

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376  
1983  
91

N° d'ordre : 597

50376  
1983  
91

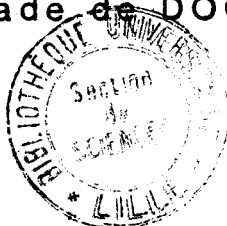
# THESE DE DOCTORAT D'ETAT ès Sciences Naturelles

option BIOCHIMIE

présentée par

**André LE TREUT**

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES



## LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES

### Approche de leur structure macromoléculaire

Soutenue le 3 Novembre 1983 devant le jury composé de

Président	Professeur	MONTREUIL J.
Examineurs	Professeurs	BISERTE G. JEANLOZ R.W.
Rapporteurs	Professeurs	FOURNET B. LOUISOT P. ROUSSEL P.

Le travail exposé dans ce mémoire a été réalisé à l'Unité de Recherches sur la Biochimie des Protéines (Unité INSERM No 16, Directeur : Professeur Philippe ROUSSEL) à Lille, et au Laboratoire de Biochimie Médicale B (Chef de Service: Professeur Jean Yves LE GALL), Faculté de Médecine, Rennes.

Je tiens à remercier très respectueusement:

- Monsieur le Professeur Gérard BISERTE qui a bien voulu m'accueillir à Lille au cours de l'année universitaire 1978-1979 en me permettant ainsi de bénéficier d'une délégation pour mission d'études; sa présence aujourd'hui dans le jury de thèse m'est témoignage de tout l'intérêt qu'il m'accorde;

- Monsieur le Professeur Jean Yves LE GALL qui n'a cessé d'encourager et de faciliter ma collaboration avec l'Unité INSERM No 16 de Lille; je suis particulièrement sensible à son amitié et à sa confiance;

- Monsieur le Professeur Philippe ROUSSEL qui, tout au long de ce séjour et bien après, m'a guidé avec beaucoup de patience et qui a accepté la lourde tâche de diriger ce travail.

Qu'il me soit également permis de remercier, pour l'honneur qu'il me font:

- Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL qui a accepté de présider le jury de thèse;

- Monsieur le Professeur Roger W. JEANLOZ qui a accepté de venir en France pour examiner ce travail;

- Monsieur le Professeur Bernard FOURNET qui a bien voulu rapporter et juger la thèse;

- Monsieur le Professeur Pierre LOUISOT qui m'a toujours accueilli et conseillé avec le plus grand intérêt, et qui aujourd'hui encore a accepté d'être rapporteur de thèse et de participer au jury.

Ce travail n'a pu se faire que grâce à la collaboration active et efficace des uns, et aux conseils et encouragements des autres. J'exprime donc toute ma gratitude à tous ceux qui, à des titres divers, chercheurs, techniciens et agents de laboratoire, m'ont permis de le mener à bien. Qu'il me soit permis de remercier plus particulièrement:

Arnold	BOERSMA	Michel	CATHELINE
Pierre	DEGAND	Jean Pierre	CODET
Annette	HAYEM	Jean François	DEZIER
Nicole	HOUDRET	Lucienne	GUENET
Pascale	HUMBERT	Anne	JEZEQUEL
Anne	LAINÉ	Martine	LE HERISSE-BLAYAU
Geneviève	LAMBLIN	Geneviève	LERAY
Michel	LHERMITTE	Pascale	THIERRY
Monique	LUYCKS		(à Rennes)
Colette	RICHET		
Andrée	SCHARFMAN		
Claude	VANDEPERRE	Claude	GALABERT
Danièle	VANDEPERRE	Monique	FILLIAT
	(à Lille)		(à l'Hôpital Renée Sabran, Giens)

pour le concours précieux et l'amitié qu'il m'ont toujours témoignés.

Je remercie également Monsieur CONIEZ qui a bien voulu se charger de certaines analyses par ultracentrifugation, au laboratoire de Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL (Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq).

Enfin une partie de ce travail a bénéficié d'une aide précieuse de l'Association Française de Lutte Contre la Mucoviscidose (contrat AFLM No 81/1).

## P U B L I C A T I O N S   R E L A T I V E S   A   L A   T H E S E

\*\*\*\*\*

Les travaux exposés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications ou communications suivantes :

Publications:

LE TREUT A., LAMBLIN G., HOUDRET N., DEGAND P. and ROUSSEL P.  
Reevaluation of the action of reducing agents on soluble mucus glycoproteins from human bronchial secretion.  
Biochimie (1981) 63 425-434.

HOUDRET N., LE TREUT A., LHERMITTE M., LAMBLIN G., DEGAND P. and ROUSSEL P.  
Comparative action of reducing agents on fibrillar human bronchial mucus under dissociating and non-dissociating conditions.  
Biochim.Biophys.Acta (1981) 668 413-419.

LE TREUT A., LAMBLIN G., JEZEQUEL A., LERAY G., GUENET L., DEGAND P.,  
LE GALL J.Y. and ROUSSEL P.  
Identification of proteoglycans in the sputum of a patient suffering from cystic fibrosis.  
Soumis à publication

LHERMITTE M., LE TREUT A., LAFITTE J.J., GALABERT C., FILLIAT M., LAMBLIN G.  
and ROUSSEL P.  
Concentration and distribution of soluble and insoluble macromolecules from sputum.  
Soumis à publication

SLAYTER H.S., LAMBLIN G., LE TREUT A., GALABERT C., HOUDRET N., DEGAND P.  
and ROUSSEL P.

Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein.

Soumis à publication

Affiches

LE TREUT A., LAMBLIN G., HOUDRET N., DEGAND P. and ROUSSEL P.

Action of mercaptoethanol on soluble mucus glycoproteins from human sputum.

In "Glycoconjugates : Proceedings of the Fifth International Symposium",  
Kiel, FRG, R. Schauer, P. Boer, E. Buddecke, M.F. Kramer, J.F.G. Vliegen-  
thart and H. Wiegandt Ed., Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1979) pp.538-539.

HOUDRET N., LE TREUT A., LHERMITTE M., LAMBLIN G., DEGAND P. and ROUSSEL P.

Revaluation of the action of disulfide-bond cleaving reagents on the struc-  
ture of gel-like bronchial mucus.

In "Glycoconjugates : Proceedings of the Fifth International Symposium",  
Kiel, FRG, R. Schauer, P. Boer, E. Buddecke, M.F. Kramer, J.F.G. Vliegen-  
thart and H. Wiegandt Ed., Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1979) pp.536-537.

LAMBLIN G., HOUDRET N., HUMBERT P., LE TREUT A. and ROUSSEL P.

Etude de la conformation macromoléculaire des mucines bronchiques humaines.

9è Journée sur la Chimie et la Biochimie des Glucides. 12-14 janvier 1981.  
Aussois (Savoie), France.

## A B R E V I A T I O N S

\*\*\*\*\*

ADN	Acide désoxyribonucléique
AS	'Amidoschwarz
ATCA	Acide trichloracétique
$\beta$ -ME	$\beta$ -mercaptoéthanol (2-mercaptoéthanol)
BT	Bleu de toluidine
BC	Bleu Coomassie
Cetavlon	Cetyltriméthylammonium bromure
Dansyl-	5-diméthylaminonaphtalène-1-sulfonyl-
DEAE-Cellulose	Diéthylaminoéthyl-cellulose
DTT	Dithiothréitol
ECTEOA-Cellulose	Epichlorohydrine triéthanolamine-cellulose
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
NANA	Acide N-acétylneuraminique
NGNA	Acide N-glycolylneuraminique
NS	Noir Soudan
PAS	Réactif de Schiff après oxydation periodique
PMSF	Phenyl-méthyl-sulfonyl fluorure
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	rotations par minute
SDS	Dodecyl-sulfate de sodium
Tris	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane



## S O M M A I R E

\*\*\*\*\*

	Page
INTRODUCTION GENERALE .....	1
 <u>PREMIERE PARTIE : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR L'ORGANISATION</u>	
<u>MOLECULAIRE DES MUCINES</u> .....	9
I. Caractéristiques chimiques générales des mucines .....	11
II. Organisation moléculaire des mucines de diverses origines .....	25
 <u>DEUXIEME PARTIE : ACTION DES AGENTS REDUCTEURS SUR LES MUCINES</u>	
<u>BRONCHIQUES</u> .....	93
I. Etude de l'action des agents réducteurs sur les mucines de la phase soluble du mucus bronchique .....	95
II. Etude de l'action des agents réducteurs sur les mucines de la phase fibrillaire du mucus bronchique .....	119
III. Discussion générale sur l'action des agents de réduction sur les mucines bronchiques .....	133
 <u>TROISIEME PARTIE : ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DES MUCINES</u>	
<u>BRONCHIQUES</u> .....	139
I. Influence de l'hydratation sur la solubilisation du mucus bronchique .....	143
II. Isolement des mucines bronchiques en l'absence des agents réducteurs. Etude de leurs propriétés physico-chimiques. Approche de leur configuration en microscopie électronique .	155
 <u>QUATRIEME PARTIE : RECHERCHE D'AUTRES FACTEURS D'ASSOCIATION DES</u>	
<u>MUCINES BRONCHIQUES</u> .....	187
 <u>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</u> .....	 203
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u> .....	211
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	235
<u>INDEX DES FIGURES</u> .....	261
<u>INDEX DES TABLEAUX</u> .....	265
<u>TABLE DES MATIERES</u> .....	267





# **INTRODUCTION GENERALE**

La muqueuse trachéo-bronchique élabore une sécrétion fondamentale intervenant activement dans la physiologie bronchique et dans la défense de l'arbre respiratoire vis-à-vis des agressions les plus variées dont celui-ci peut être l'objet. Cette sécrétion, ou mucus bronchique, en s'étalant en un mince film liquide à la surface de l'épithélium du tractus respiratoire, réalise une véritable barrière entre le milieu ambiant et les tissus sous-jacents; ce film constitue ainsi une protection efficace contre la dessiccation de la muqueuse; il constitue aussi le support dans lequel toute particule inhalée (poussière ou micro-organisme) est emprisonnée puis éliminée par le processus de l'épuration muco-ciliaire (Meyer et al., 1980; Mossberg, 1980; Puchelle et al., 1980b). Le mucus en effet, grâce à ses propriétés visco-élastiques particulières (King, 1980a, 1980b; Richardson, 1980) et sous l'action constante de la ciliature trachéo-bronchique (Blake et al., 1980), remonte progressivement les voies respiratoires jusqu'au pharynx où il est normalement dégluti.

Le mucus trachéo-bronchique est un milieu biologique très hétérogène constitué, dans les conditions physiologiques, d'environ 95% d'eau et de 5% de matières solides se répartissant schématiquement en protéines et glycoprotéines 3%, lipides 1% et sels minéraux 1% (Matthews et al., 1963; Lopez-Vidriero et al., 1980; Phipps, 1980). A cette hétérogénéité de composition s'ajoute aussi une hétérogénéité d'origine : le mucus bronchique provient en effet du mélange de multiples sécrétions produites tout au long des voies respiratoires.

Dans le secteur bronchique et accessoirement bronchio-laïre, ces sécrétions sont élaborées en partie par les cellules caliciformes ou cellules à mucus ("goblet cells") qui, avec les cellules ciliées à garniture vibratile, constituent l'épithélium de surface (Fig. 1). Mais ce sont

LUMIÈRE DE LA BRONCHE

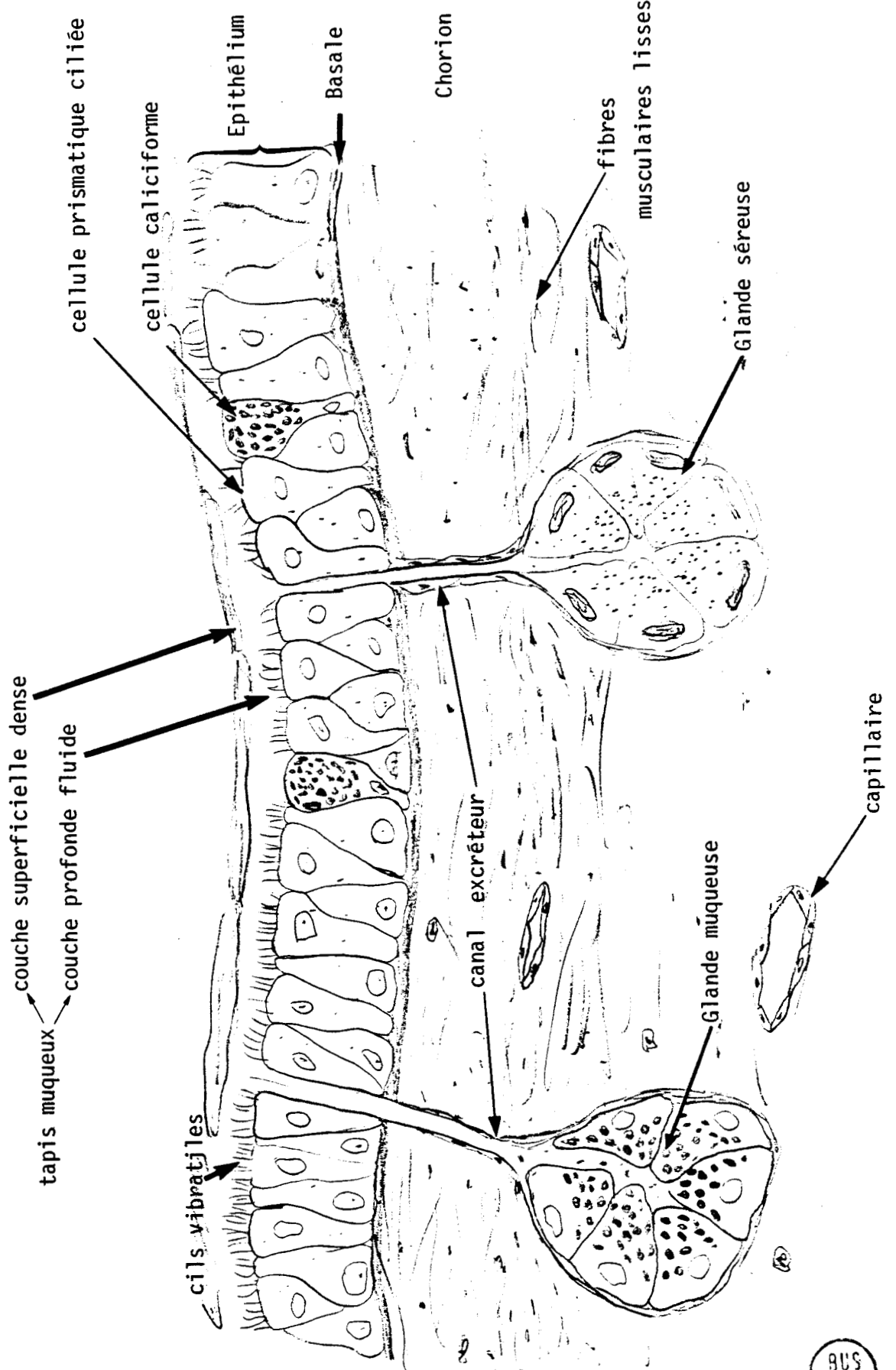


Figure 1. : Représentation schématique de la muqueuse bronchique

surtout les glandes acineuses ou tubulo-acineuses, de nature séreuse, muqueuse ou séro-muqueuse, enfouies dans la sous-muqueuse, qui constituent les principaux éléments sécrétoires (Sherman et al.,1981). Ces formations glandulaires sont avec les cellules caliciformes responsables en particulier de la synthèse de glycoprotéines de haut poids moléculaire et très riches en glucides combinés, appelées mucines.

A cette sécrétion purement trachéo-bronchique peuvent s'ajouter des éléments provenant de sources diverses (Jones et al.,1978):

- il en est ainsi des phospholipides, en particulier du surfactant, qui, produits par les pneumocytes dans les alvéoles pulmonaires et par les cellules de Clara à l'extrémité des bronchioles, jouent grâce à leurs propriétés tensio-actives un rôle essentiel dans l'expansion du tissu pulmonaire et dans le maintien de la capacité résiduelle fonctionnelle;

- les sécrétions bronchiques s'enrichissent encore de nombreux composants d'origine plasmatique tels que l'eau, des électrolytes, de l'albumine et diverses glycoprotéines qui sont déversées par extravasation capillaire dans la lumière de l'arbre respiratoire;

- des éléments figurés variés viennent également s'incorporer normalement à ces sécrétions : ce sont par exemple des cellules desquamées du revêtement bronchique, des macrophages et des leucocytes. En outre, en cas d'infection surajoutée, une flore microbienne plus ou moins abondante peut se développer et il apparaît, sous forme soluble ou sous forme de fibres (Bürgi,1964), une quantité plus ou moins importante d'acides nucléiques libérés par lyse cellulaire dans les zones inflammatoires (Matthews et al.,1963).

Le mucus bronchique, qui est la résultante du mélange de ces diverses productions, présente une différentiation progressive dans son cheminement des bronchioles vers la trachée : disposé en un mince film liquide dans les bronchioles, le mucus s'organise à partir des bronches en deux couches superposées, une couche superficielle visqueuse, véritable tapis muqueux qui en microscopie apparaît constitué d'un réseau fibrillaire plus ou moins dense (Bürgi,1965a,1965b), et une couche profonde fluide dans laquelle battent les éléments vibratiles de l'épithélium (Fig. 1). C'est sous l'action constante de la ciliature bronchique, et grâce aux propriétés

intrinsèques d'élasticité et de viscosité de ce réseau fibrillaire, que le mucus se déplace vers les voies aériennes supérieures assurant ainsi l'épuration broncho-pulmonaire.

Le volume des sécrétions produites à l'état normal par le tractus respiratoire est mal connu et diversement apprécié selon les auteurs (Clarke et al., 1980). L'estimation de 100 ml/24h faite par Policard et al. (1945) semble devoir être retenue comme une valeur moyenne.

Le mécanisme de la sécrétion du mucus bronchique et sa régulation restent encore à élucider (Adler et al., 1981). La participation de neuromédiateurs et de récepteurs spécifiques est cependant bien établie, comme l'est l'action stimulante des agents sympathicomimétiques (Nadel et al., 1980b; Peatfield et al., 1980a, 1980b; Shelhamer et al., 1980).

En tout état de cause, le mucus bronchique produit dans les conditions physiologiques n'est jamais expectoré mais dégluti. Cette absence d'extériorisation a été et reste encore un obstacle important dans l'étude biochimique du mucus bronchique normal (Carlstedt, 1982). C'est souvent par divers artifices tels que l'aspiration bronchique par l'orifice d'une trachéotomie (Snyder et al., 1982a) ou encore le lavage broncho-alvéolaire réalisé sous fibroscopie en zone macroscopiquement saine (Lafitte et al., 1977) que de petites quantités de mucus normal ont pu être recueillies, permettant ainsi une meilleure définition biochimique de ces sécrétions. Dans une étude récente cependant, réalisée chez des sujets volontaires normaux et non fumeurs, Williams et al. (1982) ont réussi par bronchofibroscopie à collecter, directement et en l'absence de toute prémédication, une quantité suffisante de mucus trachéo-bronchique pour étudier le comportement des mucines en gel filtration. L'inhalation chez un sujet normal d'agents divers cholinergiques (acétylcholine), bronchoconstricteurs (histamine, prostaglandine PGF<sub>2α</sub>) ou de simples irritants (acide citrique) a permis dans certains cas de produire une expectoration (Lopez-Vidriero et al., 1977, 1978c), mais le caractère normal de celle-ci est difficile à affirmer; ces substances peuvent en effet entraîner une modification plus ou moins profonde de la sécrétion bronchique (Boat et al., 1978) et l'hypothèse d'une contamination possible par des sécrétions nasopharyngées et salivaires ne peut être complètement écartée (Mitchell-Heggs, 1977).

Les mucines bronchiques représentent dans les sécrétions normales ou pathologiques le principal constituant macromoléculaire. Ces glycoprotéines de très haut poids moléculaire, élaborées par le tractus respiratoire, sont pour une large part responsables de l'aptitude des sécrétions bronchiques à former un gel, et conditionnent ainsi directement deux propriétés rhéologiques essentielles du mucus : sa viscosité et son élasticité. Toute altération de la structure des mucines ou de leur organisation supramoléculaire, c'est-à-dire de la structure des édifices complexes que ces molécules peuvent former par association avec d'autres substances présentes dans le mucus, sera susceptible de retentir sur les propriétés rhéologiques des sécrétions bronchiques. Les molécules qui ainsi sont susceptibles de s'associer aux mucines sont nombreuses : protéines, en particulier protéines sériques comme la sérumalbumine, immunoglobulines A sériques 7 S et sécrétoires 11 S (Puchelle et al., 1973; Harbitz et al., 1980; Hayem et al., 1980a; Kotlar et al., 1980; Stockley et al., 1980a), lipides (Sahu et al., 1978b; Galabert et al., 1981), acides nucléiques (Picot et al., 1978), ou encore peut-être des composants de faible poids moléculaire comme les polypeptides riches en proline ("PRP") (Bailleul et al., 1977). De cette éventuelle altération de la structure des mucines, il peut résulter une modification de la fonction de transport muco-ciliaire, exposant ainsi à l'encombrement de l'arbre respiratoire. Cette circonstance est fréquemment observée dans les bronchopathies chroniques.

La fréquence de ces affections, leur gravité et leur caractère invalidant, la charge économique aussi qu'elles représentent pour la société, justifient amplement les efforts importants qui ont été et sont encore investis pour une meilleure connaissance sur le plan fondamental des sécrétions trachéo-bronchiques et plus particulièrement de la structure et de l'organisation macromoléculaire de leurs mucines. C'est en effet cette connaissance, actuellement encore fragmentaire et parfois contradictoire, qui seule permettra de mieux cerner le rôle précis que ces substances jouent dans la physiologie bronchique, de mieux comprendre aussi les mécanismes pathogéniques qui président à l'installation et à l'évolution des bronchopathies chroniques, et de mieux définir enfin les orientations thérapeutiques adaptées à chaque maladie.

Avant d'exposer la contribution expérimentale que nous apportons pour une meilleure connaissance de ces mucines, il nous a semblé important de présenter une revue générale des conceptions actuelles sur la structure et l'organisation moléculaire non seulement des mucines bronchiques, mais aussi des mucines rencontrées dans d'autres sécrétions externes de l'organisme telles que la salive, le mucus gastrique ou le mucus cervical. Les acquisitions ou les hypothèses qui ont été faites à propos de ces mucines peuvent en effet, sinon se transposer, du moins assurer une meilleure approche et une meilleure compréhension des résultats expérimentaux enregistrés en matière de mucines bronchiques.





# **PREMIERE PARTIE**

**ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR  
L'ORGANISATION MACROMOLECULAIRE  
DES MUCINES**

La production de mucus n'est pas l'apanage du seul tractus respiratoire : d'autres organes, parmi lesquels les glandes salivaires, l'estomac l'intestin ou le col utérin par exemple, possèdent aussi les éléments sécrétoires qui leur permettent d'assurer une telle sécrétion.

Bien que jouant des rôles spécifiques propres à chaque localisation, ces divers mucus assurent une fonction commune de protection et de lubrification des muqueuses sous-jacentes, et cette communauté fonctionnelle se reflète dans la similitude de leurs propriétés physiques et de leurs propriétés chimiques.

Les mucines, qui représentent dans tous ces mucus le principal constituant macromoléculaire, ont été l'objet d'explorations biochimiques poussées. Ces recherches ont montré que, d'une façon générale quelle que soit leur origine, les mucines manifestent des caractéristiques communes en particulier de composition chimique, mais par contre leur organisation macromoléculaire demeure encore mal comprise et diversement interprétée. L'étude de l'architecture macromoléculaire des mucines, dont la connaissance est indispensable pour comprendre la physiologie et la pathologie du mucus, reste en conséquence une préoccupation importante à l'heure actuelle.

**I. Caractéristiques  
chimiques générales  
des mucines**

Les préparations de mucines hautement purifiées apparaissent comme étant des glycoprotéines de très haut poids moléculaire, comportant deux types de constituants d'importance pondérale relative très inégale : la fraction majeure est de nature glycanique tandis que la fraction mineure est de nature peptidique (Gallagher et al., 1978).

La partie protéique, représentant 10 à 30% du poids de la molécule, constitue la fraction mineure des mucines. Elle est organisée en un axe polypeptidique avec une composition en acides aminés tout à fait caractéristique (Tableau I). Les hydroxyaminoacides (sérine et thréonine) représentent 40 à 50% de l'ensemble des acides aminés, et constituent avec la proline, la glycine et l'alanine les trois quarts de l'édifice protéique (Roberts, 1978a; Roussel et al., 1978; Carlstedt et al., 1983b). La teneur en acides aminés à caractère hydrophobe, basique ou aromatique est faible (Forstner, 1978). La proportion de résidus cystéine est généralement inférieure à 2% (Roussel et al., 1978); elle peut même être nulle dans le cas des mucines sous-maxillaires de Mouton (Hill et al., 1977a).

La fraction glycanique constitue 70 à 85% de la masse moléculaire des mucines : elle en représente donc la fraction majeure. Elle est formée d'un nombre élevé de chaînes oligosaccharidiques, linéaires ou ramifiées, branchées par liaisons covalentes sur l'axe polypeptidique, à la manière des poils hérissés d'un goupillon de laboratoire.

Ces chaînes oligosaccharidiques sont constituées de L-fucose, D-galactose, N-acétyl-D-glucosamine et de N-acétyl-D-galactosamine, ainsi que d'acides sialiques (essentiellement acide N-acétylneuraminique, parfois acide N-glycolylneuraminique) (Fig. 2). En règle gé-

ACIDES AMINES	μmoles / g	nombre de résidus pour 100 résidus
Asp	48	3.2
Thr	403	26.6
Ser	239	15.8
Glu	71	4.7
Pro	158	10.4
Gly	125	8.2
Ala	156	10.3
Val	63	4.2
<sup>1</sup> / <sub>2</sub> Cys	9	0.6
Met	traces	
Ile	37	2.4
Leu	68	4.5
Tyr	10	0.7
Phe	16	1.1
Lys	37	2.4
His	38	2.5
Arg	39	2.6

Tableau I : Composition-type en acides aminés d'une mucine bronchique humaine. (mucine à caractère neutre isolée chez un patient atteint de bronchite chronique; d'après Lamblin G. et Coll., 1979)



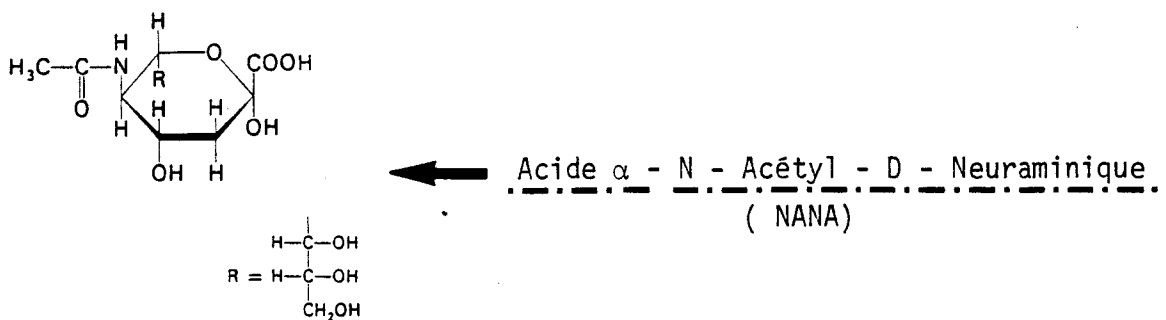
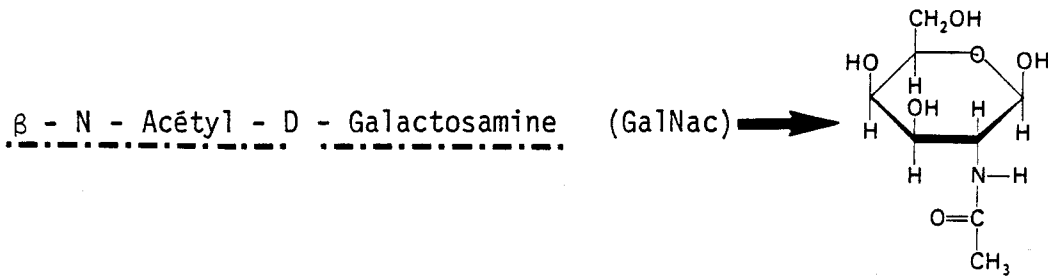
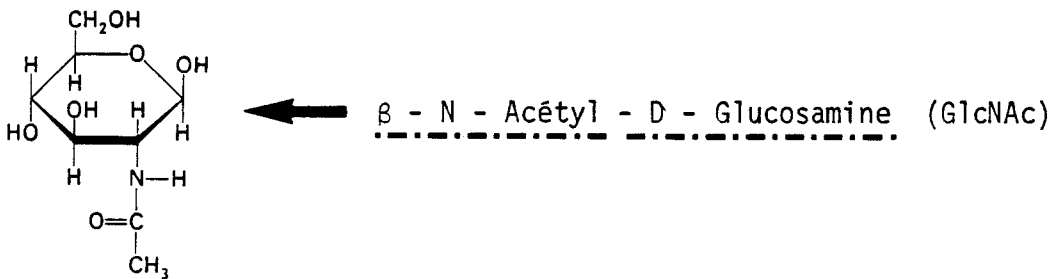
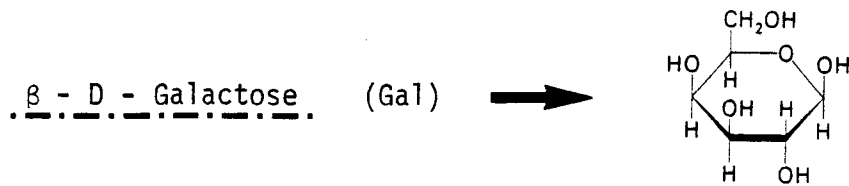
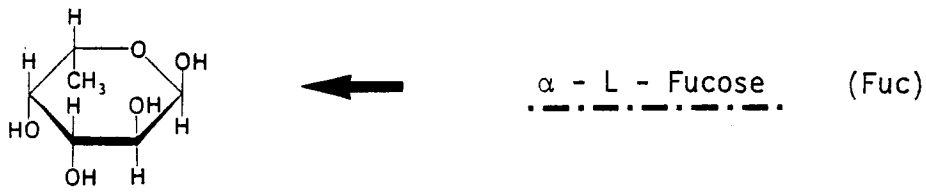


Figure 2 : Monosaccharides constitutifs des mucines

nérale, elles ne comportent pas de résidus glucose, mannose ou d'acides uroniques (Forstner, 1978). Dutta et al. (1982) ont cependant décrit récemment dans les mucines sous-maxillaires isolées chez la Chèvre l'existence de D-glucose et de D-mannose. Les chaînes sont parfois sulfatées (Havez et al., 1976), vraisemblablement au niveau de résidus galactose (Roussel et al., 1975) ou N-acétylglucosamine (Horowitz, 1967). Le Tableau II, illustrant la composition chimique obtenue par l'analyse de mucines humaines d'origine bronchique, salivaire, gastrique, intestinale, colique et cervicale, souligne la parenté moléculaire que présentent ces substances.

Par traitement des mucines en milieu alcalin en présence de borohydrure de sodium, il a été possible d'établir que la liaison glycanne - protéine est du type O-glycosidique (GalNAc → Ser/Thr), s'établissant entre un résidu de N-acétyl-D-galactosamine et un résidu hydroxyaminoacide sérine ou thréonine (Fig. 3) (Ginsburg et al., 1969; Havez et al., 1969; Bella et al., 1972; Kornfeld et al., 1976). En effet, sous l'action de ce traitement, les liaisons qui répondent à cette structure sont rompues dans une réaction de  $\beta$ -élimination au cours de laquelle les résidus N-acétyl-D-galactosamine engagés dans la liaison sont réduits, donnant l'alcool correspondant : le N-acétylgalactosaminitol.

La liaison N-acétylgalactosaminyl-sérine (ou - thréonine) n'est pas une particularité des mucines : on la retrouve dans de nombreuses autres glycoprotéines (Kornfeld et al., 1976; Strecker et al., 1979). En outre, par sa nature O-glycosidique et son alcali-labilité, ce type de liaison est à rapprocher de celui que l'on peut observer dans les protéoglycannes (chondroïtine-sulfates, dermatane-sulfate, héparine), dans lesquels cependant l'ose engagé dans la liaison glycanne - protéine est le xylose: Xyl → Ser (Lindahl et al., 1972), (Fig. 4A). Par contre, les liaisons rencontrées dans les collagènes (Butler et al., 1966) ou les glycopeptides des membranes basales glomérulaires (Spiro, 1967) sont d'un type sensiblement différent : ces liaisons, bien qu'étant aussi de type O-glycosidique, s'établissent en effet entre un résidu de galactose et un résidu d'hydroxylysine (Gal → Hyl), et sont de plus alcali-stables (Fig. 4B). Tout autre enfin est la liaison N-acétylglucosaminyl-asparagine (GlcNAc → Asn) s'établissant entre un résidu de N-acétylglucosamine et l'azote amidé d'un résidu d'asparagine sur l'axe polypeptidique (Fig. 4C). Cette liaison de type N-glycosidique est très répandue : elle est commune, à quelques exceptions près, à tou-



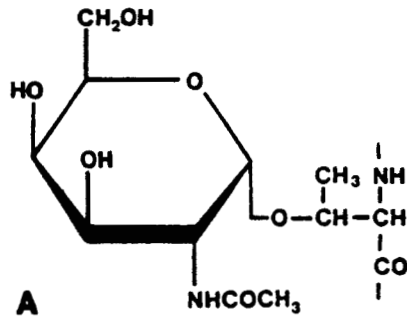
ORIGINE DE LA MUCINE	bronchique (Lambelin et al. 1979) "A1"	salivaire (Oemrawsingh et al., 1974)	gastrique (Schrager et al., 1971)	intestinale (Jabbal et al. 1976)	colique (Gold et al. 1974)	cervicale (Yurewicz et al., 1981)
ACIDES AMINES <sup>†</sup>	14.9	34.7	17	12	33	21
RESIDUS SUCRES <sup>φ</sup>						
Fuc	1.3	2.1	2.1	0.3	0.5	1.1
Gal	3.3	3.1	3.1	1.3	1.1	1.8
GalNAc	1	1	1	1	1	1
GlcNAc	2.5	2.7	2.4	1	1	0.9
NANA	0.09	1.2		0.10		0.45
SULFATES <sup>†</sup>	0.8	+	7	ND	1.6	1

† : Pourcentage du poids sec

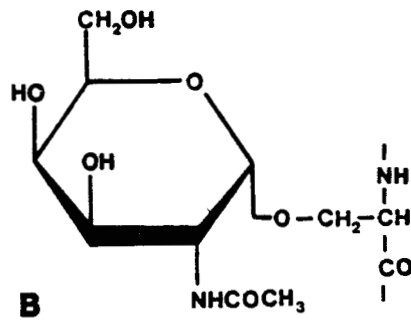
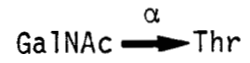
φ : Rapport molaire (par rapport à GalNAc)

ND: Non déterminé

Tableau II : Composition chimique de diverses mucines d'origine humaine



Liaison O-Glycosidique



Liaison O-Glycosidique

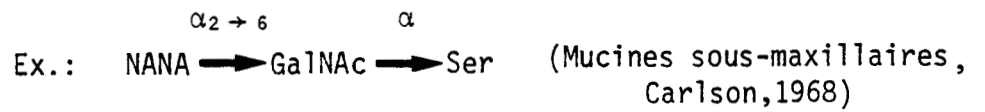
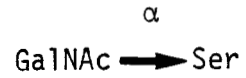


Figure 3 : Liaisons O-Glycosidiques observées dans les mucines





tes les N-glycosyl-protéines telles que par exemple l'  $\alpha$ 1-glycoprotéine acide humaine (Schwarzmann et al., 1974), l'ovomucoïde de Poule (Fournet et al., 1974) ou la transferrine humaine (Spik et al., 1975).

Dans les mucines, la proportion de résidus hydroxyaminoacides engagés dans les liaisons glycanne - protéine est élevée, comme l'indiquent les résultats du traitement alcalin en présence de borohydrure sur les mucines bronchiques isolées chez un patient atteint de mucoviscidose (Roussel et al., 1975) : sur 100 résidus d'acides aminés, 12 résidus de sérine et 16 résidus de thréonine au moins sont détruits dans ces conditions. Bien qu'un certain nombre de liaisons glycanne-protéines résistent au traitement alcalin, il ne semble pas que ces liaisons soient du type N-glycosidique alcali-résistant, s'établissant entre un résidu d'asparagine et un résidu de N-acétylglucosamine. En effet, Roussel et al. (1975) ont fait remarquer que la pauvreté en acide aspartique de ces glycopeptides résistants ne plaide pas en faveur de la présence de ce type de liaison. Ils ont suggéré que la résistance au traitement alcalin résulte plus vraisemblablement du clivage de liaisons peptidiques au voisinage du branchement du glycanne sur l'axe polypeptidique, lequel clivage s'oppose à la réaction de  $\beta$ -élimination normalement observée en présence de borohydrure de sodium. Cette grande densité d'implantation des chaînes glycaniques dans les mucines, dont l'axe polypeptidique est ainsi rendu d'accès difficile, a pour conséquence de rendre cet axe particulièrement résistant à l'attaque protéolytique (Variyam et al., 1983).

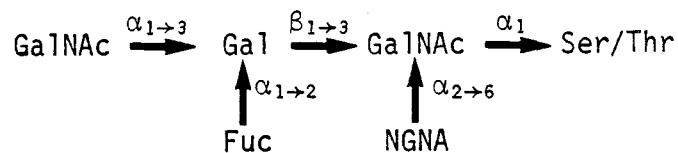
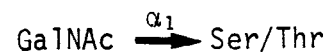
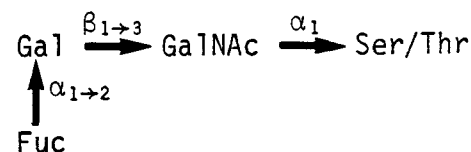
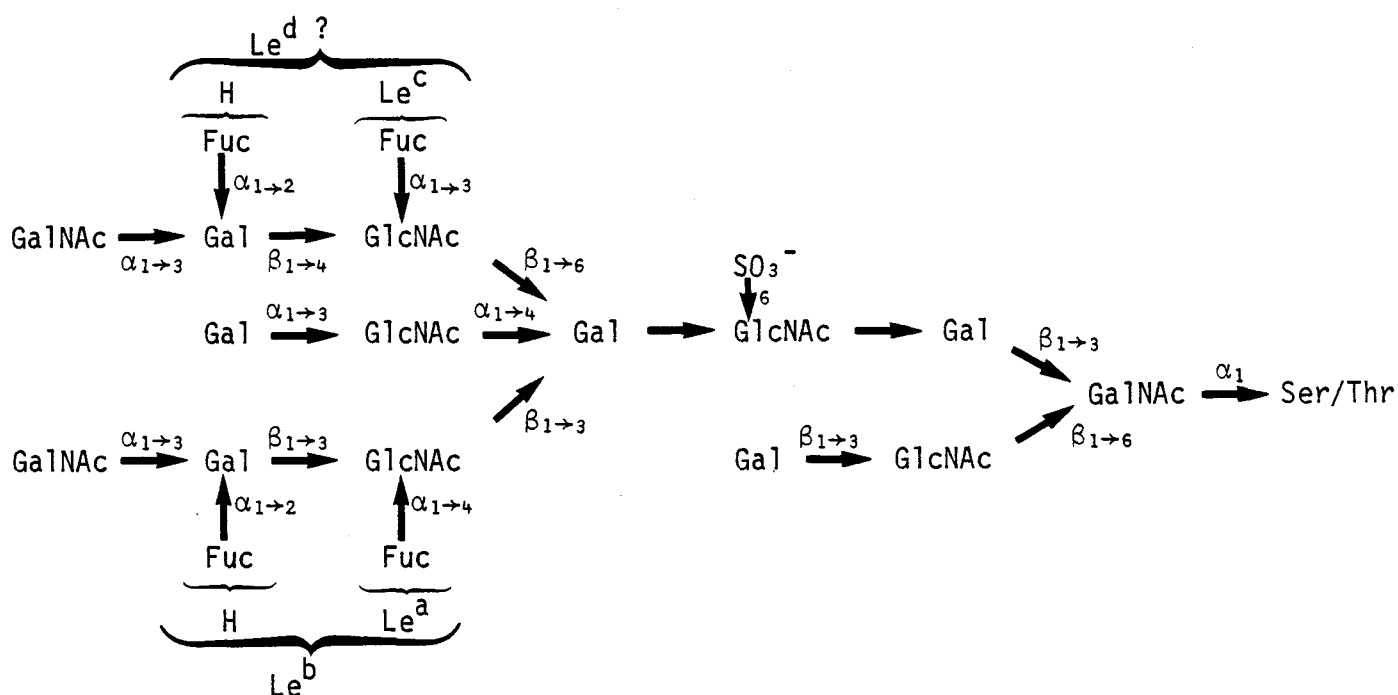
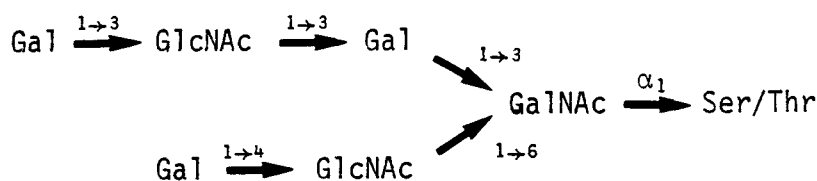
L'une des caractéristiques essentielles de la copule glucidique des mucines est la grande hétérogénéité que l'on peut observer dans la longueur des chaînes oligosaccharidiques (cette longueur peut, selon l'origine du mucus et l'espèce considérée, varier de 1 à environ 20 résidus de sucre). Dans les mucines sous-maxillaires de Porc par exemple, les séquences oligosaccharidiques qui ont été observées vont du monosaccharide au pentasaccharide (Carlson, 1968; Kornfeld et al., 1976; Aminoff et al., 1979; Hounsell et al., 1980; Van Halbeek et al., 1981). A partir de mucines bronchiques humaines, isolées chez des patients atteints de bronchite chronique, Lamblin et al. (1980) ont caractérisé 5 oligosaccharides neutres courts (di- et trisaccharides). La complexité des chaînes glycaniques peut être beaucoup plus importante, comme le témoignent les structures proposées

dans le cas de mucines gastriques (Slomiany et al., 1972; Oates et al., 1974; Schrager et al., 1974), ou de mucines de kystes ovariens (Lloyd et al., 1968) (Fig. 5). Cette grande variabilité de la longueur des chaînes glycaniques dans les mucines peut naturellement être le reflet de l'expression de l'activité plus ou moins intense de différentes glycosyltransférases lors de la biosynthèse de ces molécules, mais elle peut être aussi la conséquence dans une certaine mesure de l'action hydrolytique de glycosidases variées, peut-être d'origine bactérienne, sur les mucines au sein des mucus. Dans certains cas, les extrémités non réductrices de certaines chaînes oligosaccharidiques présentent des structures glycaniques qui sont génétiquement déterminées (Roussel et al., 1978; Boat et al., 1980; Hounsell et al., 1982), comme par exemple les antigènes ABO(H) des substances de groupe sanguin, les antigènes Lewis a et b (Kabat, 1973; Watkins, 1980), les antigènes I et i (Feizi et al., 1971; Hounsell et al., 1980; Wood et al., 1980), ou encore l'antigène SSEA-1, antigène embryonnaire récemment décrit par Feizi (1981) et par Gooi et al., (1981). Slomiany et al. (1982) ont également caractérisé chez le Chien des mucines gastriques portant le déterminant de l'antigène Forssman.

Une autre source importante d'hétérogénéité /des chaînes glycaniques de mucines est représentée par leur degré d'acidité très variable (Lamblin et al., 1977a; Forstner, 1978). En effet, de façon plus ou moins arbitraire, les mucines sont classées en trois catégories : les unes sont relativement pauvres en résidus acides et sont appelées "mucines neutres", d'autres sont plus riches en acides sialiques qu'en sulfate, les dernières enfin sont plus riches en sulfate qu'en acides sialiques. Il est intéressant de noter que dans les mucines provenant du même individu et de la même sécrétion muqueuse, il coexiste des chaînes à caractère neutre et des chaînes à caractère acide, sulfatées et/ou sialidées (Roussel et al., 1975; Roberts, 1978a). En outre, comme le schématise la figure 6, on peut établir une relation entre le caractère acide de ces chaînes glycaniques et leur longueur moyenne (Lamblin et al., 1979) : les mucines riches en acides sialiques possèdent les chaînes glycaniques les plus courtes, de l'ordre de 5 à 6, tandis que les mucines sulfatées ou les mucines neutres ont des chaînes glycaniques en moyenne plus longues. Les groupes sulfate et acide sialique, fortement ionisés, confèrent aux glycoprotéines qui les portent une charge négative non négligeable et il est probable que, par la répulsion qu'ils contribuent ainsi à développer entre les chaînes glycaniques voisi-

Mucine sous-maxillaire (Porc)

(Carlson, 1968)

(Van Halbeek et al., 1981)Mucine sous-maxillaire (Porc)(Kornfeld et al., 1976)Mucine bronchique (Homme)(Lamblin et al., 1980)Mucine gastrique (Homme)(Oates et al., 1974)Mucine de kyste ovarien (Homme) (Lloyd, 1968).

Les structures oligosaccharidiques des mucines gastriques humaines (Schrager et al., 1974) et porcines (Slomiany et al., 1972) sont très proches de cette structure.

**Figure 5 :** Exemples de structures oligosaccharidiques proposées pour des mucines d'origines variées .

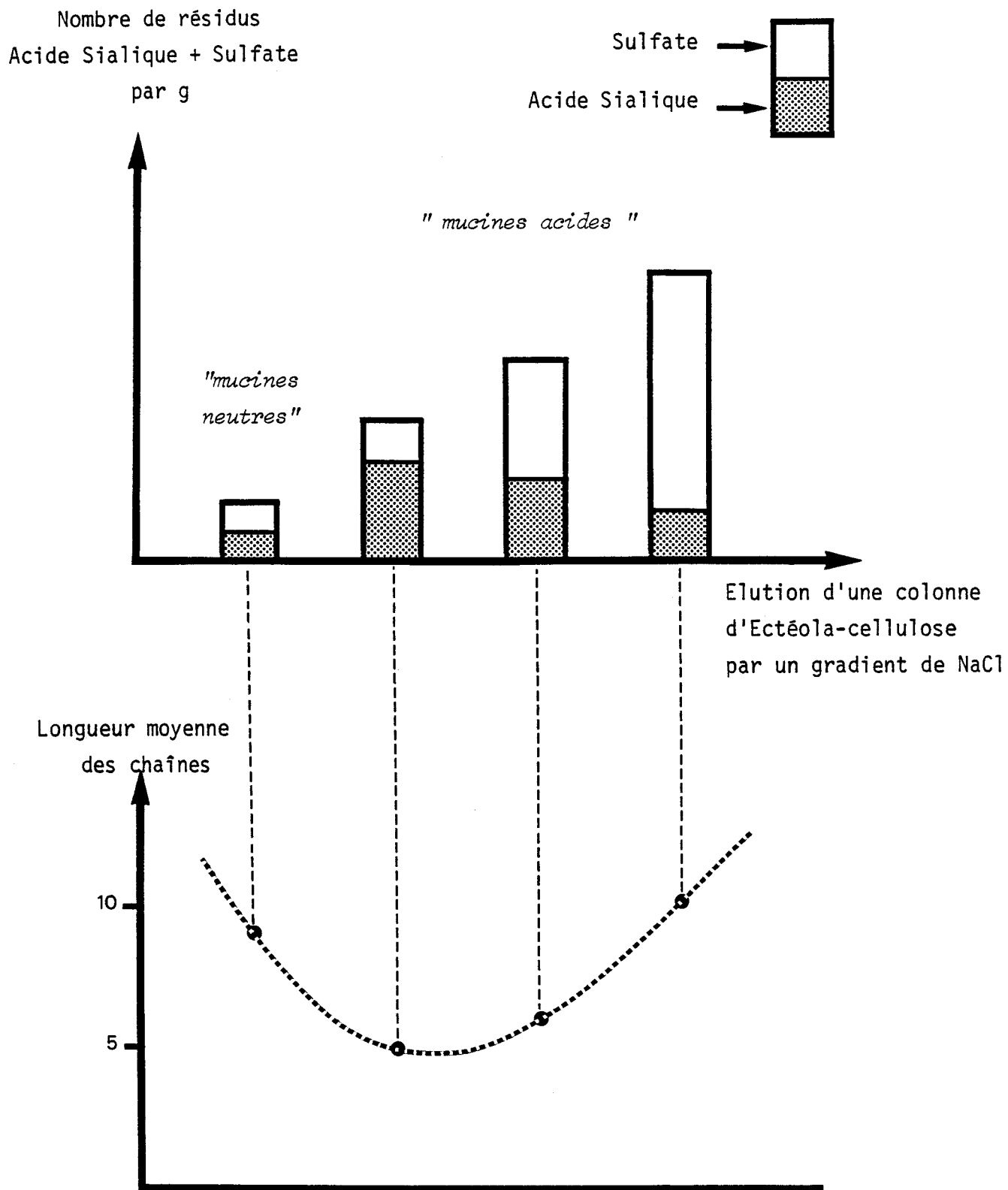


Figure 6 : Représentation schématique de la relation existant entre le caractère d'acidité des mucines et la longueur moyenne de leurs chaînes glycaniques.

nes, ils jouent un rôle important dans l'expansion de la structure tertiaire et donc dans la viscosité des mucines (Allen, 1978).

