

MÉMOIRE

présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour l'obtention du grade de Docteur ès sciences naturelles

OPTION BIOCHIMIE

par

Michel LHERMITTE

**ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS CHIMIQUES
ET IMMUNOLOGIQUES DES MUCINES
BRONCHIQUES HUMAINES
ET DE LEUR AFFINITÉ POUR LES LECTINES**



présenté le 20 avril 1977 devant la commission d'examen

MM. J. MONTREUIL, Président
R. BOURRILLON, Rapporteur
G. BISERTE, Rapporteur
Mlle G. SPICK, Rapporteur
P. ROUSSEL, examinateur

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE :

DEFINITION DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES

INTRODUCTION	11
I - ETUDE DE MUCINES ISOLEES DANS LE MUCUS BRON- CHIQUE DE MALADES ADULTES ATTEINTS DE BRON- CHITE CHRONIQUE	13
A - Préparation des mucines :	13
1) Réduction du mucus fibrillaire	13
2) Chromatographie d'échange ionique sur Ecteola- cellulose	13
3) Purification des fractions A par chromatographie de gel-filtration sur Sepharose et d'échange ioni- que sur Carboxy-méthyl-cellulose	16
4) Purification des fractions B par chromatographie de gel-filtration sur Sepharose 4B	16
5) Chromatographie des fractions C sur Ecteola- cellulose	17
6) Purification des sous-fractions C1, C2 et éventuel- lement C3 par chromatographie de gel-filtration	17
B - Propriétés électrophorétique des mucines A1, Bb, C1b, C2 b (C3 b) :	18
1) Mucines A1	18
2) Mucines Bb	18
3) Mucines C1 b, C2 b et éventuellement C3 b	19
C - Ultracentrifugation des mucines A1, Bb, C1 b, C2 b et C3 b :	19
1) Détermination de la constante de sédimentation	19
2) Détermination du poids moléculaire	20

D - Activité de groupe sanguin A, B, O des mucines bronchiques A1, Bb, C1 b, C2 b, C3 b :	20
E - Propriétés chimiques des mucines A1, Bb, C1 b, C2 b, C3 b :	21
1) Etude de l'acide aminé en position N-terminale	21
2) Etude de l'acide aminé en position C-terminale	21
3) Composition chimique	21
a - composition en acide aminé	23
b - composition glucidique	23
F - Problème des ponts disulfure dans les mucines :	40
1) Réduction et alkylation d'une mucine	42
2) Dosage de la cystéine sous forme d'acide cystéique. Oxydation performique	42
II - ETUDE DES MUCINES BRONCHIQUES NON PATHOLOGIQUES	43
A - Etude préliminaire des mucines bronchiques non pathologiques	44
1) Etude des mucines de la fraction soluble	46
2) Etude des mucines du mucus solubilisé	46
B - Etude chimique de mucines bronchiques humaines obtenues par lavages de bronches macroscopiquement saines chez six sujets de groupe sanguin O :	48
1) Réduction du pool de mucus bronchique	48
2) Purification des mucines bronchiques non pathologiques	49

3) Etude électrophorétique des fractions F3 b et F4 b	50
4) Composition chimique des mucines F3 b et F4 b	50
CONCLUSION	54
<u>DEUXIEME PARTIE :</u>	
ETUDE DES PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DES MUCINES HUMAINES	
INTRODUCTION	62
I - ANTIGENICITE DES MUCINES BRONCHIQUES NEUTRES	64
A - Préparation des mucines bronchiques S6B	64
B - Etude des immunsérums préparés à partir des mucines S6B	64
1) Constituants révélés dans le mucus bronchique réduit	69
2) Pluralité des déterminants antigéniques révélés dans les fractions S6 B	70
a - Immunoélectrophorèse simple	70
b - Immunoélectrophorèse bidimensionnelle	70
C - Purification des mucines bronchiques neutres S6 B	71
D - Caractéristiques des fractions A1 et A2	71
1) Mucines A1	71
2) Mucines A2	73

E - Etude des immunsérums préparés à partir des mucines	
A1	73
1) Révélation des protéides différents des mucines	73
2) Immunoélectrophorèse bidimensionnelle des mucines A1	73
II - LOCALISATION TISSULAIRE DU DETERMINANT ANTIGENIQUE REVELE PAR L'IMMUNSERUM ANTI-A1	75
III - ETUDE DU SITE ANTIGENIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES NEUTRES	76
A - Recherche d'une composante peptidique dans le site antigénique	76
1) Action de la trypsine	76
2) Action successive de la trypsine, de la papaine, et de la pronase	77
3) Action de la pronase	78
B - Recherche d'une composante glucidique dans le site antigénique des mucines neutres	79
1) Oxydation periodique	79
2) Action de la galactose oxydase et oxydation par le brome	80
3) Recherche d'un déterminant antigénique analogue aux substances de groupe	80
IV - ROLE D'ADJUVANT IMMUNITAIRE DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES	84
CONCLUSION	87

TROISIEME PARTIE

AFFINITE DES LECTINES POUR LES MUCINES BRONCHIQUES ET POUR LA MUQUEUSE BRONCHIQUE HUMAINE

INTRODUCTION	90
I - DESCRIPTION DES LECTINES UTILISEES	92
A - Hémagglutinine I du genêt épineux (<u>Ulex Europeus</u>)	92
B - Lectine du lotier corniculé (<u>Lotus Tetragonolobus</u>)	92
C - Lectine de germe de blé (<u>Tri ticum Vulgaris</u>)	92
D - Lectine du Soja (<u>Glycine max</u>)	93
E - Lectines du ricin (<u>Ricinus Communis</u>)	93
1) Préparation des lectines de <u>Ricinus Communis</u>	94
2) Fractionnement des lectines de <u>Ricinus Communis</u>	94
3) Propriétés des lectines obtenues	94
a - ultracentrifugation	94
b - composition en acides aminés	94
c - détermination des acides aminés en position N-terminale	96
4) Purification des lectines de <u>Ricinus Communis</u>	96
a - chromatographie d'échange ionique sur carboxy- méthyl-cellulose	96
b - propriétés des lectines purifiées	96

- électrophorèse sur acétate de cellulose	96
- électrophorèse sur gel de polyacrylamide	97
- composition chimique	97
- détermination des acides aminés en position N-terminale	97
- électrophorèse en gel de polyacrylamide des produits de réduction des fractions 2b et 3b	99
5) Conclusion	99
F - Lectine de Cacahuète (<u>Arachis Hypogea</u>)	103
G - Lectine de la Fève-Jack (<u>Canavalia Ensiformis</u>)	104
H - Lectine de Limuline (<u>Limulus Polyphemus</u>)	105
II - ETUDE DE L'AFFINITE DES LECTINES POUR LES MU- CINES BRONCHIQUES HUMAINES	106
A - Affinité de la lectine I du genêt épineux pour les mu- cines bronchiques humaines	106
B - Affinité de la lectine du loter corniculé pour les muc- ines bronchiques humaines	107
C - Affinité de la lectine du germe de blé pour les mucines bronchiques humaines	110
D - Affinité de la lectine de soja pour les mucines bronchi- ques humaines	111

E - Affinité des lectines du ricin pour les mucines bronchiques humaines	112
1) RCA _I	112
2) RCA _{II}	113
F - Affinité de la lectine de cacahuète pour les mucines bronchiques humaines	113
G - Affinité de la lectine de la Fève-Jack ou Concanavalline A pour les mucines bronchiques humaines	115
Conclusion	115
 III - UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE POUR L'ETUDE DES GLYCOPROTEIDES BRONCHIQUES HUMAINS	122
A - Fractionnement du mucus réduit	122
B - Préparation de la colonne d'affinité	123
C - Etude de la fraction 2 par chromatographie d'affinité sur colonne de Sephadex G25 couplé aux lectines de Ricin	126
1) Chromatographie d'affinité	126
2) Etude des fractions obtenues	126
a - double diffusion en agarose	126
b - électrophorèse	126
c - composition chimique	127
3) Etude de la réactivité de la fraction 2a après délipidation	127

D - Etude de la fraction 3 par chromatographie d'affinité sur colonne de Sephadex G25 couplé aux lectines du Ricin	128
1) Chromatographie d'affinité	128
2) Etude des fractions obtenues	128
a - double diffusion en agarose	128
b - électrophorèse	128
3) Chromatographie de gel filtration de la fraction 3b	129
4) Etude immuno-électrophorétique des fractions 3b ₁ , 3b ₂ , 3b ₃ et 3c	129
5) Discussion	130

IV - ETUDE HISTOCHIMIQUE ET ETUDE DE L'AFFINITE DES
LECTINES POUR LA MUQUEUSE BRONCHIQUE HUMAINE
"SAINE" 131

A - Choix du fixateur 133

1) Coloration de la muqueuse bronchique humaine par le réactif de Schiff après oxydation periodique (PAS) et par le bleu Alcian à différents pH	133
2) Solubilité des mucines	136
3) Etude électrophorétique des mucines en agarose à pH 8,2 avec fixation des électrophorégrammes dans le formol à 4 %, le Carnoy et le Bouin Alcoo- lique	137

B - Etude de la muqueuse bronchique humaine à l'aide de
lectines marquées à la peroxydase 138

1) Affinité de la lectine à fucose du genêt épineux pour les cellules de la muqueuse bronchique humai- ne	138
---	-----

2) Affinité de la lectine de lotier pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	140
3) Affinité de la lectine de germe de blé pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	140
4) Affinité de la lectine du soja pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	141
5) Affinité de la lectine de ricin pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	142
a - RCA _I	142
b - RCA _{II}	143
6) Affinité de la lectine de cacahuète pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	143
7) Affinité de la lectine de la Fève-Jack pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	144
8) Affinité de la lectine de limule (Limuline) pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine	144

C - Localisation de la broncho-transferrine	146
---	-----

Conclusion	147
------------	-----

<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	153
------------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE

APPENDICE TECHNIQUE

INTRODUCTION

L'étude biochimique des sécrétions bronchiques humaines ne s'est adressée jusqu'à présent qu'aux états d'hypersécré-
tion qui représentent toujours une anomalie pathologique de la fonction muco-sécrétoire (bronchite chronique, mucoviscidose...). C'est ainsi qu'un certain nombre d'éléments de composition ou de structure caractéristiques de la sécrétion trachéo-bronchique ont pu être définis à partir d'hypersécrétions bronchiques chroniques.

La sécrétion physiologique est normalement déglutie et ne peut donc pas être recueillie.

Des lavages bronchiques réalisés dans des zones macroscopiquement saines ne permettent que de recueillir que de très faibles quantités d'une sécrétion qui pourrait éventuellement servir d'élément de référence.

L'examen macroscopique d'une expectoration permet de distinguer plusieurs phases. L'addition de trois volumes de sérum physiologique à une expectoration fraîchement émise, permet après vingt minutes d'agitation douce d'obtenir par centrifugation trois parties distinctes :

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

L'expectoration bronchique apparaît donc hétérogène.

La phase superficielle se caractérise par ses propriétés tensio-actives et par la facilité avec laquelle elle donne une "mousse" par simple agitation. Elle contient notamment une dipalmitoyllecithine (WAREMBOURG et Coll., 1968) en tous points semblables à celle décrite par ABRAMS et TAYLOR (1964); ABRAMS (1966); FINLEY et Coll. (1966 et 1968); HARLAN et Coll. (1966) et MORGAN et Coll. (1965) et qui est considérée comme l'un des éléments essentiels du surfactant alvéolaire.

La phase aqueuse de l'expectoration représente un extrait des constituants hydrosolubles de l'expectoration.

Elle renferme de nombreux composants apparentés aux protéines et glycoprotéines du sérum humain. L'étude immunoelectrophorétique (BISERTE et Coll. 1963); (MAURER, 1968); (RYLEY 1970); (BROGAN et Coll. 1971) permet de caractériser la présence de sérum albumine, d'orosomucoïde, d' α_1 anti-trypsine, d'haptoglobine, de transferrine, d'hémopexine, de la fraction C'3 du complément et d'immunoglobulines telles que les Ig A et les Ig G. Les concentrations des

constituants protéiques de la partie soluble de la sécrétion bronchique peuvent être déterminées assez exactement (RYLEY et BROGAN, 1968) et sont variables d'une sécrétion à l'autre. La phase aqueuse de l'expectoration renferme aussi de l' α_1 antichymotrypsine (RYLEY et BROGAN, 1973), une amylase antigéniquement analogue à l'amylase salivaire (BISERTE et Coll, 1963) qui a aussi été retrouvée dans des prélèvements endobronchiques (LAINE et HAYEM, 1976).

D'autre part, la présence de plusieurs protéines d'origine non plasmatique au sein de la partie soluble du mucus est rapportée par RYLEY (1972). On y trouve du lysozyme (LORENZ et Coll., 1957), un constituant mis en évidence par BISERTE et Coll. (1963) et qui est antigéniquement analogue à la lactotransferrine (MONTREUIL et Coll. 1960), des Ig A sécrétoires (MASSON et HEREMANS, 1966), une peroxydase (SLOWEY et Coll., 1968), une protéine précipitable par les ions calcium et la présence de quatre à cinq protéines de nature inconnue (RYLEY, 1972).

D'autres enzymes, tels que des protéases et des exoenzymes d'origine cellulaire et bactérienne, sont également mis en évidence dans cette phase soluble (LIEBERMAN et KORNICK, 1964); (LIEBERMAN et Coll., 1965); (SCHULTZE et HEREMANS, 1966).

La phase fibrillaire, insoluble dans l'eau, représente la partie organisée de l'expectoration. Au sein de cette structure fibrillaire se trouvent des éléments cellulaires, (des polynucléaires notamment...). Cette structure comprend trois systèmes de fibres visualisées en microscopie électronique et classées selon leur richesse en acides dexosyribonucléiques, en "polysaccharides", et en protéines (WHITE et coll., 1954). L'architecture microfibrillaire est confirmée par les études

en microscopie optique de BISERTE et Coll. (1963) et de BURGI (1964).

Les fibres, insolubles dans l'eau, ne peuvent migrer sur les supports d'électrophorèse de zone et précipitent au point de dépôt. En conséquence, l'étude de la nature des composants impliqués dans la structure des réseaux fibrillaires d'une expectoration ne peut être effectuée qu'après dégradation suffisante de l'architecture fibrillaire.

Pour désagréger et solubiliser le réseau de fibrilles bronchiques, on peut employer deux sortes de substances agissant sur des liaisons covalentes : les enzymes protéolytiques telle que la pepsine (BROGAN, 1959) ou la papaine et la pronase (DEGAND et Coll. 1974) et les agents réducteurs comme le mercaptoéthanol (GERNEZ-RIEUX et Coll., 1964), qui rompent les ponts disulfure des protéines. Ces agents "mucolytiques" ont une action plus puissante et plus complète que celle des agents de rupture des liaisons non covalentes intéressées dans les structures quaternaire et tertiaire des protéines et glycoprotéines (modification de pH, de force ionique, action d'agents complexants tel que l'EDTA, solution d'urée à forte concentration), qui dépolymérisent ou désorganisent insuffisamment le gel pour permettre facilement l'étude et la purification des produits libérés.

Depuis 1968, dans notre laboratoire, divers protocoles de fractionnement ont été successivement appliqués aux produits de réduction du mucus fibrillaire de l'expectoration. Les mucines bronchiques peuvent être isolées sur la base de leur poids moléculaire et de leur caractère polyanionique plus ou moins marqué. Ainsi ont été utilisées, l'électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage (HAVEZ et Coll., 1969, a), la précipitation au voisinage du point isoélectrique

(HAVEZ et Coll., 1969, b), la chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose (ROUSSEL et Coll., 1971), la chromatographie d'échange d'ions sur colonne d'Ecteola-Cellulose (ROUSSEL et Coll., 1972). Mais aucune de ces techniques prise isolément ne permet une préparation de mucines bronchiques totalement débarrassée des protéines de sécrétion.

Divers couplages de ces méthodes de fractionnement appliquées à l'étude de sécrétions individuelles ont amené DEGAND (1972) à retenir l'utilisation combinée de la chromatographie d'échange ionique sur Ecteola-Cellulose et de la chromatographie de gel filtration sur Sépharose pour préparer les mucines bronchiques. Les progrès réalisés dans la purification des mucines ont été guidés par l'étude de la composition en acides aminés qui a montré un enrichissement progressif en hydroxy-amino-acides dont l'importance est assez caractéristique des mucines.

La chromatographie d'échange ionique sur Ecteola-Cellulose permet un fractionnement des mucines bronchiques, fondé sur leur caractère anionique plus ou moins marqué. Les différentes classes de mucines (DEGAND, 1972); (HAVEZ et Coll., 1973) sont homogènes en électrophorèse en agarose et en chromatographie de gel filtration.

L'ultracentrifugation (DEGAND et Coll., 1973) a permis de confirmer l'homogénéité des préparations obtenues et de préciser les valeurs des coefficients de sédimentation d'une fucomucine ($S_{20,w}^{\circ}$ de 10,85 s et masse moléculaire $M_{20,w}^{\circ}$ de 600.000 daltons).

L'étude de la composition chimique des différentes classes de mucines (DEGAND, 1972) montre que la partie polypeptidique

possède un certain nombre de caractères essentiels :

- richesse en thréonine et en sérine qui représentent de 35 à 45 % des acides aminés dosés.

- richesse en proline, alanine et glyco-colle.

Ces cinq acides aminés représentent environ 75 % des résidus d'acides aminés impliqués dans la structure du squelette polypeptidique.

De plus, à l'homogénéité de composition de l'axe polypeptidique des mucines bronchiques s'oppose la grande variabilité de composition glucidique. En effet, les mucines bronchiques renferment de 75 à 85 % de glucides combinés comprenant du fucose, du galactose, de la N-acétyl-galactosamine et de la N-acétyl-glucosamine. Certaines contiennent en plus de l'acide N-acétyl-neuraminique et des groupements sulfate. Les variations de composition de la partie glycanique ont amené DEGAND (1972) et HAVEZ et Coll. (1973) à retenir une classification des mucines bronchiques en trois groupes en fonction des trois variables représentées respectivement par le fucose, l'acide N-acétyl-neuraminique et les groupes sulfate.

1) les fucomucines correspondent à des glycoprotéines dont une partie de la structure des glycannes est génétiquement déterminée par le caractère sécréteur (groupe Lewis) et par le groupe sanguin (A, B, O) du sujet. Elles renferment de 15 à 20 % de fucose. Cependant, de très faibles quantités d'acide N-acétyl-neuraminique et de sulfate peuvent être trouvées dans ces mucines.

2) les sialomucines sont riches en acide N-acétyl-neuraminique aisément clivable par l'action des neuraminidases (HAVEZ et Coll. 1973). L'étude de leur composition démontre cependant leur caractère hybride puisqu'elles contiennent aussi des groupements sulfate.

3) Les sulfomucines possèdent toujours un caractère électro-négatif beaucoup plus marqué que les sialomucines. Elles sont insensibles à l'action des neuraminidases. Dans leur composition caractérisée par un taux plus faible d'acide sialique et de fucose, la teneur en groupements sulfate est toujours très élevée.

Les mucines bronchiques comportent des chaînes glycaniques reliées au squelette polypeptidique par des liaisons alcalilabiles formées entre les groupements hydroxylés de la sérine et de la thréonine et un résidu de N-acétyl-galactosamine (HAVEZ et Coll., 1969 b); (DEGAND, 1972).

L'hétérogénéité des différentes mucines bronchiques isolées de l'expectoration de malades atteints de bronchite chronique est très marquée. Dans d'autres sécrétions pathologiques, cette hétérogénéité n'est pas aussi marquée, puisque dans les cancers bronchiolo-alvéolaires, on trouve principalement des mucines neutres (ASSELAIN et Coll. 1968) et dans la mucoviscidose, on isole surtout des mucines acides (ROUSSEL et Coll., 1968); (LAMBLIN et Coll., 1972), contenant à la fois des résidus d'acide N-acétyl-neuraminique et des groupements sulfate. (ROUSSEL et Coll., 1972).

D'autre part, ROUSSEL et Coll. (1975) ont montré qu'il existait une hétérogénéité des glycanes au sein d'un même groupe de mucines : par exemple dans les mucines sulfatées sécrétées au cours de la mucoviscidose, la longueur moyenne des chaînes glycaniques augmente avec le degré de sulfatation.

Les études histochimiques réalisées sur des biopsies de muqueuses bronchiques humaines ont aussi permis de mettre en

évidence une hétérogénéité au niveau des cellules qui synthétisent les mucines bronchiques.

Trois types cellulaires participent à l'élaboration du mucus :

- 1) au niveau de l'épithélium de surface, les cellules caliciformes dont la moitié apicale renferme des "boules" de mucigène.
- 2) les cellules muqueuses des glandes muqueuses qui contiennent de nombreuses "boules" de mucigène.
- 3) les cellules séreuses des glandes séreuses et des glandes mixtes (croissant de GIANUZZI) qui présentent dans leur cytoplasme de nombreuses granulations sécrétoires.

La présence de mucus et de glycoprotéines au niveau cellulaire a pu être mise en évidence au moyen de colorations spécifiques ainsi, le réactif de Schiff, après oxydation periodique, colore intensément les cellules caliciformes et les cellules muqueuses. L'utilisation du Bleu alcian à différents pH permet de localiser et de différencier les sialomucines et les sulfomucines.

D'autre part, la présence de glycoprotéines ayant une activité de groupe sanguin est mise en évidence dans les cellules caliciformes et les glandes muqueuses (SZULMAN, 1960). En 1967, HAVEZ et Coll. démontrent qu'il existe un processus actif de sulfatation au niveau des cellules caliciformes et des cellules séreuses des glandes mixtes.

LAMB (1968), LAMB et REID (1968) et REID (1974)

associent l'action d'enzymes (neuraminidase...) et les colorations spécifiques des glycoprotéines et démontrent que les cellules responsables de la synthèse des glycoprotéines acides (sialomucines et sulfomucines) peuvent être individualisées en plusieurs types.

REID et De HALLER (1967) montrent après une étude histochimique que la production des mucines bronchiques acides varie avec l'âge, puisque seules des mucines sulfatées sont synthétisées chez le fœtus et le nouveau-né.

Il existe donc à la fois une hétérogénéité des mucines bronchiques sécrétées et des cellules responsables de leur production. De plus, le lieu de synthèse des différentes mucines n'est pas encore connu de façon définitive.

Les travaux biochimiques antérieurs ont donc permis de démontrer l'hétérogénéité des mucines bronchiques qui peuvent être isolées de sécrétions pathologiques individuelles et même, au sein d'un type de molécules déterminé, l'hétérogénéité des chaînes glycaniques liées au squelette polypeptidique.

Parallèlement, des travaux histochimiques ont permis de constater l'hétérogénéité des cellules bronchiques qui peuvent être impliquées dans la synthèse des mucines.

Cependant, les "retombées" de ces différents travaux, en ce qui concerne le diagnostic ou le pronostic des bronchopathies humaines, sont encore très parcellaires et justifient, si besoin était, la poursuite d'une étude fondamentale des mucines bronchiques et des cellules qui les synthétisent.

En fonction de ces données, nous avons recherché dans notre travail, la réalisation de plusieurs objectifs :

Dans la première partie, nous avons cherché à préciser la définition biochimique des différentes classes de mucines bronchiques isolées de sécrétions pathologiques et à trouver des éléments de référence se rapprochant de la sécrétion physiologique humaine.

Dans la seconde partie, nous avons étudié les propriétés antigéniques de certaines classes de mucines dans l'espoir d'améliorer encore cette classification des mucines.

Dans la troisième partie, nous avons utilisé un certain nombre de lectines pour essayer d'affirmer la définition des différents types de mucines et éventuellement, d'établir des corrélations entre les molécules sécrétées et les cellules qui les synthétisent.

PREMIERE PARTIE

DEFINITION DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES

INTRODUCTION

La classification des mucines bronchiques humaines utilisée par DEGAND (1972) et HAVEZ et Coll. (1973) est fondée sur la variation de trois paramètres : fucose, acide N-acétyl-neuraminique et groupements sulfate contenus dans les chaînes glycaniques des mucines isolées du mucus fibrillaire.

Dans une première étape, l'étude de l'hétérogénéité des mucines bronchiques a été poursuivie sur des mucines isolées de l'expectoration de malades atteints de bronchite chronique (3 de groupe sanguin O et 2 de groupe sanguin A), par un protocole de fractionnement utilisant la chromatographie sur Ecteola-Cellulose et la gel filtration sur Sepharose et différant légèrement de celui qui a été préconisé par DEGAND (1972).

Nous avons cherché à déterminer si les classes de mucines différaient seulement les unes des autres par les proportions de fucose, d'acide sialique ou de groupements sulfate, éléments considérés comme ayant généralement une situation périphérique sur les chaînes glycaniques, et si l'étude de leur composition chimique permettait de dégager certaines informations concernant la partie plus interne

des chaînes glycaniques.

Par ailleurs, si l'étude de la composition en acides aminés des mucines semble en faveur du caractère monomorphe de leur axe polypeptidique, un problème important demeure : celui de la présence et éventuellement du rôle de la cystéine dans leur structuration.

Après réduction du mucus fibrillaire par le mercaptoéthanol et blocage des thiols libres par l'iodo-acétamide marquée, HAVEZ et Coll. (1973) ont démontré qu'il n'y avait pratiquement pas de radioactivité fixée sur les mucines. Plus récemment, ROBERTS (1974), par des expériences analogues, a montré que la cystéine existait en quantité faible et variable d'une préparation de mucine à l'autre. Il a même proposé différents schémas de structures des mucines fondés sur la présence de ponts disulfure (1976).

Nous avons ainsi été amené à préciser le taux de cystéine des mucines et à vérifier si cet acide aminé jouait un rôle dans la structure des molécules isolées.

Dans une deuxième étape, nous avons essayé d'obtenir à partir de lavages bronchiques réalisés dans des zones de la muqueuse macroscopiquement saines, des mucines pouvant éventuellement servir d'éléments de référence pour les différentes classes de mucines bronchiques isolées de l'expectoration, c'est-à-dire, de sécrétions bronchiques pathologiques.

RESULTATS

I - ETUDE DES MUCINES ISOLEES DANS LE MUCUS BRONCHIQUE DE
MALADES ADULTES ATTEINTS DE BRONCHITE CHRONIQUE

A - PREPARATION DES MUCINES :

1) Réduction du mucus fibrillaire :

Le mucus bronchique fibrillaire est préparé à partir d'expectorations de malades atteints de bronchite chronique. Après réduction par le mercapto-éthanol pendant 4 h à 37°C, on obtient une fraction adialysable de mucus fibrillaire réduit dont le pourcentage obtenu pour chaque sécrétion est indiqué dans le tableau I. Le rendement par rapport au mucus fibrillaire est de 61 et 69 % chez les 2 sujets de groupe sanguin A (WAS... et VAN...) et environ de 45 % pour les 3 sujets de groupe sanguin H (MAR..., BIA... et PRO...). Les mucines sont ensuite préparées à partir du mucus fibrillaire réduit, par différentes étapes chromatographiques.

2) Chromatographie d'échange ionique sur Ecteola-cellulose :

Les mucus réduits sont soumis à une chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose équilibrée dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M et éluée par des solutions de molarité croissante en chlorure de sodium. La chromatographie sur colonnes d'Ecteola-cellulose permet ainsi de séparer trois fractions contenant chacune des mucines.

MALADES	mucus fibrillaire	fraction adialysable du mucus réduit	MUCINES					Total
			A1	Bb	C1 b	C2 b	C3 b	
MAR...	13,7 g	45,25 %	1,63 %	1,79 %	1,18 %	0,48 %	0,23 %	5,31 %
BIA...	64,5 g	45,27 %	0,05 %	0,41 %	0,75 %	0,52 %		1,73 %
PRO...	17,2 g	44,90 %	0,38 %	1,07 %	1,00 %	1,74 %		4,19 %
WAS...	10 g	69,00 %	7,10 %	2,68 %	0,34 %	0,72 %		10,84 %
VAN...	10 g	61,00 %	4,30 %	1,79 %	0,23 %	0,60 %		6,92 %

TABEAU I : Rendements de la fraction adialysable de mucus réduit et des différentes classes de mucines obtenues après fractionnement du mucus fibrillaire de cinq malades atteints de bronchite chronique.

Ces rendements sont exprimés en pourcentages par rapport au mucus fibrillaire non réduit.

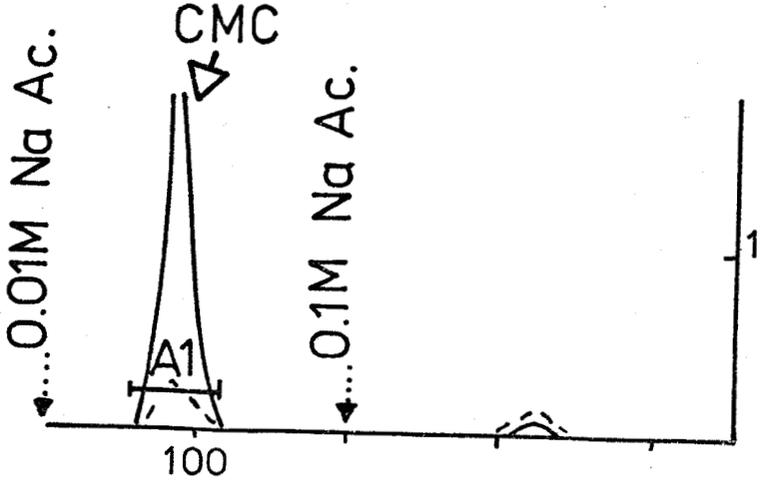
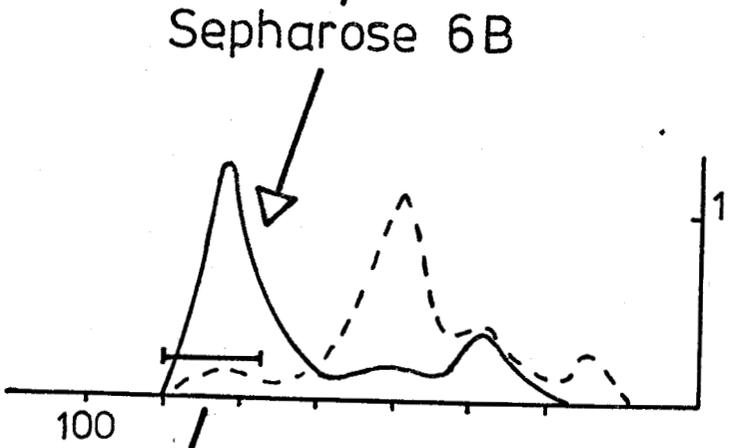
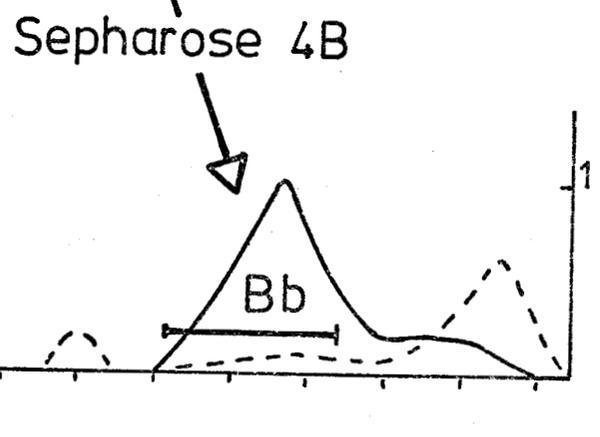
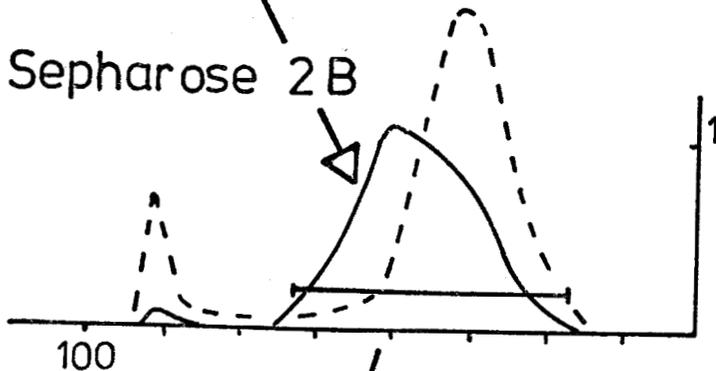
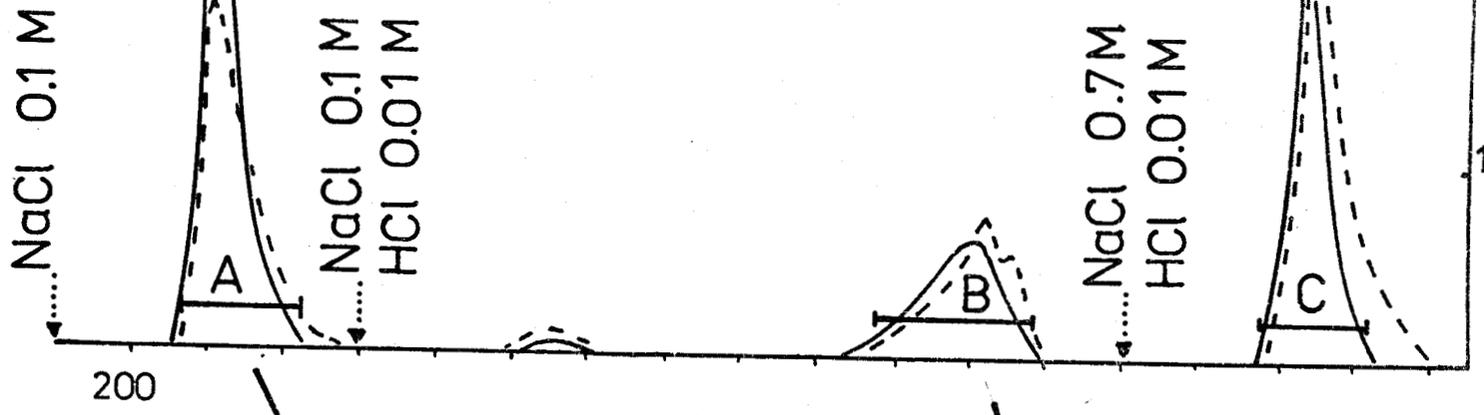


Dans l'expectoration des trois sujets de groupe sanguin O, (le fractionnement du mucus réduit de MAR... sur colonne d'Ecteola-cellulose est représenté sur la fig. 1), la solution de chlorure de sodium 0,1 M permet d'éluer une fraction A (fig. 1) représentant respectivement 12,0 (MAR...), 6,3 (BIA...) et 6,7 % (PRO...) du mucus fibrillaire initial. La solution de chlorure de sodium 0,1 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M permet d'éluer une fraction B (fig. 1) qui représente 3,7 (MAR...), 4,3 (BIA...) et 4,6 % (PRO...) du mucus initial. La colonne est alors éluee par une solution de chlorure de sodium 0,7 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M, on obtient ainsi une fraction C (fig. 1) représentant respectivement 5,7 (MAR...), 9,1 (BIA...) et 6,7 % (PRO...) du mucus fibrillaire initial.

Un protocole de fractionnement sensiblement identique est appliqué aux mucus des 2 sujets de groupe sanguin A. La plus grande partie des mucines ne sont pas retenues sur la colonne et sont éluées par la solution de chlorure de sodium 0,1 M. Cette fraction A représente respectivement 27,1 (WAS...), et 24,9 % (VAN...) du mucus fibrillaire initial. Une fraction B est éluee par la solution de chlorure de sodium 0,1 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M; elle représente 5 % du mucus fibrillaire initial dans les 2 sécrétions (VAN... et WAS...). Une dernière fraction C est éluee par la solution de chlorure de sodium 0,4 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M; il s'agit d'une fraction mineure représentant 3,8 % (WAS...) et 3,7 % (VAN...) du mucus fibrillaire initial.

Ce fractionnement sur Ecteola-cellulose fondé sur les différences de point isoélectrique permet donc d'obtenir à partir de chaque sécrétion trois fractions riches en oses combinés qui sont ensuite dialysées et lyophilisées.

Ecteola



absorbance

volume (ml)



3) Purification des fractions A par chromatographie de gel-filtration sur Sepharose et d'échange ionique sur carboxy-méthylcellulose :

Toutes les fractions A sont soumises à une chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sepharose 2 B équilibrée et éluée dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 contenant du chlorure de sodium 0,2 M. On peut ainsi séparer les mucines d'un contaminant de haut poids moléculaire exclu de la colonne (fig. 1).

La fraction dont l'élution est retardée et qui contient les mucines est dialysée et lyophilisée. On la soumet ensuite à une chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sepharose 6B dans le même tampon. On sépare ainsi les mucines de plusieurs constituants de poids moléculaire plus faible absorbant la lumière ultra-violette à 278 nm (fig. 1).

Les mucines préparées par chromatographie sur Sepharose 6 B sont enfin purifiées par chromatographie sur une colonne de carboxy-méthylcellulose équilibrée et éluée dans un tampon acétate de sodium 0,01 M de pH 5,5. L'importance de cette étape chromatographique est étudiée dans la deuxième partie de ce travail. Les mucines ainsi purifiées sont appelées A1 et les rendements obtenus par rapport au mucus fibrillaire initial sont résumés dans le tableau I.

4) Purification des fractions B par chromatographie de gel-filtration sur Sepharose 4 B :

Toutes les fractions B sont purifiées sur une colonne de Sepharose 4 B équilibrée et éluée dans le tampon Tris-HCl

0,1 M de pH 8,0 contenant du chlorure de sodium 0,2 M. On obtient ainsi des mucines Bb, qui ont une élution légèrement retardée (fig.1), débarassées de contaminants de haut poids moléculaire exclus de la colonne et de composants de poids moléculaire plus faible dont l'élution est très retardée. La proportion de chaque mucine Bb isolée à partir des sécrétions individuelles est indiquée dans le tableau I.

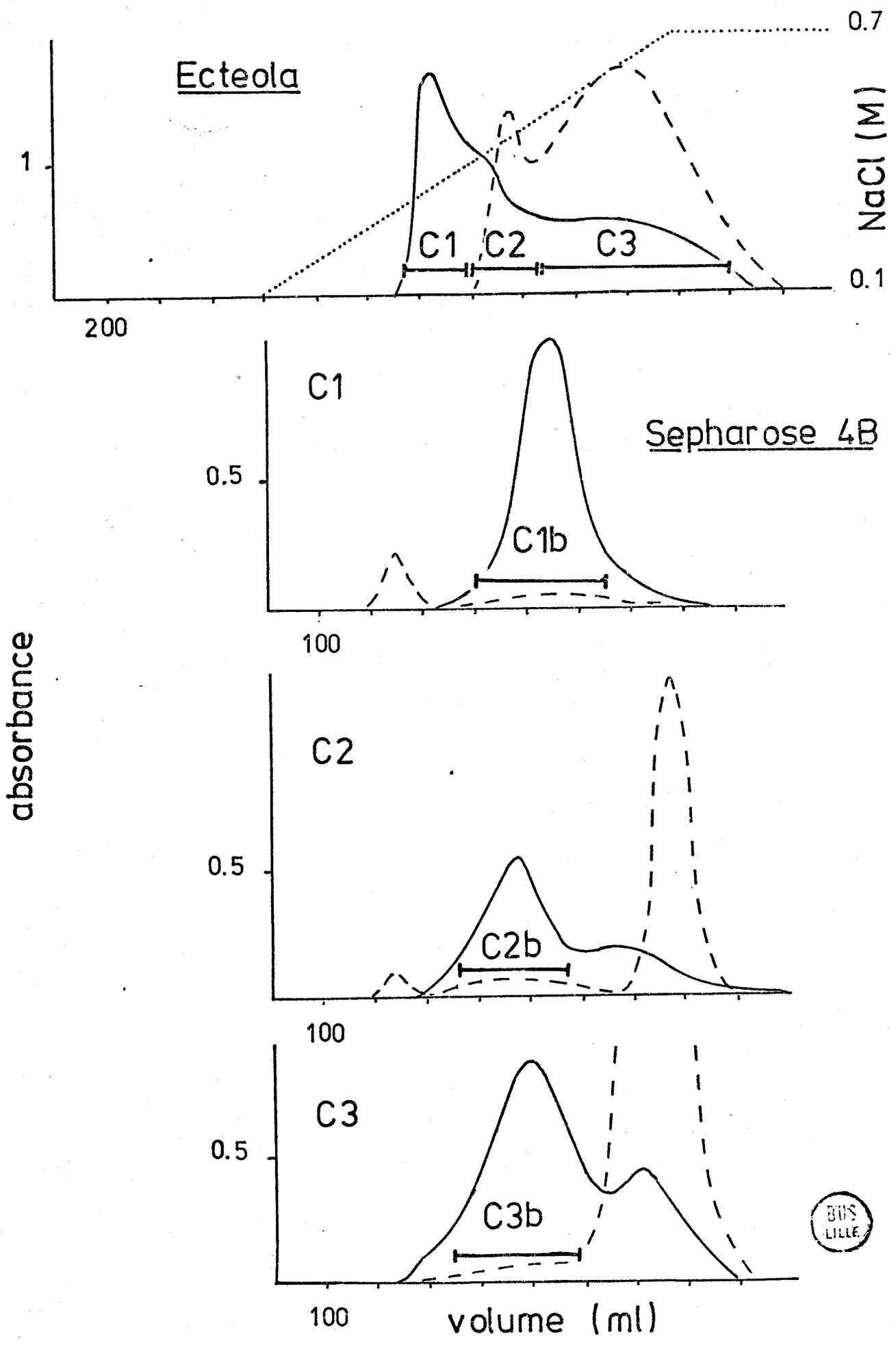
5) Chromatographie des fractions C sur Ecteola-Cellulose :

Les fractions C sont soumises à une chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose équilibrée dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M. L'élution est réalisée, soit à l'aide d'un gradient continu de chlorure de sodium de 0,1 à 0,7 M dans le cas des fractions C des sécrétions de malades de groupe sanguin O (MAR..., BIA..., PRO...), soit à l'aide d'un gradient continu de chlorure de sodium de 0,1 à 0,4 M dans le cas des fractions C des sécrétions de malades de groupe sanguin A (WAS... et VAN...).

Les fractions C peuvent ainsi être séparées en plusieurs sous-fractions. A partir des fractions C de BIA..., PRO..., WAS... et VAN... on a découpé arbitrairement 2 sous-fractions C1 et C2, tandis que la fraction C de MAR..., dont le profil d'élution montrait 3 épaulements, a été découpée arbitrairement en 3 sous-fractions C1, C2 et C3 (fig. 2).

6) Purification des sous-fractions C1, C2 et éventuellement C3 par chromatographie de gel-filtration :

Après dialyse et lyophilisation, les sous-fractions C1, C2 et éventuellement C3 sont soumises à une chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sepharose 4B, équilibrée et éluee



par un tampon Tris 0,1 M, de pH 8,0, contenant du chlorure de sodium 0,2 M. On obtient ainsi (fig. 2) les fractions de mucines C1 b, C2 b et éventuellement C3 b débarassées de contaminants de haut poids moléculaire exclus de la colonne et de composés de plus faible poids moléculaire dont l'éluion est très retardée. La proportion de chacune des fractions de mucines C1 b et C2 b et éventuellement C3 b, obtenues pour chaque malade, est indiquée dans le tableau I.

Pour chaque sécrétion, le rendement total des mucines isolées et purifiées est rapporté dans le tableau I. Les mucines A1, Bb, C1 b, C2 b et éventuellement C3 b sont ensuite étudiées en électrophorèse en agarose à pH 8,2.

B - PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES DES MUCINES A1, Bb, C1 b, C2 b, (C3 b) :

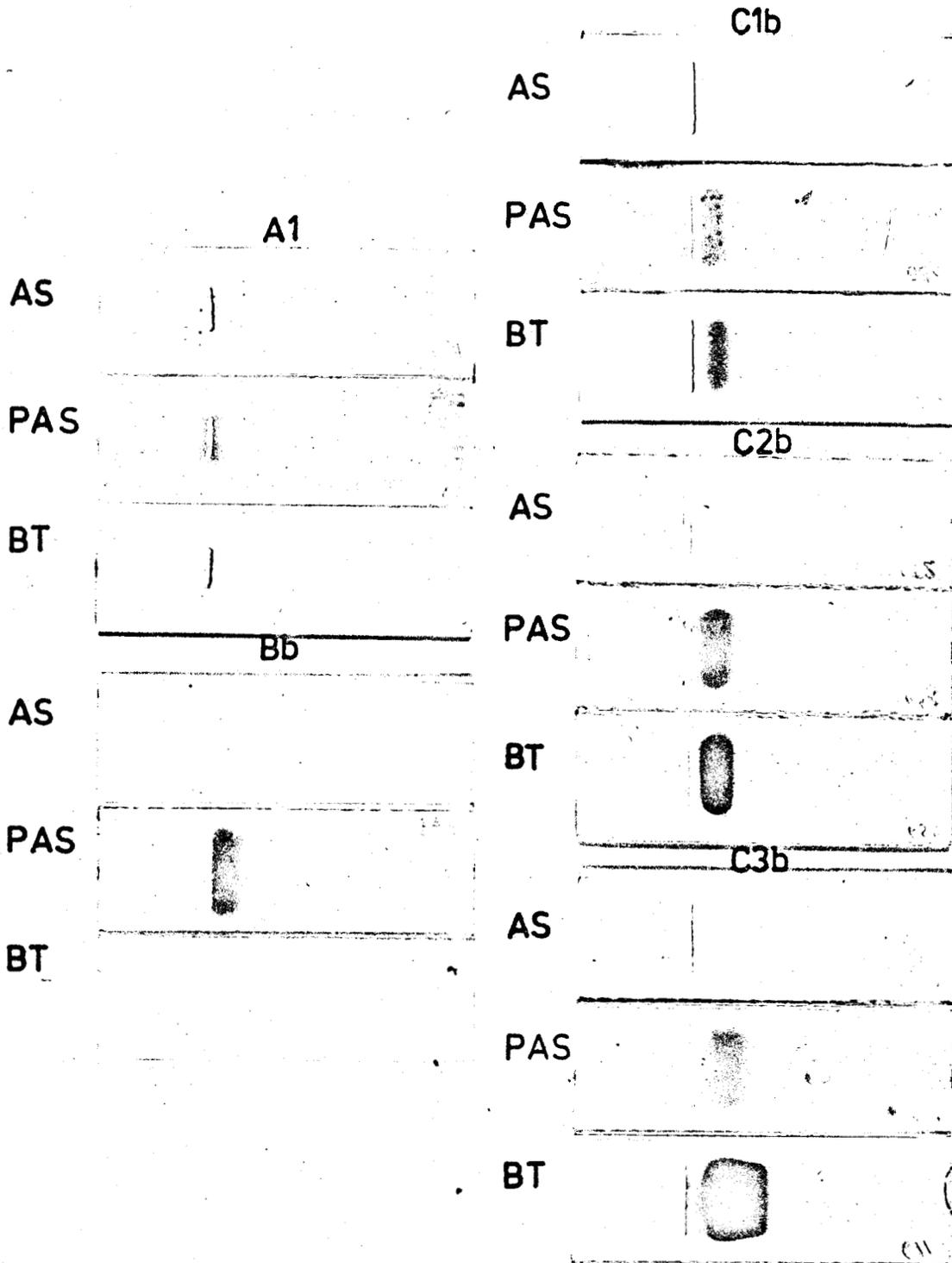
1) Mucines A1 :

L'électrophorèse à pH 8,2 des mucines A1 (fig. 3) montre qu'elles ont une faible migration du côté anodique du godet de dépôt. Elles sont faiblement colorées par l'amidoschwarz, intensément révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique, mais généralement pas révélées par le bleu de Toluidine, sauf les mucines A1 de MAR... qui sont très faiblement révélées (fig. 3).

2) Mucines Bb :

Les mucines Bb ont une migration légèrement plus anodique que les mucines A1. Elles sont peu ou pas révélées par l'amidoschwarz, intensément révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique et ne sont pas colorées par le bleu de Toluidine (fig. 3).

MAR...



BIIS
LILLE

111

3) Mucines C1 b, C2 b, et éventuellement C3 b :

Les mucines C1 b et C2 b ont une migration plus anodique que la fraction Bb (fig. 3). La fraction C1 b a une migration inférieure à celle de C2 b. Elles ne sont pas révélées par l'amidoschwarz mais sont intensément révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique et de plus en plus intensément révélées par le bleu de Toluidine. Les mucines C3 b ont une migration anodique supérieure à celle des mucines C2 b. Elles ne sont pas révélées par l'amidoschwarz, sont révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique et colorées plus intensément que les mucines C2 b par le bleu de Toluidine (fig. 3).

C - ULTRACENTRIFUGATION DES MUCINES A1, Bb, C1 b, C2 b et C3 b :

1) Détermination de la constante de sédimentation :

L'ultracentrifugation a été réalisée sur les fractions de mucines A1, Bb, C1 b, C2 b et C3 b du malade MAR... et montre que la fraction de mucines A1 est homogène (un pic symétrique). La valeur du coefficient de sédimentation est de $S^{\circ}_{20w} = 9,1 \text{ s.}$

La fraction de mucines Bb est également homogène (un pic symétrique); son coefficient de sédimentation a une valeur de $S^{\circ}_{20w} = 9,4 \text{ s.}$

Les mucines C1 b contiennent deux fractions : l'une mineure a un coefficient de sédimentation de 9,6 s, l'autre majeure de 7,9 s.

Les mucines C2 b sont elles aussi hétérogènes puisqu

l'ultracentrifugation révèle l'existence de deux pics, l'un mineur de coefficient de sédimentation 11,7 s et l'autre majeur de 10,2 s.

Les mucines C3 b se présentent en ultracentrifugation sous la forme d'un pic symétrique, la valeur du coefficient de sédimentation est de 9,2 s.

2) Détermination du poids moléculaire ° :

Le poids moléculaire des mucines a été réalisé sur les fractions de MAR... par équilibre de sédimentation. On obtient pour chacune des fractions des valeurs de M_w° qui sont respectivement :

A1 : 360 000 (+ 15 %)

Bb : 300 000 (+ 15 %)

C1 b : 440 000 (+ 15 %)

C2 b : 400 000 (+ 15 %)

C3 b : 440 000 (+ 15 %)

D - ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN A, B, O DES MUCINES BRONCHIQUES A1, Bb, C1 b, C2 b, C3 b :

La recherche de l'activité de groupe sanguin de chaque fraction de mucines montre (tableau II) que toutes les fractions de mucines isolées à partir de l'expectoration du sujet de groupe sanguin O (MAR...) ne possèdent pas d'activité de groupe sanguin H : ceci est en faveur du caractère non sécréteur du sujet MAR... Par contre, on remarque que les mucines isolées dans l'expectoration des 2 autres sujets de groupe sanguin O possèdent une activité de groupe sanguin H. La fraction A1 a une forte activité H alors que, dans les fractions plus acides, cette activité diminue.