La masse moléculaire des mucines est très élevée, mais elle n'est pas connue de façon précise. Cette carence est liée à un certain nombre de difficultés :

1) tout d'abord à la taille même de ces molécules : les mucines sont des macromolécules qui, à l'état natif, se présentent sous forme agrégée, donnant des solutions visqueuses et possédant une masse évaluée à plusieurs millions de daltons;

2) ce sont en outre des molécules qui établissent facilement des liaisons faibles avec d'autres constituants présents dans les sécrétions muqueuses, tels que des lipides, des peptides et des protéines variés éventuellement d'origine plasmatique, ou encore des acides nucléiques. Le procédé de purification des mucines doit permettre d'éliminer au maximum ces contaminants, faiblement liés aux mucines proprement dites, mais dans le même temps il doit rester suffisamment doux pour ne pas fragmenter la mucine elle-même;

3) une autre source d'incertitude sur la masse moléculaire de ces macromolécules réside dans l'hétérogénéité intrinsèque déjà signalée de la copule glucidique dont le nombre et la longueur des chaînes glycaniques varie d'une mucine à l'autre.

Compte tenu de la difficulté d'obtention de mucines "propres", compte tenu aussi de l'approximation inhérente aux méthodes de détermination des coefficients de sédimentation, compte tenu enfin de l'origine variable et de l'hétérogénéité du matériel étudié, il n'est pas surprenant de constater que les valeurs rapportées pour la masse moléculaire des mucines natives soient très dispersées, allant de 1 à 3 000 000 daltons selon les groupes qui les ont analysées, (Roberts, 1974; Starkey et al., 1974; Forstner, 1978; Allen et al., 1980).

Il faut enfin remarquer que sous l'action d'agents mucolytiques tels que les agents réducteurs (2-mercaptoéthanol ou dithiothréitol), il est observé une diminution considérable de la taille des mucines natives. Ce phénomène traduit la dégradation partielle de l'édifice macromoléculaire et se manifeste physiquement par la diminution de la viscosité de la solution, et par la chute brutale de la masse moléculaire moyenne des mucines. Les structures obtenues dans ces conditions ont une masse moléculaire qui se



situé entre 400 000 et 600 000. Ce comportement est partagé par les mucines d'origines les plus diverses telles que par exemple les mucines bronchiques (Degand et al., 1973c; Creeth et al., 1977; Lamblin et al., 1979), les mucines gastriques (Snary et al., 1970; Scawen et al., 1977) ou les mucines cervicales (Gelman et al., 1976). Dans certaines conditions, la diminution de taille moléculaire après réduction est encore plus spectaculaire : c'est ainsi qu'une mucine gastrique de Porc de masse moléculaire égale à 250 000 (Starkey et al., 1974) ou une mucine bronchique de masse égale à 180 000 (Whitney et al., 1978) ont pu être isolées.

**II. Organisation moléculaire  
des mucines  
de diverses origines**

## A/ LES MUCINES DIGESTIVES

Le tractus digestif est tapissé de la bouche au rectum par une sécrétion riche en mucines. Les éléments sécrétoires de ce mucus ne sont pas également répartis tout au long du tube digestif : le colon et le rectum apparaissent en effet beaucoup plus riches en cellules caliciformes que les étages supérieurs. Par ses propriétés lubrifiantes, le mucus secrété apporte, quel que soit l'étage considéré, une protection efficace de la muqueuse sous-jacente contre l'abrasion mécanique causée par le passage des aliments; le tapis muqueux constitue aussi pour la paroi une protection contre la menace chimique que représente la présence des sucs digestifs très actifs dans la lumière de l'organe. La menace est sans aucun doute la plus importante dans l'estomac où l'agression vient de deux composants essentiels du suc gastrique :

1) l'acide chlorhydrique tout d'abord, dont on sait que la concentration peut, lorsque la sécrétion est stimulée, atteindre 150 mmol/l. Williams et al. (1980) et Pfeiffer (1981) ont montré le rôle protecteur que jouent les mucines gastriques en s'opposant à la diffusion des protons. Nimmerfall et al. (1980) et Smithson et al. (1981) ont également exploré la diffusion de nombreuses autres substances au travers du tapis muqueux couvrant la muqueuse intestinale. Il a ainsi été montré que le mucus constitue une barrière importante à la diffusion des produits alimentaires vers les sites spécifiques intestinaux d'absorption, de transport et de digestion.

2) la pepsine ensuite, enzyme protéolytique dont l'action est facilitée par l'acidité du milieu .

Les principaux travaux sur les mucines digestives ont été consacrés à l'étude des mucines gastriques, intestinales et coliques. De l'ensemble important des résultats enregistrés au cours de ces travaux, il apparaît

que ces mucines manifestent les caractères physiques et chimiques communs à toutes les mucines, caractères déjà évoqués précédemment. Elles manifestent aussi certaines particularités, en particulier de structure tertiaire, particularités qui laissent penser à une certaine spécialisation de ces molécules selon l'étage digestif considéré.

### 1) Organisation moléculaire des mucines salivaires.

Les glandes sous-maxillaires et sublinguales sont avec les nombreuses glandes salivaires accessoires (labiales, palatines, jugales et linguales), à l'origine des mucines salivaires; mais, si par le volume de salive secrété, le rôle de ces dernières glandes est mineur, ce sont elles qui cependant constituent 70% de l'origine des mucines salivaires (Tabak et al., 1982). Ces mucines exercent de nombreuses fonctions biologiques : elles assurent la lubrification des muqueuses buccales, facilitant le cheminement du bol alimentaire vers l'oesophage; elles assurent aussi une fonction de protection de ces muqueuses contre la dessiccation et les agressions exogènes chimiques ou physiques; elles interviennent également dans la régulation de la flore bactérienne locale en permettant l'adhérence et le développement sur les muqueuses ou l'émail dentaire de certains microorganismes, mais, par phénomène de compétition, ces mucines peuvent aussi s'opposer à l'implantation d'autres microorganismes qui se trouvent donc déplacés et entraînés vers les voies digestives basses et ainsi épurés.

De très nombreuses études ont été réalisées sur les mucines salivaires dans différentes espèces animales, parmi lesquelles :

- l'Homme : Oemrawsingh et al. (1974), Prakobphol et al. (1982), Roukema et al. (1982);
- le Singe : Herzberg et al. (1979), Hatton et al. (1982);
- le Mouton : Hill et al. (1977a, 1977b), Sachdev et al. (1979);
- le Porc : Carlson (1968), De Salegui et al. (1969), Gottschalk et al. (1972);
- le Rat : Malinowski et al. (1981);
- le Chien : Lombart et al. (1972, 1974);

- la Chèvre : Dutta et al. (1982);
- le Boeuf : Tettamanti et al. (1968), Pigman et al. (1973);
- le Tatou : Wu et al. (1979).

Chez l'Homme et le Singe, ces études ont été menées sur la salive extraparotidienne; dans les autres espèces, le matériel utilisé était constitué des homogénats de glandes sous-maxillaires.

Les méthodes mises en oeuvre pour l'isolement et la purification des mucines salivaires ont également été très variées :

- chauffage à 100 °C, extraction par le chloroforme et filtration sur Biogel P-300 (Oemrawsingh et al., 1974);
- chauffage à 100°C puis filtration sur Sephacryl S-200 (Malinowski et al., 1981).
- filtration sur Sephadex G-200, réduction, filtration sur Sepharose CL-2B en urée 6M, puis échange ionique sur CM52-Cellulose en urée 6M (Herzberg et al., 1979);
- formation d'un complexe par le bromure de cetyltriméthylammonium (Cetavlon), puis précipitation fractionnée par l'éthanol (Tettamanti et al., 1968);

L'examen des résultats d'analyse chimique des substances isolées montre d'une façon générale une composition en acides aminés caractéristique des mucines (Tab. III). Il convient cependant de remarquer pour plusieurs de ces mucines une faible teneur ou même l'absence de certains acides aminés tels que cystéine, méthionine, tyrosine, phénylalanine ou histidine. Chez le Rat, la teneur en acides aminés basiques, en particulier en lysine, est exceptionnellement élevée (Malinowski et al., 1981). Cette particularité pourrait, selon ces auteurs, jouer un rôle physiologique dans les propriétés tampon des sécrétions salivaires chez le Rat.

Contrastant avec la relative stabilité de composition du squelette peptidique, les chaînes oligosaccharidiques, qui apparaissent toujours branchées par des liaisons O-glycosidiques sur des résidus de sérine ou de thréonine, manifestent selon les espèces considérées une assez grande variabilité dans leur composition et leur structure (Fig. 7). Les données structurales ont été rassemblées dans quelques revues générales importantes : Gottschalk et al. (1972), Kornfeld et al. (1976), Strecker et al. (1979),

	HOMME	SINGE	MOUTON	BOEUF	CHIEN	RAT
	(Prakobphol et al., 1982)	(Herzberg et al., 1979)	(Hill et al., 1977a)	(Tettamanti et al., 1968)	(Lombart et al., 1972)	(Malinowski et al., 1981)
<b>ACIDES AMINES</b> <i>mol/100mol</i>						
Asp	4.9	2.5	1.69	2.1	2.4	7.27
Thr	20.9	22.2	14.11	15.3	14.0	9.84
Ser	16.2	15.6	18.55	20.1	11.0	13.28
Glu	6.9	6.9	5.25	7.5	5.4	6.60
Pro	23.7	5.9	10.61	11.1	9.5	8.64
Gly	1.4	16.7	19.31	17.7	25.5	5.30
Ala	14.4	8.5	13.94	12.2	11.3	5.90
<sup>1</sup> / <sub>2</sub> Cys	0.10	0.35	-	-	1.2	-
Val	3.1	7.0	6.78	6.7	4.9	2.19
Met	0.11	0.12	-	0.09	0.2	0.33
Ile	1.5	3.0	1.14	1.6	0.9	1.97
Leu	2.8	3.7	3.36	3.7	3.8	2.24
Tyr	0.14	0.35	-	-	0.6	0.82
Phe	0.86	0.94	1.08	0.44	2.2	0.82
Lys	1.4	1.9	0.36	0.56	1.0	24.87
His	0.87	1.6	0.31	0.15	1.2	8.34
Arg	0.69	2.7	3.52	4.3	5.0	1.59
Protéines totales (g/100g)	30.4	18.7	37.2	30.9	36.5	
<b>RESIDUS SUCRES</b> <i>mol/100mol AA</i>						<i>RAPPORTS MOLAIRES</i>
Fuc	20.9	21.6		2.3	17.9	1.00
Gal	32.1	28.3		2.4	22.6	2.70
GalNAc	27.4	22.7	31.2	22.9	18.8	1.00
GlcNAc	15.7	26.7		11.4	15.5	2.70
NANA	10.2	15.3	26.8	29.6	7.4	1.00
Glc						0.67
Man	2.8	ND				0.50
Sucres totaux (g/100g)	69.6	67.6	62.8	63.6	61.3	
<b>SULFATE</b> <i>mol/100mol AA</i>	4.9	18.3	-	ND	11.8	

Tableau III : Composition chimique de quelques mucines salivaires

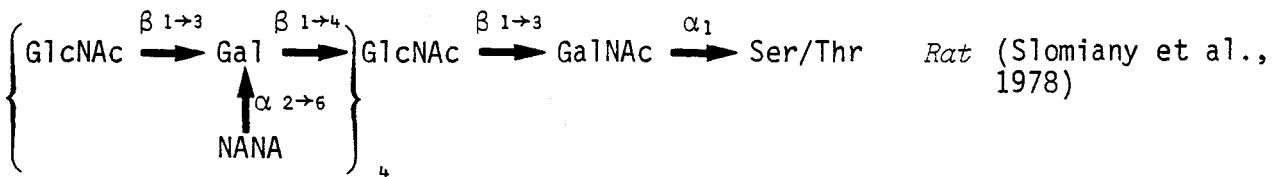
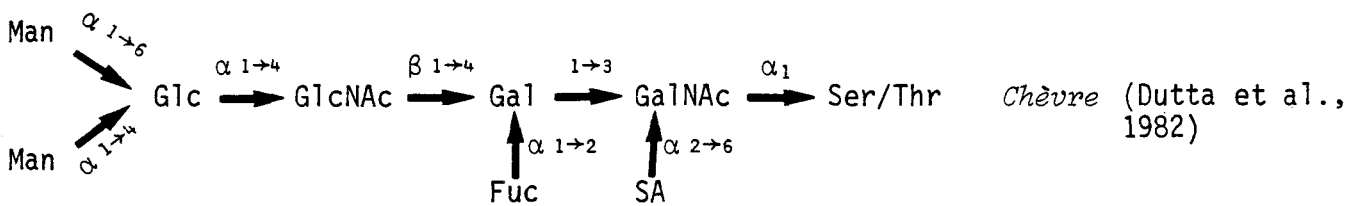
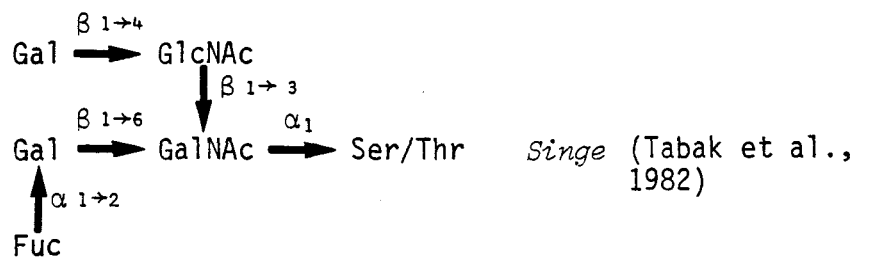
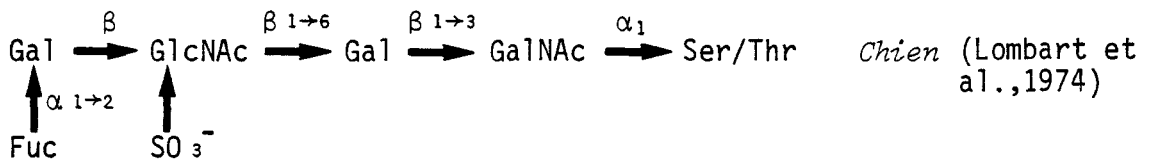
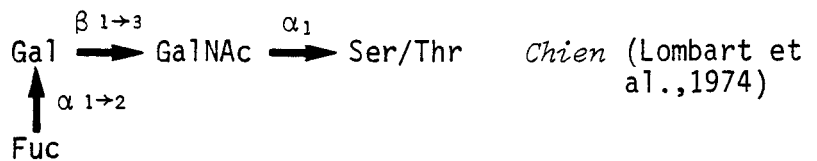
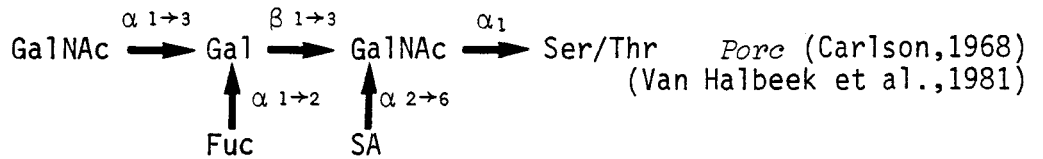
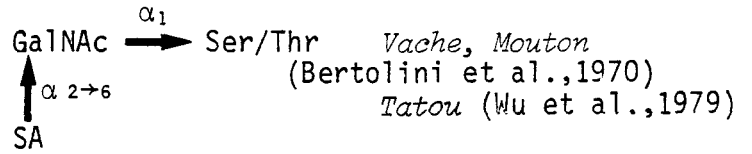
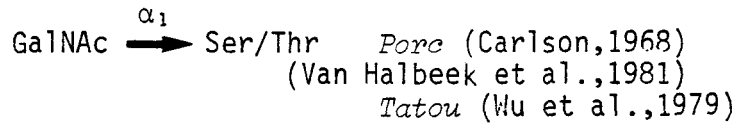


Figure 7 : Exemples de structures oligosaccharidiques dans quelques mucines salivaires.

Tabak et al. (1982).

Les oses constitutifs de ces chaînes glycaniques sont en général représentés par du L-fucose, du D-galactose, de la N-acétyl-D-glucosamine, de la N-acétyl-D-galactosamine et de l'acide sialique. Il est à remarquer cependant que Dutta et al. (1982) ont isolé à partir des mucines sous-maxillaires de la Chèvre des glycopeptides qui comportent aussi du D-glucose et du D-mannose.

La structure glycanique la plus simple, retrouvée dans les mucines sous-maxillaires du Porc (Carlson, 1968) et du Tatou (Wu et al., 1979), est constituée par un résidu de N-acétyl-D-galactosamine; cette osamine peut être liée à un acide sialique par liaison  $\alpha(2\rightarrow6)$  comme dans les mucines sous-maxillaires du Boeuf et du Mouton (Bertolini et al., 1970; Gottschalk et al., 1972) ou encore du Tatou (Wu et al., 1979).

Les structures plus complexes comportent presque toutes le noyau de base galactose  $\beta(1\rightarrow3)$  N-acétyl-D-galactosamine  $\rightarrow$  Ser/thr. Chez le Porc, la complexité des chaînes glycaniques est très variable, allant du monosaccharide au pentasaccharide, celui-ci constitué de fucose, galactose, N-acétyl-D-galactosamine et acide sialique (Carlson, 1968; Aminoff et al., 1979). Une controverse est née entre ces deux auteurs sur la position de l'acide sialique dans la chaîne oligosaccharidique : selon Carlson, dont les structures avaient été établies par plusieurs techniques dont l'oxydation périodique, les réactions enzymatiques et les réactions de méthylation, l'acide sialique était lié par liaison  $\alpha(2\rightarrow6)$  au résidu de N-acétyl-D-galactosamine lui-même engagé dans la liaison O-glycosidique; cependant Aminoff et al., sur la base de résultats d'oxydation périodique, ont proposé ultérieurement que l'acide sialique pouvait aussi se lier par liaison  $\alpha(2\rightarrow6)$  au résidu de galactose. Un terme provisoire a été apporté à cette controverse par Van Halbeek et al. (1981) qui, à partir de données tirées de la spectroscopie RMN du proton à 360 MHz et confrontées aux résultats de méthylation et de spectrométrie de masse, ont montré qu'en aucun cas le résidu d'acide sialique ne se fixait sur le galactose.

Ces variations de composition, de taille et de charge des chaînes glycaniques constituent pour les mucines salivaires une source importante de microhétérogénéité. Celle-ci peut, selon Tabak et al. (1982), être le reflet de la présence de chaînes incomplètes correspondant à autant d'étapes intermédiaires dans la biosynthèse des chaînes glycaniques; elle peut éga-



lement résulter d'une dégradation plus ou moins importante de ces chaînes sous l'action de glycosidases agissant *in vivo*, ou encore induite *in vitro* par certaines méthodes d'isolement et de purification des mucines.

Sachdev et al. (1979), utilisant des sondes fluorescentes, ont montré l'existence dans les mucines sous-maxillaires de Mouton de régions hydrophobes nettement individualisées; jointe au fait que dans quelques mucines d'autres origines (Scawen et al., 1977; Feldhoff et al., 1979), il a été établi qu'il existait des zones glycosylées et des zones non glycosylées, ces dernières riches en acides aminés soufrés et hydrophobes, cette observation apporte un argument solide à l'hypothèse que les mucines sous-maxillaires seraient également au moins chez le Mouton, constituées de deux types de domaines structuraux, l'un glycosylé et l'autre non glycosylé. La distribution de ces deux types de régions dans la mucine n'est pas connue. Selon Hill et al. (1977b), dans les mucines sous-maxillaires de Mouton, ces zones seraient réparties au hasard le long de l'axe peptidique avec les hydroxy-aminoacides, points de branchements des chaînes glycaniques, apparaissant en groupes de 3 à 9 résidus et constituant un acide aminé sur deux. Ces segments glycosylés seraient séparés les uns des autres par des zones non glycosylées longues de 4 à 7 acides aminés autres que sérine ou thréonine. Par contre, chez le Boeuf, les mucines sous-maxillaires seraient selon Pigman et al. (1973) constituées de motifs répétitifs de 28 acides aminés chacun.

En ce qui concerne la masse moléculaire des mucines salivaires, il y a des variations considérables qui, dans une certaine mesure, apparaissent liées à la concentration protéique et à la force ionique du milieu.

Chez le Mouton par exemple, les mucines isolées par Tetamanti et al. (1968) présentent une masse moléculaire de 394 000 en solution dans du NaCl 0.2M; à plus faible force ionique, la masse moléculaire a été estimée à 1 300 000 (Gottschalk et al., 1972). Toujours chez le Mouton, Hill et al. (1977a) ont montré que la masse moléculaire des mucines sous-maxillaires passait de 547 000 en solution dans du NaCl 0.5M à 155 000 dans du NaCl 2M; ces mêmes auteurs ont observé que dans le NaCl 0.5M, les masses moléculaires de l'asialomucine obtenue par action de la neuraminidase sur la mucine native, et celle de l'apomucine résultant de l'action de l' $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase sur l'asialomucine, étaient respectivement de 224 000

et 58 300. En utilisant les résultats de composition chimique et en prenant comme masse moléculaire cette valeur de 58 300, il apparaît que l'apomucine serait constituée d'environ 650 acides aminés dont 204 résidus de sérine ou de thréonine; en supposant que tous ces hydroxyaminoacides seraient engagés dans une liaison O-glycosidique avec un résidu de N-acétylgalactosamine, et sachant par l'analyse chimique que 86% de ces derniers portent un acide sialique, le calcul a montré que la masse moléculaire élémentaire de la mucine sous-maxillaire serait de 154 150, valeur très proche de 155 000 qui est la masse moléculaire apparente de la mucine en solution dans un tampon de force ionique élevé (NaCl 2M). A partir de ces données, Hill et al. (1977a) ont émis l'hypothèse que chez le Mouton, les mucines sous-maxillaires pouvaient se présenter soit sous forme de monomères en solution aqueuse diluée, soit sous forme polymérisée lorsque la force ionique du milieu augmente.

Ayant observé que les mucines de la salive sous-maxillaire pouvaient migrer par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 3 à 7,5%, mais que les mucines directement extraites des glandes restaient au dépôt en raison probablement de leur taille trop élevée, Tettamanti et al. (1968) ont émis l'hypothèse que lors du phénomène de sécrétion salivaire, il se produisait une dépolymérisation des mucines libérées par les cellules, donnant des molécules plus petites. Les résultats obtenus par Oemrawsingh et al. (1974) chez l'Homme, qui montrent que les mucines extraites des glandes sous-maxillaires ont une masse moléculaire au moins égale à 300 000, ne plaident cependant pas en faveur de cette dépolymérisation.

La nature des interactions qui s'exercent ainsi entre les sous-unités des mucines reste mal connue.

Le rôle des liaisons covalentes du type ponts disulfure reste très controversé. Il n'a pas été possible de mettre en évidence de résidus de cystéine dans les mucines isolées chez le Mouton (Hill et al., 1977a), le Boeuf (Tettamanti et al., 1968), le Porc (De Salegui et al., 1969) ou le Tatou (Wu et al., 1979); par contre de faibles teneurs de cet acide aminé ont été enregistrées dans les mucines préparées chez l'Homme (Prakobphol et al., 1982), le Singe (Herzberg et al., 1979), le Chien (Lombart et al., 1972) et la Souris (Roukema et al., 1976). Observant que la réduction-alkylation des mucines salivaires entraîne chez le Singe l'apparition de composants de plus faible masse moléculaire, Herzberg et al. (1979) ont es-

timé que des liaisons disulfure entre sous-unités pouvaient expliquer, en partie du moins, la stabilisation de l'édifice macromoléculaire dans la mucine native.

Les agents habituels de dissociation des liaisons non covalentes utilisés par Hill et al. (1977a), tels que l'urée 8M, le chlorhydrate de guanidine 7M ou le SDS à 0,1%, n'ont pas permis de réduire la taille des mucines chez le Mouton.

Les forces ioniques au sein des mucines semblent jouer un rôle important. Hill et al. (1977a) ont montré, toujours chez le Mouton, que la force ionique du solvant était un facteur déterminant dans le degré d'association de ces molécules; ces auteurs ont également observé que la dansylation, qui bloque les fonctions aminées libres des mucines, entraîne la libération de peptides contaminants, traduisant probablement une diminution des interactions électrostatiques entre les fonctions  $\epsilon$ -aminées portées par des résidus de lysine et des fonctions  $\beta$ - ou  $\gamma$ -carboxyliques libres appartenant aux mucines sous-maxillaires (Tabak et al., 1982). Prakobphol et al. (1982) ont également mis en évidence des interactions ioniques entre les mucines et des peptides contaminants de plus faible masse moléculaire.

Tabak et al. (1982) ont insisté sur le rôle possible que pourraient jouer les ions calcium: ceux-ci peuvent en effet participer à la formation de complexes ioniques entre des résidus d'acide sialique ou des résidus de sulfate appartenant à des sous-unités différentes de mucines.

Hill et al. (1977a) ont invoqué la participation probable d'interactions glycannes-protéines et/ou glycannes-glycannes : en effet, chez le Mouton, à force ionique constante (NaCl 0.5M), les mucines natives se présentent comme des tétramères, les asialomucines comme des dimères et les apomucines comme des monomères; en outre, ces auteurs ont estimé que dans des conditions d'isolement différentes il est possible d'envisager l'obtention d'oligomères encore plus volumineux. Ces observations montrent clairement l'importance du degré de glycosylation de la chaîne polypeptidique dans la tendance de la mucine à se polymériser, et peut être une explication, au moins partielle, des nombreuses divergences enregistrées dans la détermination de la masse moléculaire des mucines.

Tabak et al. (1982) ont rappelé la contribution des interactions hydrophobes entre chaînes latérales d'acides aminés non polaires dans la stabilisation de la structure macromoléculaire des mucines salivai-

res. Du fait de la distribution particulière de ces acides aminés le long de l'axe polypeptidique, ces liaisons hydrophobes pourraient s'établir de façon préférentielle entre les zones non glycosylées des mucines. Par contre Clamp et al. (1978) ont estimé que, en raison de la forte densité des chaînes glycaniques à ce niveau, il est probable que dans les zones glycosylées des mucines, l'axe polypeptidique offre l'aspect d'une chaîne enroulée au hasard ("random coil"), avec des structures secondaire et tertiaire lâches, donc flexibles.

## 2) Organisation moléculaire des mucines gastriques.

Le gel muqueux obtenu par raclage de la muqueuse gastrique est de nature hétérogène, comportant principalement (60%, p/p) des glycoprotéines de type mucine, mais aussi des constituants mineurs tels que des protéines diverses, un peu d'acides nucléiques et des débris cellulaires.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la structure des mucines gastriques. Ce sont les mucines obtenues chez le Porc qui ont été le plus étudiées (Snary et al., 1970; Allen et al., 1972; Scawen et al., 1977). Chez l'Homme, où des difficultés de recueil de matériel suffisant se posent, des travaux similaires ont pu cependant être faits sur du mucus recueilli par aspiration gastrique ou par râclage de la muqueuse de pièces de gastrectomie (Schrager, 1969; Schrager et al., 1974; Pearson et al., 1980). Slomiany et al. (1983) ont étudié les mucines isolées directement à partir du contenu gastrique d'enfants atteints de mucoviscidose. Ce mode de recueil n'excluant pas une contamination d'origine salivaire ou trachéo-bronchique, il n'est donc pas absolument certain que le matériel examiné par ces auteurs soit exclusivement d'origine gastrique.

Ces travaux ont montré que la viscosité du mucus gastrique natif et son aptitude à former un gel étaient liées à la présence de mucines polymérisées dont la masse moléculaire, déterminée par mesure de la vitesse de sédimentation, est environ de 2 000 000 (Allen et al., 1972; Allen, 1978). La solubilisation du mucus, se traduisant physiquement par une diminution importante de la viscosité aboutissant à la perte de la structure en gel, peut

être obtenue soit par protéolyse (action de la trypsine, de la pepsine, de la pronase ou de la papaïne), soit par réduction au moyen d'agents à fonction thiol libre (2-mercaptoéthanol 0.2 M par exemple). Les mucines ainsi traitées manifestent une chute importante de leur masse moléculaire qui devient voisine de 500 000.

Ces résultats ont amené Snary et al. (1970) à proposer pour les mucines gastriques natives de Porc une structure polymérique constituée de quatre sous-unités identiques (ou tout au moins très apparentées), de masse unitaire 500 000, et reliées entre elles par des ponts disulfure. Ultérieurement, des travaux similaires ont conduit Pearson et al. (1980) à formuler les mêmes hypothèses sur la structure polymérique des mucines gastriques humaines, et selon ces auteurs, cette polymérisation des mucines, qui favorise la formation d'un gel à la surface de la muqueuse gastrique, joue un rôle physiologique capital dans la protection de l'organe contre le phénomène d'autodigestion. Le gel muqueux constituerait en effet un frein à la diffusion des protons, ce qui, combiné à l'action neutralisante de la sécrétion pariétale d'ions bicarbonates (Allen et al., 1980), contribuerait à dresser une barrière au devant de l'agression que représente le suc gastrique. Le tapis muqueux, polymérisé à l'état natif, pourrait cependant être l'objet d'une certaine attaque protéolytique par la pepsine du suc gastrique, ce qui conduirait à la solubilisation et à la dégradation de la structure tétramérique des mucines en ses sous-unités. Ce phénomène serait bien entendu normalement compensé par la sécrétion par la muqueuse d'une quantité de mucines natives intactes égale à la quantité dégradée. Il y a en faveur de la réalité de cette dégradation partielle des mucines gastriques *in vivo* des arguments tels que l'analyse du mucus en gel filtration qui montre sur colonne de Sepharose 2B la rétention d'une fraction mineure de mucines (moins de 20% en poids); la majeure partie de ces mucines, restées sous forme polymérisée, étant exclue du gel (Pearson et al., 1980).

L'analyse chimique des mucines gastriques de Porc solubilisées et purifiées par centrifugation à l'équilibre en gradient de densité de chlorure de césium, puis soumises à l'action de divers enzymes protéolytiques (trypsine, pepsine ou pronase) (Scawen et al., 1977), a montré que, par rapport au matériel de départ, cette digestion entraînait une diminution de la

teneur globale en acides aminés d'environ 3% (p/p), ce qui correspond à une réduction de 18 à 25% de la partie protéique de la molécule; ce traitement n'entraîne par contre aucune perte de la fraction glycanique. En outre, l'étude de la composition des produits de protéolyse a montré que la diminution de la teneur des divers acides aminés était dissociée : insignifiante en ce qui concerne la sérine, la thréonine et la proline, mais beaucoup plus importante dans le cas de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, de la cystéine, de la tyrosine, de la phénylalanine, de l'histidine, de la lysine et de l'arginine.

Ces constatations ont amené Scawen et Allen (1977) à proposer que la mucine gastrique de Porc était constituée de deux régions distinctes :

a) une région majeure (représentant au moins 75% de l'édifice), glycosylée, résistante à l'attaque protéolytique et particulièrement riche en sérine et thréonine, sites d'implantation des chaînes glycaniques sur l'axe polypeptidique;

b) une région non glycosylée, sensible à la protéolyse, plus riche en acides aminés dicarboxyliques et en cystéine.

L'étude ultérieure réalisée par Pearson et Allen (1980) a montré que cette hypothèse pouvait aussi expliquer le comportement des mucines gastriques d'origine humaine en présence des enzymes protéolytiques.

Une telle organisation moléculaire en deux zones glycosylée et non glycosylée avait déjà été proposée antérieurement pour expliquer l'action de la papaïne sur les glycoprotéines entrant dans la structure des substances à activité de groupe sanguin (Dunstone et al., 1965; Kristiansen et al., 1968), ou celle de la pronase sur les glycoprotéines de type mucine isolées à partir des liquides de kyste ovarien (Pusztai et al., 1961).

Utilisant la méthode de dansylation, Scawen et Allen ont trouvé que chez le Porc les mucines gastriques natives et les mucines traitées par la trypsine présentaient les mêmes acides aminés N-terminaux : phénylalanine, valine et isoleucine; ceci les a conduit à suggérer que la région non glycosylée sensible à la protéolyse se trouverait à l'extrémité C-terminale de la chaîne polypeptidique (Scawen et al., 1977).

Remarquant d'une part que les mucines gastriques natives d'origine porcine (Scawen et al., 1977) ou humaine (Pearson et al., 1980) pouvaient être

scindées en leurs sous-unités aussi bien par action du 2-mercaptoéthanol 0.2 M que par protéolyse, et d'autre part que les résidus de cystéine faisaient partie des acides aminés perdus au cours de la digestion protéolytique, le groupe d'Allen a estimé que les quatre sous-unités constitutives des mucines polymérisées dans le mucus non dégradé étaient reliées entre elles par l'intermédiaire de ponts disulfures, et que ces liaisons covalentes étaient situées dans la fraction non glycosylée, donc sensible à l'action des enzymes protéolytiques.

Pour illustrer la structure tertiaire des mucines gastriques, ce groupe a proposé un modèle dit "moulin à vent" ("windmill") qui tient compte des différentes observations faites au cours de l'étude de ces mucines (Allen et al., 1976; Allen, 1978). La figure 8 donne une représentation schématique de ce modèle.

Cependant des travaux récents par Pearson, Allen et Parry (1981) sur l'étude des mucines gastriques du Porc et de l'Homme après traitement par les agents réducteurs et/ou protéolytiques, ont amené leurs auteurs à remanier très sensiblement les hypothèses précédemment émises sur le mode d'association des sous-unités de mucines au sein de la macromolécule native. Les expériences chez le Porc ont été réalisées sur une fraction de mucines polymères préparées à partir de mucus gastrique solubilisé en chlorure de sodium 0,2 M, puis purifiées en deux étapes : chromatographie de gel filtration sur Sepharose 4B puis, sur la fraction exclue du gel, centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité de chlorure de césium (Fig. 9). Les mucines natives ainsi obtenues ont servi de matériel de départ à un certain nombre d'expériences qui ont amené à faire les observations suivantes :

a) les mucines ainsi préparées ne migrent pas à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, ce qui témoigne de l'absence de toute contamination par d'autres protéines qui leur seraient liées par liaisons non covalentes;

b) elles libèrent par contre par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol 0.2 M une fraction protéique dont la masse moléculaire a été estimée à 70 000. C'est donc la seule action réductrice du 2-mercaptoéthanol qui permet la libération de ce fragment protéique puisque l'électrophorèse en présence de SDS sans agent réducteur demeure sans effet sur les mucines natives;

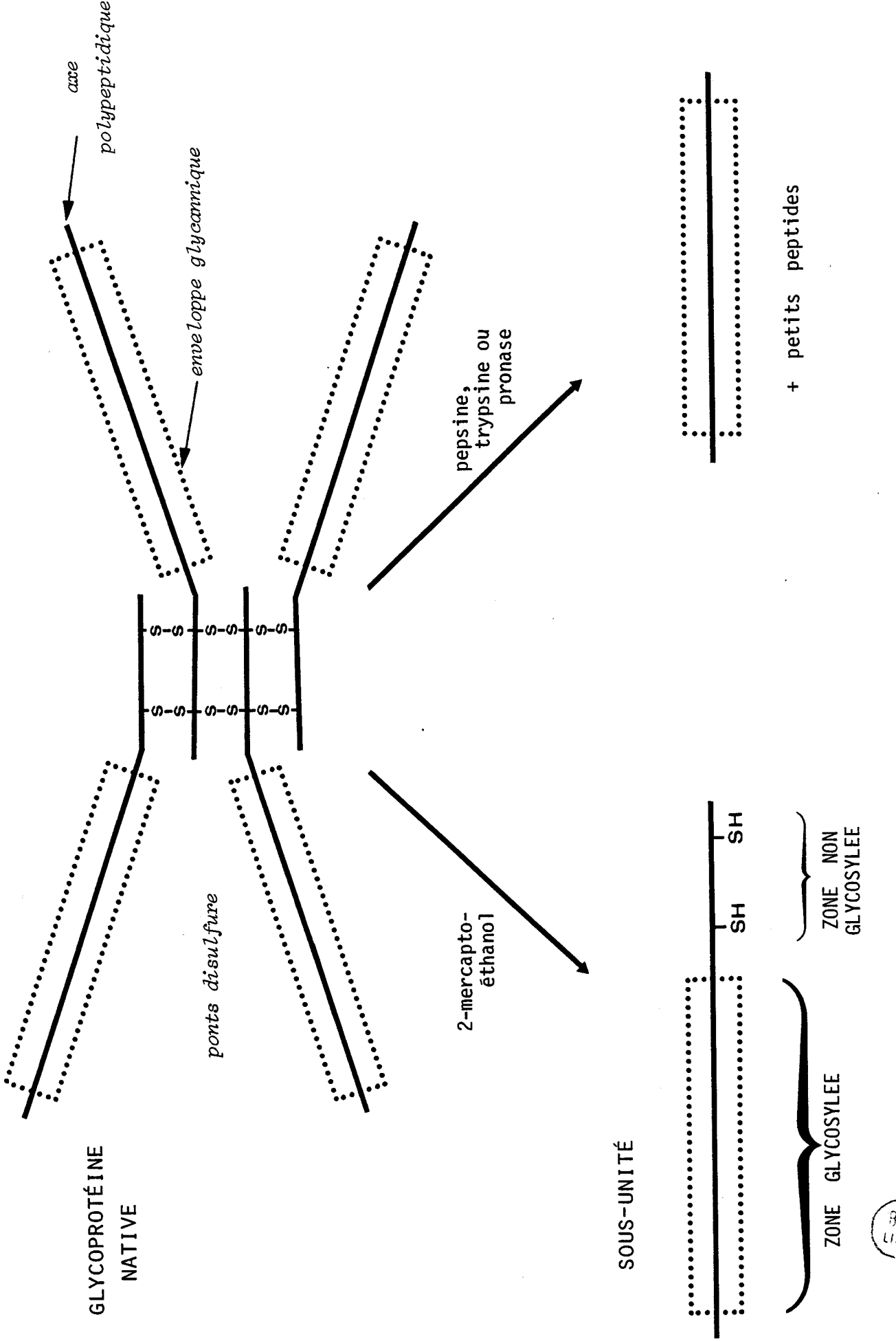


Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'une mucine gastrique de porc (d'après Allen, 1978)





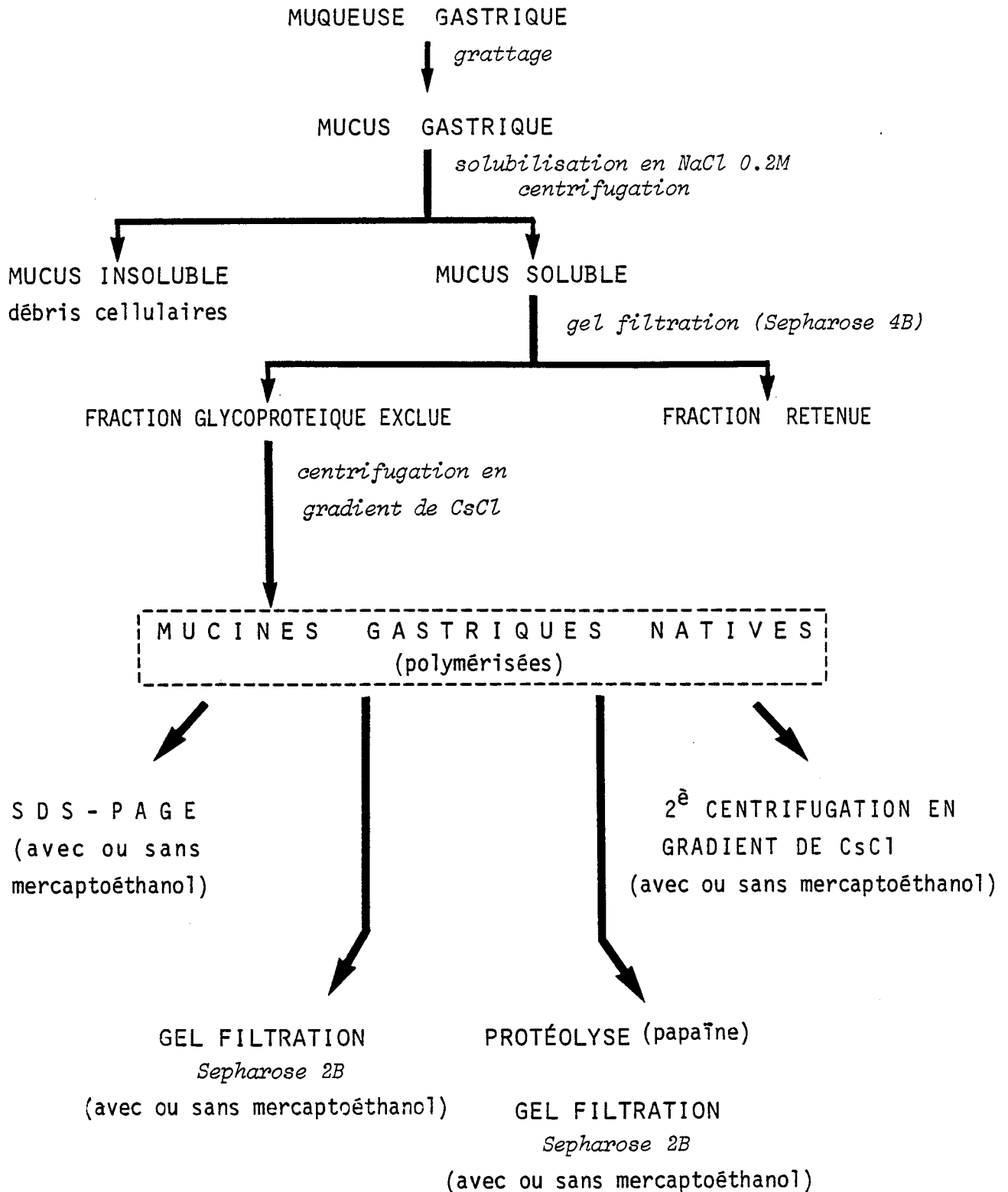


Figure 9. : Protocole expérimental d'étude des mucines gastriques de porc  
(d'après Pearson et al., 1981)

c) le fractionnement des mucines natives sur Sepharose 2B donne un pic de glycoprotéines totalement exclues du gel; cependant après réduction par le 2-mercaptoéthanol 0.2 M, une grande partie de ces glycoprotéines est partiellement retenue, témoignant d'une chute importante de leur masse moléculaire. Dans ces conditions, il apparaît en outre dans les fractions fortement retenues par la colonne une quantité non négligeable de substances absorbant à 280 nm mais non colorées par le réactif PAS. L'examen de ce matériel à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS permet également de mettre en évidence une bande protéique de masse moléculaire voisine de 70 000;

d) le même recul en Sepharose 2B peut être obtenu par filtration des mucines digérées par la papaïne, mais dans ce cas la proportion de protéines de masse moléculaire 70 000 est réduite, et il apparaît en outre de nouvelles bandes protéiques de plus faible masse moléculaire (10 à 12 000);

e) la protéine de masse moléculaire 70 000 a été isolée à partir des mucines natives grâce à une deuxième centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité de chlorure de césium en présence de 2-mercaptoéthanol 0.2 M.

Cette protéine, qui sur le plan pondéral représente en moyenne 3,5% de la glycoprotéine native, a été analysée sur les plans chimique et immunologique. Les principaux résultats obtenus sur le plan chimique ont été les suivants : richesse particulière en glycine, acide glutamique et acide aspartique; présence de cystéine en quantité appréciable; absence de galactosamine ou de glucosamine. Il est à noter que cette composition en acides aminés est différente de celle de la sérumalbumine humaine. Sur le plan immunologique, aucune réaction n'a été notée entre la protéine de masse moléculaire 70 000 et divers antisérums utilisés : sérum anti-pièce sécrétoire humaine, sérum anti-IgA humaine, sérum anti-immunoglobulines humaines, sérum anti-albumine humaine ou bovine. Cependant il n'est pas à exclure que l'absence de réactivité immunologique manifestée par cette protéine de masse moléculaire 70 000, isolée à partir des mucines gastriques de Porc, ne soit liée, en partie du moins, au fait que les antisérums utilisés étaient dirigés contre des protéines d'origine non porcine.



Sur la signification de cette protéine non glycosylée dont la composition en acides aminés est différente de celle d'une mucine réduite, et dont la teneur est telle qu'elle existerait dans un rapport 1/1 au sein de la molécule native polymère ( $2\ 000\ 000 \times 3.5/100 = 70\ 000$ ), l'interprétation suivante a été proposée par Pearson et al. (1981): cette protéine aurait un rôle structural central dans la macromolécule; elle serait en effet reliée par liaisons covalentes disulfure aux quatre sous-unités de la mucine native polymère. La réduction par le 2-mercaptoéthanol, en scindant ces liaisons libérerait d'une part les quatre sous-unités dont la masse moléculaire unitaire est voisine de 500 000, et d'autre part la protéine de masse moléculaire 70 000. Par protéolyse, on assiste encore à la libération des quatre monomères, mais la protéine centrale non protégée de l'action protéolytique, puisque non glycosylée, serait dégradée en petits peptides.

En conséquence, le modèle précédemment avancé par Allen et al. (1976, 1978) (Fig. 8) pour illustrer l'organisation macromoléculaire des mucines gastriques, a été remis en cause, en ce qui concerne tout au moins la partie centrale de l'édifice sur laquelle sont fixées par liaisons covalentes les quatre sous-unités du polymère. Un nouveau schéma d'organisation a donc été proposé (Fig. 10) dans lequel la structure liant par liaisons disulfure les quatre sous-unités glycoprotéiques est constituée par la protéine de masse moléculaire 70 000 (Allen et al., 1978, 1982; Allen, 1983a).

Ce schéma paraît séduisant, mais il est encore probablement incomplet. En effet, Slomiany et al. (1983) ont récemment mis en évidence, en particulier au cours de la mucoviscidose, la participation de quantités non négligeables de lipides dans la composition chimique des mucines gastriques natives.

Ces lipides, qui résistent à la délipidation et paraissent donc liés de façon covalente au reste de la molécule, sont constitués d'esters d'acides gras; la distribution de ces acides gras ne paraît pas la même tout au long de la molécule: leur proportion est en effet plus élevée dans les zones résistant à la protéolyse. La présence, au cours de la mucoviscidose, de quantités anormalement élevées de ces lipides dans les mucines pourrait ainsi constituer une protection de ces dernières contre l'attaque protéolytique et en conséquence perturber leur métabolisme normal. Cette

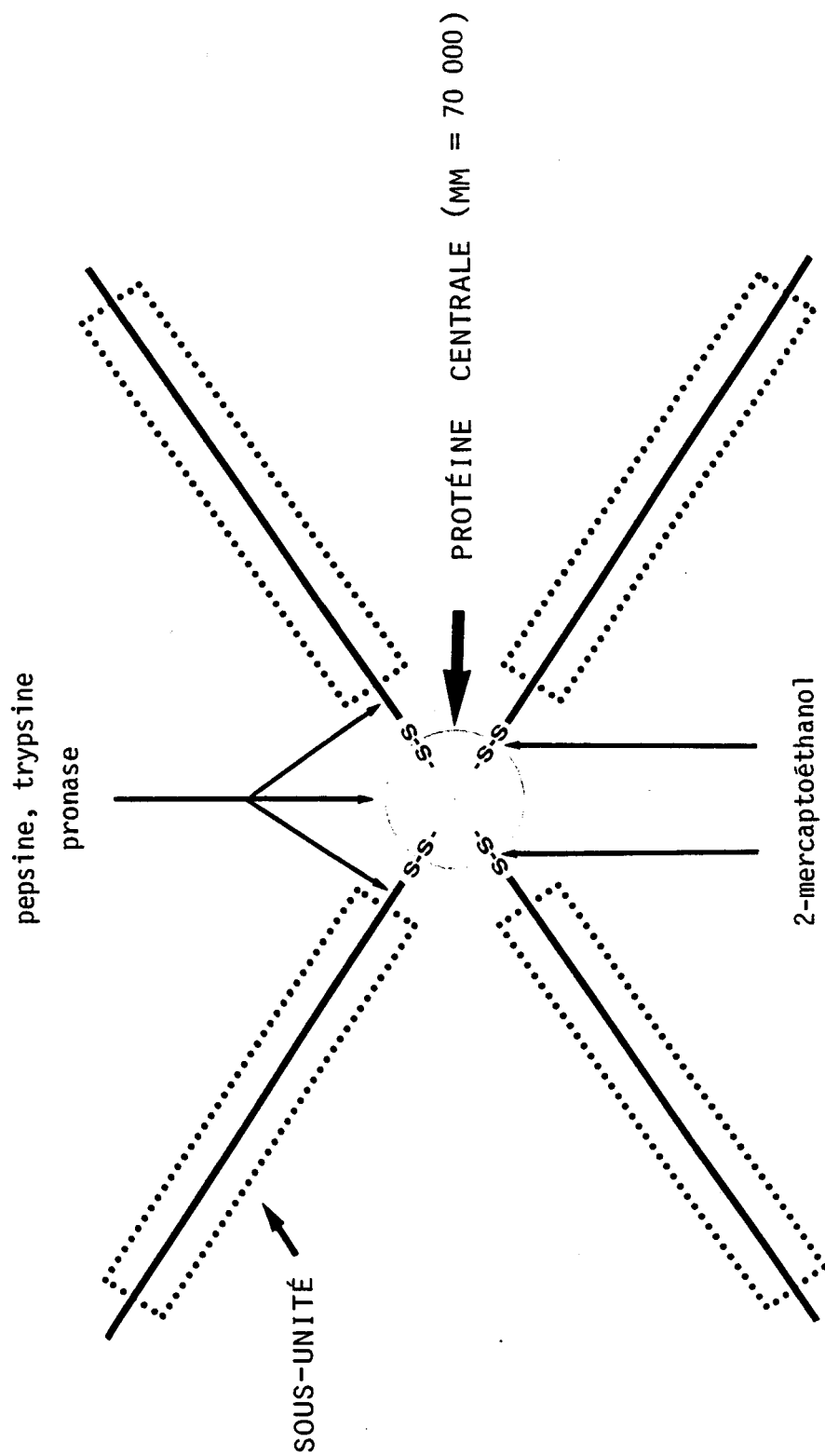


Figure 10 : Nouveau schéma d'organisation proposé pour la mucine gastrique de porc  
(d'après Allen et al., 1982)



anomalie, jointe à une possible réduction de la solubilité des mucines du fait de leur richesse en lipides, pourrait, selon Slomiany et al. (1983), se traduire par l'accumulation d'un mucus épais dans les glandes exocrines, et ainsi expliquer la pathogénie de la mucoviscidose.

### 3) Organisation moléculaire des mucines intestinales.

Avec seulement 15% (p/p) de mucines, le mucus intestinal apparaît encore plus contaminé que le mucus gastrique : la teneur en protéines y est de 80% (p/p) et celle des acides nucléiques de 5% (p/p) (Ferencz et al., 1980; Allen et al. 1982).

Le mucus intestinal a fait l'objet de nombreux travaux, tant chez le Rat (De Luca et al., 1970; Bella et al., 1972; Forstner et al., 1973), que chez le Porc (Mantle et al., 1981a, 1981b; Allen et al., 1982) ou encore chez l'Homme (Jabbal et al., 1976; Forstner et al., 1978, 1979). Des protocoles variés ont été mis en oeuvre qui ont permis d'isoler des fractions riches en mucines; cependant l'analyse ultérieure de celles-ci n'a pas toujours produit des résultats de composition chimique convergents et, dans ces conditions, il n'est donc pas trop surprenant que ces résultats aient parfois donné lieu à des interprétations différentes de structure moléculaire.

- Dans le groupe de Forstner et Jabbal (1973), les mucines ont été préparées chez le Rat par homogénéisation du produit de raclage de la muqueuse intestinale en tampon EDTA puis, après une centrifugation à 36 000g, par chromatographie de gel filtration du surnageant sur Sepharose 4B. En outre, chez l'Homme, le matériel exclus ainsi recueilli, dénommé "mucin 1", a été soumis soit à une nouvelle chromatographie de gel filtration sur Sepharose 2B produisant une nouvelle fraction, appelée "FA", riche en mucines et non retenues per le gel (Jabbal et al., 1976), soit à une chromatographie d'échange ionique sur DEAE-Biogel avec élution de la fraction enrichie en mucines, appelée "mucin 2", par un tampon phosphate-urée 6M (Forstner et al., 1979).

- Les mucines isolées par Mantle et Allen (1981a) à partir du mucus intestinal de Porc ont été préparées par homogénéisation du produit de raclage de la muqueuse dans NaCl 0.2M et centrifugation à 6 000g

pour éliminer les débris cellulaires, puis purifiées par deux étapes successives d'ultracentrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium, suivies par une filtration sur Sepharose 4B. Cette technique d'ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium avait déjà été utilisée précédemment pour l'isolement de diverses mucines telles que les mucines bronchiques (Creeth et al., 1977, 1978), les mucines du liquide de kyste ovarien (Creeth, 1978), ou encore les mucines gastriques de Porc (Starkey et al., 1974) ou gastriques humaines (Pearson et al., 1980). De l'avis de ces auteurs, cette technique s'est révélée intéressante car, en diminuant l'intensité des liaisons non covalentes dans les fractions étudiées, elle conduit en effet à l'obtention de mucines très peu contaminées par des protéines ou des acides nucléiques. Ce schéma de fractionnement a permis à Mantle et Allen d'isoler une fraction glycoprotéique apparaissant homogène en gel filtration et à l'ultracentrifugation analytique, et indemne de toute contamination comme l'attestent les résultats de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS à 1%, ou encore la résistance à la dissociation par les agents de clivage des liaisons non covalentes.

- Plus antérieurement encore, des mucines intestinales ont été isolées selon une procédure comportant aussi une étape de filtration sur gel :

a) la procédure utilisée par De Luca et al. (1970) comportait l'homogénéisation du produit de raclage intestinal, puis la précipitation par l'éthanol à chaud (bain-marie bouillant), une extraction par le mélange éthanol-éther, la digestion protéolytique du résidu par la trypsine puis la pronase, une étape de chromatographie d'échange ionique (DEAE-Sephadex A-50) suivie d'une chromatographie de gel filtration d'abord sur Sepharose 4B puis sur Sepharose 2B;

b) les mucines isolées par Bella et al. (1972) ont été préparées par homogénéisation du produit de raclage de la muqueuse intestinale, puis par action brève de la chaleur (50 °C, 10 mn), précipitation par le Cetavlon et l'éthanol, purification sur colonne de DEAE-Cellulose et enfin gel filtration sur Sepharose 4B.

A l'analyse chimique, les fractions ainsi isolées manifestent toutes une composition typique de mucines (Tab. IV). Cependant, lorsque l'on compare les résultats obtenus dans ces divers groupes, on est frappé par la

ORIGINE DE LA MUCINE	H O M M E		R A T		P O R C	
	REFERENCES (+)	REFERENCES (+)	REFERENCES (+)	REFERENCES (+)	REFERENCES (+)	REFERENCES (+)
FRACTION ETUDIEE	Jabbal et al. (1976)	Forstner et al. (1979)	De Luca et al. (1970)	Bella et al. (1972)	Forstner et al. (1973)	Mantle et al. (1981a)
	"FA"	"Mucin 2"	"F-Glyco-peptide"	"IGP-A1"	"GCM"	"small intestinal mucus glycoprotein"
	%	%	%	%	%	%
	mol%	mol%	mol%	mol%	mol%	mol%
SUCRES TOTAUX	58.34	71.07	75.50	66.70	62.00	77.50
Fucose	4.20	13.97	9.50	9.80	6.60	4.80
Galactose	17.40	20.93	27.00	16.50	23.00	13.20
N-Acétylgalactosamine	17.17	15.56		13.90	11.20	25.50
N-Acétylglucosamine	17.17	19.66		13.40	11.20	14.10
Acide sialique	2.40	0.94	6.00	13.10	10.00	19.90
Acides uroniques			4.00		0.00	
SULFATES	ND	ND	0.00	2.90	0.40	2.80
ACIDES AMINÉS TOTAUX	12.00	6.30	14.72	14.30	12.00	19.60
Thr + Ser		42.30	38.36	52.64	34.77	36.93
Asp + Glu	16.80	8.79	19.84	10.02	14.77	8.83
Pro + Gly + Ala	23.70	20.35	18.77	24.18	22.09	24.81
1/2 Cys	1.50	0.42	ND	traces	2.09	4.28
Autres	30.70	28.14	23.03	13.16	26.28	25.15

Tableau IV.: Composition chimique de quelques mucines intestinales. Les résultats sont exprimés en pourcentage du poids sec de la préparation étudiée (%), et en mol/100mol (mol%). ND= non déterminé. (+) : certaines données du tableau ont été calculées d'après les résultats fournis par les auteurs.

variabilité de certains d'entre eux. C'est ainsi par exemple que, selon l'étude considérée, la teneur molaire en fucose est d'une façon générale plus importante chez le Rat et chez l'Homme que chez le Porc; la teneur molaire en hexosamines est plus faible chez le Rat que chez le Porc ou chez l'Homme; la proportion de résidus de N-acétylgalactosamine est plus élevée chez le Porc, ce qui laisse présager que dans cette mucine la longueur moyenne des chaînes glycosylées est assez courte; la teneur molaire en acides sialiques est beaucoup plus faible chez l'Homme que chez le Rat et surtout chez le Porc; la teneur en sulfate est également très variable. Concernant les acides aminés, il y a aussi d'assez grandes variations : en particulier la teneur globale en acides aminés peut varier de 19,6% (p/p) chez le Porc (Mantle et al., 1981a; Allen et al., 1982) à 6,3% (p/p) chez l'Homme (Forstner et al., 1979); la teneur en hydroxyaminoacides, en acides aminés dicarboxyliques et en cystéine varie également dans d'assez larges proportions. Il est donc clair, au vu de ces compositions chimiques, que les mucines intestinales étudiées dans les divers groupes signalés sont différentes les unes des autres. Ces nombreuses discordances peuvent être probablement attribuées, comme le souligne Forstner et al. (1977), à la diversité des méthodes d'isolement des mucines et au degré plus ou moins poussé de leur purification. Mais il est aussi possible que des différences spécifiques significatives puissent expliquer, en partie du moins, ces discordances.

Concernant l'organisation moléculaire des mucines intestinales, les principales acquisitions proviennent de deux groupes : celui de Mantle et Allen, et celui de Forstner.

Mantle et al. (1981b) ont examiné les mucines natives intestinales de Porc préparées selon le protocole exposé ci-dessus, et étudié leurs modifications éventuelles sous l'action de divers agents dissociants, réducteurs et protéolytiques. De ces travaux, ces auteurs ont enregistré les résultats suivants:

- 1) les mucines natives ont une masse moléculaire voisine de 1 700 000 daltons;

- 2) elles ne se dissocient pas par filtration sur Sepharose 2B en présence des agents habituels de clivage des liaisons non covalentes (chlorhydrate de guanidine 6M, urée 8M, SDS 1%, KCl 2.25M).

- 3) par traitement protéolytique (pronase), les



molécules se dissocient en sous-unités dont la masse moléculaire représente environ un quart de celle des molécules natives (MM = 450 000). Il est en outre observé pendant le même temps une réduction de 29% en poids de la fraction protéique des mucines, et cela sans perte appréciable de la fraction glycanique;

4) par réduction par le mercaptoéthanol 0.2M, les sous-unités produites en présence de pronase sont à nouveau clivées, donnant naissance à des sous-unités dont la masse moléculaire est environ deux fois plus petite (MM = 270 000);

5) la réduction directe des mucines intestinales natives de Porc par le mercaptoéthanol 0.2M se traduit d'emblée par une diminution aussi spectaculaire de la masse moléculaire de ces mucines (MM = 240 000), et libère en outre une protéine de masse moléculaire 90 000. Cette dernière protéine, qui est sensible à la protéolyse, est produite sur la base d'une molécule par molécule de mucine native de départ.

A partir de ces résultats, Mantle et Allen (1981b) ont émis l'hypothèse que les mucines intestinales de Porc résultent, dans leur état natif, de la polymérisation de 7 à 8 sous-unités (MM = 240 000), auxquelles serait liée par liaisons disulfure une protéine de masse moléculaire 90 000; celle-ci jouerait ainsi un rôle central dans la structure macromoléculaire de l'édifice natif. Mantle et Allen ont proposé un schéma d'organisation de la structure polymérique des mucines intestinales de Porc très apparenté à celui de la figure 10 avancé par Pearson et al. (1981) pour représenter les mucines gastriques humaines, avec cependant quelques particularités qui permettent de les différencier :

1) le nombre de sous-unités, 7 à 8 pour les mucines intestinales, n'est que de 4 dans le cas des mucines gastriques; mais comme les masses moléculaires des deux types de sous-unités sont sensiblement dans le rapport pondéral 1/2, la masse moléculaire des mucines natives correspondantes reste du même ordre de grandeur (1 700 000 et 2 000 000 respectivement);

2) alors que la protéolyse permet de cliver les deux types de molécules en 4 sous-unités, seules les sous-unités produites dans ces conditions à partir du mucus intestinal peuvent encore par réduction se scinder en de plus petites sous-unités;

3) la protéine libérée par réduction des mucines natives intestinales manifeste une masse moléculaire de 90 000 au lieu de 70 000 dans le cas des mucines gastriques;

4) enfin, les mucines natives d'intestin de Porc apparaissent beaucoup plus résistantes aux agents de réduction que les mucines natives gastriques humaines : la réduction complète des premières nécessitent en effet 48 heures de dialyse contre une solution de mercaptoéthanol 0.25M, alors que 20 heures contre du mercaptoéthanol 0.01M suffisent pour les secondes.

Par rapport à ces résultats, ceux enregistrés par Jabbal et al. (1976) et par Forstner et al. (1979) au cours de l'étude des mucines intestinales humaines ont apporté des informations structurales sensiblement différentes :

1) en effet, l'analyse par ultracentrifugation analytique en gradient de chlorure de césium des fractions "mucin 1" et "mucin 2", isolées selon le protocole mentionné ci-dessus à partir d'intestin humain (Forstner et al., 1979), a montré l'existence dans ces deux fractions d'un composant glycoprotéique majeur associé, dans la fraction la moins purifiée dite "mucin 1", à des composants glycoprotéiques mineurs de plus faible densité;

2) la réduction de la fraction "mucin 1" en présence de dithiothréitol 10mM et de guanidine 6M, suivie d'une alkylation par l'iodoacétamide 40 mM, se traduit par l'augmentation de la proportion des composants mineurs; en revanche, la réduction n'entraîne pas de modification significative de la fraction "mucin 2";

3) en outre, par action seule de la guanidine 6M ou celle du chauffage 1 heure à 37°C sur la fraction "mucin 1", il apparaît également, bien que dans une moindre mesure, une dissociation partielle de l'édifice moléculaire.

A partir de ces observations, Forstner et al. (1979) ont suggéré que la résistance partielle de la mucine intestinale humaine purifiée ("mucin 2") à l'action des agents de réduction ne plaide pas pour l'existence de sous-unités reliées entre elles par ponts disulfure; et pour rendre compte de la sensibilité de la fraction "mucin 1" (la moins purifiée) à ces mêmes agents, ces auteurs ont proposé que la réduction dans ce cas

portait vraisemblablement sur des liaisons disulfure au sein des structures glycoprotéiques mineures qui, ainsi déstabilisées dans leur architecture, n'étaient plus aptes à s'associer par liaisons non covalentes avec la fraction glycoprotéique majeure ("mucin 2"). De la même façon, les dénaturants ou le chauffage, en réduisant les interactions non covalentes entre les diverses espèces moléculaires, seraient aussi susceptibles de produire une certaine dissociation des éléments entrant dans la constitution de la mucine intestinale native. En conséquence, ces composants glycoprotéiques mineurs joueraient un rôle différent de l'agent d'association qui, dans le modèle proposé par Allen et al. (1976) et par Pearson et al. (1981) pour la mucine gastrique et par Mantle et al. (1981b) pour les mucines intestinales, établit des liaisons covalentes par ponts disulfure entre des sous-unités fortement glycosylées. La signification et l'importance de ces structures mineures dans la mucine intestinale humaine restent encore cependant à élucider.

#### 4) Organisation moléculaire des mucines coliques.

L'examen du mucus colique est intéressant car celui-ci provient presque exclusivement d'un seul type cellulaire : les cellules caliciformes de la muqueuse (Clamp et al., 1981).

Ce mucus n'a pas été jusqu'à ce jour l'objet d'investigations aussi développées que celles consacrées au mucus élaboré par les autres étages du tractus digestif. Un certain nombre de travaux ont été consacrés aux facteurs de contrôle de la sécrétion du mucus colique (Bradbury et al., 1980; Specian et al., 1980); d'autres études, à caractère histochimique, orientées vers la recherche d'éventuels stigmates de la transformation cellulaire maligne, se sont intéressées aux mucines coliques normales et aux mucines observées dans les affections précancéreuses (polypose colique) ou cancéreuses de l'organe (Filipe et al., 1980; Listinsky et al., 1981; Boland et al., 1982). Mais les principales recherches sur la structure des mucines coliques sont l'oeuvre des équipes suivantes : Gold et al. (1974, 1981), Marshall et Allen (1978), LaMont et al. (1980), ainsi que Clamp et al. (1981).

A partir de la muqueuse colique de porc, Marshall et Allen (1978)

ont isolé, par gel filtration et ultracentrifugation à l'équilibre, des mucines dont l'analyse chimique a montré que leur composition était dans l'ensemble très proche de celle des autres mucines digestives et tout particulièrement de celle des mucines gastriques. La fraction glycanique de ces mucines est très importante (75% du poids sec), avec une teneur en acides sialiques plus élevée que dans les mucines gastriques, mais moins importante que dans les mucines intestinales (Allen et al., 1982). Ces mucines, qui apparaissent homogènes à l'ultracentrifugation, présentent une masse moléculaire très élevée estimée à 15 000 000; cependant la contribution de contaminants éventuels liés par liaisons covalentes ou non covalentes n'a pas été clairement précisée. Sous l'action des réducteurs et/ou des agents protéolytiques, ces mucines donnent lieu à la formation de sous-unités de taille variable :

a) par réduction par le 2-mercaptoéthanol 0.2 M, les mucines coliques se dissocient partiellement, donnant des sous-unités de masse moléculaire 6 000 000;

b) par action de la pronase, il se forme des sous-unités plus petites, de masse moléculaire 1 500 000;

c) par action successive de la pronase puis du mercaptoéthanol, les sous-unités obtenues sont encore de taille plus réduite (masse moléculaire = 760 000); en outre, il a été établi que la protéolyse entraîne la perte de 29% de la fraction protéique, mais elle ne frappe ni la thréonine, ni la sérine, ni la proline, et ne se traduit par aucune perte appréciable dans la fraction glycanique.

A partir de ces résultats, Allen (1978) a suggéré que les mucines coliques natives, tout comme les autres mucines digestives, étaient formées de sous-unités comportant des zones peu glycosylées, et s'associant entre elles par liaisons disulfure pour former des macro-molécules de très grande taille.

Dans une autre étude, LaMont et al. (1980), utilisant la gel filtration sur Sepharose 4B puis un échange ionique sur DEAE-Cellulose, ont obtenu chez le Rat deux fractions (appelées IV et V) possédant les caractéristiques habituelles des mucines. Ces deux fractions sont cependant différentes l'une de l'autre par :

a) leur caractère d'acidité : lors de l'échange d'ions,

les fractions sont éluées par un gradient discontinu de NaCl dans l'ordre IV puis V, selon leur acidité croissante; cependant, l'analyse chimique montre que la fraction V, pourtant plus acide, contient moins d'acides sialiques et de sulfate que la fraction IV; par contre, sa teneur en acides aspartique et glutamique est plus importante que celle de la fraction IV. Cette observation illustre bien le fait que l'acidité des mucines n'est pas liée à la seule présence des résidus d'acides sialiques et de sulfate, mais reflète aussi celle des acides aspartique et glutamique. Cette richesse en acides aminés dicarboxyliques pourrait d'ailleurs, selon LaMont et al., être une caractéristique propre aux mucines coliques;

b) leur comportement à l'ultracentrifugation qui montre non seulement une importante dispersion des vitesses de sédimentation dans les deux fractions, mais encore l'existence dans la fraction la plus acide de deux composants majeurs.

A partir de ces résultats, LaMont et al. ont émis l'hypothèse que les mucines coliques seraient constituées d'au moins deux types de molécules différant les unes des autres par leur acidité et leur masse moléculaire.

Des travaux préliminaires avaient permis à Gold et al. (1974) d'isoler des mucines coliques humaines et de les caractériser sur les plans physique, chimique et immunologique. Dans une étude plus récente, ces mêmes auteurs (1981) ont montré que ces mucines, préparées par extraction dans le mélange phénol-eau, précipitées par l'éthanol, filtrées sur Sepharose 4B puis purifiées par électrophorèse dans un gradient de polyacrylamide-agarose étaient hétérogènes du point de vue immunologique. Bien qu'apparemment homogènes par chromatographie de gel filtration (Sepharose 4B et 2B), par chromatographie d'échange ionique (DEAE- et ECTEOLA-Cellulose) et par chromatographie d'adsorption (Hydroxylapatite), ces mucines donnent en effet deux arcs de précipitation par immunodiffusion contre un anti-sérum anti-mucine colique. La protéolyse par la pronase ou la papaïne a permis de séparer les deux composants de ces mucines et d'étudier leur composition chimique. Il est ainsi apparu que l'une des deux mucines avait une teneur plus élevée en acide sialique, tandis que l'autre était plus riche en fucose. A partir de ces résultats, Gold et al. (1981) ont suggéré que les mucines coliques humaines étaient composées de deux types de molécules : des sialomucines et des fucomucines; cependant, ces auteurs n'écartent pas l'hypothèse qu'une

seule et même molécule puisse être à l'origine de ces deux composants qui ne prendraient leur individualité qu'après protéolyse.

Clamp et al. (1981) ont plus particulièrement étudié la fraction glycanique des mucines humaines isolées après chromatographie de gel filtration (Sephacrose 2B). A l'analyse chimique, la portion glycanique de ces molécules apparaît constituée des sucres habituels des mucines, mais la teneur globale de ces sucres reste faible (36%, p/p); la modestie de ce taux laissant supposer une importante contamination protéique des mucines, la fraction étudiée a été traitée par le dithiothréitol en présence de chlorhydrate de guanidine 6M, puis par l'iodoacétamide, et à nouveau filtrée sur Sepharose 2B. L'analyse de la nouvelle fraction exclue du gel montre une augmentation significative de la teneur en sucres qui passe à 52% (p/p). Il est à remarquer que le traitement direct des mucines coliques par la pronase produit le même effet que l'action des réducteurs, tant au plan de la composition que de celui de la teneur globale en sucres.

## 5) Autres mucines digestives.

### a) les mucines biliaires

La muqueuse de la vésicule biliaire produit une sécrétion dans laquelle les glycoprotéines de type mucines représentent un constituant mineur : 0.2 à 0.5 mg/ml de bile (Pearson et al., 1982). L'étude de ces mucines n'est pas facile du fait de leur mélange avec les constituants normaux de la bile (cholestérol, pigments et sels biliaires). Les fonctions du mucus biliaire restent assez mal connues : un rôle de protection de la muqueuse sous-jacente, comme dans le cas du mucus gastro-intestinal, est assez peu probable; par contre, il a été établi qu'il existait au cours de la cholélithiase expérimentale une hypersecrétion des mucines biliaires (Lee, 1980, 1981). Lee a émis l'hypothèse que grâce à leur architecture géli-forme, les mucines seraient susceptibles de jouer un rôle de matrice sur laquelle viendraient se déposer des cristaux de cholestérol ou d'autres cristaux. Les mucines joueraient ainsi un rôle important dans les mécanismes initiateurs de la lithogénèse, ainsi qu'éventuellement dans le processus

d'extension du calcul déjà formé.

A partir de la bile humaine, prélevée lors de cholécystectomies chez des femmes souffrant de calculs vésiculaires, Pearson et al. (1982) ont isolé des mucines par les méthodes habituelles dans ce groupe : chromatographie de gel-filtration (Sepharose 4B) suivie d'une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium. Les mucines ont ainsi été obtenues dans leur état natif, libres de toute contamination par des substances liées de manière non covalente. Leur analyse chimique a donné des résultats de composition en acides aminés et en sucres tout à fait caractéristiques des glycoprotéines de type mucines.

La filtration des mucines natives sur Sepharose 2B en milieu non dissociant montre que le composant majeur reste exclus du gel ; sa masse moléculaire n'a pas été déterminée avec précision, mais elle est importante, supérieure à 1 000 000. Le profil d'élution ne se modifie pas en présence d'agents de dissociation des liaisons non covalentes (chlorure de césium 3.5M ou chlorhydrate de guanidine 4M). Par contre, sous l'action de la papaïne, l'édifice se dissocie avec production d'espèces moléculaires assez homogènes, davantage retenues par le gel et donc plus petites, dont la masse moléculaire a été estimée de l'ordre de 500 000. Le 2-mercaptoéthanol 0.2M produit le même recul à l'élution, mais pour obtenir une réduction presque complète des mucines, son action doit être prolongée pendant 48 heures. L'étude électrophorétique sur gel de polyacrylamide des produits obtenus par réduction par le mercaptoéthanol 0.7M pendant 40 heures révèle la présence d'une protéine de masse moléculaire 70 000. Des résultats similaires ont été fournis à partir des mucines extraites de la bile de Porc.

Les mucines biliaires apparaissent ainsi très apparentées aux autres mucines du tractus digestif, et selon Pearson et al. (1982), l'hypothèse d'une organisation polymérique avec formation de liaisons disulfure entre les sous-unités et la protéine de masse moléculaire 70 000 permet de rendre compte des résultats expérimentaux. Par leur résistance élevée aux agents de réduction, les mucines biliaires seraient proches des mucines intestinales, mais par la taille des sous-unités et celle de la protéine de masse moléculaire 70 000, elles se rapprochent davantage des mucines gastriques.

### b) les mucines méconiales

Dans le méconium, matières visqueuses brun-verdâtre, inodores et stériles, expulsées dans les premières 24 heures chez la majorité des nouveaux-nés, les glycoprotéines du type des mucines sont un constituant majoritaire représentant 70 à 80% du poids sec de ces matières (Harries, 1978). Cette constatation n'est pas pour surprendre étant donné que le méconium n'est que le résultat du mélange du liquide amniotique ingéré par le fœtus et des sécrétions bronchiques et digestives.

Les mucines méconiales sont bien connues sur le plan de leur composition chimique qui présente toutes les caractéristiques habituelles des mucines; cependant il ne semble pas qu'elles aient, à ce jour, donné lieu à des études de structure macromoléculaire. En raison de leurs origines variées, il est probable cependant que leurs structures soient elles mêmes variées, similaires à celles des mucines dont elles sont dérivées.



## B/ LES MUCINES CERVICALES

Chez les mammifères, les voies génitales produisent un mucus qui, dans certaines espèces, joue un rôle important dans la physiologie de la reproduction.

Ce rôle reste encore obscur chez le mâle dont le sperme extériorisé au cours de l'éjaculation se présente sous l'aspect d'une sécrétion gélifforme mais qui, rapidement et spontanément, se liquéfie, probablement sous l'action de diverses protéases d'origine séminale. Le plasma séminal est riche en substances à activité de groupe sanguin et contient un composant glycoprotéique qui par sa composition chimique et sa masse moléculaire possède les caractéristiques des mucines (Gibbons, 1978). Mais des investigations complémentaires restent nécessaires pour élucider la structure et la signification physiologique de ces glycoprotéines dans les sécrétions génitales mâles.

Le mucus du tractus génital femelle provient essentiellement des cellules épithéliales bordant le canal endocervical; mais d'autres lieux mineurs de production existent tels que l'endomètre, les trompes et les glandes de Bartholin.

Les principaux travaux sur les mucines cervicales ont été réalisés sur du mucus d'origine bovine (Gelman et al., 1976; Gibbons, 1978; Roberts, 1978b; Gaddum-Rosse et al., 1980a), d'origine humaine (Gaddum-Rosse et al., 1980a; Van Kooij et al., 1980; Yurewicz et al., 1981, 1982; Carlstedt et al., 1983a, 1983b) et d'origine simienne (Hatcher et al., 1977a, 1977b; Nasir-Ud-Din et al., 1979). Diverses méthodes ont été mises en oeuvre pour solubiliser le mucus cervical, étape indispensable en vue de l'étude physico-chimique de ses constituants; ces méthodes ont été répertoriées par Gibbons (1978).

La composition chimique des mucines cervicales apparaît tout à fait typique de celle des glycoprotéines de type mucine : la teneur en acides aminés est faible (20 à 30%, p/p); cinq de ceux-ci (thréonine, sérine, proline, glycine, alanine) sont majeurs et représentent les 2/3 de l'ensemble des acides aminés, tandis que cinq autres acides aminés (lysine, histidine, tyrosine, méthionine et phénylalanine) ne représentent que moins de 10% du nombre total des acides aminés (Yurewicz et al., 1981).

Il n'existe qu'un seul acide aminé N-terminal qui chez l'Homme serait de la thréonine (Wolf et al., 1980), chez la Vache de l'alanine (Bhushana Rao et al., 1977), et chez le Singe de l'arginine (Hatcher et al., 1977).

Il y a de grandes divergences sur les conceptions qui se dégagent selon les auteurs à propos de la séquence peptidique des mucines cervicales. A partir de l'analyse des acides aminés N-terminaux dosés dans les mucines cervicales bovines, préalablement dépolymérisées sous l'action d'agents réducteurs, il a été suggéré que la molécule était constituée par la répétition de sous-unités de petite taille (MM = 27 000) ne comportant que 62 acides aminés (Bhushana Rao et al., 1977); dans l'espèce humaine, l'unité répétitive présenterait une masse moléculaire de 37 000 (Wolf et al., 1980). Cependant, Gelman et al. (1976) ont montré que par coupure au bromure de cyanogène, les mucines cervicales bovines donnaient trois fragments majeurs dans les rapports 1:2:2 avec comme masse moléculaire 230 000, 130 000 et 35 000 respectivement, et un fragment mineur de masse non déterminée. Deux des fragments majeurs, qui représentent 82% du poids total de la molécule, sont très riches en glucides et pauvres en acides aminés; à l'inverse, les deux autres fragments sont peu glycosylés et leur teneur en acides aminés (en particulier en cystéine) est plus élevée. La masse moléculaire de l'unité de base serait au minimum de 560 000. Etant donné la distribution non uniforme des résidus de méthionine le long de la chaîne peptidique, il est peu vraisemblable que la molécule native résulte de la répétition de motifs peptidiques identiques entre eux, et qu'au contraire elle comporterait des domaines nettement individualisés.

Les mucines cervicales contiennent 70 à 80% de glucides, et apparaissent constituées de fucose, galactose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique; les rapports molaires observés entre ces résidus sont chez l'Homme respectivement d'environ 1.1,

1.8, 1, 0.9 et 0.45; elles sont sulfatées (1%,p/p) (Yurewicz et al.,1981). La longueur des chaînes glycaniques peut aller jusqu'à une dizaine de résidus d'oses, et la liaison à l'axe peptidique est du type O-glycosidique.

Chez l'Homme, cette composition en sucres est indépendante du groupe sanguin du sujet examiné et ne varie pas au cours du cycle menstruel (Van Kooij et al.,1980).

Un certain nombre de données ont été publiées sur les séquences de chaînes glycaniques :

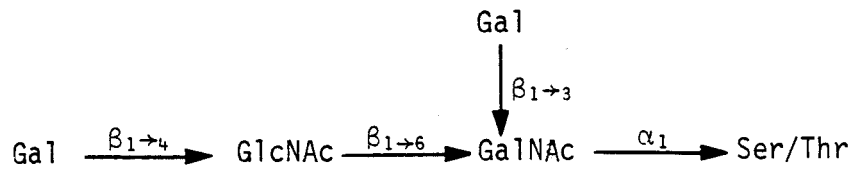
- chez l'Homme, après traitement alcalin de la mucine, 77% des résidus de N-acétylgalactosamine sont transformés en N-acétylgalactosaminitol, confirmant la nature O-glycosidique de la liaison; après purification, un total de 16 oligosaccharides différents, neutres, sialidés ou sulfatés, ont été isolés; leur taille va du disaccharide au nonasaccharide. L'étude détaillée des oligosaccharides neutres, qui constituent la moitié de la fraction glycanique de la mucine, a permis à Yurewicz et al. (1982) de proposer les séquences qui apparaissent à la figure 11. L'examen de cette figure suggère que la structure I, de nature tétrasaccharidique, représente le noyau de base des autres structures mentionnées.

- chez le Singe, il a été démontré une certaine hétérogénéité des séquences oligosaccharidiques qui varient selon la période dans le cycle menstruel. Mais comme par ailleurs, chez le Singe contrairement à ce qui se passe chez l'Homme, le mucus périovulatoire est immunologiquement distinct du mucus lutéal, suggérant un processus de biosynthèse hormono-dépendant, il est possible que les mucines cervicales soient complètement différentes dans ces deux espèces.

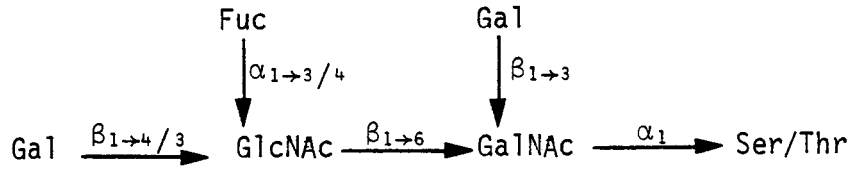
La caractéristique principale qui ressort de l'étude des glycoprotéines cervicales est l'extraordinaire hétérogénéité de leur masse moléculaire qui, selon les espèces et le traitement de solubilisation subi, peut varier de 300 000 à 10 000 000, les valeurs mesurées en milieu dissociant étant sensiblement plus élevées qu'en présence d'agents chaotropiques tels que les solutions concentrées d'urée, de chlorhydrate de guanidine, de bromure de lithium, de chlorure ou de thiocyanate de calcium.

- chez l'homme, la masse moléculaire des mucines cervicales natives serait voisine de 10 000 000 (Carlstedt et al.,1983a,1983b; mucus de fin de gestation). Chez le singe, la taille apparaît beaucoup plus

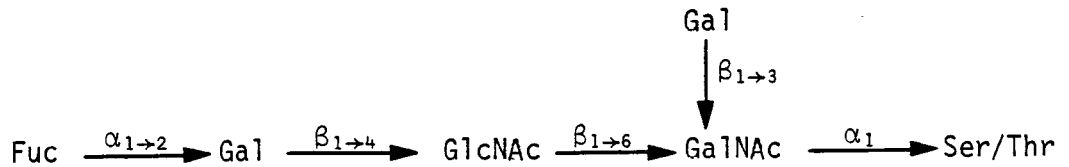
I



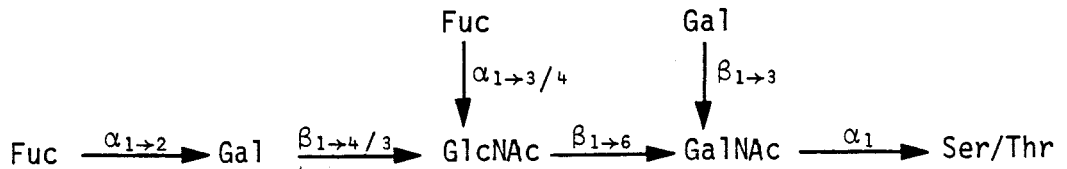
II



III



IV



V

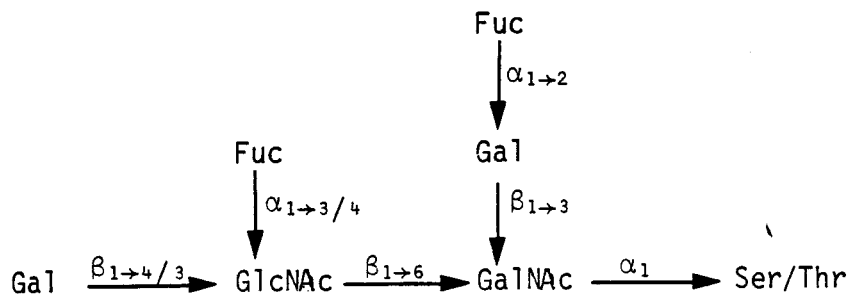


Figure 11 : Exemples de chaînes oligosaccharidiques neutres isolées à partir de mucines cervicales humaines périovulatoires (d'après Yurewicz et al., 1982)

faible, de l'ordre de 1 000 000 (Hatcher et al., 1977a, 1977b);

- sous l'action des enzymes protéolytiques, la diminution de taille est plus spectaculaire puisque les sous-unités obtenues ont une masse moléculaire se situant entre 300 000 et 600 000;

- les agents de rupture des ponts disulfure produisent le même effet que les agents de protéolyse, libérant des sous-unités de taille moléculaire similaire, mais dont la composition chimique est sensiblement différente : les glycopolypeptides de réduction sont en effet plus riches en azote et en résidus de cystéine que les glycopolypeptides de protéolyse. Les glycopolypeptides apparaissant après actions successives des agents réducteurs et des agents protéolytiques sont en tous points comparables aux glycopolypeptides libérés par la seule protéolyse, ce qui suggère que l'attaque par ces deux types d'agents se porte vraisemblablement dans des domaines très voisins dans les mucines cervicales natives. Cette région peptidique, ou une partie de cette région, peu ou pas glycosylée puisque sensible à la protéolyse enzymatique, a été isolée par Bhushana Rao et al. (1977) après digestion trypsique du glycopolypeptide de réduction; cette région serait constituée d'une vingtaine d'acides aminés, et serait riche en asparagine et en glutamine.

Le mucus cervical assure, comme le mucus des divers étages digestifs, des fonctions de protection et de lubrification des muqueuses ; en outre, dans certaines espèces telles que les espèces humaine, bovine ou ovine, le mucus cervical contrôle le passage des spermatozoïdes, déposés par le mâle dans le vagin, vers les voies génitales supérieures où s'effectue la fécondation. Ce rôle de régulation de la perméabilité cervicale aux spermatozoïdes, sans objet dans des espèces telles que le Porc, le Cheval ou le Chien chez lesquelles l'insémination est endocervicale (Gibbons, 1978), s'exerce par la modification cyclique des propriétés rhéologiques du mucus selon le climat hormonal actuel :

- 1- en période de dominance oestrogénique, c'est-à-dire au moment de l'ovulation, la quantité de mucus secrété est importante (600 mg/jour en moyenne); c'est un mucus limpide très hydraté, doué d'une grande élasticité ("filance") (Elstein, 1978; Chantler, 1982), facilement perméable aux spermatozoïdes (Gaddum-Rosse et al., 1980a, 1980b);

- 2- inversement, en phase lutéale, le mucus devient moins

abondant (20 à 60 mg/jour), opaque et cellulaire, plus visqueux; son élasticité s'altère, perturbant ou même inhibant la migration des spermatozoïdes. Ces modifications apparaissent directement liées à la production accrue de progestérone au cours de cette phase; Martin et al. (1981) ont suggéré que ces modifications pouvaient être le résultat d'une interaction entre les mucines et cette hormone.

Une question importante, restée jusqu'à présent sans réponse décisive, est celle de savoir si ces variations cycliques des propriétés du mucus cervical seraient liées ou non à des modifications de structure des mucines qui constituent le principal composant macromoléculaire de ce mucus.

La teneur en acide sialique dans les mucines cervicales collectées à différentes périodes du cycle a été l'objet de plusieurs investigations, mais les résultats sont contradictoires. L'augmentation de l'acide sialique à la période périovulatoire, rapportée par Chantler et al. (1977) et par Hatcher et al. (1977) est séduisante : par la majoration du degré d'hydratation des mucines qu'elle pourrait induire, elle permettrait d'expliquer la diminution de la viscosité du mucus à cette période. Cependant, selon Van Kooij et al. (1980), aucune variation cyclique de la composition en sucres (et donc en acide sialique) n'a pu être mise en évidence dans le mucus cervical. En outre, le fait, rapporté par Meyer et al. (1975), que le traitement des mucines bronchiques par la neuraminidase n'affecte pas les propriétés viscoélastiques de ce mucus est une indication supplémentaire que l'acide sialique n'intervient probablement pas dans la rhéologie du mucus.

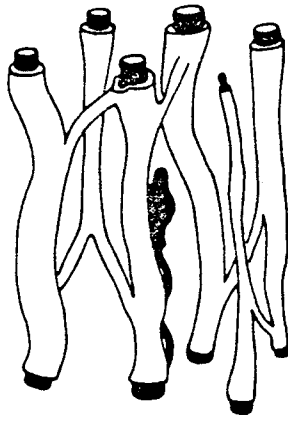
Par ailleurs, Roberts (1978b) a montré que les glycoprotéines cervicales bovines prélevées soit au moment de l'oestrus, soit au cours de la gestation, et traitées de façon identique (réduction puis attaque par la pronase), manifestaient le même comportement chromatographique sur Sepharose 4B. Le facteur qui d'après Roberts apparaît déterminant dans la variation de la viscosité du mucus serait tout simplement la teneur en eau de ce dernier : le fait d'agiter le mucus cervical prélevé lors de la gestation une nuit dans du chlorure de sodium 0.9% entraîne une absorption d'eau, aboutissant à former un mucus d'aspect identique à celui observé lors de l'oestrus. Les différences de propriétés physiques de ces deux types de mucus s'expliqueraient donc davantage par la variation, sous contrôle hormonal, de l'hydratation du mucus plus que par des différences de structures des mucines.

Van Kooij et al. (1980) ont émis une opinion à peu près similaire. Ces auteurs ont en effet remarqué que le rapport protéines sur hexoses, faible à la période périovulatoire, augmente de façon parallèle à la viscoélasticité du mucus au cours de la phase lutéale. L'évolution de ce rapport s'explique par la diminution de la sécrétion d'eau et de glycoprotéines après l'ovulation et pourrait en conséquence rendre compte de la variation des propriétés physiques du mucus au cours du cycle.

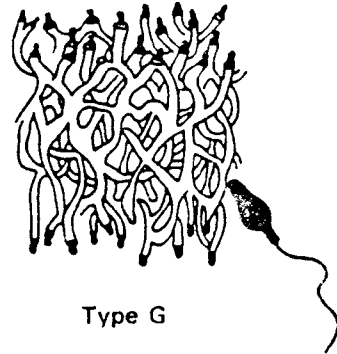
Différents modèles d'organisation macromoléculaire des mucines cervicales ont été proposés pour expliquer la perméabilité éventuelle du mucus vis-à-vis des spermatozoïdes :

1- Gibbons et al. (1966) ont émis l'hypothèse que le mucus cervical constitue un réseau formé par des fibres glycoprotéiques reliées entre elles par des liaisons chimiques, peut-être avec interposition d'une protéine dite de liaison. L'aptitude des spermatozoïdes (dont l'équipement protéasique dans l'acrosome est bien connu) à progresser dans ce réseau pourrait alors résulter, selon Moghissi et al. (1970), de l'attaque protéolytique de ces liaisons et peut-être aussi de certaines zones privilégiées des mucines.

2- Sur la base des résultats fournis par différentes méthodes physiques d'exploration (RMN, viscosimétrie, diffraction de la lumière, utilisation de traceurs isotopiques), Odeblad (1973) a proposé un modèle dans lequel les longues chaînes glycoprotéiques des mucines seraient organisées en agrégats ou micelles, disposés parallèlement les uns aux autres et hydratés par des molécules d'eau liées. Par établissement d'un certain nombre de connections entre micelles adjacentes, il se formerait un réseau à trois dimensions, entre les mailles duquel des espaces contenant une eau libre et diffusible réaliseraient de véritables canaux liquidiens. En période de dominance oestrogénique, le mucus serait de type "E" : les liaisons mises en jeu seraient préférentiellement des liaisons hydrogène, et le réseau de fibres ménagerait de larges canaux liquides où les spermatozoïdes pourraient facilement progresser (Fig. 12). La proportion d'eau liée augmenterait d'un tiers au dépens de l'eau libre bien que l'épaisseur de cette eau liée autour des mucines passerait de  $0.4 \mu\text{m}$  à  $0.03 \mu\text{m}$ ; dans ce mucus plus serré dit de type "G", la pénétration des spermatozoïdes serait très faible. La variation de l'organisation moléculaire du mucus cervical selon le climat hormonal

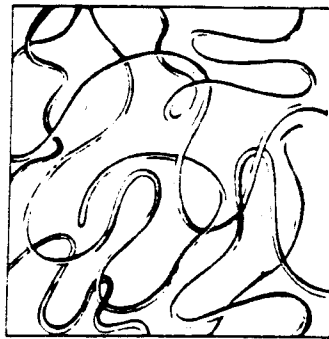


Type E



Type G

Modèles proposés par Odeblad (1973)



Modele selon Lee et al. (1977)  
(*mucine cervicale périovulatoire*)

Figure 12 : Modèles d'organisation macromoléculaire du mucus cervical, selon la phase hormonale du cycle menstruel





s'expliquerait selon Odeblad (1973) par une hormonodépendance du processus de biosynthèse des mucines cervicales.

3- Ultérieurement, Lee et al. (1977) ont suggéré un autre modèle dans lequel le mucus cervical apparaît non comme un réseau rigide tel que proposé par Odeblad, mais plutôt comme un ensemble de macromolécules à structure enroulée au hasard, dont la cohésion résulterait non de l'établissement de liaisons chimiques mais de l'existence de nombreux entrelacements lâches inter- et intrachâînes. Les modifications de rhéologie observées au cours du cycle menstruel s'expliqueraient par la variation de la teneur en eau des micelles glycoprotéiques. Un certain nombre d'observations expérimentales viennent à l'appui de la validité de ce modèle : en phase lutéale, le mucus cervical perd effectivement 10% de son eau; laissé à lui-même, il perd spontanément son aspect gélifforme et se liquéfie, ce qui, selon Chantler (1982), indiquerait l'absence de liaisons covalentes dans le maintien de la cohésion du mucus. Le degré d'hydratation du mucus serait, selon Tam et Verdugo (1981), déterminé par des variations locales et hormonodépendantes du pH, conduisant à des modifications d'ionisation des mucines cervicales, et donc à une redistribution, selon un mécanisme d'équilibre de Donnan, des molécules d'eau et des électrolytes dans le canal cervical.

4- Sur la base des renseignements tirés de l'étude physico-chimique des mucines cervicales humaines natives ainsi que de leurs fragments de réduction et de protéolyse, Carlstedt et al. (1983b) ont récemment proposé un autre modèle d'organisation de ces structures.