° Nous remercions le Docteur A. VERBERT et Madame COIGNEZ qui ont bien voulu réaliser les déterminations de poids moléculaire sur ultracentrifugeuse analytique dans le laboratoire du Professeur J. MONTREUIL (Université des Sciences et Techniques de Lille - Villeneuve d'Ascq).

Les mucines A1 et Bb isolées dans l'expectoration des sujets de groupe sanguin A possèdent à la fois des activités de groupe sanguin A et H. Les fractions C1 b ont des activités de groupe sanguin A et H plus faibles et les fractions C2 b ne possèdent pas d'activité de groupe sanguin, sauf la fraction C2 b de VAN... qui conserve une activité H (tableau II).

E - PROPRIETES CHIMIQUES DES MUCINES A1, Bb, C1 b, C2 b et C3 b :

1) Etude de l'acide aminé en position N-terminale :

La détermination de l'acide aminé situé en position N-terminale a été effectuée sur les mucines A1 de WAS... et de VAN... par la méthode des dansyl-amino-acides et n'a permis de révéler qu'un seul acide aminé : l'ARGININE.

2) Etude de l'acide aminé en position C-terminale :

Après hydrazinolyse des mucines A1 de VAN..., trois amino-acides ont été identifiés : la THREONINE, la SERINE et le GLYCOCOLLE.

3) Composition chimique :

La composition chimique des mucines de MAR... qui ne présentent pas d'activité de groupe sanguin est rapportée dans le tableau III, celles des mucines des malades BIA... et PRO... qui ont des activités de groupe sanguin H dans les tableaux IV et V et celles des malades WAS... et VAN..., à activité de groupe sanguin A dans les tableaux VI et VII.

Sujets et groupe sanguin	immun-sérums utilisés	FRACTIONS DE MUCINES				
		A1	Bb	C1 b	C2 b	C3 b
MAR... (O)	anti A	-	-	-	-	-
	anti H	-	-	-	-	-
PRO... (O)	anti A	-	-	-	-	
	anti H	+++	+	+	-	
BIA... (O)	anti A	-	-	-	-	
	anti H	+++	+++	+	+	
WAS... (A)	anti A	+++++	+++	+	-	
	anti H	+++	+++	+	-	
VAN... (A)	anti A	+++++	+++	+	-	
	anti H	+++	+++	+	+	

TABLEAU II : Inhibition des antisérums A et H par les différentes classes de mucines bronchiques isolées du mucus fibrillaire de malades atteints de bronchite chronique. Les tests ont été effectués en additionnant 0,1 ml d'une solution de mucines à 2 mg/ml à un volume égal d'antisérum représentant 2 doses agglutinantes. Le mélange est incubé pendant 15min à la température du laboratoire. Après addition d'un troisième volume de globules rouges humains A ou H, le mélange est agité et incubé pendant 2 h à la température du laboratoire. Puis on lit l'agglutination (WATKINS et MORGAN, 1962). L'inhibition de l'hémagglutination observée est notée :

+++++ = très forte ; +++ = forte ; + = faible ; - = absence d'inhibition



a - composition en acides aminés :

L'examen des résultats montre que la teneur totale en acides aminés quelque soit la sécrétion étudiée, représente environ le cinquième de la molécule.

Les mucines A1, Bb, C1 b, C2 b ou C3 b sont caractérisées par une forte proportion d'acides aminés hydroxylés, SERINE et THREONINE, puisque le pourcentage de ces résidus est compris entre 38 et 51 % des résidus dosés (tableaux IIIa à VIIa). Elles sont aussi caractérisées par une teneur élevée en PROLINE, GLYCOCOLLE et ALANINE.

On trouve sur les diagrammes d'analyses des acides aminés effectuées sur auto-analyseur Beckman, un soulèvement de la ligne de base au niveau de la cystéine. La présence ou l'absence de cystéine sera discutée dans la suite de cette étude.

Les tableaux comparatifs des compositions en acides aminés des mucines isolées à partir de chaque sécrétion, mucines ayant ou n'ayant pas d'activité de groupe sanguin A ou H, ne permettent pas de mettre en évidence de différences dans la partie polypeptidique de ces molécules (tableaux IIIa à VIIa).

b) composition glucidique :

La composition glucidique des mucines isolées est rapportée dans les tableaux IIIb, IVb, Vb, VIb, VIIb. Les mucines A1, Bb, C1 b, C2 b et éventuellement C3 b ont une teneur en glucides qui représente environ 80 % de la molécule. La partie glucidique de ces mucines est caractérisée par la présence de N-acétyl-galactosamine, de N-acétylglucosamine, de fucose, de galactose, d'acide N-acétyl-neuraminique et

(1) = composition en acides aminés déterminée sur auto-analyseur Technicon

(2) = composition en acides aminés déterminée sur auto-analyseur Beckman

	A1		Bb		C1 b		C2 b		C3 b	
	R/100R _x ⁽¹⁾	μ moles/g _{xx}	R/100 R ₍₂₎	μ moles/g						
Asp	3.21	48.5	2.53	48.0	1.74	31.8	2.19	34.3	3.45	48.4
Thr	26.70	403.1	28.01	531.2	30.82	564.2	28.43	444.0	22.43	314.3
Ser	15.82	238.9	18.62	353.1	17.53	320.9	18.19	284.2	16.19	226.9
Glu	4.70	70.9	3.14	59.5	2.78	56.8	2.78	43.4	4.20	58.9
Pro	10.47	158.0	10.58	200.6	12.54	229.7	11.06	172.7	10.63	149.0
Gly	8.28	125.1	8.42	159.7	6.25	114.3	8.06	125.9	8.73	122.3
Ala	10.35	156.3	9.42	178.7	8.82	162.4	8.77	137.1	8.53	119.5
Val	4.25	63.4	4.06	77.0	4.02	73.7	3.81	59.6	3.41	47.8
Cys	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Met	-	-	0.74	14.0	1.29	23.6	1.31	20.4	2.23	31.3
Ile	2.48	37.4	2.17	41.5	2.12	38.9	1.94	30.3	1.94	27.2
Leu	4.51	68.2	3.56	67.6	3.11	57.0	3.33	52.0	4.32	60.6
Tyr	0.64	9.6	1.10	20.9	0.96	17.6	1.25	19.5	2.14	29.9
Phe	1.08	16.3	1.38	26.3	1.14	20.9	1.20	18.8	1.93	27.1
Lys	2.44	36.8	2.09	39.4	2.06	37.8	2.25	35.2	3.13	43.9
His	2.54	38.3	2.41	45.7	2.94	53.8	3.66	57.2	4.53	63.5
Arg	2.59	39.1	1.78	33.7	1.88	34.3	1.75	27.3	2.19	30.7

TABLEAU IIIa : Composition chimique des mucines isolées de l'expectoration de MAR... (sujet de groupe sanguin O).

x = Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus d'acides aminés

xx = Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

	A1		Bb		C1 b		C2 b		C3 b	
	% _{xxx}	μ moles/g _{xx}	%	μ moles/g						
Acides aminés	16.1	1509.9	18.9	1869,9	18.7	1837.7	16.0	1561.9	15.2	1401.3
Fuc	8.9	540	7.3	450	8.1	490	11.7	710	17.4	1060
Gal	26.0	1440	22.4	1240	24.3	1350	26.9	1490	26.3	1460
G. Nac	23.7	1070	22.6	1020	21.9	990	22.9	1040	21.9	990
Gal Nac	9.6	430	14.1	640	14.4	650	12.5	570	9.3	420
NANA	1.3	40	4.2	140	5.3	170	3.8	120	3.2	100
Sulfate	0.9	110	0.4	50	0.6	70	1.7	210	2.4	300

TABLEAU IIIb : Composition chimique des mucines isolées de l'expectoration de MAR... (sujet de groupe sanguin O).

xxx = Resultats exprimés en pourcentage de poids sec

xx = Resultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec



	A 1		B b		C1 b		C2 b	
	R/100 R _x	μ moles/g _{xx}	R/100 R	μ moles/g	R/100 R	μ moles/g	R/100 R	μ moles/g
Asp (1)	1.99	37.1	2.65	58.6	1.50	27.2	2.96	57.9
Thr	29.70	553.8	23.26	513.4	32.03	579.9	24.24	473.3
Ser	15.59	290.5	13.88	306.3	19.27	349.0	18.20	355.4
Glu	3.68	68.6	4.08	90.1	3.13	56.6	4.12	80.5
Pro	12.19	227.2	10.52	232.1	12.99	235.3	12.09	236.0
Gly	6.79	126.7	8.09	178.5	6.02	109.0	8.62	168.1
Ala	9.05	168.8	9.13	201.5	8.89	161.0	9.36	182.8
Val	3.64	67.7	4.21	92.9	3.62	65.6	3.97	77.5
Cys	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Met	1.54	28.7	-	-	0.80	14.4	1.12	22.0
Ile	2.20	41.2	3.51	77.4	2.05	37.2	1.87	36.7
Leu	4.43	82.6	4.86	107.2	2.72	49.2	3.63	70.7
Tyr	0.90	16.7	2.33	51.5	0.66	12.0	1.19	23.2
Phe	1.19	22.3	2.61	57.5	0.65	11.7	1.27	24.9
Lys	2.11	39.4	3.72	82.0	1.58	28.7	1.81	35.4
His	2.85	53.3	3.23	71.3	2.13	38.5	3.03	59.1
Arg	2.14	39.9	3.92	86.4	1.96	35.4	2.51	48.9

x = Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus d'acides aminés

xx : Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

(1) : Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Beckman



TABLEAU IV a : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de BIA ... (sujet de groupe sanguin O).

	A 1		B b		C 1 b		C 2 b	
	% xxx	μ moles/g xx	%	μ moles/g	%	μ moles/g	%	μ moles/g
Acides aminés	18.4	1868.1	21.6	2206.7	17.6	1810.7	19.2	1952.4
Fuc	11.5	700	17.9	1090	10.9	670	14.0	850
Gal	21.2	1180	18.7	1040	19.8	1100	24.4	1360
G. Nac	23.9	1080	20.5	930	22.8	1030	26.3	1190
Gal Nac	14.0	630	10.6	480	15.7	710	13.2	600
NANA	0.5	20	3.3	110	5.6	180	3.0	100
Sulfate	0	0	0.7	90	0.4	50	2.0	250

xx : Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

xxx : Résultats exprimés en pourcentage de poids sec

TABLEAU IV b : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de BIA ... (sujet de groupe sanguin O).



	A 1		B b		C1 b		C 2 b	
	R/100 R x	μ moles/g xx	R/100 R	μ moles/g	R/100 R	μ moles/g	R/100 R	μ moles/g
Asp (1)	3.22	48.5	3.51	54.9	1.03	16.3	2.07	31.3
Thr	23.68	357.1	24.75	387.4	32.18	508.3	27.88	422.0
Ser	15.84	238.9	15.73	246.2	17.59	277.9	17.58	266.2
Glu	4.84	73.0	4.59	72.0	2.30	36.3	3.34	50.5
Pro	9.78	147.4	10.08	157.8	15.59	246.3	13.32	201.7
Gly	8.80	132.8	8.24	128.8	4.71	74.4	6.83	103.4
Ala	9.99	150.7	9.38	146.8	8.42	133.0	8.99	136.1
Val	3.66	55.2	4.53	70.9	3.75	59.2	4.19	63.4
Cys	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Met	2.17	32.7	0.93	14.6	0.87	13.8	1.52	22.9
Ile	2.07	31.2	2.48	38.7	2.25	35.5	1.95	29.5
Leu	4.47	67.4	4.60	72.1	1.64	25.9	2.57	38.9
Tyr	1.27	19.1	1.71	26.8	0.97	15.2	1.01	15.2
Phé	1.58	23.8	1.73	27.0	0.79	12.5	0.96	14.5
Lys	3.30	49.7	2.65	41.5	3.76	59.3	2.90	43.9
His	3.16	47.6	2.62	40.9	2.37	37.5	2.99	45.2
Arg	2.18	32.8	2.46	38.5	1.76	28.1	1.92	29.1

x = Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus

xx = Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

(1) = composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Beckman



TABLEAU V a : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de PRO... (sujet de groupe sanguin O).

	A 1		B b		C 1 b		C 2 b	
	% xxx	μ moles/g xx	%	μ moles/g	%	μ moles/g	%	μ moles/g
Acides aminés	15.8	1507.9	15.7	1564.9	15.9	1579.5	15.5	1513.8
Fuc	13.5	820	17.7	1080	11.0	670	12.5	760
Gal	22.2	1230	20.3	1130	24.2	1340	24.9	1380
G. Nac	21.0	950	18.2	820	14.7	670	20.5	930
Gal Nac	9.1	410	9.3	420	17.6	800	12.5	570
NANA	2.9	90	6.4	210	13.0	420	9.0	290
Sulfate	0.3	40	0.6	70	0.5	60	1.5	90

xxx : Résultats exprimés en pourcentage de poids sec

xx : Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

TABLEAU V b : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de PRO... (sujet de groupe sanguin O).



	A1		B b		C1 b		C2 b	
	R/100 R(1) x	μ moles/g xx	R/100 R(2)	μ moles/g	R/100 R (2)	μ moles/g	R /100 R(2)	μ moles /g
Asp	2.05	20.5	2.74	34.9	1.92	34.4	2.51	33.0
Thr	33.58	336.1	28.31	361.1	25.54	460.1	25.36	332.6
Ser	13.37	133.9	15.72	200.6	20.26	365.1	17.57	230.4
Glu	3.81	38.1	3.72	47.5	3.17	57.2	3.89	51.1
Pro	9.00	90.1	11.75	149.8	13.42	241.8	12.80	167.9
Gly	6.92	69.3	6.95	88.7	6.79	122.4	8.28	108.7
Ala	10.49	105.1	9.47	120.8	9.28	167.2	9.99	131.0
Val	3.94	39.4	4.36	55.6	3.86	69.6	3.76	49.3
Cys	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Met	-	-	0.75	9.6	1.07	19.3	1.09	14.3
Ile	2.36	23.6	2.35	30.0	2.11	38.0	1.72	22.6
Leu	4.73	47.3	4.29	54.7	2.04	36.6	2.89	38.0
Tyr	-	-	1.09	13.9	1.46	26.3	1.04	13.7
Phe	1.14	11.4	1.37	17.5	0.83	14.9	1.10	14.4
Lys	2.70	27.1.	2.14	27.4	3.05	55.0	2.19	28.7
His	2.94	29.5	2.54	32.3	3.18	57.3	3.76	49.3
Arg	2.97	29.7	2.45	31.1	2.04	36.6	2.03	26.7

x = Résultats exprimés en nombre de résidus d'acides aminés pour 100 résidus

xx = Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

(1) = Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Technicon

(2) = Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Beckman

TABLEAU VI a : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de WAS... (sujet de groupe sanguin A).



	A 1		B b		C 1 b		C 2 b	
	% xxx	μ moles/g xx	%	μ moles/g	%	μ moles/g	%	μ moles/g
Acides aminés	9.8	1001.1	12.7	1275.5	17.7	1801.8	12.8	1311.7
Fuc.	20.1.	1230	19.0	1160	14.4	880	14.8	900
Gal.	26.3	1460	21.9	1220	24.9	1380	27.2	1510
G. Nac	22.0	1990	21.4	970	17.5	790	20.3	920
Gal. Nac	19.5	1930	17.9	810	16.2	740	11.5	520
NANA	0	0	4.4	140	8.3	270	5.7	180
Sulfate	0	0	0.4	50	1.4	170	2.4	300

xx : Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

xxx : Résultats exprimés en pourcentage de poids sec

TABLEAU VI b : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de WAS ... (sujet de groupe sanguin A).



	A1		B b		C1 b		C2 b	
	^x R/100 R (1)	μ_{xx} moles/g	R/100 R (2)	μ moles/g	R/100 R (2)	μ moles/g	R/100 R (2)	μ moles/g
Asp ⁽¹⁾	1.79	27.3	3.42	63.9	1.76	28.1	3.23	47.8
Thr	32.09	491.0	25.85	483.1	31.28	501.9	23.89	354.9
Ser	15.23	233.1	17.12	319.9	17.95	287.9	18.83	279.5
Glu	4.18	64.0	4.42	82.7	2.97	47.5	5.62	83.5
Pho	12.69	194.2	10.84	202.5	13.25	212.6	10.42	154.8
Gly	6.32	96.7	7.87	147.2	6.22	99.9	9.36	138.9
Ala	10.70	163.7	8.74	163.4	9.12	146.2	9.51	141.3
Val	3.59	54.9	4.08	76.4	3.29	52.7	3.12	46.4
Cys	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Met	-	-	0.80	15.1	1.49	23.9	1.46	21.7
Ile	2.41	36.8	2.58	48.1	1.94	31.2	1.78	26.4
Leu	4.23	64.8	4.09	76.6	2.97	47.5	3.41	50.8
Tyr	tr	tr	1.51	28.2	0.69	11.1	1.25	18.7
Phe	tr	tr	1.72	32.2	0.90	14.5	1.42	21.0
Lys	1.67	25.6	2.57	47.9	2.10	33.7	2.27	33.7
His	2.35	36.0	2.17	40.6	2.12	34.1	2.68	39.8
Arg	2.74	41.9	2.21	41.4	1.96	31.4	1.76	26.1

xx = Résultats exprimés en micro-moles par gramme de poids sec. - x = Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus d'acides aminés.



(1) = Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Technicon

(2) = Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Beckman

TABLEAU VIIa: Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de VAN... (sujet de groupe sanguin A).

	A1		Bb		C1 b		C2 b	
	% xxx	μ moles/g xx	%	μ moles/g	%	μ moles/g	%	μ moles/g
acides aminés	14.9	1530.0	18.6	1869.2	15.7	1604.2	14.6	1485.3
Fuc.	16.5.	1010	16.9	1030	13.6	830	15.1.	920
Gal.	22.0	1220	23.1.	1280	25.4	1410	25.6	1420
G Nac	22.2.	1000	17.5	790	18.4	830	20.7	940
Gal Nac	21.6	980	16.4	740	18.5	840	15.2	690
NANA	0	0	3.5	110	3.2	110	2.0	60
Sulfate	0	0	0	0	0.9	110	2.8	350

xx : résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec

xxx : résultats exprimés en pourcentage de poids sec

TABLEAU VII b : Composition chimique de mucines isolées de l'expectoration de VAN ... (sujet de groupe sanguin A).



de groupements sulfate.

Différentes remarques peuvent être formulées :

- la teneur en fucose varie selon que les mucines possèdent ou non une activité de groupe sanguin A, B, O. Les fractions A1 éluées de la colonne d'Ecteola-cellulose par une solution de chlorure de sodium 0,1 M étaient précédemment considérées comme des "fucomucines". Cependant, la teneur en fucose de ces fractions est faible, quand elles sont dépourvues d'activité A, B ou O (tableau IIIb). De plus, certaines fractions acides ont une teneur en fucose assez élevée (tableaux IVb et Vb). La dénomination de "fucomucines" appliquée aux fractions A1 ne peut donc être retenue.

- le taux de N-acétyl-galactosamine est plus élevé dans les mucines possédant des activités de groupe sanguin A (tableaux VIb et VIIb).

- le nombre total des résidus acides (acide N-acétyl-neuraminique et groupements sulfate) augmente progressivement des mucines A1 aux mucines C2 b ou éventuellement C3 b. Le rapport acide N-acétyl-neuraminique + groupements sulfate/100 acides aminés permet de mettre en évidence cette progression (tableaux VIII, IX, X et XI). Toutefois, les mucines A1 peuvent renfermer, dans certains cas un nombre non négligeable de résidus acides (tableaux VIII et X) et la mucine C1 b de PRO... (tableau X) renferme plus de résidus acides que la mucine C2 b. On remarque que la mucine C1 b est particulièrement riche en acide N-acétyl-neuraminique (tableau Vb).

D'autre part, dans chaque mucine l'importance du nombre de résidus d'acide N-acétyl-neuraminique par rapport au nombre de résidus sulfate est indiqué par la valeur du rapport acide N-acétyl-neuraminique/groupements sulfate. Pour chaque sé-

	A1	Bb	C1 b	C2 b	C3 b
Estimation de la longueur moyenne des chaînes	8.2	5.4	5.6	6.9	9.6
Acide N-acétyl-neuraminique + groupements sulfate/100 acides aminés	9.9	10.0	13.0	21.1	28.5
Acide N-acétyl-neuraminique/sulfate	0.3	2.8	2.4	0.6	0.3
N-acétyl-galactosamine/100 acides aminés	28.5	33.7	35.3	36.5	29.3

TABLEAU VIII : Caractéristiques des chaînes glycaniques des mucines de MAR...



	A1	Bb	C1 b	C2 b
Estimation de la longueur moyenne des chaînes	5.7	7.6	5.2	6.8
Acide N-acétyl-neuraminique + groupements sulfate /100 acides aminés	1.1	9.1	12.7	17.9
Acide N-acétyl-neuraminique /Sulfate	-	1.2	3.6	0.4
N-acétyl-galactosamine /100 acides aminés	35.9	21.7	39.2	30.7

TABLEAU IX : Caractéristiques des chaînes glycaniques des mucines de BIA...



	A1	Bb	C1 b	C2 b
Estimation de la longueur moyenne des chaînes	8.5	8.7	4.9	6.9
Acide N-acétyl-neuramique + groupements sulfate /100 acides aminés	8.6	17.9	30.4	25.1
Acide N-acétyl-neuraminique /sulfate	2.2	3.0	7.0	3.2
N-acétyl-galactosamine /100 acides aminés	27.2	26.6	50.6	37.6

TABLEAU X : Caractéristiques des chaînes glycaniques des mucines de PRO...



	WAS...				VAN...			
	A1	Bb	C1 b	C2 b	A1	Bb	C1 b	C2 b
acide N-acétyl-neuraminique + groupements sulfate/100 acides aminés	-	14.9	24.4	36.6	-	5.9	13.7	27.6
acide N-acétyl-neuraminique/sulfate	-	2.8	1.6	0.6	-	-	1	0.2

TABLEAU XI : Caractéristiques des chaînes glycaniques des mucines de WAS... et VAN...



création, ce sont, soit les mucines Bb (tableaux VIII et XI), soit, les mucines C1 b (tableaux IX, X et XI) qui sont les plus sialidées. La diminution ou l'inversion de la valeur de ce rapport dans les mucines C2 b ou éventuellement C3 b (tableaux VIII, IX et XI) montre que ces mucines sont principalement sulfatées. Ce n'est pas le cas de la mucine C2 b de PRO... (tableau X) où le nombre de résidus d'acide N-acétyl-neuraminique est plus important que le nombre de résidus de sulfate.

- une "estimation" de la longueur moyenne des chaînes glycan-
niques peut être réalisée pour les mucines isolées chez des sujets de groupe sanguin O en établissant le rapport de la somme des résidus de fucose + galactose + N-acétyl-glucosamine + N-acétyl-galactosamine + acide N-acétyl-neuraminique sur le nombre de résidus de N-acétyl-galactosamine. On peut, en effet, penser dans ce cas que tous les résidus de N-acétyl-galactosamine sont engagés dans des liaisons O-glycosidiques avec des résidus d'acides aminés hydroxylés, Threonine et serine (WATKINS, 1972).

Les mucines C1 b qui sont généralement les plus riches en acide sialique ont une longueur moyenne de chaînes de l'ordre de 5 résidus de sucres (tableaux VIII, IX et X).

Les mucines C2 b ou C3 b qui sont plus sulfatées que les précédentes ont une longueur moyenne de chaînes comprise entre 6, 8 et 9, 6 résidus de sucres (tableaux VIII, IX et X).

La longueur moyenne des chaînes glycaniques des mucines A1, pauvres en résidus acides est de 5, 7 à 8, 5 résidus de sucres et celles des mucines Bb est de 5, 4 à 8, 7 résidus de sucres (tableaux VIII, IX et X).

Il semble donc que la longueur moyenne des chaînes glycaniques des mucines neutres A1 ou faiblement acides Bb soit, à l'exception de la fraction Bb du malade MAR... (tableau VIII) plus grande que celle des mucines C1 b qui sont les plus sialidées. De

même l'augmentation de la teneur en sulfate observée dans les fractions acides C2 b ou C3 b s'accompagne d'une augmentation de la longueur moyenne des chaînes glycaniques qui peut atteindre 9 à 10 sucres.

On peut aussi remarquer, dans le cas des sujets O que l'augmentation ou la diminution du nombre de résidus d'acide N-acétyl-galactosamine suit une évolution parallèle au nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés (tableaux IIIa, IVa, et Va).

D'autre part, en ce qui concerne les mucines isolées chez des sujets A sécréteurs, la présence de N-acétyl-galactosamine à l'extrémité non réductrice des chaînes glycaniques ne permet pas de rechercher ce type d'estimation.

- la détermination de la valeur du rapport N-acétyl-galactosamine/100 acides aminés permet d'apprécier la "glycosylation" des différentes mucines isolées des sujets de groupe sanguin O (tableaux VIII, IX et X). Cette estimation est fondée sur la supposition que tous les résidus de N-acétyl-galactosamine sont engagés dans des liaisons glycanne-protéine comme ils le sont dans certaines substances de groupe sanguin H (WATKINS, 1972). Les mucines C1 b sont les plus glycosylées, principalement celles de PRO... (tableau X), les mucines C2 b de MAR... (tableau VIII) possèdent sensiblement le même degré de glycosylation que les mucines C1 b. Les mucines A1, sauf celles de BIA... (tableau IX) sont les moins glycosylées (tableaux VIII et X). Cette estimation ne peut pas s'appliquer aux mucines des sujets de groupe sanguin A, puisque dans ce cas, un certain nombre de résidus de N-acétyl-galactosamine sont situés à l'extrémité non réductrice des chaînes glycaniques.

F - PROBLEME DES PONTS DISULFURE DANS LES MUCINES :

La structure géliforme des sécrétions bronchiques est due en partie à l'existence de ponts disulfure (HAVEZ et Coll., 1973) (ROBERTS, 1974 et 1976). Si leur rupture amène une diminution de la viscosité des solutions de mucus, la localisation exacte de ces ponts dans le mucus fibrillaire est encore un sujet controversé.

Par réduction d'un mucus fibrillaire par le mercapto-éthanol suivie d'une alkylation avec de l'iodo-acétamide marquée puis chromatographie de gel filtration sur Sepharose 4B, HAVEZ et Coll. (1972) avaient suggéré que les ponts disulfure rompus étaient situés sur les protéines du mucus et non pas sur les mucines.

En 1974, ROBERTS rapporte la présence de très faibles quantités de cystéine au sein des mucines bronchiques humaines.

En 1976, le même auteur, à la suite d'expériences de réduction de mucus bronchique suivie d'une alkylation par l'iodo-acétamide marquée, isole des fractions de mucines radio-actives et propose différents schémas de structure des mucines bronchiques impliquant l'association de chaînes de mucines par des ponts disulfure. Cependant, il existe des différences individuelles dans l'activité spécifique des mucines alkylées ainsi marquées.

On ne peut donc complètement éliminer l'hypothèse que les mucines isolées par ROBERTS soient contaminées par des quantités faibles, mais variables d'un cas à l'autre, de protéines ou de peptides encore associés aux mucines malgré les techniques de purification utilisées. La deuxième partie de ce travail donnera d'ailleurs quelque valeur à cette hypothèse.

En ce qui concerne les différentes mucines que nous

avons préparées, l'examen des diagrammes d'élution des hydrolysats effectués sur l'auto-analyseur Beckman montre qu'il existe un léger soulèvement de la ligne de base au niveau de l'élution de la cystéine, (voir plus haut). Afin de déterminer si la cystéine est un élément de la structure des mucines, deux types d'expériences ont été réalisés.

1) Réduction et alkylation d'une mucine :

La mucine Bb du malade MAR... est réduite par le mercapto-éthanol dans des conditions identiques à celles utilisées pour réduire un mucus bronchique (4 h à 37°C). La réduction est suivie d'une alkylation par l'iodo-acétamide, pendant 1 h. Après dialyse et lyophilisation, la mucine non réduite et la mucine réduite puis alkylée sont soumises à une chromatographie sur une colonne de Sepharose 4B. Les diagrammes d'élution obtenus ont exactement le même profil.

2) Dosage de la cystéine sous forme d'acide cystéique. Oxydation performique :

Trois mucines A1 (PRO...), Bb et C2 b (MAR...) sont soumises à une oxydation performique et, après oxydation, la composition en acides aminés de chaque mucine est déterminée. La transformation des résidus de cystéine en acide cystéique après oxydation performique permet effectivement de déceler cet acide aminé en très faible quantité, puisque l'on retrouve toujours un nombre de résidus de cystéine inférieur à 1 % des résidus d'acides aminés (0,69 % : A1 de PRO...) (0,52 % : Bb de MAR...) (0,58 % : C2 b de MAR...).

Nos expériences personnelles démontrent tout d'abord que les mucines bronchiques contiennent de faibles quantités de cysté-

ine. Si on rapporte les valeurs trouvées pour la cystéine au poids moléculaire des mucines A1, Bb et C2 b déterminé par équilibre de sédimentation, on trouve respectivement 3,4 ; 2,9, et 3,4 résidus de cystéine par molécule de mucine.

La réduction et l'alkylation des mucines isolées ne modifient pas leur profil d'éluion sur une colonne de Sepharose 4B. On peut donc penser qu'il n'y a pas une polymérisation des "monomeres" de mucines isolées réunis par des ponts disulfure.

On doit cependant souligner que nos expériences ont été réalisées sur des molécules purifiées à partir du mucus bronchique déjà réduit mais non bloqué. Dans ces conditions, on ne peut complètement éliminer, pour le mucus natif, la possibilité d'association de "monomeres" de mucines unis par un petit nombre de ponts disulfure. Le fait que les mucines isolées après réduction mais sans alkylation ne soient pas capables d'une certaine réassociation spontanée n'est pas en faveur de cette hypothèse.

II - ETUDE DES MUCINES BRONCHIQUES NON PATHOLOGIQUES :

Après avoir défini certaines caractéristiques des mucines bronchiques isolées de l'expectoration de malades atteints de bronchite chronique, nous avons cherché à étudier des mucines isolées d'une sécrétion bronchique aussi proche que possible de l'état physiologique.

A l'état normal, la sécrétion bronchique entraînée par les battements ciliaires vers les voies aériennes supérieures y est progressivement déglutie. Nous avons donc recueilli les produits des lavages bronchiques, réalisés sous fibroscopie dans des territoires bronchiques macroscopiquement sains. Etant donné les faibles quantités de sécrétion recueillie par des lavages réalisés à l'aide de solution phy-

siologique, nous avons utilisé un liquide de lavage contenant un agent "réducteur", la N-acétyl-cystéine et nous avons mélangé les produits de lavages provenant de plusieurs patients pour en faire un pool suffisamment important.

A - ETUDE PRELIMINAIRE DES MUCINES BRONCHIQUES NON PATHOLOGIQUES :

Des lavages bronchiques ont été réalisés chez cinq sujets n'ayant pas d'antécédents de bronchite chronique (trois sujets de groupe sanguin O, un sujet de groupe sanguin A et un sujet de groupe sanguin B).

Dans chaque cas, le liquide de lavage est centrifugé et séparé en une fraction soluble et en un "culot gélatineux" qui sont dialysés contre eau distillée, puis lyophilisés (tableau XII). Les "culots gélatineux" sont ensuite soumis à une réduction par le mercapto-éthanol à 1 %, centrifugés, dialysés et lyophilisés. Les constituants solubilisés et adialysables ou "mucus solubilisé" représentent de 35 à 49 % du mucus gélatineux.

L'étude électrophorétique en agarose des fractions solubles obtenues à partir des cinq liquides de lavage a été effectuée en utilisant des révélations par l'amidoschwarz, le réactif de Schiff après oxydation périodique (PAS) et le bleu de Toluidine. Cette étude a permis de constater de grandes analogies dans l'aspect électrophorétique de ces fractions : celles-ci ont donc été mélangées.

De la même façon, l'aspect électrophorétique des différentes fractions de "mucus solubilisé" s'est avéré homogène. Les différentes fractions de "mucus solubilisé" ont donc encore été réunies.

SUJET N°	1	2	3	4	5
Groupe sanguin	O	O	A	O	B
Fraction soluble	155°	76	125	188	201
"Culot géliforme"	60	46	61	193	180
Mucus solubilisé	23	16	30	91	73

° = Résultats exprimés en mg de produit adialysable obtenu dans la fraction soluble et le culot géliforme à partir de chaque solution de lavage (500 ml pour les sujets 1, 3, 4 et 5 ; 200 ml pour le sujet 2) et de produit adialysable obtenu après solubilisation par réduction des culots géliformes.

TABLEAU XII : Matériel adialysable contenu dans les différentes fractions de cinq lavages bronchiques.



1) Etude des mucines de la fraction soluble :

525 mg de mélange des fractions solubles sont déposés sur une colonne d'Ecteola-cellulose équilibrée et éluée dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M. L'éluion de la colonne est ensuite réalisée par passage successif des solutions de chlorure de sodium 0,1 M, 0,3 M, 0,5 M et 0,7 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M (fig. 4). On recueille ainsi plusieurs fractions (F1 = 110 mg ; F3 = 14 mg ; F4 = 2,5 mg).

La fraction F1 est de caractère neutre puisqu'elle n'est pas retenue sur la colonne d'Ecteola.

25 mg de la fraction F1 et 13 mg de la fraction F3 sont soumis à une chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 4B dans un tampon Tris 0,1 M, Na Cl 0,2 M de pH 8,0 (fig. 4).

La fraction F3 a été séparée en une fraction de haut poids moléculaire exclue de la colonne, une fraction complètement retenue qui est essentiellement protéique et deux fractions glycoprotéiques dont l'absorption à 278 nm est faible (F3b et F3c)(fig. 4).

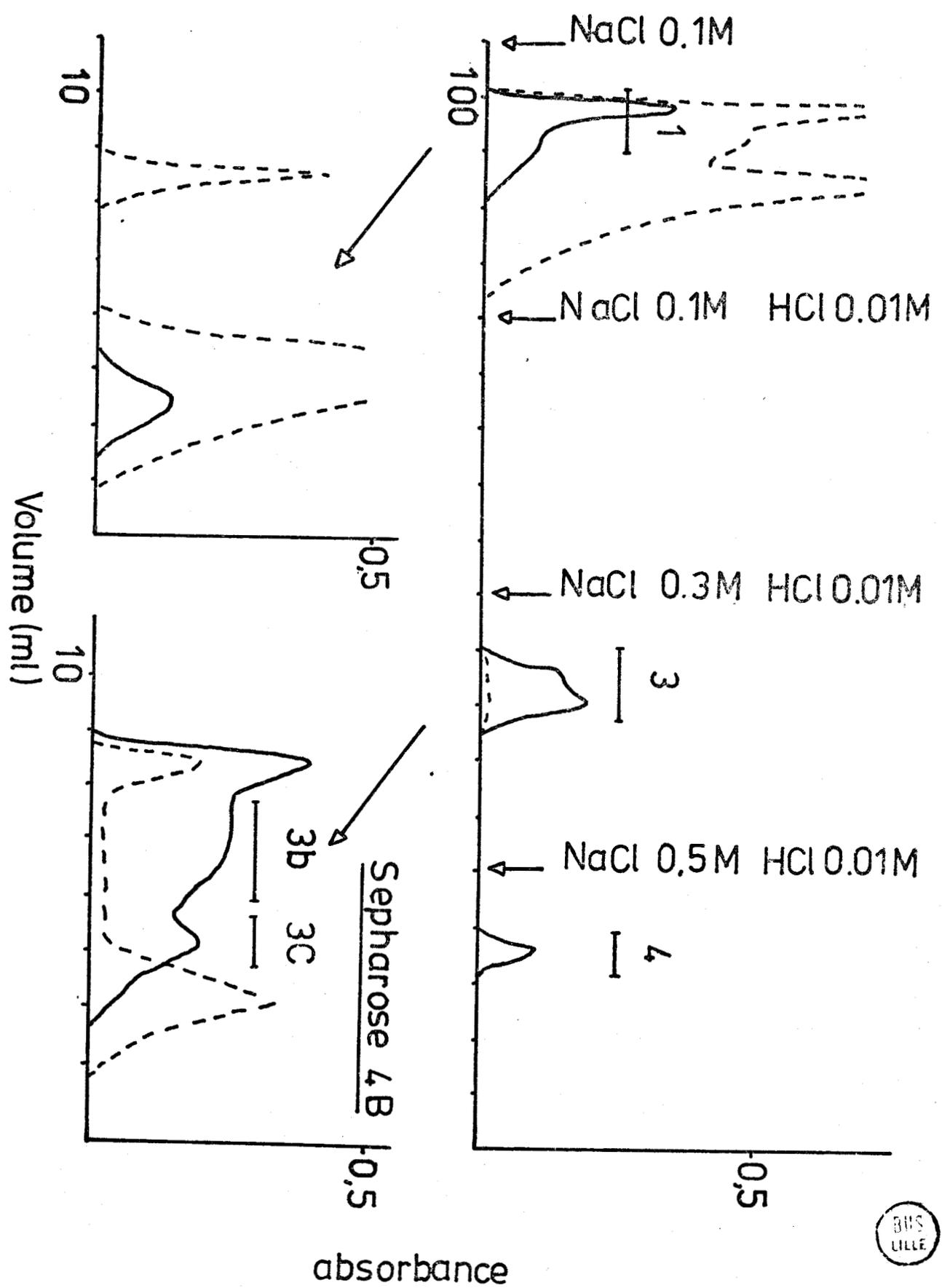
Dans les mêmes conditions, l'étude chromatographique de la fraction F1, de caractère neutre, démontre qu'elle ne contient pas de mucines neutres de taille moléculaire comparable à celle des fractions F3 b et F3 c(fig. 4).

L'étude électrophorétique des fractions F3 b, F3 c et F4 révèle leur caractère acide ainsi qu'en témoignent leur mobilité électrophorétique et leur affinité pour le bleu de Toluidine (fig. 5).

2) Etude des mucines du mucus solubilisé :

210 mg de mélange de "mucus solubilisé" sont soumis à une chromatographie sur une colonne d'Ecteola-cellulose iden-

Ecteoia



3b

A S

PAS

BT

3c

4

IIIb

IV

A S

PAS

BT



tique à celle qui est utilisée pour la fraction soluble (fig. 6).

Quatre fractions sont séparées, dialysées, puis lyophilisées (FI : 7 mg ; FII = 5 mg ; FIII = 15 mg ; FIV = 2 mg).

7 mg de la fraction FI et 14 mg de la fraction FIII sont alors soumis à une chromatographie de gel filtration sur Sepharose 4B (fig. 6).

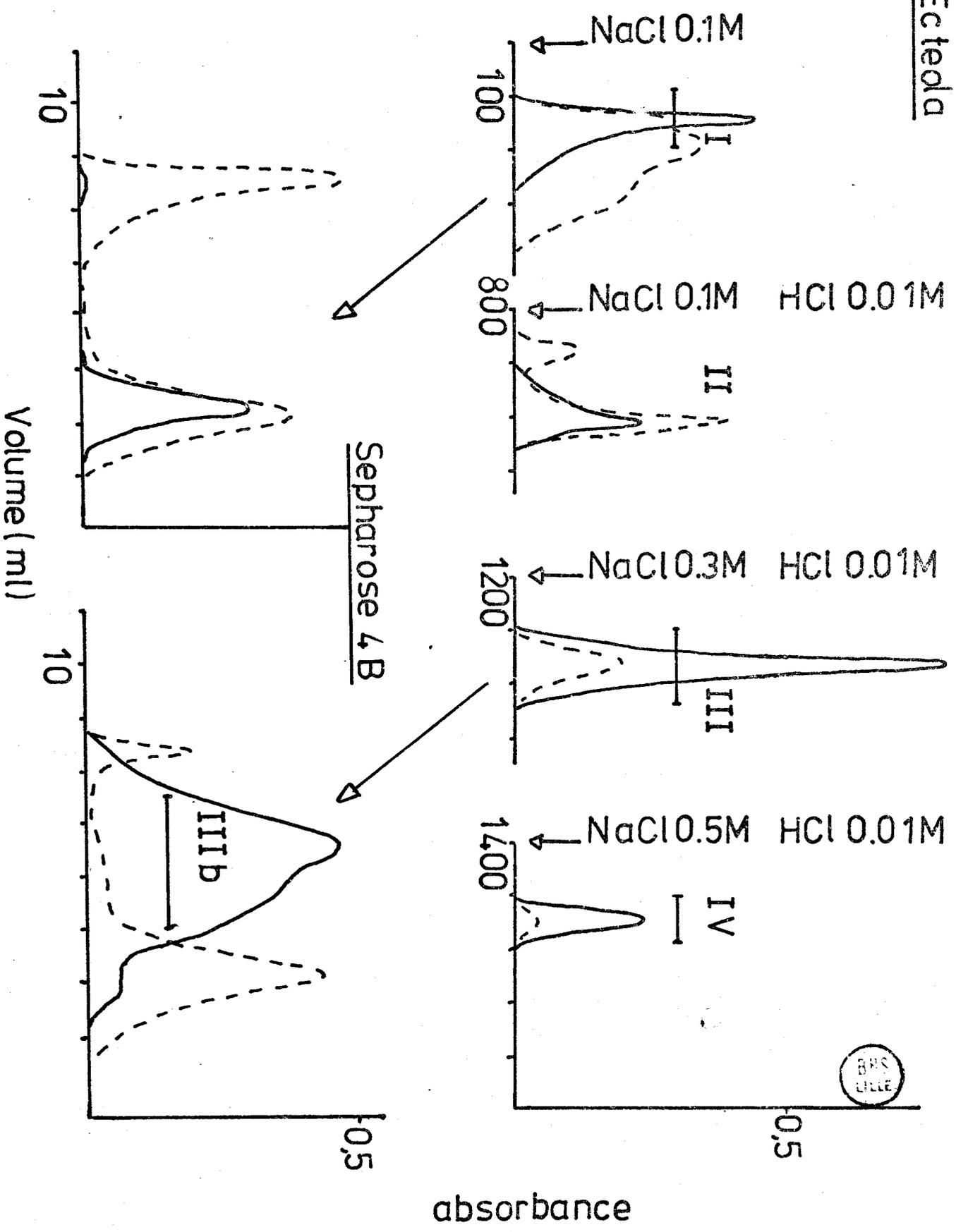
La fraction FI ne contient pas de mucines neutres de taille comparable à celle des mucines acides (FIII b) isolées à partir de la fraction FIII (fig. 6).

L'étude électrophorétique des fractions FIII b et FIV confirme leurs caractères de mucines acides (fig 5).

On remarque aussi que les quantités de mucines obtenues à partir du "mucus gélatineux" solubilisé sont beaucoup plus faibles que les quantités de mucines isolées dans la fraction soluble. La présence d'un agent réducteur : la N-acétyl-cystéine dans les solutions de lavage doit certainement permettre la solubilisation d'une partie des mucines contenues dans le mucus gélatineux, au niveau de la bronche même.

Cette première série d'expériences démontre que les mucines préparées à partir de liquides de lavages réalisés chez cinq sujets dans des territoires macroscopiquement sains sont des molécules de caractère acide. Ces mucines correspondent à un mélange de molécules sécrétées par des sujets de groupe sanguin B et O. Nous n'avons pas réalisé l'étude de leur composition chimique estimant que l'appartenance de l'un des sujets au groupe sanguin A ne nous permettait pas de procéder à une estimation de la longueur moyenne des chaînes de ces molécules. Un deuxième pool de sécrétions a donc été constitué à partir de

Ec teada



lavages réalisés chez six sujets de groupe sanguin O.

B - ETUDE CHIMIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES
OBTENUES PAR LAVAGE DE BRONCHES MACROSCOPIQUE-
MENT SAINES CHEZ SIX SUJETS DE GROUPE SANGUIN O :

Cette deuxième série de lavages a été réalisée dans les mêmes conditions que celles qui ont été utilisées pour la première série.

Toutefois, considérant d'une part que le matériel obtenu était certainement d'origine bronchique et d'autre part que le matériel obtenu avait déjà été en contact avec un agent réducteur, la N-acétyl-cystéine, nous n'avons pas séparé les produits solubles du mucus insoluble et l'ensemble a été soumis à une réduction par le mercapto-éthanol.

1) Réduction du pool de mucus bronchique :

Les produits des six lavages bronchiques sont réunis, dialysés contre eau distillée et rassemblés en pool de mucus bronchique (1,4g) qui est soumis à une réduction par le β mercapto-éthanol. 760 mg d'un matériel soluble dans l'eau et non dialysable (le mucus réduit) sont ainsi obtenus.

L'étude électrophorétique du mucus réduit montre qu'il comprend des constituants de mobilité anodique supérieure à celle de l'albumine et qui sont uniquement révélés par le bleu de Toluidine, une fraction de mobilité analogue à la sérum-albumine uniquement révélée par l'amidoschwarz et un mélange de constituants de mobilité alpha et bêta révélés par l'amidoschwarz, le réactif de Schiff après oxydation periodique et faiblement par le bleu de

Toluidine (fig. 7).

2) Purification des mucines bronchiques non pathologiques :

Le pool de mucus réduit est fractionné sur une colonne d'Ecteola-cellulose mais à la différence des premiers lavages, la colonne est éluée d'abord par des solutions de chlorure de sodium 0,1 M puis de chlorure de sodium 0,1 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M et finalement par un gradient continu de chlorure de sodium de 0,1 M à 0,7 M contenant de l'acide chlorhydrique 0,01 M. On peut ainsi séparer quatre fractions (fig. 8). Les constituants élués par le gradient de chlorure de sodium forment sur la courbe de dosage des oses combinés, un pic très étalé qui est arbitrairement découpé en 2 fractions F3 et F4 et dont la trainée n'est pas retenue. Les quatre fractions ainsi séparées sont dialysées et lyophilisées (F1 = 205 mg ; F2 = 24 mg ; F3 = 22 mg ; F4 = 14 mg).

Chacune des 4 fractions est ensuite soumise à une chromatographie sur colonne de Sepharose 4B (fig. 9).

50 mg de la fraction F1, 24 mg de la fraction F2, 22 mg de la fraction F3 et 14 mg de la fraction F4 sont soumis à une chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 4B dans un tampon Tris 0,1 M, Na Cl 0,2 M de pH 8,0 (fig. 9).

Les fractions F3 et F4 sont ainsi séparées en fractions de haut poids moléculaire exclues de la colonne, fractions complètement retenues qui sont essentiellement protéiques et en fractions glycoprotéiques absorbant très peu à 278 nm, F3 b et F4 b (fig. 9).

Dans les mêmes conditions, l'étude de chromatographie des fractions F1 et F2 démontre qu'elles ne contiennent pas de mucines de taille moléculaire comparable à celles des fractions F3 b ou F4 b (fig. 9).



MR.

3b

4b

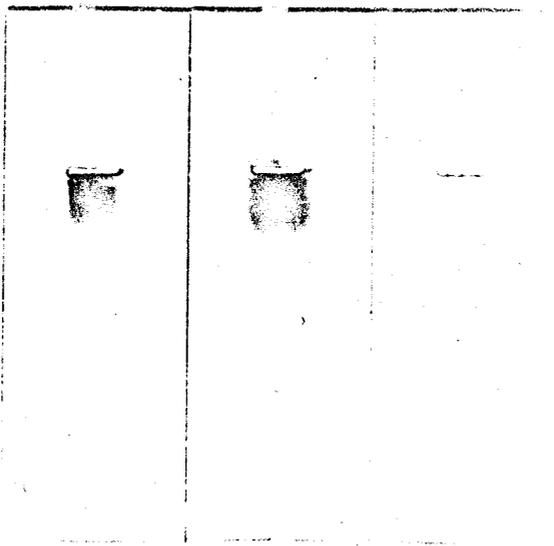
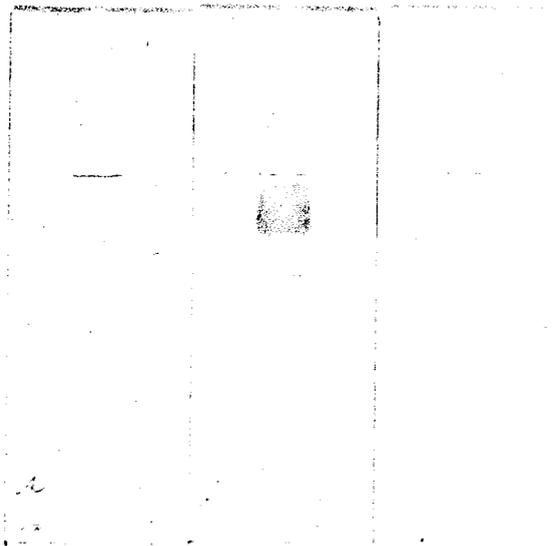
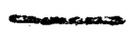
A S



PAS



B T



3) Etude électrophorétique des fractions F3 b et F4 b :

En électrophorèse en agarose, les fractions F3 b et F4 b sont bien colorées par le réactif de Schiff après oxydation periodique. La fraction F3 b est très faiblement colorée par l'amido-schwarz. La fraction F4 b est mieux révélée par le bleu de Toluidine que la fraction F3 b (fig. 7).

Les mucines bronchiques obtenues à partir des liquides de lavage constituent donc une population de mucines acides.

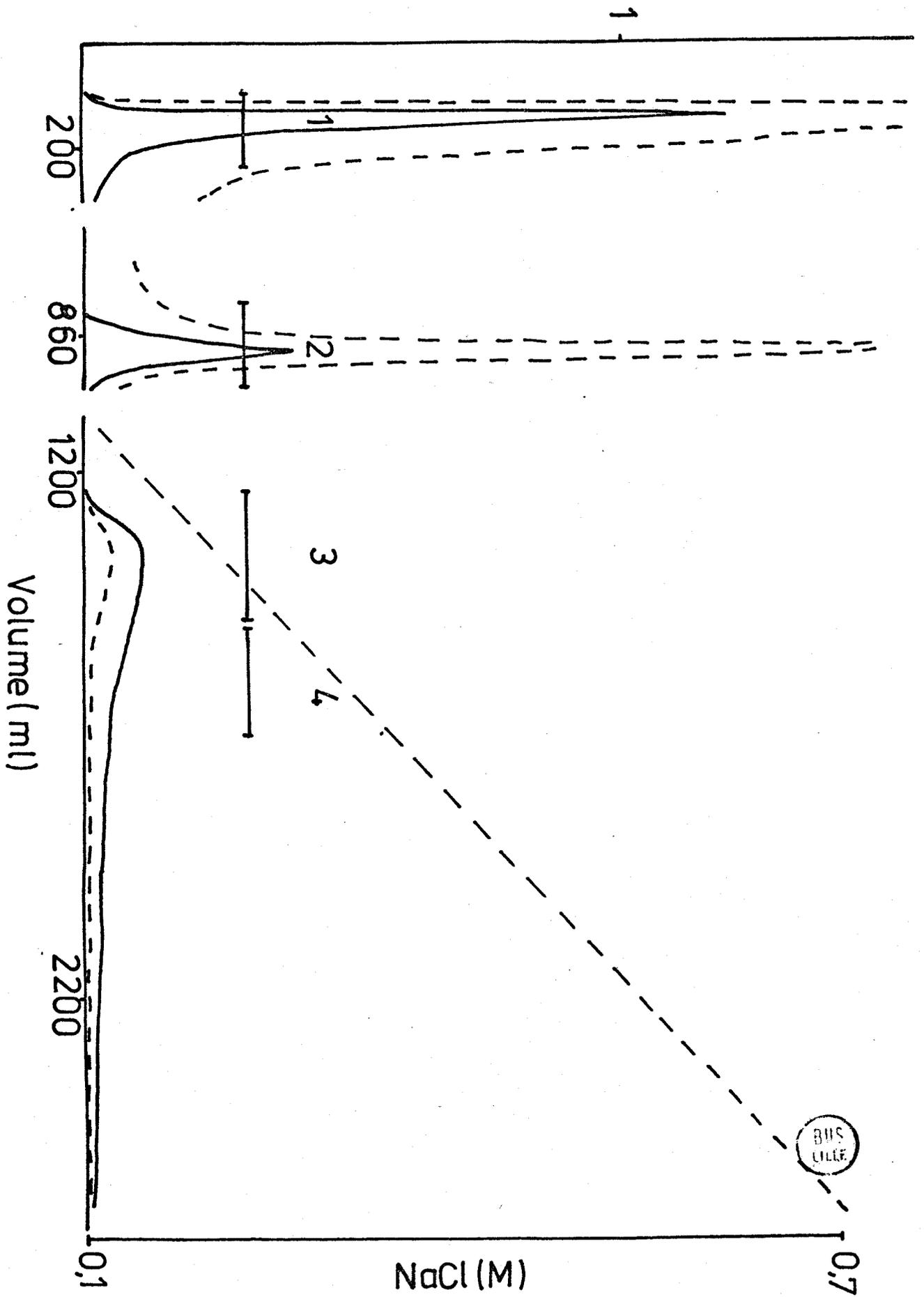
4) Composition chimique des mucines F3 b et F4 b :

Dans la composition chimique des mucines acides, on retrouve tous les constituants qui ont été préalablement identifiés dans les mucines bronchiques isolées à partir d'expectorations de malades atteints de bronchite chronique, notamment la richesse de la partie polypeptidique en acides aminés hydroxylés (tableau XIII).

L'examen de la composition glucidique (tableau XIII) permet de faire les constatations suivantes (tableau XIV) : si on admet aussi pour les mucines bronchiques isolées par lavage chez des sujets de groupe sanguin O, que tous les résidus de N-acétyl-galactosamine sont engagés dans des liaisons glycanne - protéine de type O-glycosidique, la valeur du rapport molaire (galactose + fucose + N-acétyl-osamines + acide sialique) / N-acétyl-galactosamine représente une estimation de la longueur moyenne des chaînes glycaniques de ces molécules. La valeur de ce rapport est de 4,5 pour la fraction F3 b et de 5,7 pour la fraction F4 b. On peut aussi remarquer qu'entre les fractions F4 b et F3 b, il y a une évolution parallèle du nombre de résidus de N-acétyl-galactosamine et du nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés.

En outre, dans les fractions F3 b et F4 b, le nombre de résidus d'acide sialique est plus grand que celui des groupements sulfate (tableau XIII). Ceci se traduit dans la valeur du rapport

absorbance



Sepharose 4B

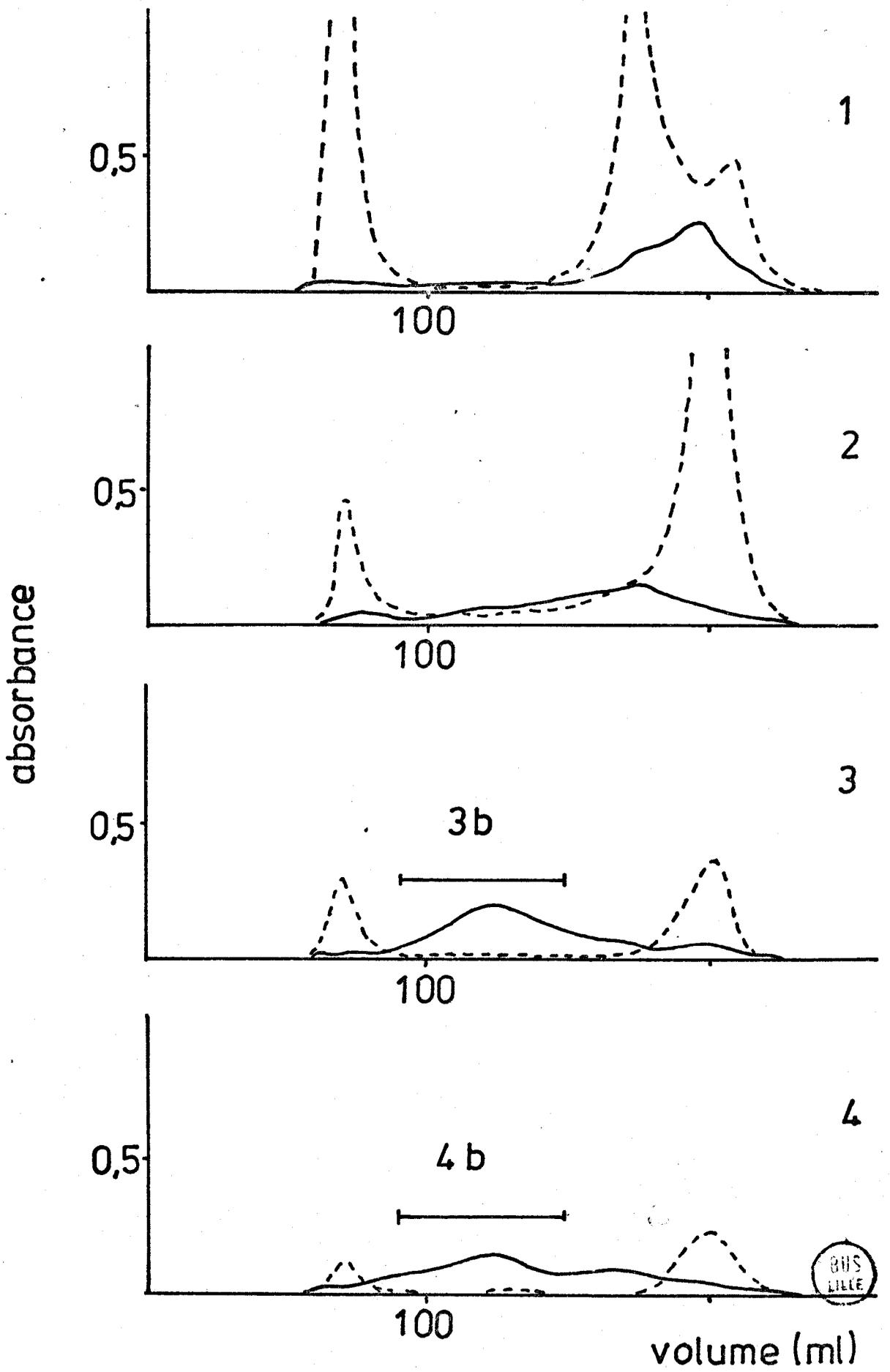


TABLEAU XIII : Composition chimique des fractions glycoprotéiniques
F3 b et F4 b

	F3 b		F4 b	
	R/100 R _x	μ moles /g _{xx}	R/100 R _x	μ moles /g _{xx}
Asp ⁽¹⁾	2.69	53.2	3.22	55.9
Thr	27.70	548.2	23.55	408.5
Ser	18.68	369.7	18.69	324.2
Glu	3.91	77.4	4.32	75.0
Pro	14.84	293.6	12.52	217.1
Gly	6.57	130.1	8.65	150.1
Ala	8.28	163.8	8.16	141.5
Val	3.99	78.9	4.45	77.2
Cys	tr	tr	tr	tr
Met	0.77	15.2	1.09	18.9
Ile	2.13	42.1	2.15	37.3
Leu	2.31	45.8	2.84	49.3
Tyr	1.10	21.8	1.40	24.3
Phe	1.23	24.4	1.25	21.7
Lys	2.24	44.3	3.11	54.0
His	1.54	30.5	2.71	47.0
Arg	2.01	39.8	1.87	32.5

	% _{xxx}	μ moles /g	%	μ moles /g
Acides aminés	19.53	1978.8	17.06	1734.5
Fuc	8.4	510	9.3	560
Gal	20.3	1130	20.8	1160
G Nac	11.9	540	14.2	640
Gal Nac	16.5	750	12.7	580
NANA	13.3	430	11.2	360
Sulfate	0.8	100	2.0	240

BHS
LILLE

x = résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus
xx = résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec
xxx = résultats exprimés en pourcentage de poids sec

(1) Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Beckman

TABLEAU XIV : Caractéristiques des mucines F3 b et F4 b obtenues à partir de lavages bronchiques.

	F3 b	F4 b
Estimation de la longueur moyenne des chaînes glycaniques	4, 5	5, 7
Acide N-acétyl-neuraminique / Sulfate	4, 3	1, 5
<u>Acide N-acétyl-neuraminique + groupements sulfate</u> 100 acides aminés	26, 6	34, 6
<u>N-acétyl-galactosamine</u> 100 acides aminés	37, 7	33, 4



acide N-acétyl-neuraminique sur sulfate qui est cependant plus élevé dans la fraction F3 b que dans la fraction F4 b (tableau XIV).

D'autre part, la valeur du rapport N-acétyl-galactosamine sur 100 acides aminés permet également d'avoir une estimation du degré de glycosylation de la molécule (tableau XIV).

Ces différentes constatations démontrent que les mucines bronchiques obtenues chez l'adulte par lavage bronchique, dans des zones de l'arbre bronchique macroscopiquement saines, représentent une population de molécules plus sialidées que sulfatées et dont la longueur moyenne des chaînes glycaniques pourrait être de 5 à 6 sucres.

CONCLUSIONS

Dans cette première partie de notre travail, nous avons poursuivi l'étude, entreprise par DEGAND (1972), concernant les mucines bronchiques sécrétées par les malades adultes souffrant de bronchite chronique. Nous avons aussi essayé de déterminer les propriétés des mucines non pathologiques obtenues par lavages bronchiques de l'adulte.

I - Les mucines bronchiques ont été isolées à partir du mucus fibrillaire de malades atteints de bronchite chronique selon un protocole voisin de celui qui a été décrit par DEGAND (1972) : réduction, chromatographie d'échange ionique et chromatographie de gel filtration. Le rendement en mucines purifiées est faible. Il varie d'une sécrétion à l'autre et représente de 1,7 à 10 % du mucus fibrillaire. On doit cependant rappeler que l'action des agents réducteurs ne permet d'obtenir à partir du mucus fibrillaire que de 45 à 69 % de constituants solubles et adialysables.

Les différentes fractions de mucines présentent des caractères acides plus ou moins marqués et leur proportion respective varie d'une sécrétion à l'autre. On peut isoler beaucoup (WAS... et VAN...) peu (MAR...) ou presque pas de mucines de caractères neutres (BIA... et PRO...); il en est de même, des mucines acides trouvées

en grande quantité dans les sécrétions de 3 malades (MAR..., BIA... et PRO...) et en faibles proportions dans les sécrétions de WAS... et de VAN...

II - En ce qui concerne les propriétés physiques des mucines de bronchite chronique purifiées, on doit d'abord remarquer comme l'a déjà signalé DEGAND (1972) la faible absorption de la lumière ultraviolette à 278 nm.

L'étude par ultracentrifugation des différentes mucines sécrétées par l'un des malades (MAR...) montre que si certaines fractions de mucines apparaissent homogènes, d'autres semblent contenir au moins deux types moléculaires, l'un majeur et l'autre mineur. Les valeurs du coefficient de sédimentation trouvées pour les fractions homogènes ou pour les pics majeurs s'échelonnent entre 8 et 10 s et sont voisines de celles qui ont été déterminées par CREECH et KNIGHT (1967) pour des substances de groupe sanguin solubles dans l'eau, isolées de kystes ovariens humains (10,9 S).

Le poids moléculaire des différentes classes de mucines du malade MAR... varie entre 350 000 et 440 000 daltons. Il est inférieur à celui qui a été trouvé par DONALD (1973) pour des substances douées d'activité de groupe sanguin isolées d'extraits phénoliques de kystes ovariens.

III - En ce qui concerne la partie polypeptidique, la teneur en acides aminés des différentes fractions de mucines est faible (de 12 à 21 %). Elle est tout à fait comparable à celle qui a déjà été trouvée par DEGAND (1972) et par HAVEZ et Coll. (1973). Les proportions de THREONINE, de SERINE et de PROLINE sont élevées.

Le taux de cystéine dans les mucines isolées est très faible mais ne permet pas d'éliminer complètement l'éventualité, défendue

par ROBERTS (1976), de ponts disulfure unissant les "monomères" des mucines bronchiques au sein du mucus fibrillaire. Cette éventualité ne peut cependant être retenue pour les mucines bronchiques purifiées à partir du mucus fibrillaire solubilisé par réduction sans alkylation consécutive et qui n'ont pas non plus de tendance spontanée à la réagrégation.

Comme l'a déjà trouvé DEGAND (1972), l'arginine est le seul aminé en position N-terminale détecté par dansylation des mucines A1.

L'hydrazinolyse d'une fraction de mucines A1 (VAN...) met en évidence plusieurs acides aminés en position C-terminale : la thréonine, le glycolle et la sérine. On connaît l'instabilité des hydrazides de la sérine et du glycolle en présence de traces d'eau (SCHROEDER, 1972), mais nos expériences ont été réalisées en milieu anhydre.

La présence de trois acides aminés en position C-terminale conduit à la notion de l'hétérogénéité des chaînes polypeptidiques de ces mucines mais on peut aussi formuler l'hypothèse que cette hétérogénéité résulte de la protéolyse endobronchique plus ou moins importante d'une chaîne polypeptidique unique.

IV - La composition glucidique des mucines bronchiques isolées est tout à fait comparable à celle d'autres mucines bronchiques étudiées par DEGAND (1972), HAVEZ et Coll. (1973), LAMBLIN et Coll. (1972). On y retrouve du fucose, du galactose, de la N-acétyl-galactosamine de la N-acétyl-glucosamine et suivant leur degré d'acidité, une quantité plus ou moins importante d'acide N-acétyl-neuraminique ou de groupements sulfate. L'examen de la composition glucidique des différentes mucines permet de faire certaines remarques :

- a) La teneur en fucose est élevée dans les mucines douées d'activité de groupe sanguin A ou H (tableaux IV_b à VII_b). Il est faible dans les mucines isolées chez un sujet non sécréteur (tableau III_b). Il apparait donc que la dénomination "fucomucines" est parfois impropre pour des mucines non retenues sur une colonne d'Ecteola-cellulose. Les mucines obtenues sont plutôt des mucines "neutres".
- b) Le nombre de résidus acides contenus dans une mucine (acide N-acétyl-neuraminique et groupements sulfate) permet d'une part de préparer les différentes classes de mucines à caractère polyanionique différent (DEGAND, 1972) (HAVEZ et Coll., 1973) et, d'autre part, de proposer une classification pour les différentes mucines.
- les mucines A1 ou mucines neutres, ont une teneur faible en résidus acides. Dans notre travail, nous avons appelé "mucines neutres", les mucines qui ne sont pas retenues sur une colonne d'Ecteola-cellulose équilibrée en chlorure de sodium 0,1 M.
 - les autres mucines ont un caractère acide plus marqué. L'examen des tableaux de composition chimique (tableaux III_b à VII_b) et la valeur du rapport acide N-acétyl-neuraminique + sulfate sur 100 acides aminés (tableaux VIII à XI) montrent une augmentation progressive du caractère acide des mucines Bb aux mucines C2 b ou C3 b. D'autre part, dans chaque classe de mucines, la valeur du rapport acide N-acétyl-neuraminique sur sulfate (tableaux VIII à XI) montre la prépondérance d'un résidu sur l'autre. On remarque que le rapport diminue des mucines Bb aux mucines C2 b ou C3 b. On passe progressivement des sialomucines aux sulfomucines.

Les sialomucines correspondraient à des mucines ayant un rapport acide N-acétyl-neuraminique sur sulfate supérieur à l'unité. Les sulfomucines correspondraient à des mucines ayant un rapport inférieur à l'unité. Mais dans les deux cas, les sialomucines et les sulfomucines sont des molécules hybrides contenant à la fois des résidus d'acide N-acétyl-neuraminique et des groupements sulfate.

c) Il est également possible pour des mucines ne possédant pas d'activité de groupe sanguin A de faire une "estimation de la longueur moyenne des chaînes glycaniques" en considérant que tous les résidus de N-acétyl-galactosamine sont engagés dans des liaisons O-glycosidiques avec des acides aminés hydroxylés, threonine et serine. On trouve ainsi (tableaux VIII à X) que :

- les mucines neutres ont une longueur moyenne de chaînes glycaniques élevée (5,7 à 8,5 résidus)
- les mucines sialidées ont une longueur moyenne de chaînes glycaniques faible (4,9 à 5,6 résidus)
- les mucines sulfatées ont une longueur moyenne de chaînes glycaniques élevée (6,8 à 9,6 résidus).

Dans cette classification, on remarque que les mucines A1 s'identifient aux mucines neutres et les mucines C2 b ou C3 b aux mucines sulfatées. La distinction entre les mucines Bb C1 b, et C2 b est plus délicate car si, généralement ce sont les mucines C1 b qui sont les plus sialidées, on peut trouver que, dans certaines expectorations (M^AR...) (tableau VIII), la fraction la plus sialidée est la fraction Bb. Dans d'autres sécrétions par contre, la mucine Bb se rapproche plutôt des mucines neutres (PRO... et BIA...) (tableaux IX et X).

- d) L'estimation du "degré de glycosylation" par la détermination du rapport N-acétyl-galactosamine sur 100 acides aminés permet de différencier les mucines bronchiques douées d'activité de groupe sanguin A en différentes catégories :
- les mucines neutres A1 comporteraient de 27,2 à 35,9 chaînes glycaniques pour 100 acides aminés (tableaux VIII à X).
 - les mucines les plus riches en acide sialique (C1 b) et, dans le cas du malade PRO... (C2 b) seraient les plus glycosylées et pourraient comporter de 35,3 à 50,6 chaînes glycaniques pour 100 acides aminés.
 - les mucines Bb faiblement acides représentent une catégorie de molécules intermédiaires entre les mucines A1 et les mucines C1 b. Toutefois, on doit remarquer que le degré de glycosylation des mucines Bb du malade BIA... est supérieur à celui des mucines A1 du même malade. Peut-être dans ce cas, les mucines A1 proviennent-elles de la désialidation endobronchique des sialomucines C1 b.
 - les mucines sulfatées (C2 b et C3 b) ont généralement un degré de glycosylation compris entre celui des mucines neutres et celui des mucines sialidées (de 29,3 à 35,6 chaînes pour 100 acides aminés).

L'étude des caractères acides et la composition chimique des mucines sécrétées par les malades adultes atteints de bronchite chronique amène à affiner LA CLASSIFICATION DES MUCINES.

- les mucines bronchiques neutres sont éluées de la colonne d'Ecteola cellulose par du chlorure de sodium 0,1 M. Elles ont des chaînes glycaniques relativement peu nombreuses (aux environs de 30 chaînes pour 100 acides aminés) et comportent en moyenne de 5,7 à 8,5 résidus de sucres.

- les mucines sialidées ont un rapport acide N-acétyl-neuraminique sur sulfate supérieur à l'unité. Leurs chaînes glycaniques sont plus nombreuses (de 35 à 50 chaînes pour 100 acides aminés) et en moyenne plus courtes (moins de 6 sucres).

- les mucines sulfatées ont un rapport acide N-acétyl-neuraminique sur sulfate inférieur à l'unité. Leurs chaînes glycaniques sont en moyenne plus longues que celles des mucines sialidées (de 6,8 à 9,6 résidus de sucres) et leur nombre est un peu plus grand que celui des mucines neutres mais plus faible que celui des mucines sialidées (de 30 à 35 chaînes pour 100 acides aminés).

V - Nous avons aussi cherché à comparer les mucines isolées chez des adultes souffrant de bronchite chronique à un témoin aussi proche que possible de l'état physiologique. Nous avons ainsi isolée et étudié les mucines obtenues par des lavages bronchiques réalisés chez des adultes dans des territoires bronchiques macroscopiquement sains.

Les mucines ainsi isolées présentent une certaine diversité de leurs caractères d'acidité avec cependant une proportion toujours plus élevée de résidus d'acide N-acétyl-neuraminique que de groupements sulfate.

Chez des sujets de groupe sanguin O, ces mucines sialidées ont une longueur moyenne des chaînes glycaniques assez courte (au voisinage de 5 résidus de sucres) et de 33 à 37 chaînes glycaniques pour 100 acides aminés.

Elles entrent ainsi parfaitement dans la classe des mucines sialidées que nous avons définie chez les malades atteints de bronchite chronique.

VI - Si le matériel obtenu par lavage bronchique est bien un reflet fidèle de la sécrétion bronchique normale de l'adulte, la confrontation des résultats obtenus dans les lavages de territoires bronchiques sains et dans l'expectoration de malades atteints de bronchite chronique conduit à la notion que la sécrétion de mucines neutres ou principalement sulfatées est, chez l'adulte, un témoin de l'atteinte bronchique.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DES MUCINES

BRONCHIQUES HUMAINES

INTRODUCTION

Les techniques de chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose ont permis au cours de la première partie de distinguer plusieurs classes de mucines, dans l'expectoration de malades atteints de bronchite chronique.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons cherché à affiner la définition des mucines bronchiques humaines en étudiant leurs propriétés immunologiques.

Une étude préliminaire a montré que seules les mucines bronchiques neutres semblent antigéniques pour le lapin (ROUSSEL et Coll., 1972). Nous avons repris cette étude en utilisant deux préparations de mucines bronchiques neutres obtenues en grande quantité (WAS... et VAN...).

L'obtention d'immunsérums "anti-mucines" devrait nous permettre de vérifier si ce sont bien les mucines neutres qui sont antigéniques pour le lapin ou bien des contaminants. Si les mucines neutres sont antigéniques, on peut espérer définir le site antigénique responsable et les immunsérums obtenus pourraient aussi être utilisés pour préciser l'origine cellulaire des mucines bronchiques.

ROUSSEL et Coll. (1972) avaient également suggéré que les mucines bronchiques humaines permettaient la stimulation de formation d'anticorps pour les souillures qui les contaminaient. Nous avons donc été amenés à rechercher le pouvoir d'adjuvant immunitaire des mucines bronchiques humaines.

RESULTATS

I - ANTIGENICITE DES MUCINES BRONCHIQUES NEUTRES CHEZ

LE LAPIN :

A - PREPARATION DES MUCINES BRONCHIQUES NEUTRES S6 B :

L'étude de l'antigénicité des mucines neutres a, dans un premier temps, été réalisée avec les fractions de mucines neutres WAS... et VAN... préparées seulement par 3 étapes chromatographiques : Ecteola-cellulose, Sepharose 2B, Sepharose 6 B (voir partie précédente, fig. 1). Les mucines S6 B ainsi obtenues sont douées d'activité de groupe sanguin A et H ; elles sont homogènes en électrophorèse à pH 8,2 (fig. 10) et en ultracentrifugation ; elles ne sont pas révélées par un immunosérum antiprotéines sériques humaines ; elles absorbent très peu la lumière ultraviolette à 278 nm. Elles ont une composition glucidique (tableaux XV et XVI) proche de celle des substances de groupe sanguin isolées dans d'autres sécrétions (WATKINS, 1972) et une composition en acides aminés caractérisée par une grande richesse en acides aminés hydroxylés et aussi par un taux élevé de proline, glycolle et alanine (tableaux XVII et XVIII). Par dansylation, on ne peut mettre en évidence qu'un seul acide aminé en position N-terminale : l'arginine. Les mucines S6 B apparaissant pures ont été utilisées pour préparer des immunosérums chez le lapin.

B - ETUDE DES IMMUNSERUMS PREPARES A PARTIR DES MUCINES S6 B :

Des lapins ont été immunisés avec des mucines bronchiques S6 B (WAS... ou VAN...). Chaque lapin a reçu par voie intramusculaire une injection hebdomadaire de 5 mg de mucines pendant un mois, puis une injection hebdomadaire de 10 mg de mucines pendant

AS



MUCINES S6B

PAS



MUCINES S6B



MUCINES S6B
IS ANTI MUCINES S6B
MUCUS FIBRILLAIRE
REDUIT

	S6 B	A1	A1 T	A1 PP
Fucose	18.3	20.1	18.1	16.7
Acide N -acétyl-neuramini- que	-	-	-	-
Galactose	26.6	26.3	25.6	24.3
N-acétyl-glucosamine	22.9	22.0	20.2	20.4
N-acétyl-galactosamine	21.3	19.5	18.5	17.9
Acides aminés	11.5	9.85	10.5	9.0

Les résultats sont exprimés en pourcentage de poids sec

TABLEAU XV : Composition chimique des fractions S6 B, A1, et A1 après hydrolyses par la tryptosine A1 T et par la papaine puis la pronase A1 PP (WAS...).



	S6 B	A1	A1 T	A1 P
Fucose	14,1	16,5	15,7	16,2
Acide N-acétyl-neuraminique	-	-	-	-
Galactose	18,7	22,0	22,3	22,0
N-acétyl-glucosamine	18,9	22,2	22,0	22,2
N-acétyl-galactosamine	18,8	21,6	21,2	21,7
Acides aminés	15,0	14,9	14,4	11,6

Les résultats sont exprimés en pourcentage de poids sec.

TABLEAU XVI : Composition chimique des fractions S6 B, A1 et de la fraction A1 après hydrolyse par la trypsine (A1 T) et par la pronase (A1 P) (VAN...).



TABLEAU XVII : Composition en acides aminés des fractions S6 B, A1, A2 et A1 après hydrolyses par la trypsine A1 T et par la papaine, puis la pronase A1 PP (WAS...).

Résultats exprimés en nombre de résidus par 100 résidus.

	S6 B	A1	A2	A1 T	A1 PP
Asp ^o	2,99	2,05	7,77	1,87	1,88
Thr	27,01	33,58	12,53	32,00	32,53
Ser	16,22	13,37	11,35	16,00	15,53
Glu	4,57	3,81	9,32	3,45	4,05
Pro	9,58	9,00	6,89	11,66	11,32
Gly	7,39	6,92	9,66	6,82	7,17
Ala	9,81	10,49	9,09	10,05	10,22
Cys	-	-	-	-	-
Val	4,10	3,94	6,00	3,93	4,35
Met	-	-	0,86	-	-
Ile	2,16	2,36	3,27	2,16	2,23
Leu	4,91	4,73	7,35	4,55	4,62
Tyr	1,06	traces	2,53	traces	traces
Phe	2,21	1,14	3,10	1,30	traces
Lys	2,42	2,70	4,18	1,66	1,50
His	2,68	2,94	2,05	2,22	2,20
Arg	2,87	2,97	4,01	2,31	2,35

^o Composition en acides aminés déterminée sur autoanalyseur Technicon.



TABLEAU XVIII : Composition en acides aminés des fractions S6 B, A1 et de la fraction A1 après hydrolyses par la trypsine A1 T et par la pronase A1 P (VAN...).

Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus.

	S6 B	A1	A1 T	A1 P
Asp °	4,34	1,79	2,69	1,81
Thr	24,81	32,09	29,81	30,61
Ser	15,75	15,23	15,91	16,87
Glu	6,74	4,18	4,66	3,63
Pro	10,23	12,69	11,62	11,32
Gly	7,01	6,32	8,77	7,90
Ala	8,39	10,70	8,61	10,24
Cys	-	-	-	-
Val	3,88	3,59	3,63	3,85
Met	-	-	-	-
Ile	2,32	2,41	1,93	2,20
Leu	4,93	4,23	3,95	4,31
Tyr	1,59	traces	traces	traces
Phe	1,77	traces	1,17	1,24
Lys	2,61	1,67	1,73	1,60
His	2,15	2,35	2,18	2,31
Arg	3,48	2,74	3,33	2,11



° Composition en acides aminés déterminée par autoanalyseur Technicon

le second mois.

La qualité des immunsérums obtenus a été étudiée en effectuant des immunoélectrophorèses avec d'une part, du mucus bronchique réduit, et d'autre part, les mucines S6 B ayant servi pour les immunisations.

1) Constituants révélés dans le mucus bronchique réduit :

Quand le mucus bronchique réduit WAS... est étudié, en immunoélectrophorèse à l'aide de l'immunsérum anti-mucines S6 B (WAS...), on met en évidence 4 arcs de précipitation (fig. 10).

- un arc a une mobilité électrophorétique identique à celle de la sérum-albumine ;
- un second a une mobilité β_1 -globulinique ;
- les deux derniers arcs se situent dans la zone β_2 et γ globulinique.

Ces résultats sont surprenants si on considère que les préparations de mucines S6 B, utilisées pour immuniser les lapins réunissent un certain nombre de critères de pureté.

Cependant, la mobilité et la forme des arcs décelés par l'immunsérum anti-mucines S6 B (WAS...) dans le mucus réduit rappellent celles de certains déterminants antigéniques habituels de la sécrétion bronchique.

Pour identifier les composants révélés par cet immunsérum, des études immunologiques sont entreprises à l'aide de sérum humain, d'immunoglobulines A de lait, de chaînes légères κ et λ , de lacto-transferrine et de sérum albumine. L'immunsérum anti-mucines S6 B (WAS...) réagit avec la sérum-albumine, les chaînes légères des immunoglobulines, les immunoglobulines A du lait et la lactotransferrine.

2) Pluralité des déterminants antigéniques révélés dans les fractions S6 B :

a - Immunoélectrophorèse simple :

Les immunoélectrophorèses réalisées avec chacun des immunsérum (anti-mucines S6 B (WAS...)) ou anti-mucines S6 B (VAN...)) et la préparation de mucines correspondantes (mucines S6 B (WAS...)) ou mucines S6 B (VAN...)) mettent en évidence un arc de précipitation épais et dont la mobilité correspond à celle des mucines S6 B (fig. 10). Cet arc est bien révélé par l'amidoschwarz et par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Après épuisement avec du sérum humain, la fraction d'immunoglobulines A de lait et la lactotransferrine, cet arc persiste, mais son intensité est plus faible.

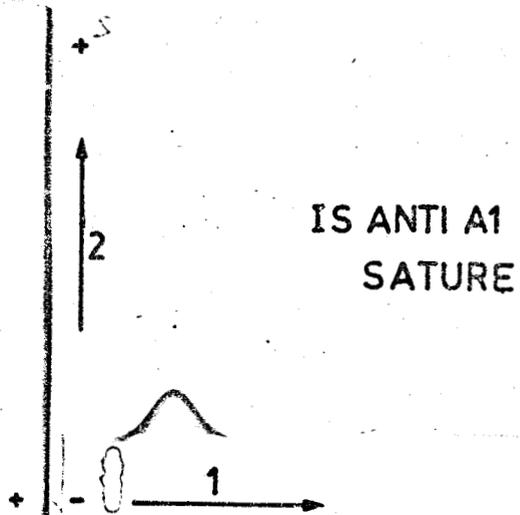
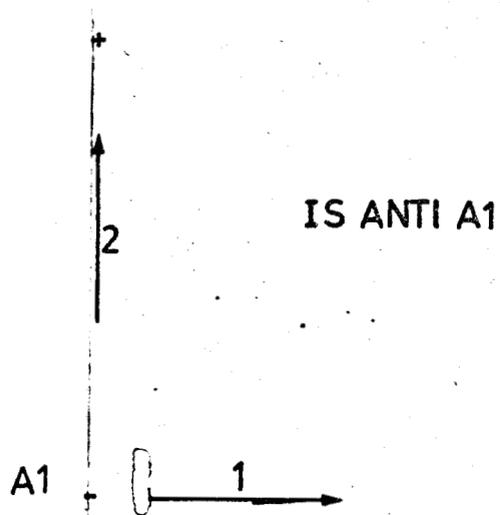
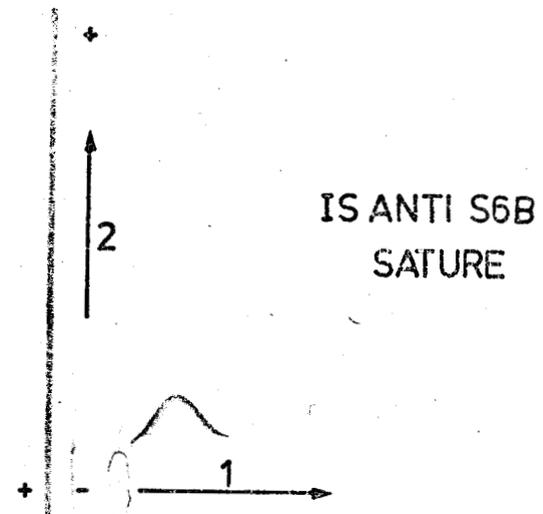
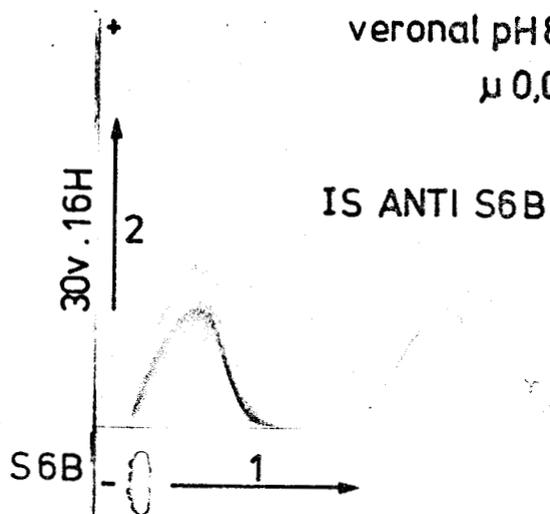
b - Immunoélectrophorèse bidimensionnelle :

Lorsque l'immunoélectrophorèse est réalisée en double dimension, on remarque que l'immunsérum révèle dans la fraction de mucines S6 B, un arc correspondant à la sérum-albumine et quatre ou cinq arcs superposés, ayant la même mobilité électrophorétique que la partie anodique des mucines S6 B (fig. 11). Après épuisement, l'immunsérum ne révèle plus que deux arcs ayant la mobilité électrophorétique des mucines S6 B (fig. 11).

Ainsi les immunsérums préparés à partir de mucines bronchiques neutres S6 B apparemment pures, contiennent différents types d'anticorps : certains sont dirigés contre des protéides souillant les préparations de mucines, peut être même adsorbés sur ces préparations (albumine, bronchotransferrine, immunoglobulines), d'autres permettent de révéler deux antigènes pouvant correspondre aux mucines.

En tout état de cause, les mucines bronchiques S6 B ne sont pas pures et pour vérifier leur antigénicité, une purification de ces molécules s'impose.

veronal pH8,6
 μ 0,02



C - PURIFICATION DES MUCINES BRONCHIQUES NEUTRES S6 B :

Les mucines neutres S6 B (WAS... ou VAN...) ont été purifiées par une étape chromatographique sur colonne de Carboxy-méthyl-cellulose qui a été décrite dans la première partie (fig. 1). On peut ainsi séparer une fraction majeure appelée mucine A1, d'une fraction mineure A2, élue plus tardivement de la colonne. Les fractions A2 (WAS... et VAN...) représentent respectivement 1,4 % et 1,7 % des fractions majeures correspondantes A1 (WAS... et VAN...).

Les fractions A1 et A2 ont une mobilité électrophorétique identique en agarose à pH 8,2 (LHERMITTE, 1972). La fraction A2 est plus fortement colorée par l'amidoschwarz, mais moins fortement par le réactif de Schiff après oxydation périodique que les mucines A1.

D - CARACTERISTIQUES DES FRACTIONS A1 et A2 :

1) Mucines A1 :

Les mucines A1 sont douées d'activité de groupe sanguin A et H (tableau II). L'activité de groupe sanguin des mucines A1 du malade VAN... a été mesurée de façon plus précise (tableau XIX). En outre, ces mucines sont dépourvues d'activité I.[°]

Les compositions chimiques réalisées sur les mucines S6 B et A1 font apparaître une grande analogie (tableaux XV à XVIII). Les mucines A1 ont un taux de glucides plus élevé et sont un peu plus riches en acides aminés hydroxylés.

En ultracentrifugation, les fractions A1 (WAS... et VAN...) sont homogènes et possèdent des constantes de sédimentation $S_{20 w}^{\circ} = 9,7$ s (WAS...) et $S_{20 w}^{\circ} = 10,5$ s (VAN...). La masse moléculaire de la mucine A1 (VAN...) déterminée par équilibre de sédimentation est égale à 350 000 (+ 15 %) daltons.

[°] L'activité de groupe sanguin I a été déterminée par le Professeur Y. DELMAS-MARSALET.

TABLEAU XIX :

Activité de groupe sanguin des mucines bronchiques neutres avant et après hydrolyse (VAN...).

Les résultats sont exprimés en quantité minimale de mucines (microgrammes) donnant une inhibition complète de deux doses agglutinantes (WATKINS et MORGAN, 1962) (Cf. appendice technique).

	anti A	anti H
mucines neutres A1	0,12	31
mucines neutres après hydrolyse trypsique A1 T	0,12	31
mucines neutres après hydrolyse trypsique et pronasique A1 P	0,12	31



2) Fraction A2 :

Cette fraction est obtenue en très faible quantité et sa composition en acides aminés est différente de celle des mucines A1 ; la proportion d'acides aminés dicarboxyliques est plus importante (tableau XVII). Après dansylation, on révèle les dérivés correspondants à l'acide glutamique, l'acide aspartique, la lysine, la sérine et le glyco-colle.

Au total, les fractions de mucines A1 apparaissent plus pures que les fractions de mucines S6 B puisqu'elles ont été débarrassées de la fraction A2. Ces fractions de mucines A1 ont été utilisées pour immuniser des lapins.

E - ETUDE DES IMMUNSERUMS PREPARES A PARTIR DES MUCINES A1 :

Des essais d'immunisation chez le lapin ont été réalisés à l'aide d'injections intramusculaires hebdomadaires de différentes quantités de mucines A1 (1 mg, 5 mg, 10 mg ou 20 mg). Les immunisations les meilleures ont été obtenues avec des injections de 20 mg de mucines pendant 2 mois pour la fraction A1 (WAS...) et 5mg pendant 3 mois pour la fraction A1 (VAN...).

1) Révélation de protéides différents des mucines :

En immunoélectrophorèse, les immunosérums obtenus sont encore capables de révéler la sérum-albumine, la lactotransferrine et les immunoglobulines A.

2) Immunoélectrophorèse bidimensionnelle des mucines A1 :

Les immunoélectrophorèses réalisées avec les immunosérums et les fractions de mucines correspondantes mettent

en évidence deux arcs de précipitation qui ont la même mobilité électrophorétique dans la première dimension : l'un est un arc bien dessiné et l'autre est un arc diffus (fig. 11).

Après saturation des immunsérums par du sérum humain, de la lactotransferrine et des immunoglobulines A, il ne reste qu'un arc bien révélé par le bleu coomassie (fig. 11) et légèrement par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Cet arc semble bien correspondre aux mucines.

L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle de la fraction A1 (VAN...) réalisée avec l'immunsérum préparé à partir de la fraction A1 (WAS...), saturé par du sérum humain, de la lactotransferrine et des immunoglobulines A met en évidence un arc de précipitation.

Ces résultats montrent qu'il existe au sein des mucines bronchiques neutres A1 (WAS...) et A1 (VAN...) un déterminant antigénique commun.

Les fractions A1 (obtenues par purification des mucines S6 B) sont antigéniques pour le lapin. Elles apparaissent moins contaminées que les mucines S6 B par des protéides différents des mucines puisqu'il n'y a plus qu'un arc diffus qui disparaît après épuisement des immunsérums par les protéines du sérum humain, les immunoglobulines A et la lactotransferrine. Toutefois, ces contaminants doivent cependant encore se trouver à l'état de traces dans les fractions A1 puisque les immunsérums préparés à partir de ces fractions contiennent des anticorps dirigés contre ces contaminants.

On peut d'ailleurs se demander si les mucines n'exercent pas un effet d'adjuvant immunitaire à l'égard des traces de protéines qui les contaminent.

La purification des mucines S6 B qui possédaient deux types d'antigènes persistants après épuisement des immunosérum correspondants (fig. 11) permet de les séparer en deux fractions A1 et A2. Les mucines A1 ne possèdent plus qu'un seul type d'antigène révélé par l'immunsérum anti-A1 épuisé correspondant. Le deuxième déterminant antigénique des mucines S6 B a donc été éliminé au cours de la purification.

On peut rappeler à ce propos que TETTAMANTI et PIGMAN (1968) ont décrit deux sortes de mucines sous-maxillaires, l'une majeure caractérisée par sa richesse en glucides et en acides aminés hydroxylés, l'autre mineure caractérisée par une teneur plus importante en acides aminés dicarboxyliques.

Les anticorps anti-mucines bronchiques A1 obtenus chez le lapin ont ensuite été utilisés pour essayer de localiser le déterminant antigénique de ces molécules au sein des cellules de la muqueuse bronchique.

II - LOCALISATION TISSULAIRE DU DETERMINANT ANTIGENIQUE REVELE PAR L'IMMUNSERUM ANTI A1 :

Cette étude a été réalisée sur des coupes de muqueuse bronchique humaine à l'aide de l'immunsérum anti-mucines bronchiques A1 (WAS...). Deux méthodes ont été utilisées : une méthode directe où l'immunsérum anti-A1 a été couplé avec la fluorescéine et une méthode indirecte dans laquelle les anticorps de lapin anti-A1 ont été révélés par des anticorps de mouton anti-globulines de lapin marqués par la fluorescéine.

Avec ces deux méthodes, on observe une fluores-

cence des cellules muqueuses, tandis que les cellules calciformes ou séreuses ne sont pas marquées. Le marquage est surtout net à la périphérie des cellules, mais des éléments fluorescents sont aussi observés à l'intérieur des cellules essentiellement au pôle apical des cellules muqueuses.

Par cette technique, il a donc été possible de localiser le déterminant antigénique des mucines neutres dans les cellules muqueuses de la muqueuse bronchique humaine.

III - ETUDE DU SITE ANTIGENIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES

NEUTRES :

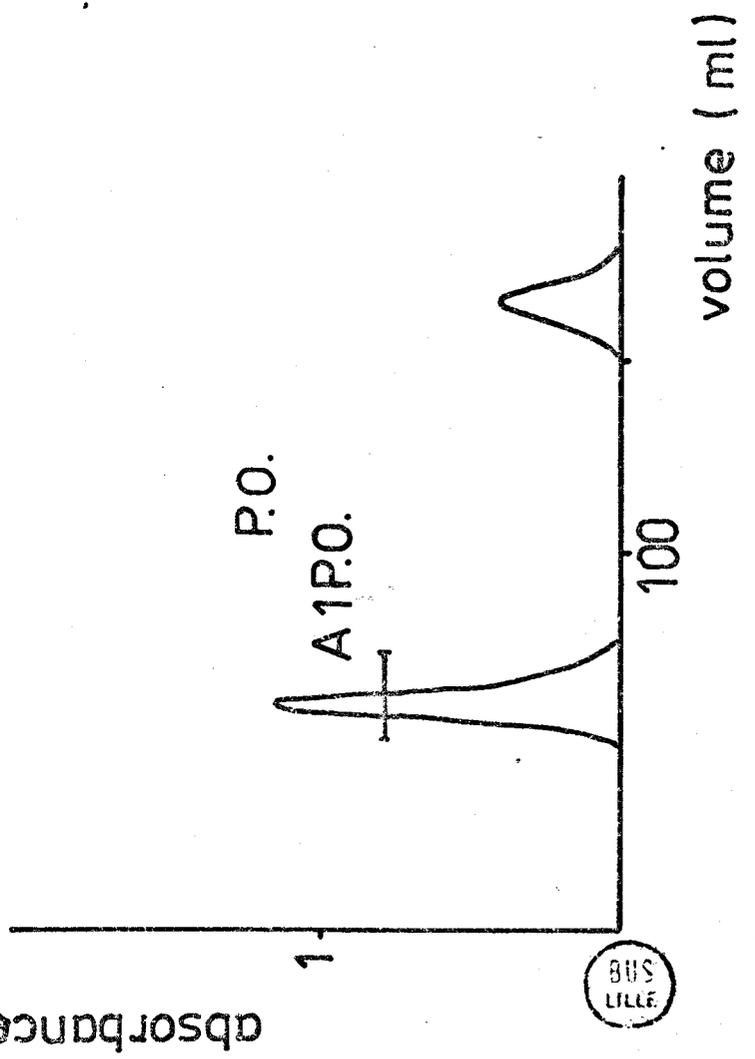
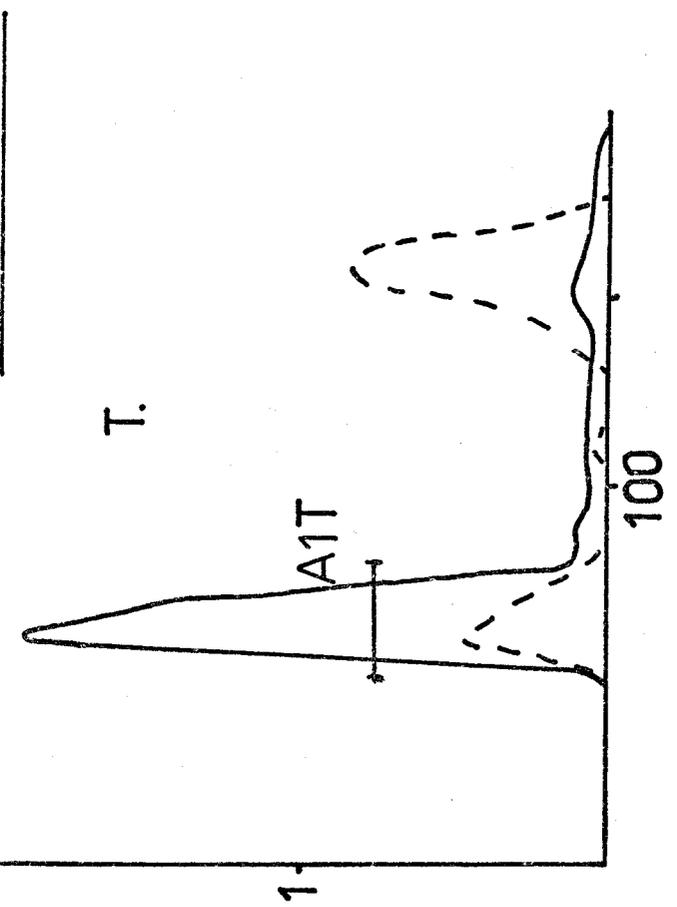
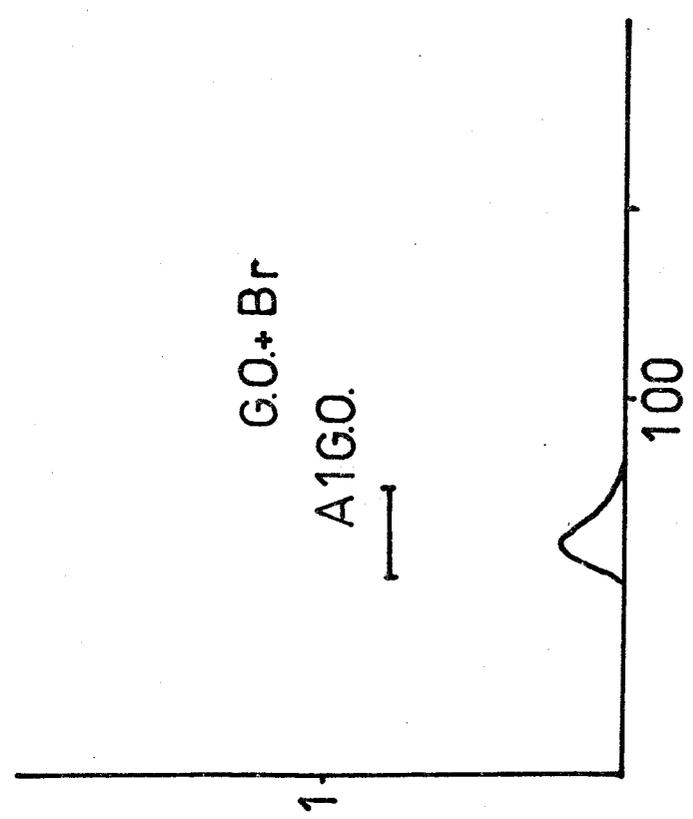
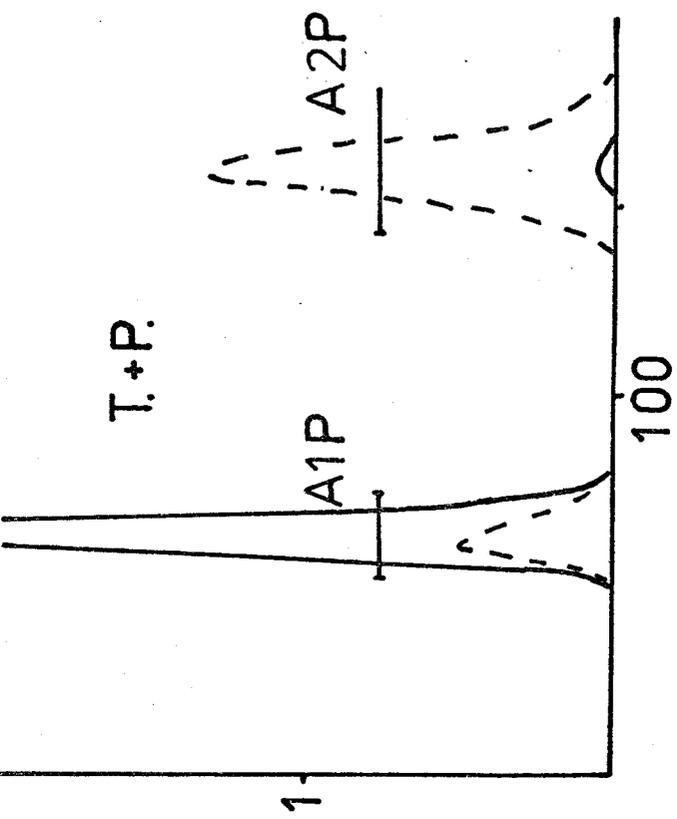
Une étude du site antigénique des mucines bronchiques neutres doit s'attacher à préciser les composantes peptidique et glucidique pouvant intervenir de façon isolée ou combinée dans la structure de ce site.

A - RECHERCHE D'UNE COMPOSANTE PEPTIDIQUE DANS LE SITE ANTIGENIQUE :

Dans la recherche d'une composante peptidique, les mucines ont été soumises à l'action de différents enzymes, trypsine, papaine et pronase.