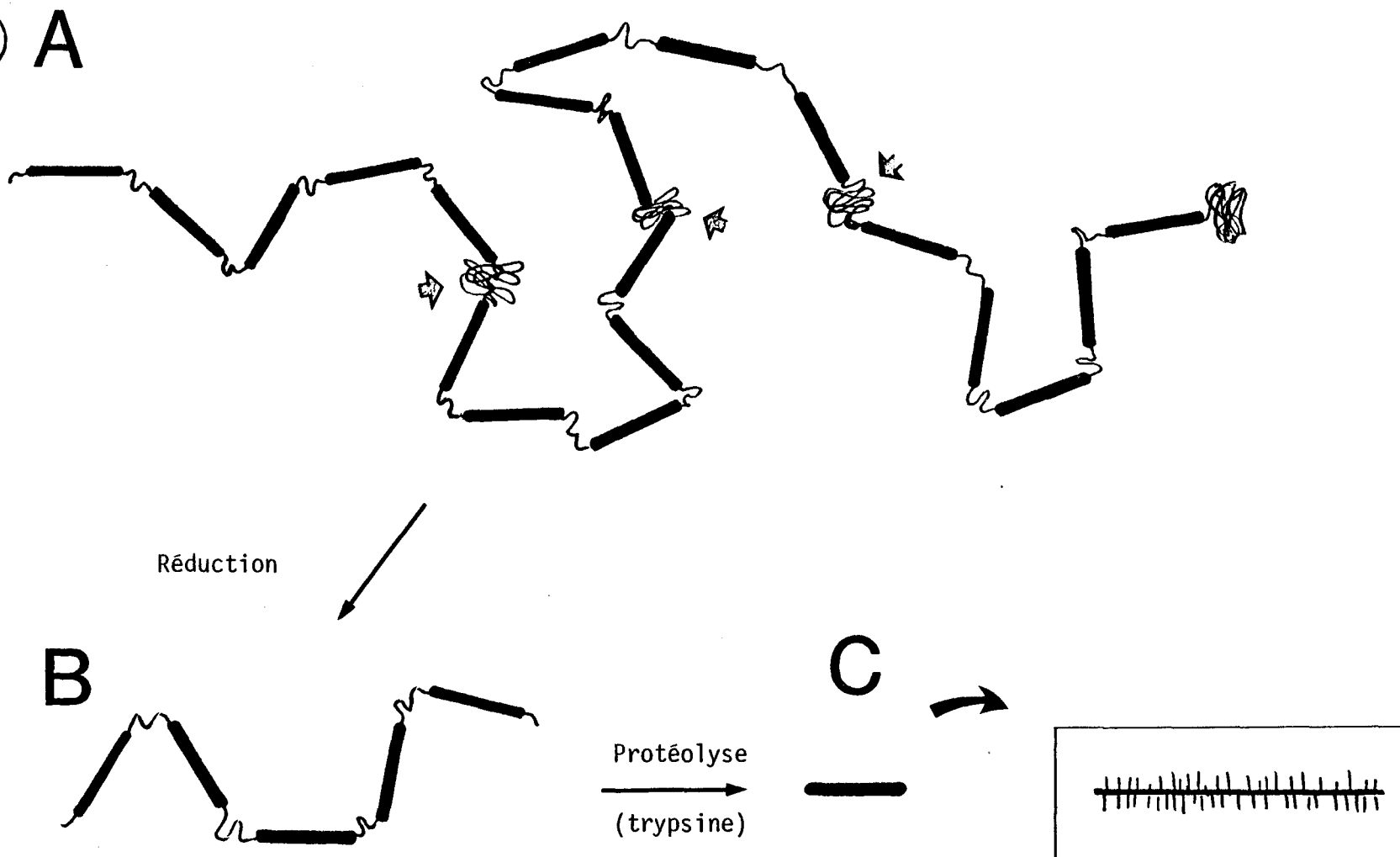
Ces auteurs ont montré que sous l'action du dithiothreitol en milieu dissociant, il se produit une importante dépolymérisation des mucines objectivée 1) par le recul en chromatographie sur Sepharose CL-2B et 2) par la diminution de la masse moléculaire qui passe de 10 000 000 environ pour les mucines natives à 2 000 000 environ pour les "sous-unités" réduites; sous l'action ultérieure de la trypsine, ces sous-unités produisent des glycopeptides (appelés "T-domains") dont la masse moléculaire est de l'ordre de 380 000.

A partir de la masse moléculaire et de la teneur en acides aminés, et considérant un espacement linéaire de 0.25 à 0.30 nm par résidu d'acide aminé, c'est-à-dire intermédiaire entre celui d'une conformation hélicoïdale  $\alpha$  (0.15nm) et celui d'une conformation de type  $\beta$  complètement étirée (0.35nm), le calcul a montré que la longueur moyenne de

chaque protomère (T-domain) était de 110 à 120nm ; en rapprochant cette longueur du rayon de gyration expérimental déterminé à partir des mesures de diffusion de la lumière ( $R_g = 31\text{nm}$ ), Carlstedt et al. (1983b) ont montré que la conformation de ces protomères était en grande partie étirée, en forme de bâtonnets, peu flexibles. Par ailleurs, quand à partir des données enregistrées dans les trois structures de complexité croissante observées (protomères, sous-unités et molécule native), on examine le rayon de gyration en fonction de la masse moléculaire, les trois points expérimentaux se disposent selon une droite dont la pente suggère, selon les auteurs, que l'arrangement des protomères en sous-unités et des sous-unités dans la molécule native se fait probablement selon un modèle linéaire flexible, mais néanmoins quelque peu rigide. En aucun cas, précisent ces auteurs, l'organisation des protomères ne peut être celle du modèle d'Allen et al. (1982) (Fig.10), dans lequel quatre protomères identiques se disposent en étoile avec établissement de ponts disulfure entre eux ou par l'intermédiaire d'une protéine de liaison.

Ces protomères seraient reliés les uns aux autres bout à bout par l'intermédiaire de régions peptidiques non glycosylées, sensibles à la protéolyse, et d'après le calcul, 4 à 5 protomères entreraient dans la constitution d'une sous-unité. Pour constituer la mucine native, 4 sous-unités en moyenne s'associeraient par établissement de liaisons disulfure, et, pour rendre compte de la plus faible teneur en acides aminés des sous-unités par rapport à la molécule native, Carlstedt et al. (1983b) ont proposé qu'une séquence peptidique se disposerait entre les sous-unités, qui serait libérée par l'action des agents réducteurs.

La mucine cervicale native apparaîtrait donc, selon ces auteurs, comme une macromolécule linéaire et flexible, constituée de 4 sous-unités disposées régulièrement et unies par des ponts disulfure; chacune de ces sous-unités résulterait à son tour de l'enchaînement de 4 à 5 protomères identiques reliés entre eux par un peptide sensible aux enzymes protéolytiques et donc peu glycosylé. Le modèle correspondant à cette description est représenté schématiquement à la figure 13.



**Figure 13 :** Modèle d'organisation macromoléculaire des mucines cervicales humaines (d'après Carlstedt et al., 1983b). A : mucine native; B : sous-unité; C : protomère ("T-domain") avec, dans l'encadré, le schéma rappelant l'implantation des chaînes oligosaccharidiques sur l'axe polypeptidique. Le site d'action des agents de réduction sur la mucine native est indiqué par des flèches.

## C/ LES MUCINES TRACHEO-BRONCHIQUES

Les sécrétions trachéo-bronchiques figurent parmi les sécrétions muqueuses les mieux étudiées de l'organisme. Les nombreux travaux réalisés ont rendu possible une meilleure connaissance de ces sécrétions, et notamment celle de leur principal constituant macromoléculaire, les mucines. Cependant, comme les mucines secrétées par les autres épithéliums, les mucines trachéo-bronchiques demeurent encore l'objet d'interprétations divergentes quant à certains aspects de leur structure et de leur organisation macromoléculaire. Ces désaccords en fait s'expliquent probablement par la très grande hétérogénéité des fractions étudiées, tant en ce qui concerne leur origine que leur mode de préparation.

En raison des difficultés de recueil et du volume limité du mucus trachéo-bronchique normal, une grande partie des recherches a été effectuée sur l'expectoration émise au cours de divers états pathologiques tels que la bronchite chronique, l'asthme ou la mucoviscidose, toutes affections qui sont caractérisées par une hypersecretion bronchique.

Quelques auteurs cependant, grâce à la mise en oeuvre de diverses techniques de recueil, ont pu prélever des quantités suffisantes de sécrétion bronchique physiologique pour permettre l'étude ultérieure, plus ou moins détaillée, de leurs composants (Tab. V). Ces techniques sont variées :

1) l'aspiration trachéale sous bronchofibroscopie (Whitney et al., 1978; Sachdev et al., 1980; Williams et al., 1982) ou par l'orifice d'une trachéotomie (Snyder et al., 1982a);

2) le lavage broncho-alvéolaire, effectué sous fibroscopie en zone macroscopiquement saine (Lafitte et al., 1975, 1977);

BUS  
LILLE

REFERENCES	ESPECE	MATERIEL ETUDIE	SOLUBILISATION	FRACTIONNEMENT
Degand et al. (1973b)	Homme	Liquide de kystes bronchogéniques	Lavage par 3 Vol. NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Réduction par $\beta$ ME 1% en tampon phosphate	Gel filtration puis Electrophorèse préparative à haut voltage ou échange ionique puis gel filtration
Degand et al. (1974)	"	"	Lavage par 3 Vol. NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Papaïne / Pronase	Précipitation par l'éthanol Electrophorèse préparative à haut voltage ou échange ionique
Lafitte et al. (1975)	"	Liquide de lavage broncho-alvéolaire (fibroscopie)	centrifugation → phase soluble → phase géiforme réduite par $\beta$ ME 1% en tampon phos.	échange ionique puis gel filtration
Lafitte et al. (1977)	"	"	Réduction par $\beta$ ME 1% en tampon phosphate	échange ionique puis gel filtration
Whitney et al. (1978)	"	Secrétions trachéo-bronchiques (fibrosc)	Guanidine 6M à 60°C Réduction	gel filtration
Liao et al. (1979)	Chien	Aspiration trachéale (poche trachéale)	Lavage par 2 Vol. eau → phase soluble → phase géiforme SDS seul ou avec DTT	gel filtration échange ionique
Sachdev et al. (1980)	Homme	Secrétions trachéo-bronchiques (fibrosc.)	Ultra-sons	gel filtration
Snyder et al. (1982a)	"	Secrétions trachéo-bronchiques (trachéo.)	Lavage par 3 x 20 Vol. eau ébullition 1mn;	précipitation par Cetavlon et éthanol; gel filtration
Williams et al. (1982)	"	Secrétions trachéales (fibroscopie)	Urée 8M	gel filtration
Mian et al. (1982)	Poulet	Secrétions trachéales (préparation trachéale in vitro cannulée)	Séparation phases soluble et géiforme par pipette Pasteur	gel filtration

Tableau V.: Protocoles de solubilisation et de fractionnement de diverses mucines trachéobronchiques normales

3) des techniques expérimentales telles que la constitution d'une poche trachéale chez le Chien (Liao et al., 1979) ou l'isolement d'un segment trachéal de Poulet *in vitro* (Mian et al., 1982) ont également été mises en oeuvre;

4) une autre approche des mucines "normales" a été réalisée par Degand et al. (1973b, 1974) qui ont examiné le liquide de sécrétion obtenu à partir de kystes bronchogéniques prélevés chirurgicalement. Ces kystes proviennent du développement, à un niveau donné de l'arbre trachéo-bronchique, de cellules qui se sont détachées au cours de l'embryogénèse pendant la migration intrathoracique du bourgeon respiratoire. Le liquide isolé à partir de ces tumeurs intrathoraciques fermées offre l'avantage d'être stérile, permettant ainsi l'isolement de sécrétions natives puisque indemnes de toute contamination bactérienne. Il est à noter cependant que les liquides de kystes bronchogéniques ne peuvent être considérés comme représentatifs de l'ensemble des sécrétions trachéo-bronchiques normales car ils ne sont produits que par des types cellulaires d'origine ponctuelle. La composition peptidique particulière des mucines de kystes bronchogéniques, notamment leur proportion élevée en sérine, incite en outre à la prudence quant à leur assimilation à des mucines de caractère normal.

La première difficulté à laquelle se heurte l'étude des mucines trachéo-bronchiques est liée à la nature complexe et à l'hétérogénéité du mucus bronchique.

En effet, dès l'examen macroscopique, l'expectoration apparaît inhomogène, comportant des amas ou des zones à consistance géliniforme au sein d'une phase liquide plus ou moins abondante.

A l'examen microscopique, après coloration des glycoprotéines acides par le bleu de toluidine et des acides désoxyribonucléiques par l'orangé d'acridine, la sécrétion apparaît constituée par un réseau de fibrilles plus ou moins fines et denses, renfermant dans leurs mailles des éléments cellulaires d'origine essentiellement leucocytaire, le tout baignant dans une phase liquide (Bürgi, 1964).

Par l'étude en microscopie électronique, White et al. (1954) ont décrit dans l'expectoration de sujets asthmatiques l'existence de deux types de fibres : les fibres de "mucoprotéines" et les fibres de "désoxyribonucléoprotéines", ces dernières provenant des noyaux de cellules in-

flammatoires dégradés et particulièrement abondants dans les sécrétions purulentes.

Havez et al. (1967) ont montré que, tout en respectant l'organisation fibrillaire de l'expectoration, le lavage à l'eau permet l'élimination des composants solubles et des éléments cellulaires présents dans ces sécrétions. En effet, par agitation de l'expectoration en présence de trois volumes de sérum physiologique suivie d'une centrifugation à basse vitesse (4000g pendant 20mn), il est possible de séparer la sécrétion bronchique en trois phases :

a) une couche superficielle mousseuse riche en phospholipides et en particulier en dipalmitoylphosphatidylcholine, principal composant du surfactant pulmonaire;

b) une couche intermédiaire aqueuse correspondant à un mélange de constituants solubles d'origine bronchique et parfois salivaire;

c) un culot gélatineux insoluble dans l'eau, correspondant au réseau fibrillaire bronchique et à des éléments cellulaires.

Les phases soluble et gélatineuse manifestent sur le plan qualitatif une composition assez voisine : toutes deux comportent en effet des glycoprotéines de type mucine, des protéines et glycoprotéines d'origine plasmatique et sécrétoire; elles renferment aussi des lipides et des acides nucléiques, ces derniers particulièrement abondants dans les expectorations surinfectées (Roussel et al., 1976, 1978; Lamblin et al., 1977b; Lopez-Vidriero et al., 1980b; Bhaskar et al., 1981). La teneur de ces divers composants et leurs proportions relatives varient cependant beaucoup entre phase soluble et phase fibrillaire : les constituants protéiques apparaissent prépondérants dans la phase soluble, tandis que les mucines représentent le composant principal du mucus fibrillaire (Das, 1977; Lopez-Vidriero et al., 1978a, 1978b, 1978c).

Compte tenu de cette distribution, l'étude des mucines bronchiques peut être entreprise soit à partir de la phase soluble, soit à partir de la phase gélatineuse du mucus, ou encore à partir de la sécrétion trachéo-bronchique totale, mais dans ces deux derniers cas, en raison de ses propriétés viscoélastiques, l'échantillon doit être solubilisé pour permettre le fractionnement et l'étude ultérieure de ses composants.

Bien que ne nécessitant aucun traitement préalable de solubilisation, la phase soluble du mucus bronchique n'a servi de matériel d'étude des mucines que dans quelques travaux (Lafitte et al., 1975; Liao et al., 1979; Mian et al., 1982). Ce manque d'intérêt pour une composante non négligeable des sécrétions bronchiques résulte en fait de la pauvreté relative de cette phase en substances organiques et tout particulièrement en mucines. Pour nombre d'auteurs, l'avantage de la phase soluble qui, par définition, ne pose aucun problème de solubilisation, est amoindri par le fait qu'elle ne peut être considérée comme représentative des sécrétions trachéo-bronchiques dans leur ensemble. C'est pourquoi, en vue d'améliorer cette représentativité, différentes techniques ont été proposées qui, dans l'équilibre existant entre phase fibrillaire et phase soluble, tendent à augmenter la part de cette dernière.

Les techniques de solubilisation du mucus sont nombreuses et se classent, en fonction de l'importance du remaniement moléculaire qu'elles entraînent, en techniques non dégradantes et en techniques dégradantes :

1) les techniques non dégradantes laissent les structures macromoléculaires dans leur état natif. Appartiennent à cette catégorie:

a) les méthodes d'extraction en tampon aqueux non dissociant.

- Feldhoff et al. (1979), travaillant sur les sécrétions trachéo-bronchiques collectées chez un patient asthmatique, ont proposé une méthode qui consiste à diluer l'expectoration au 1/10 dans de l'eau puis, après agitation mécanique douce, à recueillir la phase soluble par centrifugation à basse vitesse; cette méthode apparaît particulièrement efficace puisque la phase géliforme disparaît totalement dans le culot et que dans le surnageant se retrouvent plus de 90% des oses combinés présents dans le matériel de départ.

- Cette méthode a été reprise plus récemment par Snyder et al. qui ont proposé une triple extraction du mucus bronchique, chaque extraction se faisant avec 20 volumes (mucus de sujet normal, Snyder et al., 1982a) ou avec 4 volumes de sérum physiologique (mucus d'enfants atteints de mucoviscidose, Snyder et al., 1982b). Cette variante aboutit également à une très bonne extraction puisque 80 à 85% des protéines, de l'acide sialique et des oses neutres passent ainsi dans la



phase soluble.

- L'ampleur de la solubilisation du mucus par extraction dans un tampon aqueux non dissociant n'apparaît pas toujours aussi grande : selon Rose et al. (1979), l'extraction par 10 à 20 volumes d'eau ou de sérum physiologique n'entraîne qu'une solubilisation partielle du mucus, le plus souvent de l'ordre de 25%, parfois 40 à 60%. Pour Sachdev et al. (1980), la solubilisation du mucus normal préalablement dialysé et lyophilisé reste très limitée à température ambiante, même après agitation prolongée.

b) les méthodes d'extraction en tampon dissociant : l'urée 6M (Roberts, 1974), le chlorhydrate de guanidine 6M (Whitney et al., 1978) ou le SDS à 1% (Liao et al., 1979) constituent des agents efficaces de dissociation des liaisons hydrogène au sein du mucus. Harding et al. (1983b) considèrent néanmoins que le chlorhydrate de guanidine, même à la concentration 6M, ne constitue pas un agent de dissociation, mais qu'il agit plutôt comme un électrolyte classique en supprimant de façon réversible les effets de charge électrique au sein des édifices macromoléculaires de nature polyélectrolytique. A l'appui de cette thèse, ces auteurs ont montré que la masse moléculaire de diverses mucines ne variait pas de façon significative selon que celles-ci se trouvaient en tampon phosphate seul (force ionique 0.1) ou contenant du chlorure de sodium 1M ou encore du chlorhydrate de guanidine 6M; tout au plus ont-ils remarqué une légère diminution de la viscosité de la solution de mucines en présence de ces sels, modification qui, selon Harding et al. (1983b), serait d'ordre purement conformationnel et non le résultat d'un effet dissociant.

c) l'emploi de bromure de césium à forte concentration (densité finale dans l'échantillon  $d = 1.50$  g/ml) a été préconisé par Creeth et al. (1977) pour solubiliser les sécrétions trachéo-bronchiques totales de bronchite chronique et d'asthme. Bhaskar et al. (1981) ont également utilisé cette technique pour solubiliser la phase gélatineuse du mucus au cours de l'asthme. Par la force ionique élevée qu'il confère et par sa nature partiellement chaotropique, le bromure de césium diminue l'intensité des forces électrostatiques entre les espèces moléculaires, ce qui selon Creeth assure la solubilisation du mucus.

2) les techniques dégradantes affectent les structures moléculaires de façon irréversible, avec une action plus ou moins prononcée

selon la nature du ou des agents mucolytiques utilisés. L'emploi de ces agents, bénéfique quant à la diminution de la viscosité des échantillons, devient souvent un handicap pour l'étude ultérieure de certaines propriétés des mucines qui perdent leur structure native et se fragmentent sous leur action. Les traitements mucolytiques appliqués au mucus bronchique ont été de nature variée, mettant en jeu les agents suivants :

a) les agents de rupture des ponts disulfure : L-cystéine (Havez et al., 1967), 2-mercaptoéthanol (Degand et al., 1973b; Lambelin et al., 1973), dithiothréitol (Roberts, 1976; Liao et al., 1979), ou encore le dithioérythritol (Havez et al., 1970; Tabachnik et al., 1981);

b) les enzymes protéolytiques tels que la pepsine, la papaïne, la pronase et la trypsine (Brogan, 1959; Havez et al., 1967). Ces agents catalysent la rupture de la chaîne polypeptidique des mucines en libérant des glycopeptides de taille variable, assurant ainsi une mucolyse partielle;

c) le traitement par les ultra-sons (Brogan, 1960; Sachdev et al., 1980);

Il est à remarquer que, par rapport à l'action d'une technique appliquée de façon isolée, la combinaison de deux techniques peut dans certains cas aboutir à une meilleure solubilisation du mucus. Rose et al. (1979) ont ainsi montré par exemple que l'effet de solubilisation des agents dénaturants est plus marqué en présence d'un agent réducteur.

La purification et le fractionnement des mucines ont été obtenus par la mise en oeuvre de méthodes variées basées sur différentes propriétés physicochimiques de ces molécules telles que taille, charge électrique ou densité (Tab. V et Tab. VI). Etant donné qu'aucune de ces méthodes ne peut conduire isolément à l'obtention de mucines suffisamment purifiées, il est indispensable, comme pour la solubilisation du mucus, de procéder par divers couplages de techniques différentes. Les méthodes les plus utilisées ont été les suivantes :

1) la chromatographie de gel filtration en tampon dénaturant ou non dénaturant. Basée sur la taille moléculaire des espèces à séparer, cette méthode de fractionnement, bien que très largement utilisée par les divers auteurs, garde ses limites en raison de difficultés d'élution observées quand les échantillons sont visqueux, et en raison aussi de rende-

REFERENCES	ORIGINE DE L'EXPECTORATION	SOLUBILISATION	FRACTIONNEMENT
Brogan (1959) (1960)	Bronchite chronique "	Pepsine Ultra-sons	Précipitation par l'éthanol Précipitation par le phénol 90%
Havez et al. (1967)	Asthme	Lavage par 3 Vol NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Réduction (cystéine 0,075M)	Electrophorèses (agarose, prépa.) Gel filtration
Lamblin et al. (1973)(1977a)	Bronchite chronique	Lavage par 3 Vol NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Réduction ( $\beta$ ME 1%)	Echange ionique Gel filtration
Roussel et al. (1975)	Mucoviscidose	"	"
Roussel et al. (1976)	Mucoviscidose	Lavage par 3 Vol NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Papaïne/Pronase ou $\beta$ ME 1%	Précipitation par l'éthanol Echange ionique Gel filtration
Roberts (1974)	Bronchite chronique Bronchorrhée	Lavage par 2 Vol eau Recueil de la phase géiforme Urée 6M	Précipitation par l'éthanol Echange ionique
Roberts (1976)	"	Recueil de la phase géiforme par centrifugation; 3 lavages par 2 Vol eau puis par NaCl 0,9% Réduction (DTT 0,1M)	Gel filtration Echange ionique
Lhermitte et al. (1976)	Bronchite chronique	Lavage par 3 Vol NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Réduction ( $\beta$ ME 1%)	Echange ionique Gel filtration
Lamblin et al. (1977b)	Mucoviscidose	Lavage par 3 Vol NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Papaïne/Pronase	Précipitation par l'éthanol Echange ionique Gel filtration

Tableau VI.: voir suite page suivante

REFERENCES	ORIGINE DE L'EXPECTORATION	SOLUBILISATION	FRACTIONNEMENT
Creeth et al. (1977)	Bronchite chronique Asthme	Dilution par 2 Vol Tampon phosphate/NaCl en présence de CsBr (densité finale = 1,5 g/l)	Ultracentrifugation en gradient de CsBr
Whitney et al. (1978)	Mucoviscidose Bronchite chronique	Guanidine 6M à 60°C Réduction	Gel filtration
Rose et al. (1979)	Asthme	Homogénéisation. Bain marie bouillant 10mn. Recueil de la phase gel. Réduction en SDS 1%	Gel filtration Hydroxylapatite
Feldhoff et al. (1979)	Asthme	Dilution au 1/10 avec de l'eau	Gel filtration
Lamblin et al. (1979)(1980)	Mucoviscidose Bronchite chronique	Lavage par 3 Vol NaCl 0,9% Recueil du mucus fibrillaire Réduction (βME 1%)	Echange ionique Gel filtration
Jenssen et al. (1980b)	Bronchite chronique	Urée 6M, à pH 12,5 Centrifugation	Gel filtration
Bhaskar et al. (1981)	Asthme	Ultracentrifugation 160 000g-30mn. Recueil des phases soluble et gel. Dilution par tampon phosphate/NaCl, 1 Vol et 2 Vol, respectivement.	Ultracentrifugation en gradient de CsBr
Tabachnik et al. (1981)	Mucoviscidose	Aucun traitement particulier	Gel filtration
Snyder et al. (1982b)	Mucoviscidose	Dilution par 3 x 4 Vol NaCl 0,9%	Citraconylation Précipitation par le Cetavlon

BUS LILLE

Tableau VI.: Protocoles de solubilisation et de fractionnement des mucines trachéobronchiques au cours de circonstances pathologiques variées.

ments parfois insuffisants;

2) l'électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage (Havez et al., 1967; Degand et al., 1973b, 1974);

3) la chromatographie d'échange ionique : autre méthode d'application très large permettant de séparer les mucines d'après leur caractère d'acidité croissante (Lamblin et al., 1973, 1977a, 1977b, 1979, 1980; Degand et al., 1973b, 1974; Roberts, 1974, 1976; Roussel et al., 1975, 1976; Lafitte et al., 1975, 1977; Liao et al., 1979);

4) la chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite (Rose et al., 1979);

5) les méthodes utilisant les agents de précipitation :

a) précipitation par l'éthanol (Brogan, 1959, 1960; Degand et al., 1974; Roberts, 1974; Roussel et al., 1976; Lamblin et al., 1977b). Cette technique permet de précipiter les mucines, mais d'autres protéines sont également entraînées;

b) fractionnement au phénol (Brogan, 1959, 1960)

c) précipitation par le rivanol (lactate de 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine) ou par le cetavlon (bromure de cetyltriméthylammonium) (Havez et al., 1967, 1969; Snyder et al., 1982a, 1982b). Le traitement par le cetavlon ne permet de précipiter que les mucines chargées négativement; les autres mucines, restées dans le surnageant, pouvant à leur tour être précipitées par l'éthanol à 50% (v/v) (Snyder et al., 1982a, 1982b);

6) l'ultracentrifugation en gradient de densité de bromure de césium est, selon Creeth et al. (1977) et selon Bhaskar et al. (1981), une méthode intéressante pour séparer les glycoprotéines de type mucine des autres contaminants protéiques présents dans le mucus. En effet, en raison de leur fort degré de glycosylation, les mucines manifestent une densité de flottation approchant celle d'une solution pure de sucres (densité environ 1.6 g/ml) tandis que les glycoprotéines plasmatiques ou sécrétoires, peu glycosylées, présentent une densité proche de celle des protéines pures (densité environ 1.3 g/ml). Cependant, étant donné la teneur assez élevée en acides aminés des mucines ainsi isolées, il semble que cette technique laisse persister une certaine contamination de celles-ci par les protéines;

7) Snyder et al. (1982b) ont proposé une nouvelle méthode de purification des mucines basée sur l'emploi de l'anhydride citraconique (encore dénommé anhydride méthylmaléique). Cette méthode repose sur la

constatation que les liaisons qui s'établissent dans le mucus entre les mucines et les contaminants protéiques sont principalement de nature non covalente, mettant en jeu des fonctions  $\epsilon$ -aminées appartenant aux protéines et des résidus d'acide sialique et de sulfate chargés négativement, situés sur les mucines (Jenssen et al., 1980a). Le traitement du mucus par l'anhydride citraconique permet de modifier réversiblement les résidus de lysine et donc de minimiser ces interactions non covalentes. Dans ces conditions, les complexes mucines-protéines se dissocient et les groupes de sulfate et d'acide sialique étant libérés, les mucines peuvent, après désacétylation, être séparées par précipitation par les sels d'ammonium quaternaire. Les mucines ayant une faible teneur en lysine, Snyder et al. considèrent que la réaction de citraconylation reste pratiquement limitée aux protéines contaminantes.

Les tableaux VII et VIII rapportent la composition chimique des substances glycoprotéiques de masse moléculaire élevée isolées à partir de diverses sécrétions trachéo-bronchiques humaines.

L'examen de ces tableaux montre que d'une façon générale ces substances partagent les caractéristiques chimiques habituelles des mucines : faible teneur en acides aminés totaux (10 à 30 g/100g); richesse de l'axe polypeptidique en sérine et thréonine; cinq des acides aminés (Thr + Ser + Pro + Gly + Ala) représentent à eux seuls entre les 2/3 et les 3/4 de l'ensemble des résidus d'acides aminés; pauvreté en acides aminés soufrés, aromatiques, aliphatiques et basiques.

La fraction "IA" isolée par Tabachnik et al. (1981) à partir de l'expectoration de sujets atteints de mucoviscidose s'écarte cependant assez sensiblement de ces critères : sa composition en acides aminés laisse supposer la présence de protéines contaminantes en quantités non négligeables.

Parmi les travaux réalisés sur les mucines, un certain nombre de divergences ont été enregistrées quant à la teneur de ces glycoprotéines en cystéine. Ces résidus représentent d'après les travaux de Rousset et al. (1975), Lafitte et al. (1977) et Lamblin et al. (1979) moins de 0.7 mol/100 mol d'acides aminés; chez d'autres auteurs, les valeurs sont sensiblement plus élevées : 2.6% selon Creeth et al. (1977), 2.3% selon Sachdev et al. (1980).

ORIGINE DU MUCUS	1975 Roussel et al.	1977 Creeth et al.	1977 Lafitte et al.	1979 Feldhoff et al.	1979 Lambtin et al.	1979 Rose et al.	1980 Sachdev et al.	1981 Bhaskar et al.	1981 Bhaskar et al.	1981 Tabachnik et al.	1982b Snyder et al.
FRACTION ETUDIEE	"S" (réduite)	"18.1*" (native)	"3b" (réduite)	"I" (native)	"C3b" (réduite)	"MGP 0.3M HA (réd.)	"HO-4" (native)	"AsEXT" (native)	"AsEXT" (réduite)	"IA" (native)	"CF-C" (native)
ACIDES AMINES <i>mol/100mol</i>											
Asp	2.2	8.3	2.7	7.0	3.6	4.0	6.9	7.1	5.5	10.6	8.9
Thr	28.7	18.1	27.5	17.0	24.4	23.2	16.4	17.9	22.5	9.3	19.8
Ser	17.0	12.7	18.6	11.0	16.1	16.9	12.5	12.1	13.7	10.1	15.2
Glu	4.4	8.1	3.9	7.8	4.2	4.3	9.5	9.7	7.8	8.7	8.1
Pro	11.8	10.5	14.7	10.3	11.1	12.8	10.1	12.7	13.7	5.8	12.4
Gly	8.8	7.6	6.5	7.2	8.2	7.1	7.1	8.1	7.6	8.8	9.7
Ala	10.4	7.2	8.2	8.6	9.2	7.6	7.6	7.1	7.5	8.5	8.1
1/2Cys	-	2.6	0.6	1.5	0.7	1.3	2.3	1.1	1.5	9.2	1.2
Val	4.0	4.8	4.0	6.9	3.8	4.2	6.1	1.1	←	6.2	4.0
Met	traces	0.4	0.8	1.0	1.2	0.6	0.9	0.9	←	1.0	0.4
Ile	2.2	2.1	2.1	2.9	2.1	1.7	2.5	2.5	←	2.7	2.4
Leu	4.5	4.9	2.3	6.3	4.3	3.8	6.5	6.5	←	6.9	6.5
Tyr	traces	1.8	1.1	1.1	1.1	1.6	2.6	24.2	←	2.2	traces
Phe	traces	2.1	1.2	2.1	1.1	2.2	3.6	←	←	1.8	traces
Lys	1.6	2.1	2.2	2.9	2.7	3.2	1.9	←	←	2.7	2.4
His	2.1	2.5	1.5	2.1	3.8	2.0	3.5	←	←	1.7	0.3
Arg	2.1	4.2	2.0	4.0	2.5	3.5	23.2	←	←	3.5	0.5
Acides aminés totaux (g/100g)	10.15	29	19.53	28	13	15	23.2	24	18	?	30.3

Tableau VII.: Composition en acides aminés de quelques mucines trachéobronchiques humaines

BIBLI

ORIGINE DU MUCUS	1975	1977	1977	1979	1979	1979	1980	1981	1981	1982b
Mucoviscidose	Roussel et al.	Creeth et al.	Lafitte et al.	Feldhoff et al.	Lambin et al.	Rose et al.	Sachdev et al.	Bhaskar et al.	Bhaskar et al.	Snyder et al.
FRACTION ETUDIEE	"S" (réduite)	"18.1*" (native)	"3b" (réduite)	"I" (native)	"C3b" (réduite)	"MGP 0.3M HA" (réduite)	"H0-4" (native)	"ASEXT" (native)	"ASEXT" (réduite)	"CF-C" (native)
RESIDUS SUCRES										
<i>Rapports molaires</i>										
Fuc	2.53	1.39	0.68	1.86	1.91	0.69	1.00	0.90	0.90	5.70
Gal	4.03	2.82	1.52	2.21	3.48	1.61	2.10	2.60	2.60	3.50
GalNAc	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GlCNAC	2.78	2.50	0.72	1.43	2.36	0.97	1.50	1.90	1.80	2.30
NANA	0.28	0.17	0.58	0.71	0.24	0.75	1.30	1.10	1.10	1.30
GlC		0.16								
Man		0.16		-						
Sucres totaux (g/100g)	84.6	58	70.4	70	73.9	45.3	72.8	78	86	69.7
SULFATE	0.65	1.46	0.13	4.5 (g/100g)	0.71	1.56	0.85	0.18	0.16	?
<i>Rapports molaires</i>										

Tableau VIII.: Composition glucidique de quelques mucines trachéobronchiques humaines

MS  
VILLE



Sous l'action des agents réducteurs, un certain nombre de modifications importantes interviennent dans la partie protéique des mucines. Ces modifications, illustrées dans le tableau VII par la comparaison de l'analyse de la fraction "AsExt" de Bhaskar et al. (1981) avant et après action du dithiothréitol, consistent en une diminution des acides aminés totaux (de l'ordre de 5 à 6 g/100g), avec enrichissement en thréonine et en sérine, et appauvrissement en acides aspartique et glutamique.

La fraction glycanique dans ces diverses mucines (Tab. VIII) montre une teneur en oses combinés généralement élevée (70 à 80% p/p) et apparaît constituée de fucose, de galactose, de N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine, d'acides sialiques et de sulfate.

De grandes variations individuelles ont été constatées dans la composition glucidique, notamment en ce qui concerne le fucose, le galactose, l'acide sialique et le sulfate. La présence de glucose et de mannose dans certaines des fractions (Creeth et al., 1977; Bhaskar et al., 1981) atteste de la présence de protéines contaminantes ou peut être de protéines de liaison. Ici encore, la fraction "IA" de Tabachnik et al. (1981) présente une composition inhabituelle, en particulier en galactose, acide sialique et en sulfate. La variabilité de la composition en sucres des mucines trachéo-bronchiques, contrastant avec la relative stabilité de leur composition en acides aminés, est le reflet d'une importante hétérogénéité de la copule glucidique de ces glycoprotéines, hétérogénéité qui concerne la longueur moyenne des chaînes glycaniques, mais aussi leur degré d'acidité (Roussel et al., 1975; Lamblin et al., 1977a). Enfin, il ne faut pas négliger l'existence d'une microhétérogénéité glycanique en fonction de l'activité de groupe sanguin des mucines examinées.

Les connaissances sur les séquences glycaniques dans les mucines bronchiques ont fait des progrès importants grâce aux travaux récents de Lamblin et al. (1980, 1981b) et de Van Halbeek et al. (1982).

Lamblin et al. (1980) ont examiné les oligosaccharides neutres réduits obtenus par traitement alcalin en présence de borohydrure des mucines bronchiques acides isolées de l'expectoration de sujets atteints de bronchite chronique. Ces auteurs ont pu ainsi, grâce à diverses techniques d'analyse (oxydation périodique, analyse des produits de méthylation, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de

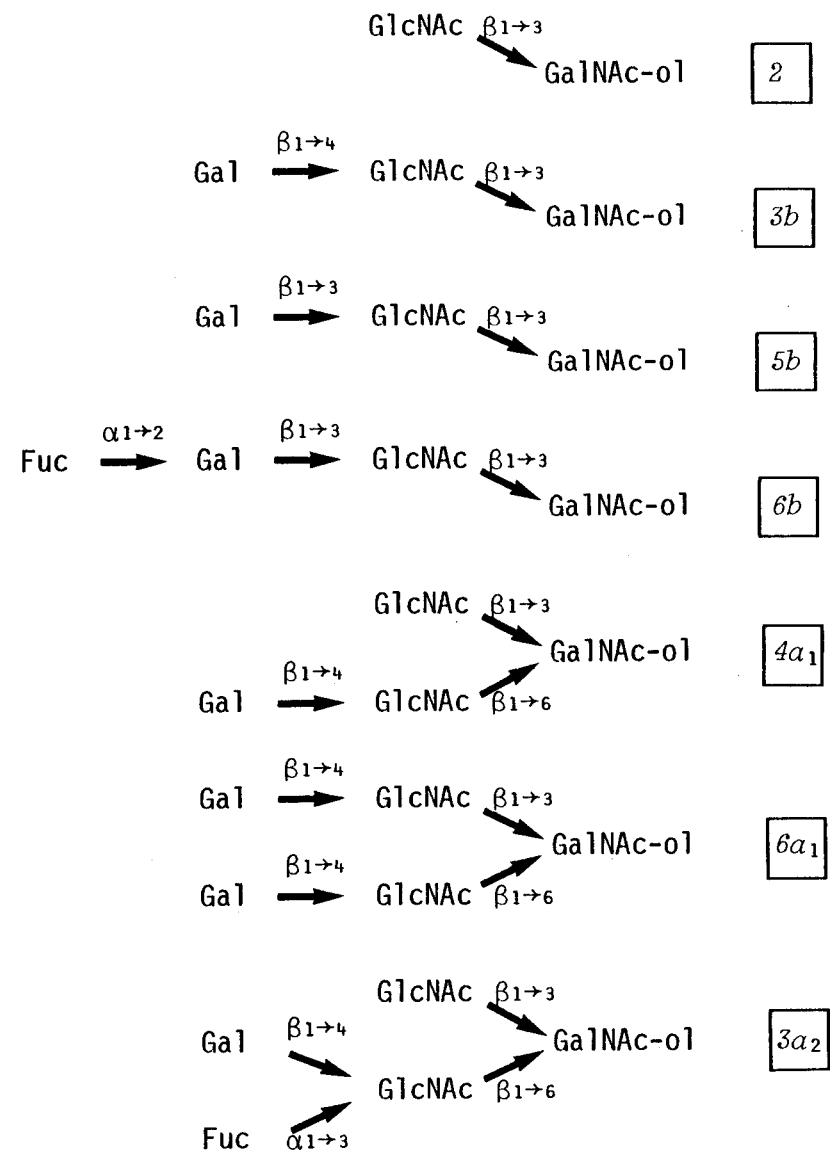
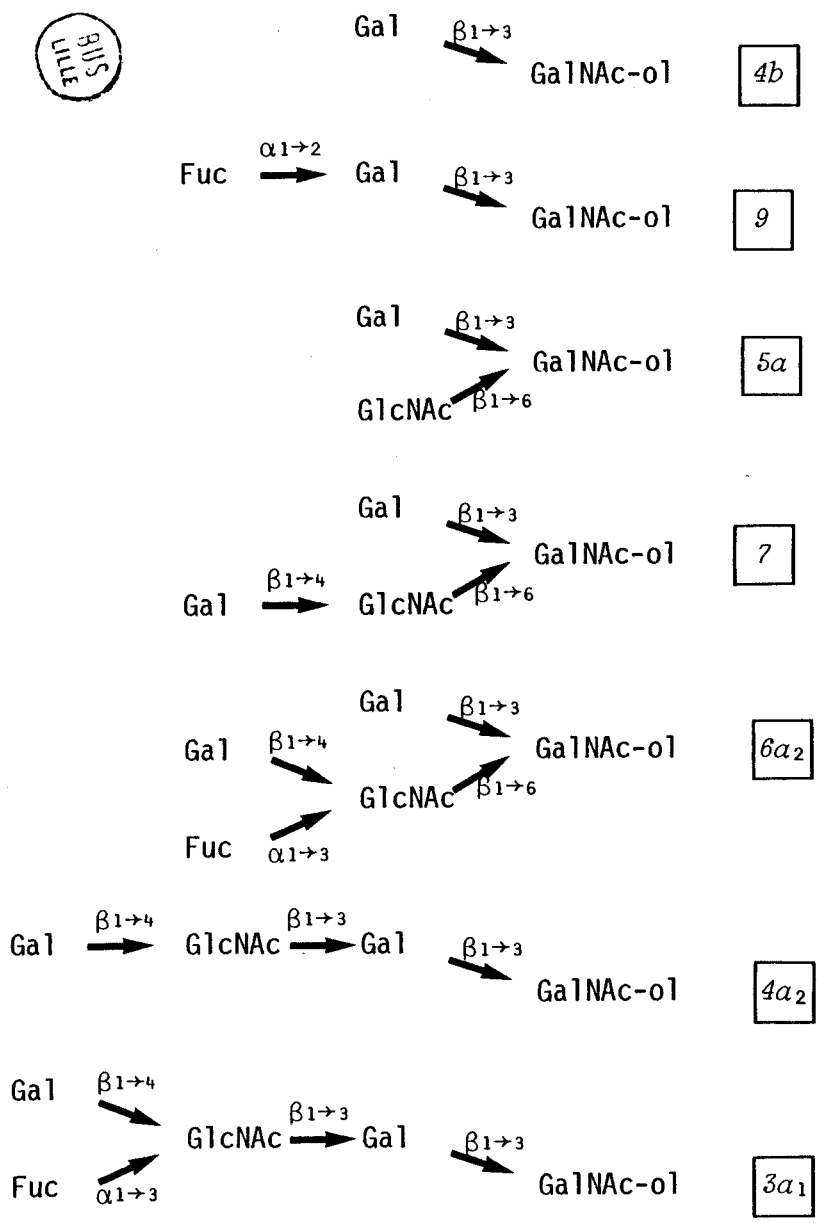
masse, dégradations enzymatiques), caractériser deux disaccharides et trois trisaccharides linéaires différents.

Utilisant les mêmes techniques ainsi que l'analyse par spectrométrie RMN du proton à 360 MHz, Lamblin et al. (1981b) ont également isolé à partir de l'expectoration d'enfants atteints de mucoviscidose quatre oligosaccharides linéaires (deux disaccharides et deux trisaccharides) identiques à ceux déjà mis en évidence au cours de la bronchite chronique, ainsi que deux oligosaccharides branchés nouveaux (un trisaccharide et un tétrasaccharide).

Une étude plus récente par Van Halbeek et al. (1982), mettant en oeuvre des champs encore plus intenses (500 MHz), a repris l'analyse des oligosaccharides neutres isolés à partir d'un pool de mucus recueilli chez des enfants appartenant tous au même groupe sanguin O et atteints de mucoviscidose. Quatorze structures glycaniques, allant du disaccharide au pentasaccharide, ont ainsi été complètement élucidées (Fig. 14). L'examen de ces structures montre qu'elles dérivent en fait de deux noyaux disaccharidiques différents, et qu'il est possible d'établir à partir de chacun de ces noyaux une filiation représentée à la figure 15. Les composés X (1<sup>è</sup> filiation) et Y (2<sup>è</sup> filiation) n'ont pas été caractérisés au cours de cette étude; cependant ces composés, dont la séquence se déduit facilement, ont une existence hautement probable, sans doute parmi les nombreux oligosaccharides mineurs dont les structures n'ont pu en conséquence être établies. Il est à remarquer que le composé X fait partie des trisaccharides isolés et séquencés par Lamblin et al. (1980) dans les sécrétions de bronchite chronique. Par ailleurs, la séquence Gal- $\beta$ 1-4-(Fuc- $\alpha$ 1-3)GlcNAc- $\beta$ 1-, appartenant aux composés 3a1 et 3a2, est identique au déterminant de l'antigène embryonnaire SSEA-1 mis en évidence par Gooi et al. (1981).

La caractérisation de toutes ces structures au sein de la seule fraction neutre des oligosaccharides de mucoviscidose confirme l'hétérogénéité qui se dégageait déjà du comportement chromatographique et de la composition chimique des mucines bronchiques; elle laisse aussi entrevoir la complexité et la variété beaucoup plus grandes que peuvent présenter les différentes chaînes glycaniques sur ces molécules. Van Halbeek et al. (1982) estiment que l'hétérogénéité des chaînes glycaniques traduit l'existence de processus incomplets de biosynthèse ou de dégradation, et que la caractérisation de plusieurs noyaux oligosaccharidiques dans ces chaînes

RUS  
LITTE



NOYAU TYPE Gal  $\xrightarrow{\beta 1 \rightarrow 3}$  GalNAc-ol

NOYAU TYPE GlcNAc  $\xrightarrow{\beta 1 \rightarrow 3}$  GalNAc-ol

Figure 14 : Structures de quelques oligosaccharides-alditols neutres isolés à partir de l'expectoration d'enfants atteints de mucoviscidose (d'après Van Halbeek et al., 1982)

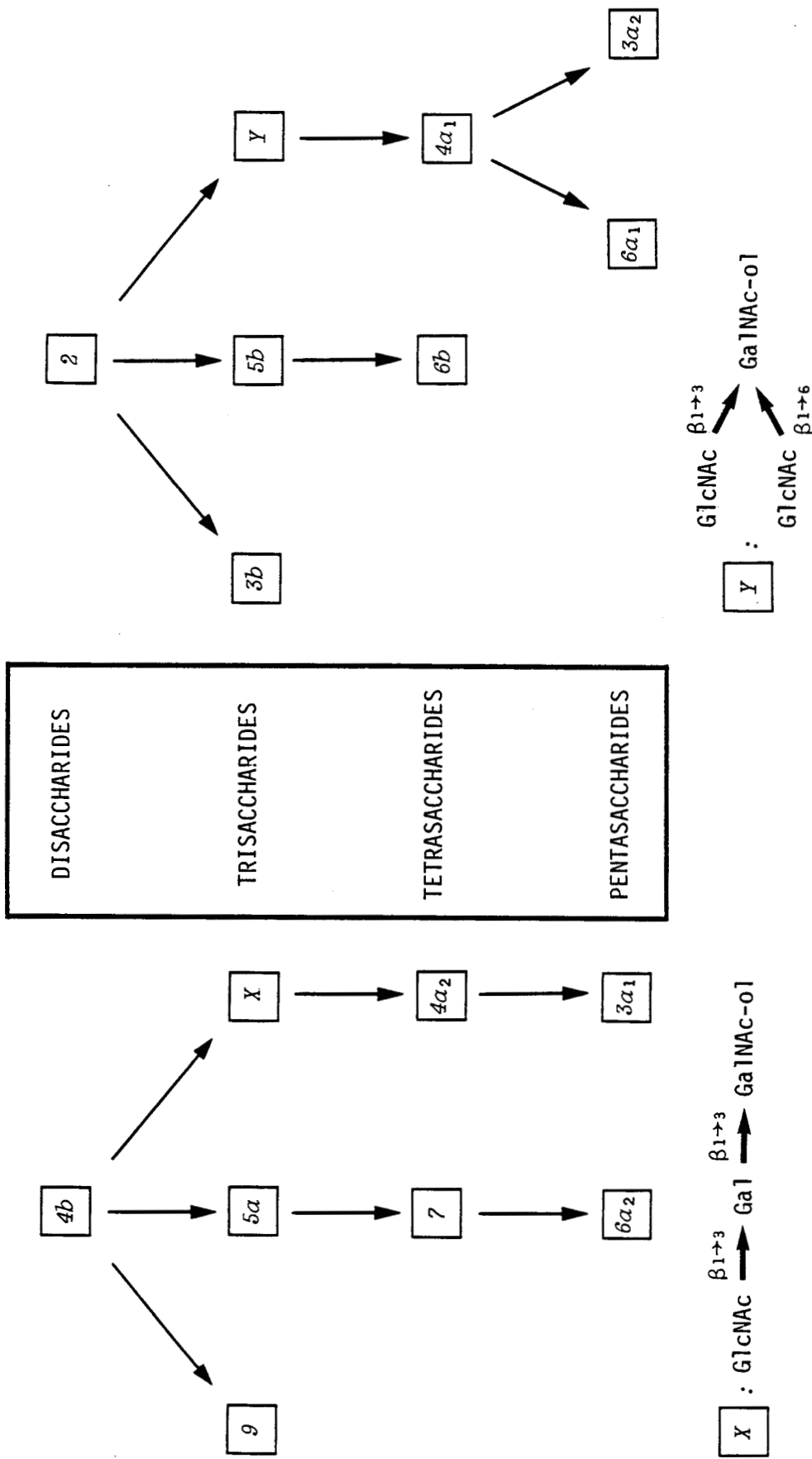


Figure 15 : Filiation des structures oligosaccharidiques représentées à la Fig. 14



implique l'existence de mécanismes de biosynthèse multiples.