1) Action de la trypsine :

Les mucines bronchiques neutres A1 (WAS... ou VAN...) hydrolysées par la trypsine sont soumises à une chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 100 dans l'acide acétique 0,1 M (fig. 12). Une seule fraction A1 T, riche en glucides combinés est exclue de la colonne. Une autre fraction, réagis-



sant avec la ninhydrine est éluée plus tardivement (fig. 12). Après lyophilisation, cette fraction ne se retrouve qu'à l'état de traces.

En électrophorèse en agarose à pH 8,2, la fraction A1 T a la même migration que les mucines A1 (fig. 13).

L'inhibition d'hémagglutination réalisée sur la fraction A1 T (VAN...) montre qu'elle a des activités de groupe sanguin A et H analogues à celles de la fraction A1 correspondante (A1 VAN...) (tableau XIX).

Les fractions A1 T ont une composition chimique analogue à celle des mucines A1 (tableaux XV et XVI). Il en est de même pour leur composition en acides aminés (tableaux XVII et XVIII).

L'arginine est le seul acide aminé identifié en position N-terminale.

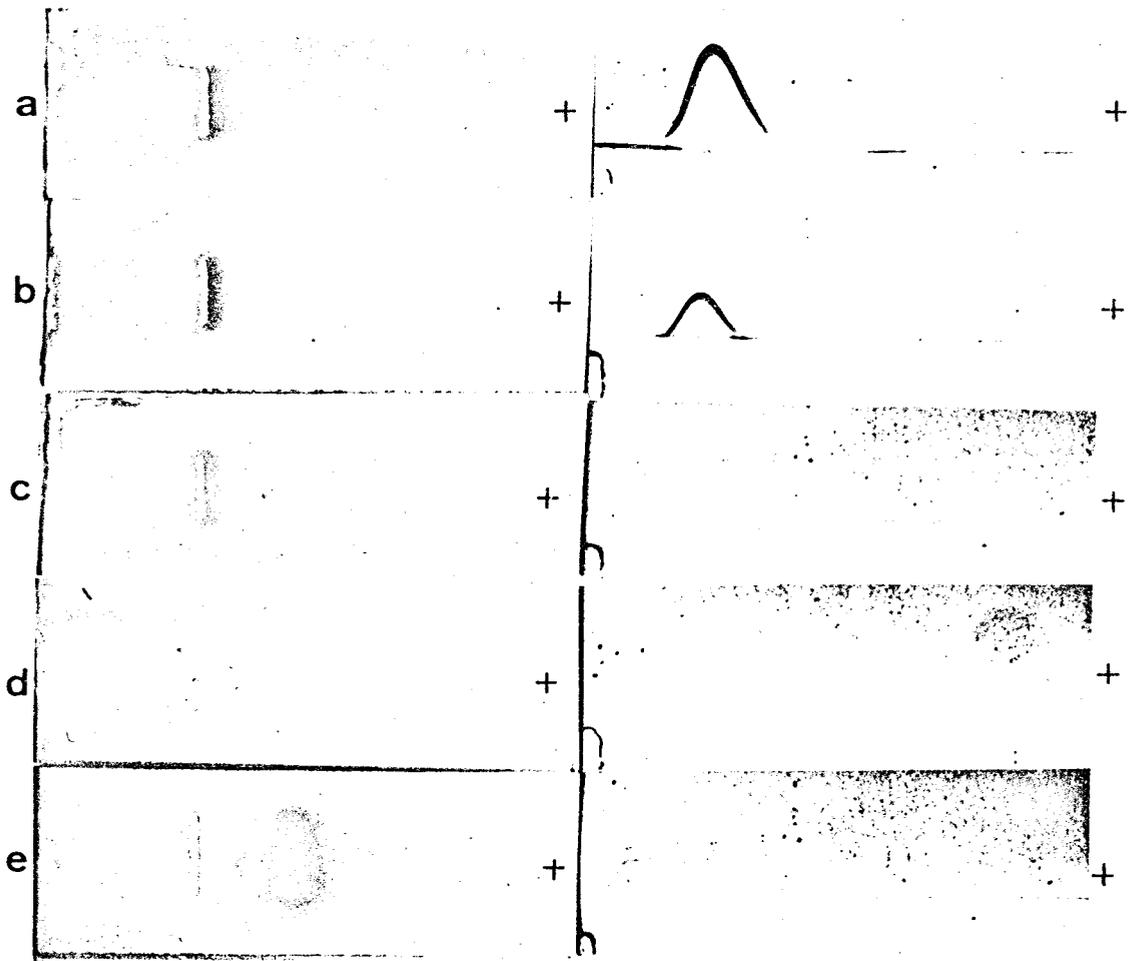
L'étude des acides aminés obtenus après hydrolyse de la fraction A1 T (VAN...) met en évidence de la lysine, de la sérine et du glycolle. Il n'y a pas de thréonine.

En ultracentrifugation, les fractions A1 T se présentent sous la forme de pic symétrique dont les coefficients de sédimentation sont respectivement $S_{20w}^{\circ} = 10,3$ s (A1 T WAS...) et $S_{20w}^{\circ} = 10,8$ s (A1 T VAN...). Le poids moléculaire de cette dernière fraction est $M_{20w}^{\circ} = 370\ 000$ (+ 15 %).

L'étude immunoélectrophorétique bidimensionnelle réalisée avec les immunsérums anti-A1 correspondants montre la présence d'un arc (fig. 13). Le déterminant antigénique n'est donc pas détruit par l'hydrolyse trypsique.

2) Action successive de la trypsine, de la papaine et de la pronase :

La fraction A1 T (WAS...) est hydrolysée par la



BHS
LILLE

mercuripapaine pendant 48 h à 37°C puis par la pronase pendant 24 h à 37°C. L'hydrolysate est centrifugé et le surnageant obtenu est précipité par de l'éthanol absolu. Le précipité est alors remis en solution et déposé sur la colonne de Sephadex G 100 équilibrée et éluée avec de l'acide acétique 0,1 M. On n'obtient qu'une seule fraction glycopeptidique exclue de la colonne (A1 PP).

La composition chimique de cette fraction est peu différente des mucines A1 (tableau XV). Le seul acide aminé retrouvé en position N-terminale est toujours l'arginine. Leur taille moléculaire étudiée par ultracentrifugation n'est pas réduite ($S_{20}^{\circ} = 11,6$ s).

L'étude immunoélectrophorétique bidimensionnelle montre qu'il n'y a plus d'arc révélé par l'immunsérum anti-A1 correspondant. Le déterminant antigénique est donc détruit par actions successives de la trypsine, de la papaine et de la pronase.

3) Action de la pronase :

La fraction A1 T (VAN...) est hydrolysée par la pronase pendant 24 h à 37°C. La solution est lyophilisée et soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex G 100 (fig. 12).

Une fraction glycopeptidique (A1 P) est exclue de la colonne et séparée d'une fraction réagissant avec la ninhydrine qui, elle, est éluée plus tardivement de la colonne (A2 P).

En électrophorèse à pH 8,2, la fraction A1P est homogène et a une mobilité identique aux mucines A1 (VAN...) (fig. 13).

Cette fraction A1 P a la même activité de groupe sanguin que les mucines A1 (VAN...) et la même composition glucidique (tableaux XVI et XIX). Sa composition en acides aminés est légèrement modifiée (tableau XVIII).

Par contre, l'arginine est encore le seul acide aminé identifiable en position N-terminale, alors que les acides aminés persistants après hydrazinolyse sont maintenant l'alanine et la thréonine, avec la sérine et le glyco-colle.

En ultracentrifugation, cette fraction se présente sous la forme d'un pic légèrement asymétrique dont la constante de sédimentation $S_{20}^{\circ} = 11,6$ s. Son poids moléculaire est de 280 000 (+ 15 %).

L'étude immunoélectrophorétique en deux dimensions effectuée avec l'immunsérum anti-A1 (VAN...) ne permet plus de révéler un arc de précipitation (fig. 13).

Le déterminant antigénique est donc détruit par action successive de la trypsine et de la pronase.

La fraction A2 P est dessalée sur une colonne de résine mixte AG 501 x 8 (Biorad) et lyophilisée. La composition glucidique effectuée en chromatographie phase gazeuse sur les traces de matériel, récupérées montre qu'elle renferme du fucose, du galactose, de la N-acétyl-glucosamine et de la N-acétyl-galactosamine dans les rapports molaires 1; 2; 0,8; 1.

B- RECHERCHE D'UNE COMPOSANTE GLUCIDIQUE DANS LE SITE ANTIGENIQUE DES MUCINES NEUTRES :

1) Oxydation periodique :

Les mucines A1 sont soumises à une oxydation periodique pendant 24 h à 4°C puis réduites par du borohydrure de sodium pendant 16 h à 4°C. La solution est ensuite acidifiée jusqu'à pH 5 et soumise à une chromatographie sur une colonne de G 100 dans l'acide acétique 0,1 M (fig. 12). Une fraction réagit avec l'orcinol, elle est exclue de la colonne et lyophilisée. L'étude immuno-

électrophorétique de cette fraction (A1 G O) en double dimension montre qu'elle n'est plus révélée par l'immunsérum anti A1 correspondant (fig. 13).

L'oxydation periodique détruit donc le site antigénique des mucines A1.

2) Action de la galactose oxydase et oxydation par le brome :

Les mucines A1 sont dissoutes dans du tampon phosphate de sodium 0,075 M de pH 7,0 et soumises à l'action de la galactose oxydase pendant 24 h à 37°C. Après addition de carbonate de calcium, du brome est ajouté. Le mélange est gardé pendant 24 h à température du laboratoire et à l'obscurité, et le précipité formé est solubilisé par addition d'acide chlorhydrique 1 M. Cette solution est ensuite lyophilisée et soumise à une chromatographie sur une colonne de Sephadex G 100 dans l'acide acétique 0,1 M. Les mucines oxydées réagissant avec l'orcinol (AGO) sont exclues de la colonne (fig. 12) et lyophilisées. Cette fraction est homogène en électrophorèse à pH 8,2 mais sa mobilité est plus anodique que celle de la fraction A1 (fig. 13). Elle n'est plus révélée par l'immunsérum anti-A1 correspondant.

L'action de la galactose oxydase et du brome ne permet plus de révéler le site antigénique des mucines A1 par immunoélectrophorèse.

3) Recherche d'un déterminant antigénique analogue aux substances de groupe :

Le déterminant antigénique contenu dans la fraction A1 pourrait être de nature glucidique puisqu'il est détruit par oxydation periodique ou par oxydation par la galactose oxydase et le brome. Afin de voir s'il n'y avait pas identité entre le déterminant des mucines

nes bronchiques neutres et certains déterminants erythrocytaires de groupe sanguin, l'immunsérum anti-A1 (VAN...) a été épuisé avec des globules rouges humains A ou O, ou des globules rouges de mouton.

Après immunoélectrophorèse en double dimension de la fraction A1 avec les immunsérums anti-A1 épuisés par les différents types de globules, l'arc est toujours présent.

Il n'y a donc pas dans cette fraction A1 (VAN...) de déterminant antigénique ayant la structure des antigènes de groupe sanguin A, H ou de l'antigène de Forssman.

L'importance de la partie peptidique du déterminant antigénique des mucines bronchiques neutres a été étudiée en soumettant ces mucines soit à l'action successive de la trypsine, de la papaine et de la pronase, soit à l'action de la trypsine et de la pronase.

La chromatographie de gel filtration de chaque hydrolysate sur Sephadex G 100 a permis de séparer deux types de fractions : les unes de masse moléculaire élevée sont exclues de la colonne, les autres de poids moléculaire inférieur contiennent des produits de protéolyse.

Le matériel exclu de la colonne A1 T, A1 PP et A1 P réagit avec l'orcinol et renferme des glycopeptides ayant la même composition chimique et le même acide aminé en position N-terminale que les mucines A1. L'hydrazynolyse des mucines A1 (VAN...) et des glycopeptides correspondants A1 T et A1 P montre que les trois fractions renferment du glycolle et de la sérine, cependant on trouve de la thréonine dans la fraction A1, de la lysine dans la fraction A1 T, de l'alanine et de la thréonine dans la fraction A1 P. Les acides aminés C-terminaux identifiés dans les trois

fractions sont donc différents. Les glycopeptides A1 T et A1 P sont toujours doués d'activité de groupe sanguin, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec une glycoprotéine de groupe sanguin isolé de liquides de kyste ovarien (PUSZTAI ET MORGAN, 1961), (DONALD, 1973).

La fraction de masse moléculaire plus faible contient des traces de substances réagissant très peu avec l'orcinol, mais présentant une réactivité importante à la ninhydrine.

La très faible différence entre les masses moléculaires des mucines A1 et des glycopeptides A1 T et A1 P, l'identité de l'acide aminé N-terminal dans chaque fraction et la modification de leur acide aminé C-terminal montre que les deux hydrolyses (trypsine et pronase) ont agi successivement sur un fragment de la molécule situé dans la partie C-terminale. DONALD, (1973) a montré que la digestion pronasique de plusieurs substances de groupes sanguins isolées des liquides de kyste ovarien réduisait la taille moléculaire de ces glycoprotéines en coupant la chaîne peptidique dans les zones où elle n'est pas glycosylée. En gel filtration, le matériel qui résistait au traitement enzymatique avait un profil d'éluion identique (DONALD, 1973). Cependant, la masse moléculaire de ces fractions était beaucoup plus élevée que celle des fractions A1 T et A1 P.

La légère augmentation du coefficient de sédimentation des mucines bronchiques hydrolysées après action de la trypsine (A1 T) puis après action successive de la papaine et de la pronase (A1 PP) ou de la pronase seule (A1 P) montre que les hydrolyses provoquent des modifications dans la conformation des mucines, en leur conférant peut être une forme plus ramassée.

Le site antigénique des mucines n'est pas détruit par la trypsine mais disparaît après action successive de la papaine

et la pronase ou de la pronase, il est donc constitué essentiellement de séquences peptidiques.

Une relation entre le déterminant antigénique et une activité de substances de groupe sanguin A ou H ou encore une activité de type Forsrman ne peut être retenue pour deux raisons :

- a - les mucines A1 et les glycopeptides ont la même activité de groupe sanguin A et H.
- b - les immunsérums saturés avec des globules rouges humains ou des globules rouges de mouton précipitent encore les mucines A1.

Cependant, des résidus osidiques pouvaient aussi entrer dans la constitution du site antigénique ; c'est pourquoi les mucines ont été soumises soit à une oxydation periodique, soit à une oxydation par la galactose oxydase et le brome. Les mucines oxydées par l'acide periodique ne sont plus capables de réagir avec l'immunsérum. De même, l'action successive de la galactose oxydase et du brome détruit la réactivité immunologique, suggérant que des résidus de galactose et (ou) de N-acétyl-galactosamine font partie du déterminant antigénique.

Ces résultats semblent démontrer que les mucines bronchiques neutres possèdent un déterminant antigénique, situé dans la partie C-terminale de l'axe peptidique qui contient aussi des glycannes.

On peut rappeler à ce propos que le déterminant antigénique des mucines sous-maxillaires ovines désialidées comprend à la fois le résidu de N-acétyl-galactosamine engagé dans une liaison O-glycosyl avec un acide aminé hydroxylé et quelques résidus d'acides aminés voisins du point de branchement (GOTT-SCHALK et Coll., 1971).

Les résultats obtenus sur les mucines bronchiques neutres d'activité H dans la première partie de notre travail montrent que ces molécules comportent par rapport aux autres fractions de mucines un nombre de chaînes glycaniques plus restreint. En supposant que les mucines bronchiques neutres possèdent une activité de groupe sanguin A, ont-elles aussi un degré de glycosylation assez faible, les résultats de l'étude immunologique permettraient de soulever l'hypothèse que les mucines neutres sont moins fortement glycosylées du côté C-terminal de la molécule qui est assez facilement dégradé par les enzymes protéolytiques.

Toutefois, on ne peut complètement éliminer l'hypothèse selon laquelle le déterminant antigénique serait situé sur une partie de la molécule non dégradée par l'action des enzymes protéolytiques, mais dont la conformation serait bouleversée par la protéolyse de la partie C-terminale des mucines.

IV - ROLE D'ADJUVANT IMMUNITAIRE DES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

Lors de l'immunisation des lapins, soit avec les préparations de mucines S6 B (WAS...) soit avec les mucines A1 (WAS...) ou A1 (VAN...) nous avons vu que le lapin était capable de synthétiser des anticorps contre les mucines mais aussi qu'il était aussi capable de fabriquer des anticorps dirigés contre les traces de protéides contaminant les différentes préparations de mucines telles que la sérum-albumine, les immunoglobulines et la bronchotransferrine.

Les mucines pourraient peut-être jouer un rôle d'adjuvant immunitaire pour ces contaminants. Pour vérifier cette hy-

thèse, le rôle d'adjuvant immunitaire des mucines à l'égard des protéines sériques a été recherché et comparé à celui de l'adjuvant complet de Freund.

Deux groupes de lapins ont reçu une même quantité de sérum humain normal préalablement mélangé, soit avec l'adjuvant de Freund, soit avec des mucines bronchiques neutres A1 (MAR...) isolées à partir de l'expectoration d'un sujet de groupe sanguin H atteint de bronchite chronique. Un troisième groupe servant de contrôle n'a reçu que des mucines bronchiques A1 (MAR...).

Deux lapins (groupe I) ont reçu chacun deux injections intramusculaires d'un mélange de 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund et de 0,5 ml de sérum humain normal dialysé, lyophilisé et remis en solution dans 0,5 ml de solution de chlorure de sodium à 9 p. 1 000.

Trois lapins (groupe II) ont reçu chacun deux injections d'un mélange de 3 mg de mucines bronchiques et de 0,5 mg de sérum humain lyophilisé dissous dans 1 ml de chlorure de sodium à 9 p. 1000.

Deux lapins (groupe III) ont reçu chacun deux injections d'un mélange de 3 mg de mucines bronchiques dissous dans 0,5 ml de chlorure de sodium à 9 p. 1000 .

Les injections ont été séparées par un intervalle de trois semaines et le sérum de chaque animal a été prélevé trois semaines après la deuxième injection.

Les immunsérums obtenus ont été étudiés en immunoélectrophorèse bidimensionnelle en utilisant un rapport antigène/immunsérum identique (soit respectivement 10 à 20 microgrammes de protéines du sérum pour 0,5 ou 1 ml d'immunsérum de lapin).

Les sérums prélevés chez les lapins de groupe III,

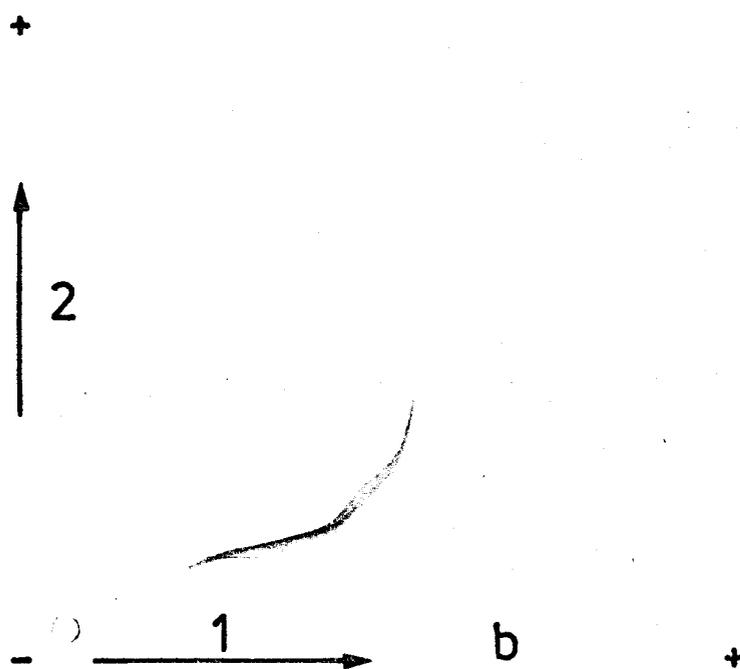
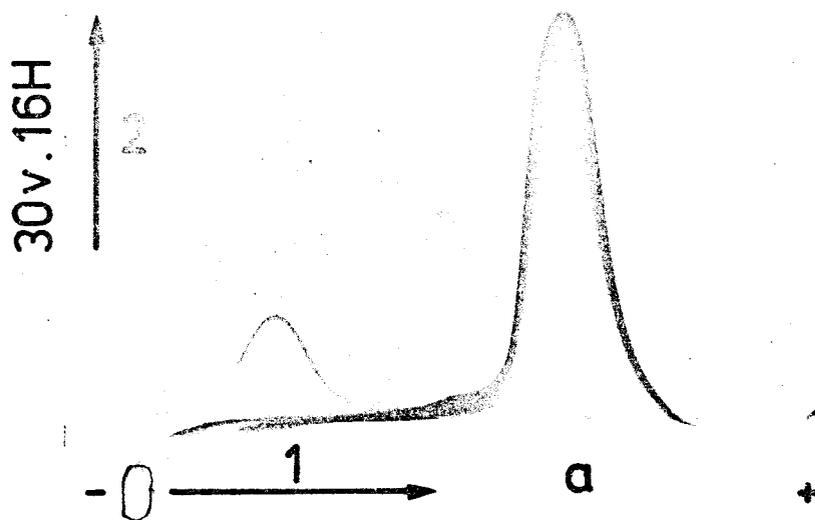
qui n'ont reçu que des mucines, n'ont pas permis de révéler la moindre trace de protéines sériques humaines. On peut considérer que ces mucines bronchiques sont pures.

Les immunsérums prélevés chez les lapins de groupe I qui ont reçu le mélange sérum humain-adjvant de Freund permettent de révéler la sérum-albumine et une fraction globulinique de mobilité β 2 (fig. 14).

Les immunsérums prélevés chez les trois lapins du groupe II qui ont reçu le mélange sérum humain-mucines bronchiques permettent de révéler la sérum-albumine et 5 fractions globuliniques (fig. 14). Avec le sérum de l'un des lapins, le pic correspondant à l'albumine observé en immunoélectrophorèse (fig. 14) est particulièrement petit : ceci signifie que le titre des anticorps anti-albumine du sérum de ce lapin est particulièrement élevé.

Les mucines bronchiques humaines neutres possèdent à l'égard de certaines protéines du sérum humain, un rôle d'adjvant immunitaire supérieur à celui de l'adjvant complet de Freund.

veronal pH 8,6
 μ 0,02



CONCLUSION

En conclusion, cette étude de l'antigénicité des mucines bronchiques humaines neutres a permis de mettre en évidence plusieurs points.

I - Les mucines bronchiques humaines neutres sont difficiles à purifier :

En effet, en utilisant un protocole de fractionnement comportant successivement une chromatographie sur Ecteolacellulose, deux étapes chromatographiques sur Sepharose 2 B et 6 B, puis une chromatographie sur carboxy-méthyl-cellulose, on obtient des mucines neutres qui ont une composition chimique très particulière et voisine de celle des substances de groupe sanguin dont elles possèdent aussi l'activité.

L'électrophorèse en gélose, l'ultracentrifugation, la détection d'un seul acide aminé N-terminal par dansylation semblent indiquer la pureté de ces mucines. La détection de plusieurs acides aminés après hydrazinolyse semble cependant indiquer une certaine hétérogénéité de ces molécules. En outre, si l'immunisation de lapins par les mucines neutres démontre l'existence d'un site antigénique semblant bien

appartenir aux mucines, elle montre aussi que ces molécules sont encore souillées par des traces de contaminants (albumine, bronchotransferrine, immunoglobulines) dont la taille moléculaire est inférieure à celle des mucines qui, théoriquement, avaient dû être éliminées lors de l'étape de gel filtration sur Sepharose 6B et qui sont peut être adsorbées sur les mucines.

II - Le déterminant antigénique révélé par les immunsérums préparés à partir des mucines neutres est retrouvé dans les cellules muqueuses bronchiques humaines normales :

Si on considère que les mucines bronchiques neutres ne représentent pas une population de molécules normalement sécrétées par une muqueuse bronchique saine, on peut se demander pourquoi le site antigénique des mucines neutres est détecté dans les cellules d'une muqueuse normale. Il est possible que les mucines neutres représentent soit des produits de dégradation, soit plus vraisemblablement des produits dont la synthèse glycanique est incomplète.

III - Les faibles quantités d'immunsérums obtenus n'ont pas permis la poursuite de notre étude sur l'antigénicité des mucines neutres.

En effet, l'emploi de la chromatographie d'affinité, au moyen d'anticorps antimucines insolubilisés auraient peut-être permis de distinguer, au sein des mucines neutres, des molécules antigéniques, et d'autres pas.

IV - Le site antigénique des mucines neutres présente une composante peptidique située au niveau de l'extrémité C-terminale.

Il n'est pas détruit par la trypsine mais est dégradé par l'action de la pronase, enzymes qui laissent intacte la partie

N-terminale des mucines. Il faut remarquer que l'action de ces enzymes protéolytiques entraîne aussi une modification de la conformation des mucines qui se traduit par une augmentation de la constante de sédimentation.

Des glycanes interviennent aussi peut être dans cette propriété puisque la destruction des glycanes par oxydation périodique ou traitement par la galactose oxydase et le brome modifie l'activité antigénique.

V - Les mucines bronchiques neutres jouent pour certaines protéines sériques humaines, un rôle d'adjuvant immunitaire plus puissant que celui de l'adjuvant complet de Freund.

On ne sait pas encore si les mucines acides possèdent aussi cette propriété de stimulation immunitaire. Si tel était le cas, les fonctions des mucines dans la défense de la muqueuse bronchique humaine pourraient être multiples (rôle de protection, stimulation des défenses immunitaires à l'égard des protéines étrangères).

On ne sait pas non plus si dans certaines bronchites chroniques, la présence dans la sécrétion bronchique de molécules dont les chaînes glycaniques sont dégradées sous l'influence des enzymes bactériens, ou au contraire, incomplètement synthétisées, peut être à l'origine de désordres auto-immunitaires selon un mécanisme un peu analogue à celui qui a été évoqué dans les cas de thyroidites chroniques (HAUROWITZ, 1968).

TROISIEME PARTIE

AFFINITE DES LECTINES POUR LES MUCINES BRONCHIQUES

ET POUR LA MUQUEUSE BRONCHIQUE HUMAINE

INTRODUCTION

La classification des mucines bronchiques, proposée à la fin de la première partie de ce travail montre, qu'en plus de la diversité des caractères d'acidité, les mucines neutres (A1) faiblement acides (Bb) et acides (C1 b, C2 b et C3 b) pouvaient se différencier les unes des autres par le nombre et la "longueur moyenne" de leurs chaînes glycaniques. Seules, les mucines A1 sont antigéniques chez le lapin et leur déterminant antigénique peut être localisé dans les glandes muqueuses de la muqueuse bronchique humaine.

L'utilisation des lectines (BOYD et SHAPLEIGH, 1954a) nous est alors apparue opportune. En effet, les lectines, protéines et glycoprotéines isolées du règne végétal ou animal sont douées de nombreuses propriétés (SHARON et LIS, 1972) ; (LIS et SHARON, 1973) ; (NICOLSON, 1974 a). Elles agglutinent des cellules, érythrocytes ou autres cellules animales. Certaines servent à typer les groupes sanguins et permettent de réaliser des études structurales sur les substances de groupe sanguin. D'autres lectines sont capables de différencier les cellules normales des cellules tumorales. Quelques unes sont même mitogéniques. Toutes ces propriétés sont dues, au fait que les lectines sont capables de réagir avec certaines structures glycaniques apparte-

nant à des glycoconjugués des membranes cellulaires (SHARON et LIS, 1972). L'emploi de la chromatographie d'affinité au moyen de lectines insolubilisées sur des gels a permis d'isoler des glycoprotéines, des oligosaccharides et des polyssacharides.

De plus, au niveau tissulaire, il est possible de mettre en évidence les interactions des lectines avec des structures glycaniques, soit par microscopie optique, soit par microscopie électronique (BERNHARD et AVRAMEAS, 1971).

Nous avons entrepris une étude de l'affinité de huit lectines (lectines de ricin, de la cacahuète, de soja, du germe de blé, de la fève-Jack, du genêt épineux et du lotier corniculé) pour les éléments glucidiques entrant dans la structures des chaînes glycaniques des mucines bronchiques. L'objectif de ce travail a été de préciser l'affinité des différents types de mucines précédemment décrits pour les lectines dont nous disposions.

Nous avons aussi été amenés à entreprendre la purification des mucines bronchiques par chromatographie d'affinité.

Les résultats obtenus sur les mucines nous ont ensuite incités à comparer l'affinité des différentes lectines pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine normale.

RESULTATS

I - DESCRIPTION DES LECTINES UTILISEES :

A - HEMAGGLUTINE I DU GENET EPINEUX (Ulex Europeus) :

Cette lectine est préparée à partir des graines de genêt épineux (GORSE PHYTOHEMAGGLUTININ) selon la méthode décrite par OSAWA et MATSUMOTO (1972) modifiée par l'utilisation d'une chromatographie d'affinité sur une colonne d'Epoxy-Sepharose couplée à du fucose (VREBLAD, 1976).

L'hémagglutinine I isolée des graines de genêt épineux dont l'extrait brut était déjà utilisé par BOYD et SHAPLEIGH en 1954 pour le diagnostic des sécréteurs et la détermination des sous-groupes sanguins A et AB, a une spécificité pour le fucose (MATSUMOTO et OSAWA, 1969) et peut donc être utilisée pour la mise en évidence de ce sucre au sein des glycoconjugués.

B - LECTINE DU LOTIER CORNICULE (Lotus Tetragonolobus) :

La lectine du lotier corniculé (L fucose binding Protéins) utilisée est une préparation commerciale (Miles Laboratories, Kankakae, Illinois, 60901).

Cette lectine présente une spécificité pour les résidus d' α L-fucose (MORGAN et WATKINS, 1953) (SPRINGER et WILLIAMSON, 1962) et réagit avec toutes les substances de groupe sanguin du système ABO (NAPIER et Coll. , 1974).

La mise en évidence de résidus de fucose peut donc être réalisée par l'emploi de cette lectine (NEWMAN et KABAT, 1976b) (PEREIRA et KABAT, 1976).

C - LECTINE DE GERME DE BLE (Triticum Vulgaris) :

La lectine de germe de blé (WHEAT GERM AGGLUTININ ou WGA) a été préparée par chromatographie d'affinité sur une

colonne de Sepharose $-(\epsilon\text{-aminocaproyl})\beta\text{-D.N.}$ acétyl-glucosamino-pyranosylamine selon la technique de ALLEN et Coll. (1973) et nous a été aimablement fournie par le Docteur H. DEBRAY.

Cette lectine a la propriété de se lier à des structures oligosaccharidiques contenant de la N-acétyl-glucosamine tels que le chitobiose, ou le chitotriose (BURGER, 1969) ; (NAGATA, et BURGER, 1972) ; (ALLEN et Coll., 1973). Cependant, récemment GREENAWAY et LEVINE (1973) ont montré que la lectine de germe de blé avait un site de liaison pour une molécule de N-acétyl-glucosamine et un autre site pour l'acide N-acétyl-neuraminique.

La lectine du germe de blé peut donc être utilisée pour la recherche de résidus de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique appartenant à des structures glycaniques.

D - LECTINE DU SOJA (Glycine Max) :

La lectine du soja (SOYA BEAN AGGLUTININ ou S.B.A.) a été préparée par chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose N- $(\epsilon\text{-aminocaproyl})\text{-}\beta\text{D}$ galactopyranosylamine selon le protocole décrit par GORDON et Coll. (1972) et nous a été aimablement fournie par le Docteur H. DEBRAY.

La lectine du soja montre une spécificité pour des molécules contenant des résidus de N-acétyl-galactosamine ou de galactose en position terminale non réductrice (LIS et Coll., 1970) ; (LIS et SHARON, 1973). Elle peut donc être utilisée pour la détection de tels résidus dans les structures glycaniques.

E - LECTINES DU RICIN (Ricinus communis) :

1) Préparation des lectines de Ricinus Communis :

Les lectines de Ricinus Communis ont été préparées selon le protocole décrit par TOMITA et Coll., 1972) : fractionnement au sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose 4B.

2) Fractionnement des lectines de Ricinus Communis :

La fraction de lectines éluée de la colonne de Sepharose 4B est alors soumise à une chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sephadex G 150 équilibrée et éluée par un tampon phosphate de sodium 0,005 M, 0,1 M en chlorure de sodium, de pH 7,0 ; on sépare ainsi 3 fractions : une fraction F1, exclue de la colonne et dépourvue d'activité agglutinante pour les globules rouges humains de groupe sanguin B et deux fractions F2 et F3, dont l'élution est retardée et qui sont capables d'agglutiner les globules rouges B (fig. 15).

3) Propriétés des lectines obtenues :

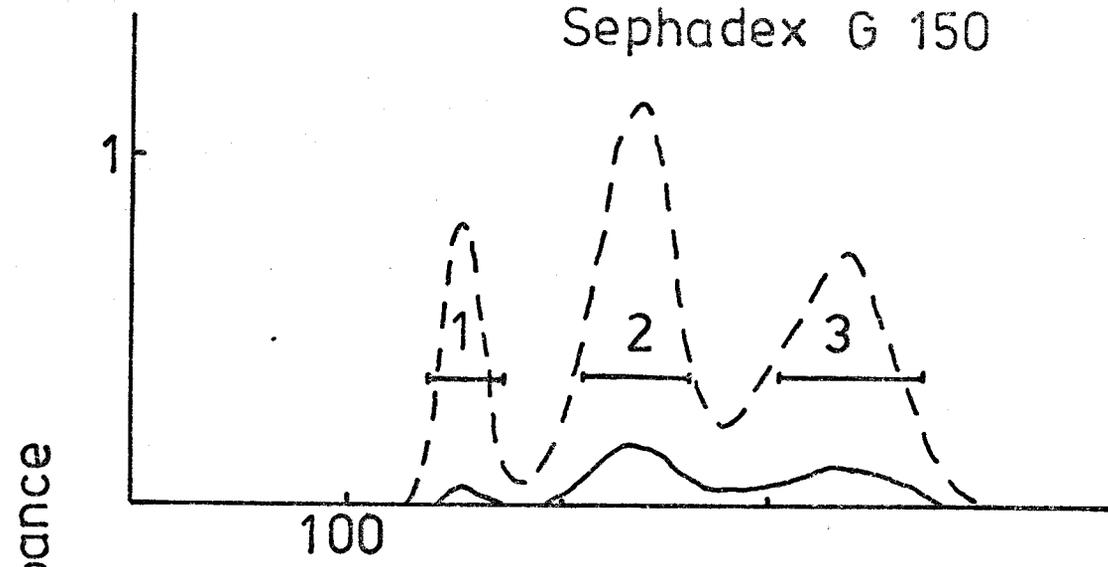
a) ultracentrifugation :

les deux fractions F2 et F3 ~~pe~~ représentent sous la forme de pics symétriques et les valeurs de la constante de sédimentation S_{20}° sont respectivement de 6,8 et 4,9 S.

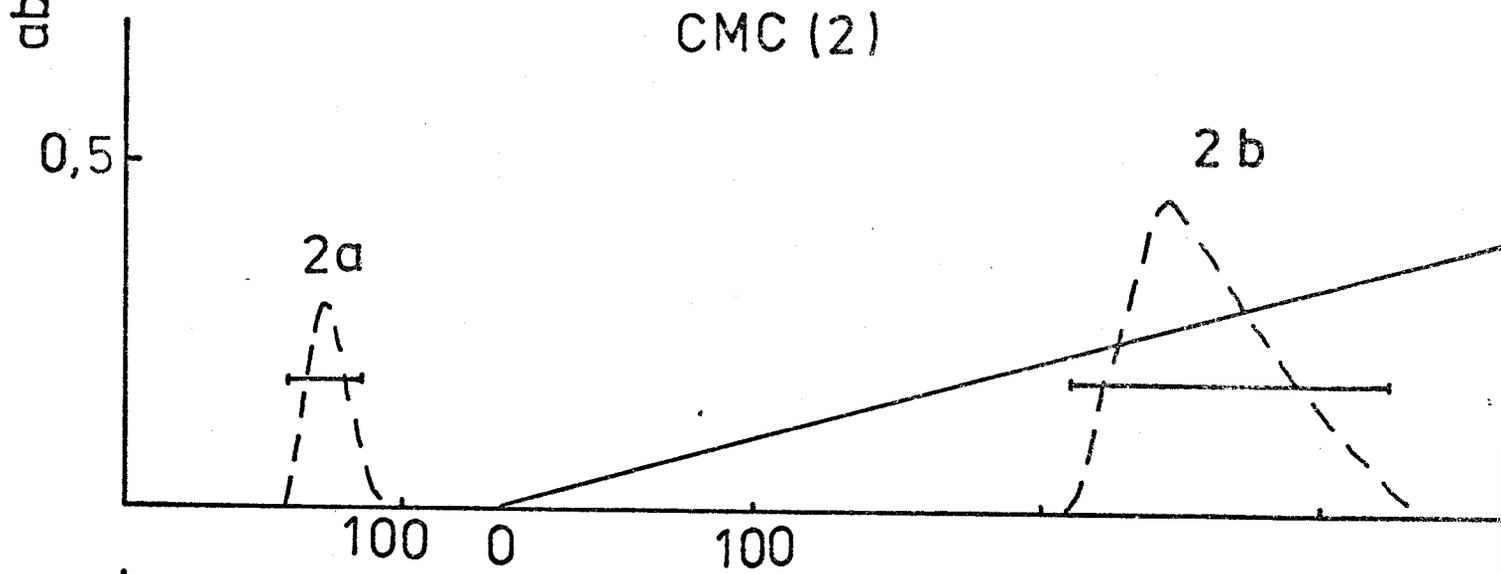
b) Composition en acides aminés :

la composition en acides aminés des fractions F2 et F3 est représentée sur le tableau XX. Les deux fractions sont caractérisées par une richesse en acides aminés dicarboxyliques : acide aspartique et acide glutamique ainsi qu'en serine, glycocolle, alanine et threonine.

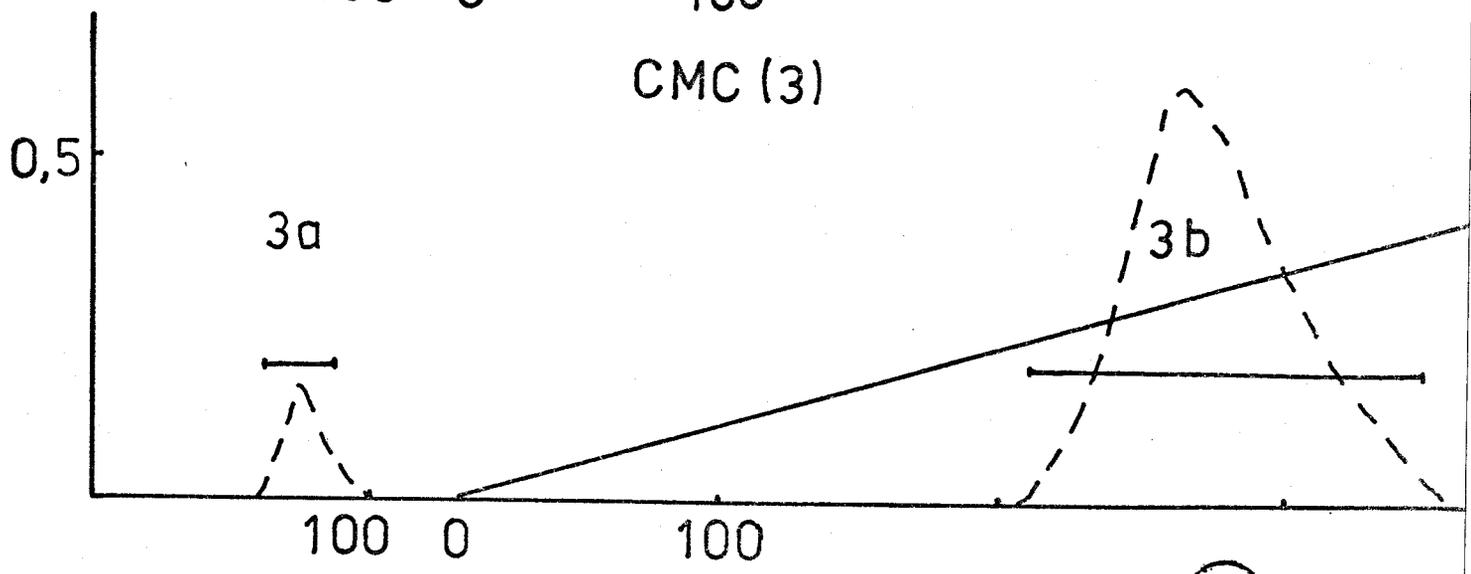
Sephadex G 150



CMC (2)



CMC (3)



volume (ml)



	F2	F2 b	agglutini- ne _x	RCA _I _{xx}	F3	F3 b	toxine _x	RCA _{II} _{xx}
Asp°	10.35	10.83	11.12	11.88	11.11	12.04	12.62	12.09
Thr	7.43	7.61	7.26	7.38	6.33	6.72	7.00	6.95
Ser	8.76	8.41	7.17	6.86	10.39	8.69	6.74	6.81
Glu	11.86	10.07	8.38	9.86	11.56	10.30	9.63	9.81
Pro	5.38	5.76	5.41	5.31	5.18	5.54	5.48	4.91
Gly	8.27	8.07	6.70	7.02	9.98	8.16	7.13	7.01
Ala	7.76	6.90	5.52	6.40	8.01	7.99	7.55	7.38
1/2 Cys	1.62	1.69	1.77	9.83	1.23	1.32	1.82	9.81
Val.	6.54	6.68	5.85	6.12	5.65	5.95	5.21	5.59
Met	1.27	1.05	1.23	0.66	1.08	0.71	0.95	0.78
Ile	6.46	6.95	7.23	6.70	5.92	6.62	6.95	6.30
Leu	7.61	8.56	8.13	8.23	7.65	8.53	9.09	8.45
Tyr	3.00	3.39	4.41	2.30	3.58	4.12	4.32	2.68
Phe	3.79	3.67	4.62	3.46	3.07	3.17	3.63	3.27
Lys	3.22	2.82	4.56	2.34	2.49	2.39	1.27	1.74
His	1.59	1.52	1.68	1.12	1.28	1.33	3.26	0.99
Arg	5.09	6.00	7.14	5.31	5.49	6.40	6.10	6.25
Trp	N.D.	N.D.	1.74	N.D.	N.D.	N.D.	1.27	N.D.

TABLEAU XX : Etude comparative de la composition en acides aminés des fractions F2, F2 b, F3 et F3 b et des autres préparations de lectines de RICINUS COMMUNIS.

° Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par 100 résidus

La composition en acides aminés a été déterminée sur auto-analyseur Technicon.

x : GURLER et HORSTMANN (1973)

xx : NICOLSON et Coll. (1974 b)



c) détermination des acides aminés en position N-terminale :

Après dansylation, on constate que la fraction F2 comporte plusieurs acides aminés N-terminaux : glycofolle, serine, alanine et phénylalanine, tandis que la fraction F3 comporte deux acides N-terminaux majeurs : glycofolle et serine ainsi que des traces d'alanine, de phénylalanine, de proline et de leucine ou d'isoleucine.

4) Purification des lectines de Ricinus Communis :

a) chromatographie d'échange ionique sur carboxyméthyl-cellulose :

La présence de plusieurs acides aminés en position N-terminale dans les fractions F2 et F3 a nécessité cette étape chromatographique supplémentaire.

Les fractions F2 et F3 sont soumises à une chromatographie sur une colonne de Carboxyméthyl-cellulose équilibrée et éluée par un tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,5, ce qui permet d'éliminer pour chaque fraction F2 et F3, une petite fraction non retenue sur la colonne et dépourvue d'activité agglutinante (F2 a et F3 a). L'éluion de la colonne par un gradient linéaire de chlorure de potassium de 0 à 0,6 M dans le même tampon permet d'éluier les fractions de lectines F2 b et F3 b (fig. 15).

b) propriétés des lectines purifiées :

. Electrophorèse sur acétate de cellulose :

L'étude électrophorétique des fractions de lectines F2 b et F3 b, en acétate de cellulose à pH 8,6 montre que les deux fractions sont bien révélées par l'amidoschwarz et légèrement révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique, que la fraction F2 b a une mobilité légèrement plus cathodique que la fraction F3 b et enfin, la fraction F3 b est légèrement contaminée par la fraction F2 b.

. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

En électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la fraction F3 b se présente sous la forme d'une bande homogène révélée par le bleu Coomassie et faiblement par le réactif de Schiff après oxydation periodique. La fraction F2 b apparaît sous la forme de plusieurs bandes : une partie de cette fraction ne pénètre pas dans le gel et reste au point de dépôt. Elle est bien révélée par le bleu Coomassie et plus faiblement par le P.A.S. On trouve ensuite deux bandes qui pénètrent dans le gel et qui sont bien révélées par le bleu Coomassie et faiblement colorées par le P.A.S. puis deux fines bandes mieux colorées par le P.A.S. que les deux précédentes et enfin, une bande possédant la même mobilité que la fraction F3 b.

. Composition chimique :

- la composition en acides aminés des deux fractions F2 b et F3 b (tableau XX) est sensiblement identique à celle des deux fractions F2 et F3.

- la composition glucidique des deux fractions F2 b et F3 b (tableau XXI) se caractérise par la présence de N-acétyl-glucosamine, de manose et de fucose. On trouve aussi sur le chromatogramme des pics ayant les mêmes temps de rétention que ceux des méthyl-glycosides triméthylsilylés du xylose et du rhamnose. Il existe aussi un peu de glucose qui provient peut-être d'une contamination apparue lors de l'étape chromatographique sur carboxyméthyl-cellulose.

. Détermination des acides aminés en position N-terminale :

Par dansylation, on ne décèle dans chacune des deux fractions, que deux acides aminés en position N-terminale : la serine et le glycolle. Dans les fractions F2 a et F3 a, non retenues sur carboxyméthyl-cellulose, on

TABLEAU XXI :

Composition chimique des fractions F2b et F3 b

	F2b	F3b
Fucose	0,4	0,2
Mannose	3,9	3,2
Glucose	0,3	0,3
N-acétyl-glucosamine	1,1	0,9
"Rhamnose"	0,3	traces
"Xylose"	1,2	0,7
Acides Aminés	70,6	72,5

Les résultats sont exprimés en pourcentage de poids sec.



trouve après dansylation et hydrolyse, de nombreux dansyl-amino-acides correspondant à l'acide aspartique, l'acide glutamique, la serine, le glycolle, la threonine, la phénylalanine et l'alanine pour la fraction F2 a et de l'acide aspartique, l'acide glutamique, la serine, le glycolle, la phénylalanine, l'alanine, la leucine, l'isoleucine et la proline pour la fraction F3 a.

. Electrophorèse en gel de polyacrylamide des produits de réduction des fractions F2 b et F3 b :

- l'étude des lectines de Ricinus Communis a été complétée par une réduction de chaque fraction de lectines F2 b et F3 b (1 mg) pendant 2 H à 37°C dans un millilitre de tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 7,0 contenant 5 % de S. D. S. et 1 % de β -mercapto-éthanol et par l'étude électrophorétique en gel de polyacrylamide de 50 microlitres de cette solution.

- dans la fraction F2 b, on met ainsi en évidence deux bandes principales, la plus rapide bien révélée par le Bleu Coomassie et faiblement colorée par le réactif de Schiff après oxydation periodique, la plus lente révélée par le Bleu Coomassie et par le réactif de Schiff ; il existe aussi une bande mineure de mobilité intermédiaire.

- l'électrophorèse de la fraction F3 b réduite ne met en évidence que deux bandes. La plus rapide a la même mobilité et les mêmes caractères tinctoriaux que la bande la plus rapide de la fraction F2 b réduite. La bande la plus lente est bien révélée par le Bleu Coomassie et le réactif de Schiff et a une mobilité légèrement inférieure à celle de la bande intermédiaire de la fraction F2 b réduite.

5) Conclusion :

Deux fractions de lectines peuvent être préparées à partir de Ricinus Communis par chromatographie d'affinité sur



Sepharose 4 B puis chromatographie de gel perméation sur Sephadex G 150 qui permet d'éliminer une petite fraction de haut poids moléculaire pratiquement dépourvue d'activité agglutinante à l'égard des globules rouges humains. Ces deux fractions F2 et F3 sont analogues à la lectine RCA_I (NICOLSON et Coll., 1974 b) ou agglutinine (GURTLER et HORSTMANN, 1973) et à la lectine RCA_{II} (NICOLSON, 1974 b) ou toxine (GURTLER et HORSTMANN, 1973).

Ces deux fractions sont ensuite purifiées par chromatographie d'échange ionique sur colonne de carboxyméthylcellulose qui permet encore d'éliminer de petites fractions sans activité agglutinante. Ces lectines purifiées F2 b et F3 b sont homogènes en ultracentrifugation et ont respectivement des constantes de sédimentation S°_{20w} de 6,8 pour F2 b et de 4,9 pour F3 b.

FUNATSU et Coll. (1971 c) avaient trouvé une constante de sédimentation de 4,64 pour la ricine D dépourvue d'activité agglutinante (FUNATSU et Coll. 1971 a).

Les compositions en acides aminés de ces deux fractions sont voisines de celles qui ont été précédemment décrites (NICOLSON et Coll. 1974 b) ; (GURTLER et HORSTMANN, 1973) (FUNATSU et Coll. 1971 a). Toutefois, elles diffèrent de la composition établie par NICOLSON et Coll. (1974 b) par une teneur plus faible en cystéine et de toutes les compositions précédemment rapportées par une teneur plus élevée en serine et en glyco-colle (NICOLSON et Coll., 1974 b) ; (GURTLER et HORSTMANN, 1973) ; (FUNATSU et Coll., 1971 b). Ceci est probablement dû à la durée de l'hydrolyse chlorhydrique (8 h) utilisée pour la détermination de ces deux acides aminés.

Les deux lectines purifiées F2 b et F3 b ne contiennent plus que deux acides aminés en position N-terminale : la serine et le glyco-colle. Il faut remarquer à ce propos que l'étape de chro-

matographie sur carboxyméthyl-cellulose permet d'éliminer une petite fraction dépourvue d'activité hémagglutinante en même temps que de nombreux acides aminés qui étaient révélés après dansylation et hydrolyse des fractions F2 et F3. Ces résultats diffèrent de ceux qui ont été déjà rapportés pour l'agglutinine, dans laquelle on a identifié l'alanine et la threonine (GURTLER et HORSTMANN, 1973) ou la proline (WALDSCHMIDT-LEITZ et KELLER, 1970) et pour la toxine dans laquelle on a trouvé l'alanine et l'isoleucine (GURTLER et HORSTMANN, 1973) ; (FUNATSU et Coll., 1971 b) ou la proline (WALDSCHMIDT-LEITZ et KELLER, 1970). On doit cependant, remarquer que les préparations précédemment étudiées n'étaient pas obtenues par chromatographie d'affinité. On a par ailleurs, déjà décrit pour les lectines de Ricin un processus d'autolyse spontanée qui pourrait rendre compte de ces différences de groupements N-terminaux (GURTLER et HORSTMANN, 1973).