Les mucines trachéo-bronchiques ont fait l'objet de nombreuses déterminations de masse moléculaire (Tab. IX). De l'ensemble des données recueillies, il apparaît une très grande dispersion des valeurs à l'origine de laquelle deux explications au moins peuvent être proposées :

1) cette diversité tout d'abord est liée à l'hétérogénéité des échantillons analysés dont la solubilisation a fait appel à des agents variés :

a) ce sont les mucines natives, solubilisées par des techniques non dégradantes, qui présentent les masses moléculaires les plus élevées : 3.3 à 7 000 000 pour des mucines solubilisées par dispersion dans le bromure de césium (Creeth et al., 1977); 2 à 6 000 000 (Jenssen et al., 1980b) et 1 280 000 (Roberts, 1974) après solubilisation dans l'urée 6M; 1 800 000 après solubilisation dans l'eau (Feldhoff et al., 1979);

b) quand les mucines ont été solubilisées soit par les agents réducteurs soit par protéolyse, la mesure de leur masse moléculaire a donné des résultats beaucoup plus faibles se situant généralement entre 350 et 600 000 (Degand et al., 1973a, 1973c; Lhermitte et al., 1976; Roussel et al., 1976; Lamblin et al., 1979). Il existe cependant sur ce sujet quelques divergences parmi les données de la littérature : Rose et al. (1979) ont ainsi enregistré une masse moléculaire de 2 000 000 pour des mucines pourtant réduites, et dans ces conditions, il est permis de se demander si les structures étudiées par ces auteurs ne correspondent pas en fait à des agrégats qui se seraient formés au cours d'un bref chauffage du mucus (10mn au bain-marie bouillant) précédant l'action de l'agent réducteur. A l'inverse, une masse moléculaire de 180 000 a été rapportée par Whitney et al. (1978) dans le cas d'une mucine normale solubilisée en présence de guanidine/HCl 6M et réduite. Enfin, en ce qui concerne les mucines obtenues par Sachdev et al. (1980), la faiblesse même de leur masse moléculaire (69 400) est une indication de l'importance de la fragmentation qui a pu survenir dans la molécule au cours de l'étape de solubilisation par les ultra-sons.

2) Une autre source de la diversité des résultats réside également dans l'hétérogénéité des méthodes utilisées pour la détermination de la masse moléculaire. Si les résultats obtenus par des méthodes basées sur des mesures de sédimentation sont à priori vraisemblables, par contre

REFERENCES	ORIGINE DE LA MUCINE	AGENT DE SOLUBILISATION	MASSE MOLECULAIRE méthode de mesure	résultat
Degand et al (1973a,c) Havez et al (1973)	Divers états d'hyper- secrétion bronchique	Réduction (βME 1% v/v, 4h, 37°C)	Ultracentrifugation	400 000 - 600 000
Roberts (1974)	Bronchite chronique	Urée 6M	Sédimentat. à l'équilibre	1.28 x 10 <sup>6</sup>
Roussel et al (1976)	Mucoviscidose	Papaïne/pronase ou βME 1%	Ultracentrifugation	450 000
Lhermitte et al (1976)	Bronchite chronique	Réduction (βME 1% v/v, 4h, 37°C)	Sédimentat. à l'équilibre	350 000
Creeth et al (1977)	Bronchite chronique Asthme	Dispersion en solution con- centrée de CsBr	Ultracentrifugation	3.3 à 7 x 10 <sup>6</sup>
Whitney et al (1978)	Normale	id. + réduction (βME)	"	0.57 à 2.3 x 10 <sup>6</sup>
Lamblin et al (1979)	Bronchite chronique Mucoviscidose	Guanidine 6M, 60°C + Réduction	Gel filtration (Seph.CL2B)	180 000
Rose et al (1979)	Asthme	Réduction (βME 1% v/v, 4h, 37°C)	Sédimentat. à l'équilibre	315 000 - 450 000
Feldhoff et al (1979)	Asthme	Bain-marie bouillant 10 mn + réduction (DTT 0.01M)	Gel filtration (Seph.2B)	2 x 10 <sup>6</sup>
Sachdev et al (1980)	Normale	Dilution au 1/10 dans l'eau	Sédimentat. à l'équilibre	1.8 x 10 <sup>6</sup>
Jenssen et al (1980b)	Bronchite chronique	Ultra-sons	Sédimentat. à l'équilibre	69 400
		Urée 6M, pH 12.5	Estimation d'après taille au microscope électronique	2 à 6 x 10 <sup>6</sup>

Tableau IX.: Masse moléculaire de diverses mucines trachéo-bronchiques humaines

ceux déduits du comportement des mucines en chromatographie d'exclusion moléculaire apparaissent contestables : en effet, cette dernière technique n'est pas adaptée à de telles mesures pour des structures qui, comme les mucines, présentent une forme très allongée et donnent des masses moléculaires apparentes très surestimées.

Une approche originale de la structure des mucines a été réalisée par Lamblin et al. (1979). Ces auteurs ont en effet examiné des mucines bronchiques réduites de mucoviscidose et de bronchite chronique au microscope électronique grâce à une technique spéciale d'ombrage par jet rotatif de platine. Ces molécules, dont la masse moléculaire déterminée par sédimentation à l'équilibre se situe vers 400 000, se présentent principalement sous la forme de bâtonnets dont la longueur moyenne est d'environ 50 à 200 nm et la largeur de 3 à 5nm. Certains de ces bâtonnets présentent des figures inhabituelles avec constitution de boucles, d'amas nodulaires, de ramifications ou d'épaississements par juxtaposition de deux molécules, toutes figures qui témoignent de la tendance marquée des mucines à l'agrégation; cette tendance apparaît plus grande dans le cas des mucines à caractère neutre.

Une étude similaire a été rapportée par Jenssen et al. (1980b) qui ont examiné les mucines non réduites recueillies au cours de la bronchite chronique. Leurs observations ont confirmé les résultats de Lamblin et al. (1979), notamment en ce qui concerne l'organisation des molécules en structures filiformes; la taille de ces structures a été estimée de 2 000 à 5 000 nm, ce qui pour un matériel natif n'est pas en désaccord avec les valeurs plus faibles enregistrées par Lamblin pour des mucines réduites.

Harding et al. (1983a) ont également examiné au microscope électronique des mucines bronchiques natives (masse moléculaire 2 250 000) provenant d'un patient atteint de mucoviscidose. Utilisant une technique d'ombrage à jet monodirectionnel de platine, ces auteurs ont observé des champs dans lesquels les mucines sont apparues principalement sous forme de flaques très étalées et très peu épaisses, avec moins de 10% du matériel sous forme de filaments de 100 à 200nm de longueur et de 1.5nm d'épaisseur. Les auteurs considèrent que l'épaisseur (3 à 5 nm) des filaments observés par Lamblin et al. (1979), est surestimée, probablement en raison du choix de la technique d'ombrage métallique par jet rotatif qui, selon eux, exagère la largeur des structures examinées. Bien que l'aspect aplati sous lequel les mucines leur

sont apparues puisse être un artéfact lié au séchage des préparations à l'air, Harding et al. (1983a) ont estimé que la meilleure représentation de la molécule de mucine serait celle d'une structure flexible très expansée, de conformation de type plutôt sphérique que filamenteux.

L'organisation macromoléculaire du mucus bronchique a été et demeure encore l'objet de débats souvent divergents. Tous les auteurs s'accordent cependant pour reconnaître que dans le mucus natif les mucines sont associées à diverses substances contaminantes parmi lesquelles des lipides, des protéines et glycoprotéines d'origine sécrétoire ou plasmatique. Une part importante de ces contaminants peut être éliminée par lavages du mucus dans l'eau ou le sérum physiologique, mais la phase gélatineuse résiduelle reste encore très hétérogène, témoignant de l'existence d'interactions privilégiées entre les mucines et ces contaminants.

Creeth et al. (1977) ont montré que l'ultracentrifugation dans un gradient de bromure de césium est une méthode intéressante pour séparer ces substances des mucines. De nombreux auteurs ont également montré que la solubilisation du mucus gélatineux peut être obtenue en présence d'agents de dissociation tels que l'urée, le chlorhydrate de guanidine ou le SDS (Roberts, 1974; Liao et al., 1979; Rose et al., 1979). Ces résultats suggèrent l'existence d'interactions faibles, de nature non covalente résultant par exemple de l'établissement de liaisons hydrogène, hydrophobes ou ioniques entre les divers composants du mucus natif. La contribution relative de ces différents types de liaisons à la stabilité de l'édifice macromoléculaire et la nature précise des sites interagissants restent encore à élucider; il est cependant probable que l'enveloppe glycanique qui représente la majeure partie de la surface des structures moléculaires en présence joue un rôle essentiel dans ces interactions.

Le point qui a soulevé le plus de controverses concerne l'existence et le rôle éventuels que jouent les liaisons covalentes de type disulfure dans la structure des mucines.

De très nombreux auteurs ont observé que sous l'action des agents réducteurs, des propriétés physiques essentielles des mucines trachéo-bronchiques natives étaient affectées, se traduisant par une diminution significative de leur viscosité (Sheffner, 1963; Havez et al., 1967; Lamblin et al., 1979; Tabachnik et al., 1981) ainsi que de leur coeffi-



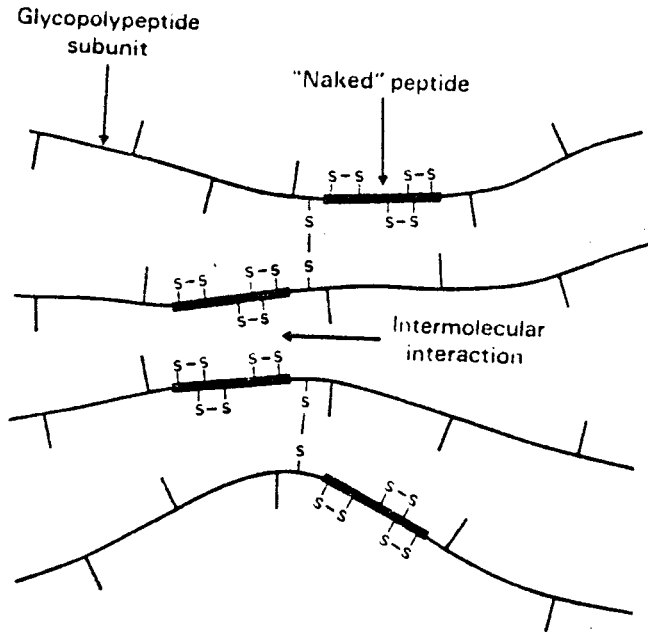
cient de sédimentation et de leur taille moléculaire (Creeth et al., 1977; Bhaskar et al., 1981). Pendant le même temps, il est noté une modification de la fraction protéique des mucines consistant en une perte d'environ 5% de la teneur en acides aminés, avec augmentation de la proportion en sérine, thréonine et proline, et diminution des acides aspartique et glutamique et de la cystéine.

Ces modifications des propriétés physicochimiques surprennent par leur ampleur étant donné la faible teneur des mucines en résidus de cystéine; cependant, bien qu'elles n'aient pas été enregistrées dans toutes les expectorations étudiées (Roberts, 1974; Rose et al., 1979; Boat et al., 1980), certains auteurs en ont tiré argument pour proposer que les mucines bronchiques natives résulteraient de la polymérisation de sous-unités glycoprotéiques par l'intermédiaire de peptides de liaison riches en acides aminés dicarboxyliques, et que ces peptides leur seraient reliés par liaisons covalentes de type disulfure (Roberts, 1976, 1978a; Creeth et al., 1977).

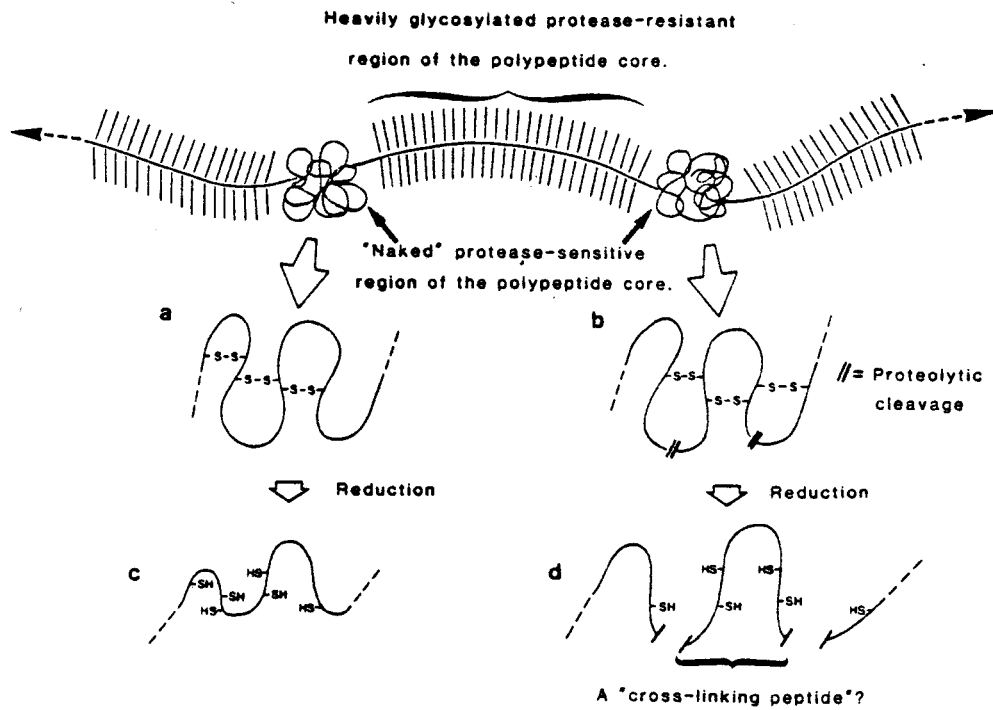
En outre, utilisant de l'iodo(1-14C)acétamide pour marquer les liaisons disulfure rompues par les agents réducteurs, Roberts (1976) a montré qu'il existait dans les mucines deux types de régions se distinguant l'une de l'autre par leur sensibilité à l'action des agents protéolytiques. A partir de ces observations, Roberts (1976, 1978a) a proposé un schéma d'organisation des mucines bronchiques qui, comme cela avait déjà été antérieurement suggéré pour les substances à activité de groupe sanguin présents dans le liquide de kyste ovarien (Dunstone et al., 1965; Kristiansen et al., 1968) ou pour les mucines cervicales (Gibbons et al., 1966), comporte deux types de domaines structuraux : un premier type constitué d'une chaîne polypeptidique riche en thréonine et sérine, fortement glycosylée, et résistante à la protéolyse, et un second type formé d'une chaîne polypeptidique plus riche en cystéine et en acides aminés dicarboxyliques, peu ou pas glycosylée ("naked peptide") et donc sensible à l'action des protéases (Fig. 16). Ce dernier motif peptidique constitue dans ce modèle un facteur important d'association dans l'architecture macromoléculaire des mucines :

- en se liant par liaisons covalentes à ses extrémités N- et C-terminales selon un axe unipeptidique avec les sous-unités de mucines, il contribue à l'allongement des chaînes glycoprotéiques;

- par formation de ponts disulfure et constitution d'interactions



**Figure 16 :** Modèle d'organisation macromoléculaire des mucines trachéo-bronchiques (d'après Roberts,1978a)



**Figure 17 :** Modèle d'organisation macromoléculaire des mucines trachéo-bronchiques, et mode d'action des agents mucolytiques (d'après Carlstedt,1982)



non covalentes entre régions non glycosylées appartenant à des chaînes adjacentes, ce peptide contribue aussi à la formation du réseau impliqué dans le phénomène de gélation du mucus natif.

Cette conception de la structure des mucines bronchiques, qui confère aux liaisons disulfure une responsabilité importante dans la cohésion macromoléculaire, ne permet cependant pas toujours de rendre compte des résultats expérimentaux enregistrés par d'autres auteurs :

1) les mucines natives isolées par Feldhoff et al. (1979) à partir de l'expectoration recueillie chez un asthmatique et solubilisée par dilution dans l'eau, apparaissent peu sensibles à l'action des agents réducteurs : les diagrammes d'élution d'une colonne de Sepharose 4B avant et après réduction par le DTT ne montrent pas de différences significatives, ce qui suggère que la rupture des ponts disulfure ne conduit pas à une diminution importante de la masse moléculaire des mucines;

2) Lamblin et al. (1979) ont examiné au microscope électronique les mucines bronchiques isolées de mucoviscidose et de bronchite chronique et solubilisées par réduction. Ces mucines, purifiées par chromatographie d'échange ionique et de gel filtration, et dont la masse moléculaire est voisine de 400 000, se présentent sous forme de bâtonnets dont la longueur varie de 50 à 200nm. La dispersion importante de ces valeurs peut, selon les auteurs, avoir plusieurs origines : soit être le reflet d'un processus de biosynthèse des mucines aboutissant à la production de chaînes de longueur variable; soit résulter de la rupture de liaisons disulfure intra- ou intermoléculaires, éventuellement situées dans un peptide de liaison; soit encore être liée à l'activation de systèmes protéolytiques par les réducteurs. Cependant, compte tenu de la pauvreté des mucines en cystéine et de l'existence d'activités protéolytiques dans les mucus natifs (Twumasi et al., 1977), Lamblin et al. ont estimé que la dernière hypothèse était parfaitement plausible, et que donc la polydispersion physique des mucines pouvait être le reflet de l'action indirecte des agents à fonction thiol;

3) Rose et al. (1979) ont remarqué que les agents de réduction restaient inefficaces dans la solubilisation des mucines en tampon non dissociant;

4) Mian et al. (1982) ont rapporté que les mucines trachéales du Poulet étaient résistantes aux agents de rupture des liaisons non

covalentes et des liaisons disulfure;

5) Snyder et al. (1982b) ont montré que la réduction des mucines purifiées par citraconylation ne modifie pas de façon significative leur constante de sédimentation : celle-ci passe de 6.9S en milieu dissociant (urée 6M) à 6.4S en présence d'urée 6M et de 0.1% de mercaptoéthanol. Par ailleurs, ces auteurs n'ont observé aucune dissociation des mucines à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et d'agents réducteurs, et ils estiment en conséquence que le rôle des liaisons disulfure n'apparaît pas déterminant dans l'organisation macromoléculaire des mucines;

6) Williams et al. (1982), étudiant le comportement en chromatographie sur colonne de Sepharose CL-2B des mucines trachéo-bronchiques solubilisées en milieu dissociant, ont observé que les mucines natives et les mucines obtenues après réduction donnaient le même profil d'élution. Selon les auteurs, cette observation ne plaide pas en faveur de l'organisation polymérique des mucines où les sous-unités seraient unies par ponts disulfure; cependant elle ne permet pas pour autant d'écarter l'existence de tels liens dans les zones non glycosylées des mucines, et il est alors probable que la rupture de ces liaisons puisse affecter la structure secondaire de l'édifice sans qu'il intervienne des modifications importantes de sa masse moléculaire. S'appuyant sur les résultats de Williams et al. (1982), Carlstedt (1982) a proposé pour les mucines bronchiques un schéma d'organisation moléculaire comportant des zones glycosylées et des zones non glycosylées, ces dernières à structure globulaire en raison de l'existence de ponts disulfure intra-chaîne (Fig. 17). L'examen de ce modèle montre que le peptide de liaison, qui est enroulé sur lui-même dans la mucine native (étape a), se déroule après action des réducteurs en exposant ses fonctions thiols libres (étape c) mais sans perdre de substance; par protéolyse isolée, des coupures interviennent dans certaines liaisons peptidiques sans toutefois beaucoup altérer la taille de l'édifice (étape b); lorsque les processus protéolytique et réducteur sont appliqués successivement, il y a libération de peptides et donc fragmentation de l'édifice macromoléculaire (étape d).



# **DEUXIEME PARTIE**

**ACTION DES AGENTS REDUCTEURS**

**SUR LES MUCINES BRONCHIQUES**

Il est aujourd'hui tout à fait inutile d'insister sur le rôle essentiel que jouent les glycoprotéines du type des mucines dans la physiologie du mucus bronchique. Pour tous les auteurs en effet, c'est de ces composants macromoléculaires que dépendent les propriétés rhéologiques des sécrétions bronchiques, propriétés grâce auxquelles le mucus participe, avec la ciliature bronchique, à la constitution de l'appareil mucociliaire, moteur dont l'action permet l'épuration permanente de l'arbre respiratoire.

Il n'est pas étonnant dans ces conditions de remarquer le vif intérêt qui s'est manifesté pour une meilleure connaissance de l'organisation macromoléculaire du mucus bronchique et singulièrement de ses mucines.

Comme il ressort de l'étude générale présentée en première partie de ce mémoire, de nombreuses divergences ont été enregistrées parmi les auteurs sur la conception de l'organisation macromoléculaire des mucines. Parmi les principaux points de désaccord, il y a le problème de la participation éventuelle des liaisons covalentes de type disulfure dans l'architecture des mucines, et celui du mode d'action des agents de réduction au cours de la mucolyse. Elucider ces questions est de toute première importance, car de cette connaissance dépend la compréhension du rôle précis que jouent les mucines dans la physiologie et la pathologie bronchiques.

Il nous a en conséquence semblé intéressant d'entreprendre une étude sur l'action des agents de réduction sur les mucines bronchiques. Etant donné qu'après dilution de l'expectoration avec trois volumes de sérum physiologique, la centrifugation permet de séparer une phase gélatineuse contenant un mucus de structure fibrillaire et une phase aqueuse contenant les éléments solubles de l'expectoration (Havez et al., 1967), étant donné également que les mucines bronchiques se retrouvent principalement dans la phase fibrillaire mais aussi pour une part non négligeable dans la phase soluble du mucus, il est apparu opportun d'examiner l'action des réducteurs non seulement sur la phase fibrillaire mais aussi sur la phase soluble, ceci d'autant plus qu'avec cette dernière phase, les problèmes de solubilisation ne se posent pas. Les résultats de l'étude de cette action sont présentés dans les pages suivantes.

**I. Etude de l'action des agents réducteurs**

**sur les mucines**

**de la phase soluble du mucus bronchique**



L'étude de l'action des agents réducteurs a été réalisée sur les phases solubles préparées à partir de l'expectoration de deux malades appartenant au même groupe sanguin O :

- un malade (Vid...) atteint de mucoviscidose
- un malade (Lak...) atteint de bronchite chronique

#### A/ PREPARATION DE LA PHASE SOLUBLE DU MUCUS BRONCHIQUE

2100ml de l'expectoration du malade Vid..., atteint de mucoviscidose, ont permis d'isoler 21.85g de phase soluble (soit 10.40g/l de mucus) et 48.80g de mucus fibrillaire (soit 23.24g/l de mucus). Les composants non dialysables de cette expectoration se répartissent donc en phase soluble : 31%, et phase fibrillaire : 69%.

1500ml de l'expectoration du malade Lak..., atteint de bronchite chronique, ont permis d'isoler 7.5g de phase soluble (soit 5g/l de mucus) et 5.2g de mucus fibrillaire (soit 3.47g/l de mucus), donnant la répartition suivante : phase soluble, 59% et phase fibrillaire, 41%.

#### B/ COMPORTEMENT DES CONSTITUANTS DE LA PHASE SOLUBLE EN CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHAROSE CL-2B

Le protocole de cette étude est présenté dans la figure 18.

##### 1) Phase soluble du malade Vid..., atteint de mucoviscidose

Les diagrammes d'éluion des composants de la phase soluble native filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B en tampon non dissociant (Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0) et en tampon dissociant (guanidine/HCl 6M) apparaissent respectivement à la figure 19 (chromatogramme A) et à la figure 20 (chromatogramme C). Dans chaque cas, trois fractions glycoprotéiques sont obtenues : une fraction I complètement exclue du gel, une fraction II partiellement retenue et une fraction III fortement retenue dans le gel.

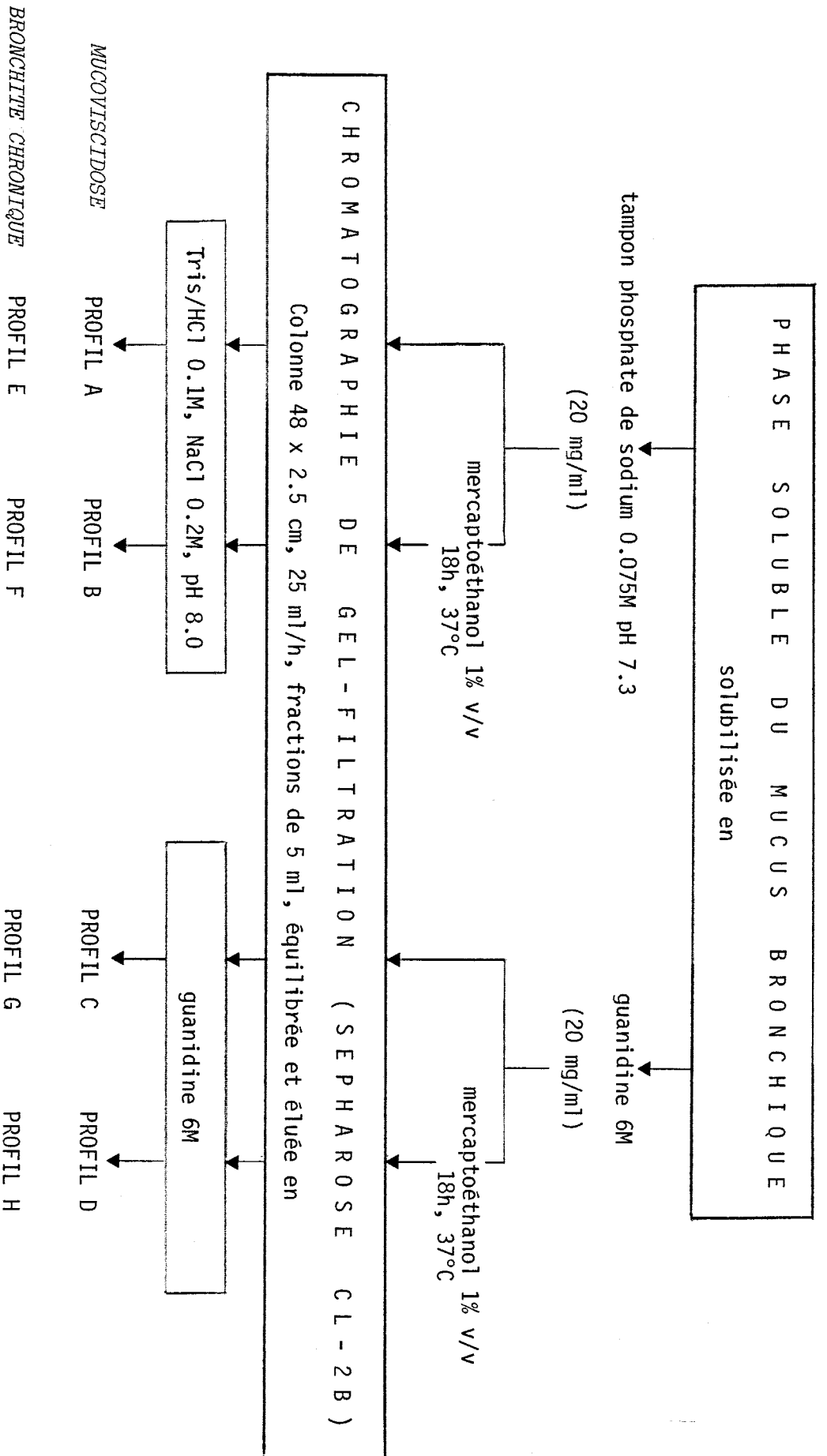
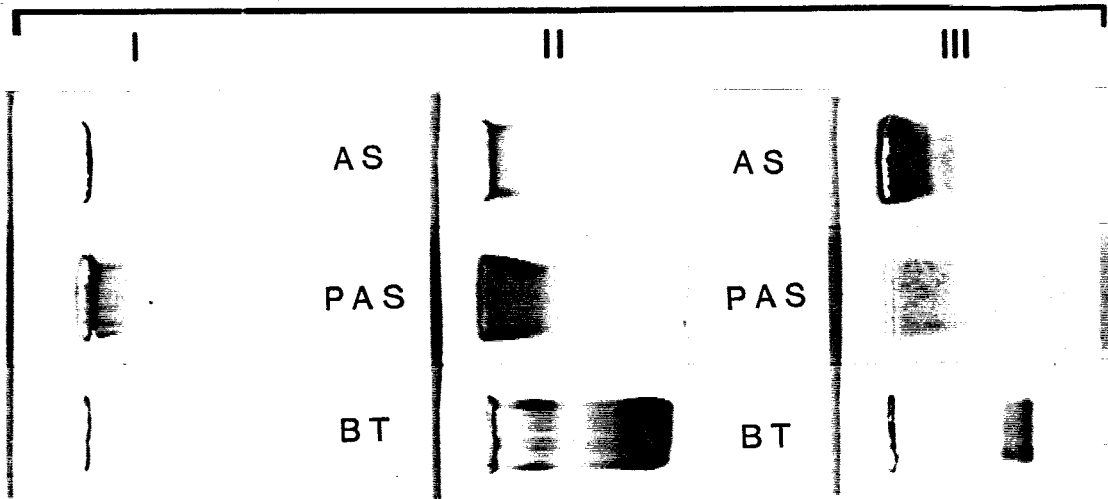
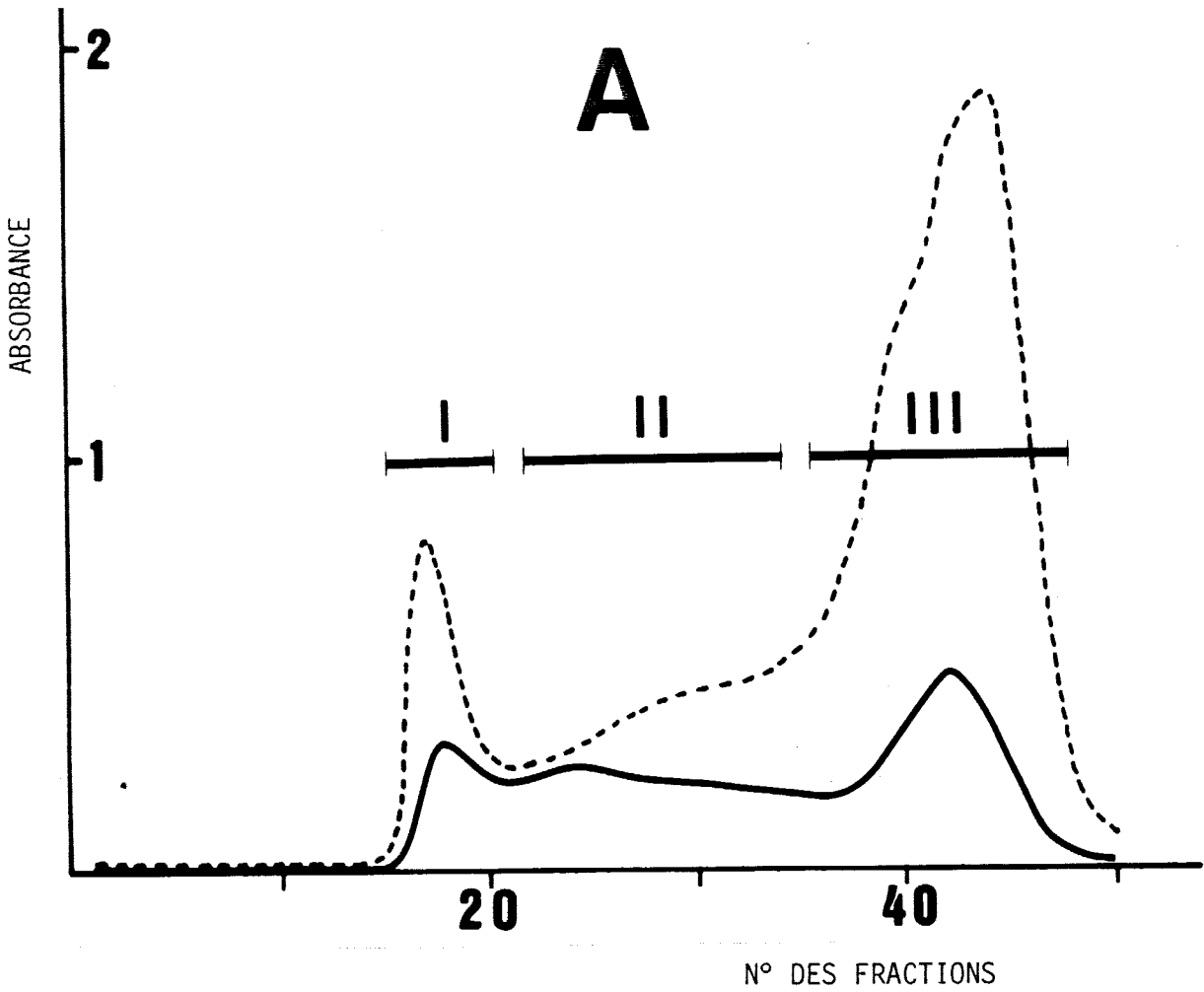


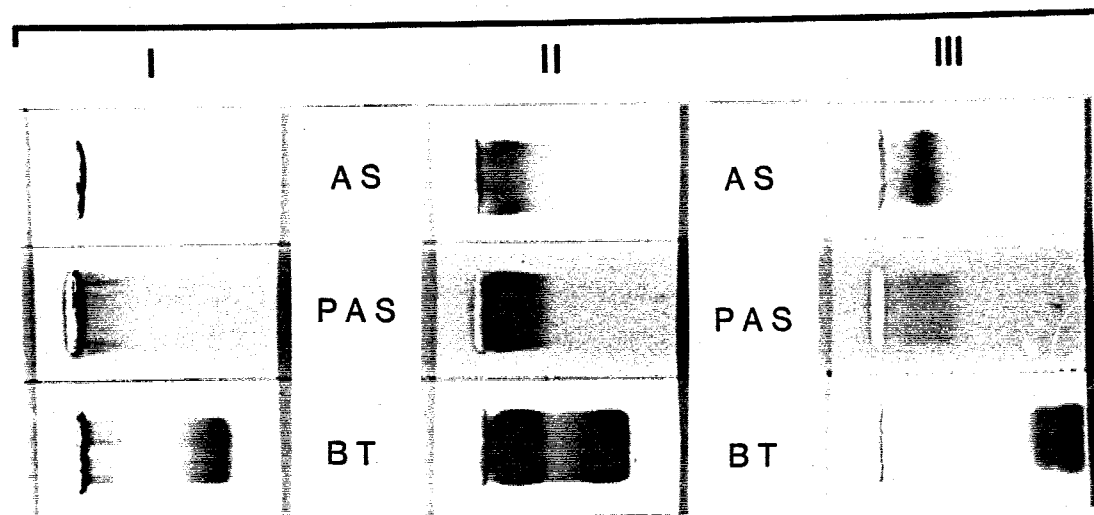
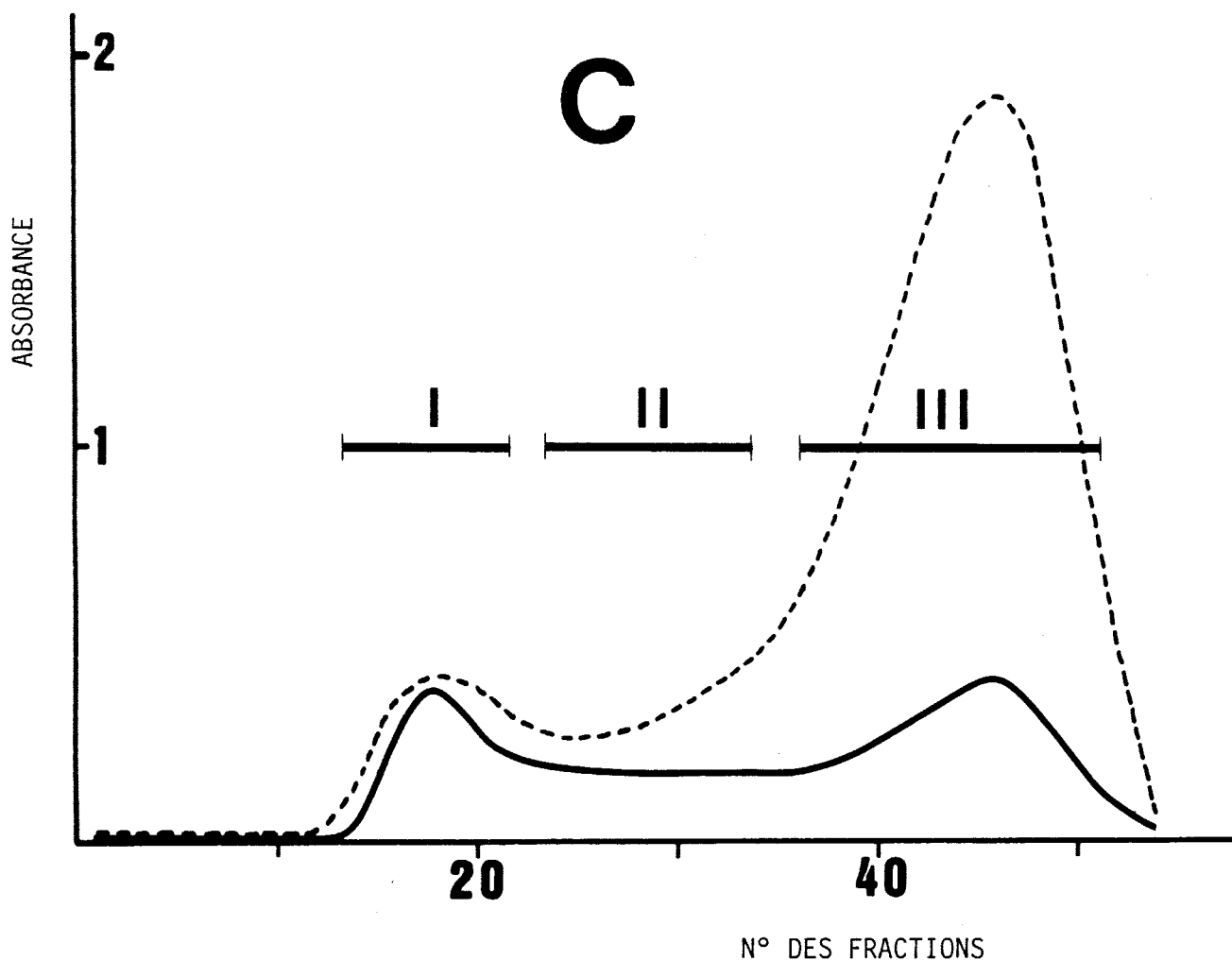
Figure 18 : Protocole de l'étude de l'action des agents de réduction sur la phase soluble du mucus bronchique





RUS  
LILLE

Fig. 19: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble native Vid... (mucoviscidose) sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. En haut : profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=9mg; II=13.5mg; III= 35.5 mg. En bas : analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).



RHS  
FILE

Fig. 20: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble native Vid... (mucoviscidose) sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon guanidine/HCl 6M. En haut : profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=1.5mg; II=7.5mg; III=37mg. En bas : analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

Les diagrammes obtenus après réduction et filtration de la phase soluble en milieu non dissociant et en guanidine/HCl 6M sont présentés respectivement dans les figures 21 (chromatogramme B) et 22 (chromatogramme D). Dans les deux cas, trois fractions glycoprotéiques sont encore obtenues; cependant, quand on compare entre elles les absorbances après réaction à l'orcinol, il apparaît que l'action du mercaptoéthanol se traduit par d'importantes modifications des profils d'élution : par rapport au profil A (phase soluble native filtrée en milieu non dissociant), le profil B (phase soluble réduite et filtrée en milieu non dissociant) montre:

- a) une diminution de la fraction exclue (BI)
- b) une augmentation importante de la fraction partiellement retenue (BII), riche en oses combinés, et qui apparaît comme un pic homogène et symétrique, avec un maximum survenant dans le tube No 32.

Au cours de l'une des expériences, la phase soluble a été réduite par le 2-mercaptoéthanol à 1% en tampon phosphate de sodium, puis alkylée par l'iodoacétamide 0.2M et filtrée sur Sepharose CL-2B en milieu Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Le profil d'élution obtenu n'a montré aucune différence par rapport au diagramme B (Fig. 21) obtenu après réduction seule de la phase soluble. En conséquence, dans les expériences ultérieures, les thiols libérés par le mercaptoéthanol n'ont pas été bloqués par alkylation.

La filtration de la phase soluble native en guanidine/HCl 6M (Fig. 20) donne le profil C, peu différent de celui observé après filtration du même échantillon en tampon non dissociant (Fig. 19, profil A).

Après réduction et filtration en guanidine/HCl 6M (Fig. 22, profil D), les modifications observées sont similaires à celles décrites dans le profil B : la fraction exclue (DI) est plus faible, tandis que la fraction retenue (DII), riche en oses combinés, est plus importante. Cependant, cette dernière fraction est plus étalée et son élution survient plus tôt que pour le pic BII correspondant, le maximum d'absorbance après réaction à l'orcinol se situant dans le tube No 28.

La détermination de la masse moléculaire par ultracentrifugation à l'équilibre donne une valeur de 260 000 pour les composants de la fraction BII, et 400 000 pour les composants de la fraction DII.

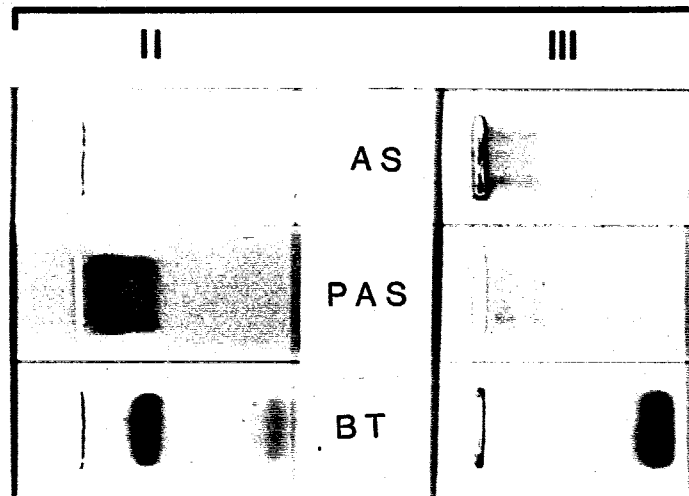
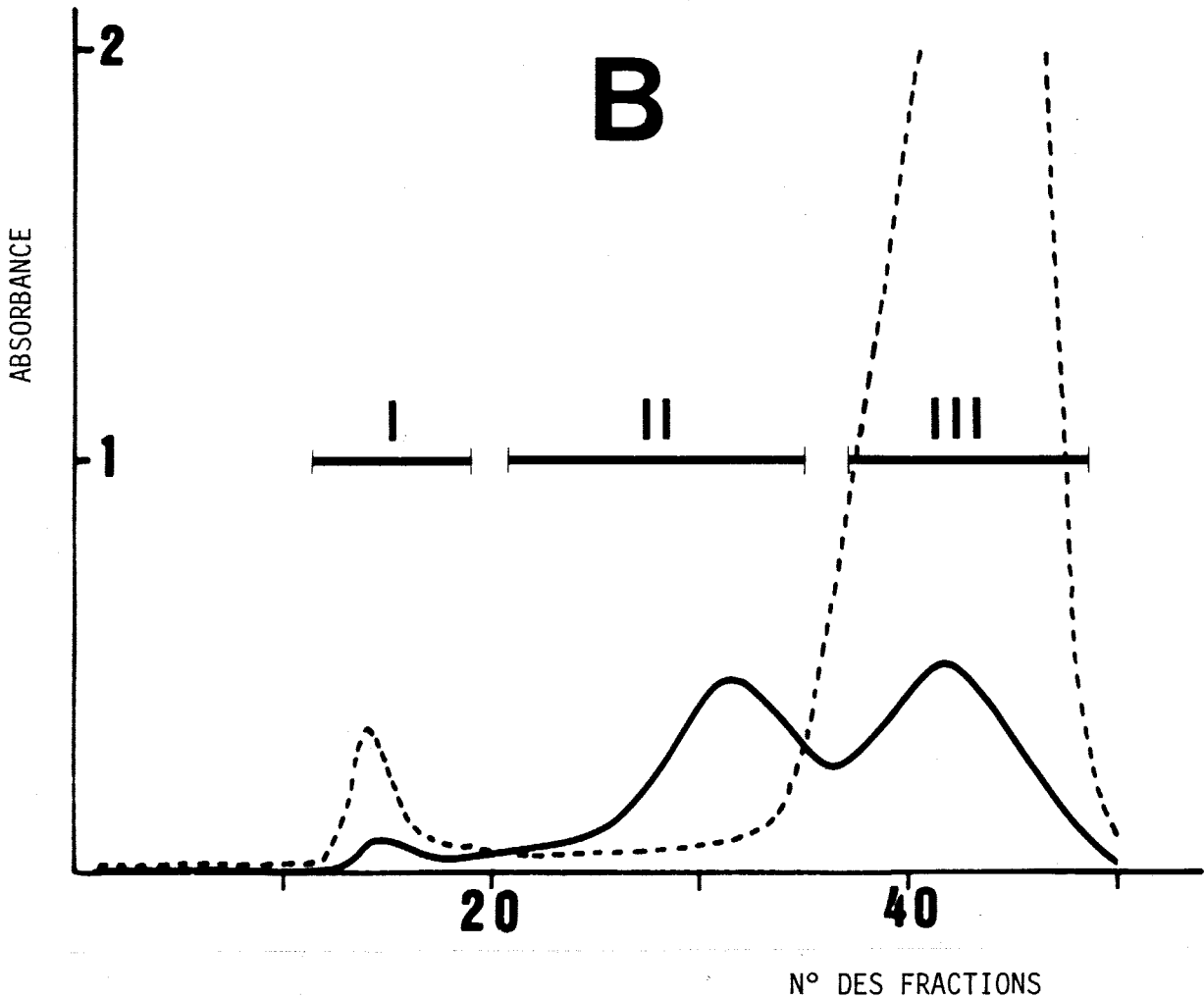


Fig. 21: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... (mucoviscidose) réduite en tampon phosphate et filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. En haut : profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I= 1mg; II=11mg; III=24mg. En bas : analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

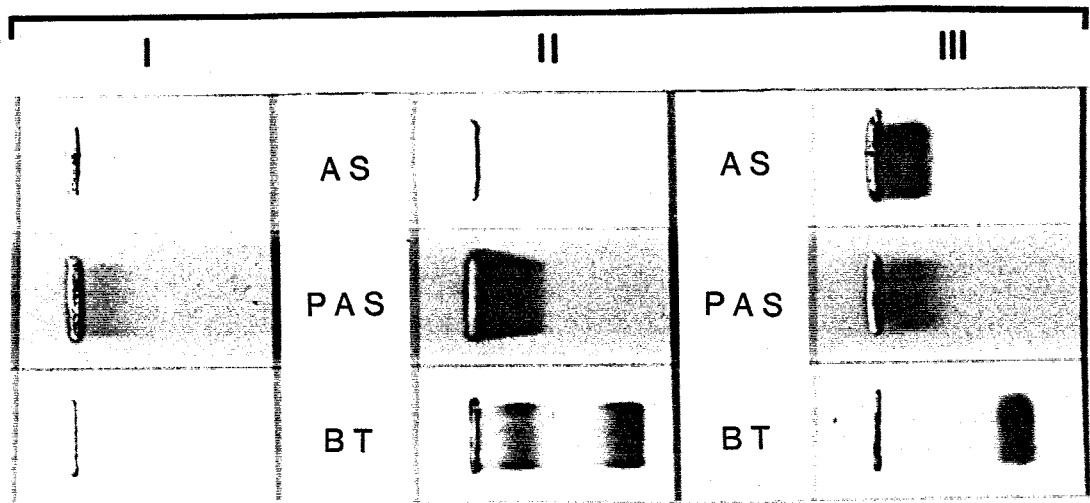
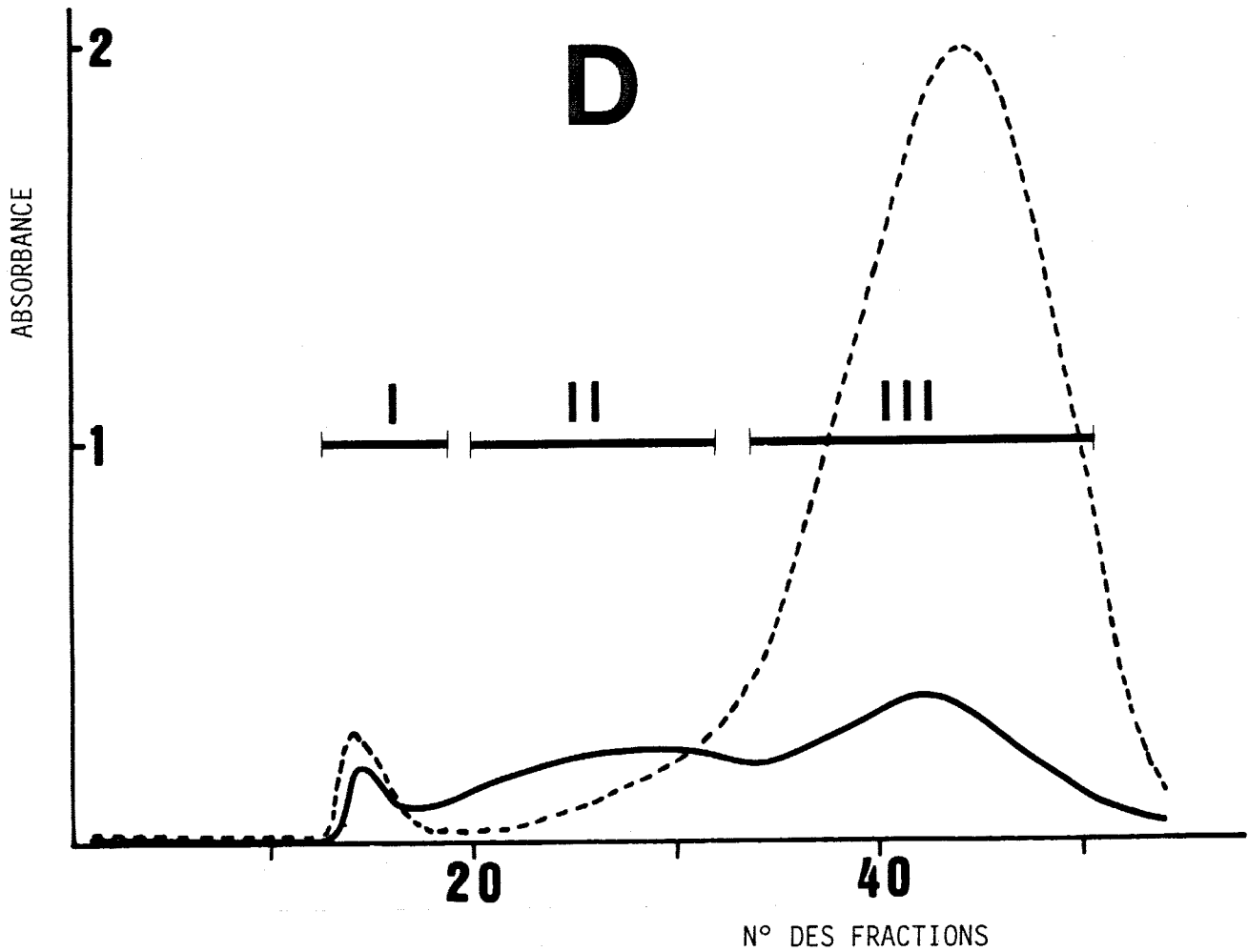


Fig. 22: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... (mucoviscidose) réduite en guanidine/HCl 6M et filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en guanidine/HCl 6M. En haut : profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=2.1mg; II=12.5mg; III= 45.2mg. En bas : analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

## 2) Phase soluble du malade Lak..., atteint de bronchite chronique

Les diagrammes d'élution des composants de la phase soluble native (Lak..., bronchite chronique), filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B en tampon non dissociant (Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0) et en tampon dissociant (guanidine/HCl 6M) apparaissent respectivement dans les figures 23 (profil E) et 24 (profil G). Dans ces deux cas, la majeure partie des composants glycoprotéiques apparaît dans les fractions exclues du gel.

Les diagrammes d'élution obtenus après réduction et filtration en milieu non dissociant et en milieu dissociant apparaissent respectivement dans les figures 25 (profil F) et 26 (profil H). Après action du mercaptoéthanol en tampon phosphate et chromatographie en tampon Tris/HCl (profil F), il n'apparaît pas de modifications importantes dans l'aspect de la courbe à l'orcinol de la fraction exclue (FI); dans la fraction partiellement retenue (FII), il apparaît un pic glycoprotéique mineur avec un maximum dans le tube No 32; la courbe à l'orcinol montre enfin, par rapport au profil correspondant E, une augmentation de la teneur en hexoses dans la fraction la plus retenue (FIII). L'examen de la courbe d'absorbance à 278nm montre un pic important dans la fraction FI traduisant l'existence d'une légère turbidité dans les tubes.

Lorsque la réduction et la chromatographie sont faites en guanidine/HCl 6M (profil H), la dépolymérisation des composants glycoprotéiques est plus importante, le pic principal à l'orcinol survenant dans la fraction HII dont le maximum se situe dans le tube No 20.

## 3) Mélange en proportions égales des phases solubles du malade Vid... (mucoviscidose) et du malade Lak... (bronchite chronique)

Comme les diagrammes obtenus par filtration des phases solubles, réduites en tampon phosphate, de Vid.. d'une part (profil B, Fig. 21) et de Lak... d'autre part (profil F, Fig. 25) sont différents l'un de l'autre, une expérience de réduction d'un mélange à parties égales de ces deux phases solubles a été réalisée en tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7,3.

Après chromatographie sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0, le diagramme représenté à la figure 27 a été obtenu (profil I). Comme dans le profil B, la majeure



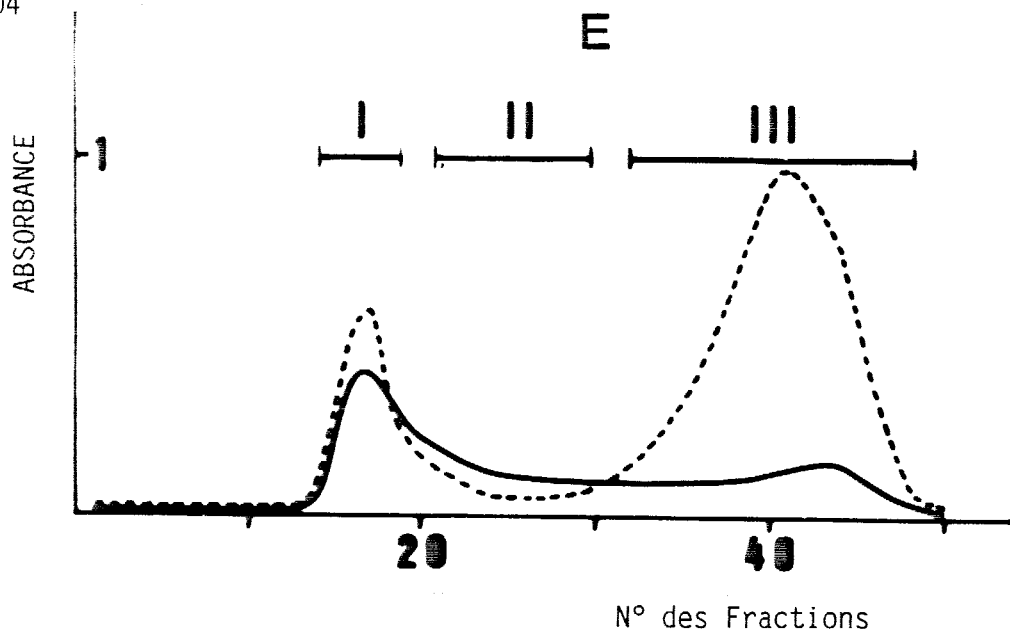


Fig. 23: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble native Lak... (bronchite chronique) sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=10mg; II=8mg; III=33mg.

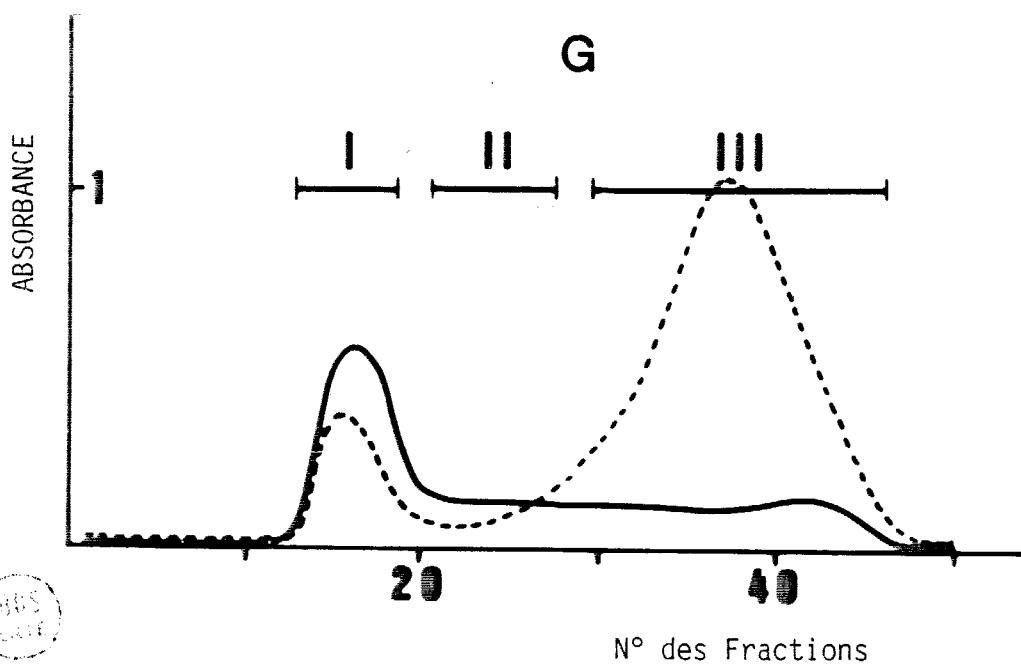


Fig. 24: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble native Lak... (bronchite chronique) sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon guanidine/HCl 6M. Profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=15mg; II=8mg; III=39mg.

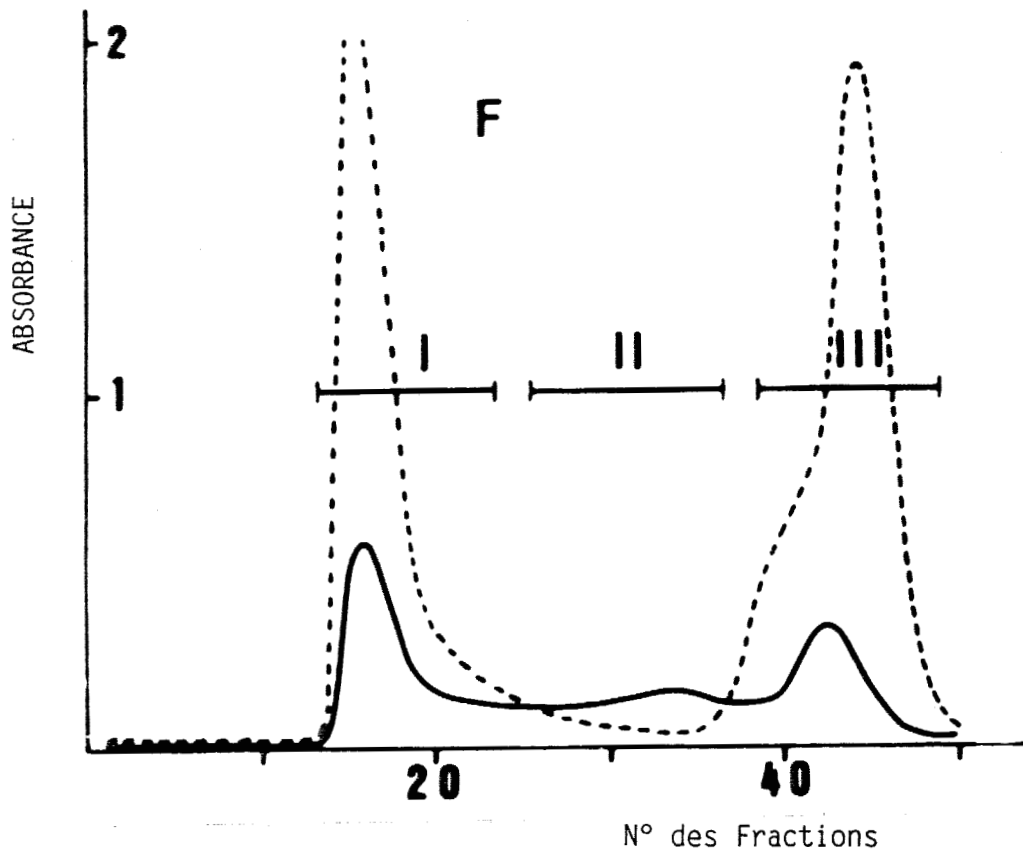


Fig. 25: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Lak... (bronchite chronique) réduite en tampon phosphate et filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'éluion (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=25mg; II=7mg; III=18mg.

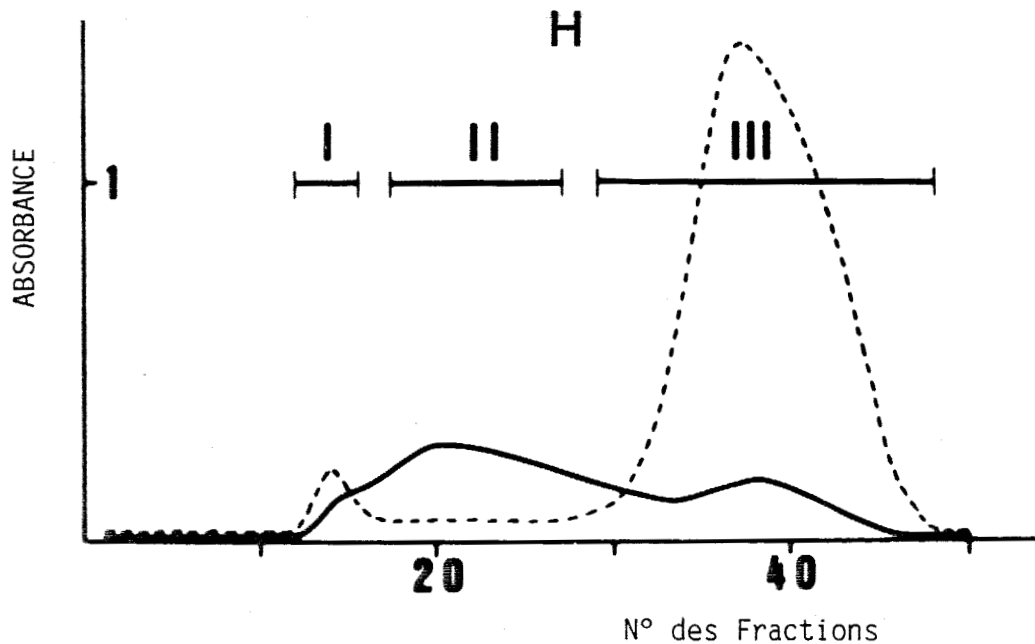


Fig. 26: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Lak... (bronchite chronique) réduite en guanidine 6M et filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en guanidine/HCl 6M. Profil d'éluion (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=3mg; II=13mg; III=48mg.

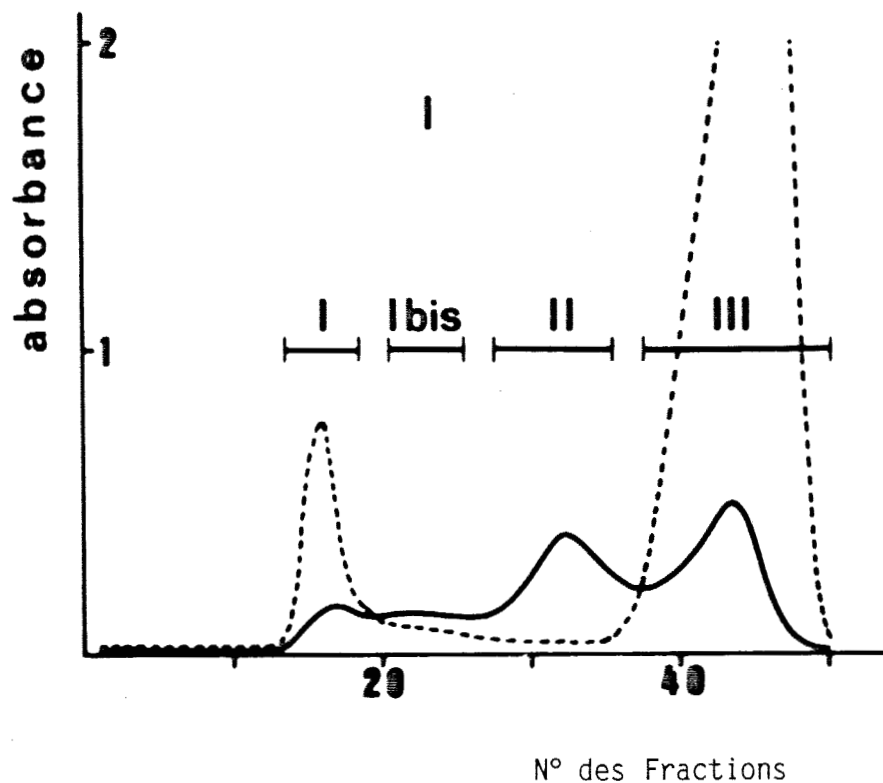


Fig. 27: Chromatographie de gel filtration du mélange à parties égales de phases solubles Vid... (mucoviscidose) et Lak... (bronchite chronique) réduit en tampon phosphate et filtré sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=3mg; Ibis=3mg; II=10mg; III=24mg.



partie du matériel glycoprotéique est partiellement retenue par la colonne, le pic se situant dans le tube No 32.

#### 4) Phase soluble du malade Vid..., préalablement traitée par la chaleur ou le PMSF

Les résultats précédents pouvant laisser supposer l'intervention d'un éventuel système mucolytique activé par les agents à thiol, des essais d'inactivation de cette activité mucolytique ont été entrepris sur la phase soluble Vid... avant réduction par le mercaptoéthanol et filtration sur colonne de Sepharose CL-2B en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0.

Le diagramme d'élution de la phase soluble traitée par la chaleur (bain-marie bouillant pendant 20mn) puis réduite par le mercaptoéthanol est présenté à la figure 28 (profil J). Si l'on fait exception d'une opalescence apparaissant dans les fractions entièrement ou partiellement exclues de la colonne de Sepharose, se traduisant par une absorbance plus élevée à 278nm, le profil obtenu, en particulier la courbe après réaction à l'orcinol, ne diffère pas sensiblement du profil A (Fig. 19) obtenu par filtration de la phase soluble non réduite.

Le diagramme d'élution de la phase soluble incubée en présence d'un inhibiteur des sérine-protéases, le PMSF à la concentration finale 0.5mM, puis réduite par le mercaptoéthanol et enfin filtrée sur Sepharose CL-2B en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0, apparaît en figure 29 (profil K). Comme dans le profil A (phase soluble non réduite), la fraction glycoprotéique majeure reste dans le volume d'exclusion de la colonne; cependant, une partie du matériel apparaît légèrement retardée, son élution survenant comme le pic glycoprotéique principal du profil B (Fig. 21) obtenu par réduction de la phase soluble en tampon phosphate. En conséquence, en présence du PMSF, la réduction n'est que partielle.

#### C/ ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES COMPOSANTS DE LA PHASE SOLUBLE APRES FRACTIONNEMENT SUR SEPHAROSE CL-2B

Les différentes fractions obtenues par filtration de la phase soluble de Vid... (mucoviscidose) sur colonne de Sepharose CL-2B, avant ou après réduction, en tampon non dissociant ou en tampon dissociant, ont été

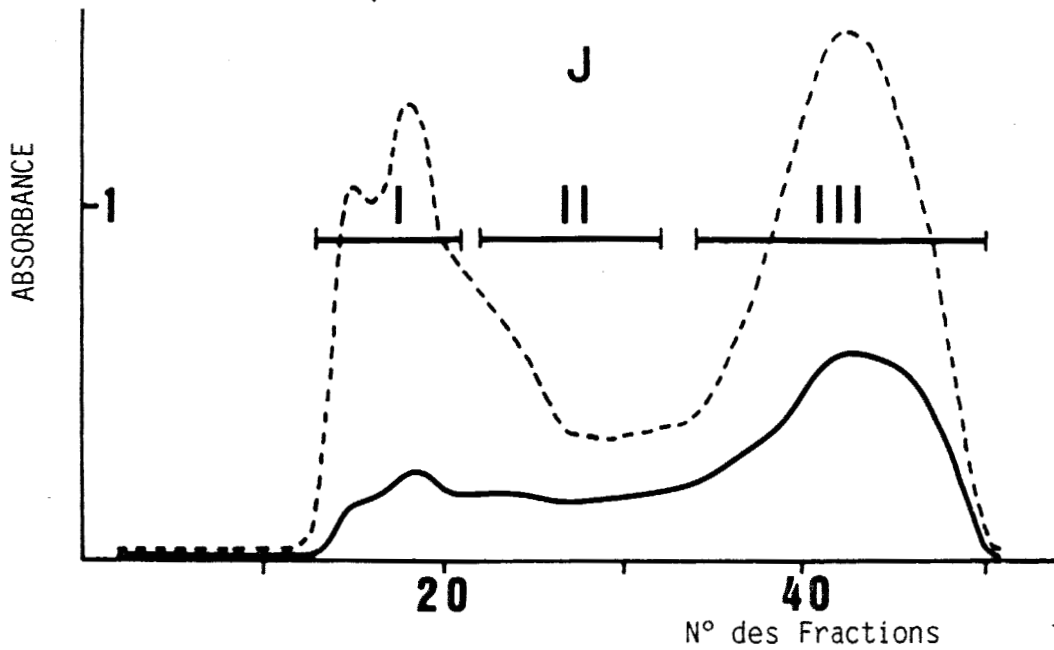


Fig. 28: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... (mucoviscidose) traitée par la chaleur, réduite en tampon phosphate et filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=11mg; II=10mg; III=26mg.

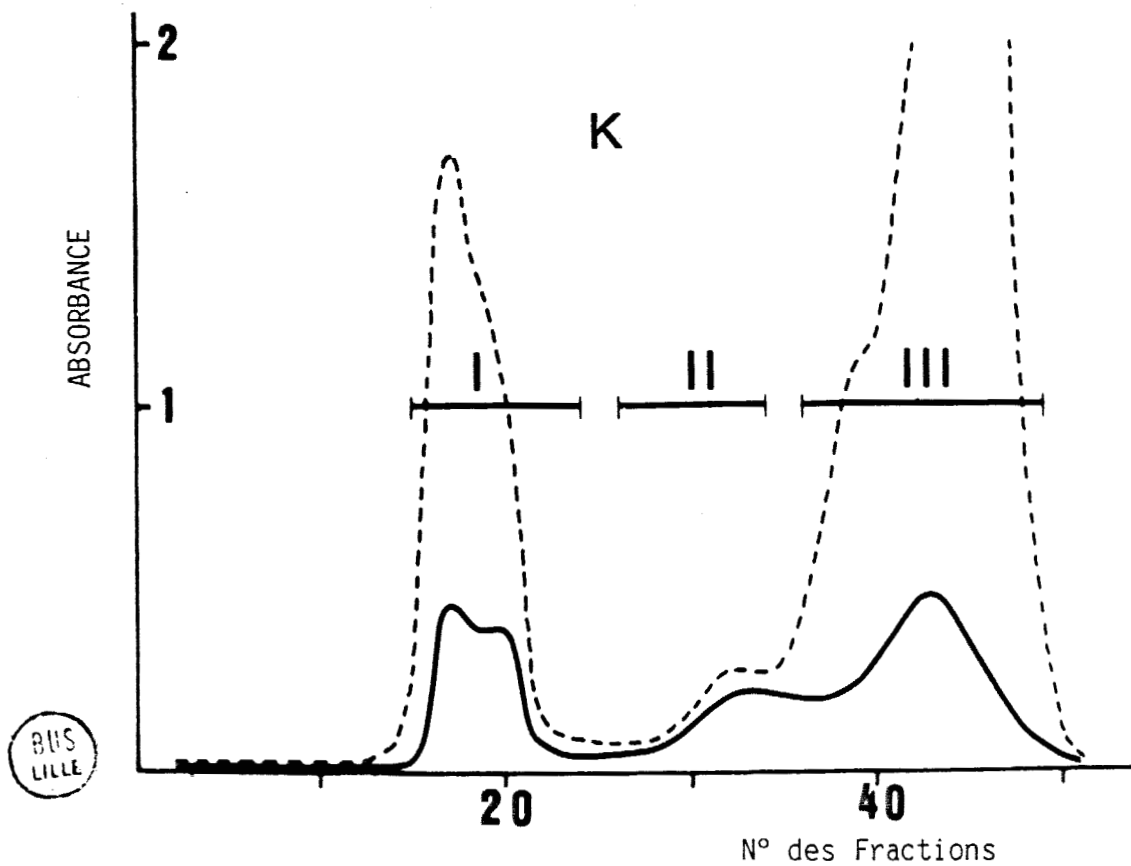


Fig. 29: Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... (mucoviscidose) traitée par le PMSF puis réduite en tampon phosphate et filtrée sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=13mg; II=6mg; III=31mg.

analysées par électrophorèse en gel d'agarose. Les résultats apparaissent sous les diagrammes d'élution correspondants (Fig. 19 à Fig. 22). Seule la fraction BI, obtenue en quantité insuffisante, n'a pu être étudiée.

### 1) Electrophorèse des fractions AI, AII et AIII (Fig. 19)

La plus grande partie du matériel de la fraction AI ne peut pénétrer dans le gel et reste dans la fente de dépôt.

Dans la fraction AII, outre la persistance d'une petite quantité d'échantillon au dépôt, il apparaît deux composants principaux : l'un des composants, de faible mobilité électrophorétique, donne une large bande très fortement colorée par le PAS, et présente une faible affinité pour l'amidoschwarz dans sa partie cathodique, et pour le bleu de toluidine dans sa partie anodique. L'autre composant est de plus grande mobilité électrophorétique et se colore intensément par le bleu de toluidine.

Dans la fraction AIII, deux bandes de faible mobilité électrophorétique prennent fortement l'amidoschwarz, moins intensément le PAS et pas du tout le bleu de toluidine. Dans la partie anodique de la lame, deux autres bandes sont révélées uniquement par le bleu de toluidine, la moins rapide d'entre elles présentant des propriétés métachromatiques. En outre, une autre bande colorée seulement par l'amidoschwarz, possédant la même mobilité que la sérumalbumine, apparaît à mi-distance entre le dépôt et les bandes colorées par le bleu de toluidine.

### 2) Electrophorèse des fractions CI, CII et CIII (Fig. 20)

Les fractions recueillies en milieu dénaturant donnent à l'électrophorèse des résultats assez peu différents de ceux que donnent les fractions obtenues en milieu non dénaturant.

### 3) Electrophorèse des fractions BII et BIII (Fig. 21)

La fraction BII comporte deux bandes de faible mobilité : la plus lente est fortement colorée par le PAS, à peine détectée par l'amidoschwarz, et pas du tout révélée par le bleu de toluidine; la plus rapide prend également, mais moins intensément, le PAS, et est fortement colorée par le bleu

de toluidine;

La fraction BIII montre deux bandes de faible mobilité colorée très légèrement par l'amidoschwarz et encore plus légèrement par le PAS; en outre, il existe dans la partie anodique de la lame une bande intensément colorée par le bleu de toluidine.

#### 4) Electrophorèse des fractions DI, DII et DIII (Fig. 22)

La fraction DI ne pénètre pratiquement pas dans le gel d'agarose, à l'exception d'une bande peu intense et peu mobile apparaissant après coloration par le PAS.

La fraction DII comporte une large bande peu mobile, fortement colorée par le PAS et plus faiblement dans sa partie anodique par le bleu de toluidine, ainsi qu'une bande rapide révélée intensément par le bleu de toluidine

La fraction DIII présente le même comportement électrophorétique que la fraction CIII.

#### 5) Electrophorèse des fractions AII, AIII, BII, BIII, CII, CIII, DII et DIII après hydrolyse par la nucléase

Après action de la nucléase du staphylocoque doré, les fractions ont été étudiées en électrophorèse sur agarose. Les résultats enregistrés (non présentés) sont, à un détail près, en tous points similaires à ceux déjà exposés obtenus avec les fractions correspondantes non traitées par cet enzyme : en effet, dans toutes les fractions, la bande la plus rapide fortement colorée par le bleu de toluidine a disparu; la bande de mobilité plus faible, présentant des propriétés métachromatiques en présence du bleu de toluidine, persiste dans les fractions les plus retenues en Sepharose CL-2B (AIII, BIII, CIII et DIII).

#### D/ COMPOSITION CHIMIQUE

Toutes les fractions recueillies après filtration de la phase soluble Vid... (mucoviscidose) sur Sepharose CL-2B, à l'état natif ou réduit, en milieu dissociant ou non dissociant, ont été dialysées, lyophilisées et

analysées du point de vue composition chimique. Les résultats enregistrés à partir des fractions AI, AII, AIII et BII, BIII obtenues en milieu non dissociant, sont présentés dans le tableau X; ceux des fractions CI, CII, CIII et DII, DIII obtenues en milieu dissociant, sont présentés dans le tableau XI.

### 1) Composition en acides aminés

La teneur en acides aminés dans les fractions exclues (AI et CI) ou partiellement retenues (AII, BII, CII, DII) est faible : 11 à 19.5 g/100g (poids sec); elle est plus faible dans les fractions réduites (BII, DII) que dans les fractions natives correspondantes (AII, CII). La proportion des acides aminés hydroxylés (Thr + Ser) est comprise entre 23.84 et 35.54 mol/100mol, plus élevée dans les fractions réduites (BII, DII) que dans les fractions natives correspondantes (AII, CII). La proportion en acides aminés dicarboxyliques (Asp + Glu) va de 12.73 à 17.28 mol/100mol, et apparaît plus faible dans les fractions réduites (BII, DII) que dans les fractions natives correspondantes.

La teneur en acides aminés dans les fractions fortement retenues par le gel (AIII, BIII, CIII et DIII) est élevée, comprise entre 53.9 et 64.6 g/100g (poids sec). La proportion d'acides aminés dicarboxyliques est élevée (25.01 à 28.49 mol/100mol), tandis que les acides aminés hydroxylés sont en proportion plus faible (11.81 à 12.07 mol/100mol).

### 2) Composition glucidique

Les oses combinés constituent 49.0 et 51.6 g/100g (poids sec) dans les fractions exclues AI et CI. Dans les fractions partiellement retenues, la teneur en sucres passe de 51.7 et 39.2 g/100g avant réduction (AII, CII) à 67.5 et 49.6 g/100g après réduction (BII, DII). Cette augmentation importante des sucres totaux apparaît principalement liée à la variation du galactose et N-acétylhexosamines. Par contre, dans les fractions fortement retenues (AIII, BIII, CIII, DIII) la teneur en sucres reste faible : 15.8 à 18.5 g/100g.

La longueur moyenne des chaînes glycaniques a été calculée en supposant que, dans les glycoprotéines ne possédant pas d'activité de groupe



FRACTIONS	AI	AII	AIII	BII	BIII					
<b>ACIDES AMINÉS</b> <i>mol/100mol</i>										
Asp	7.25	7.03	12.56	5.01	13.08					
Thr	12.39	14.46	5.89	21.97	5.55					
Ser	11.45	10.46	6.58	13.57	6.52					
Glu	10.03	8.91	14.20	7.72	15.41					
Pro	6.56	8.13	6.67	8.82	6.96					
Gly	11.39	10.54	8.15	9.31	8.42					
Ala	9.07	8.70	6.27	8.94	5.65					
Val	5.08	5.23	4.98	3.87	4.39					
1/2 Cys	1.18	0.74	1.71	traces	0.95					
Met	0.77	0.54	2.51	0.64	2.53					
Ile	2.84	2.74	3.29	2.51	3.46					
Leu	6.39	6.61	7.98	5.24	8.13					
Tyr	2.48	2.36	2.60	1.76	2.41					
Phe	3.11	3.00	3.56	2.15	3.62					
Lys	3.74	4.07	6.73	3.24	6.92					
His	2.04	2.53	3.03	2.80	3.38					
Arg	4.25	3.93	3.30	2.44	2.60					
Acides aminés totaux (g/100g)	17.47	19.56	62.65	15.16	64.60					
Thr + Ser	23.84	24.92	12.47	35.54	12.07					
Asp + Glu <i>mol/100mol</i>	17.28	15.94	26.76	12.73	28.49					
<b>SUCRES</b>										
	a	b	a	b	a	b				
Fuc	9.8	2.6	12.2	2.2	1.8	0.9	12.3	2.2	1.8	1.5
Man	0.4	0.1	0.3	0.1	1.3	0.6	nd		1.4	1.1
Gal	16.1	3.9	16.4	3.9	5.4	1.6	22.1	3.6	5.0	3.9
Glc	1.5	0.4	0.7	0.2	0.7	0.3	1.5	0.2	0.9	0.7
GalNAc	5.2	1	5.3	1	2.7	1	7.7	1	1.6	1
GlcNAc	13.1	2.5	11.6	2.2	4.8	1.7	18.3	2.4	5.3	3.3
NANA	2.9	0.4	5.2	0.7	1.8	0.5	5.6	0.5	1.9	0.8
Sucres totaux g/100g	49.0		51.7		18.5		67.5		17.9	
Long. moy. chaînes		10.9		10.3		6.6		9.9		12.3
Sucres/Protéines	2.80		2.64		0.30		4.45		0.28	
<b>SULFATE</b>										
	0.3	0.2	1.6	0.8	1.1	1.1	2.4	0.8	0.8	1.3
AA + Sucres + Sulf. (g/100g)	66.77		72.86		82.25		85.06		83.30	

a : g/100g (poids sec)

b : rapport molaire (GalNAc = 1)

Tableau X : Composition chimique des fractions obtenues après filtration de la phase soluble native ou réduite en milieu non dissociant

FRACTIONS	CI	CII	CIII	DII	DIII
<b>ACIDES AMINÉS</b> <i>mol/100mol</i>					
Asp	6.53	7.30	11.92	5.42	11.48
Thr	14.12	13.64	5.39	18.54	5.74
Ser	14.89	10.31	6.42	12.89	6.37
Glu	8.36	9.33	14.70	8.46	13.53
Pro	7.13	9.23	8.44	9.33	6.46
Gly	11.18	9.13	8.21	9.58	7.97
Ala	8.62	7.61	6.19	8.37	6.46
Val	4.60	5.50	4.67	4.71	5.07
1/2 Cys	1.06	0.87	0.43	traces	1.31
Met	0.95	0.89	1.70	0.56	2.87
Ile	3.00	3.16	3.74	4.07	3.51
Leu	5.57	7.23	8.21	5.40	8.57
Tyr	2.53	2.51	2.95	2.54	2.84
Phe	2.92	3.22	4.20	2.52	3.91
Lys	3.01	3.97	6.43	2.45	6.65
His	2.44	2.31	2.64	2.25	3.04
Arg	3.09	3.80	3.76	2.92	4.20
Acides aminés totaux (g/100g)	15.06	17.78	53.90	11.01	63.27
Thr + Ser	29.01	23.95	11.81	31.43	12.11
Asp + Glu <i>mol/100mol</i>	14.89	16.63	26.62	13.88	25.01
<b>SUCRES</b>	a b	a b	a b	a b	a b
Fuc	8.6 1.7	7.0 2.6	2.7 2.3	9.9 2.5	2.0 1.9
Man	nd	0.4 0.1	1.7 1.3	0.1 0.02	1.1 1.0
Gal	15.2 2.7	12.3 4.2	5.2 4.2	16.2 3.7	4.3 3.8
Glc	1.8 0.3	0.7 0.2	0.3 0.3	1.0 0.2	1.2 1.1
GalNAc	6.9 1	3.7 1	1.6 1	5.4 1	1.4 1
GlcNAc	13.7 2.0	8.4 2.3	4.3 2.8	10.9 2.0	4.0 2.9
NANA	5.4 0.6	6.7 1.3	2.6 1.1	6.1 0.8	1.8 0.9
Sucres totaux g/100g	51.6	39.2	18.4	49.6	15.8
Long. moy. chaînes	8.3	11.7	13.0	10.2	12.6
Sucres/Protéines	3.43	2.20	0.34	4.50	0.25
<b>SULFATE</b>	0.4 0.2	1.0 0.7	0.6 1.0	2.6 1.2	0.3 0.6
AA + Sucres + Sulf. (g/100g)	67.06	57.98	72.90	63.21	79.37

a: g/100g (poids sec)

b : rapport molaire (GalNAc = 1)

Tableau XI : Composition chimique des fractions obtenues après filtration de la phase soluble native ou réduite en milieu dissociant

sanguin A, tous les résidus de N-acétylgalactosamine sont engagés dans des liaisons glycanne-peptides (Lamblin et al., 1979). Le rapport molaire des sucres totaux à la N-acétylgalactosamine exprime donc dans ces conditions la longueur moyenne des chaînes glycaniques. Ce rapport ne varie pas de façon significative dans les différentes fractions recueillies : il est compris entre 8.3 et 11.7 dans les fractions exclues ou partiellement retenues.

Par contre, le rapport pondéral sucres totaux/acides aminés totaux apparaît significativement plus élevé dans les fractions réduites (BII=4.45; DII=4.50) que dans les fractions natives correspondantes (AII=2.64; CII=2.20). Dans les fractions fortement retenues (AIII, BIII, CIII, DIII), ce rapport est très faible : 0.25 à 0.34.

La teneur en sulfate apparaît légèrement plus élevée dans les fractions réduites peu retenues (BII=2.4 g/100g; DII=2.6 g/100g) que dans les fractions natives correspondantes (AII=1.6 g/100g; CII=1 g/100g).

Le total des différents constituants (acides aminés totaux + sucres totaux + sulfate) est compris entre 58 et 85 g/100g (poids sec); c'est dans la fraction BII obtenue après réduction en tampon phosphate que ce total est le plus élevé.

## E/ DISCUSSION

La phase soluble native, préparée à partir de l'expectoration d'un enfant atteint de mucoviscidose (Vid...), présente des diagrammes similaires en chromatographie de gel filtration sur Sepharose CL-2B, que l'élution soit faite en tampon non dissociant (Fig. 19) ou en milieu dissociant (Fig. 20).

Bien qu'apparaissant hétérogènes à l'électrophorèse, les fractions AI et AII (Fig. 19) et CI et CII (Fig. 20) ne diffèrent pas beaucoup les unes des autres du point de vue composition chimique. Le niveau élevé de leur rapport sucres/protéines, leur teneur élevée en thréonine, sérine, proline, glycoColle et alanine, de même qu'en fucose, galactose et N-acétylhexosamines, ainsi que leur faible teneur en cystéine permettent de les identifier comme des glycoprotéines du type des mucines (Tableaux X et XI).

L'examen des résultats de composition chimique révèle l'existence d'un déficit important dans la fraction CII éluee par la guanidine 6M : le total acides aminés + sucres + sulfate représente 57.98g/100g (poids sec). Cette perte s'explique assez mal. Elle peut être liée à la persistance d'u-

ne quantité non négligeable de sels minéraux ou de guanidine liés aux mucines, bien que cette fraction comme toutes les autres fractions ait été dialysée de façon extensive contre de l'eau distillée. Une autre hypothèse que l'on peut avancer pour expliquer, en partie du moins, ce "trou" de composition chimique impliquerait des substances lipidiques dont la présence dans la phase soluble du mucus bronchique a déjà été rapportée (Warembourg et al., 1968). La présence d'acides nucléiques dans les fractions partiellement ou fortement retenues sur Sepharose CL-2B a été établie par électrophorèse qui montre la disparition, après l'action des nucléases, d'une bande rapide colorée par le bleu de toluidine. En conséquence, la participation de tels acides nucléiques peut aussi être invoquée pour rendre compte des déficits de composition dans certaines des fractions étudiées.

Le traitement des phases solubles Vid... et Lak... par le mercaptoéthanol en présence de guanidine/HCl 6M se traduit, après filtration sur Sepharose CL-2B, par l'apparition dans le volume partiellement inclus dans la colonne, d'une proportion élevée des mucines (fractions DII et HII); étant donné que les fractions glycoprotéiques principales des phases natives correspondantes apparaissent à l'élution dans le volume exclu (fractions CI et GI), ce recul des mucines après réduction traduit une diminution de la taille moléculaire. Les fractions DII et HII restent encore cependant de nature hétérogène ainsi qu'en témoignent la réaction à l'orcinol qui montre un profil étalé et l'électrophorèse qui objective des composants de mobilité et d'affinité très différentes.

A l'analyse chimique la fraction réduite DII apparaît, par rapport à la fraction native CII, sensiblement plus riche en hydroxyaminoacides et plus pauvre en acides aminés dicarboxyliques. La teneur en sucres totaux apparaît également plus élevée. Ces résultats montrent clairement que la réduction des mucines en milieu dénaturant entraîne une dépolymérisation partielle de la structure macromoléculaire, et qu'en conséquence quelques liaisons covalentes de type disulfure sont impliquées dans cette structure.

Le traitement de la phase soluble Vid... (mucoviscidose) par le mercaptoéthanol en tampon phosphate aboutit, après fractionnement sur Sepharose CL-2B, à la production de mucines de taille moléculaire plus faible et plus homogène (fraction BII) que lorsque la réduction et l'élution ont lieu

dans la guanidine (fraction DII). La détermination de la masse moléculaire, qui permet d'attribuer respectivement les valeurs de 260 000 et 400 000 aux fractions BII et DII, confirme le degré plus important de "dépolymérisation" de BII par rapport à DII. L'électrophorèse de la fraction BII met en évidence deux bandes de faible mobilité électrophorétique et fortement colorées par le PAS; la bande de plus faible mobilité correspond vraisemblablement à des mucines neutres, et l'autre bande, également colorée par le bleu de toluidine, à des mucines plus acides (Lamblin et al., 1979). En ce qui concerne la composition chimique, la réduction en tampon phosphate entraîne des modifications plus importantes que la réduction en guanidine: la perte en acides aminés dicarboxyliques et le gain en acides aminés hydroxylés sont plus importants dans la fraction BII que dans la fraction DII. Comme dans la fraction DII, il n'y a, dans la fraction BII, que des traces de cystéine, et le rapport sucres/protéines est du même ordre de grandeur.

En conséquence, la réduction des mucines en tampon phosphate induit une dissociation plus marquée que celle produite par réduction en tampon dénaturant. L'action des agents de réduction opérant en milieu non dissociant sur les mucines bronchiques ne peut donc s'expliquer par la seule rupture de ponts disulfure. Comme cela avait déjà été antérieurement suggéré par Lamblin et al. (1979), il est possible à partir des résultats que nous avons enregistrés après réduction de la phase soluble du malade Vid..., atteint de mucoviscidose, de proposer que le mercaptoéthanol agit, outre par son effet de rupture de liens disulfure, en stimulant un système mucolytique.

Cette interprétation est corroborée par l'observation que la phase soluble préparée à partir de l'expectoration du malade Lak..., atteint de bronchite chronique, résiste fortement à la dépolymérisation lorsqu'elle est traitée seule par le mercaptoéthanol en tampon phosphate, mais qu'elle subit une dissociation importante lorsqu'elle est réduite en présence d'une quantité équivalente de la phase soluble Vid.... De ces résultats il ressort que le système mucolytique présent dans la phase soluble Vid... et activable en présence des agents de réduction, serait absent, au moins partiellement, de la phase soluble Lak... L'observation que le traitement préalable de la phase soluble Vid... par la chaleur ou par le PMSF, inhibiteur de protéases, protège, au moins partiellement, contre la réduction, même en tampon phosphate, va dans le même sens et permet en outre de soupçonner la nature en-

zymatique du phénomène de protéolyse activé par les réducteurs.

Les mucines obtenues par réduction de la phase soluble préparée à partir de l'expectoration de deux malades différents (Vid... et Lak...) présentent un comportement différent en chromatographie de gel filtration. Cette variation du comportement des mucines selon le mucus bronchique indique probablement que la sensibilité aux agents réducteurs varie d'un individu à l'autre, et que le contenu en protéases activables par les agents de réduction varie aussi d'un mucus à l'autre.



**II. Etude de l'action des agents réducteurs**

**sur les mucines**

**de la phase fibrillaire du mucus bronchique**



Cette étude a été réalisée à partir de l'expectoration d'un malade (Nas...) appartenant au groupe sanguin A, et atteint de bronchite chronique.

#### A/ PREPARATION DE LA PHASE FIBRILLAIRE DU MUCUS BRONCHIQUE

500ml de l'expectoration du malade Nas... ont permis d'isoler, après lavage par trois volumes de sérum physiologique, centrifugation, dialyse et lyophilisation 2.90g de phase soluble (soit 5.80g/l de mucus) et 5.39g de phase fibrillaire (soit 10.78g/l de mucus). Les composants non dialysables de cette expectoration se répartissent donc en phase soluble: 35%, et phase fibrillaire: 65%.

#### B/ COMPORTEMENT DES CONSTITUANTS DE LA PHASE FIBRILLAIRE EN CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHAROSE CL-2B

##### 1) Phase fibrillaire native solubilisée en guanidine/HCl 6M

100mg de phase fibrillaire ont été solubilisés par agitation dans 10ml de guanidine/HCl 6M. Après élimination d'un insoluble de 8mg par centrifugation, l'échantillon est déposé sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée par de la guanidine/HCl 6M.

Le diagramme d'élution (profil A) est présenté à la figure 30. Trois fractions glycoprotéiques sont obtenues: la fraction AI exclue de la colonne, très riche en oses combinés, représente 32% du mucus fibrillaire de départ; la fraction AII, d'élution légèrement retardée, également riche en oses, et la fraction AIII très retardée, absorbant davantage à 278nm, contiennent respectivement 14 et 22% du mucus de départ.