La partie glucidique des lectines F2 b et F3 b se caractérise d'abord par la présence de mannose, ce qui est en accord avec les résultats de PODDER et Coll. (1974), de N-acétylglucosamine, de glucose, de fucose et peut-être de xylose et de rhamnose. Ces données confirment les premières constatations de GURTLER et HORSTMANN (1973) qui avaient montré que les deux fractions d'agglutinine et de toxine de Ricin étaient révélées par le P.A.S.. Les lectines isolées de Ricin, comme la plupart des lectines sont des glycoprotéines (SHARON et LIS, 1972).

En électrophorèse sur acétate de cellulose, la fraction F2 b correspondant à la forme de lectine la plus lourde apparaît plus acide que la fraction F3 b (LHERMITTE et Coll., 1975).

L'électrophorèse de la fraction F2 b dans un gel de polyacrylamide à 13,4 % montre que cette fraction est hétérogène. Elle se résoud en effet en une fraction qui ne pénètre pas bien dans le

gel et en quatre bandes dont les deux plus rapides sont les mieux révélées par le P.A.S. (LHERMITTE et Coll., 1975). Il faut d'ailleurs signaler que l'électrophorèse de la lectine RCA_I étudiée par NICOLSON et Coll. (1974 b) montrait déjà la présence de quatre bandes mineures dont la mobilité était intermédiaire entre celle de la forme majeure de la lectine RCA_I et celle de la lectine RCA_{II}.

Après réduction, la fraction F3 b analogue à la lectine RCA_{II} ou toxine se sépare en deux bandes dont la plus lente est la mieux colorée par le P.A.S. Ce résultat est en accord avec les constatations de OLSNES et Coll., (1974) qui ont trouvé un taux de glucides de 6,5 % pour la chaîne B la plus lente, responsable de l'activité toxique et de 2,4 % pour la chaîne A la plus rapide, responsable de l'affinité pour le galactose.

En électrophorèse, en gel de polyacrylamide, la fraction F2 b analogue à la lectine RCA_I ou agglutinine se sépare, après réduction, en deux bandes majeures et une bande intermédiaire. La bande, la plus lente est la mieux révélée par le P.A.S. Une étude comparative des 3 chaînes de la fraction F2 b et des deux chaînes de la fraction F3 b permet de les classer selon un ordre de mobilité croissante : chaîne lente de la fraction d'agglutinine, chaîne lente (B) de la toxine, chaîne intermédiaire de la fraction d'agglutinine et chaînes rapides de la toxine et de l'agglutinine qui ont dans les conditions utilisées, la même mobilité. Ces résultats sont en accord avec ceux de GURTLER et HORSTMANN (1973) mais diffèrent légèrement de ceux de NICOLSON et Coll. (1974 b) qui ont trouvé que la chaîne intermédiaire de RCA_I et la chaîne lourde de RCA_{II} avaient la même taille moléculaire et de ceux de OLSNES et Coll. (1974) qui considèrent que les fractions lourdes de la toxine et de l'agglutinine ont la même taille moléculaire.

Ces résultats donnent à penser que la lectine F2 b, analogue à l'agglutinine ou à la lectine RCA_I qui est considérée comme formée de 4 chaînes polypeptidiques (NICOLSON et Coll., 1974 b) dont deux auraient une affinité pour les membranes (OLSNES et Coll., 1974), présente une certaine hétérogénéité.

Cette hétérogénéité tient d'abord au fait qu'une petite proportion des molécules de lectines RCA_I contiennent au moins une chaîne dont la taille moléculaire est différente de celles des deux autres chaînes qui sont les chaînes prépondérantes. Les lectines du ricin peuvent subir un processus d'autolyse spontanée (GURTLER et HORSTMANN, 1973). Cependant, toutes les opérations de fractionnement ont été effectuées à + 4°C ce qui est plus en faveur de l'existence d'un troisième type de chaîne dans certaines molécules de lectines RCA_I que d'une dégradation spontanée de l'une des deux autres formes.

En outre, la séparation de la fraction F2 b en plusieurs bandes de mobilité différente en gel de polyacrylamide et n'ayant pas toute la même affinité pour le P.A.S. laisse supposer que l'hétérogénéité de cette fraction pourrait être au moins en partie, d'origine glycannique.

Les discordances concernant la nature des acides aminés N-terminaux et la mobilité électrophorétique des chaînes obtenues après réduction des lectines pourraient enfin suggérer qu'il existe des différences dans les graines de Ricin utilisées par les différents auteurs.

F - LECTINE DE CACAHUETE (Arachis hypogea) :

La lectine de cacahuète (Peanut agglutinin) a été préparée selon la technique décrite par LOTAN et coll. (1975). Elle est spécifique de structures glycanniques renfermant des résidus

de galactose. LOTAN et Coll, (1975) ont toutefois montré qu'un dissacharide, comme le O.β .D.-galactosyl (1 → 3)-2 acetamido-2-desoxy-galactose était plus spécifique que le dissacharide O.β .D. galactosyl (1 → 4)-2-acetamido-2-dexosy-glucose ce qui démontre que la lectine reconnaît le résidu glucidique en position terminale non réductrice, mais aussi le sucre sub-terminal.

Ce site étendu de reconnaissance de la lectine de cacahuète pour des structures contenant le dissacharide O.β .D. galactosyl (1 → 3) 2 acetamido-2-desoxy-galactose a été confirmé par l'emploi de molécules contenant cette séquence dans des expériences d'inhibition d'hémagglutination.

Ainsi l'orosomucoïde (JEAN LOZ, 1972) qui contient des séquences dissacharidiques O.β .D. galactosyl→2 acetamido-2-dexosy-glucose, mais pas de séquences O.β .D. galactosyl→2-acetamido-2-dexosy -galactose est beaucoup moins inhibiteur que la fève (SPIRO et BHOYROO, 1974) qui contient à la fois des séquences O.β .D. galactosyl→2 acetamido-2-desoxy-glucose et O.β .D. galactosyl (1 → 3) 2 acetamido 2 desoxy-galactose. Les glycoprotéines qui ont le plus d'affinité pour la lectine de cacahuète sont celles qui contiennent seulement des séquences Gal → Gal Nac comme l'antigène T (SPRINGER et De SAI, 1974) ou la glycophorine (MARCHESI et Coll. , 1972) dans laquelle l'acide sialique a été libéré par hydrolyse enzymatique.

La lectine de cacahuète peut donc être utilisée pour la mise en évidence de résidus de galactose en position terminale sur les structures glycaniques.

G - LECTINE DE LA FEVE - JACK (Canavalia Ensiformis) :

La lectine de la fève - Jack ou Concanaviline A est obtenue par broyage des graines de fève - Jack, fractionnement au

sulfate d'ammonium (entre 30 et 80 % de saturation) et chromatographie d'affinité sur colonne de Sephadex G 50, selon le protocole décrit par AGRAWAL et GOLDSTEIN (1972). La Concanavaline A est éluée de la colonne par une solution de glucose. Elle est ensuite débarassée du glucose par dialyse contre de l'eau distillée et lyophilisée.

GOLDSTEIN et Coll. (1965) ; GOLDSTEIN et SO (1965) ont montré que la Concanavaline A avait une affinité pour les biopolymères contenant des résidus d' α -D-glucose, d' α D-N-acétyl-glucosamine, d' α -D-mannose ou de β -D-fructose en position terminale non réductrice. tels que le glycogène (SUMMER et HOWELL, 1936); (CIFONELLI et Coll. , 1956), les dextrans (GOLDSTEIN et Coll. , 1965) ; (GOLDSTEIN et Coll. , 1968), les α -mannanes (SUMMER et HOWELL, 1936) ; (SO et GOLDSTEIN, 1968), les fructanes (SO et GOLDSTEIN, 1969), les polysaccharides du pneumocoque (CIFONELLY et Coll. , 1966), des immunoglobulines (LEON, 1967), des substances de groupe sanguin (LLOYD et Coll. , 1969), (NEWMAN et KABAT, 1976a), d'autres lectines (GOLDSTEIN et Coll. , 1969), des lipopolysaccharides (GOLDSTEIN et STAUB, 1970), des acides teichoïques (REEDER et EKSTEDT, 1971), des structures cellulaires bactériennes (TKACZ et Coll. , 1973) et animale (INBAR et SACHS, 1969), (CLINE et LIVINGSTONE, 1971) (OZANNE et SAMBROCK, 1971).

H - LECTINE DE LIMULE (Limulus Polyphemus) : LIMULINE :

La lectine isolée de l'hémolymphe d'un xiphosure : la limule nous a été aimablement fournie par le Professeur M. MONSIGNY et Mme A.C. ROCHE.

Cette lectine présente une spécificité pour des structures glycaniques renfermant de l'acide N-acétyl-neuraminique tels que l'orosomucoïde (ROCHE et Coll. , 1975) et peut servir à mettre en évidence de tels résidus au sein de structures polysaccharidiques.

II - ETUDE DE L'AFFINITE DES LECTINES POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

Les lectines isolées du genêt épineux, du lotier, du germe de blé, du soja, de la cacahuète, du ricin et de la fève -Jack ont été utilisées pour étudier les mucines neutres (A1), légèrement acides (Bb) et acides (C1 b, C2 b et éventuellement C3 b), obtenues à partir des sécrétions bronchiques individuelles (cf. première partie). Nous avons aussi été amenés au cours de ce travail à utiliser des mucines C1 b et C2 b désialidées (CASSIDY et Coll., 1965).

La mise en évidence de l'affinité des lectines pour les diverses classes de mucines peut être obtenue en utilisant différentes techniques : l'électrophorèse bidimensionnelle ou affino-électrophorèse, la double diffusion dans un gel d'agarose, ou "affino-diffusion" et la technique d'inhibition de l'hémagglutination.

En raison des quantités importantes de matériel utilisé, tant en lectines qu'en mucines, la mise en évidence de l'affinité des lectines pour les mucines par affino-électrophorèse n'a pu être effectuée qu'avec la lectine RCA_I du ricin et avec les fractions de mucines du malade VAN.... Par double diffusion dans un gel d'agarose ou affino-diffusion, on a pu étudier l'affinité de chaque lectine pour les différentes fractions de mucines. Cette étude a ensuite été précisée par inhibition de l'hémagglutination, sauf pour les mucines du malade MAR... qui étaient en trop faible quantité.

A - AFFINITE DE LA LECTINE I DU GENET EPINEUX POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

1) En affino-diffusion, la lectine à fucose du genêt épineux

précipite toutes les fractions de mucines à l'exception des différentes mucines isolées dans l'expectoration du malade MAR... (tableau XXII) (fig. 16). On remarque en outre, qu'après désialidation, on obtient un arc plus épais avec la fraction C1 b du malade VAN... (fig. 16).

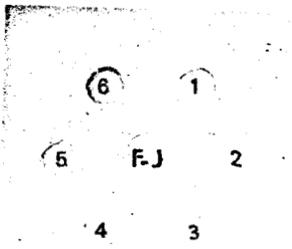
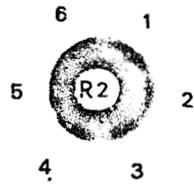
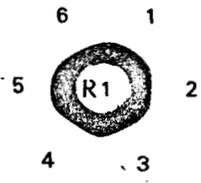
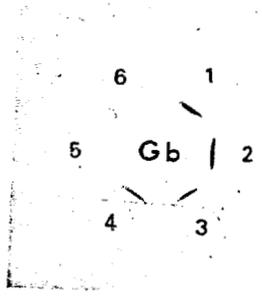
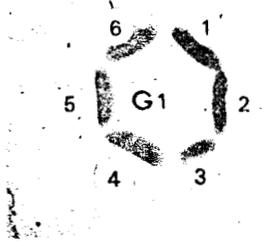
2) Toutes les mucines des malades BIA..., PRO..., WAS... et VAN... sont capables d'inhiber l'hémagglutination des globules rouges humains O par la lectine de genêt épineux. Les résultats sont résumés dans le tableau XXIII. Ce test n'a pu, faute de matériel, être réalisé avec les mucines du malade MAR..., sauf en ce qui concerne la fraction A1 qui, à une concentration de 3 mg par ml, n'était pas capable d'inhiber l'agglutination des globules rouges O par la lectine.

Les résultats montrent qu' au sein de chaque sécrétion, ce sont les mucines neutres (A1) ou faiblement acides (Bb) qui ont le pouvoir d'inhibition le plus élevé. Après désialidation, les mucines C1 b et surtout C2 b du malade VAN..., ont un pouvoir inhibiteur plus important (tableau XXIII).

La lectine à fucose du genêt épineux a donc la propriété de réagir avec les différentes mucines bronchiques humaines A1, Bb, C1 b, C2 b, sauf avec celles du malade MAR... qui est un sujet non sécréteur. On sait déjà que cette lectine permet de diagnostiquer les sujets sécréteurs. (BOYD et SHAPLEIGH, 1954 a).

B - AFFINITE DE LA LECTINE DU LOTIER CORNICULE POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

1) En affino-diffusion, cette lectine précipite toutes les mucines à l'exception des mucines C2 b des malades BIA... et PRO.... L'arc de



Malades	Mucines	Genêt	Lotier	Germe de blé	Soja	Ricin		Cacahuète	Concanavale A
						RCA _I	RCA _{II}		
MAR...	A1	0	+	++	0	++	++		0
	Bb	0	+	++	0	++	++		0
	C1 b	0	+	+	0	++	++		0
	C2 b	0	+	0	0	++	++		0
	C3 b	0	+	0	0	++	++		0
BIA...	A1	++	+	++	++	++	++	+	0
	Bb	++	++	++	++	++	++	+	0
	C1 b	+	++	+	+	++	++	0	0
	C2 b	+	0	+	0	++	++	0	0
PRO...	A1	++	++	++	+	++	++	+	0
	Bb	++	++	++	++	++	++	+	0
	C1 b	+	++	++	++	++	++	0	0
	C2 b	+	0	+	0	++	++	0	0
WAS...	A1	++	+	++	++	++	++	++	0
	Bb	++	++	++	++	++	++	++	0
	C1 b	++	++	++	+	++	++	+	0
	C2 b	++	++	0	0	++	++	0	0
VAN...	A1	++	+	++	++	++	++	+	0
	Bb	++	++	++	+	++	++	++	0
	C1 b	+	++	++	+	++	++	+	0
	C1 b désialidé	++	++	++	+	++	++	++	0
	C2 b	++	++	+	0	++	++	0	0
	C2 b désialidé	++	++	+	+	++	++	++	0

TABLEAU XXII : Affino-diffusion : Réaction de précipitation en gel d'agarose des mucines bronchiques humaines des malades MAR..., BIA..., PRO..., WAS... et VAN... et des lectines de genêt, lotier, germe de blé, soja, ricin (RCA_I et RCA_{II}), de cacahuète, et de la concanavale A.

Les résultats sont notés : ++ arc épais ; + arc fin ; 0 absence de précipitation



TABLEAU XXIII : Etude de l'affinité des lectines de genêt, lotier, germe de blé, soja, ricin (RCA_I et RCA_{II}) et de cacahuète pour les mucines bronchiques humaines par inhibition de l'hémagglutination.

malades	mucines	genêt	lotier	germe de blé	soja	ricin		cacahuète
						RCA _I	RCA _{II}	
BIA...	A1	225	225	1000	500	650	375	4500
	Bb	250	225	1250	1000	650	375	5250
	C1 b	300	275	1500	1250	700	400	> 6000
	C2 b	300	> 325	2000	> 3000	700	400	> 6000
PRO...	A1	200	225	1250	1250	700	375	5250
	Bb	225	225	1500	1250	700	400	5500
	C1 b	275	250	1500	1500	800	400	> 6000
	C2 b	300	> 325	2500	> 3000	750	425	> 6000
WAS...	A1	250	250	1250	500	600	375	4750
	Bb	250	250	1250	750	650	350	4750
	C1 b	250	225	2000	1250	650	400	5250
	C2 b	275	325	> 3000	> 3000	700	450	> 6000
VAN...	A1	200	250	1000	500	650	350	4500
	Bb	200	250	1000	500	700	350	5250
	C1 b	250	275	1750	1000	750	400	5250
	C1 b désialidé	225	275	1500	775	700	400	5000
	C2 b	275	325	2250	> 3000	750	400	> 6000
	C2 b désialidé	225	300	1750	1250	700	375	5250

Les résultats sont exprimés en nombre de µg par ml, capables d'inhiber l'hémagglutination.

5250
BHS
LITE

précipitation est plus fin avec les fractions neutres A1 des malades WAS... et VAN... qui appartiennent au groupe sanguin A (tableau XXII) (fig. 16).

2) Les mucines des malades BIA..., PRO..., WAS... et VAN... sont capables d'inhiber l'hémagglutination des globules rouges humains O à des doses sensiblement identiques (tableau XXIII). En outre, après désialidation, la mucine C2 b du malade VAN... a un pouvoir inhibiteur un peu plus élevé (tableau XXIII). On doit aussi constater que les mucines neutres A1 ou légèrement acides (Bb) du malade WAS... de groupe sanguin A, ont un pouvoir inhibiteur plus faible que les mucines C1 b (tableau XXIII).

C - AFFINITE DE LA LECTINE DU GERME DE BLE POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

1) La lectine du germe de blé est capable de précipiter toutes les mucines à l'exception des fractions C2 b et C3 b du malade MAR..., et C2 b du malade WAS.... L'intensité des arcs de précipitation est cependant plus faible avec les fractions acides C1 b et C2 b (tableau XXII) (fig. 16). La désialidation des mucines C1 b et C2 b (malade VAN...) ne modifie pas l'arc de précipitation.

2) Par inhibition de l'hémagglutination des globules rouges humains A, on remarque que ce sont les mucines neutres (A1) ou faiblement acides (Bb) qui ont le pouvoir inhibiteur le plus élevé. Celui des mucines C1 b et C2 b est plus faible (tableau XXIII). La désialidation des mucines C1 b et C2 b du malade VAN... augmente assez sensiblement le pouvoir inhibiteur (tableau XXIII).

La lectine du germe de blé est donc capable de réagir avec des mucines de caractères d'acidité différents, mais ce sont généralement les mucines neutres (A1) qui ont le plus grand pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination.

Cette lectine a une affinité pour les résidus de N-acétyl-glucosamine et pour les résidus d'acide N-acétyl-neuraminique. Nos résultats montrent que la lectine du germe de blé a plus d'affinité pour les mucines pauvres en acide sialique que pour les mucines acides. Ceci suggère que l'affinité de cette lectine pour les mucines bronchiques est essentiellement due à certains résidus de N-acétyl-glucosamine. Peut-être l'anomerie de la liaison de l'acide sialique ou la présence de groupements sulfate réduisent la fixation de la lectine du germe de blé sur les mucines les plus acides.

D - AFFINITE DE LA LECTINE DU SOJA POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

1) En affino-diffusion, la lectine du soja précipite les mucines neutres (A1) et faiblement acides (Bb), plus faiblement les mucines acides (C1 b) aussi bien des malades de groupe sanguin O (BIA... et PRO...) que des malades de groupe sanguin A (WAS... et VAN...). Les mucines acides C2 b ne sont jamais précipitées. On remarque qu'après désialidation, la mucine C2 b du malade VAN... réagit avec la lectine.

Aucune mucine du malade MAR..., sujet non sécréteur n'est précipitée (tableau XXII) (fig. 16).

2) En inhibition de l'hémagglutination, on remarque que ce sont les fractions A1 et Bb qui ont le pouvoir d'inhibition le plus élevé, les mucines C1 b sont elles aussi inhibitrices, par contre, les mucines C2 b, même à une concentration de 3 mg par ml n'inhibent jamais l'hémaggluti-

nation. La désialidation de la mucine C2 b du malade VAN... permet à cette mucine d'acquérir un pouvoir inhibiteur (tableau XXIII)

Ce test d'inhibition de l'hémagglutination des globules rouges de lapin trypsinisés a également été effectué avec deux fractions de mucines A1 et Bb du malade MAR... Ces différentes mucines du malade MAR... à une concentration de 3 mg par ml, ne sont pas capables d'inhiber l'agglutination. Faute de matériel, cette étude n'a pu être effectuée avec les mucines C1 b, C2 b et C3 b du malade MAR...

La lectine de soja dont la spécificité est due à la présence en position terminale non réductrice de résidus de N-acétylgalactosamine ou de résidus d' α ou β -D-galactose dans des oligosaccharides ou des glycoprotéines réagit donc avec les mucines neutres (A1), faiblement acides (Bb), et acides (C1 b) mais ne réagit pas avec les mucines les plus acides C2 b isolées chez quatre malades (deux de groupe sanguin O et deux de groupe sanguin A). Elle ne semble pas réagir avec les mucines du malade MAR... non sécréteur.

E - AFFINITE DES LECTINES DU RICIN POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

1) RCA_I :

a) l'affinité des mucines A1 du malade VAN... a pu, d'abord être montrée par affino-électrophorèse bidimensionnelle. L'arc de précipitation révélé par le bleu de Coomassie est très épais. Au contraire, les mucines Bb, C1 b et C2 b du même malade sont difficilement précipitées. On obtient avec la fraction Bb, un arc allongé et diffus, avec la fraction C1 b, un arc allongé et très diffus. La fraction C2 b n'est absolument pas révélée.

b) en double diffusion, dans un gel d'agarose, les différentes mucines de chaque malade sont précipitées par la lectine RCA_I (tableau XXII) (fig. 16). Cette fraction est donc capable de précipiter des mucines d'acidité différente.

c) les différentes mucines A1, Bb, C1 b et C2 b ainsi que les mucines C1 b et C2 b désialidées du malade VAN... sont capables d'inhiber l'hémagglutination des globules rouges humains B, à des doses sensiblement égales (tableau XXIII).

La lectine RCA_I présente donc une très grande affinité pour les différentes mucines, affinité qui ne semble pas très affectée par le caractère acide des molécules C1 b et C2 b.

En affino-électrophorèse bidimensionnelle, l'obtention d'arc diffus avec les fractions Bb, C1 b et l'absence de réactivité des mucines C2 b avec la lectine RCA_I pourrait peut-être s'expliquer par le caractère acide de ces molécules dont la migration de plus en plus anodique, empêcherait partiellement ou totalement la formation des complexes.

2) RCA_{II} :

Avec cette lectine, on obtient des résultats identiques aux résultats obtenus avec la lectine RCA_I aussi bien en affino-diffusion (fig. 16) (tableau XXII) qu'en inhibition de l'hémagglutination (tableau XXIII). La lectine RCA_{II} présente donc aussi une très grande affinité pour chaque classe de mucines, affinité qui n'est pas affectée par le caractère acide des molécules C1 b et C2 b puisque la désialidation des mucines du malade VAN... n'augmente pas fortement leur pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination.

F - AFFINITE DE LA LECTINE DE CACAHUETE POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

1) La lectine de cacahuète est capable de précipiter les mucines neutres (A1) et faiblement acides (Bb) des malades BIA..., PRO..., WAS... et VAN.... Elle précipite très faiblement les mucines C1 b des malades WAS... et VAN... qui sont de groupe sanguin A. Les fractions C1 b des malades BIA... et PRO... de groupe sanguin O, ainsi que toutes les fractions C2 b ne sont jamais précipitées. On remarque toutefois, que la désialidation des mucines C1 b et C2 b du malade VAN... permet d'obtenir un arc plus épais (C1 b) ou permet à la mucine (C2 b) d'être précipitée par la lectine (tableau XXII) (fig. 16). L'étude n'a pu, faute de matériel, être effectuée avec les mucines du malade MAR...

2) Les mucines neutres (A1) ont le pouvoir d'inhibition d'héماغglutination des globules rouges humains O désialidés le plus élevé. Les mucines acides (C2 b) n'inhibent jamais l'agglutination des globules rouges. Par contre, la fraction C2 b désialidée du malade VAN..., ainsi que les mucines faiblement acides (Bb) ou certaines mucines acides, C1 b des malades WAS... et VAN... ont un pouvoir d'inhibition faible (tableau XXIII).

Chez les deux malades de groupe sanguin A, la lectine de cacahuète a une affinité pour les mucines les moins riches en acide sialique (A1 et Bb), pour les mucines acides C1 b et pour les mucines les plus acides C2 b après désialidation.

Chez les deux malades de groupe sanguin O (BIA... et PRO...), cette lectine n'a d'affinité que pour les mucines pauvres en acide sialique (A1 et Bb). Nous n'avons pu, faute de matériel, déterminer l'affinité pour les mucines acides après désialidation.

Ces résultats suggèrent que l'affinité de la lectine pour les mucines bronchiques pourrait être due à des résidus de galac-

tose en position terminale non réductrice et que la présence de certains résidus d'acide sialique diminue ou annihile cette affinité.

G - AFFINITE DE LA LECTINE DE LA FEVE JACK ou CONCANAVALINE A POUR LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES :

Aucune des fractions de mucines étudiées n'est précipitée en gel d'agarose par la concanavaline A (tableau XXII) (fig. 15).

En raison de la non réactivité des mucines et de la concanavaline A par affino-diffusion, le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination des différentes mucines vis à vis de la concanavaline A n'a pas été mesuré .

CONCLUSION

L'étude de l'affinité des lectines pour les mucines bronchiques humaines permet de préciser la définition des différentes classes de mucines séparées par chromatographie d'échange ionique sur colonne d'Ecteola-cellulose.

I - Parmi les différentes mucines neutres (A1) ou faiblement acides (Bb), on doit distinguer les mucines du malade MAR... qui ne possèdent pas d'activité de groupe sanguin A, B ou H, des mucines isolées chez les autres malades qui possèdent une activité de groupe sanguin A (WAS... et VAN...) ou O (BIA... et PRO...).

a) Les mucines bronchiques A1 et Bb du malade MAR... réagissent

avec les lectines de lotier, de germe de blé, de ricin. Elles ne réagissent pas avec la lectine de genêt épineux. ce qui confirme le caractère non sécréteur des mucines de ce malade. Cependant, elles réagissent avec la lectine de lotier indiquant la présence de structures glycaniques contenant du fucose mais n'ayant pas d'activité H. Peut-être s'agit-il d'une structure analogue à l'antigène L (NAPIER et Coll., 1974). La réaction avec la lectine de germe de blé indique la présence de N-acétyl-glucosamine. La réaction avec les lectines de ricin semble démontrer la présence de résidus de galactose en position terminale non réductrice. Cependant, contrairement aux mucines des autres malades. on doit constater l'absence complète de réaction avec la lectine de soja, indiquant tout d'abord que la spécificité des lectines de ricin et du soja sont différentes.

On sait, d'autre part, que la différence entre les mucines des malades sécréteurs et non sécréteurs correspond à l'expression ou à l'absence d'expression d'une fucosyl-transférase (WATKINS, 1972). Les résultats obtenus avec la lectine de soja ne peuvent s'expliquer uniquement par l'absence d'expression de cette fucosyl-transférase à moins que la conformation des mucines non fucosylées des sujets non sécréteurs soit telle que les sites pouvant théoriquement réagir avec la lectine de soja soient inaccessibles.

- b) Les mucines bronchiques A1 ou Bb, isolées chez les quatre malades BIA..., PRO..., WAS... et VAN... réagissent avec toutes les lectines utilisées, à l'exception de la Concanavaline A :

Elles réagissent notamment avec les lectines ayant une spécificité pour le L, fucose, c'est à dire, les lectines de genêt épineux et de lotier. Les différences d'affinité de ces lectines pour

les mucines du malade MAR... pourraient indiquer la présence dans les mucines des quatre autres malades de différentes structures glycaniques contenant du fucose, les unes ayant une activité H, et les autres sans activité H. Elles réagissent aussi avec la lectine de germe de blé qui a une spécificité pour la N-acétyl-glucosamine et avec les lectines de ricin et de soja qui ont une affinité pour des structures contenant des résidus de galactose ou de N-acétyl-galactosamine en position terminale non réductrice. Le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination des mucines douées d'activité A n'est pas considérablement supérieur à celui des mucines ne possédant qu'une activité H (tableau XXIII). Ceci amène à penser que l'essentiel de l'affinité des lectines de ricin et de soja pourrait être dû à des structures glycaniques comportant du galactose. Ces mucines réagissent également avec la lectine de cacahuète qui a une spécificité pour des résidus de galactose. La dissociation dans l'affinité des lectines de ricin et de soja pour les mucines du malade non sécréteur MAR... permet de soulever l'hypothèse que les différentes lectines de ricin, de soja et de cacahuète ne réagissent pas obligatoirement avec les mêmes structures glycaniques.

Il existe une discordance entre nos résultats et ceux de PEIREIRA et Coll., (1974) qui ont montré que la lectine de soja est capable de précipiter des substances de groupe sanguin A, mais pas les substances de groupe sanguin H. Or, les mucines bronchiques humaines douées d'activité A ou H sont précipitées par cette lectine, tandis que les mucines qui ne possèdent pas d'activité A, B ou H ne réagissent pas. En outre, il a également été montré que la lectine de soja était capable de précipiter des substances de groupe sanguin H partiellement dégradées par oxydation périodique (PEIREIRA et Coll., 1974). Il doit donc exister, au sein des mucines bronchiques humaines d'activité H, des struc-

tures glycaniques peut-être incomplète pour lesquelles la lectine de soja a une affinité.

II - Parmi les différentes mucines acides : C1 b, C2 b et éventuellement C3 b, on doit distinguer trois groupes de mucines : celui des malades de groupe sanguin O, celui des malades de groupe sanguin A et les mucines isolées chez le malade MAR... qui ne possèdent pas d'activité A, B ou H.

a) Les mucines bronchiques C1 b et C2 b isolées chez les deux malades de groupe sanguin O (BIA... et PRO...) réagissent avec la lectine de genêt épineux, qui a une spécificité pour le fucose. Contrairement aux mucines C1 b, les mucines C2 b ne réagissent pas avec la lectine de lotier qui a aussi une spécificité pour le fucose. Les mucines bronchiques acides C1 b et C2 b réagissent avec les lectines de ricin. La réaction avec la lectine de soja permet de distinguer les mucines C1 b qui réagissent, les mucines C2 b qui ne réagissent pas avec cette lectine. Les mucines C1 b et C2 b ne réagissent pas avec la lectine de cacahuète.

L'absence complète de réaction avec la lectine de cacahuète peut s'expliquer par le fait que les mucines C1 b et C2 b des deux malades BIA... et PRO... sont riches en acide N-acétylneuraminique (tableaux IV et V) et que la lectine ne peut se fixer que sur des structures glycaniques contenant du galactose et non sialidées (LOTAN et Coll., 1975). Les mucines C1 b et C2 b réagissent avec la lectine de germe de blé qui a une affinité pour la N-acétyl-glucosamine. Elles ne réagissent pas avec la Concanavalline A.

b) Les mucines bronchiques C1 b et C2 b isolées chez les deux ma-
lades de groupe sanguin A (WAS... et VAN...) réagissent avec
les deux lectines ayant une spécificité pour le fucose, c'est à dire,
la lectine de genêt épineux et de lotier. La différence d'affinité
de la lectine de lotier pour les mucines C2 b isolées des sécré-
tions des malades de groupe sanguin O (BIA... et PRO...) ou A
(WAS... et VAN...) pourrait être liée à un taux plus faible en
acide sialique (tableaux IV , V , VI et VII). Les mucines C1 b et
C2 b réagissent avec les lectines de ricin mais diffèrent par leur
réaction avec la lectine de soja puisque les mucines C2 b ne réa-
gissent pas avec celle-ci. Les mucines C1 b réagissent avec la
lectine de cacahuète, au contraire des mucines C2 b. Les diffé-
rences d'affinité de cette lectine pour les mucines acides des deux
malades de groupe sanguin O (BIA... et PRO...) et des deux ma-
lades de groupe sanguin A (WAS... et VAN...) peuvent s'expliquer
par leur contenu différent en acide sialique (tableaux IV , V , VI
et VII). Les mucines C1 b et C2 b du malade VAN... réagissent
avec la lectine de germe de blé. Les mucines C1 b du malade
WAS... réagissent également avec cette lectine, au contraire des
mucines C2 b. Mais on doit constater que les mucines C2 b du ma-
lade VAN... (tableau VII) sont moins acides que les mucines
C2 b du malade WAS... (tableau VI). Les mucines C1 b et C2 b
ne réagissent pas avec la Concanavaleine A.

Après désialidation, on constate que le pouvoir
d'inhibition de l'hémagglutination des mucines acides C1 b et C2 b
du malade VAN... (tableau XXIII) augmente, notamment, dans les
réactions avec les lectines à une spécificité pour le fucose : genêt é-
pineux et lotier. Les réactions avec les lectines de soja et de caca-
huète montrent que les mucines C1 b désialidées ont un pouvoir
d'inhibition de l'hémagglutination plus grand et que les mucines

C2 b désialidées acquièrent le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination. On peut donc penser que la désialidation de ces mucines acides a permis de démasquer des structures glycaniques spécifiques pour la fixation des lectines au niveau de résidus de galactose. Le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination des mucines acides augmente également, dans la réaction avec la lectine de germe de blé. On peut ainsi penser que la libération de l'acide N-acétyl-neuraminique a permis de découvrir des résidus de N-acétyl-glucosamine. Cette réaction semble également indiquer que la lectine de germe de blé présente une affinité pour les résidus de N-acétyl-glucosamine des mucines bronchiques et non pas pour les résidus d'acide N-acétyl-neuraminique.

c) Les mucines bronchiques C1 b, C2 b ou C3 b isolées chez le malade MAR, . . . réagissent avec la lectine de Lotier qui a une spécificité pour le fucose. Ces mucines ne réagissent pas avec la lectine de genêt épineux. On retrouve donc le résultat obtenu avec les mucines neutres (A1) et faiblement acides (Bb), confirmant ainsi que la lectine de genêt épineux ne réagit pas avec les mucines d'un sujet non sécréteur. Les mucines C1 b, C2 b et C3 b réagissent avec les lectines de ricin. Contrairement aux mucines des quatre autres malades, on constate l'absence complète de réaction avec la lectine de soja, ce qui permet de bien individualiser les mucines du malade MAR, . . . sujet non sécréteur. De plus, les mucines acides C1 b, C2 b et C3 b de ce malade réagissent différemment avec la lectine de germe de blé qui a une affinité pour la mucine C1 b, mais ne réagit pas avec les mucines C2 b et C3 b. On retrouve donc le résultat obtenu avec les mucines du malade WAS, . . . de groupe sanguin A, dont les mucines les plus

acides C2 b n'avaient pas d'affinité pour la lectine de germe de blé. Les mucines C1 b, C2 b et C3 b ne réagissent pas non plus avec la Concanavoline A.

- d) L'absence de réactivité de certaines mucines acides, notamment C2 b, dont on a montré que la désialidation permettait de démasquer des structures spécifiques de lectines peut s'expliquer par plusieurs phénomènes. En effet, il peut exister une répulsion entre les mucines acides et les lectines acides. Il a été montré que la lectine de lotier (YARIV et Coll., 1972) était acide. Il en est de même de la lectine de soja (LIS et SHARON, 1972).

De plus, le nombre important de groupements sulfate portés par certaines mucines peut aussi intervenir dans cette réaction. D'autre part, l'absence d'affinité des lectines pour les mucines peut être liée à des phénomènes d'encombrements stériques. Enfin, on ne peut éliminer la présence d'autres molécules de nature non glycoprotéique, fixées sur les mucines bronchiques et qui masqueraient partiellement ou totalement les sites de fixation.

L'étude de l'affinité des lectines pour les différentes mucines bronchiques de cinq malades atteints de bronchite chronique permet de distinguer les populations de molécules synthétisées par des sujets sécréteurs de substances de groupe sanguin A, B ou H de celles qui sont fabriquées par des sujets non sécréteurs. Cette distinction est toutefois impossible pour les mucines les plus acides qui contiennent de l'acide sialique et des groupements sulfate.

III - UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE POUR L'ETUDE DES GLYCOPROTEIDES BRONCHIQUES HUMAINS

L'étude de l'affinité des différentes lectines pour les mucines bronchiques a montré que les deux lectines de Ricinus communis étaient capables de réagir avec toutes les fractions de mucines. Dès lors, il semblait intéressant de rechercher, si dans la sécrétion bronchique il existait d'une part, d'autres molécules que les mucines, et possédant une affinité pour les lectines, d'autre part, de voir si au sein d'une population de mucines bronchiques, toutes les molécules avaient une affinité pour les lectines.

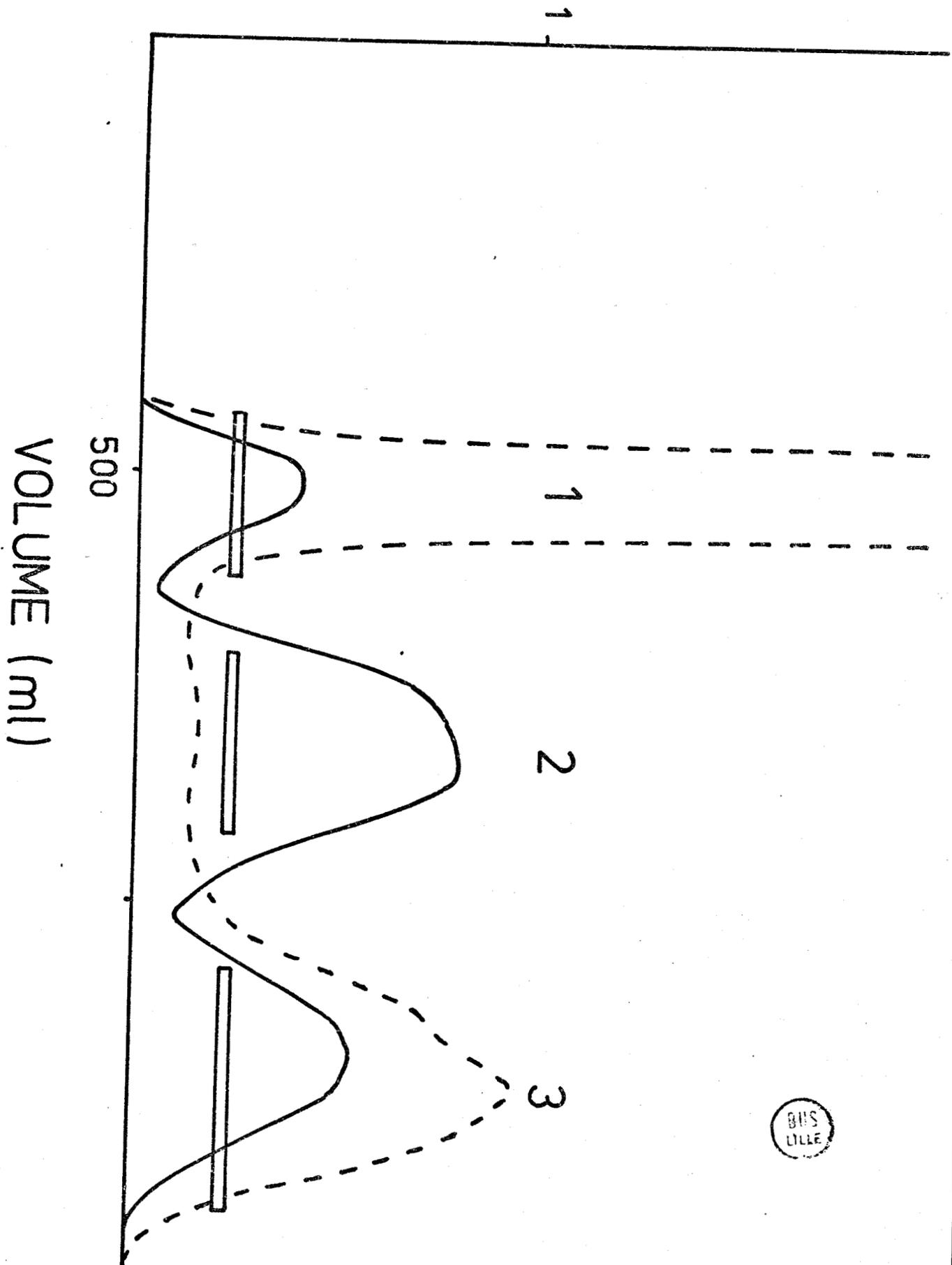
Les lectines de Ricin ont ainsi été utilisées pour essayer de différencier par chromatographie d'affinité les différentes molécules d'une sécrétion bronchique.

A - FRACTIONNEMENT DU MUCUS REDUIT :

Le mucus bronchique fibrillaire d'un malade de groupe sanguin A souffrant de bronchite chronique est réduit par le β mercapto-éthanol. Le mucus ainsi solubilisé est soumis à une chromatographie sur colonne de Sepharose 4B dans un tampon Tris 0,1 M, Na Cl 0,2 M de pH 8,0.

350 mg de mucus réduit sont ainsi séparés en trois fractions. La fraction 1 (40 mg) correspond à des constituants exclus de la colonne et donc de poids moléculaire très élevé. La fraction 2 (94 mg) correspond à des constituants absorbant peu à 278 nm et riches en oses combinés : il s'agit d'une population de mucines bronchiques. La fraction 3 (74 mg) contient des oses combinés et absorbe plus fortement la lumière ultra-violette à 278 nm (fig. 17). Trois chromatographies identiques ont été réalisées.

ABSORBANCE



BHS
LILLE

En électrophorèse en agarose à pH 8,2, la fraction 1 ne pénètre pas dans le gel d'agarose ; la fraction 2 se présente sous la forme d'une zone assez large révélée par le réactif de Schiff après oxydation periodique, sa partie cathodique est faiblement révélée par l'Amidoschwarz et sa partie anodique bien révélée par le bleu de Toluidine (fig. 18). Cette fraction contient donc une population de mucines d'acidité variable. Elle possède une activité de groupe sanguin A et renferme environ 70 % de glucides (tableau XXIV). Sa composition en acides aminés montre qu'elle renferme une teneur importante en threonine, serine, proline, alanine et glycocolle (tableau XXV).

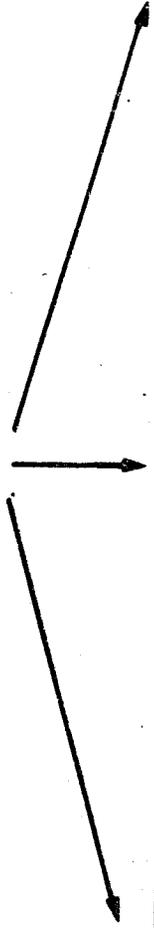
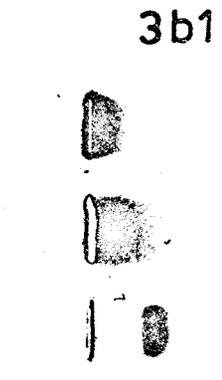
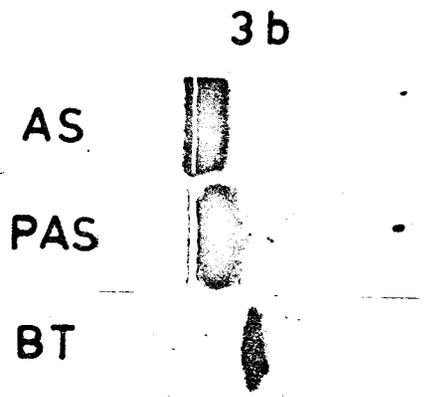
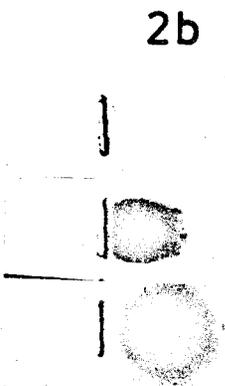
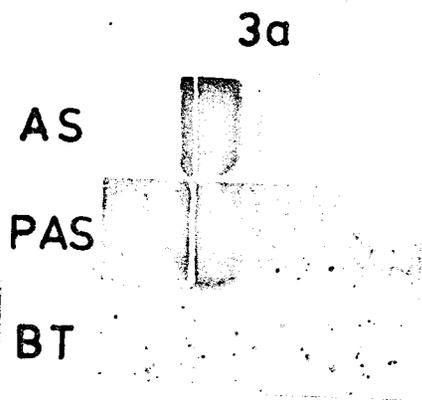
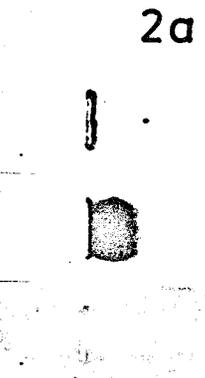
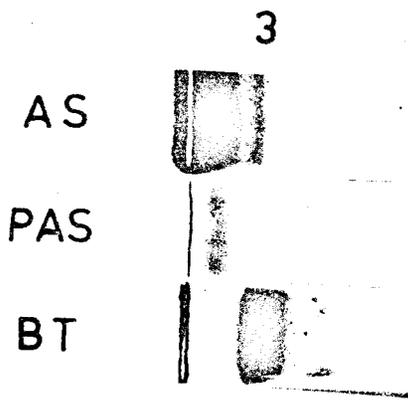
L'étude en double diffusion montre que les deux préparations de lectines du Ricin réagissent avec cette fraction 2 (fig. 19).

La fraction 3 est plus hétérogène et contient des constituants ayant une migration électrophorétique identique à celle de la sérum-albumine, des constituants migrant sur le versant anodique du godet de dépôt, bien colorés par l'Amidoschwarz et par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Elle contient aussi une fraction de mobilité anodique supérieure à celle de l'albumine et bien révélée par le Bleu de Toluidine (fig. 18). Cette fraction 3 contient un mélange comportant des protéines, des glycoprotéines et des constituants acides.

L'étude en double diffusion montre que les deux préparations de lectines réagissent avec la fraction 3 (fig. 19).

B - PREPARATION DE LA COLONNE D'AFFINITE :

Les lectines de Ricinus communis, fixées sur du Sephadex G 25 préalablement activé par du bromure de cyanogène, peuvent ainsi être utilisées en chromatographie d'affinité pour étudier les molécules contenues dans les fractions 2 et 3.



BUS
LILLE

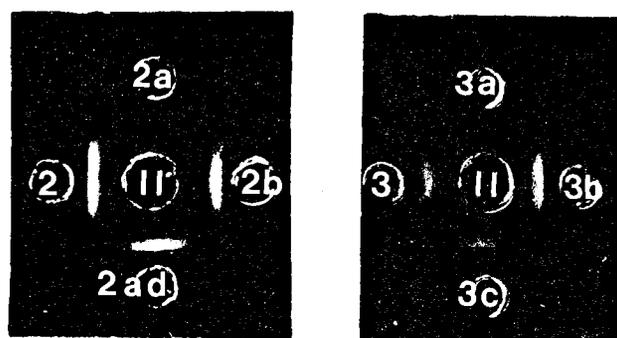


FIGURE 19 :

Etude en double diffusion dans un gel d'agarose de la lectine RCA_{II} de Ricinus Communis et des fractions de mucus bronchique (fractions 2 et 3 obtenues par chromatographie d'un mucus réduit sur Sépharose 4B ; fractions 2a, 2b, 3b et 3c obtenues par chromatographie d'affinité des fractions 2 et 3 sur une colonne de lectines de Ricin-Sephadex G25 ; fraction 2 ad correspondant à la fraction 2a après une extraction lipidique).

TABLEAU XXIV : Composition chimique de la fraction 2 éluée de la colonne de Sepharose 4B et des 2 fractions 2a et 2b éluées de la colonne de Sephadex G 25 couplé avec les lectines du ricin.

	2	2a	2b
Fucose	12,2	11,8	13,9
Galactose	20,5	17,3	22,2
N-acétyl-glucosamine	16,7	14,9	17,0
N-acétyl-galactosamine	10,2	9,0	12,2
Acide N-acétyl-neuraminique	9,0	8,1	9,1
Sulfate	1,0	0,9	1,6
Acides aminés	15,00	15,06	15,30
Lipides	6,0	7,9	3,6

Les résultats sont exprimés en pourcentage de poids sec



TABLEAU XXV :

Composition en acides aminés de la fraction 2 éluée de la colonne de Sepharose 4B et des fractions 2a et 2b éluées de la colonne de Sephadex G25 couplé avec les lectines de Ricin.

Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par 100 résidus.

	2	2a	2b
Asp °	4,20	4,87	4,78
Thr	25,69	24,78	24,81
Ser	15,69	15,96	16,71
Glu	5,87	5,36	5,49
Pro	10,10	9,38	9,87
Gly	7,55	8,34	8,40
Ala	8,90	9,52	9,40
Val	4,50	4,18	4,91
Ile	2,62	3,00	2,54
Leu	4,86	3,90	3,88
Tyr	1,00	1,21	1,13
Phe	1,86	2,38	1,64
Lys	2,64	2,51	2,16
His	1,80	1,65	1,37
Arg	3,27	2,94	2,82

° composition en acides aminés déterminées sur auto-analyseur Technicon.



C - ETUDE DE LA FRACTION 2 PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 COUPLE AUX LECTINES DE RICIN :

1) Chromatographie d'affinité :

La chromatographie d'affinité réalisée à partir de 80 mg de la fraction 2 permet d'obtenir une fraction 2a qui n'est pas retenue sur la colonne et qui est éluée par l'eau distillée (fig. 20), ainsi qu'une deuxième fraction 2b éluée de la colonne par la solution de chlorure de sodium 0,5 M contenant de l'acide acétique 0,1 M (fig. 20). Les deux fractions 2a et 2b sont dialysées et lyophilisées (2a = 7 mg) (2b = 51 mg).