De ces résultats il apparaît que la guanidine/HCl 6M est un bon agent de solubilisation et de dissociation du mucus fibrillaire et que, la majorité des glycoprotéines, qui apparaissent dans le volume d'exclusion de la colonne, conservent une structure macromoléculaire. La masse moléculaire des glycoprotéines de la fraction AI, déterminée par ultracentrifugation à l'équilibre, est de 1 000 000. Ce résultat confirme donc le comportement de

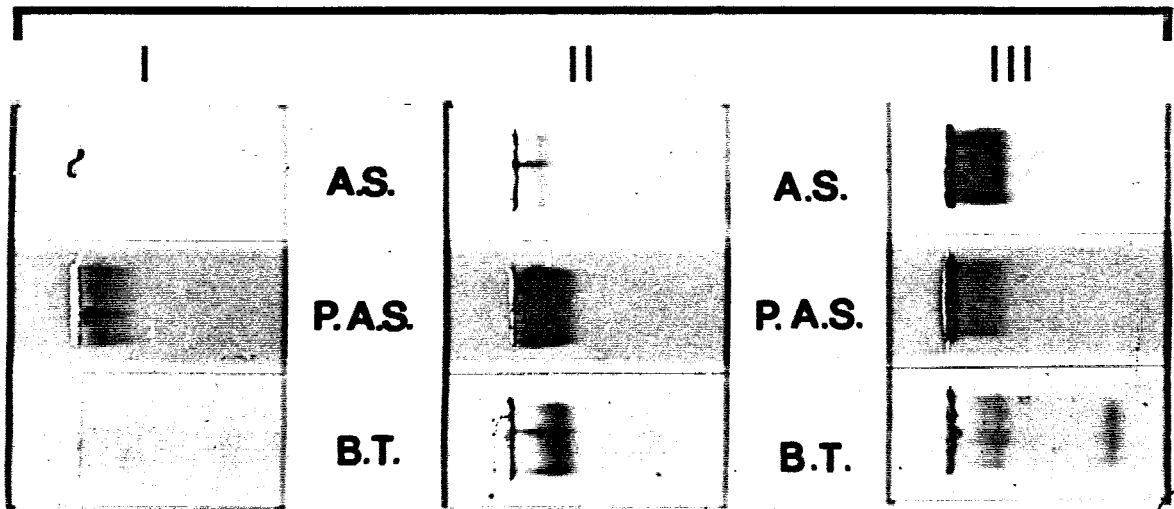
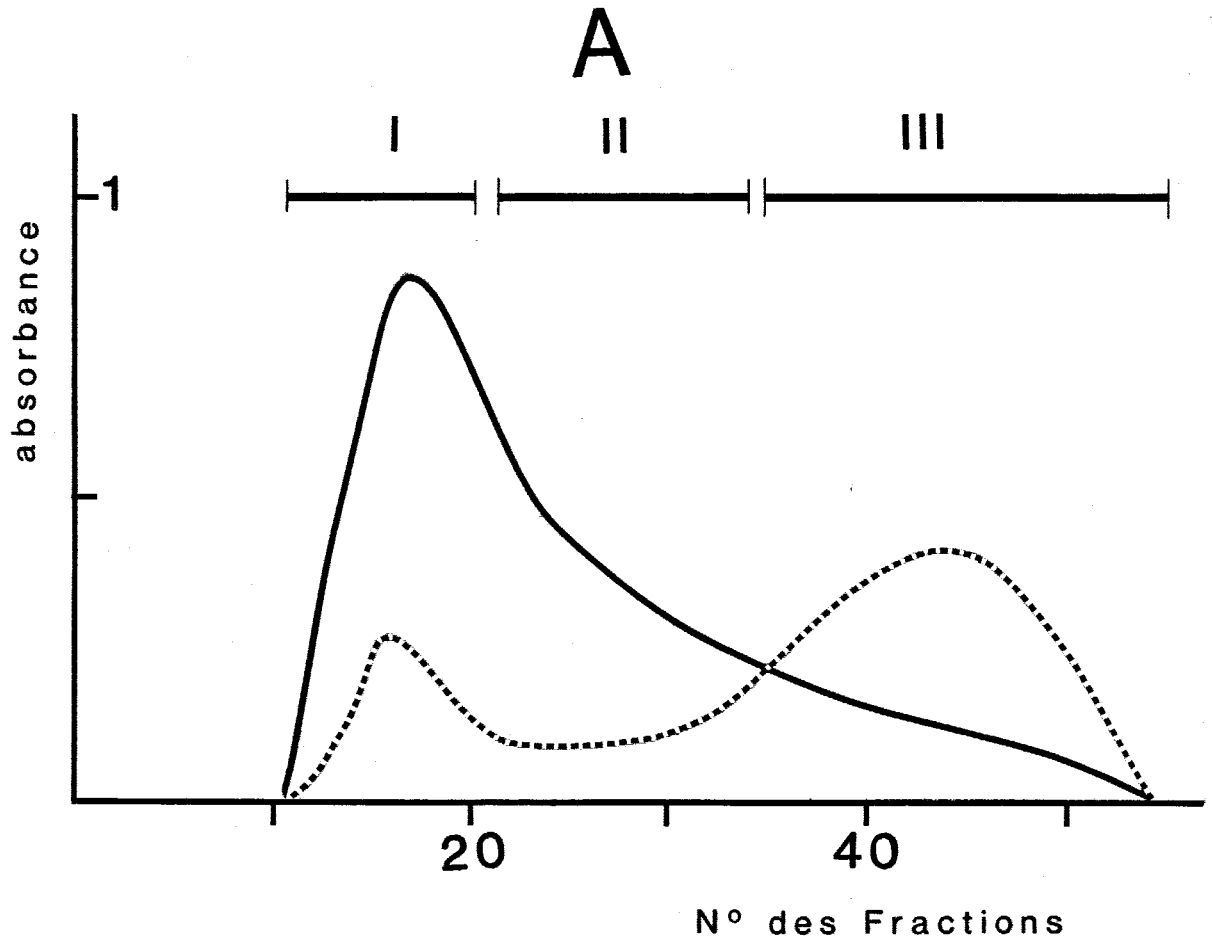


Fig. 30: Chromatographie de gel filtration de la phase fibrillaire native Nas... (bronchite chronique) sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en guanidine/HCl 6M. En haut : profil d'éluion (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 92mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=32mg; II= 14mg; III=22mg. En bas : analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

ces molécules en chromatographie de gel filtration.

## 2) Phase fibrillaire réduite en milieu dissociant

100 mg de phase fibrillaire solubilisée en tampon Tris/HCl 0.3M, guanidine/HCl 6M, pH 8.0 ont été réduits par le mercaptoéthanol, et alkylés par l'iodoacétamide. Les produits obtenus, dialysés, lyophilisés, sont fractionnés par gel filtration sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en guanidine/HCl 6M.

Le diagramme obtenu (profil B) est présenté à la figure 31. Trois fractions glycoprotéiques sont recueillies. La fraction BI exclue est mineure (4% du matériel de départ). La fraction BII légèrement retardée, très riche en oses, représente 29% de l'échantillon de départ, et constitue la fraction majeure. La fraction BIII, fortement retardée, pauvre en oses et présentant une forte absorbance à 278 nm, représente 13% du mucus utilisé.

La masse moléculaire des mucines éluées dans la fraction glycoprotéique majeure BII est de 435 000.

## 3) Phase fibrillaire réduite en milieu non dissociant

100mg de la phase fibrillaire Nas... ont été réduits par du mercaptoéthanol en tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7.3. Un insoluble de 6mg a été éliminé par centrifugation. Les produits de réduction, dialysés et lyophilisés, ont été filtrés sur Sepharose CL-2B en milieu Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0.

Le diagramme d'élution (profil C, Fig. 32) montre trois fractions glycoprotéiques: une fraction mineure exclue (CI = 9mg), une fraction majeure retardée (CII = 39mg) et une fraction fortement retardée (CIII = 17mg). Par comparaison avec la fraction majoritaire des mucines réduites en présence de guanidine/HCl 6M (BII), les mucines réduites en tampon phosphate (CII) sont éluées plus tardivement de la colonne de Sepharose, et leur masse moléculaire est plus faible: 250 000 (contre 435 000 pour BII).

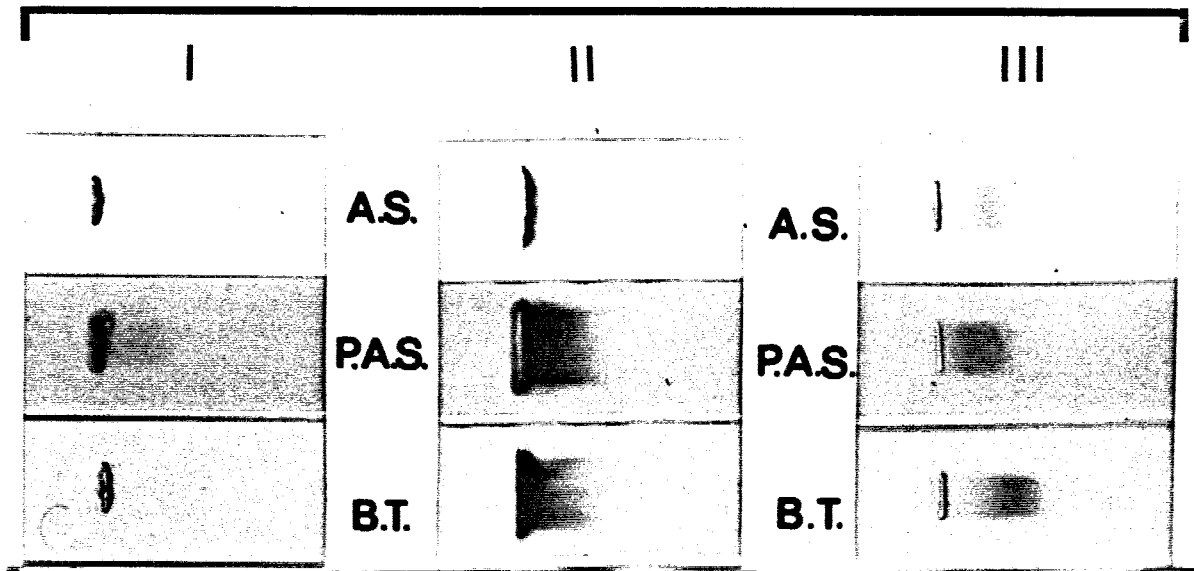
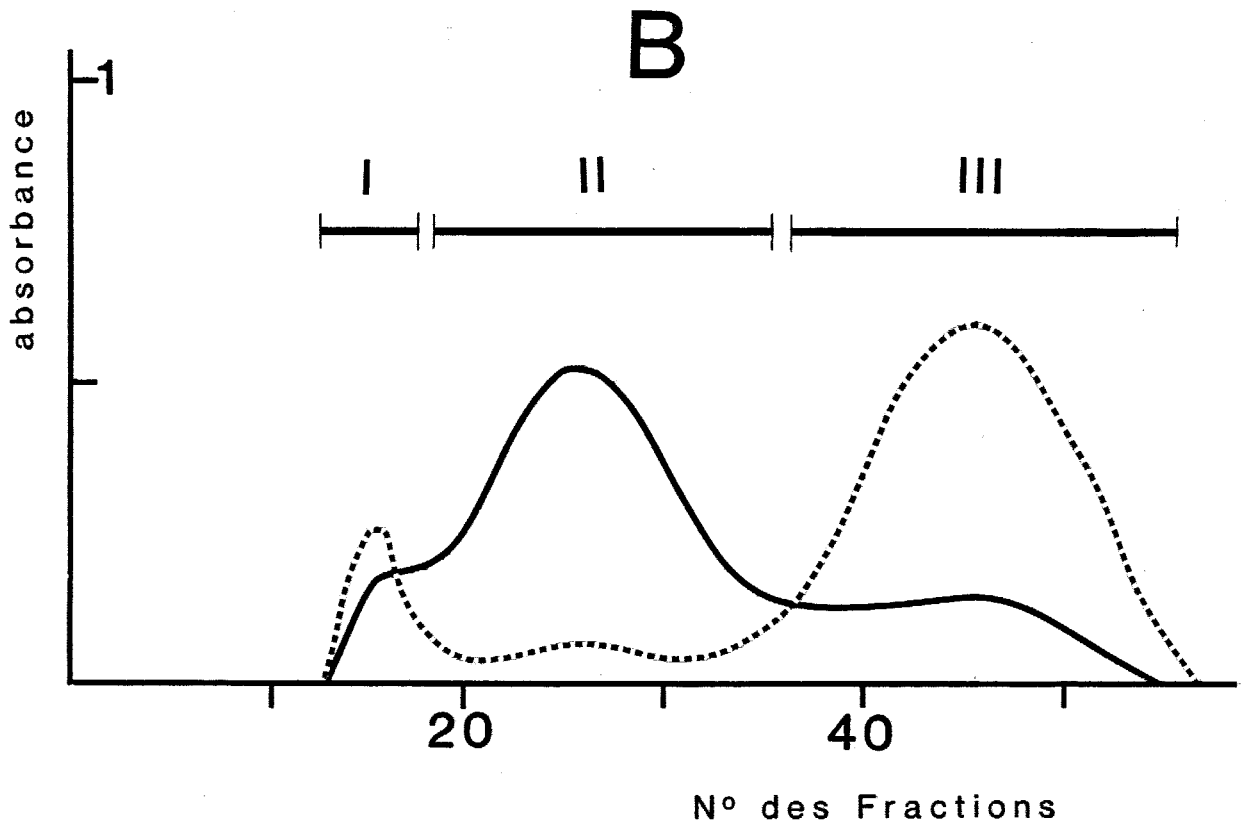


Fig. 31: Chromatographie de gel filtration de la phase fibrillaire Nas... (bronchite chronique) réduite et alkylée en tampon Tris/HCl 0.3M, guanidine/HCl 6M, pH 8.0, sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en guanidine 6M. En haut : profil d'élution (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé 100mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=4mg; II=29mg; III=13mg. En bas : analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

BBS  
LILLE

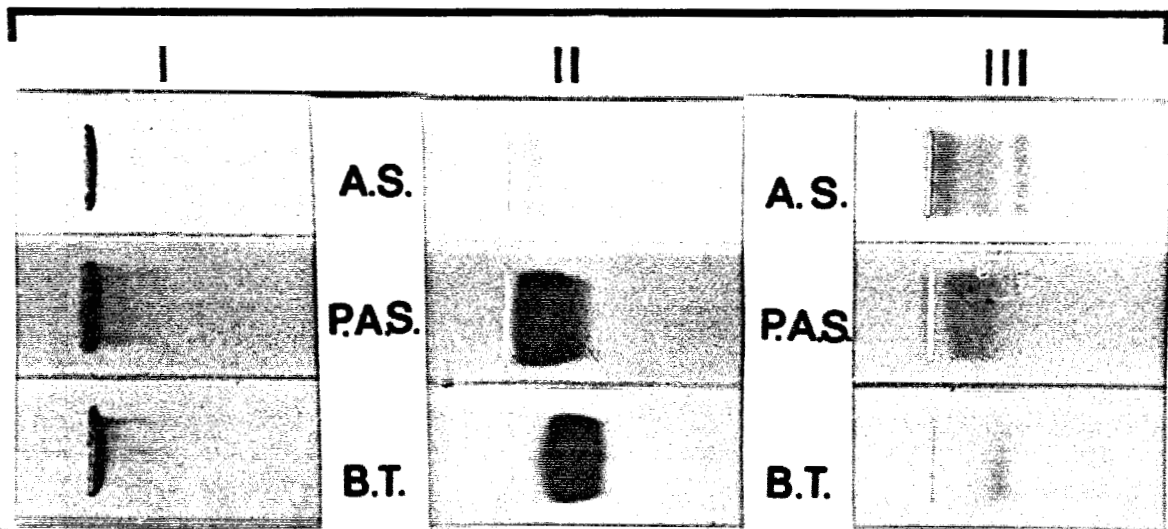
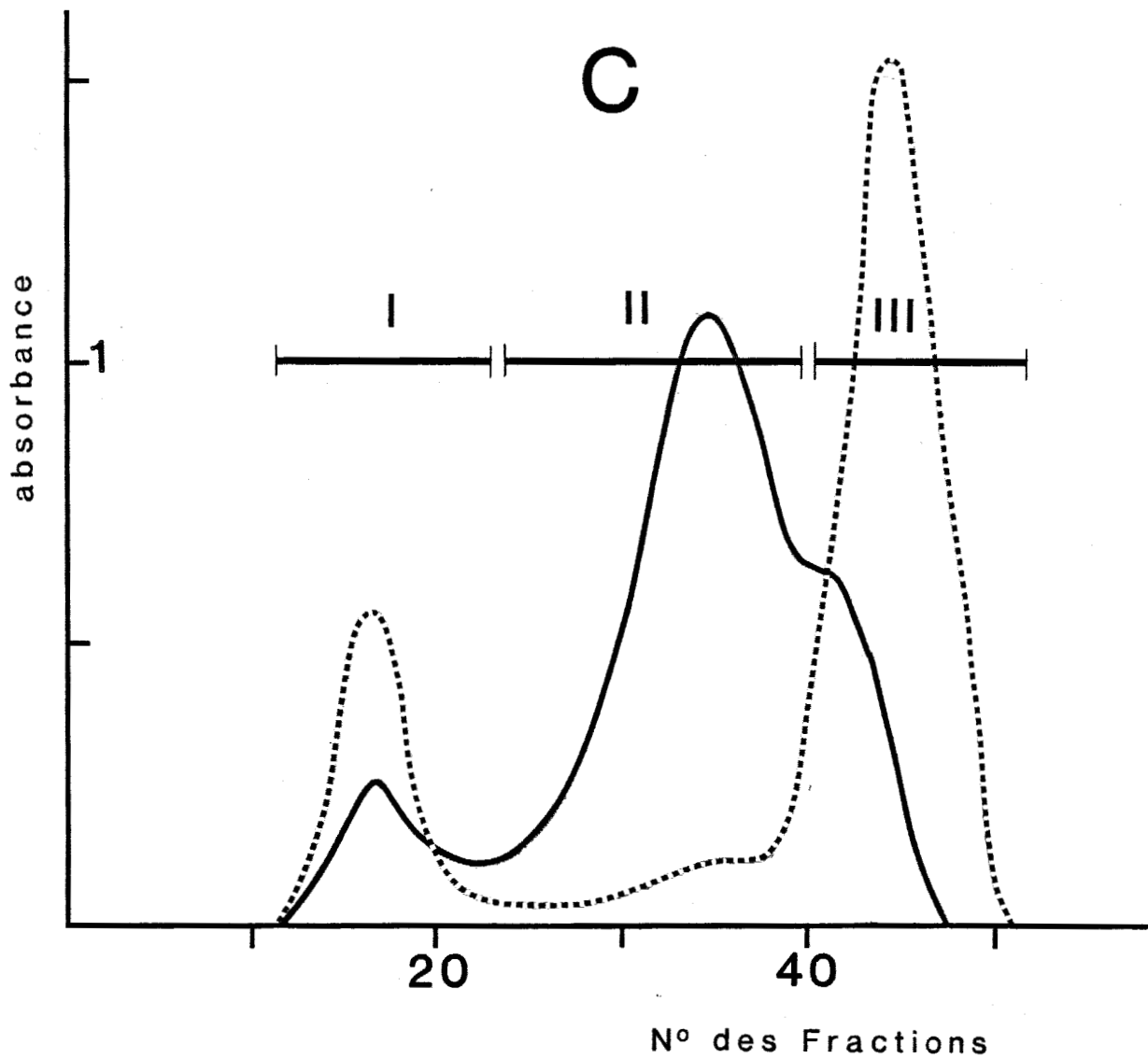


Fig. 32: Chromatographie de gel filtration de la phase fibrillaire Nas... (bronchite chronique) réduite en tampon phosphate sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. En haut : profil d'éluion (— = hexoses, --- = A 278 nm). Echantillon déposé: 94mg; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: I=9mg; II=39mg; III=17mg. En bas: analyse électrophorétique des fractions après coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

C/ ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS GLYCOPROTEIQUES NAS... SEPARÉES PAR GEL FILTRATION DU MUCUS FIBRILLAIRE SUR SEPHAROSE CL-2B

1) Mucus fibrillaire natif solubilisé en guanidine 6M (Fig. 30)

L'électrophorèse en agarose à pH 8.2 montre que la fraction AI pénètre un peu dans le gel et qu'elle se colore intensément par le PAS, très faiblement par l'amidoschwarz et le bleu de toluidine.

La fraction AII donne une bande diffuse de mobilité sensiblement plus grande que AI; elle est intensément colorée par le PAS, plus faiblement par l'amidoschwarz dans sa partie cathodique et par le bleu de toluidine dans sa partie anodique.

La fraction AIII apparaît plus hétérogène, comportant une bande diffuse de faible mobilité, légèrement colorée par le PAS, et dans sa partie anodique par le bleu de toluidine; elle est fortement révélée par l'amidoschwarz dans sa partie cathodique. En outre, une fine bande de même mobilité que la sérumalbumine est colorée par l'amidoschwarz, et une autre bande possédant une forte mobilité électrophorétique prend le bleu de toluidine.

2) Mucus fibrillaire réduit en guanidine 6M (Fig. 31)

La majeure partie de la fraction BI reste dans la fente de dépôt, colorée par l'amidoschwarz, le PAS et le bleu de toluidine. Une faible partie du matériel se présente sous forme d'une bande peu mobile, colorée par le PAS.

La fraction BII apparaît sous forme d'une bande diffuse colorée par le PAS et le bleu de toluidine, ainsi que par l'amidoschwarz dans sa partie cathodique.

la fraction BIII apparaît hétérogène constituée d'une bande diffuse prenant le PAS et l'amidoschwarz, et d'une bande également diffuse plus anodique colorée par le bleu de toluidine.

3) Mucus fibrillaire réduit en tampon phosphate (Fig. 32)

La fraction CI pénètre mal dans le gel et présente les mêmes affinités tinctoriales que la fraction correspondante BI.

La fraction CII apparaît sous forme d'une large bande fortement colorée par le PAS, à peine révélée par l'amidoschwarz sous forme d'une bande étroite dans sa partie cathodique, et fortement colorée dans sa partie anodique par le bleu de toluidine.

La fraction CIII apparaît très hétérogène comportant trois bandes: une bande peu mobile uniquement colorée par l'amidoschwarz, une bande plus rapide colorée par le PAS et l'amidoschwarz, enfin une bande encore plus rapide prenant l'amidoschwarz et le bleu de toluidine.

#### D/ COMPOSITION CHIMIQUE

Les fractions glycoprotéiques séparées par gel filtration sur Sepharose CL-2B du mucus fibrillaire Nas... natif (AI, AII, AIII), ou réduit en guanidine 6M (BI, BII, BIII) ou encore réduit en phosphate (CI, CII, CIII) ont été dialysées, lyophilisées et leur composition chimique a été déterminée. La composition en acides aminés apparaît dans le tableau XII et la composition glycanique dans le tableau XIII.

##### 1) Fractions recueillies après filtration du mucus fibrillaire natif en guanidine/HCl 6M

La fraction glycoprotéique majeure AI, exclue en gel filtration apparaît comme la fraction la plus glycosylée (52.20g/100g) et la moins riche en acides aminés (19.19g/100g). La proportion des acides aminés hydroxylés est relativement élevée (29.54mol/100mol), et celle des acides aminés dicarboxyliques est faible (15.84mol/100mol). Le rapport pondéral sucres/acides aminés est 2.72.

Les fractions AII et surtout AIII sont plus riches en acides aminés et contiennent moins d'oses combinés; les hydroxyaminoacides y sont en proportion plus faible et les acides aminés dicarboxyliques en proportion plus élevée. Dans les trois fractions, la teneur en cystéine est faible et la teneur en sulfate similaire.

De cette analyse chimique, il ressort que la fraction glycoprotéique AI de masse moléculaire élevée possède une composition du type des mucines, bien que comportant de faibles quantités de mannose et de glucose.

FRACTIONS	AI	AII	AIII	BI	BII	BIII	CI	CII	CIII
<b>ACIDES AMINÉS</b> <i>mol/100mol</i>									
Asp	7.18	8.46	11.72	10.13	5.75	12.30	7.72	2.33	12.69
Thr	16.84	10.64	6.59	8.84	24.78	8.72	12.47	28.97	8.91
Ser	12.70	11.52	8.14	11.99	14.48	8.91	11.82	19.49	9.70
Glu	8.66	9.95	12.98	10.32	6.33	14.00	9.10	3.18	13.56
Pro	8.48	7.55	7.40	5.66	9.35	8.26	6.16	12.54	9.59
Gly	9.93	9.65	8.88	9.14	7.35	10.76	9.71	5.75	8.62
Ala	7.82	8.99	7.51	7.34	7.52	7.23	8.74	8.96	6.65
Val	4.58	5.32	5.02	5.11	4.18	4.04	5.32	3.66	4.82
½Cys	2.18	2.49	2.60	0.44	1.47	0.45	0.74	0.92	2.12
Met	0.59	0.43	0.88	1.26	0.88	0.74	0.25	0.60	0.65
Ile	2.19	2.61	3.08	3.27	1.96	2.78	3.28	1.84	2.19
Leu	5.48	7.23	8.54	8.37	4.55	6.16	7.83	3.15	6.11
Tyr	2.43	2.68	2.33	3.85	1.81	2.63	3.00	1.13	2.32
Phe	2.66	3.01	3.01	3.79	1.93	3.02	3.73	1.18	2.82
Lys	2.71	3.72	5.13	5.44	2.19	3.95	3.49	1.72	3.86
His	2.35	2.08	1.42	1.11	2.39	2.27	1.81	2.85	2.04
Arg	3.21	3.66	4.76	3.94	3.07	3.78	4.82	1.73	3.36
Acides aminés totaux (g/100g)	<u>19.19</u>	<u>29.74</u>	<u>52.79</u>	<u>13.60</u>	<u>18.19</u>	<u>28.02</u>	<u>17.87</u>	<u>12.79</u>	<u>35.34</u>
Thr + Ser <i>mol/100mol</i>	29.54	22.16	14.73	20.83	39.26	17.63	24.29	48.46	18.61
Asp + Glu <i>mol/100mol</i>	15.84	18.41	24.70	20.45	12.08	26.30	16.82	5.51	26.25



Tableau XII : Composition en acides aminés des fractions obtenues après filtration du mucus fibrillaire Nas...



FRACTIONS	AI		AII		AIII		BI		BII		BIII		CI		CII		CIII	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
SUCRES																		
Fuc	6.8	1.1	5.1	0.9	1.6	1.1	2.7	1.0	9.5	1.2	5.2	1.6	5.1	1.0	12.4	1.4	6.1	1.2
Man	0.5	0.1	0.8	0.1	1.0	0.6	0.4	0.1	0.6	0.1	1.5	0.4	0.3	0.1	-		2.4	0.4
Gal	14.1	2.0	12.7	2.0	4.0	2.4	8.7	3.0	18.9	2.2	10.8	3.1	12.2	2.2	25.6	2.5	13.2	2.4
Glc	0.9	0.1	1.1	0.2	0.5	0.3	1.9	0.7	1.0	0.1	1.7	0.5	1.0	0.2	0.8	0.1	0.7	0.1
GalNAC	8.2	1	7.8	1	2.1	1	3.6	1	10.9	1	4.4	1	6.9	1	12.7	1	7.0	1
GlcNAC	11.9	1.5	11.8	1.5	4.0	1.9	5.9	1.6	16.5	1.5	9.8	2.2	12.0	1.7	18.8	1.5	13.2	1.9
NANA	9.8	0.8	6.0	0.5	1.9	0.6	1.2	0.2	9.8	0.6	4.7	0.7	4.3	0.4	10.8	0.6	6.1	0.6
Sucres totaux g/100g	52.2		45.3		15.1		24.4		67.2		38.1		41.8		81.1		48.7	
Rapport Sucres/Ac. aminés	2.72		1.52		0.29		1.79		3.69		1.36		2.34		6.34		1.38	
SULFATE	1.2	0.4	1.3	0.4	1.3	1.5	2.9	2.0	0.9	0.2	2.8	1.6	2.6	0.9	1.7	0.3	1.4	0.5
AA + Sucres + Sulf. (g/100g)	72.6		76.3		69.2		40.9		86.3		68.9		62.3		95.6		85.4	

a : g/100g (poids sec)

b : rapport molaire (GalNac = 1)

Tableau XIII: Composition glucidique des fractions obtenues après filtration du mucus fibrillaire Nas...

## 2) Fractions recueillies après filtration du mucus fibrillaire réduit en guanidine/HCl 6M

La fraction la plus glycosylée est la fraction BII, légèrement retenue sur la colonne de Sepharose. Par rapport à la fraction AI, sa teneur en oses combinés (67.20g/100g) est plus élevée, et sa teneur en acides aminés (18.19g/100g) plus faible. La proportion en acides aminés hydroxylés est plus élevée (39.26mol/100mol) et celle en acides aminés dicarboxyliques plus faible (12.08mol/100mol). Le rapport des sucres totaux aux acides aminés totaux est de 3.69.

Dans la fraction BI, les oses représentent 24.40g/100g et les acides aminés totaux 13.60g, donnant un rapport sucres/acides aminés de 1.79. Cette fraction est plus riche en acides aminés dicarboxyliques et moins riche en hydroxyaminoacides que la fraction glycoprotéique majeure BII. Le total des acides aminés + sucres + sulfate ne représente que 40.90g/100g. Ce déficit important de composition s'explique assez mal, et l'on peut soit incriminer la persistance, malgré la dialyse, de sels de guanidine dans la fraction, soit encore évoquer l'existence de composants de nature non glycoprotéiques tels qu'acides nucléiques ou lipides.

Dans la fraction BIII, la teneur en acides aminés est de 28.02g/100g, et la teneur en sucres 38.10g/100g. Les acides aspartique et glutamique sont abondants (26.30%), tandis que thréonine et sérine ne représentent que 17.63%.

Les trois fractions sont sulfatées, et leur teneur en cystéine est faible.

## 3) Fractions recueillies après filtration du mucus fibrillaire réduit en tampon phosphate

La fraction majeure est la fraction CII très riche en glucides (81.10g/100g), composée de fucose, galactose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine et acide sialique. Elle comporte encore une faible teneur de glucose, mais pas de mannose. Les acides aminés représentent 12.79g/100g, ce qui donne un rapport sucres/acides aminés de 6.34. Thréonine et sérine constituent 48% des acides aminés, tandis que l'acide aspartique et glutamique ne représentent que 5.5% de ceux-ci.

Les fractions CI et surtout CIII sont moins glycosylées et plus riches en acides aminés que la fraction CII.

La cystéine est présente en faible proportion dans CI, CII et constitue plus de 2% dans CIII.

## E/ DISCUSSION

Le mucus fibrillaire préparé à partir de l'expectoration du malade Nas..., atteint de bronchite chronique, a été filtré sur colonne de Sepharose CL-2B dans trois conditions: à l'état natif après solubilisation en guanidine 6M; après réduction par le mercaptoéthanol en présence de guanidine 6M; et après réduction par le mercaptoéthanol en tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7.3.

Après solubilisation par la guanidine, la fraction glycoprotéique principale est éluée dans le volume d'exclusion de la colonne de Sepharose, indiquant que ces glycoprotéines ont une taille moléculaire élevée. Ce comportement chromatographique est en accord avec la mesure de la masse moléculaire qui attribue à cette fraction une masse de 1 000 000, et avec l'analyse électrophorétique qui révèle que l'essentiel du matériel analysé, coloré par l'amidoschwarz et le PAS, ne peut pénétrer dans le gel d'agarose. L'analyse chimique indique une teneur élevée en glucides, avec une composition glycannique caractérisée par la présence des oses habituels dans les mucines, mais aussi par de faibles quantités de mannose et de glucose; les acides aminés ne représentent que 19% de la structure moléculaire, avec une proportion élevée de thréonine, sérine, proline, glycine et alanine, et une proportion faible des acides aminés dicarboxyliques.

Après réduction en milieu dissociant, la fraction glycoprotéique majeure apparaît légèrement retardée par le gel de Sepharose. La masse moléculaire des composants de cette fraction est de 435 000, confirmant qu'une diminution importante de la taille moléculaire des glycoprotéines est intervenue sous l'action du mercaptoéthanol. L'électrophorèse montre que la majorité du mucus réduit pénètre dans le gel et présente une affinité importante pour le PAS mais aussi pour l'amidoschwarz et le bleu de toluidine. L'analyse chimique de la fraction glycoprotéique majeure montre par rapport à celle

de la fraction non réduite correspondante un enrichissement en glucides et un appauvrissement en acides aminés. La proportion de thréonine et de sérine est plus élevée et celle de l'acide aspartique, de l'acide glutamique et de la cystéine plus faible. Ces résultats indiquent qu'en milieu dissociant, les agents réducteurs entraînent une dépolymérisation des mucines probablement par rupture de ponts disulfure au sein de l'édifice macromoléculaire.

Après réduction et filtration sur Sepharose en milieu non dissociant, le retard à l'élution de la fraction glycoprotéique majeure est encore plus important que quand la réduction se fait en milieu dissociant. La masse moléculaire (250 000) est également plus faible. L'analyse électrophorétique met en évidence une fraction glycoprotéique de mobilité plus grande, prenant intensément le PAS et le bleu de toluidine mais à peine détectée par l'amidoschwarz. La teneur en glucides est nettement plus élevée et celle des acides aminés plus faible que dans la fraction correspondante réduite en guanidine 6M. La fraction glycanique ne comporte plus de mannose; la proportion en acides aminés hydroxylés est plus élevée et celle des acides aminés dicarboxyliques plus faible.

Ces résultats indiquent que la dépolymérisation des mucines est plus importante après réduction en milieu non dissociant qu'après réduction en milieu dissociant. La rupture de ponts disulfure, qui rend compte de l'action des réducteurs en milieu dissociant, ne peut cependant à elle seule suffire pour expliquer la dégradation plus prononcée des mucines réduites en milieu non dissociant. Ici encore, comme dans le cas des phases solubles bronchiques précédemment envisagé, l'intervention d'un système mucolytique activé par les agents réducteurs doit être envisagé lorsque la réduction s'effectue en tampon non dénaturant.



**III. Discussion générale sur l'action  
des agents de réduction  
sur les mucines bronchiques**

Les agents réducteurs sont de longue date connus comme agents mucolytiques et mucorégulateurs et parfois utilisés à des fins thérapeutiques pour fluidifier les sécrétions bronchiques dans les états d'hypersecretion bronchique (Webb, 1962; Sheffner, 1963; Gernez-Rieux et al., 1964; Hammerschlag et al., 1980; Li et al., 1980; Melville et al., 1980; Puchelle et al., 1980a; Tabachnik et al., 1980; Takishima et al., 1980; Yanaura et al., 1982).

L'étude de l'action des agents réducteurs sur les mucines tant dans la phase soluble que dans la phase fibrillaire du mucus bronchique a suggéré que le mécanisme d'action des agents à thiol pouvait être double dans certaines conditions: d'abord une action classique de rupture de ponts disulfure à la fois en milieu non dissociant et en milieu dissociant; en outre, et seulement en milieu non dissociant, activation d'un système mucolytique.

L'effet de rupture de ponts disulfure est indiscutable quand on considère la diminution de la taille et de la masse moléculaire des mucines des phases soluble et fibrillaire traitées par le mercaptoéthanol en milieu dissociant. Cependant, étant donné la faible teneur en cystéine des mucines réduites dans ces conditions, il est vraisemblable que la majeure partie des liaisons disulfure rompues appartiennent à des protéines qui, malgré la nature dénaturante du milieu, sont associées aux mucines par liaisons non covalentes.

En milieu non dissociant, les réducteurs agissent en outre par activation d'un système mucolytique dont la nature reste encore incertaine. Un certain nombre d'éléments convergent cependant qui laissent penser qu'il s'agit d'un phénomène de protéolyse de nature enzymatique:

- l'intervention probable d'un tel phénomène avait déjà été proposée par Lamblin et al. (1979) pour expliquer l'hétérogénéité des

mucines bronchiques réduites en milieu non dissociant, tant du point de vue de leur masse moléculaire que de leur aspect en microscopie électronique sous forme de bâtonnets de longueur très variable.

- par rapport à la réduction en milieu dénaturant, la réduction en tampon phosphate 0.075M, pH 7.3 produit des mucines de plus petite taille, dont l'élution d'une colonne de Sepharose est plus retardée et dont la masse moléculaire est significativement plus faible. L'analyse électrophorétique révèle que ces mucines se colorent moins par l'amidoschwarz; à l'analyse chimique, les modifications portent non sur la fraction glycanique mais sur l'axe polypeptidique avec diminution plus importante de la teneur en acides aminés (et donc enrichissement relatif en sucres, et augmentation du rapport sucres/acides aminés).

- la réduction des mucines dans la phase soluble Vid... n'est que partielle lorsque, avant action du mercaptoéthanol en tampon phosphate, l'échantillon a été chauffé au bain-marie bouillant ou mis en présence d'un inhibiteur de protéases.

- Houdret et al. (1983) ont récemment montré que l'incubation de mucines bronchiques natives de haut poids moléculaire avec deux inhibiteurs de protéases agissant simultanément (PMSF et EDTA) protège ces glycoprotéines de l'effet mucolytique induit par le mercaptoéthanol ou l'acétate 4-aminophenylmercurique (APMA).

- la présence d'enzymes protéolytiques dans les sécrétions trachéobronchiques a déjà été rapportée par Twumasi et al. (1977); Lieberman et al. (1971) ont également rapporté l'existence dans les expectorations purulentes de leucoprotéases activables par les agents réducteurs.

- de nombreux inhibiteurs de protéases à caractère neutre, dont certains possèdent une forte teneur en cystéine, ont été caractérisés dans les sécrétions bronchiques humaines (Schiessler et al., 1978; Hayem et al., 1980b; Stockley et al., 1980b; Hochstrasser et al., 1981; Kueppers et al., 1982).

Le mécanisme d'action par lequel les agents inhibiteurs activent un ou des système(s) protéolytique(s) reste encore spéculatif. Une action directe sur une thiol-protéase ou la libération d'une protéase à partir d'un complexe protéase-inhibiteur de protéase inactif peuvent être envisagées. Ces complexes enzyme-inhibiteur constituent selon Houdret et al. (1983) des structures protéiques de faible masse moléculaire, associées aux mucines



bronchiques, et dissociables de celles-ci par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le mercaptoéthanol et l'acétate 4-aminophenylmercurique auraient la propriété soit de modifier la conformation soit encore de dissocier les complexes enzyme-inhibiteur; les protéases ainsi libérées deviendraient actives et exerceraient leur action protéolytique se traduisant par l'effet de mucolyse.

L'étude des phases solubles provenant de deux malades différents a montré que l'importance du système mucolytique susceptible d'être activé par les agents réducteurs est quantitativement variable selon le mucus envisagé: son activité est beaucoup plus élevée dans la phase soluble provenant du malade atteint de mucoviscidose (Vid...) que dans la phase soluble provenant du malade atteint de bronchite chronique (Lak...). Cependant, les résultats sont encore insuffisants à ce jour pour tenter d'établir une corrélation éventuelle entre la sensibilité d'un mucus à un agent de réduction et l'existence d'une pathologie associée bien définie.

Cette observation pourrait cependant avoir une portée plus générale que le cas ponctuel étudié. Le concept qui s'en dégage conduirait à envisager, en dehors de toute recherche de corrélation clinico-biologique, que la sensibilité du mucus bronchique aux agents réducteurs peut varier d'un individu à l'autre.

La résistance que nous avons observée à la réduction des mucines de la phase soluble Lak... est comparable à une observation faite antérieurement par Feldhoff et al. (1979). Ces auteurs ont en effet remarqué que la réduction des mucines isolées de sécrétions trachéobronchiques d'un patient asthmatique n'entraîne pas de modification de leur profil d'élution d'une colonne de Sepharose 4B. En conséquence Feldhoff et al. (1979) ont estimé que la rupture seule de liaisons disulfure dans les mucines ne conduit pas à une diminution importante de leur taille moléculaire. Creeth et al. (1977) ont également rapporté que, concernant la masse moléculaire des mucines bronchiques, l'effet de la réduction par le dithiothréitol en milieu non dissociant varie beaucoup d'une expectoration à l'autre.

Williams et al. (1982) et Carlstedt (1982) ont récemment rapporté que les mucines trachéobronchiques normales résistent en milieu dissociant à l'action du dithiothréitol. Ces auteurs considèrent en conséquence que la structure moléculaire des mucines ne peut résulter d'une polymérisation d'éventuelles sous-unités reliées par ponts disulfure. Cependant ils n'écartent

pas la possibilité que de telles liaisons intramoléculaires puissent exister dans la séquence polypeptidique des mucines: dans ces conditions, l'action des agents ne doit affecter que la structure secondaire de la molécule sans modification importante de la masse moléculaire de l'édifice. Selon Williams et al. (1982), les différences de comportement des mucines trachéobronchiques vis-à-vis des agents réducteurs seraient en fait le reflet de l'activité protéolytique endogène de chaque mucus: l'activité dans le mucus serait probablement plus faible chez l'individu normal que chez le malade atteint de bronchite chronique ou de mucoviscidose.



# **TROISIEME PARTIE**

**ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE**

**DES MUCINES BRONCHIQUES**

Quand on examine la littérature sur les mucines bronchiques, il ressort de l'ensemble des travaux effectués une certaine hétérogénéité tant dans les résultats de composition chimique que dans les conceptions émises sur la structure de ces macromolécules. Comme cela a déjà été souligné dans la première partie de ce mémoire, une part importante de cette hétérogénéité semble s'expliquer par la diversité des matériels d'étude utilisés. En effet certains auteurs ont travaillé sur la sécrétion bronchique totale (Boat et al., 1976), d'autres plus nombreux ont travaillé sur les phases séparées (fibrillaire et/ou soluble) du mucus (Roussel et al., 1975). Divers procédés de séparation ont ainsi été mis en oeuvre: soit ultracentrifugation directe de l'expectoration (Bhaskar et al., 1981), soit lavage du mucus avec de l'eau ou du sérum physiologique suivie d'une centrifugation à vitesse élevée (Creeth et al., 1977; Rose et al., 1979) ou à basse vitesse (Brogan, 1959; Havez et al., 1967; Ryley, 1970; Degand et al., 1973b; Roberts, 1974, 1976; Lafitte et al., 1975; Lamblin et al., 1977b; Brown et al., 1981).

Pendant des années, le mucus a été considéré comme une entité presque immuable résistant à la dispersion même en présence d'un excès de sérum physiologique. Cependant, la notion de deux phases distinctes, fibrillaire et soluble, a été remise en cause lorsque Feldhoff et al. (1979) ont observé qu'une part importante de la sécrétion trachéobronchique pouvait être solubilisée par dilution au 1/10 dans l'eau et agitation.

Il était dès lors intéressant d'entreprendre comme premier point de cette troisième partie du mémoire une étude systématique de l'influence de l'hydratation sur la solubilisation du mucus bronchique. Ce travail a permis d'évaluer les effets de la dilution et de l'agitation sur la solubilité des molécules non dialysables de l'expectoration recueillie au cours d'affections bronchopulmonaires variées, et de déterminer la teneur des com-

posants macromoléculaires solubles et non solubles dans la sécrétion bronchique native.

Le second point de cette troisième partie du mémoire propose une nouvelle méthode d'isolement des mucines bronchiques permettant une nouvelle définition de ces molécules.

Lamblin et al. (1973) ont en effet montré que le traitement du mucus fibrillaire bronchique par les agents de rupture des ponts disulfure en milieu non dissociant permet de solubiliser les mucines bronchiques. Après purification, ces molécules sont apparues en microscopie électronique sous la forme de longs filaments polypeptidiques dont la flexibilité est cependant limitée par la présence de nombreuses chaînes latérales glycaniques (Lamblin et al., 1979). Cependant la distribution des longueurs des molécules ainsi purifiées est apparue beaucoup plus grande que ne le laissait prévoir leur caractère homogène en chromatographie de gel filtration. Il a été suggéré que cette hétérogénéité pouvait être liée à l'action d'un système mucolytique de nature enzymatique (Lamblin et al., 1979). De fait, le travail exposé dans la deuxième partie du mémoire a montré qu'en milieu non dissociant les agents réducteurs possédaient la propriété d'activer un système protéolytique mucolytique.

Ayant ainsi établi que les molécules préparées par réduction du mucus bronchique ne correspondaient en réalité qu'à des fragments de mucines, et mettant à profit l'observation que la majorité des composants macromoléculaires peuvent être extraits par simple agitation mécanique d'une dilution aqueuse étendue du mucus bronchique (Feldhoff et al., 1979), une nouvelle méthode d'isolement des mucines bronchiques a été mise au point avec le souci de les préparer dans un état aussi proche que possible de leur état natif. Les mucines ainsi isolées ont été analysées sur le plan chimique ainsi qu'à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et en microscopie électronique. Grâce à cette nouvelle approche physicochimique, une nouvelle définition de la structure complexe des mucines bronchiques pourra être proposée.



**I. Influence de l'hydratation  
sur la solubilisation  
du mucus bronchique**



L'expectoration de patients atteints de diverses affections bronchiques a été recueillie. 15 patients étaient atteints de bronchite chronique (br.ch.), 6 de mucoviscidose (mucov.), 6 de bronchiectasie (br.ect), 1 d'asthme, 3 de cancer bronchiolo-alvéolaire (c.b.a.) et 1 de silicose (silic.). Tous les échantillons avaient un volume au moins égal à 20ml.

#### A/ SOLUBILISATION DES EXPECTORATIONS DANS L'EAU DISTILLÉE

##### 1) Effet de la dilution progressive de l'expectoration par l'eau

L'expectoration émise par 18 patients a été soumise à une dilution progressive par l'eau distillée selon une méthode comportant 4 étapes (Fig. 33). A chaque étape, 3 volumes d'eau sont ajoutés soit à l'expectoration soit au culot résiduel; le mélange obtenu est agité à 4°C sur agitateur magnétique tournant à 2000 rpm, puis centrifugé à 4000g pendant 30mn. Les surnageants recueillis (I,II,III et IV) ainsi que le dernier culot sont dialysés contre de l'eau distillée pendant 4 jours, lyophilisés et pesés. Les composants macromoléculaires totaux de l'expectoration apparaissent ainsi formés par les composants macromoléculaires solubilisés (ensemble des surnageants I,II,III et IV) et par les composants macromoléculaires insolubles (culot final).

Les résultats de cette étude (Fig. 34) montrent que, en moyenne, 65% des macromolécules sont solubilisés après dilution par 3 volumes d'eau, tandis que, après dilution avec 9 ou 12 volumes d'eau, plus de 90% du matériel non dialysable a été extrait dans la phase aqueuse.

##### 2) Répartition des composants macromoléculaires après dilution de l'expectoration par 12 volumes d'eau

32 expectorations différentes ont été extraites en une fois par 12 volumes d'eau, avec agitation pendant 24h à 4°C et 2000 rpm. Après centrifugation pendant 30mn à 4000g, les surnageants et culots obtenus ont été dialysés, lyophilisés et pesés.

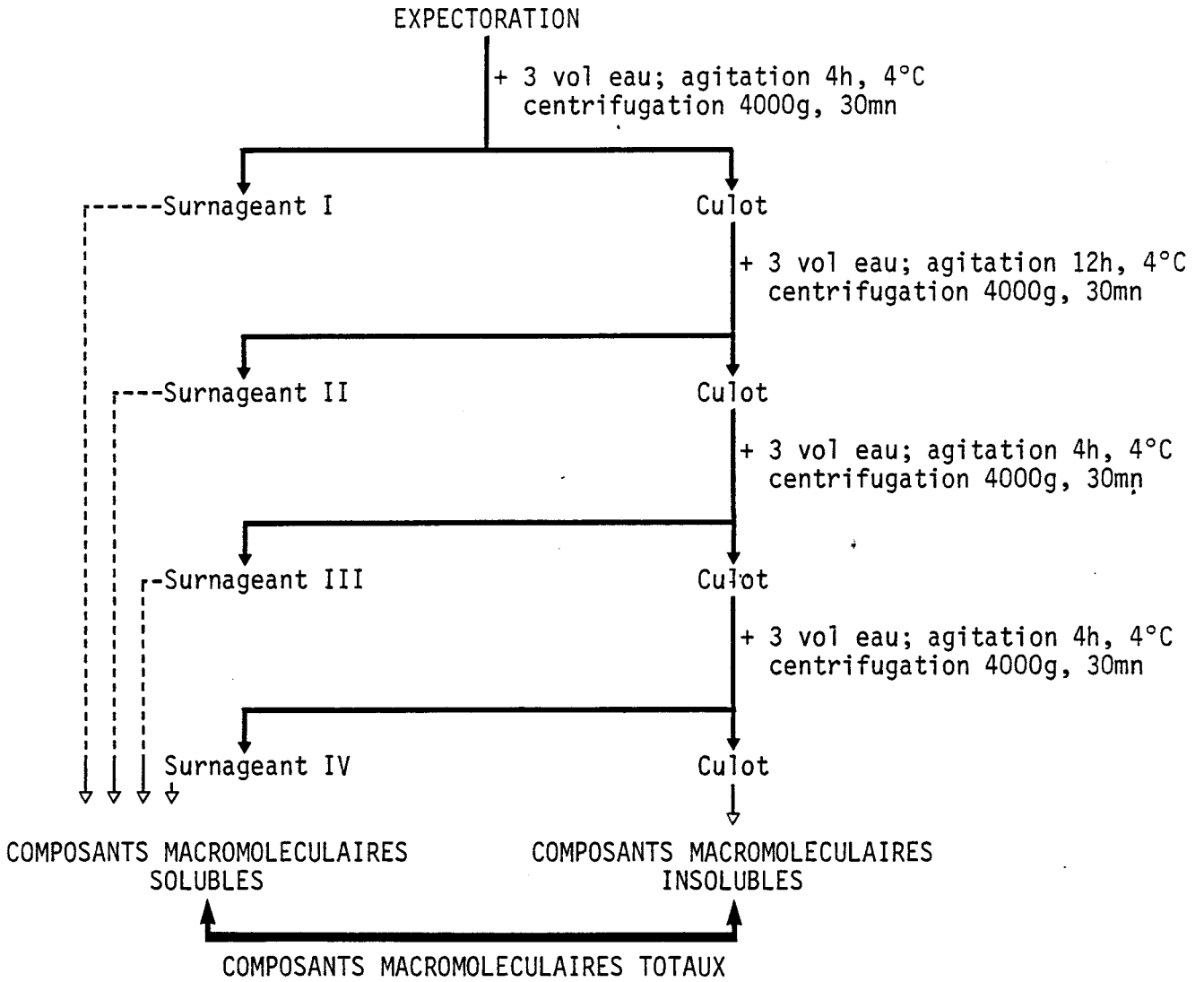


Figure 33 : Schéma de la dilution progressive des expectorations par l'eau distillée.