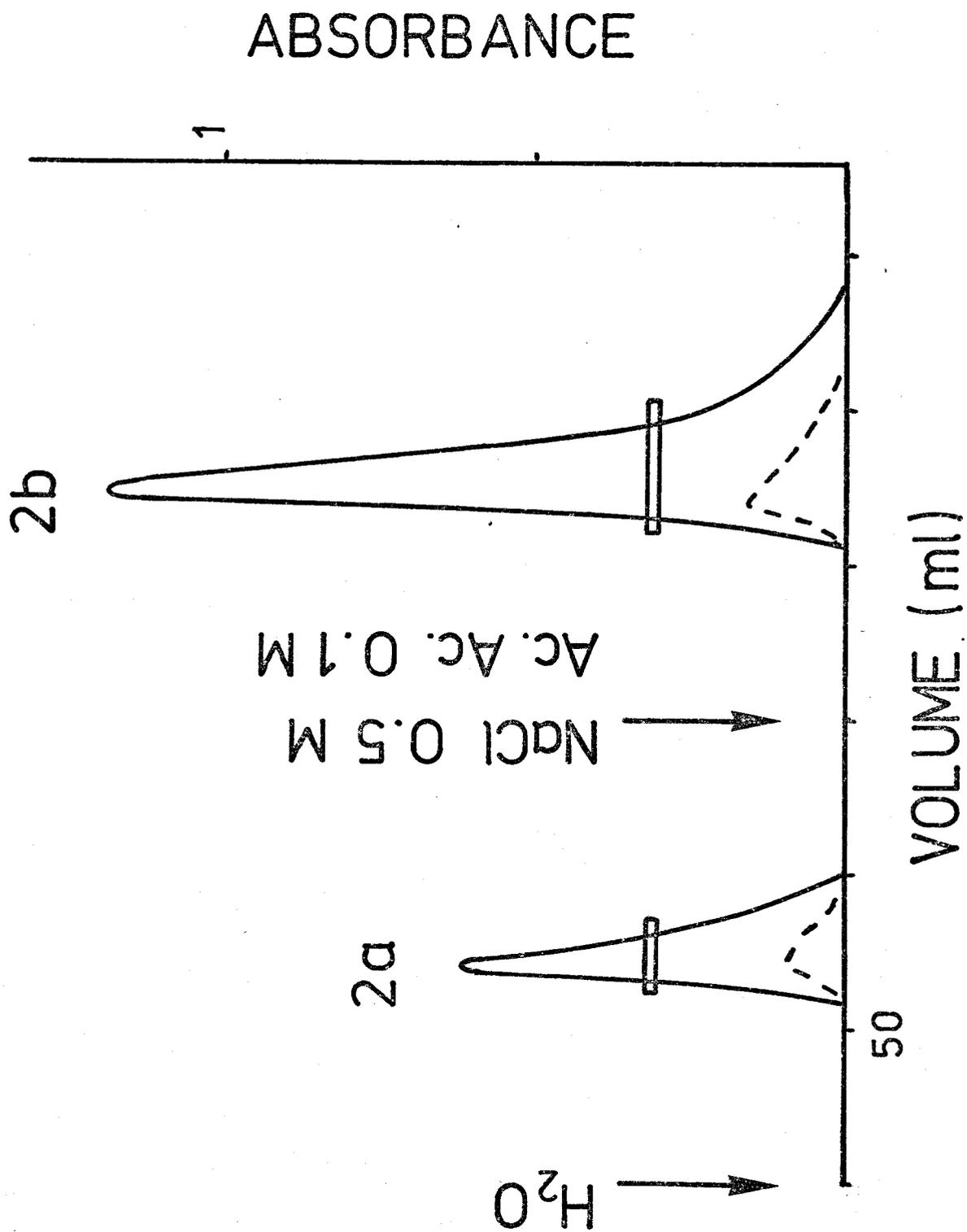
2) Etude des fractions obtenues :

a - double diffusion en agarose :

Les deux fractions sont étudiées par double diffusion en présence des lectines de ricin. Dans ces conditions, aussi bien en présence de la lectine RCA_{II} (fig. 19) que de la lectine RCA_I, on obtient un arc de précipitation avec la fraction 2b tandis que la fraction 2a n'est pas précipitée par les lectines.

b - électrophorèse :

L'électrophorèse en agarose des 2 fractions 2a et 2b montrent qu'elles sont intensément révélées par le réactif de Schiff après oxydation périodique et faiblement par l'Amidoschwarz. La révélation par le bleu de Toluidine fait apparaître une différence entre les deux fractions : 2a est faiblement révélée et 2b est intensément révélée par le bleu de Toluidine (fig. 18).



BINS
LILLE

c - composition chimique :

- La composition glucidique des deux fractions montre qu'elles renferment toutes les deux les mêmes constituants (tableau XXIV) dans des rapports molaires voisins. Toutefois, la fraction 2a renferme environ 62 % de glucides tandis que la fraction 2b en contient 76 %.
- La composition en acides aminés des fractions 2a et 2b est caractérisée par leur richesse en threonine, serine, glyco-colle, alanine et proline (tableau XXV).
- La somme des pourcentages glucides + acides aminés est plus importante pour la fraction 2b que pour la fraction 2a.
- La quantité de lipides extraits par le chloroforme-méthanol (2-1 : v/v) est de 7,9 % pour la fraction 2a et de 3,6 % pour la fraction 2b.

L'étude qualitative des lipides ainsi extraits est réalisée par chromatographie sur couche mince. En utilisant le système solvant chloroforme-méthanol-ammoniaque, on met en évidence dans chacune des fractions, la présence de cardiolipides, céphalines, lecithines et sphingomyelines. Par chromatographie avec le solvant ether de pétrole-éthanol-acide acétique, on démontre la présence de stérides, de triglycérides, d'acides gras libres, de diglycérides et de monoglycérides.

3) Etude de la réactivité de la fraction 2a après délipidation :

L'étude en double diffusion de la fraction 2a préalablement délipidée montre que cette fraction est précipitée par les lectines de Ricinus communis (fig. 19).

En électrophorèse, en agarose, cette fraction délipidée est plus fortement révélée par le bleu de Toluidine que la

fraction non délipidée 2a.

D - ETUDE DE LA FRACTION 3 PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 COUPLE AUX LECTINES DU RICIN :

1) Chromatographie d'affinité :

La fraction 3 élue de la colonne de Sepharose 4B est déposée sur la colonne de lectines insolubilisées sur du Sephadex G 25. L'élution est conduite dans les mêmes conditions que précédemment. On obtient ainsi une fraction non retenue sur la colonne et élue par l'eau distillée 3a (21 mg) et deux fractions 3b (25 mg) et 3c (2 mg) élues de la colonne par la solution de chlorure de sodium 0,5 M contenant de l'acide acétique 0,1 M (fig. 21).

2) Etude des fractions obtenues :

a - Double diffusion en agarose :

L'étude en double diffusion révèle que la fraction 3a n'est pas précipitée par les lectines du Ricin alors que les fractions 3b et 3c le sont (fig. 19).

b - électrophorèse :

L'électrophorèse en agarose à pH 8,2 montre que la fraction 3a renferme des constituants essentiellement révélés par l'amidoschwarz : l'un a une mobilité identique à celle de la sérum-albumine ; les autres ont une mobilité β -globulinique et sont aussi faiblement révélés par le réactif de Schiff après oxydation périodique (fig. 18).

Les fractions 3b et 3c renferment des constituants révélés par l'amidoschwarz et le réactif de Schiff après oxydation périodique ainsi que des constituants ayant une migration plus anodique et ré-

vélés par le bleu de Toluidine (fig. 18).

3) Chromatographie de gel filtration de la fraction 3b :

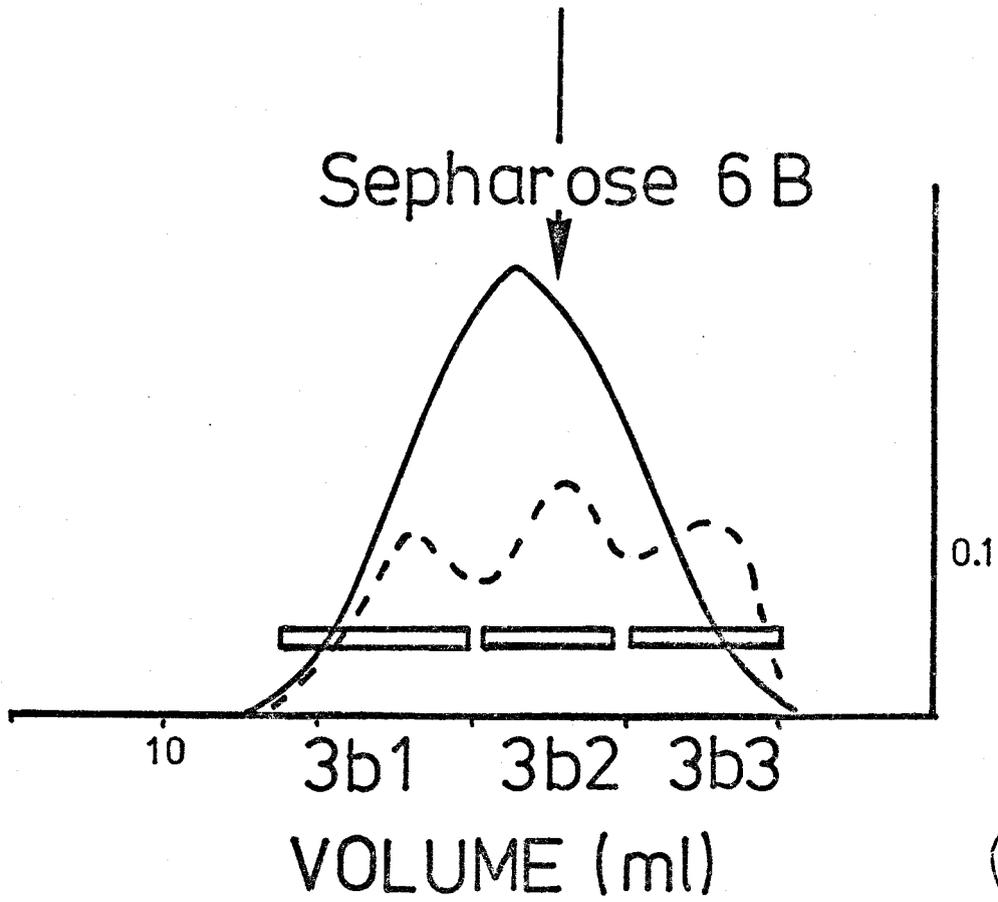
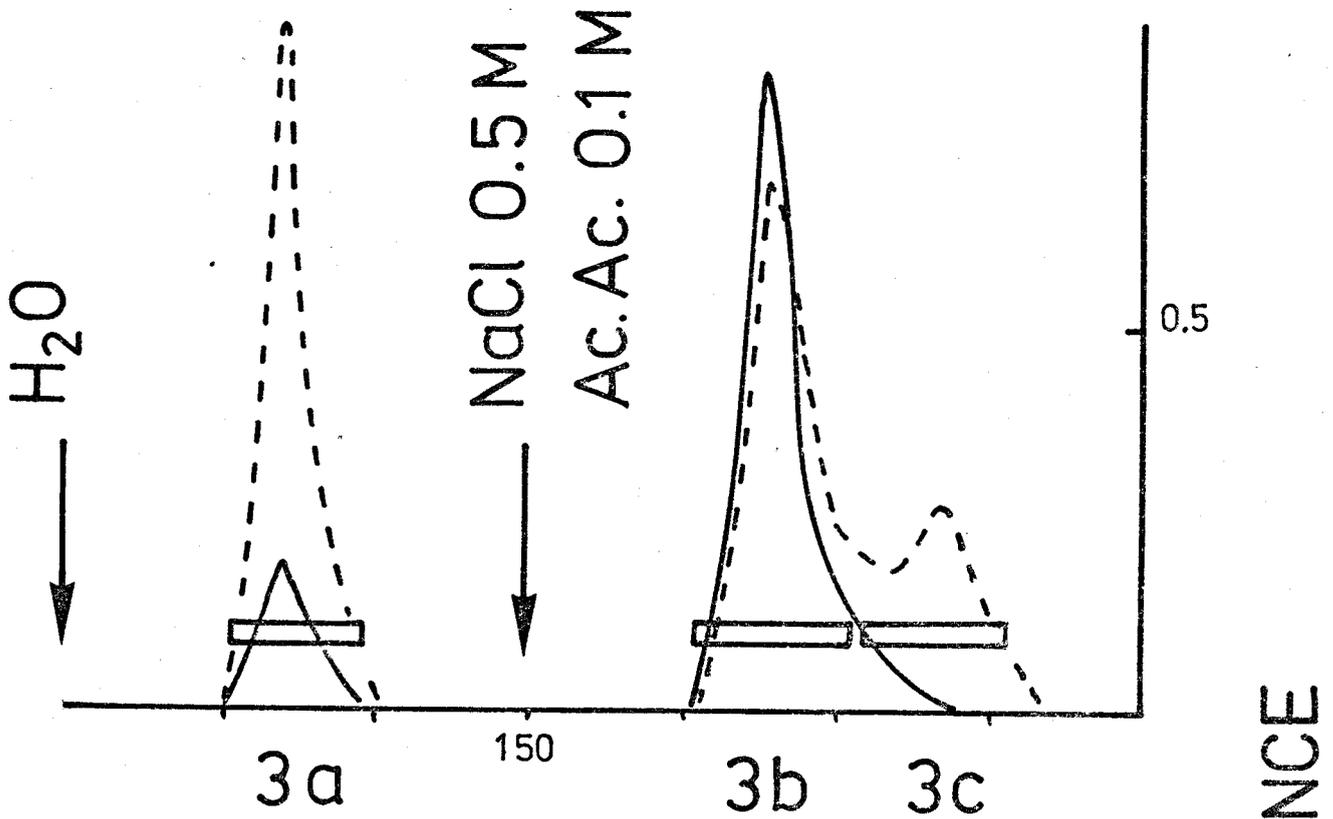
La fraction 3b (25 mg) est déposée sur une colonne de Sepharose 6B équilibrée dans un tampon Tris 0,1 M, Na Cl 0,2 M, de pH 8,0. L'éluion réalisée par le même tampon a permis d'obtenir 3 fractions 3b 1 (4 mg), 3b 2 (10 mg) et 3b 3 (2 mg) (fig. 21)

L'électrophorèse à pH 8,2 de chacune des 3 fractions montre une zone plus ou moins diffuse révélée par l'amido-chwarz et par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Dans les fractions 3b 1 et 3b 2, on remarque des constituants révélés par le bleu de Toluidine (Fig. 18).

4) Etude immuno-électrophorétique des fractions 3b 1, 3b 2, 3b 3 et 3c :

L'étude immuno-électrophorétique a été réalisée à l'aide de différents immunsérums : antiprotéines sériques humaines, antichaine α des immunoglobulines A, antilactotransferrine et anti α 1-chymotrypsine. Elle a permis de montrer que la fraction 3b 1 ne contient qu'un arc révélé par l'immunsérum antiprotéines sériques humaines et par l'immunsérum antichaines α . La fraction 3b 2 contient deux arcs révélés par l'immunsérum antiprotéines sériques humaines : l'un est aussi révélé par l'immunsérum antichaines α et l'autre par l'immunsérum anti α 1-antichymotrypsine. La fraction 3b 3 ne contient qu'un arc de mobilité β -globulinique révélé par l'immunsérum antiprotéines sériques humaines et par l'immunsérum antilactotransferrine.

La fraction 3c n'a été obtenue qu'à l'état de traces et l'immuno-électrophorèse réalisée avec l'immunsérum antiprotéines sériques humaines révèle deux arcs ayant l'un la mobilité



des immuno-globulines et l'autre celle de l' α 1-antichymotrypsine.

5) Discussion :

La chromatographie d'un mucus bronchique fibrillaire réduit sur colonne de Sepharose 4B permet de séparer d'une part, l'ensemble des mucines ayant différents caractères d'acidité et d'autre part, une fraction de poids moléculaire plus faible contenant des protéines et des glycoprotéines comme les immunoglobulines A et la broncho-transferrine (HAVEZ et Coll., 1973).

Nous avons démontré au chapitre précédent que toutes les fractions de mucines, quelle que soit leur acidité, réagissaient avec les lectines de ricin. Nous avons cherché à vérifier, si, au sein de l'ensemble des mucines, toutes les molécules étaient capables de réagir avec les lectines de ricin.

La chromatographie de l'ensemble des mucines sur une colonne de lectines de ricin fixées sur du Sephadex G 25 permet de les séparer en deux fractions :

- une fraction mineure, non retenue sur la colonne, n'a apparemment pas d'affinité pour les lectines de ricin. Cette fraction essentiellement glycoprotéique contient cependant des lipides. L'extraction de ceux-ci par la méthode de FOLCH permet de démasquer l'affinité des glycoprotéines pour les lectines de ricin.
- la fraction majeure est retenue sur la colonne et correspond à des molécules ayant une affinité pour les lectines de ricin mais

encore souillée par de plus faibles quantités de lipides. On peut rappeler à ce propos que la sécrétion bronchique humaine est très riche en lipides (HAVEZ et Coll., 1973).

Peut-être y a-t-il dans les mucines des régions hydrophobes pouvant se lier à des lipides dont l'abondance sur certaines molécules empêcherait la réactivité avec les lectines de ricin.

Ces expériences démontrent en outre, que la réactivité d'une fraction avec des lectines ne signifie pas obligatoirement que toutes les molécules contenues dans cette fraction ont une affinité pour les lectines

Nous nous proposons ultérieurement de vérifier si des faits du même genre peuvent être observés avec la lectine de gennét épineux qui réagit avec toutes les mucines des sujets sécréteurs.

Nous avons ensuite utilisé la chromatographie d'affinité sur colonne de Sephadex G 25-lectines de ricin pour fractionner les molécules contenues dans la fraction 3 du mucus réduit. Cette expérience démontre l'affinité pour les lectines de ricin, de molécules comme la broncho-transferrine, l' α 1-antichymotrypsine, ou les immunoglobulines A. L'affinité de ce dernier type de molécules pour les lectines de ricin a d'ailleurs déjà été constatée par HARBOE et Coll. (1975).

IV - ETUDE HISTOCHIMIQUE ET ETUDE DE L'AFFINITE DES LECTINES POUR LA MUQUEUSE BRONCHIQUE HUMAINE "SAINE"

Les lectines qui présentent une affinité pour les glycoprotéines présentes dans le mucus bronchique peuvent être utilisées

pour essayer de localiser ces molécules dans la muqueuse bronchique humaine "saine" et éventuellement pour connaître leur lieu de synthèse.

On sait, en effet, que la muqueuse bronchique humaine comprend plusieurs types cellulaires impliqués dans la biosynthèse de glycoconjugués bronchiques (RHODIN, 1966).

Au niveau de l'épithélium de surface, en dehors des cellules ciliées, on rencontre des cellules caliciformes à mucus ouvertes (il y a en moyenne une cellule caliciforme pour cinq cellules ciliées). Les cellules caliciformes ont une forme très allongée, le noyau est rond ou légèrement ovale et se trouve à la base de la cellule.

Par ailleurs, dans la sous-muqueuse sont localisées des glandes tubulo-acineuses muqueuses, séreuses et mixtes.

Les acini muqueux sont constituées de cellules à noyau reniforme rejeté à la partie basale de la cellule ; d'autre part, il est possible de localiser des boules de mucigènes au pôle apical.

Les glandes séreuses comprennent des cellules à noyau central et arrondi, ou ovalaire, situé à l'union du tiers inférieur et du tiers moyen de la cellule; le cytoplasme contient de nombreuses granulations le plus souvent concentrées dans la région apicale.

Le mucus bronchique qui tapisse l'épithélium bronchique provient essentiellement des glandes de la sous-muqueuse et, pour une part plus faible, des cellules caliciformes de l'épithélium.

L'étude de l'affinité de la muqueuse bronchique hu-

maine a été effectuée au moyen des lectines utilisées pour typer les différentes mucines bronchiques et de la lectine de la limule (limuline) qui a une spécificité à l'égard des résidus d'acide sialique.

Au cours de la réalisation de ce travail, il est apparu que la technique de fixation du tissu bronchique était une étape importante. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons été amenés à choisir le type de fixateur le plus favorable à la fixation des glycoconjugués présents dans les cellules de la paroi bronchique.

A - CHOIX DU FIXATEUR :

Les fragments de biopsie ont été fixés dans 3 fixateurs différents : une solution de formol à 4 %, le mélange de Carnoy et le mélange alcoolique de Bouin.

Des études histochimiques et biochimiques ont ensuite permis de préciser le type de fixateur le mieux adapté à notre étude.

1) Coloration de la muqueuse bronchique humaine par le réactif de Schiff après oxydation periodique (P. A. S.) et par le bleu alcian à différents pH.

La mise en évidence des glycoconjugués au sein des cellules de la muqueuse bronchique humaine est effectuée par coloration des coupes au moyen du réactif de Schiff après oxydation periodique. La nature acide de certaines de ces molécules est mise en évidence par la coloration au bleu alcian à différents pH : 2, 5 ; 1 et 0, 2.

On remarque qu'après fixation par le mélange de Carnoy, la partie apicale des cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et les cellules muqueuses des glandes localisées dans la sous-muqueuse sont très intensément révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Le cytoplasme entier des cellules séreuses est très faiblement coloré (fig. 22). Les cellules caliciformes et les cellules muqueuses sont très bien révélées à leur apex, par le bleu alcian à pH 2,5 (fig. 22) et 1 alors que ces mêmes molécules sont faiblement colorées par le bleu alcian à pH 0,2. Les cellules séreuses ne sont que faiblement révélées par le bleu alcian aux différents pH et la coloration est diffuse dans tout le cytoplasme

Après fixation par le mélange alcoolique de Bouin, la coloration au P.A.S. met en évidence, comme précédemment, avec une intensité égale, les cellules caliciformes et les cellules muqueuses. Quant aux cellules séreuses, elles sont toujours faiblement révélées. La coloration par le bleu alcian permet de révéler les cellules caliciformes et muqueuses aux différents pH, mais avec une intensité moindre qu'avec le fixateur de Carnoy.

Lorsque le tissu a été fixé dans la solution de formol à 4 %, les colorations obtenues sont beaucoup moins intenses que dans les deux cas précédents. Il faut noter cependant, qu'à pH 0,2, seules les cellules séreuses restent faiblement colorées.

En conclusion, l'étude comparative de la fixation de la muqueuse bronchique par trois fixateurs, résumée dans le tableau XXVI, montre que les coupes fixées par le formol sont moins colorées

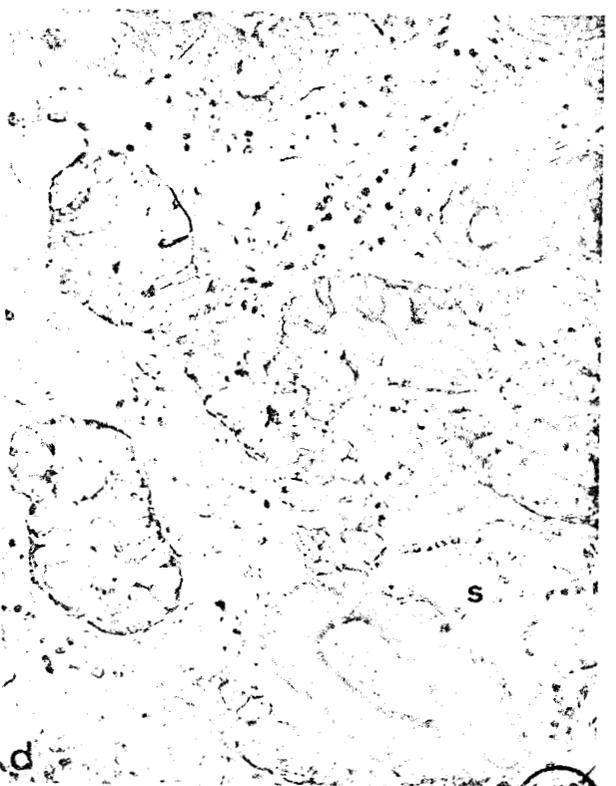


TABLEAU XXVI :

Coloration de la muqueuse bronchique humaine macroscopiquement "saine" par le réactif de Schiff (P. A. S.) et le bleu Alcian à pH 2, 5 ; 1 et 0, 2.

Fixateurs	Cellules	P. A. S.	BLEU ALCIAN		
			pH 2, 5	ph 1	pH 0, 2
Carnoy	Caliciformes	++++	++++	+++	+
	Muqueuses	++++	++++	+++	+
	Séreuses	++	++	+	+
Bouin alcoolique	Caliciformes	++++	+++	++	++
	Muqueuses	+++	+++	++	++
	Séreuses	++	++	+	+
Formol	Caliciformes	+++	+++	+++	0
	Muqueuses	+++	+++	+++	0
	Séreuses	+	+	+	+

L'intensité de coloration observée est indiquée par :

++++ très forte

+++ forte

++ moyenne

+ faible

0 absence de coloration



par le P. A. S. que celles qui ont été fixées avec le carnoy ou le Bouin alcoolique. Certains glycoconjugués, peut-être des mucines, ne sont probablement pas fixés par le formol et le sont au moins partiellement, par les deux autres fixateurs. Ceci nous a amené à étudier la solubilité, dans ces trois fixateurs, de mucines préparées à partir d'expectorations de malades atteints de bronchite chronique.

2) Solubilité des mucines :

5 mg de mucines C2 b (BIA...) sont mis en suspension dans 5 ml de chaque fixateur. Après agitation pendant quelques secondes, on constate que les mucines placées dans la solution de paraformaldehyde sont dissoutes, alors que dans le carnoy et le Bouinalcoolique, il persiste un trouble.

Après 2 h de contact, la suspension de mucines dans le carnoy est centrifugée : on peut ainsi récupérer un surnageant et un culot qui sont lyophilisés et pesés. A partir du culot insoluble, on retrouve ainsi environ 5 mg de produit. Après évaporation et lyophilisation du surnageant, on ne retrouve aucune trace de matériel. Les mucines bronchiques sont donc insolubles dans le fixateur de Carnoy.

Après 24 h de contact, la suspension de mucines, dans le Bouin alcoolique est aussi centrifugée. On obtient un culot et un surnageant, le culot est lyophilisé et pesé. On retrouve 3 mg de produit. Le surnageant est neutralisé par de la soude 1 M, dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisé. On retrouve environ 2 mg de produit.

Les mucines ont donc un coefficient de solubilité différent dans chaque fixateur. Elles sont parfaitement solubles dans le formol, partiellement solubles dans le Bouin alcoolique et complètement insolubles dans le Carnoy. Ces résultats amènent à penser

que les différences d'intensité de coloration des coupes pourraient s'expliquer par une extraction plus ou moins importante de certaines molécules et en particulier, des glycoconjugués.

3) Etude électrophorétique de mucines en agarose à pH 8,2 avec fixation des électrophorégrammes dans le formol à 4 %, le Carnoy ou le Bouin alcoolique.

Les mucines acides (C2 b) de BIA... sont étudiées en électrophorèse en agarose à pH 8,2. Les électrophorégrammes sont ensuite fixés dans les conditions habituelles (mélange : éthanol-eau-acide acétique ou Cetavlon), ou par le Carnoy pendant 2 h, le Bouin alcoolique pendant 24 h ou encore la solution de paraformaldehyde pendant 24 h.

La coloration des différentes lames par l'amidoschwarz, le P.A.S. et le bleu de Toluidine montre que la révélation des mucines par le P.A.S. et le bleu de Toluidine est plus intense quand elles ont été fixées par le Carnoy (fig. 23). Avec ce fixateur, on révèle beaucoup mieux la partie la plus anodique des mucines qu'avec les fixateurs habituels.

Après fixation par le Bouin alcoolique, on révèle bien les mucines par le bleu de Toluidine. Par contre, la révélation au P.A.S. est plus faible. (fig. 23).

Après fixation par la solution de paraformaldehyde on n'observe plus qu'une faible coloration au P.A.S. et aucune coloration par le bleu de Toluidine (fig. 23).

Cette expérience démontre que les mucines bronchiques peuvent être extraites presque en totalité par la solution de paraformaldehyde, partiellement par le Bouin alcoolique. Par contre, le Carnoy semble être le fixateur qui convient le mieux à la précipitation des mucines.

BIA... mucinesC2b

Carnoy

AS

PAS



BT



Ethanol_eau_ac.acétique

AS

PAS

Bouin alcoolique

AS

PAS

Cétavlon

BT



BT



Formol

AS

PAS

BT



B - ETUDE DE LA MUQUEUSE BRONCHIQUE HUMAINE A L'AIDE
DE LECTINES MARQUEES A LA PEROXYDASE :

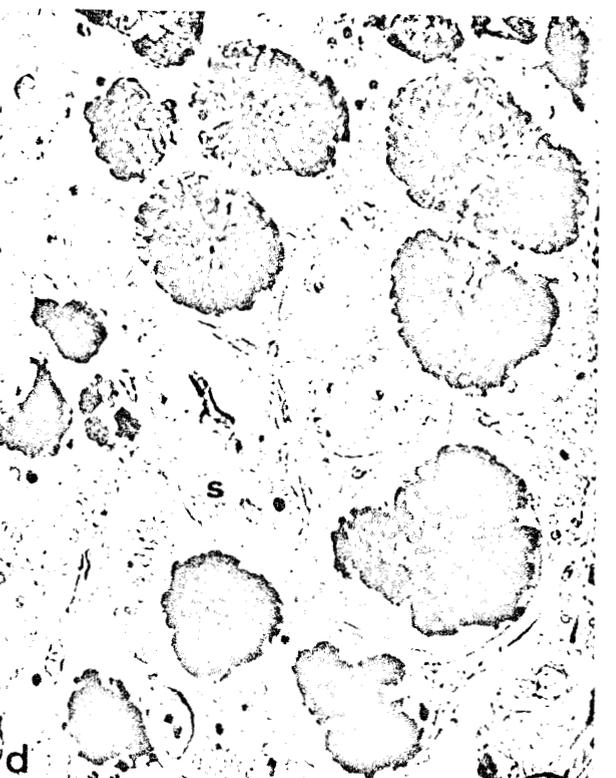
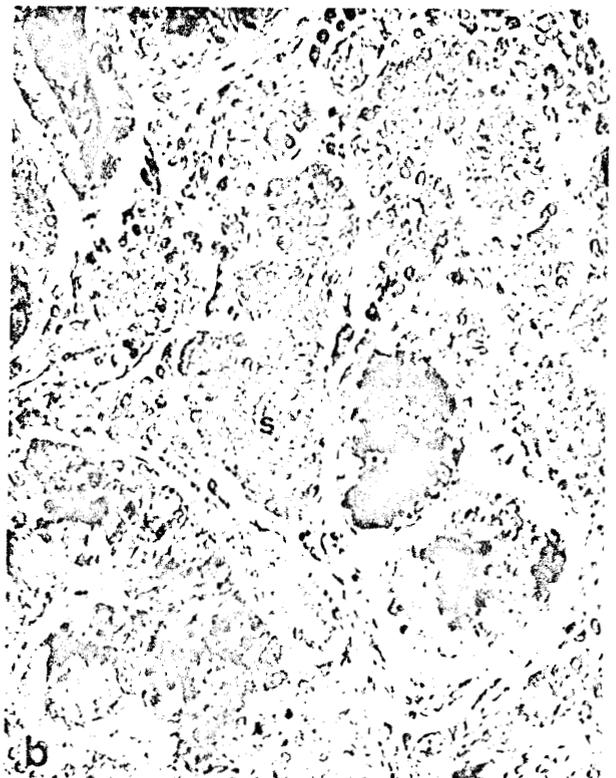
Cette étude a été entreprise dans le but d'identifier les cellules et éventuellement les groupes d'organites cellulaires qui, au sein de la muqueuse bronchique humaine ont une affinité pour ces lectines.

Pour réaliser cette étude, chaque lectine a été marquée avec de la peroxydase au moyen d'une solution de glutaraldehyde. Puis les coupes obtenues à partir des fragments de tissu bronchique normal, chez un sujet adulte de groupe sanguin A, ont été fixées par le mélange de Carnoy, le Bouin alcoolique ou une solution de paraformaldehyde. Elles ont ensuite été incubées avec chaque solution de lectines marquées à la peroxydase. Au niveau des cellules de la muqueuse bronchique, la présence de peroxydase est révélée par de l'eau oxygénée en présence de diaminobenzidine.

1) Affinité de la lectine à fucose du genêt épineux pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

La lectine du genêt épineux se fixe électivement au pôle apical des cellules caliciformes et des cellules muqueuses aussi bien après fixation par le Bouin alcoolique que par le mélange de Carnoy (fig. 24) (tableau XXVII). Le cytoplasme des cellules séreuses n'est que très faiblement marqué. Après utilisation de la solution de paraformaldehyde, il n'est pas possible de révéler les cellules caliciformes, muqueuses ou séreuses. Quelque soit la fixation utilisée, le tissu conjonctif n'est jamais coloré, au contraire, le tissu cartilagineux est toujours coloré.

Tout marquage disparaît après incubation de la



Fixateurs	Cellules	Genêt	Lotier	Germe de blé	Soja	Ricin		cacahu- ète	conca- navaline A	Limuli- ne
						RCA _I	RCA _{II}			
Carnoy	Caliciformes	++++	++	+++	++++	++++	++++	0	0	++++
	Muqueuses	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	0	0
	Séreuses	+	++	++	+	++	+++	++	+++	++++
	Tissu conjonctif	0	+	++	+	++	++	+	++	0
	Tissu cartilagineux	+	++	++	+	++	++	+	++	0
Bouin Alcoo- lique	Caliciformes	+++	+	+++	++	++	++	0	0	
	Muqueuses	+++	+++	+++	+++	++	++	+	0	
	Séreuses	+	+	++	++	+	+	+++	+++	
	Tissu conjonctif	0	+	++	+	+	+	+	++	
	Tissu cartilagineux	+	+	++	+	+	+	+	++	

TABLEAU XXVII : Marquage des différents types cellulaires de la muqueuse bronchique humaine au moyen des lectines marquées à la peroxydase.

L'intensité de coloration observée est noté : +++++ très forte ; +++ forte ; ++ moyenne ; + faible ; 0 absence de coloration



solution de lectine en présence de fucose 0,2 M. De même, l'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) inhibe l'interaction entre les lectines et les cellules de la muqueuse bronchique, mais n'inhibe pas la réaction avec le tissu cartilagineux.

2) Affinité de la lectine du lotier pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

Après fixation de la muqueuse bronchique par le mélange de Carnoy, la solution de lectine du lotier couplée à la peroxydase permet de bien colorer l'apex des cellules muqueuses, plus faiblement celui des cellules caliciformes et également, le cytoplasme des cellules séreuses (fig. 24).

L'intensité de coloration varie aussi en fonction des fixateurs (tableau XXVII). Si elle est intense, après utilisation du mélange de Carnoy, elle est moins marquée avec le Bouin Alcoolique. Après fixation par la solution de paraformaldehyde aucun de ces trois types cellulaires n'est coloré. Toutefois, quelque soit la fixation, le tissu conjonctif est toujours légèrement coloré, ainsi que le tissu cartilagineux.

L'addition de fucose 0,2 M à la solution de lectine avant l'incubation des coupes empêche la réaction de se produire : aucune cellule n'est marquée. L'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) donne un résultat sensiblement identique , mais le cartilage reste coloré.

3) Affinité de la lectine de germe de blé pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

La lectine de germe de blé réagit fortement avec la partie apicale des cellules caliciformes et des cellules muqueuses.

Le cytoplasme de certaines cellules séreuses est faiblement coloré tandis que dans d'autres cellules, il ne l'est pas. Le tissu conjonctif est légèrement marqué ainsi que le cartilage hyalin entourant les chondrocytes (fig. 25). L'intensité de marquage de ces différentes cellules est sensiblement identique, après fixation par le Carnoy ou le Bouin Alcoolique (tableau XXVII). Après fixation du paraformaldehyde, aucun type cellulaire n'est mis en évidence.

L'addition de N-acétyl-glucosamine (0,2 M) à la solution de lectine de germe de blé avant incubation des coupes ne permet plus de révéler les cellules de la muqueuse bronchique.

Par contre, l'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) à la solution de lectine s'accompagne d'une disparition de la révélation des différents types cellulaires, sauf du tissu cartilagineux.

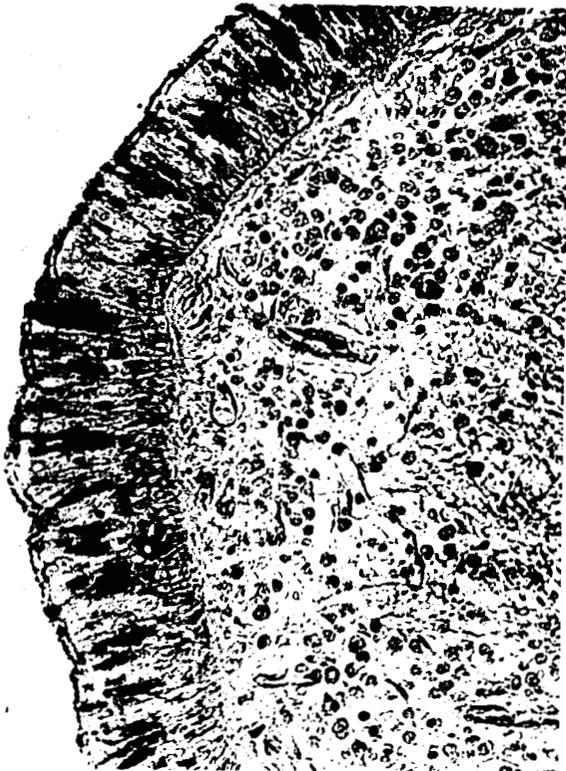
4) Affinité de la lectine du soja pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

La lectine du soja se fixe préférentiellement à l'apex des cellules caliciformes et muqueuses. Là encore, la coloration est beaucoup plus importante lorsque les tissus ont été fixés par le Carnoy (fig. 25) (tableau XXVII).

Les cellules séreuses sont très faiblement colorées. De plus, elles sont un peu mieux révélées après fixation par le Bouin Alcoolique qu'après fixation par le Carnoy.

Après fixation par la solution de paraformaldehyde, les cellules caliciformes, muqueuses ou séreuses ne sont jamais colorées.

Quelque soit le fixateur utilisé, le tissu conjonctif présente toujours une coloration de fond et le tissu cartilagineux est également coloré.



C

L'addition de galactose (0,2 M) et de N-acétylgalactosamine (0,2 M) à la solution de lectine couplée à la peroxydase ne permet plus la révélation des cellules muqueuses et caliciformes, ni des cellules du tissu conjonctif.

L'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) à la solution de lectine, s'accompagne également d'une disparition de la coloration des cellules muqueuses et caliciformes, alors que le tissu cartilagineux est encore légèrement teinté.

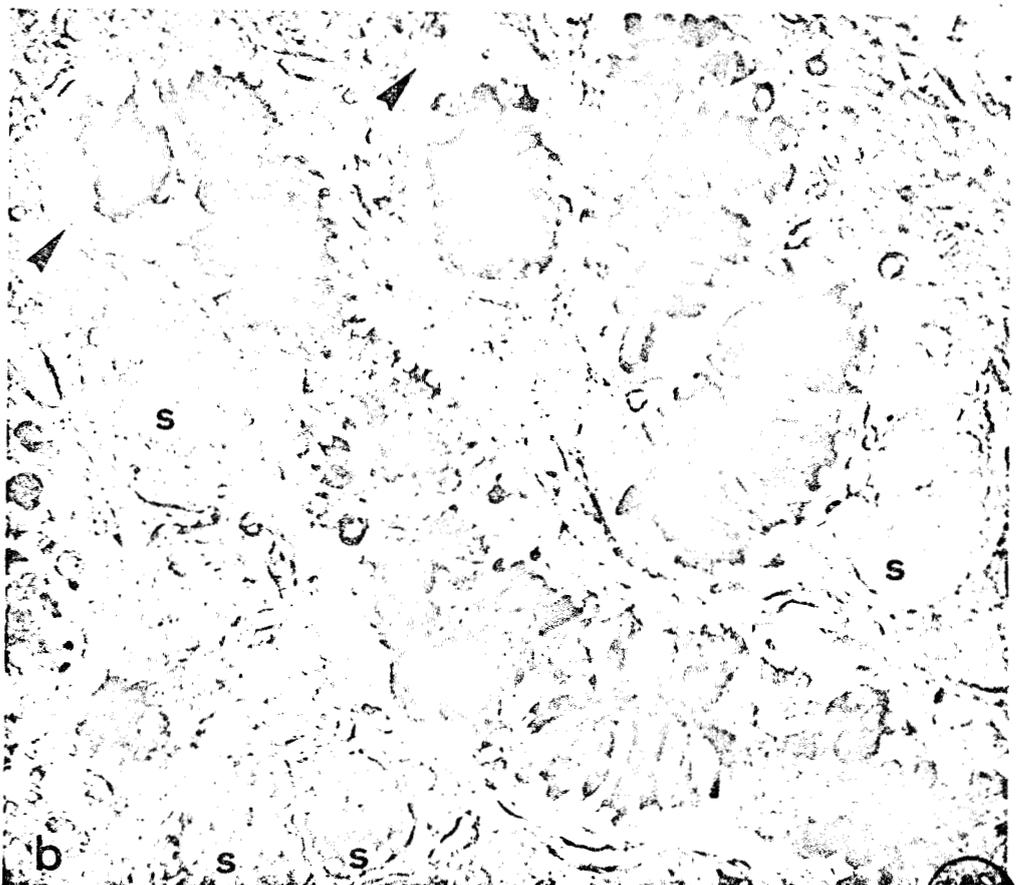
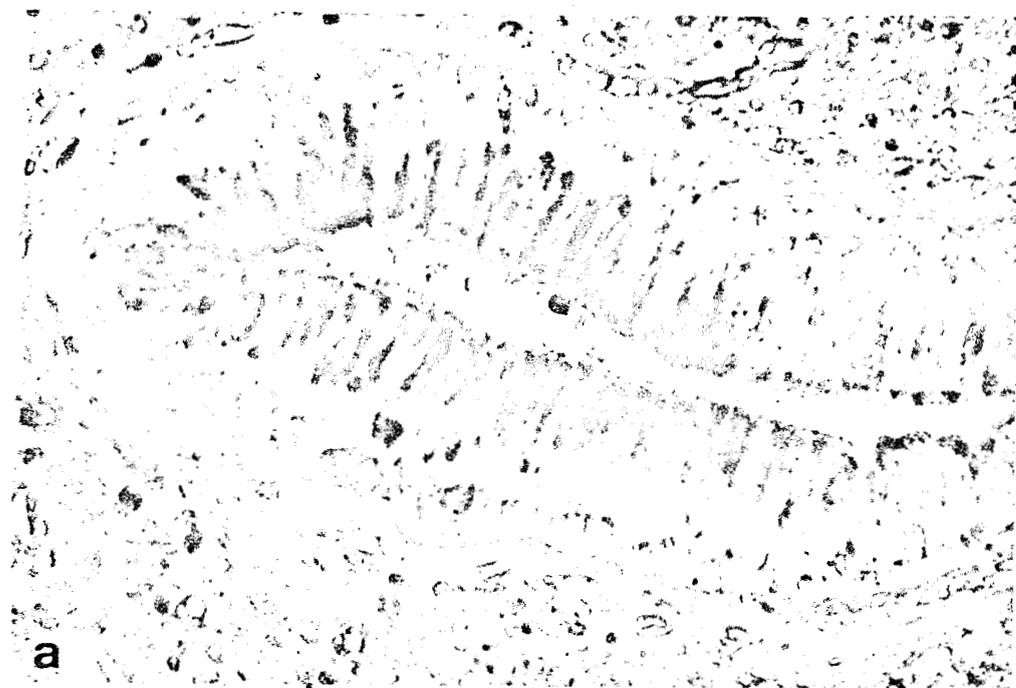
5) Affinité des lectines du ricin pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

a - RCA_I :

Après fixation de la muqueuse bronchique par le mélange de Carnoy ou le Bouin Alcoolique, la lectine RCA_I réagit fortement avec la partie apicale des cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et avec les cellules muqueuses des glandes. Pratiquement, tout le cytoplasme des acini séreux est aussi coloré, mais l'intensité de la réaction est plus faible. Le noyau de ces différentes cellules n'est jamais coloré. Le tissu conjonctif est coloré uniformément et, dans les fragments d'anneaux cartilagineux, la substance intracellulaire du cartilage hyalin entourant les chondrocytes est très bien mise en évidence. Il faut remarquer que l'intensité de la coloration varie en fonction des fixateurs employés (tableau XXVII) :

- intense après utilisation du mélange de Carnoy (fig. 26).
- moins marquée avec le Bouin Alcoolique.

Après fixation par le paraformaldehyde, seules les cellules caliciformes, les cellules muqueuses et le tissu cartilagineux sont très faiblement colorés..



LILLE

Les coupes incubées avec la solution de lectines RCA_I marquées à peroxydase et contenant le sucre inhibiteur (galactose 0,2 M) présentent une légère coloration de fond. La coloration des cellules caliciformes, muqueuses, séreuses, ainsi que celle du cartilage a disparu. L'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) à la solution de lectine donne le même résultat, excepté la persistance de la coloration du cartilage.

b - RCA_{II} :

Avec la lectine RCA_{II}, les résultats obtenus sont identiques. Toutefois, les cellules séreuses sont plus colorées qu'avec la solution de lectine RCA_I (tableau XXVII) (fig. 27).

Les coupes incubées avec la solution de lectine RCA_{II} marquée à la peroxydase et contenant les sucres inhibiteurs (galactose 0,2 M ou N-acétyl-galactosamine 0,2 M) présentent une légère coloration de fond. La coloration des cellules caliciformes, muqueuses et séreuses, et aussi celle du cartilage a disparu. L'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) à la solution de lectine donne un résultat identique : seule la coloration du cartilage persiste.

6) Affinité de la lectine de cacahuète pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

Les cellules qui présentent une affinité pour la lectine de cacahuète, sont surtout les cellules séreuses, préalablement fixées soit dans le Carnoy (fig. 28), soit dans le Bouin Alcoolique. Quelque soit le fixateur, les cellules caliciformes ne sont pas marquées. Par contre, les cellules muqueuses sont faiblement colorées. Après fixation par la solution de paraformaldehyde, aucun de ces types cellulaires n'est révélé. Quelque que soit la fixation utilisée, les tissus conjonctif et cartilagineux sont toujours faiblement colo-



BUS
LILLE

rés (tableau XXVII).

L'addition de galactose (0,2 M) à la solution de lectine permet d'éliminer totalement le marquage. L'addition d'un pool de mucines (fraction 2, fig. 17) à la solution de lectine empêche la révélation des différents types cellulaires (muqueux, et séreux) tandis que le tissu cartilagineux reste coloré.

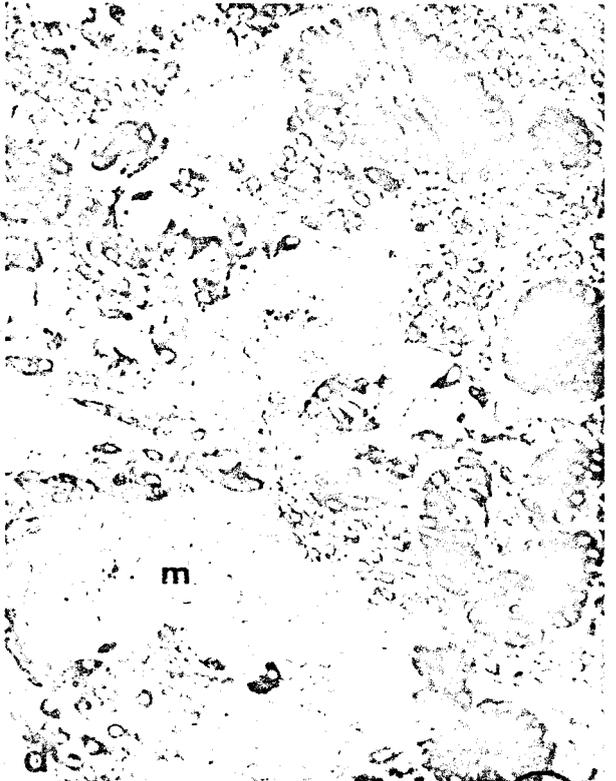
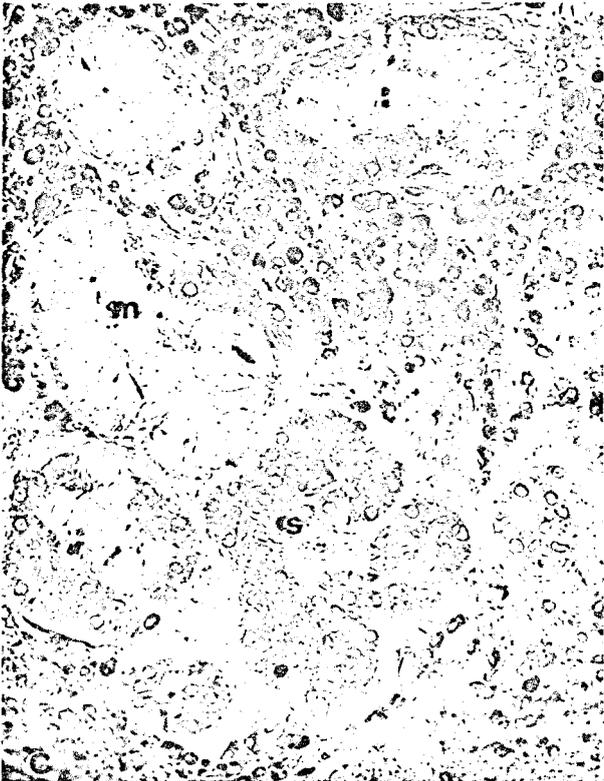
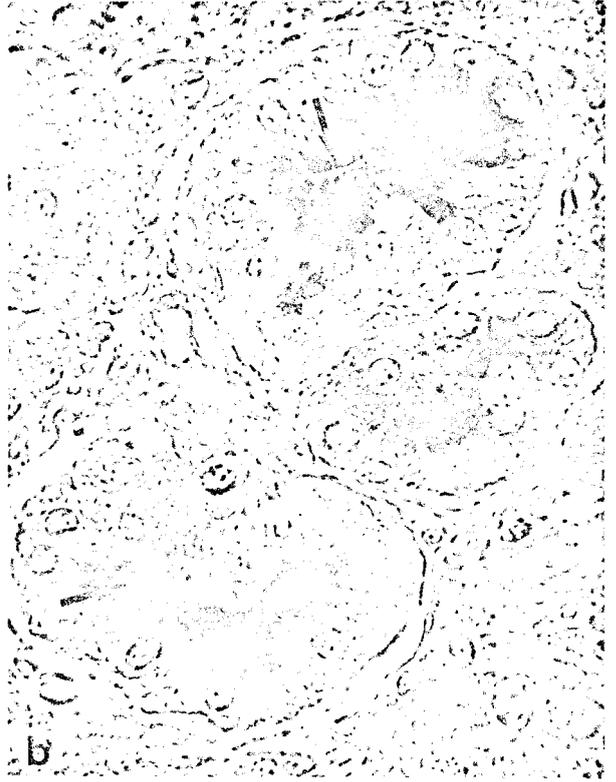
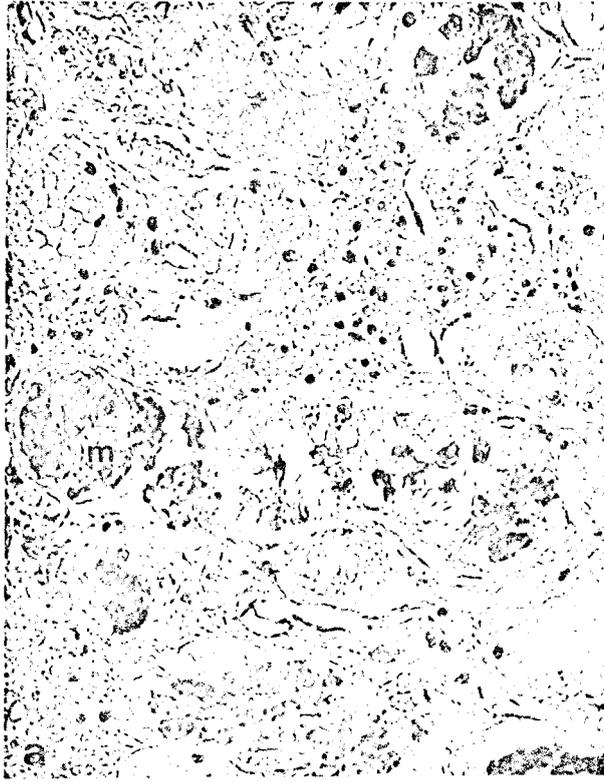
7) Affinité de la lectine de la Fève-Jack pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

Après fixation de la muqueuse bronchique par le mélange de Carnoy ou le Bouin Alcoolique, la lectine de la Fève-Jack ou concanavoline A permet de colorer intégralement le cytoplasme des cellules séreuses. Les cellules caliciformes et muqueuses ne sont pas colorées (fig. 28). Aucune cellule n'est mise en évidence après fixation par le formol. Il est à noter que, quelque soit le fixateur, le tissu conjonctif est coloré. La substance intracellulaire du cartilage hyalin entourant les chondrocytes est également mise en évidence. (Tableau XXVII).

L'addition préalable à la solution de lectine d' α méthyl-mannopyranoside (0,2 M) empêche la révélation des cellules séreuses du tissu conjonctif et du tissu cartilagineux.

8) Affinité de la lectine de limule (Limuline) pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine :

L'emploi de la limuline couplée à la peroxydase permet sur des coupes de la muqueuse bronchique fixées dans le Carnoy (fig. 29) (tableau XXVII) de colorer la partie apicale des cellules caliciformes de l'épithélium bronchique où la coloration apparaît diffuse. Elle colore également les cellules séreuses



BUS
LILLE

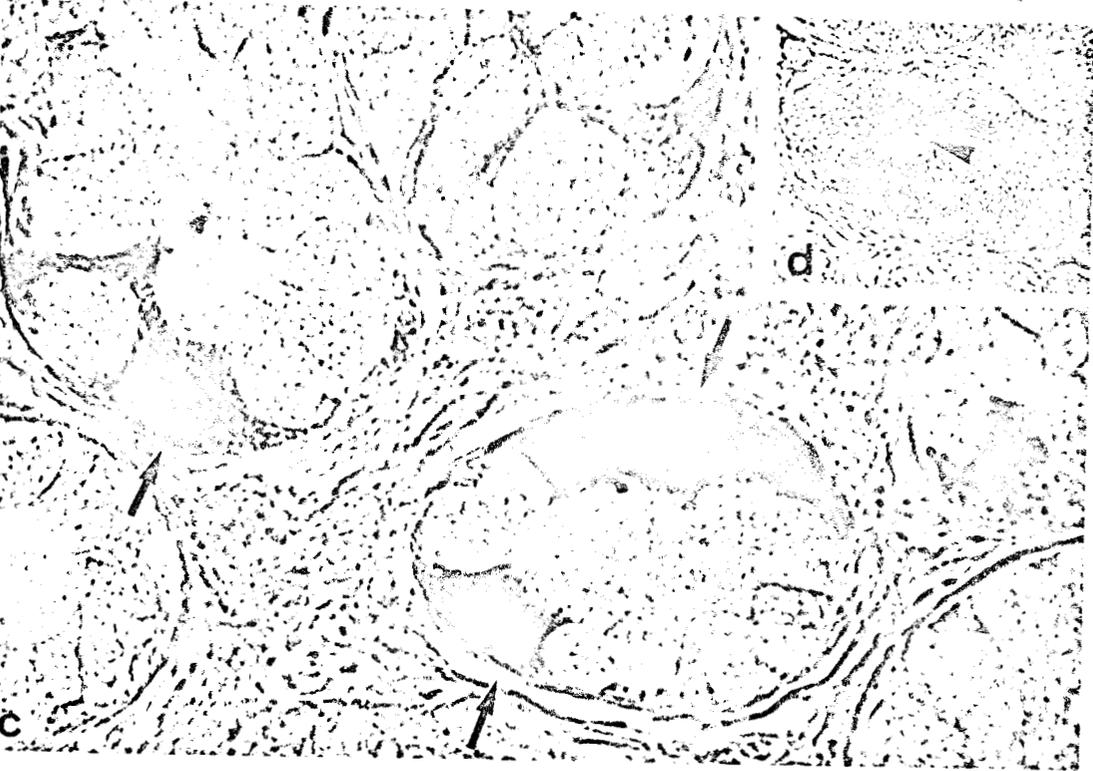
qui sont souvent associées pour former les croissants de GIANUZZI. Le marquage apparait sous la forme de petits granules situés soit au pôle apical, soit dans tout le cytoplasme de la cellule. Le noyau des différentes cellules n'est jamais coloré ; les cellules muqueuses, le tissu conjonctif et le tissu cartilagineux ne sont jamais marqués.

Les coupes fixées dans le Bouin alcoolique et la solution de paraformaldehyde n'ont pas été incubées avec cette lectine.

L'addition préalable d'acide N-acétyl-neuraminique (0,2 M) à la solution de lectines avant l'incubation des coupes ne permet plus de révéler les différents types cellulaires.

L'absence de réactivité des cellules muqueuses de la sous-muqueuse bronchique à la lectine de la limuline nous a amené à utiliser l'action d'une neuraminidase sur le tissu fixé dans le Carnoy et à comparer des coupes de tissu colorées par la double coloration bleu alcian-PAS avant et après action de cet enzyme. Sans action préalable de la neuraminidase, les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique, les cellules muqueuses et séreuses sont préférentiellement colorées en bleu. Après action de la neuraminidase, les cellules caliciformes sont toujours colorées en bleu, mais dans les cellules muqueuses et les cellules séreuses, il y a prédominance de la coloration rouge sur la coloration bleue, démontrant ainsi avant action de la neuraminidase, la présence d'acide sialique au niveau des cellules muqueuses et séreuses.

Ces résultats démontrent donc la présence d'acide sialique dans les cellules muqueuses qui ne présentent aucune affinité pour la limuline.



BHS
LILLE

C - LOCALISATION DE LA BRONCHO-TRANSFERRINE :

Par chromatographie d'affinité, réalisée avec les lectines de Ricinus communis, on a pu montrer qu'à côté des mucines bronchiques, il existait d'autres glycoprotéines de la sécrétion bronchique ayant une affinité pour les lectines de Ricin, notamment, la broncho-transferrine, l' α 1 antichymotrypsine et la chaîne α des immunoglobulines A. En utilisant un immunsérum anti-lactotransferrine sur des coupes initialement fixées dans le mélange de Carnoy, on trouve que la broncho-transferrine est localisée dans le cytoplasme des cellules séreuses de la sous-muqueuse bronchique. Les glandes muqueuses et les cellules caliciformes ne sont pas marquées, par contre, les cellules situées entre les acini sont intensément marquées ainsi que le tissu conjonctif (fig. 28). Lorsque le sérum antilactotransferrine est préalablement épuisé par une préparation riche en lactotransferrine, le marquage des cellules séreuses n'apparaît pas.

CONCLUSIONS

L'étude de l'affinité de différentes lectines pour une muqueuse bronchique humaine "saine" prélevée chez un sujet de groupe sanguin A , a permis de montrer qu'il existait des sites de fixation variables suivant les lectines. Dans un premier temps, cette étude a fait apparaître l'importance de la fixation du tissu bronchique.

I - Le formol, un des fixateurs généralement le plus employé, dans les études de microscopie optique, peut extraire des glycoconjugués au niveau cellulaire. Par contre, le fixateur de Carnoy et le Bouin alcoolique dans lesquels les mucines bronchiques sont, soit peu solubles (Bouin alcoolique), soit insolubles (Carnoy) donnent des résultats plus intéressants. Après utilisation de l'un de ces deux types de fixation, on remarque notamment que les cellules bronchiques sont bien colorées par le P.A.S. et le bleu alcian, avec une intensité moindre, cependant, après fixation par le Bouin alcoolique, La coloration est très faible après fixation par le formol. On peut également signaler que l'emploi d'un fixateur à base de formol et de glutaraldehyde donnait des résultats encore moins satisfaisants. Néanmoins, l'étude de l'affinité des différentes lectines pour les cellules de la muqueuse bronchique humaine a été effectuée en utilisant les fixations par le formol, le Bouin alcoolique ou le mélange de

Carnoy. En effet, bien que la supériorité du Carnoy soit évidente, il paraissait intéressant de voir si l'extraction plus ou moins importante produite par les deux autres fixateurs ne permettait pas de démasquer des sites spécifiques pour les lectines.

II - Les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique réagissent dans leur partie apicale avec les lectines de genêt épineux et de lotier qui ont une affinité pour le fucose. Elles réagissent également avec la lectine du germe de blé qui a surtout une affinité pour la N-acétyl-glucosamine et non pas pour l'acide N-acétyl-neuraminique, différence d'affinité mise en évidence par les tests d'inhibition de l'hémagglutination réalisés à l'aide de plusieurs mucines. La partie apicale des cellules caliciformes réagit avec les lectines de ricin et la lectine de soja. On peut donc penser que du galactose est présent dans ces cellules, mais aussi de la N-acétyl-galactosamine, puisque la muqueuse bronchique étudiée a été prélevée chez un sujet de groupe sanguin A, dont on sait que les glycoprotéines douées d'activité de groupe sanguin A, ont un certain nombre de résidus de N-acétyl-galactosamine à la périphérie de leur chaînes glycaniques. Les cellules caliciformes ne réagissent pas avec la lectine de cacahuète. Ceci n'est pas étonnant puisque cette lectine n'est pas capable de se fixer sur des molécules sialidées (LOTAN et Coll., 1975). Or les cellules caliciformes sont riches en acide N-acétyl-neuraminique (JONES et REID, 1973). De plus, la partie apicale des cellules caliciformes réagit avec la limuline qui a une spécificité pour l'acide sialique, ce qui confirme la présence de molécules sialidées dans ces cellules. Enfin, les cellules caliciformes ne réagissent pas avec la concanavaleine A.

III - La partie apicale des cellules muqueuses réagit aussi avec les lec-

tines de genêt épineux, de lotier et de germe de blé. Les cellules muqueuses réagissent, au niveau de leur apex avec les lectines de soja, et de cacahuète (faiblement). Elles réagissent uniformément avec les lectines du ricin. Ces différences d'affinité des lectines qui ont une spécificité pour le galactose sont certainement liées à la présence de résidus acides. Les tests d'inhibition de l'hémagglutination ont, en effet, montré que les mucines acides étaient capables de réagir avec les lectines du ricin. Au contraire, les mucines les plus acides ne réagissent pas avec les lectines de cacahuète et de soja, tandis que les mucines neutres ou faiblement acides réagissent. On peut donc penser que les lectines du ricin révèlent la présence de galactose au sein de molécules d'acidité variable réparties dans toute la cellule alors que les deux lectines de cacahuète et de soja mettent en évidence des molécules moins acides, situées à l'apex de la cellule. Les cellules muqueuses ne réagissent pas avec la limuline qui a une affinité pour l'acide sialique. Ce résultat est surprenant, car on sait que les cellules muqueuses contiennent de l'acide sialique (LAMB et REID, 1969). La présence d'acide sialique au sein de ces cellules peut aussi expliquer la faible réaction avec la lectine de cacahuète. De plus, l'action d'une neuraminidase sur le tissu bronchique humain a permis, après coloration histochimique, de mettre en évidence de l'acide N-acétyl-neuraminique au sein de ces cellules. On peut donc penser que les résidus d'acide N-acétyl-neuraminique présents dans ce type cellulaire ne sont pas accessibles à la limuline, peut-être parce qu'ils sont masqués, ou encore, parce que l'acide sialique contenu dans les glycoprotéines des cellules muqueuses est lié à la chaîne glycanique par une liaison non reconnue par la limuline.

Les cellules muqueuses ne réagissent pas non plus avec la concanavaleine A.

IV - Le cytoplasme des cellules séreuses de la muqueuse bronchique humaine réagit fortement avec la lectine de lotier et plus faiblement avec la lectine de genêt épineux. Il réagit aussi avec les deux lectines du ricin et la lectine de soja qui ont une affinité pour le galactose et (ou) la N-acétyl-galactosamine. De plus, le cytoplasme des cellules séreuses réagit assez fortement avec la lectine de cacahuète montrant ainsi la présence de galactose au sein de molécules probablement non sialidées. Cependant, il existe dans les cellules séreuses des molécules contenant de l'acide N-acétyl-neuraminique (LAMB et REID, 1970) ; ces cellules réagissent également avec la limuline. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la sécrétion bronchique humaine contient, en plus des mucines bronchiques, d'autres glycoprotéines sialidées (LAINE et HAYEM, 1976). Les cellules séreuses réagissent aussi avec la concanavaline A qui a surtout une affinité pour le mannose; or la sécrétion bronchique humaine renferme des glycoprotéines à mannose (HAVEZ et Coll., 1973). Le marquage à l'intérieur du cytoplasme des cellules séreuses se présente toujours sous la forme de petits grains parmi lesquels des structures antigéniques analogues à la broncho-transferrine ont été mises en évidence.

V - Il faut aussi remarquer que l'absence de révélation d'un type cellulaire ne permet pas d'exclure l'absence des sucres spécifiques des lectines au sein des cellules.

En effet, les résultats obtenus avec les différentes mucines bronchiques humaines ont montré qu'il pouvait exister des phénomènes de répulsion entre les mucines acides et certaines lectines, elles-mêmes acides. Les phénomènes disparaissent après désialidation des mucines.

De même, il peut exister des phénomènes d'encom-

brements stériques d'autant plus qu'il a été montré que les lectines de cacahuète (LOTAN et Coll., 1975) de la Fève-Jack (SO et GOLDSTEIN, 1968) et de germe de blé (ALLEN et Coll., 1973) avaient un site de fixation étendu. On sait d'autre part, que des lipides sont capables de venir se lier aux mucines bronchiques et d'empêcher ainsi leur réaction avec les lectines du ricin.

VI - Enfin, les glycoconjugués mis en évidence in situ dans le tissu bronchique, peuvent correspondre aux produits de sécrétion en cours de synthèse.

L'étude de l'affinité des différentes lectines pour la muqueuse bronchique humaine "saine" prélevée chez un malade de groupe sanguin A a donc permis de localiser certaines structures glycaniques au sein des différents types cellulaires impliqués dans la biosynthèse des glycoprotéines de la sécrétion bronchique.

Les résultats obtenus permettent de différencier principalement les cellules caliciformes, muqueuses et séreuses au moyen de la limuline, de la concanavaline A et de la lectine de cacahuète.

Les différentes lectines qui ont une affinité pour la plupart des mucines bronchiques isolées de l'expectoration ont aussi une affinité pour les cellules caliciformes et les cellules muqueuses de la muqueuse bronchique humaine. Cette constatation est donc en faveur de la synthèse de ces molécules dans les deux types cellulaires. Toutefois, la limuline qui a une affinité pour les cellules caliciformes et pas

d'affinité pour les cellules muqueuses n'a pas pu être utilisée, faute de matériel, pour l'étude des mucines bronchiques humaines. Peut-être la réalisation d'une chromatographie d'affinité à l'aide de cette lectine permettrait-elle de distinguer parmi les mucines bronchiques acides celles qui sont synthétisées par les cellules muqueuses et celles qui sont produites par les cellules caliciformes.

Enfin, l'étude de l'affinité des lectines pour la muqueuse bronchique humaine a permis de définir une méthodologie qui pourra être appliquée à la muqueuse bronchique dans différentes circonstances physiologiques ou pathologiques. Pour réaliser une étude véritablement comparative des mucines et de la muqueuse bronchique, il faudra tenir compte dans l'avenir du caractère sécréteur ou non sécréteur et de l'état physiologique ou pathologique du sujet étudié.

CONCLUSIONS GENERALES

- 1 - Ce travail a d'abord permis de préciser la classification chimique des mucines bronchiques isolées de l'expectoration de cinq malades atteints de bronchite chronique (2 sujets de groupe sanguin A, et 3 sujets de groupe sanguin O).

Par chromatographie d'échange ionique sur colonne d'Écteola-cellulose, on constate que les mucines bronchiques purifiées à partir de l'expectoration correspondent à une population de molécules d'acidité très diverse qui se subdivisent en plusieurs groupes dont certains caractères (degré de glycosylation et longueur moyenne de chaînes glycaniques) ont pu être estimés pour les molécules isolées des sécrétions de sujets de groupe sanguin O.

- Les mucines neutres sont pauvres en résidus acides (acide N-acétyl-neuraminique et groupements sulfate). Elles seraient faiblement glycosylées (30 chaînes pour 100 acides aminés) et la longueur moyenne des chaînes glycaniques serait de 5,7 à 8,5 résidus de sucres.

- Les mucines acides se distinguent selon leur teneur relative en acide sialique et en sulfate, en mucines sialidées et en mucin-

nes sulfatées.

. les mucines sialidées seraient les molécules les plus glycosylées (35 à 50 chaînes pour 100 acides aminés) et la longueur moyenne des chaînes glycaniques serait de 4,9 à 5,6 résidus de sucres.

. les mucines sulfatées seraient moins glycosylées (30 à 35 chaînes pour 100 acides aminés) et la longueur moyenne des chaînes glycaniques serait de 6,8 à 9,6 résidus de sucres.

- Les mucines légèrement acides sont des molécules intermédiaires entre les mucines neutres et les mucines acides.

2 - Les mucines obtenues par lavages bronchiques réalisés dans des zones macroscopiquement saines de l'arbre bronchique de sujets de groupe sanguin O, sont des molécules principalement sialidées et que leur degré de glycosylation et leur longueur moyenne de chaînes glycaniques apparentent aux mucines sialidées, isolées de l'expectoration des malades adultes atteints de bronchite chronique.

Ce résultat permet de suggérer que les molécules neutres ou sulfatées isolées de l'expectoration des sujets atteints de bronchite chronique sont des molécules pathologiques.

3 - L'étude des propriétés immunologiques des mucines bronchiques neutres a permis de souligner la difficulté à purifier ces molécules.

- les mucines neutres exercent à l'égard des traces de protéines qui les contaminent ou de certaines protéines sériques, un rôle d'adjuvant immunitaire.

- Elles sont antigéniques pour le lapin et leur site antigénique est localisé au voisinage de la partie C-terminale, peu glycosylée, de l'axe polypeptidique.

Ce site est retrouvé dans les cellules muqueuses de la muqueuse bronchique humaine.

4 - L'étude de l'affinité de différentes lectines pour les différents types de mucines isolées chez des malades atteints de bronchite chronique a permis plusieurs constatations :

- les mucines synthétisées par un sujet non sécréteur ne réagissent pas avec les lectines de genêt épineux et de soja, contrairement à la plupart des mucines de sujets sécréteurs.

- contrairement aux mucines neutres ou faiblement acides, les mucines les plus acides, notamment en raison de leur teneur en acide sialique ne réagissent pas avec certaines lectines (lotier, soja, cacahuète).

- la fixation de lipides sur certaines mucines bronchiques (peut-être sur des régions particulièrement hydrophobes) peut empêcher l'affinité de ces molécules pour les lectines de ricin.

5 - L'utilisation de lectines permet aussi de distinguer les différents types cellulaires impliqués dans la sécrétion bronchique.

L'affinité de certaines lectines d'une part pour les cellules caliciformes et les cellules muqueuses et d'autre part, pour la majeure partie des mucines suggèrent que ces deux types cellulaires sont à l'origine de la synthèse des mucines bronchiques.

Une méthodologie a été mise au point qui permettra peut-être, dans l'avenir, de définir la sécrétion des cellules caliciformes et celle des cellules muqueuses. Elle pourra être aussi utilisée pour la comparaison de différents états pathologiques et de l'état physiologique ou pour la surveillance de l'effet de certains agents pharmacodynamiques sur la muqueuse bronchique humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMS M.E. et TAYLOR F.B., 1964
Physiologist, 7, 78-78

- ABRAMS M.E., 1966
J. Appl. Physiol., 21, 718-720

- AGRAWAL B.B. et GOLDSTEIN I.J., 1972
Methods in enzymology, 28, 313-318

- ALLEN A.K., NEUBERGER A. et SHARON N., 1973
Biochem J., 131, 155-162

- ASSELAIN R., UZZAN D., ROUSSEL P. et DEGAND P., 1968
"Hypersécrétion Bronchique" R.Poinsont Impr., Clichy, 101-113

- BERNHARD W. et AVRAMEAS S., 1971
Expt. Cell. Res., 64, 232-236

- BISERTE G., HAVEZ R. et CUVELIER R., 1963
Exp. Ann. Bioch. Med., 24, 85-120

- BOYD W.C. et SHAPLEIGH E., 1954 a
Blood, 9, 1195-1198

- BOYD W.C. et SHAPLEIGH E., 1954 b
J. Lab. Clin. Med., 44, 235-237

- BROGAN T.D., 1959
Biochem J., 71, 125-131

- BROGAN T.D., RYLEY H.C., ALLEN L. et HUTT H., 1971
Thorax, 26, 418-423

- BURGER M.M., 1969
Proc. Nat. Acad. Sci. US, 62, 994-1001

- BURGI H., 1964
Med. Thorac., 21, 156-167

- CASSIDY J.T., JOURDAIN G.W. et ROSEMAN S., 1965
J. Biol. Chem., 240, 3501-3506

- CIFONELLI J.A., MONTGOMERY R. et SMITH F., 1956
J. Amer. Chem. Soc., 78, 2485-2488

- CIFONELLI J.A., REBERS P., PERRY M.B. et JONES J.K., 1966
Biochemistry, 5, 3066-3072

- CLINE M.J. et LINVINGSTON D.C., 1971
Nature, 232, 155-156

- GREETH J.M. et KNIGHT C.G., 1967
Biochem J., 105, 1135-1145

- DEGAND P., 1972
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Lille,

- DEGAND P., RUFFIN P., LAMBLIN G. et HAVEZ R., 1973
C.R. Acad. Sc. (Paris), 276, 113-116

- DEGAND P., ROUSSEL P. et LAMBLIN G., 1974
Clin. Chim. Acta, 50, 223-236

- DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. et BISERTE G., 1965
Bull. Soc. Chim. France, 12, 3506-3511

- DONALD A.S.R., 1973
Biochim. Biophys. Acta, 317, 420-436

- FINLEY T. N., CONLEY G.R., HUBER G.L. et LADMAN A.J., 1968
Clinical Research, 14, 365-365

- FINLEY T.N., PRATT S.A., LADMAN A.J., BREWER L. et
Mc KAY M.B., 1968
J. Lipid. Res., 9, 357-358

- FUNATSU M., FUNATSU G., ISHIGURO M., NANNO S., et HARA.K.,
1971 a
Proc. Japan Acad., 47, 713-717

- FUNATSU M., FUNATSU G., ISHIGURO M., NANNO S. et
HARA K., 1971 b
Proc. Japan Acad., 47, 718-723

- FUNATSU M, FUNATSU G., ISHIGURO M., et HARA K., 1971 c
Proc. Japan Acad., 47, 786-796

- GERNEZ-RIEUX Ch., BISERTE G., HAVEZ R., VOISIN C.,
ROUSSEL P. et DEGAND P., 1964
Acta Tuberc. Pneumol. Belg., 55, 138-164

- GOLDSTEIN I. J., HOLLERMAN E. et MERRICK J. M., 1965
Biochim. Biophys. Acta, 97, 68-76

- GOLDSTEIN I. J. et SO L. L., 1965
Arch. Biochim. Biophys., 111, 407-414

- GOLDSTEIN I. J., PORETZ R. D., SO L. L., et YANG Y., 1968
Arch. Biochim. Biophys., 127, 787-794

- GOLDSTEIN I. J. et STAUB A. M., 1970
Immunochemistry 7, 135-140

- GORDON J. A., BLUMBERG S., LIS H. et SHARON N., 1972
Febs Lett, 24, 193-196

- GOTTSCHALK A., SCHAUER H. et UHLENBRUCK G., 1971
Z. Physiol. Chem., 352, 117-124

- GREENAWAY P. J. et LEVINE D., 1973
Nature, 241, 191-192

- GURTNER L. G. et HORSTMANN H. J., 1973
Biochim. Biophys. Acta, 295, 582-594

- HARBO E. M., SALTVEDT E., CLOSS O. et OLSNES S., 1975
Scand. J. Immunol., 4, suppl. 2, 125-134

- HARLAN N. R., MARGRAF J. H., et SAID S. I., 1966
Am. J. Physiol., 211, 855-861

- HAUROWITZ F., 1968
Immunochimistry and the biosynthesis of antibodies, 199-231,
Interscience, Publishers New-York, London, Sidney

- HAVEZ R., DEMINATTI M., ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A.
et BISERTE G., 1967
Clin. Chim. Acta., 17, 463-477

- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A. et BISERTE G.
1969a
Protides of Biological Fluids (H. Peeters ed.), Pergamon Press.
343-360

- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., DELMAS-MARSALET Y.
et BISERTE G., 1969b
Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 245-259

- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P. et LAMBLIN G., 1973
Exp. Annu. Bioch. Med., 32, 121-148

- INBAR M. et SACHS L., 1969
Nature, 223, 710-712

- JEANLOZ R. W. , 1972
Glycoproteins (Gottschalk A. ed.) 565-611, Elsevier, New-York N. Y.

- JONES R. et REID L. , 1973
Histochem. J. , 5, 9-18

- LAINE A. et HAYEM A. , 1976
Clin. Chim. Acta, 67, 159-167

- LAMB D. , 1968
"Hypersécrétion bronchique" R. Poinson, Impr. Clichy, 143-153

- LAMB D. et REID L. , 1968
"Hypersécrétion bronchique", R. Poinson Impr. Clichy, 11-22

- LAMB D. et REID L. , 1969
J. of Pathol. , 98, 213-229

- LAMB D. et REID L. , 1970
J. of Pathol. , 100, 127- 138

- LAMBLIN G. , DEGAND P. , ROUSSEL P. , HAVEZ R. , HARTEMANN E. et FILLIAT M. , 1972
Clin. Chim. Acta, 36, 329-340

- LEON M. A. , 1967
Science, 158, 1325-1326

- LHERMITTE M. , 1972
Dea Biochimie, Lille

- LHERMITTE M., LAMBLIN G., DEGAND P. et ROUSSEL P., 1975
Biochimie, 57, 1293-1299

- LIEBERMAN J. et KORNICK M.B., 1964
J. Clin. Invest., 43, 1892-1904

- LIEBERMAN J., TRIMMER B. M. et KORNICK M.B., 1965
Lab. Invest., 14, 249-257

- LIS H., SELA B., SACHS L., et SHARON N., 1970
Biochim. Biophys. Acta, 211, 582-585

- LIS H. et SHARON N., 1973
Annu. Rev. Biochem., 42, 541-574

- LLOYD K. O., KABAT E. A. et BEYCHOK S., 1969
J. Immunol., 102, 1354-1362

- LORENZ T. H., KORST D., SIMPSON J. F. et MUSSER M. J., 1957
J. Lab. Clin. Med., 49, 145-150

- LOTAN R., SKUTELSKY E., DANON D. et SHARON N., 1975
J. Biol. Chem., 250, 8518-8523

- MARCHESI V. T., TILLACK T. W., JACKSON R. L., SEGREST J. P.
et SCOTT R. E., 1972
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1445-1449

- MASSON P. L., et HEREMANS J. F., 1966
Biochim. Biophys. Acta, 120, 172-173

- MATSUMOTO I. et OSAWA T., 1969
Biochim. Biophys. Acta, 194, 180-189

- MAURER H., 1968
"Hypersécrétion bronchique" R. Poinot Impr. Clichy, 279-287

- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., 1960
Biochim. Biophys. Acta, 45, 413-421

- MORGAN W. T. J. et WATKINS W. M., 1953
Brit. J. Exp. Pathol., 34, 94-103

- MORGAN T. E., FINLEY T. N. et FIALKOW H., 1965
Biochim. Biophys. Acta, 106, 403-413

- NAGATA Y. et BURGER M. M., 1972
J. Biol. Chem., 247, 2248-2250

- NAPIER P. W., EVERHART D. L. et GRUNDBACHER, 1974
Vox. Sanguinis, 27, 447-458

- NEWMAN W. et KABAT E. A., 1976a
Arch. Biochem. Biophys., 172, 510-523

- NEWMAN W. et KABAT E. A., 1976b
Arch. Biochem. Biophys., 172, 524-534

- NICOLSON G. L., 1974a
International Review of Cytology (Bourne et Danielli ed.)
Academic Press, New-York, San Francisco, London, 89-190

- NICOLSON G. L., BLAUSTEIN J. et ETZLER M. E., 1974b
Biochemistry, 13, 196-204

- OLSNES S., REFSNES K. et PIHL A., 1974
Nature, 249, 627-631

- OSAWA T. et MATSUMOTO I., 1972
Methods in Enzymology, 28, 323-327

- OZANNE B. et SAMBROOK J., 1971
Nature, 232, 156-160

- PEREIRA M. E., KABAT E. A. et SHARON N., 1974
Carbohy. Res. 37, 89-102

- PEREIRA M. E. et KABAT E. A., 1976
J. of Exp. Med., 143, 422-436

- PODDER S. K., SUROLIA A. et BACHAWAT B. K., 1974
Eur. J. Biochem., 44, 151-160

- PUSZTAI A. et MORGAN W. T. J., 1961
Biochem. J., 21, 639-647

- REEDER W. J. et EKSTEDT R. D., 1971
J. Immunol., 106, 334-340

- REID L. et DEHALLER R., 1967
Med. Probl. Pediat., 10, 195-199

- REID L., 1974
Scand. J. Resp. Diseases, 90, 9-14

- RHODIN J.A., 1966
Am. Rev. Respi. Dis., 93, 1-15

- ROBERTS G.P., 1974
Eur. J. Biochem., 50, 265-280

- ROBERTS G.P., 1976
Arch. Biochim. Biophys., 173, 528-537

- ROCHE A.C., SCHAUER R., et MONSIGNY M., 1975
Febs Lett, 57, 245-250

- ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A., MOSCHETTO Y.,
HERMIER M. et HAVEZ R., 1968
"Hypersécrétion bronchique" R. Poinson Impr., Clichy, 155-162

- ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A. et HAVEZ R., 1971
Prog. Resp. Res., 6, 15-28

- ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P. et HAVEZ R., 1972
Clin. Chim. Acta, 36, 315-328

- ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P., WALKER- NASIR
et JEANLOZ R.W., 1975
J. Biol. Chem., 250, 2114-2122

- RYLEY H.C. et BROGAN T.D., 1968
Br. J. exp. Pathol., 49, 625-633

- RYLEY H. C. , 1970
J. Lab. Clin. Med. , 75, 382-390

- RYLEY H. C. , 1972
Biochim. , Biophys. Acta , 270, 300-309

- RYLEY H. C. et BROGAN T. D. , 1973
J. Clin. Pathol. , 26, 852-856

- SCHROEDER W. E. , 1972
Methods Enzymol. (Hirs, C and Timascheff S. ed.)
25, 138-143
Academic Press New-York, and London

- SCHULTZE H. E. et HEREMANS J. F. , 1966
The proteins of respiratory secretions. Elsevier Publishing Company
Amsterdam, London, Nex-York, 816-831

- SHARON N. et LIS H. , 1972
Science , 177, 949-959

- SLOWEY S. , EIDELMAN S. et KLEBANOFF S. J. , 1968
J. Bacteriol. , 96, 575-579

- SO L. L. et GOLDSTEIN I. J. , 1968
J. Biol. Chem. , 243, 2003-2007

- SO L. L. et GOLDSTEIN I. J. , 1969
Carbohy. Res. , 10, 231-244

- SPIRO R.G., et BHOYROO V.D., 1974
J. Biol. Chem., 249, 5704-5717

- SPRINGER G.F. et WILLIAMSON P., 1962
Biochem. J., 85, 282-291

- SPRINGER G.F. et DESAI P.R., 1974
Biochim. Biophys. Res. Commun., 61, 420-425

- SUMMER J.B. et HOWELL S.F., 1936
J. Bacteriol., 32, 227-237

- SZULMAN A.E., 1960
J. Exptal. Med., 111, 785-799

- TETTAMANTI G. et PIGMAN W., 1968
Arch. Biochem. Biophys., 124, 41-50

- TKACZ J.S., CYBULSKA E.B. et LAMPEN J.O., 1971
J. Immunol., 105, 1-8

- TOMITA M., KUROKAWA T., ONOZAKI K., ICHIKI N., OSAWA T.
et UKITA T., 1972
Experientia, 28; 84-85

- VRET BLAD P., 1976
Biochim. Biophys. Acta, 434, 169-176

- WALDSCHMIDT-LEITZ E. et KELLER L., 1970
Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem., 351, 990-994

- WAREMBOURG H., HAVEZ R., SEZILLE G., SCHERPEREEL P.,
ROUSSEL P. et DEGAND P., 1968
"Hypersécrétion bronchique" R. Poinson Impr. Clichy, 181-192
- WATKINS W. M. et MORGAN W. T. J., 1962
Vox. Sanguinis, 7, 129-150
- WATKINS W. M., 1972
Glycoproteins (GOTTSCHALK ed.) 1, 830-891
Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New-York
- WHITE J. C., ELMES P. C. et WALSH A., 1954
J. Path. Bacteriol., 67, 105-108
- YARIV J., KALB J. et BLUMBERG S., 1972
Methods in enzymology (GINSBURG V. Ed.) 28, 356-360
Academic Press New-York, and London

APPENDICE TECHNIQUE

APPENDICE TECHNIQUE

I - TECHNIQUE DE PURIFICATION DES MUCINES	T1
A - A partir du mucus bronchique fibrillaire de sujets atteints de bronchite chronique	T1
1) Préparation du mucus fibrillaire	
2) Réduction du mucus fibrillaire	
B - A partir des liquides lavages bronchiques	T2
1) Obtention des liquides lavages bronchiques	
2) Réduction du produit des lavages bronchiques	
C - Chromatographie d'échange ionique sur colonne d'Ecteola-Cellulose	T3
1) Préparation de l'échangeur et montage de la colonne	
2) Conditions d'élution	
D - Chromatographie de gel filtration	T5
D - Chromatographie sur colonne de Carboxy-méthyl-cellulose	T6
1) Préparation de l'échangeur et de la colonne	
2) Chromatographie	
II - ETUDES ELECTROPHORETIQUES	T7
A - Electrophorèse en agarose	T7
B - Electrophorèse sur acétate de cellulose	T7
C - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	T8

III - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE :	T8
A - Préparation des immunsérums	T8
1) Immunsérums anti-mucines S6B ou anti-mucines A1	
2) Purification des immunsérums anti-mucines S6B ou anti-A1 par saturation	
a - éléments utilisés pour la saturation des immunsérums	
b - mode opératoire	
. épuisement par les protéides	
. épuisement par les globules rouges	
B - Utilisation d'immunsérums commerciaux	T9
C - Immunoélectrophorèse simple	T9
D - Immunoélectrophorèse en double dimension	T10
IV - INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION	T12
V - ULTRACENTRIFUGATION	T13
A - Détermination du coefficient de sédimentation	T13
B - Détermination du poids moléculaire	T13
VI - METHODE D'ETUDE DES GLUCIDES ET DES GROUPEMENTS SULFATE	T14
A - Repérage des oses par la méthode automatique de dosage à l'orcinol	T14

B - Analyse de la composition glucidique par chromatographie en phase gazeuse	T14
1) Méthanolyse	
2) N-acétylation et de-O-acétylation	
a - N-acétylation	
b - dé -O-acétylation	
3) Tri-méthyl-silylation	
4) Libération des osamines dans le cas des lectines du ricin	
5) Standard interne	
6) Chromatographie en phase gazeuse	
C - Dosage de l'acide sialique	T16
D - Groupement sulfate	T16
E - Oxydation periodique	T16
F - Action de la galactose-oxydase et oxydation par le brome	T17
VII - METHODES D'ETUDE DES ACIDES AMINES	T17
A - Methode automatique de repérage des acides aminés et des peptides par réaction à la ninhydrine	T17
B - Détermination de la composition en acides aminés	T18
1) Hydrolyse	
2) Analyse des acides aminés sur auto-analyseur	

C - Détermination des acides aminés en position N-terminale	T19
D - Détermination des acides aminés en position C-terminale	T20
E - Dosage de la cystéine sous forme d'acide cystéique après oxydation performique	T20
VIII - REDUCTION ET ALKYLATION D'UNE MUCINE BRONCHIQUE	T20
IX - HYDROLYSES ENZYMATIQUES	T21
A - Hydrolyse trypsique	T21
B - Hydrolyse papainique et pronasique	T21
C - Hydrolyse pronasique	T22
X - METHODES D'ETUDE DES LIPIDES	T22
XI - TECHNIQUES DE PREPARATION ET MESURE DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DES LECTINES	T22
A - Préparation des lectines du ricin	T23
1) Broyage des graines et fractionnement au sulfate d'ammonium	
2) Chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B	
3) Fractionnement des lectines du ricin	
4) Purification des lectines du ricin	

- B - Préparation de la lectine à fucose du genêt épineux T24
- 1) Broyage des graines et fractionnement par le sulfate d'ammonium
 - 2) Chromatographie d'affinité sur une colonne d'exoxy-Sepharose couplé à du L-Fucose
 - a - Préparation de la colonne
 - b - Chromatographie d'affinité
- C - Préparation de la lectine de cacahuète T26
- 1) Broyage des graines et fractionnement au sulfate d'ammonium
 - 2) Chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose N- ϵ -aminocaproyl -D-galacto-pyrano-sylamine
- D - Détermination de l'activité hémagglutinante des lectines T27
- 1) Préparation des globules
 - 2) Titration des lectines

- XII - METHODE D'ETUDE DE L'AFFINITE DES LECTINES POUR LES MUCINES T28
- A - Affino-électrophorèse bidimensionnelle T28
- B - Affino-diffusion T29
- C - Inhibition de l'hémagglutination T29
- D - Chromatographie d'affinité sur colonne de Sephadex G25-lectines du ricin T30

- 1) Fixation des lectines de ricin sur Sephadex G25
- 2) Chromatographie d'affinité sur la colonne Sephadex G25-lectines de ricin

XIII - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	T31
A - Prélèvement du tissu	T31
B - Fixation du tissu	T31
1) Fixation dans le mélange de Bouin-Hollande-Erlant	
2) Fixation dans le mélange de Carnoy	
3) Fixation dans le Bouin Alcoolique	
4) Fixation dans le formol	
C - Préparation des coupes	T32
D - Techniques histochimiques	T32
1) Coloration par le réactif de Schiff après oxydation periodique (PAS)	
2) Coloration par le bleu alcian à différents pH	
3) Double coloration par le bleu alcian à pH 2, 5 et par le réactif de Schiff après oxydation periodique	
4) Action de la sialidase de Diplococcus Pneumoniae	
E - Techniques d'immunofluorescence	T34
1) Révélation directe	
a - couplage de l'immunsérum anti-A1 avec de l'isothiocyanate de fluoresceine	
b - révélation	

2) Révélation indirecte

F - Immunohistochimie

T35

G - Révélation de l'affinité tissulaire des lectines à l'aide
de la peroxydase

T36

1) Technique de marquage des lectines à la peroxydase

2) Technique d'épuisement des lectines marquées à la
peroxydase

3) Réaction des lectines avec le tissu bronchique

4) Révélation de la peroxydase

BIBLIOGRAPHIE

I - TECHNIQUE DE PURIFICATION DES MUCINES :

A - A PARTIR DU MUCUS BRONCHIQUE FIBRILLAIRE DE SUJETS
ATTEINTS DE BRONCHIQUE CHRONIQUE :

1) Préparation du mucus fibrillaire :

L'expectoration de cinq malades atteints de bronchite chronique est collectée tous les jours et congelée jusqu'au moment de l'emploi. Après décongélation, les échantillons sont rassemblés et lavés pendant une heure avec trois volumes de sérum physiologique. Le mélange est alors centrifugé pendant 20 min à 4 000g : on élimine le surnageant et on lyophilise le culot.

2) Réduction du mucus fibrillaire :

Le mucus fibrillaire lyophilisé est mis en suspension dans un tampon phosphate de sodium 0,075 M de pH 7,3 (10 g de mucus dans un litre de tampon) et agité pendant une nuit à 4°C. On ajoute ensuite du mercapto-éthanol pour avoir une concentration finale de 1 % (v/v) et le mélange est alors mis en agitation pendant 4 heures à 37°C. Après centrifugation du mucus réduit à 4 000 g pendant 20 min, on élimine le précipité et on dialyse le surnageant pendant trois jours à 4°C contre de l'eau distillée (2 changements par jour). La préparation dialysée est alors lyophilisée.

B - A PARTIR DES LIQUIDES DE LAVAGES BRONCHIQUES :

1) Obtention des liquides de lavages bronchiques :

Deux sortes de lavages bronchiques ont été réalisés :

- a - Des lavages bronchiques ont été réalisés chez 5 sujets (3 sujets de groupe sanguin O, un de groupe sanguin A et un de groupe sanguin B). Ils ont été effectués sous fibroscopie par instillation dans les bronches ventrale moyenne et lobaire inférieure droites d'une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000 contenant de la N-acétyl-cystéine (1 % pour le lavage des sujets n° 1, 2 et 3, 0,4 % dans les cas des sujets n° 4 et 5). 500 ml de solution ont été utilisés pour le lavage bronchique des sujets 1, 3, 4 et 5 et 200 ml pour le lavage bronchique du sujet 2.
- b - Des lavages bronchiques ont été réalisés chez 6 sujets de groupe sanguin O avec 500 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium contenant de la N-acétyl-cystéine (0,4 %) et aussi de la xylocaine (0,04 %).

2) Réduction du produit des lavages bronchiques :

- a - Dans la première série, chaque lavage bronchique a été centrifugé et séparé en une fraction soluble et un culot gélifforme qui ont été dialysés contre eau distillée, puis lyophilisés. Les culots "géliformes" ont été ensuite soumis à une réduction par le mercaptoéthanol à 1 % comme dans le cas des mucus fibrillaires de l'expectoration.

- b - Les lavages bronchiques de la deuxième série ont été réunis, dialysés contre eau distillée, et lyophilisés pour constituer un pool de lavage bronchique. Ce pool a été réduit dans des conditions identiques à celles qui ont été précédemment décrites.

C - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE SUR COLONNE D'ECTEOLA-CELLULOSE :

Le mucus bronchique réduit est fractionné sur une colonne d'Ecteola-cellulose dont la capacité d'échange est de 0,4 mEq par g d'Ecteola-cellulose sec.

1) Préparation de l'échangeur et montage de la colonne :

Le protocole de régénération appliqué à l'Ecteola-cellulose a été décrit par DEGAND (1972).

L'Ecteola-cellulose est ensuite équilibrée dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M et montée sur colonnes munies à leur extrémité inférieure d'un disque en verre fritté de porosité n° 2.

2) Conditions d'élution :

Le mucus bronchique réduit et lyophilisé est dissous et déposé au sommet de la colonne d'Ecteola-cellulose. Les dimensions de la colonne ont été choisies en fonction de la quantité de mucus réduit, soumis à la chromatographie (3 cm x 20 cm pour 700 mg de mucus réduit ou 4 cm x 45 cm pour 1,5 g).

L'élution de la colonne est menée à la température du laboratoire par passage successif des solutions de molarité croissante en chlorure de sodium :

- soit Na Cl 0, 1 M

Na Cl 0, 1 M HCl 0, 01 M

Na Cl 0, 3 M HCl 0, 01 M

Na Cl 0, 5 M HCl 0, 01 M

Na Cl 0, 7 M HCl 0, 01 M pour les mucus de lavages bronchiques

- soit Na Cl 0, 1 M

Na Cl 0, 1 M HCl 0, 01 M

Na Cl 0, 4 M HCl 0, 01 M

Na Cl 0, 7 M HCl 0, 01 M pour les mucus des malades WAS... et
VAN...

- soit Na Cl 0, 1 M

Na Cl 0, 1 M HCl 0, 01 M

Na Cl 0, 7 M HCl 0, 01 M pour les mucus des malades MAR...,
BIA... et PRO...

Des fractions de 10 ml (ou 20 ml) sont recueillies à la sortie des colonnes (3 cm x 20 cm) ou (4 cm x 45 cm) sur collecteur automatique de fractions.

Chacun des tubes correspondant au fractionnement est soumis à une lecture au spectrophotomètre à 278 nm et à une estimation de la teneur en oses combinés par une méthode de dosage à l'orcinol (DEMAILLE et Coll. 1965).

Les fractions éluées de la colonne d'Ecteola-cellulose par les solutions de chlorure de sodium 0, 4 M HCl 0, 01 M (malades WAS... et VAN...) ou 0, 7 M HCl 0, 01 M (malades MAR..., BIA... et PRO...) sont à nouveau fractionnées sur une colonne

d'Ecteola-cellulose. Chaque fraction est dissoute dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M et déposée au sommet de la colonne. Celle-ci est ensuite éluée par un gradient continu de chlorure de sodium de molarité croissante soit de 0,1 à 0,4 M (malades WAS... et VAN...), soit de 0,1 à 0,7 M (malades BIA..., MAR... et PRO...). Ce gradient linéaire est réalisé à l'aide de deux récipients contenant l'un 800 ml d'une solution de Na Cl 0,1 M, HCl 0,01 M, et l'autre Na Cl 0,4 M, HCl 0,01 M ou NaCl 0,7 M, HCl 0,01 M.

D - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION :

Les fractions éluées des colonnes d'Ecteola-cellulose par les différentes solutions de chlorure de sodium sont soumises à une chromatographie de gel filtration sur Sepharose. La granulation du Sepharose utilisé a été déterminée pour chaque fraction après des essais préliminaires sur différentes colonnes de Sepharose 2B, 4B ou 6B.

Chaque fraction est dissoute dans un faible volume de tampon Tris HCl 0,1 M de pH 8,0 contenant du chlorure de sodium 0,2 M, déposé au sommet de la colonne de Sepharose et éluée par le même tampon. Les dimensions des colonnes varient en fonction des quantités de préparation à chromatographier (2 cm x 47,5 cm pour 25 mg ; 2,5 cm x 47 cm pour 100 mg et 4,5 cm x 47 cm pour 500 mg). Au bas de chaque colonne, on recueille des fractions de 2,5 ml (1,2 cm x 47,5 cm), 5 ml (2,5 cm x 47 cm) ou 15 ml (4,5 cm x 47 cm) sur collecteur automatique. Elles sont soumises à une analyse spectrophotométrique à 278 nm et à un dosage automatique des oses à l'orcinol (DEMAILLE et Coll., 1965).

E - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CARBOXY-METHYL-CELLULOSE :

La fraction éluée de la colonne d'Ecteola-cellulose par la solution de chlorure de sodium à 0,1 M et purifiée par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 2B ou 6B est soumise à une chromatographie d'échange ionique sur carboxy-méthyl-cellulose.

1) Préparation de l'échangeur et de la colonne :

Le protocole de régénération appliqué à la carboxy-méthyl-cellulose (Whatman CM 11) comporte plusieurs étapes effectuées sur un entonnoir muni d'un verre fritté. Un cycle de régénération comprend :

- un lavage à l'eau distillée,
 - un contact de 30 min avec Na OH 0,2 M,
 - un lavage abondant à l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de la neutralité,
 - 30 min en contact avec HCl 0,2 M,
- et, enfin, un lavage à l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de la neutralité.

2) Chromatographie :

La chromatographie d'échange ionique est réalisée sur une colonne (2 cm x 20 cm) remplie de carboxy-méthyl-cellulose équilibrée dans du tampon acétate de sodium 0,01 M de pH 5,5. Après dépôt de la fraction sous un volume de 2 ml de tampon, l'élution est conduite par un gradient discontinu correspondant au passage successif des tampons :

- acétate de sodium 0,01 M de pH 5,5
- acétate de sodium 0,1 M de pH 5,5.

On recueille des fractions de 5 ml dont on mesure l'ab-

sorption spectrophotométrique et dont on dose la teneur en oses combinés grâce à la méthode automatique à l'orcinol (DEMAILLE et Coll., 1965).

Les deux fractions obtenues sont dialysées contre de l'eau distillée et lyophilisées.

II - ETUDES ELECTROPHORETIQUES :

A - ELECTROPHORESE EN AGAROSE :

L'électrophorèse en agarose est effectuée selon une modification de la méthode de SCHEIDEGGER (1955). Le support est un gel d'agarose à 1 % (Industrie Biologique Française, Genevilliers, France) dans un tampon véronal sodé de pH 8,2 et de force tonique 0,1, coulé sur des lames de microscope (25 x 75 mm). La migration électrophorétique s'effectue pendant une heure sous une différence de potentiel de 20 volts aux extrémités des lames. Les électrophorégrammes sont révélés par l'Amidoschwarz (DEGAND, 1972), le réactif de Schiff après oxydation périodique (BISERTE, 1957) et le bleu de Toluidine (VANARKEl et Coll., 1963).

B - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE :

L'électrophorèse est réalisée sur des bandes d'acétate de cellulose Séraphore III (2,5 x 15 cm), à pH 8,6, selon la technique de Kohn (1957). Les électrophorégrammes sont révélés par l'Amidoschwarz (DEGAND, 1972), et le réactif de Schiff après oxydation périodique (BISERTE, 1957).

C - ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE :

L'électrophorèse est réalisée selon la technique de WEBER et OSBORN, (1969) mais le gel utilisé est, selon la définition de HJERTEN (1962) caractérisé par $T = 13,66 \%$ et $C = 1,32 \%$. On dépose 50 microgrammes de fractions à étudier dans 50 microlitres de tampon phosphate de sodium $0,01 \text{ M}$ de pH 7,0 contenant du S. D. S (1 %) au sommet des gels (0,5 x 12 cm) et on laisse migrer pendant 4 heures avec une intensité de 8 mA par gel. Les gels sont ensuite colorés par le bleu Coomassie (LAINE, 1975) et le réactif de Schiff après oxydation périodique (ZACHARIUS et Coll., 1969).

III - ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE :

A - PREPARATION DES IMMUNSERUMS :

1) Immunsérums anti-mucines S6B ou anti A1 :

L'immunisation des lapins par des mucines S6B ou A1 de bronchite chronique a été effectuée de la façon suivante : injections intramusculaires hebdomadaires de 5, 10 ou 20 mg de mucines dissoutes dans 0,5 ml de chlorure de sodium physiologique tamponnée à pH 7,0 (PBS) et mélangées à 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (DIFCO) (Laboratoires Detroit, Michigan), pendant une période de deux ou trois mois.

2) Purification des immunsérums antimucines S6B ou antimucines A1 par saturation :

a - éléments utilisés pour la saturation des immunsérums :

. une préparation enrichie en lactotransferrine. une préparation d'immu-

noglobulines A de lait, ainsi que deux préparations de chaînes légères d'immunoglobulines κ et λ nous ont été aimablement données par Monsieur le Professeur HAVEZ et Madame le Docteur HAYEM.

. globules rouges humains A ou O : (Centre Régional de Transfusion sanguine, Lille) et globules rouges de mouton (Institut Pasteur, Paris).

b - mode opératoire :

. épuisement par les protéides : un ml d'immunsérum est épuisé pendant 2 heures à 37°C par 5 mg de sérum humain lyophilisé, 2 mg de la fraction d'immunoglobulines A et 2 mg de la fraction riche en lacto-transferrine. Le mélange est alors laissé pendant une heure à + 4°C et centrifugé. On recueille le surnageant qui sert à effectuer les études immunologiques.

. épuisement par les globules rouges : l'immunsérum anti-mucines A1 (0,3 ml) a aussi été épuisé par des globules rouges humains A ou B ou par des globules rouges de mouton (0,15 ml d'une solution à 10 % (v/v) dans du chlorure de sodium physiologique tamponnée à pH 7,0 (PBS).

B - UTILISATION D'IMMUNSERUMS COMMERCIAUX :

Des immunsérums fabriqués chez le lapin : anti-protéines sériques humaines, antichaine λ des immunoglobulines, anti-lactotransferrine et anti λ 1 antichymotrypsine ont également été utilisés (BEHRING).

C - IMMUNOELECTROPHORESE SIMPLE :

Cette technique associe une migration électrophorétique et une identification immunologique par réaction de précipitation antigène-anticorps dans du gel d'agarose à 1 % dans un tampon véronal de pH 8,2. Après dépôt de l'immunsérum et incubation des lames à température du

laboratoire pendant 48 heures, les gels sont laissés avec du sérum physiologique pendant 1 heure, séchés, lavés avec de l'eau courante pendant deux jours, séchés et révélés par coloration avec l'amidoschwarz (LAMBLIN et Coll., 1973).

D - IMMUNOELECTROPHORESE EN DOUBLE DIMENSION :

Cette technique comprend deux migrations électrophorétiques (LAURELL, 1965). Le premier temps électrophorétique permet la séparation sur un gel d'agarose des différents antigènes. Le deuxième temps électrophorétique se fait dans un gel d'agarose contenant l'immunosérum selon une direction perpendiculaire à celle de la première dimension. On réalise ainsi une réaction de précipitation antigène-anticorps (dépendant du rapport antigène-anticorps).

1) Matériel d'électrophorèse :

a - cuve :

Les cuves à électrophorèse sont des cuves fermées, équipées d'un compartiment central étanche dans lequel est établie une circulation d'eau courante, ceci afin de stabiliser la température du gel pendant l'électrophorèse.

b - Tampon véronal pH 8,6 (force ionique 0,02) :

- véronal sodé : 41,2 g
- véronal acide : 8 g
- eau distillée q. s. p. 10 litres

Ce tampon est utilisé dans les bacs à électrophorèse et pour la préparation de l'agarose.

2) Mode opératoire :

a - Première dimension :

15 ml d'agarose (Industrie Biologique Française, Gennevilliers, France) à 1 % dans un tampon véronal de pH 8,6 sont coulés sur une plaque de verre de dimensions 10 x 10 cm.

Après refroidissement, une série de fentes est pratiquée à 0,5 cm à l'extrémité cathodique de la plaque. Quatre échantillons peuvent être déposés sur la même plaque dans des trous distants les uns des autres de 2,5 cm. On dépose 40 à 50 microlitres de solution à étudier dans chaque fente. La migration électrophorétique est effectuée pendant une heure sous une différence de potentiel de 100 volts aux extrémités de la plaque. Après électrophorèse, les fentes sont comblées en y coulant un peu d'agarose à 1 %.

b - Deuxième dimension :

La plaque d'agarose est alors découpée à l'aide d'une lame de rasoir en 4 bandes (10 x 2,5 cm). Chaque bande est transférée sur le côté cathodique d'une autre plaque de verre de dimensions 10 x 10 cm. Sur le reste de la plaque on coule 12 ml d'agarose à 1 % contenant 300 microlitres d'immunsérum.

Après gélification, la plaque est placée dans la cuve à électrophorèse réfrigérée et la seconde migration est effectuée pendant une nuit sous une tension de 30 volts aux extrémités de la plaque.

c - Révélation des plaques :

Avant de colorer les plaques, il faut laver le gel et le sécher.

. Lavage et séchage :

Le protocole appliqué est le suivant :

- on recouvre le gel avec une couche de feuilles de papier filtre superposées d'une épaisseur de 2 cm.

- on exerce une pression pendant 30 à 45 min, à l'aide d'une plaque de verre recouverte d'un poids de 500 g.

- après avoir ôté le papier filtre, on lave la plaque avec une solution de chlorure de sodium physiologique tamponnée à pH 7,0 (PBS), deux fois pendant 15 min, puis on lave à l'eau distillée pendant 15 min et on sèche la plaque d'agarose recouverte d'une feuille de papier filtre sous un courant d'air chaud.

. Coloration :

- les arcs de précipitation sont révélés par coloration de la plaque par le bleu de Coomassie (LAINE, 1975).

IV - INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION :

La recherche de l'activité de groupe sanguin est effectuée par étude de l'inhibition de l'hémagglutination de globules rouges humains A, B ou O par des immunosérums correspondants, préalablement absorbés par la fraction à étudier selon la technique de WATKINS et MORGAN (1962).

Chaque détermination est faite en additionnant 100 µl d'une solution de mucines (2 mg/ml) ou d'une dilution de cette solution mère dans du sérum physiologique tamponné à pH 7,0 à un volume égal d'immunosérum contenant 2 doses agglutinantes (WATKINS et MORGAN, 1962).

Une dose agglutinante correspond à la plus petite dilution d'antisérum A, B ou H (l'immunosérum étant dilué de demi en demi) capable de provoquer une agglutination nette des globules rouges humains correspondants. Le mélange est incubé pendant 15 min à température du laboratoire. Après addition d'un troisième volume (0,1 ml) d'une suspen-

sion de globules rouges humains A ou H à 1% dans la solution physiologique tamponnée à pH 7,0 (PBS), le mélange est agité, incubé pendant 2 heures à température du laboratoire. On effectue alors la lecture de l'agglutination.

V - ULTRACENTRIFUGATION :

A - DETERMINATION DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION :

Le coefficient de sédimentation des différentes préparations de mucines est mesuré sur une ultracentrifugeuse Spinco (modèle E) : 10 mg de mucines sont dissous dans 1 ml de tampon acétate de sodium 0,02 M de pH 7,0 contenant du chlorure de sodium 0,1 M et dialysés pendant 12 heures contre le même tampon. La mesure du coefficient de sédimentation de chaque mucine est effectuée à une vitesse de rotation de 59 780 tours/min en utilisant trois concentrations différentes (10, 5 et 1,25 mg). Des clichés photographiques sont pris à intervalle de temps réguliers. Pour chaque concentration, on peut ainsi déterminer la valeur du coefficient de sédimentation apparent, ce qui permet ensuite de déterminer la valeur du coefficient de sédimentation à concentration nulle, dans l'eau S_{20}° , par méthode graphique, en extrapôlant la courbe $\frac{1}{S_{app.}} = f(\text{concentration})$.

B - DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE :

La détermination du poids moléculaire est effectuée selon une modification (CHERVENKA, 1970) de la méthode d'YPHANTIS (1964). 0,8 mg de mucines sont dissous dans 1 ml de tampon Tris HCl 0,1 M de pH 7,0 et dialysés contre le même tampon pendant 24 heures à 4°C. La

préparation est centrifugée à une vitesse de rotation de 6 400 tours/min à 20°C sur une ultracentrifugeuse analytique Beckman équipée de cellules capillaires à double secteur jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (6 heures). Le volume spécifique partiel utilisé pour le calcul du poids moléculaire ($\bar{V} = 0,590$) a été déterminé avec d'autres préparations de mucines bronchiques (DEGAND et Coll., 1973).

VI - METHODE D'ETUDE DES GLUCIDES :

A - REPERAGE DES OSES PAR LA METHODE AUTOMATIQUE DE DOSAGE A L'ORCINOL :

La présence d'oses combinés dans les éluats de colonne est mise en évidence par le dosage automatique à l'orcinol (DEMAILLE et Coll., 1965).

B - ANALYSE DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE PAR CHROMA- TOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE :

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse selon la modification (ROUSSEL et Coll., 1975) de la méthode de REINHOLD (1972).

Le protocole utilisé est le suivant :

1) Méthanolyse :

Elle est effectuée dans des tubes vissés à bouchon de Teflon. L'échantillon de mucines (150 à 200 μg) est soumis à une méthanolyse dans 0,5 ml de méthanol-HCl 0,5 M à 65°C pendant 16 heures. Puis on sèche sous un courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

2) N-acétylation et dé-O-acétylation :

a - N-acétylation :

Les produits sont N-acétylés par addition de 100 µl d'anhydride acétique et de 100 µl de pyridine, laissés 3 min à la température du laboratoire et séchés sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

b -dé -O-acétylation :

Les produits sont alors de-O-acétylés dans 500 µl de méthanol contenant de l'ammoniaque à 20 % pendant 1 heure à 65°C. Le méthanol est alors évaporé sous courant d'azote.

3) Tri-méthyl-silylation :

La silylation est effectuée par addition de 100 µl de Sylon (Sylon HTP-Inc. Bellafonte, Pennsylvania, 16 823). On laisse en contact pendant 1 heure à température ambiante. On sèche sous courant d'azote et on ajoute 100 µl d'heptane. On attend 30 min, avant l'injection de 1 à 2 µl de la phase heptanique.

4) Libération des osamines dans le cas des lectines de Ricin :

Dans le cas des lectines de Ricin, la détermination des osamines est effectuée après hydrolyse par de l'acide trifluoro-acétique 2 N pendant 2 heures à 100°C. L'hydrolysat est soumis à la N-acétylation par le mélange de 100 microlitres d'anhydride acétique et de 100 microlitres de pyridine puis à une O-méthyl-glycosidation par la solution d'acide chlorhydrique 0,5 M dans le méthanol pendant 16 heures à 65°C.

5) Standard interne :

Toutes ces opérations sont réalisées en présence d'ino-

sitol utilisé comme témoin interne (50 µg).

6) Chromatographie en phase gazeuse :

L'analyse des méthyl-O-glycosides tri-méthyl silylés est effectuée par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Perkin-Elmer (modèle 900) muni de détecteurs à ionisation de flamme et en utilisant des colonnes d'acier (180 x 0,3 cm) contenant de l'OV 17 à 3 % sur Chromosorb W-AW -DMCS (100-120 mesh) (PACKARD). La température initiale du four est de 120°C, elle augmente de 8° par min jusqu'à 270°C.

La surface des pics et les temps de rétention sont déterminés au moyen d'un intégrateur digital (Infotronics CRS 208, Shannon, Ireland).

C - DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE :

Le dosage de l'acide sialique est effectué au moyen de l'acide 2-thiobarbiturique selon la méthode d'AMINOFF (1961) après hydrolyse de l'échantillon par de l'acide sulfurique 0,05 M pendant 30 min à 80°C.

D - GROUPEMENTS SULFATE :

Le dosage des groupements sulfate est effectué selon la technique de SPENCER (1960) au moyen de chloranilate de baryum après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1 M pendant 5 heures à 100°C.

E - OXYDATION PERIODIQUE :

Les mucines A1 (10 mg) sont dissoutes dans 10 ml d'une solution de metaperiodate de sodium 0,04 M et gardées à l'obscurité pendant 24 heures à 4°C. L'excès de metaperiodate est détruit par addition d'éthylène glycol à 25 % (85 microlitres). Après une heure, 10 mg de borohydrure de sodium sont ajoutés et la solution est gardée à l'obscurité pendant 16 heures à 4°C (KABASAWA et HIRS, 1972). Enfin, la solution est amenée à pH 5 avec de l'acide acétique 4 M. La solution est lyophilisée et déposée sur la colonne de Sephadex G 100 (2,5 x 44 cm)

dans l'acide acétique 0,1 M. Les fractions de 5 ml recueillies sont soumises à un dosage automatique des oses à l'orcinol (DEMAILLE et Coll., 1965).

F - ACTION DE LA GALACTOSE OXYDASE ET OXYDATION PAR LE BROME :

Les mucines A1 (10 mg) sont dissoutes dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,075 M de pH 7,0 et soumises à l'action de la galactose oxydase (500 µg) de *Dactylum dentroides* (Worthington) (MOREL et Coll. 1966). Après addition de 100 mg de carbonate de calcium, 5 microlitres de brome sont ajoutés. Le mélange est gardé pendant 24 h à température du laboratoire et à l'obscurité. Le précipité formé est solubilisé par addition d'acide chlorhydrique 1 M (SHIER et Coll., 1972) et la solution est lyophilisée et déposée sur une colonne de Sephadex G100 (2,5 x 44 cm) dans l'acide acétique 0,1 M. On recueille des fractions de 5 ml qui sont analysées comme précédemment.

VII - METHODES D'ETUDE DES ACIDES AMINES :

A - METHODE AUTOMATIQUE DE REPERAGE DES ACIDES AMINES ET DES PEPTIDES PAR REACTION A LA NINHYDRINE :

La présence d'acides aminés ou de peptides dans les éluats de colonne est mise en évidence par une méthode automatique sur auto-analyseur Technicon (DEGAND, 1972).

B - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES :

1) Hydrolyse :

L'échantillon de mucines (1mg) est hydrolysé au moyen d'acide chlorhydrique 5,6 M pendant 24 heures à 110°C, en tube scellé sous vide. La solution est ensuite lyophilisée après avoir été diluée par de l'eau distillée.

2) Analyse des acides aminés sur auto-analyseur :

a - La composition en acides aminés sur auto-analyseur Technicon a été décrite par DEGAND (1972).

b - Composition est réalisée sur auto-analyseur Beckman (Multichrom B). Les tampons et le programme retenus permettent sur une seule colonne (Résine Beckman type M 82) la séparation des acides aminés et des osamines. La composition des tampons utilisés est rapportée dans le tableau suivant.

tampon	1	2	3	4	5
pH	2,97	2,97	4,10	7,32	7,32
citrate de sodium 2H ₂ O	78,4 g				
HCl (R.P.)	56,9 ml	56,9 ml	36,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Chlorure de sodium	-	58,5 g	-	-	187,2 g
thodiglycol	10,0 ml				
acide N-caprylique	0,4 ml				
eau distillée q. s. p.	500 ml				

Le programme utilisé pour une analyse est le suivant :

	Temps en minutes
tampon 1	0 - 138
tampon 2	138 - 161
tampon 3	161 - 204
tampon 4	204 - 219
tampon 5	219 - 309
régénération Na OH 0,2 M	309 - 334
rééquilibration en tampon 1	334 - 369

Dans le programme, l'utilisation du tampon acétate de sodium pH 2,97 enrichi en chlorure de sodium permet l'élution des hexosamines (glucosamine et galactosamine).

C - DETERMINATION DES ACIDES AMINES EN POSITION N-TERMINALE :

Les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par dansylation (GRAY et HARTLEY, 1963) ; (WOODS et WANG, 1967) et chromatographies en couche mince (GROS et LABOUESSE, 1968).

D - DETERMINATION DES ACIDES AMINES EN POSITION C-TERMINALE:

Les acides aminés C-terminaux ont été déterminés selon la technique décrite par SCHROEDER (1972).

E - DOSAGE DE LA CYSTEINE SOUS FORME D'ACIDE CYSTEIQUE APRES OXYDATION PERFORMIQUE :

L'oxydation performique des mucines a été réalisée selon le protocole décrit par HIRS (1967). 2 mg de mucines sont repris dans 100 μ l d'acide formique à 99 % et 20 μ l de méthanol puis sont laissés à - 5°C pendant 30 min. Sont alors ajoutés 100 μ l d'acide performique (Réactif acide performique = mélange de 5 volumes d'eau oxygénée à 30 % et 15 volumes d'acide formique à 99 %). Le milieu réactionnel est maintenu à - 5°C pendant 150 min. Après dilution par addition de 200 μ l d'eau distillée, la solution est soumise immédiatement à une lyophilisation. La poudre ainsi obtenue est ensuite hydrolysée par HCl 5, 6 M pendant 24 heures à 110°C.

VIII - REDUCTION ET ALKYLATION D'UNE MUCINE BRONCHIQUE :

40 mg de mucines sont dissous dans 4 ml de tampon phosphate de sodium 0, 075 M de pH 7, 3 auxquels on ajoute 40 μ l de β mercaptoéthanol. Le mélange est agité pendant 4 heures à 37°C. Il est ensuite alkylé avec 250 mg d'iodo-acétamide pendant 1 heure. La solution est alors dialysée contre de l'eau distillée puis lyophilisée.

IX - HYDROLYSES ENZYMATIQUES :

A - HYDROLYSE TRYPSIQUE :

190 mg des mucines A1 sont hydrolysés par la trypsine bovine (trypsine cristallisée deux fois en présence de chlorure de diphémyl carbamide (Miles -Servac Ltd, Maidenhead, Bercks, Angleterre)) dans 10 ml de tampon bicarbonate de sodium à 1 % (w/v) de pH 8,75 pendant 2 heures à 37°C. Le mélange est lyophilisé et 50 mg sont déposés sur une colonne de Sephadex G100 (2,5 x 44 cm) équilibrée dans l'acide acétique 0,1 M. L'éluion est poursuivie avec l'acide acétique 0,1 M et on recueille des fractions de 5 ml dont on dose la teneur en oses combinés grâce à une méthode automatique à l'orcinol (DEMAILLE et Coll., 1965) et la réactivité à la ninhydrine (DEGAND, 1972). Les fractions renfermant des oses combinés sont lyophilisées.

B - HYDROLYSES PAPAINIQUE ET PRONASIQUE :

20 mg de mucines A1 préalablement hydrolysés par la trypsine sont hydrolysés par la mercuripapaine Worthington (rapport pondéral enzyme/substrat = 1/20) pendant 24 heures à 37°C dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 6,5 en présence de B.A.L. (50 microlitres). Après recharge avec la même quantité de mercuripapaine, l'hydrolyse est poursuivie pendant 24 heures supplémentaires. La solution est amenée, à l'aide d'acétate de calcium 1 M à la concentration finale de 0,01 M en acétate de calcium et au pH de 7,3 avec du Tris. On ajoute alors de la pronase B grade Calbiochem (rapport pondéral enzyme/substrat : 1/40) et on poursuit l'hydrolyse pendant 24 heures à 37°C. L'hydrolysate est centrifugé et le surnageant est précipité par 4 volumes d'éthanol absolu, remis en solution et déposé sur une colonne de Sephadex G100 (2 x 40 cm) élue à l'aide d'acide acétique 0,1 M. On recueille des fractions qui sont analysées comme précédemment.

C - HYDROLYSE PRONASIQUE :

La fraction glycopeptidique (40 mg) obtenue par gel filtration après hydrolyse trypsique est soumise à l'hydrolyse pronasique dans 4 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M de pH 7,3, acétate de calcium 0,01 M pendant 24 heures à 37°C. La solution est lyophilisée et déposée sur une colonne de Sephadex G100 (2,5 x 44 cm) dans l'acide acétique 0,1 M. On recueille des fractions de 5 ml qui sont analysées comme précédemment.

X - METHODE D'ETUDE DES LIPIDES :

L'extraction des lipides est réalisée selon la méthode de FOLCH et LEES, (1951). 5 mg de fraction à étudier sont mis en suspension dans 25 ml de mélange chloroforme/méthanol (2 : 1) pendant 24 heures à température du laboratoire. On sépare le résidu insoluble du surnageant. Celui-ci est conservé alors que le résidu est à nouveau soumis à 2 extractions successives par 25 ml du même mélange pendant 4 heures. Les différents extraits sont réunis. 3 aliquots sont évaporés à sec : l'un d'entre-eux est pesé, les autres sont utilisés pour l'étude qualitative des lipides. Celle-ci est réalisée par chromatographie sur couche mince en gel de silice G (MERCK) soit dans un solvant chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (115-45-7, 5 : v/v), soit dans un solvant éther de pétrole-éther méthylique-acide acétique (90-10-1 v/v). Les plaques sont révélées par carbonisation après pulvérisation d'un mélange contenant 4 ml d'acide sulfurique, 100 ml d'eau et 20 g de sulfate d'ammonium.

XI - TECHNIQUES DE PREPARATION ET MESURE DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DES LECTINES :

A - PREPARATION DES LECTINES DU RICIN :

1) Broyage des graines et fractionnement au sulfate d'ammonium

(TOMITA et Coll., 1972) :

200 g de graines de Ricinus Communis (Ets Truffaut) sont broyées finement et mis en suspension pendant une nuit dans un litre de tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 7,0 contenant du chlorure de sodium 0,1 M. La suspension est alors centrifugée à 15000 g pendant 20 min. On recueille le surnageant dont le volume est complété à un litre avec le tampon phosphate et on ajoute du sulfate d'ammonium (187 g) pour amener la solution à 30 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est agité pendant 4 heures à 4°C puis centrifugé à 15 000 g pendant 20 min. Le surnageant (998 ml) est recueilli, filtré sur de la gaze et soumis à un nouveau fractionnement par le sulfate d'ammonium en ajoutant 205 g de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 60 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est agité pendant 4 heures à 4°C et centrifugé à 15 000 g pendant 20 min. Le précipité obtenu est dissous dans 150 ml de tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 7,0 contenant du chlorure de sodium 0,1 M et dialysé pendant 8 jours (2 changements par jour) contre le même tampon. Un léger précipité apparaît : il est éliminé par centrifugation pendant 30 min à 15 000g

2) Chromatographie d'affinité sur Sepharose 4B :

La solution dialysée est déposée sur une colonne de Sepharose 4B (4 x 40 cm) équilibrée dans le tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 7,0 contenant du chlorure de sodium 0,1 M. Les constituants qui n'ont pas d'affinité pour le gel de Sepharose sont élués par le même tampon. Quand les fractions recueillies (20 ml) ont une valeur de densité optique mesurée à 278 nm inférieure à 0,005, les lectines sont alors éluées par une solution de galactose 0,1 M dans

le même tampon. On recueille des fractions de 20 ml dont on mesure l'absorption spectrophotométrique à 278 nm et le pouvoir d'agglutination des globules B. Toutes les fractions ayant une activité hémagglutinante sont dialysées et lyophilisées.

3) Fractionnement des lectines du Ricin :

150 mg de la fraction de lectines, éluées de la colonne de Sepharose 4B sont dissous dans 5 ml de tampon phosphate de sodium 0,005 M, chlorure de sodium 0,1 M, de pH 7,0. Cette solution est déposée sur une colonne de Sephadex G150 (3,5 x 66 cm), équilibrée et éluee dans le même tampon. On recueille des fractions de 8 ml dont on mesure l'absorption spectrophotométrique à 278 nm et dont on dose la teneur en oses combinés grâce à une méthode automatique à l'orcinol (DEMAILLE et Coll., 1965).

4) Purification des lectines du ricin :

60 mg de fraction de lectines sont dissous dans 5 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,5 et déposés sur une colonne de carboxy-méthyl-cellulose (2 x 20 cm) équilibrée dans le même tampon.

Cette colonne est d'abord éluee par 200 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,5 puis par 600 ml d'un gradient linéaire de chlorure de potassium de 0 à 0,6 M, dans le même tampon. On recueille des fractions de 5 ml dont on mesure l'absorption spectrophotométrique à 278 nm.

B - PREPARATION DE LA LECTINE A FUCOSE DU GENET EPINEUX

1) Broyage des graines et fractionnement par le sulfate d'ammonium :

100 g de graines finement broyées sont mis en suspension dans 1,1 litre de chlorure de sodium à 9 p 1000 et agités une nuit à 4°C. Le surnageant obtenu après centrifugation est amené à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium avec du sulfate d'ammonium solide. Le mélange est agité pendant 4 heures, puis centrifugé à 15000 g. Le précipité obtenu est repris dans du chlorure de sodium à 9 p 1000, dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisé.

2) Chromatographie d'affinité sur une colonne d'epoxy-Sepharose

couplé à du L-fucose :

a - Préparation de la colonne (VREBLADT, 1976) :

20 g d'epoxy-Sepharose 6B (Pharmacia) sont mis en suspension dans 2 litres d'eau distillée. Le mélange est agité pendant une heure. L'eau distillée est éliminée et le gel est alors agité dans 200 ml de soude 0,1 N pendant 2 à 3 min. On élimine la soude à travers un verre filtré. On ajoute alors au gel, 50 ml d'une solution de fucose à 20 % dans la soude 0,1 N. Le mélange est agité lentement pendant une nuit à la température du laboratoire. Finalement, la solution sodique est éliminée à travers un verre fritté et le gel est lavé avec un litre d'eau distillée et 4 fois 150 ml de tampon phosphate de sodium 0,05 M contenant du chlorure de sodium M de pH 7,0.

b - Chromatographie d'affinité :

250 mg de la fraction obtenue par une précipitation au sulfate d'ammonium sont dissous dans le tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 7,0 contenant du chlorure de sodium 1 M et appliqués au sommet de la colonne d'epoxy-Sepharose 6B couplée à du fucose (1 x 30 cm). La colonne est d'abord lavée par le tampon phosphate afin d'éliminer les protéines qui n'ont pas d'affinité pour le fucose, puis on élue de la colonne, par une so-

lution de fucose 0,1 M dans le même tampon, les protéines qui ont une affinité pour le fucose. On recueille des fractions de 5 ml dont on mesure l'absorption spectrophotométrique à 278 nm et le pouvoir d'agglutination des globules rouges humains O. Les fractions hémagglutinantes sont dialysées et lyophilisées. On obtient ainsi à partir de 100 g de graines, 10 mg d'hémagglutinine I.

C - PREPARATION DE LA LECTINE DE CACAHUETE :

1) Broyage des graines et fractionnement au sulfate d'ammonium :

200 g de graines de cacahuète (Lesieur-Dakar) sont finement broyées, délipidées à l'éther de pétrole dans un extracteur de Soxhlet puis séchées. 100 g de farine délipidée sont mis en suspension dans 500 ml de chlorure de sodium à 9 p 1000, agités pendant 3 heures à la température du laboratoire et centrifugés à 10 000 g pendant 20 min. Le précipité obtenu est remis en suspension dans 500 ml de chlorure de sodium à 9 p 1000, agité pendant 3 heures puis centrifugé à 10 000 g pendant 20 min. Les deux surnageants obtenus après centrifugation sont mélangés (1 l) : on y ajoute 391 g de sulfate d'ammonium afin d'amener la solution à 60 % de saturation en sulfate d'ammonium à 4°C ; on agite la solution pendant 4 heures. Elle est ensuite laissée une nuit à 4°C puis centrifugée pendant 30 min à 15 000 g. Le précipité obtenu est dissous dans 150 ml d'eau distillée et dialysé pendant 4 jours contre de l'eau distillée, puis 3 jours contre du chlorure de sodium à 9 p 1000 ; le précipité insoluble qui s'est formé dans le boudin à dialyse est alors éliminé par centrifugation pendant 20 min à 25 000 g et le surnageant obtenu (250 ml) est utilisé pour préparer la lectine.

2) Chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose- ξ -aminocaproyl β -D galactopyranosylamine

La solution obtenue précédemment est déposée au sommet d'une colonne de Sepharose- ξ -aminocaproyl β -D-galactopyranosylamine ° initialement équilibrée dans une solution de chlorure de sodium à 9 p 1000. Les protéines qui n'ont pas d'affinité pour le galactose sont éluées par le chlorure de sodium puis la colonne est lavée par une solution de galactose 0,05 M dans le chlorure de sodium à 9 %. On recueille des fractions de 20 ml dont on mesure la densité optique à 278 nm et dont on recherche la capacité d'agglutiner les globules rouges humains O désialidés. Les fractions hémagglutinantes sont dialysées et lyophilisées. A partir de 100 g de graines délipidées, on obtient 105 mg de lectines d'Arachis Hypogea.

D - DETERMINATION DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE DE LECTINES :

1) Préparation des globules :

Des globules rouges humaines A, B ou O sont lavés 3 fois dans du tampon phosphate de sodium 0,025 M, 0,15 M en chlorure de sodium et de pH 7,0.

Une partie des globules rouges humains O est désialidée par la neuraminidase de Clostridium perfringens. (I.C.N., Cleveland, Ohio) selon la technique de LOTAN et Coll. (1975).

Des globules rouges de lapin sont lavés 3 fois dans du tampon phosphate de sodium 0,025 M, 0,15 M en chlorure de sodium de pH 7,0 et trypsinisés (Trypsine DCC Calbiochem) selon la technique de LIS et SHARON (1972).

Tous les globules sont ensuite utilisés en suspension

° Nous remercions le Docteur H. DEBRAY d'avoir mis à notre disposition cette colonne.

à 4 % dans du tampon phosphate de sodium 0,025 M, 0,15 M en chlorure de sodium et de pH 7,0.

2) Titration des lectines :

Chaque lectine est mise en solution dans le tampon phosphate de sodium 0,025 M, 0,15 M en chlorure de sodium de pH 7,0 (1 mg/ml) ; on réalise des dilutions successives au demi de cette solution de lectines. La titration des lectines se fait dans des boîtes à microtitration en mettant dans chaque trou 50 microlitres de chacune des dilutions de lectines et 50 microlitres de suspension de globules rouges (globules rouges humains B pour les lectines de Ricin, globules rouges humains O pour les lectines de genêt épineux, et de lotier, globules rouges humains A pour la lectine de germe de blé, globules rouges humains O désialidés pour la lectine de cacahuète, globules rouges de lapin trypsinisés pour la lectine de soja. Le mélange est laissé pendant une heure à la température du laboratoire et on note ensuite la plus grande dilution de lectines capables d'agglutiner complètement les globules rouges.) La quantité de lectines ainsi déterminée représente une dose hémagglutinante (OSAWA et MATSUMOTO, 1972).

XII - METHODE D'ETUDE DE L'AFFINITE DES LECTINES POUR

LES MUCINES :

A - AFFINO ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE :

Dans un premier temps, les mucines bronchiques (2,5 mg) sont soumises à une électrophorèse (décrite dans la partie immunoélectrophorèse bidimensionnelle). Ensuite, l'électrophorèse dans la deuxième dimension, est réalisée dans un gel d'agarose à 1 %, en

tampon véronal de pH 8,6 (force ionique 0,02) contenant 3 mg de lectines. Après séchage, les arcs sont révélés par le bleu Coomassie (LAINE 1975).

B - AFFINO DIFFUSION :

L'étude en double diffusion dans un gel d'agarose à 1 % en tampon véronal de pH 8,2 est effectuée selon la méthode d'OUCHTERLONY (1967) sur des lames de microscope (7,5 x 2,5 cm). Les trous distants de 5 mm sont remplis de 20 microlitres de solution de lectines (4 mg/ml pour les lectines de Ricin et 2 mg/ml pour les autres lectines) et de 10 microlitres de solution de mucines (2 mg/ml). On laisse ensuite diffuser une nuit à la température du laboratoire. Les lames sont ensuite lavées pendant 3 heures dans le chlorure de sodium à 9 p 1000 séchées, lavées sous eau courante pendant 48 heures puis révélées au Bleu Coomassie.

C - INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION :

Dans un premier temps, on réalise des dilutions successives au demi d'une solution de mucines à 6 mg par ml dans le tampon phosphate de sodium 0,025 M, 0,15 M en NaCl et de pH 7,0. Les tests d'inhibition de l'hémagglutination sont effectués dans des boîtes de microtitration en ajoutant dans chaque trou 50 microlitres de chacune des dilutions de mucines à 50 microlitres d'une solution de lectines soigneusement diluée pour avoir au minimum 2 doses hémagglutinantes. Le mélange est incubé pendant 2 heures à la température du laboratoire puis on ajoute 50 microlitres de la suspension de globules rouges correspondante. Le mélange est gardé pendant une heure à la température du laboratoire, puis on lit l'agglutination. On détermine la plus faible concentration de

mucines provoquant l'inhibition de l'hémagglutination.

Dans un second temps, on réalise une série de dilutions arithmétiquement croissantes de la solution de mucines ainsi trouvée afin de déterminer plus précisément la concentration de mucines qui inhibe complètement l'hémagglutination.

D - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHADEX G25-LECTINES DE RICIN :

1) Fixation des lectines de Ricin sur Sephadex G25 :

5 g de Sephadex G25 (Pharmacia super fine 10-40 μ) sont activés par du bromure de cyanogène selon la technique de WIDE (1969). Le gel activé est lavé sur verre fritté par de l'eau distillée glacée puis par un tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 8,25, contenant du chlorure de sodium 0,1 M.

150 mg du mélange des lectines de Ricin élués de la colonne de Sepharose 4B sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate de sodium 0,005 M, 0,1 M en chlorure de sodium et de pH 8,25. Cette solution est mise en agitation, on ajoute le Sephadex G25 activé, puis on amène le volume de la solution à 200 ml avec le même tampon. On laisse le mélange sous agitation pendant 72 heures à 4°C. Ensuite, le gel Sephadex G25 lectines de Ricin est déposé dans une colonne (4 x 12 cm) et lavé par un litre d'eau distillée.

2) Chromatographie d'affinité sur la colonne Sephadex G25-lectines de Ricin :

80 mg de fractions à étudier sont dissous dans 2 ml d'eau distillée et déposés sur la colonne de Sephadex G25-lectines de Ricin (4 x 12 cm) équilibrée dans l'eau distillée. L'élution est conduite avec de l'eau distillée. On recueille des fractions de 5 ml dont

on mesure l'absorption spectrophotométrique à 278 nm et dont on dose la teneur en oses combinés (DEMAILLE et Coll., 1965). La fraction obtenue est lyophilisée. La colonne est ensuite éluée par une solution de chlorure de sodium 0,5 M contenant de l'acide acétique 0,1 M. Des fractions de 5 ml sont recueillies et analysées comme précédemment. Les fractions glycoprotéiques éluées sont dialysées et lyophilisées.

XIII - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES :

A - PRELEVEMENT DU TISSU :

Des biopsies bronchiques ont été prélevées dans une zone macroscopiquement saine de l'arbre bronchique d'un malade de groupe sanguin A et de malades de groupe sanguin O. Elles ont été sectionnées en plusieurs fragments et immédiatement fixées.

B - FIXATION DU TISSU :

1) Fixation dans le mélange de Bouin-Hollande Erlant :

Les biopsies bronchiques prélevées chez les malades de groupe sanguin O, sont fixées par le fixateur de Bouin-Hollande-Erlant : solution d'acide picrique (4g) et d'acétate de cuivre (2,5 g) dans 100 ml d'eau à laquelle on ajoute 10 ml de chlorure mercurieux saturé et 10 ml de formol neutralisé à pH 7,0 par de la soude 0,1 M.

2) Fixation dans le mélange de Carnoy :

Une partie du tissu prélevé chez le malade de groupe sanguin A est fixée dans le mélange de Carnoy, éthanol absolu-chloroforme-acide acétique (6-3-1 : v/v) pendant 2 heures (GANTER et JOLLES, 1970).

3) Fixation dans le Bouin Alcoolique :

Un autre fragment est fixé dans du Bouin Alcoolique mélange d'alcool à 80 % (150 ml), de formol à 35 % ajusté à pH 7,0 à l'aide de soude 0,1 N (60 ml) d'acide acétique (15 ml) et d'acide picrique (1g) pendant 2 4 heures (GANTER et JOLLES, 1970).

4) Fixation dans le formol :

Un troisième fragment est fixé dans une solution de formol à 4 % : 4 g de paraformaldehyde sont dissous dans 50 ml d'eau distillée à 80°C. La dissolution est effectuée en présence de 10 gouttes de soude normale. Après refroidissement, on ajoute 50 ml d'une solution de cacodylate de sodium 0,2 M ajustée à pH 7,4 avec de l'acide chlorhydrique (GANTER et JOLLES, 1970).

C - PREPARATION DES COUPES :

Après fixation, les fragments sont déshydratés et inclus dans de la parafine. Les blocs obtenus sont débités en sections de 5 microns.

D - TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES :

Les coupes sont déparaffinées, réhydratées et colorées par le réactif de Schiff après oxydation periodique ou par le bleu alcian à différents pH.

1) Coloration par le réactif de Schiff après oxydation periodique

(P.A.S.) :

Les coupes sont trempées pendant 10 min dans de l'acid

periodique à 1 % rincées à l'eau distillée et colorées pendant 20 min par le réactif de Schiff : Pararosaniline à 1 % (150 ml) metabisulfite de sodium à 3 % (50 ml) HCl N (30 ml) . Elles sont ensuite passées pendant 8 min dans 3 bains successifs d'eau sulfureuse : eau distillée (300 ml), metabisulfite de sodium à 10 % (15 ml), HCl N (15 ml). Enfin, elles sont lavées à l'eau courante jusqu'à l'obtention d'une transparence du fond.

2) Coloration par le bleu alcian à différents pH :

Les coupes sont oxydées en deux minutes dans un mélange de permanganate de potassium et d'acide sulfurique préparé extemporanément : KMnO_4 à 2,5 % H_2SO_4 à 5 %, H_2O (1-1-8 v/v). Elles sont ensuite rincées à l'eau courante, blanchies dans une solution de metabisulfite de sodium à 5 % et colorées par le bleu alcian à pH 0,2 ; 1 ; et 2,5 pendant 30 min. Elles sont finalement passées sous eau courante pendant 10 min.

3) Coloration par le bleu alcian à pH 2,5 et par le réactif de Schiff après oxydation periodique :

Il est possible de réaliser une double coloration bleu alcian-P.A.S. Les coupes sont d'abord colorées par le bleu alcian à pH 2,5. Après rinçage à l'eau courante, pendant 10 min, les coupes sont oxydées par l'acide periodique à 1 % et colorées par le réactif de Schiff comme cela a été décrit précédemment.

4) Action de la sialidase de DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE :

Les coupes sont mises à incuber pendant 24 heures à 37°C dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 6,5 contenant 100 unités de sialidase de Diplococcus Pneumoniae (HOUDRET et Coll., 1975). Pour vérifier l'action de la sialidase, d'autres cou-

pes sont incubées dans les mêmes solutions ne contenant pas de sialidase.

E - TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE :

Deux méthodes peuvent être utilisées pour effectuer cette réaction :

- l'une directe, nécessite le marquage de l'immunsérum anti-A1, par l'isocyanate de fluoresceine ;
- l'autre, indirecte, se déroule en deux temps avec emploi de l'immunsérum anti-A1 fabriqué chez le lapin, puis d'un immunsérum fluorescent de mouton antiglobulines de lapin (Institut Pasteur).

1) Révélation directe :

a - couplage de l'immunsérum anti-A1 avec de l'isothiocyanate de fluoresceine :

5 ml d'immunsérum anti-A1 sont précipités par le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation. Après dialyse, le précipité est dissous dans 2,5 ml d'eau et dialysé contre une solution de chlorure de sodium à 8,5 % contenant du phosphate de sodium (0,02 M) et de pH 7,2 (solution physiologique (PBS) tamponnée). La combinaison avec l'isothiocyanate de fluoresceine est effectuée selon la méthode de MARSCHALL et Coll. (1968), mais à 25°C pendant 4 heures (KINNEY et Coll. 1964).

L'excès de fluoresceine est éliminé par filtration sur colonne de Sephadex G50 (25 x 0,25 cm) dans la solution physiologique tamponnée. Les protéines couplées à la fluoresceine sont ensuite concentrées sous un volume de 2,5 ml.

b - révélation :

L'immunsérum marqué par la fluoresceine est déposé sur les coupes et laissé 80 min à la température du laboratoire. Les lames sont ensuite lavées dans le tampon phosphate de pH 7,2, pendant 5 min puis colorées par une solution de bleu Evans à 1 p. 10 000 dans le même tampon de pH 7,2 pendant 10 min. Elles sont enfin montées dans la glycérine dans le tampon véronal de pH 8,6.

2) Révélation indirecte :

L'immunsérum anti-A1 est laissé sur les lames pendant 80 min. Après lavage de 5 min dans le tampon phosphate de sodium 0,02 M de pH 7,2, elles sont recouvertes d'immunsérum fluorescent de mouton anti-globulines de lapin (Institut Pasteur) pendant 60 min puis lavées à nouveau et colorées par la solution de bleu Evans.

F - IMMUNOHISTOCHIMIE :

L'immunsérum anti-lactotransferrine est utilisé afin de localiser l'antigène correspondant au sein de la muqueuse bronchique.

Les coupes réhydratées sont recouvertes de sérum de mouton normal dilué au 1/30 pendant 10 min, puis rincées dans du tampon phosphate de sodium de pH 7,2 (Na₂ HPO₄ anhydre : 1,07 g, NaH₂ PO₄, 2 H₂O : 0,39 g, eau distillée q.s.p. 850 ml) contenant 1 % de sérum de mouton normal pendant 30 min. Elles sont ensuite mises à incuber pendant 24 heures avec les immunsérums précédents dilués au 1/10 et contenant de la sérum-albumine bovine (NBC Cleveland, Ohio) à 4 p. 1000. Après incubation, les coupes sont lavées dans le tampon phosphate de sodium de pH 7,2 contenant du sérum de mouton normal à 1 %. Les lames sont alors mises à incuber avec des fragments Fab

d'immunoglobulines anti-lapin préparées chez le mouton et marquées à la peroxydase (MAZZUCA, 1974). Finalement, la peroxydase est révélée par la diaminobenzidine (SIGMA) en solution à 0,05 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 7,6 contenant 0,01 % d'eau oxygénée.

Un contrôle a été effectué en utilisant l'immunsérum lacto-transferrine aimablement fournie par Madame le Docteur A. HAYE.

G - REVELATION DE L'AFFINITE TISSULAIRE DES LECTINES A L'ACIDE DE LA PEROXYDASE :

1) Technique de marquage des lectines à la peroxydase (AVRAMIAS, 1969) :

5 mg de lectine du Ricin, du germe de blé, du soja, du genêt épineux, du lotier ou de la cacahuète sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 8,2 et dialysés contre 2 l de ce tampon pendant une nuit à 4°C.

On ajoute à cette solution, 10 mg de peroxydase type VI (SIGMA). Après dissolution, on introduit goutte à goutte, 50 microlitres d'une solution de glutaraldehyde à 1 %, sous agitation douce. On laisse au repos 3 heures à la température du laboratoire. La solution est ensuite dialysée pendant 1 nuit contre 2 l de tampon phosphate de sodium 0,02 M, 0,14 M en chlorure de sodium de pH 7,4.

La solution est ensuite centrifugée à 10 000 g pendant 20 min et gardée dans un flacon bouché jusqu'à utilisation.

- La lectine de la limule (1 mg) est dissoute dans 1,4 ml de tampon cacodylate de sodium 0,05 M, 0,01 M en chlorure de calcium, de pH 6,8. On ajoute à cette solution 6 mg de peroxydase type VI (SIGMA). Après dissolution, on introduit goutte à goutte, 50 microlitres d'une solution de glutaraldehyde à 1 %

en agitant doucement ; on laisse au repos 3 heures à la température du laboratoire. Ensuite, la solution est dialysée pendant une nuit contre 2 litres de tampon cacodylate de sodium 0,05 M, 0,01 M en chlorure de calcium, de pH 6,8 et gardée à 4°C jusqu'à utilisation.

- La lectine de la Fève-Jack n'est pas marquée à la peroxydase au moyen de glutaraldehyde puisque cette lectine a spontanément une affinité pour cet enzyme (BERNHARD et AVRAMEAS, 1971).

2) Technique d'épuisement des lectines marquées à la peroxydase

Les lectines marquées à la peroxydase sont mises en contact avec l'ose inhibiteur ou avec des préparations de mucines bronchiques (TABLEAU). L'incubation dure 4 heures à la température du laboratoire, puis les solutions sont centrifugées par la muqueuse bronchique.

3) Réaction des lectines avec le tissu bronchique :

La solution de lectine est déposée sur des coupes préalablement réhydratées pendant 12 heures dans un tampon phosphate de sodium de pH 7,2 (Na₂HPO₄ anhydre : 1,07 g, NaH₂PO₄, 2 H₂O : 0,30 g eau distillée q. s. p. 850 ml). L'incubation est effectuée pendant une durée variable suivant la nature de la fixation) à 4°C dans des chambres humides.

Après incubation, les lames sont rincées dans le tampon phosphate de sodium de pH 7,2 pendant 2 heures sous une légère agitation.

Les coupes qui ont été incubées avec les solutions de Concanavoline sont alors mises en présence, une heure durant, d'une solution de peroxydase (10 mg/ml) dans le tampon phosphate

de sodium de pH 7,2 à température du laboratoire, puis rincées pendant une heure dans le tampon phosphate de sodium de pH 7,2.

4) Révélation de la peroxydase :

La peroxydase est mise en évidence en déposant sur les coupes pendant 3 min une solution de diaminobenzidine (SIGMA) 0,05 mg/ml dans du tampon Tris-HCl 0,5 M de pH 7,6 contenant 0,01 % d'eau oxygénée (GRAHAM et KARNOVSKY, 1966). Les coupes sont alors rincées pendant 30 min dans de l'eau distillée, déshydratées et montées dans l'Eukitt.

ÉPUISEMENT DES LECTINES MARQUÉES À LA PEROXYDASE
AVEC LE OU LES OSES INHIBITEUR(S) ET AVEC UNE PRÉPARA-
TION DE MUCINES BRONCHIQUES

LECTINES ISOLEES DE	INHIBITION	
	ose (s) 0,2 M	Mucines ° (fraction 2)
<u>Ricin</u> RCA _I RCA _{II}	- D. Galactose - D. Galactose - D. N-acétyl-galactosa- mine	30 mg/ml
<u>Fève Jack</u> Concanavoline A	- α methyl-D-manno- pyranoside - D-N-acétyl-glucosa- mine	
<u>Genêt épineux (I)</u>	- L Fucose	30 mg/ml
<u>Cacahuète</u>	- D Galactose	30 mg/ml
<u>Germe de Blé</u>	- D N-acétyl-glucosami- ne - Acide sialique	30 mg/ml
<u>Soja</u>	- D Galactose - D-N-acétyl-galactosa- mine	30 mg/ml
Lotier	- L Fucose	30 mg/ml
Limule	- Acide sialique	

La préparation de mucines utilisée pour réaliser l'épuisement des lectines marquées à la peroxydase est obtenue par chromatographie sur Sepharose 4B d'un mucus fibrillaire réduit (fraction 2) figure 17 de la 3ème partie.

BIBLIOGRAPHIE

- AMINOFF D., 1961
Biochem. J., 81, 384-392

- AVRAMEAS S., 1969
Immunochemistry, 6, 43-52

- BISERTE G., 1957
Bull. Soc. Chim. Bio., 39, suppl. n° 3, 93-158

- CHERVENKA C. H., 1970
Anal. Biochem., 34, 24-29

- DEGAND P., 1972
Thèse de Doctorat ès-Sciences, Lille

- DEGAND P., RUFFIN P., LAMBLIN G. et HAVEZ R., 1973
C.R. Acad. Sc. (Paris), 276, 113-116

- DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R., et BISERTE G., 1965
Bull. Soc. Chim. France, 12, 3506-3511

- FOLCH J. et LEES M. B., 1951
J. Biol. Chem., 191, 807-817

- GANTER P. et JOLLES C., 1970
Histochimie normale et pathologique, 1381-1848 (Gauthier-Villars Ed)

- GRAHAM R. C. et KARNOVSKY M. J., 1966
J. Histochem. Cytochem., 14, 291-302

- GRAY W.R. et HARTLEY B.S., 1963
Biochem. J., 89, 59-62

- GROS J. et LABOUESSE B., 1968
Europ. J. Biochem., 7, 463-470

- HIRS Ch. W., 1967
Methods in Enzymology (Hirs ed.) Academic press New-York, San Francisco, London, 11, 59-62

- HJERTEN S., 1962
Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 147-151

- HOUDRET N., SCHARFMAN A., MARTIN G. et ROUSSEL, 1975
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 126b, 175-180

- KABASAWA I. et HIRS Ch. W., 1972
J. Biol. Chem., 247, 1610-1624

- KINNEY R. M., SPILLANE J. T. et PEARCE G. W.
J. of Immunology, 93, 252-257

- KOHN J., 1957
Clin. Chim. Acta, 2, 297-303

- LAINE A., 1975
Thèse de Docteur 3è Cycle, Lille, 110 p.

- LAMBLIN G., LHERMITTE M., DEGAND P., SERGEANT Y. H. et ROUSSEL P., 1973
Biochim. Biophys. Acta, 322, 372-382

- LAURELL C. B. , 1965
Anal. Biochem. , 10, 358-361

- LIS H. et SHARON N. , 1972
Methods in enzymology , 28, 360-365 (Ginsburg V. ed.) Academic Press New-York and London

- LOTAN R. , SKUTELSKY E. , DANON D. et SHARON N. , 1975
J. Biol. Chem. , 272, 8518-8523

- MARSHALL J. D. , EVELAND W. C. et SMITH C. C. , 1958
Proc. of the Soc. for Exptl. Biol. and Med. , 98, 898-900

- MAZZUCA M. , 1974
J. Histochem and Cytochem. , 22, 993-996

- MOREL A. G. , VANDENHAMER C. J. A. , SCHEINBERG I. H. et ASHWELL C. , 1966
J. Biol. Chem. , 241, 3745-3749

- OSAWA T. et MATSUMOTO, 1972
Methods in Enzymology , 28, 323-327

- OUCHTERLONY O. , 1967
Handbook of Experimental immunology (WEIR, D. M. ed.), 655-706
Blackwell Scientific Publications, Oxford

- REINHOLD V. N. , 1972
Methods in enzymology (Hirs C. et Timascheff S. Ed.), 25, 244-249
Academic Press New-York and London

- ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P., WALKER-NASIR E. et
JEAN LOZ W., 1975
J. Biol. Chem., 250, 2114-2122

- SCHEIDEGGER J. J., 1955
Intern. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 7, 103-110

- SCHROEDER W. E., 1972
Methods in enzymology (Hirs C. and Timascheff S. Ed.) 25, 138-143
Academic Press New-York and London

- SHIER W. T., LIN Y. et DEVRIES A. L., 1972
Biochim. Biophys. Acta, 263, 406-413

- SPENCER B., 1960
Biochem. J., 75, 435-440

- TOMITA M., KUROKAWA T., ONOZAKI K., ICHIKI N., OSAWA T.
et UKITA T., 1972
Experientia, 28, 84-85

- VARNAKEL C., BAILLIEUX R. E. et JORNAIN F. L. J., 1963
J. Chromatog., 11, 421-423

- VRET BLAD P., 1976
Biochim. Biophys. Acta, 434, 169-176

- WATKINS W. M. et MORGAN W. T. J., 1962
Vox Sanguinis, 7, 129-150

- WEBER K. et OSBORN M., 1969
J. Biol. Chem., 244, 4406-4412

- WIDE L., 1969
Acta Endocr. Suppl. 142, 207-386

- WOODS K.R. et WANG K.T., 1967
Biochem. Biophys. Acta, 133, 369-370

- YPHANTIS D.A., 1964
Biochemistry, 3, 297-317

- ZACHARIUS R.M. , ZELL T.E., MORRISON J.H. et WODDLOCK J.J.
1969
Anal. Biochem. 30, 148-152