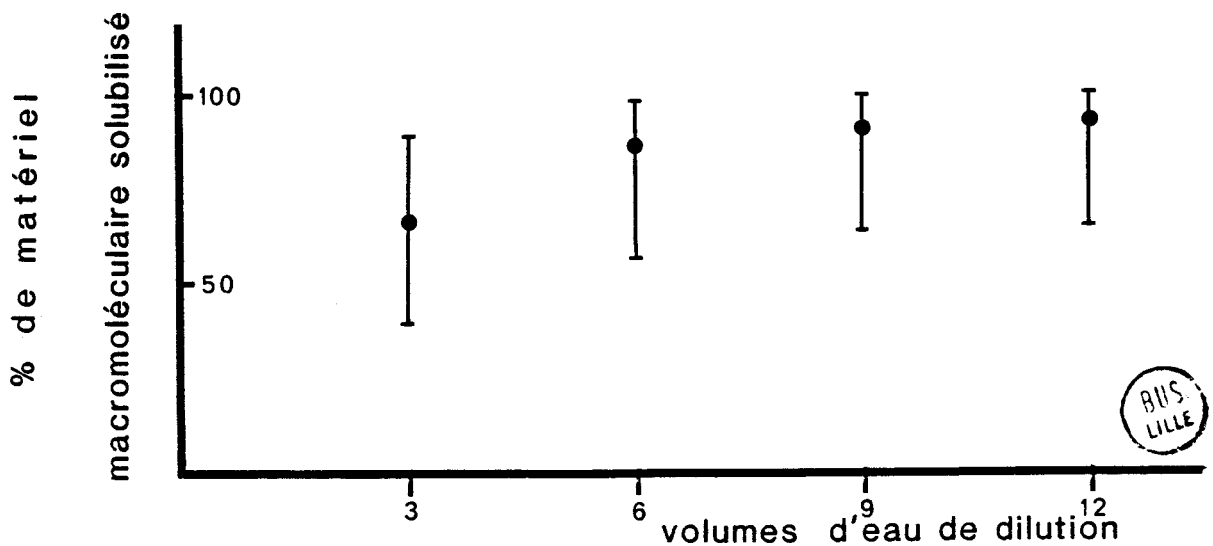


Figure 34 : Effet de la dilution progressive par l'eau sur l'extractibilité des composants macromoléculaires des expectorations. Nombre de malades examinés : 18; pourcentage moyen et étendue des valeurs.

La répartition des composants macromoléculaires solubles et insolubles est représentée dans le tableau XIV. D'une façon générale, plus de 75% des composants macromoléculaires de l'expectoration (exprimés en poids sec) sont extraits par dilution avec 12 volumes d'eau. Cependant, chez 5 sujets atteints de mucoviscidose, les résultats de la solubilisation sont plus faibles.

Les données recueillies dans les trois groupes de malades les plus nombreux (bronchite chronique, mucoviscidose et bronchiectasie) sont résumées de façon synthétique dans le tableau XV qui indique la concentration moyenne (ainsi que les valeurs extrêmes enregistrées) des composants macromoléculaires totaux, solubles et insolubles dans les expectorations de chacun de ces groupes.

La teneur en composants macromoléculaires est plus élevée chez les patients atteints de bronchite chronique (12.3mg/ml) que chez les enfants atteints de bronchiectasie (7.4mg/ml), mais elle reste cependant inférieure à celle observée dans le groupe atteint de mucoviscidose (19.2mg/ml). Dans ce dernier groupe, la proportion de composants macromoléculaires solubles est cependant plus faible (62.8%) que dans le groupe atteint de bronchite chronique (86.3%) ou de bronchiectasie (86.9%).

Les moyennes observées dans chacun des trois groupes ont été comparées deux à deux à l'aide du test t de Student, et les différences enregistrées ont été considérées comme significatives pour p inférieur à 0.05 (Tab. XVI).

### 3) Effet de l'agitation mécanique sur la solubilisation du mucus

La vitesse d'agitation en présence d'eau pouvant être un facteur important dans le phénomène de solubilisation du mucus, une expérience de dilution d'une expectoration à différentes vitesses d'agitation a été réalisée.

L'expectoration d'un malade (120ml) a été divisée en 4 fractions égales de 30ml, et chacune de ces fractions, diluée par 12 volumes d'eau, a été agitée sur agitateur magnétique tournant à vitesse différente (0, 500, 1000 et 2000 rpm) pendant 24h à 4°C. Après centrifugation, les surnageants ont été dialysés, lyophilisés et pesés.

La proportion des macromolécules solubilisées dans ces conditions

Nom	Malades		Volume (ml)	Composants macromoléculaires				
	âge	affection		totaux mg/ml	solubles		insolubles	
					mg/ml	%	mg/ml	%
BAY..	57	br.ch.	202	9.8	8.6	88.0	1.2	12.0
DEL..	26	br.ch.	70	8.4	7.8	92.4	0.6	7.6
GUI..	59	br.ch.	54	21.2	16.9	79.9	4.3	20.1
LEM..	71	br.ch.	20	12.9	12.1	94.2	0.8	5.8
MUY..	82	br.ch.	42	18.0	16.0	88.5	2.0	11.5
SAI..	49	br.ch.	54	7.3	6.2	84.8	1.1	15.2
SQU..	58	br.ch.	70	20.8	18.8	90.4	2.0	9.6
ELK..	50	br.ch.	34	11.2	9.3	83.0	1.9	17.0
GHE..	52	br.ch.	32	9.0	7.0	77.9	2.0	22.1
RAH..	51	br.ch.	100	8.9	7.3	92.8	0.6	7.2
BEN..	35	br.ch.	40	16.7	15.2	91.0	1.5	9.0
NES..	64	br.ch.	90	15.7	13.3	85.1	2.4	14.9
BEL..	63	br.ch.	170	9.7	7.7	80.1	2.0	19.9
BOU..	49	br.ch.	100	10.2	9.0	88.2	1.2	11.8
MOR..	69	br.ch.	160	4.9	3.8	78.0	1.1	22.0
DIA..	15	mucov.	30	14.7	8.6	58.8	6.1	41.2
FAI..	9	mucov.	100	11.3	7.2	63.5	4.1	36.5
MEY..	8	mucov.	175	17.4	12.3	70.9	5.1	29.1
NAS..	7	mucov.	170	26.2	15.8	60.2	10.4	39.8
ROD..	15	mucov.	190	11.8	10.3	86.8	1.5	13.2
SAR..	16	mucov.	20	33.9	12.4	36.8	21.5	63.2
AMR..	13	br.ect	230	7.7	7.1	91.9	0.6	8.1
BAB..	15	br.ect	155	5.8	5.1	87.5	0.7	12.5
DAS..	10	br.ect	180	12.7	11.1	87.5	1.6	12.5
HAM..	10	br.ect	230	4.6	4.1	88.3	0.5	11.7
KAM..	9	br.ect	200	8.1	7.3	90.8	0.8	9.2
TAI..	8	br.ect	230	5.7	4.3	75.6	1.4	24.4
NEG..	46	asthme	30	17.8	17.2	97.0	0.6	3.0
GAR..	64	c.b.a.	40	16.6	15.4	92.3	1.2	7.7
IDA..	46	c.b.a.	30	15.8	12.9	81.5	2.9	18.5
COU..	56	c.b.a.	60	12.6	10.0	79.4	2.6	20.6
MUR..	61	silic.	50	12.6	12.1	95.9	0.5	4.1

Tableau XIV : Concentration et distribution des composants macromoléculaires dans l'expectoration recueillie chez 32 malades atteints de diverses affections bronchiques, et diluée par addition de 12 volumes d'eau. (br.ch.= bronchite chronique, mucov.= mucoviscidose; br.ect= bronchiectasie; c.b.a.= cancer bronchoalvéolaire, silic.= silicose).

Malades nombre affection	Composants macromoléculaires				
	totaux mg/ml	solubles		insolubles	
		mg/ml	%	mg/ml	%
15 bronchite chronique	12.3 (4.9 - 21.2)	10.7 (3.8 - 18.8)	86.3 (77.9 - 94.2)	1.6 (0.6 - 4.3)	13.7 (5.8 - 22.1)
6 mucoviscidose	19.2 (11.3 - 33.9)	11.1 (7.2 - 15.8)	62.8 (36.8 - 86.8)	8.1 (1.5 - 21.5)	37.2 (13.2 - 63.2)
6 bronchiectasie	7.4 (4.6 - 12.7)	6.5 (4.1 - 11.1)	86.9 (75.6 - 91.9)	0.9 (0.5 - 1.6)	13.1 (8.1 - 24.4)

Tableau XV : Concentration moyenne et distribution moyenne des composants macromoléculaires dans les expectorations de bronchite chronique, de mucoviscidose et de bronchiectasie, diluées par addition de 12 volumes d'eau.

Groupes testés	Composants macromoléculaires				
	totaux mg/ml	solubles		insolubles	
		mg/ml	%	mg/ml	%
br.ch./mucov.	p < 0.05	NS	p < 0.001	p < 0.005	p < 0.001
br.ch./br.ect	p < 0.05	NS	NS	NS	NS
mucov./br.ect	p < 0.02	p < 0.02	p < 0.01	p < 0.05	p < 0.01

Tableau XVI : Comparaison, par le test t de Student, de la concentration moyenne et de la distribution moyenne des composants macromoléculaires dans les expectorations de bronchite chronique (br.ch.), de mucoviscidose (mucov.) et de bronchiectasie (br.ect) diluées par addition de 12 volumes d'eau. Le seuil de signification des différences a été fixé à 0.05. NS= non significatif.



a été de 36.3% dans l'échantillon non agité, et de 92.3%, 91.8% et 95.6% dans les échantillons agités respectivement à 500, 1000 et 2000 rpm.

#### 4) Rôle éventuel de la protéolyse dans la solubilisation du mucus

Un effet de protéolyse ne pouvant être a priori écarté dans le mécanisme de solubilisation du mucus, une autre série d'expériences a été réalisée en présence ou en l'absence de PMSF (Phényl-méthyl-sulfonyl fluorure), inhibiteur de protéases.

7 expectorations provenant de malades différents ont ainsi été divisées chacune en deux fractions égales; l'une des 2 fractions est additionnée de 12 volumes d'eau contenant du PMSF 0.05mM; l'autre fraction est additionnée de 12 volumes d'eau seulement.

Le protocole d'extraction appliqué aux 14 fractions ainsi préparées a été le même et est schématisé à la figure 35. Ce protocole comporte une première extraction aqueuse avec agitation 24h à 4°C. La centrifugation sépare le surnageant du culot. Une partie des composants contenus dans le culot pouvant correspondre à des globulines ayant précipité dans un milieu fortement hypotonique, le culot No 1 a été soumis à une deuxième extraction en présence de 3 volumes de sérum physiologique, avec agitation 24h à 4°C. La centrifugation permet à nouveau de séparer un nouveau surnageant et un deuxième culot. Des macromolécules du type des mucines étant encore susceptibles d'avoir été complexées par du calcium et demeurant donc insolubles, le culot No 2 est à nouveau extrait par 3 volumes d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 0.005mM, avec agitation 24h à 4°C. Une dernière centrifugation sépare le troisième surnageant et le culot final No 3. Les trois surnageants et le culot No 3 sont dialysés, lyophilisés et pesés.

Les résultats de cette étude apparaissent dans le tableau XVII. Etant donné la difficulté que l'on rencontre pour diviser une expectoration en deux fractions parfaitement identiques, les résultats obtenus en présence de PMSF ne sont pas significativement différents de ceux obtenus en son absence, et en conséquence, il n'y a aucune indication que des sérine-protéases aient pu agir dans le phénomène de solubilisation du mucus agité en présence de 12 volumes d'eau. Après extraction du culot No 1 par le sérum physiologique et du culot No 2 par l'EDTA, de petites quantités de matériel macromoléculaire apparaissent dans les surnageants correspondants; mais il

## EXPECTORATION

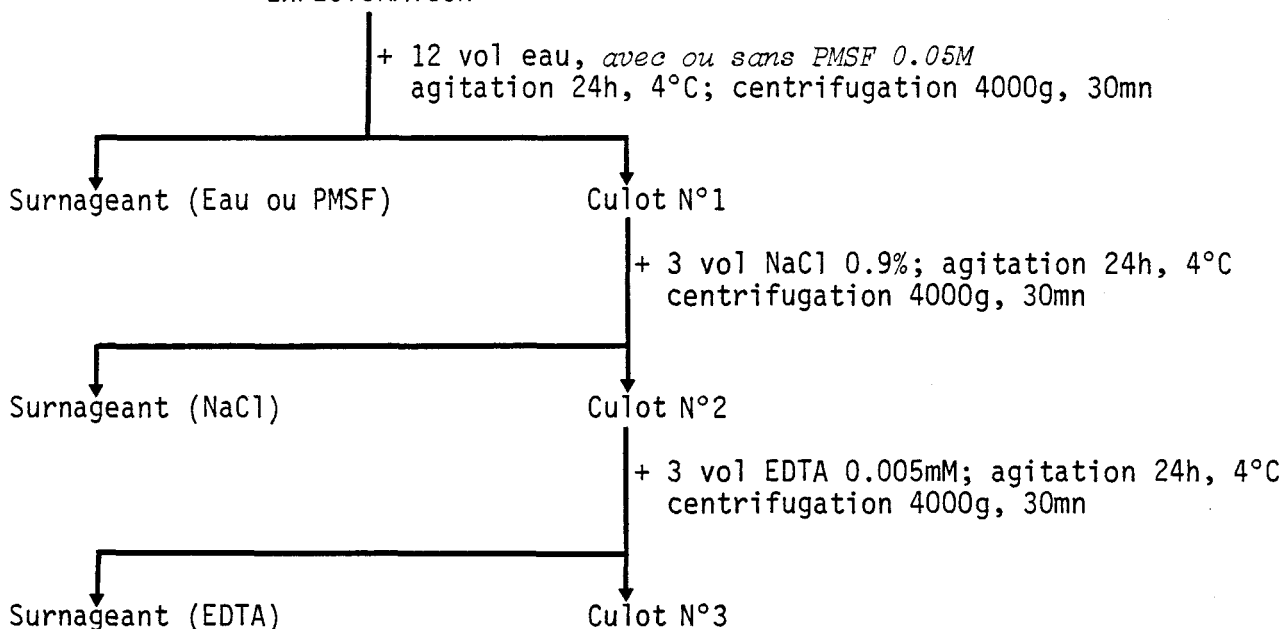


Figure 35: Protocole de solubilisation du mucus bronchique en présence ou en l'absence de PMSF. 7 expectorations différentes ont été traitées par addition de 12 volumes d'eau, avec ou sans PMSF 0.05mM; le culot obtenu par centrifugation a été extrait successivement par 3 volumes de NaCl 0.9%, puis par 3 volumes d'EDTA 0.005mM. Surnageants et culot final ont été dialysés, lyophilisés et pesés.

Malades	Extraction sans PMSF				Extraction avec PMSF			
	Eau	NaCl	EDTA	Dernier culot	PMSF	NaCl	EDTA	Dernier culot
BAY..	83.3	1.1	traces	15.5	86.1	3.6	3.0	7.3
GHE..	77.0	7.8	3.9	11.3	72.0	7.4	4.0	16.6
RAH..	90.2	2.1	0.6	7.1	86.9	2.3	1.7	9.1
COU..	85.4	3.4	0.5	10.7	88.0	2.9	0.7	8.4
BIL..	84.7	1.6	0.3	13.4	87.5	1.9	0.9	9.7
BOU..	88.3	5.1	0.2	6.4	95.2	3.7	traces	1.0
BEL..	81.7	1.8	0.4	16.1	78.9	1.4	0.7	19.0

Tableau XVII: Comparaison de la distribution des composants macromoléculaires dans 7 expectorations extraites successivement par 12 volumes d'eau (avec ou sans PMSF 0.05mM), 3 volumes de NaCl 0.9% et 3 volumes d'EDTA 0.005mM. Le protocole détaillé est indiqué à la Fig. 35. Les résultats sont exprimés en pourcentage des composants macromoléculaires totaux dans chaque expectoration.

est difficile de dire s'il s'agit là d'une action propre du sérum physiologique et de l'EDTA, ou s'il ne s'agit pas tout simplement de la continuation de l'extraction par l'eau.

## B/ DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail indiquent qu'une très large part des composants macromoléculaires du mucus bronchique peut être solubilisée par dilution dans 12 volumes d'eau distillée, confirmant ainsi l'observation initiale faite par Feldhoff et al. (1979). En montrant que la proportion de macromolécules solubilisées dépend du degré de dilution apportée, cette étude laisse en outre entrevoir qu'à la limite, à dilution infinie, tout le mucus peut être solubilisé. En conséquence, il convient de reconsidérer la notion ancienne de mucus fibrillaire immuable, et de lui substituer la notion de phase géliforme et de phase soluble en équilibre l'une avec l'autre en fonction du degré d'hydratation du mucus.

De nombreux travaux ont été consacrés par le passé à la phase fibrillaire, géliforme, du mucus bronchique humain (Havez et al., 1967; Roberts, 1974, 1976; Rose et al., 1979; Bhaskar et al., 1981). Au cours de ces travaux, la phase fibrillaire, considérée comme une entité bien définie, a été lavée selon des méthodes variées, en utilisant soit de l'eau soit du sérum physiologique. Il est donc probable que les différents auteurs cités n'ont pas tous travaillé sur la même fraction du mucus bronchique, et qu'en conséquence, il convient de garder une certaine prudence dans l'interprétation de certains résultats discordants acquis dans ces conditions.

Les résultats de Feldhoff et nos propres observations posent le problème du mécanisme de solubilisation du mucus dans l'eau. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées à cet égard:

- l'expectoration humaine, en particulier quand elle est surinfectée, peut être riche en protéases (Twumasi et al., 1977). Dans ces conditions, il n'est pas interdit d'envisager que, même à 4°C, une certaine activité protéolytique puisse se manifester dans le mucus, augmentant ainsi la solubilité de ce dernier. Cependant, le fait que la solubilisation intervienne encore en présence de PMSF, ne plaide pas pour cette hypothèse, sauf à considérer l'intervention d'autres familles de protéases, thiol-protéases



ou métallo-protéases par exemple.

- le rôle de l'agitation mécanique ne doit pas être sous-estimé: il a en effet été montré que des filaments d'ADN pouvaient être cassés par agitation, la cassure se produisant statistiquement au milieu de la molécule (Levinthal et al., 1961). Au cours de l'agitation du mucus, un phénomène similaire de rupture pourrait aussi intéresser les longues molécules de mucines bronchiques, facilitant ainsi la solubilisation du mucus.

- il est possible que le mécanisme en jeu soit en fait multiple : d'une part un effet propre de dissolution par l'eau, et d'autre part un effet mécanique de rupture moléculaire.

Quand on examine les résultats des différentes expectorations analysées, il apparaît qu'en moyenne l'expectoration des sujets atteints de bronchiectasie est significativement plus pauvre en composants macromoléculaires totaux que celle des sujets atteints de bronchite chronique ou de mucoviscidose (Tab. XV et XVI). Cette observation est en accord avec celle de Potter et al. (1967) qui ont montré que chez des malades atteints de mucoviscidose, la teneur en eau des sécrétions bronchiques est plus faible que chez des patients atteints de bronchiectasie ou laryngectomisés. Nos résultats montrent en outre que si, du point de vue teneur en eau, les expectorations de mucoviscidose et de bronchite chronique sont comparables, par contre, en moyenne, les composants macromoléculaires sont beaucoup moins solubles au cours de la mucoviscidose qu'au cours de la bronchite chronique.

Il apparaît des variations non négligeables lorsque l'on compare la concentration des composants macromoléculaires solubles et totaux de l'expectoration des différents patients d'un même groupe pathologique (Tab. XIV).

- Comme il ne semble pas que ces modifications de concentrations macromoléculaires soient liées à un phénomène de protéolyse, on peut se demander si elles ne sont pas le reflet de mouvements d'eau entre la lumière et la muqueuse bronchiques: de l'eau peut être perdue par évaporation dans l'air inspiré mais aussi par absorption par la muqueuse sous-jacente.

- Knowles et al. (1981) ont suggéré que l'absorption excessive de sels et peut être d'eau par les muqueuses respiratoires pouvait

contribuer à la pathogénie des désordres pulmonaires dans la mucoviscidose. Le volume et la composition des sécrétions bronchopulmonaires semblent régulés, en partie du moins, par un mécanisme de transport actif du sodium et du chlore (Olver et al., 1975; Al-Bazzaz et al., 1979; Davis et al., 1980; Nadel, 1980; Widdicombe et al., 1980). Si la liaison entre la sécrétion d'eau et le transport des ions est probable, il a aussi été suggéré que la sécrétion du mucus était contrôlée indépendamment de la sécrétion de l'eau (Nadel et al., 1979).

- Les variations d'un jour à l'autre du volume expectoré et de la concentration en composants macromoléculaires solubles peuvent également s'expliquer par une contamination d'origine salivaire ou encore par la déglutition d'une fraction de la sécrétion bronchique. Le fait de n'avoir examiné que des expectorations de plus de 20ml permet cependant de minimiser l'influence de la salive sur les résultats.

Le point important qui se dégage de ce travail est que la solubilité des composants du mucus bronchique dépend du degré d'hydratation de ce milieu, et que par dilution il est possible de solubiliser la quasi-totalité de ces composants. A la notion ancienne de phase fibrillaire immuable baignant dans une phase soluble devrait donc se substituer la notion nouvelle de deux phases, fibrillaire et soluble, réalisant entre elles une sorte d'équilibre en fonction du degré d'hydratation du mucus. Le mécanisme par lequel la dilution du mucus permet de solubiliser la phase fibrillaire reste cependant imprécis et, pour l'expliquer, on peut, outre l'effet solvant propre de l'eau, également envisager le rôle éventuel de l'agitation mécanique et celui de la protéolyse.



**II. Isolement des mucines bronchiques  
en l'absence des agents réducteurs**

**Etude de leurs propriétés physico-chimiques**

**Approche de leur configuration**

**en microscopie électronique**

Au cours de cette étude, deux expectorations différentes ont été examinées: celle d'un malade (G...), atteint de bronchite chronique, et celle d'un enfant (B...), atteint de mucoviscidose.

Le schéma général de purification des mucines à partir de ces expectorations est représenté à la figure 36. Le schéma montre qu'après dilution du mucus par l'eau (1:12, v/v) et centrifugation, le surnageant recueilli a été soit lyophilisé soit concentré par filtration sur une membrane poreuse. La raison principale qui a poussé à adopter pour les échantillons deux méthodes différentes de concentration tient au fait qu'en cours d'étude, les images que donnaient certaines fractions lyophilisées au microscope électronique faisaient craindre que la lyophilisation ne soit responsable de la création d'artéfacts. La filtration sur membrane poreuse, qui permettait d'éviter de lyophiliser, a donc été, chaque fois que possible, retenue comme méthode de concentration, en particulier lorsqu'un examen de microscopie électronique devait être effectué.

## A/ PURIFICATION ET ANALYSE CHIMIQUE DES MUCINES

### 1) Purification et analyse chimique des surnageants lyophilisés

a) 200ml de chaque expectoration ont été extraits par dilution au 1:12, v/v, dans l'eau et agitation pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation et lyophilisation, les surnageants et les culots ont été pesés:

- à partir du mucus de bronchite chronique, le matériel recueilli représentait 4545mg dans le surnageant G1 (dont 60% dialysables) et 390mg dans le culot.

- à partir du mucus de mucoviscidose, le surnageant B1 représentait 7235mg de matériel (dont 52% dialysables) et le culot 1785mg.

b) Les surnageants G1 et B1 ont été fractionnés par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose CL-2B en guanidine/HCl 6M, donnant les diagrammes représentés respectivement dans les figures 37 et 38.

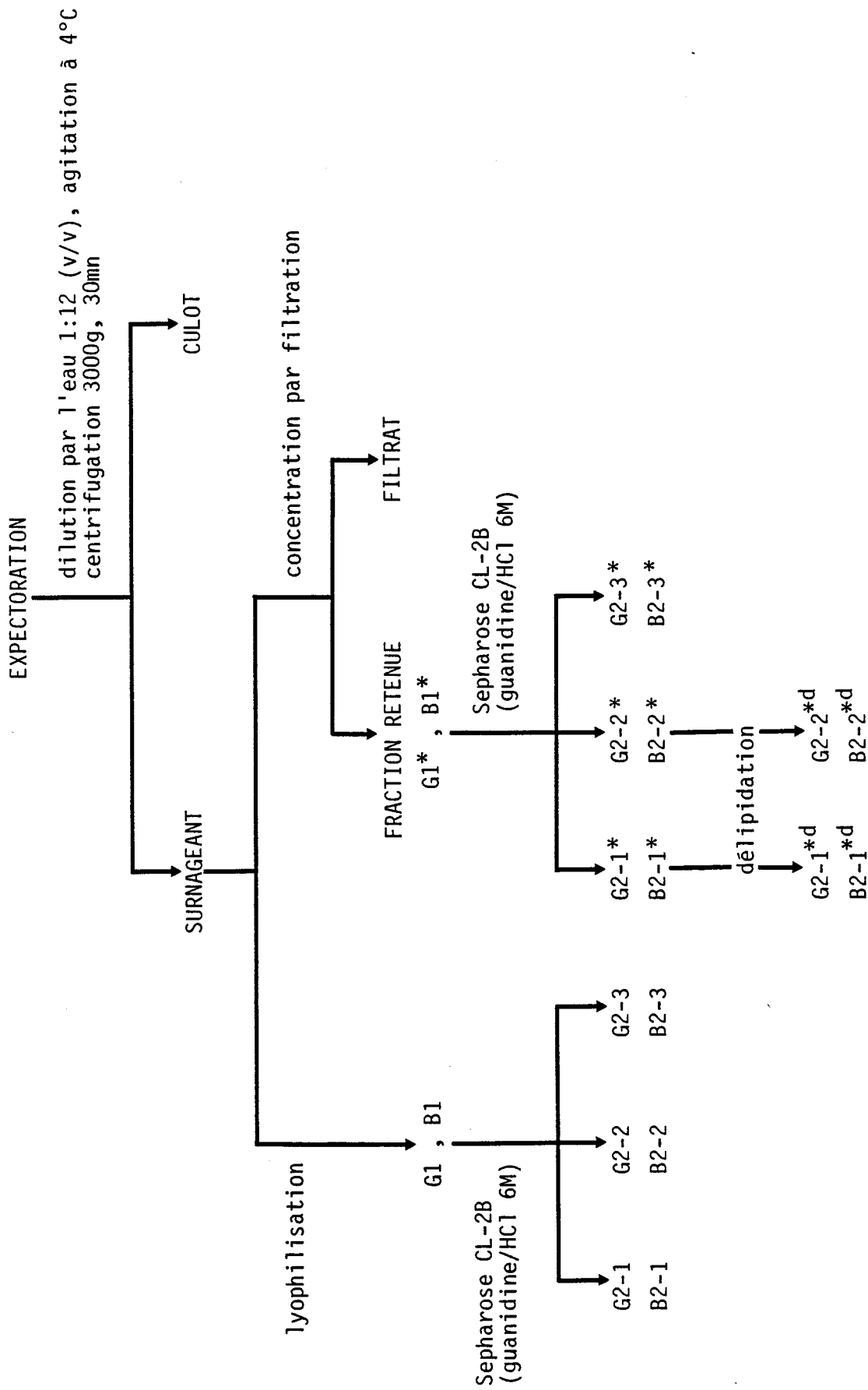


Figure 36: Schéma de fractionnement des composants du mucus bronchique dilué 1:12 (v/v) par l'eau distillée. Deux expectorations ont été étudiées : G... (bronchite chronique) et B... (mucoviscidose).



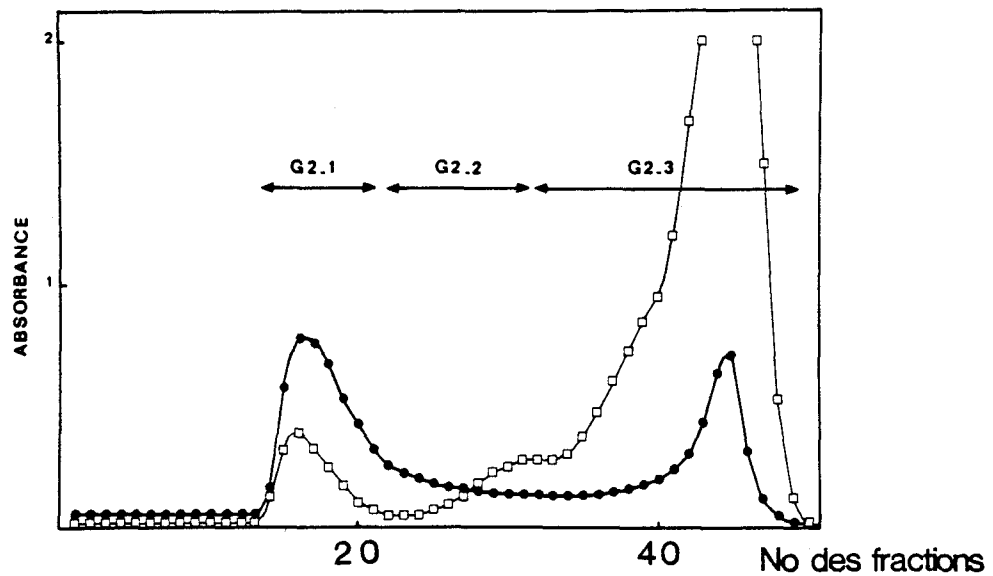


Figure 37: Chromatographie de gel filtration du surnageant G1 (mucus de bronchite chronique dilué au 1/12è dans l'eau, centrifugé et lyophilisé sans dialyse). Colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée par la guanidine/HCl 6M. Profil d'éluion: ●-● = hexoses; □-□ = A 278nm. Echantillon déposé: 150mg dans 10ml de guanidine/HCl 6M; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: G2-1 = 20.3mg; G2-2 = 11.8mg; G2-3 = 17.4mg.

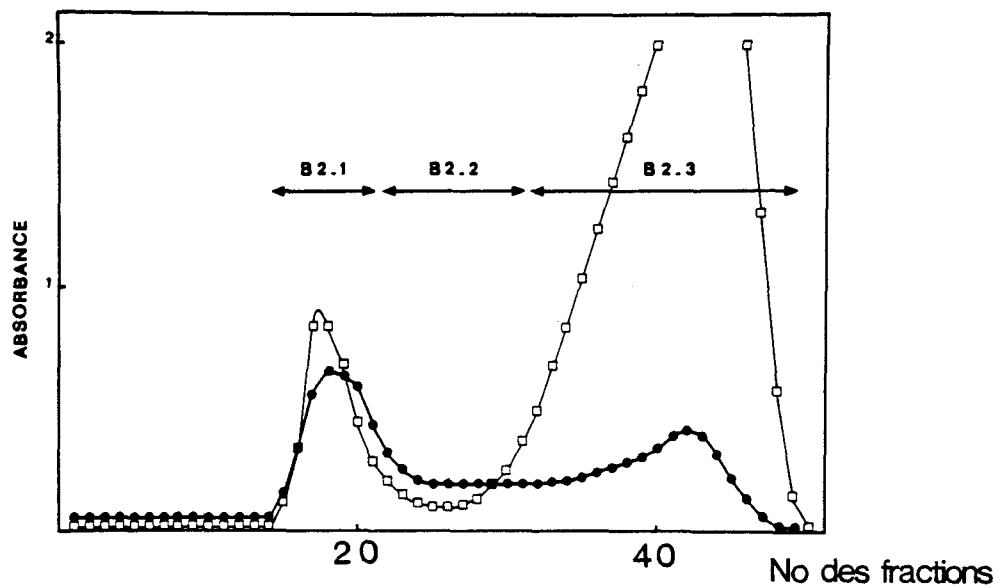


Figure 38: Chromatographie de gel filtration du surnageant B1 (mucus de mucoviscidose dilué au 1/12è dans l'eau, centrifugé et lyophilisé sans dialyse). Colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée par la guanidine/HCl 6M. Profil d'éluion: ●-● = hexoses; □-□ = A 278nm. Echantillon déposé: 150mg dans 10ml de guanidine/HCl 6M; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: B2-1 = 21.8mg; B2-2 = 6.5mg; B2-3 = 32.6mg.

Dans les deux cas, trois fractions glycoprotéiques ont été recueillies (G2-1, G2-2 et G2-3 d'une part, B2-1, B2-2 et B2-3 d'autre part) qui ont été dialysées et lyophilisées.

c) Les résultats de l'analyse chimique de chacune de ces fractions apparaissent dans le tableau XVIII.

- les fractions G2-1 et B2-1, exclues de la colonne de Sepharose CL-2B, ont une teneur et une composition glucidique typique de celles des mucines. Ces fractions contiennent aussi beaucoup de lipides: près de 25% de leur poids dans le cas de G2-1 (bronchite chronique) et 40% dans le cas de B2-1 (mucoviscidose). L'analyse lipidique détaillée de ces fractions (Tab. XIX) révèle une teneur élevée en phospholipides; les glycolipides, les glycérides et les acides gras apparaissent également en quantités non négligeables.

- Les fractions retardées G2-2 et B2-2 ont une composition chimique également typique de celles des mucines; elles sont beaucoup moins riches en lipides que les fractions exclues G2-1 et B2-1.

- Les fractions les plus retardées en gel filtration, G2-3 et B2-3, dont l'absorbance à 278nm apparaît très élevée (Fig. 37 et 38), possèdent une forte teneur en acides aminés; la proportion en acide aspartique et en acide glutamique est plus importante que celle de la sérine et de la thréonine; ces fractions sont par ailleurs peu glycosylées, tous caractères qui permettent de les distinguer des mucines éluées plus tôt du gel de Sepharose.

d) Les différentes fractions séparées par gel filtration ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les résultats sont présentés à la figure 39 (surnageant G1 et fractions dérivées) et à la figure 40 (surnageant B1 et fractions dérivées).

- Dans les fractions exclues G2-1 et B2-1, la plus grande partie du matériel glycoprotéique, intensément coloré par le réactif de Schiff après oxydation periodique, demeure dans le gel de concentration. Une faible partie des composants, colorée par le bleu Coomassie, pénètre dans le gel sous forme d'une traînée au sein de laquelle apparaissent quelques bandes. Un composant de bas poids moléculaire, coloré par le PAS ainsi que par le noir Soudan correspond probablement à des glycolipides.

- Les fractions retenues G2-2 et B2-2 donnent des aspects similaires à ceux des fractions correspondantes G2-1 et B2-1. Cepen-



FRACTIONS	Bronchite chronique			Mucoviscidose		
	G2-1	G2-2	G2-3	B2-1	B2-2	B2-3
ACIDES AMINES mol/100mol						
ac. cystéique	0.9	2.1	0.2	0	0.3	2.2
Asp	8.4	8.9	13.1	10.1	8.4	12.6
Thr	16.4	14.1	6.1	11.6	16.5	6.3
Ser	10.7	10.5	6.5	10.1	10.4	7.0
Glu	8.4	8.8	13.0	8.9	8.1	12.9
Pro	9.0	9.0	7.0	7.3	8.1	6.8
Gly	8.8	8.2	8.6	8.9	9.8	8.6
Ala	8.1	7.6	6.9	8.0	7.8	7.2
Val	5.2	5.7	4.8	5.5	5.5	4.7
½ Cys	1.6	0.6	3.1	2.0	1.6	1.3
Met	traces	0.2	0.4	0.4	0.7	0.7
Ile	3.0	2.6	3.5	3.5	2.9	3.8
Leu	6.0	7.1	8.0	7.4	6.3	8.0
Tyr	1.8	1.8	3.2	2.5	1.9	2.4
Phe	2.6	2.7	3.7	3.5	2.9	3.8
Lys	3.9	1.8	5.6	4.7	3.5	6.0
His	1.7	4.4	2.0	1.7	1.9	2.3
Arg	3.6	3.7	4.3	3.6	3.4	4.0
Acides aminés totaux μmol/g g/100g	1 811 18.8	2 727 28.8	5 498 60.1	1 631 17.2	1 785 18.4	5 184 56.9
SUCRES g/100g poids sec						
Fuc	4.3	3.1	1.8	2.3	4.1	1.4
Man	0.4	0.7	1.3	0.4	0.7	1.8
Gal	14.7	14.8	5.0	8.6	13.8	5.2
Glc	1.7	0.4	0.4	1.8	1.0	0.4
GalNAc	7.5	8.2	3.6	4.0	7.4	3.4
GlcNAc	14.4	15.4	7.7	10.1	14.8	6.0
NANA	6.5	7.9	1.3	3.9	6.0	3.8
Sucres totaux g/100g	49.5	50.5	21.1	31.4	47.8	22.0
SULFATE g/100g	1.2	1.5	3.0	2.0	0.9	0
LIPIDES TOTAUX g/100g	24.8	6.2	1.7	40.0	9.4	2.0

BUS  
LILLE

Tableau XVIII : Composition chimique des différentes fractions séparées par chromatographie de gel filtration des surnageants lyophilisés G1 et B1.

FRACTIONS	G2-1	B2-1
Acides gras	20.2	15.1
Glycérides	7.5	5.8
Cholestérol + stérides	12.9	17.1
Phospholipides	26.8	37.3
Glycolipides	16.9	20.9

Tableau XIX : Composition lipidique des fractions exclues de la colonne de Sepharose CL-2B: G2-1 (bronchite chronique) et B2-1 (mucoviscidose). La composition est exprimée en pourcentages pondéraux de la quantité de lipides extraits.

FRACTIONS	G2-1* <sup>d</sup>	G2-2* <sup>d</sup>	B2-1* <sup>d</sup>	B2-2* <sup>d</sup>
ACIDES AMINES mol/100mol				
Asp	7.3	6.0	9.1	7.1
Thr	17.8	22.0	14.4	19.3
Ser	11.0	13.3	10.6	12.0
Glu	7.6	6.4	8.3	6.7
Acides aminés totaux g/100g	21.3	19.0	20.1	17.0
SUCRES g/100g				
Fuc	6.7	6.7	9.3	7.9
Man	0.7	0.4	0.7	0
Gal	19.3	19.4	22.4	20.4
Glc	1.3	0.8	1.0	0.6
GalNAc	9.7	11.7	9.1	9.2
GlcNAc	20.2	19.4	20.0	15.8
NANA	12.1	13.8	7.5	12.0
Sucres totaux g/100g	70.0	72.2	70.0	66.0
Acides aminés + sucres g/100g	91.3	91.2	90.1	83.0

Tableau XX : Composition chimique des fractions obtenues par délipidation du mucus bronchique.

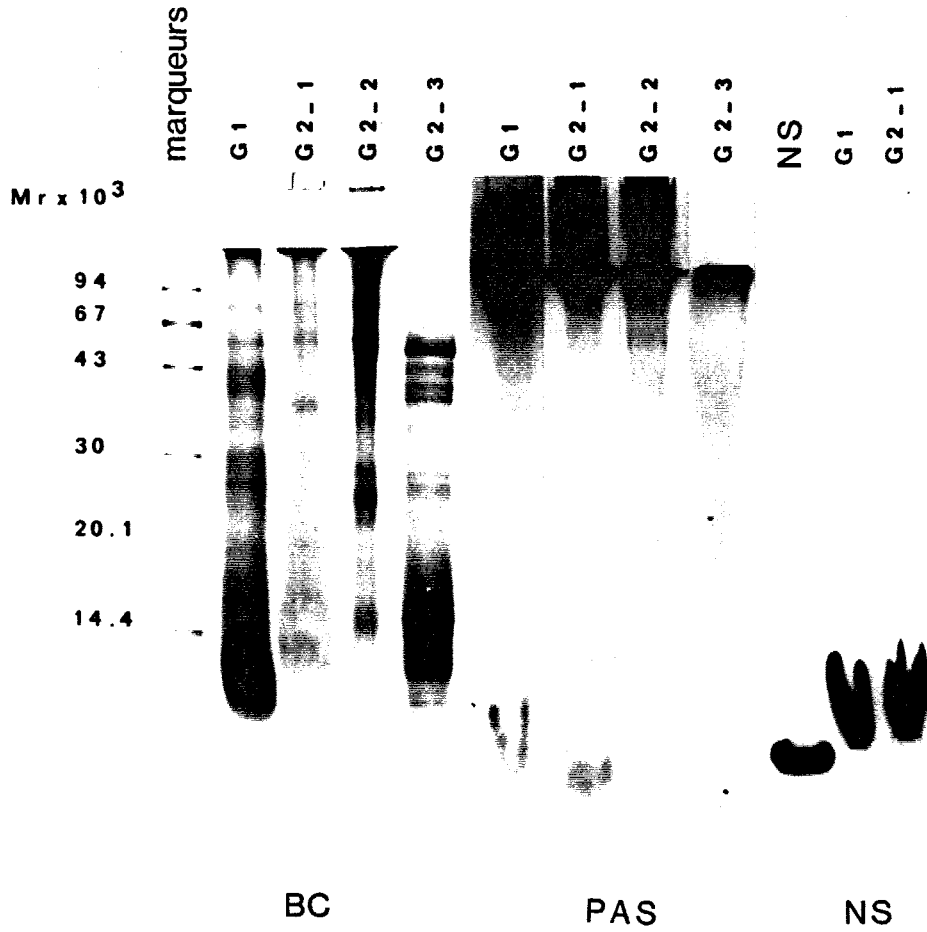


Figure 39: Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS du surnageant G1 de l'expectoration d'un malade atteint de bronchite chronique, ainsi que des fractions G2-1, G2-2 et G2-3. Les gels ont été colorés soit par le bleu Coomassie (BC), soit par le réactif de Schiff (PAS). En outre, dans le gel situé le plus à droite, les fractions ont été précolorées par le noir Soudan (NS). Aucune utilisation de mercaptoéthanol n'a été faite au cours de ces expériences.

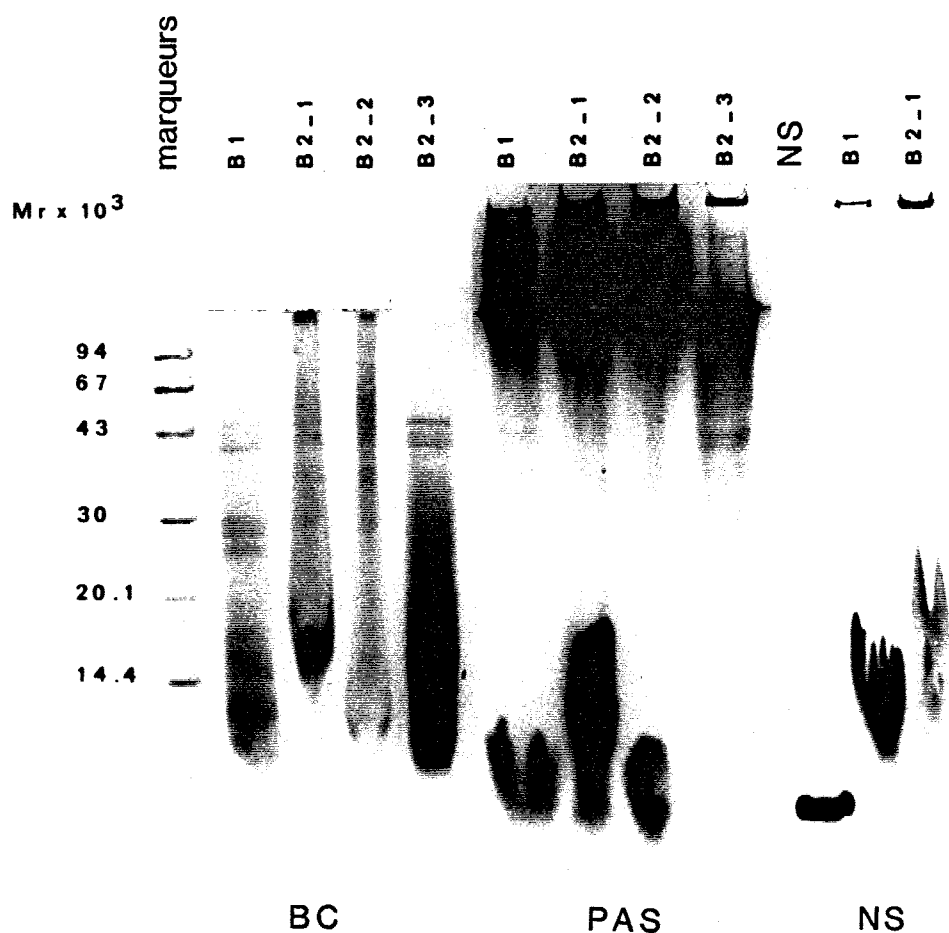


Figure 40 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS du surnageant B1 de l'expectoration d'un enfant atteint de mucoviscidose, ainsi que des fractions B2-1, B2-2 et B2-3. Les gels ont été colorés soit par le bleu Coomassie (BC), soit par le réactif de Schiff (PAS). En outre, dans le gel situé le plus à droite, les fractions ont été précolorées par le noir Soudan (NS). Aucune utilisation de mercaptoéthanol n'a été faite au cours de ces expériences.

dant, la teneur en glycolipides y est plus faible, et en outre, quelques protéines d'un poids moléculaire inférieur à 100 000 apparaissent dans la fraction G2-2.

e) La figure 41 montre le résultat de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide des différentes fractions préalablement réduites par chauffage à 100°C pendant 3mn en présence de 2-mercaptoéthanol. Le profil protéique des fractions G2-1, B2-1 et B2-2 reste inchangé par ce traitement, tandis que dans les fractions G2-2, G2-3 et B2-3 des protéines de plus faible poids moléculaire apparaissent après réduction.

f) Les fractions G2-2 et G2-3 d'une part, B2-2 et B2-3 d'autre part ont par ailleurs été incubées en présence de nucléases puis analysées par électrophorèse en agarose. La figure 42 montre dans les fractions B2-2 et B2-3 la présence d'une bande rapide colorée par le bleu de toluidine; leur disparition après action des nucléases permet de les identifier comme étant des acides nucléiques. On peut en outre remarquer dans la fraction B2-3, la persistance, malgré l'action des nucléases, d'une bande légèrement moins rapide que les acides nucléiques et à caractère métachromatique après coloration au bleu de toluidine. L'acidité de cette bande, jointe à sa métachromasie et à sa résistance aux nucléases permet de soupçonner l'existence de mucopolysaccharides acides dans cette fraction.

## 2) Purification des surnageants non lyophilisés

Dans une autre série d'expériences, le surnageant d'extraction aqueuse (12 volumes) de chaque expectoration (G: bronchite chronique, B: mucoviscidose) a été, comme cela apparaît à la figure 36, concentré par filtration sur membrane poreuse (diamètre des pores: 0.20 $\mu$ m). Pour chaque surnageant, la fraction retenue et le filtrat ont été recueillis.

a) Les fractions retenues sur le filtre (G1\* ou B1\*) ont été, après dialyse contre de la guanidine/HCl 6M, analysées par chromatographie sur colonne de Sepharose CL-2B. Les profils d'élution de ces fractions G1\* et B1\* ne sont pas présentés ici: ils sont identiques à ceux des surnageants lyophilisés (G1: Fig. 37, B1: Fig. 38).

b) Les filtrats ont été lyophilisés puis chromatographiés sur colonne de Sepharose CL-2B en guanidine/HCl 6M. Les profils obtenus (non présentés) indiquent la présence presque exclusive de composants de faible mas-

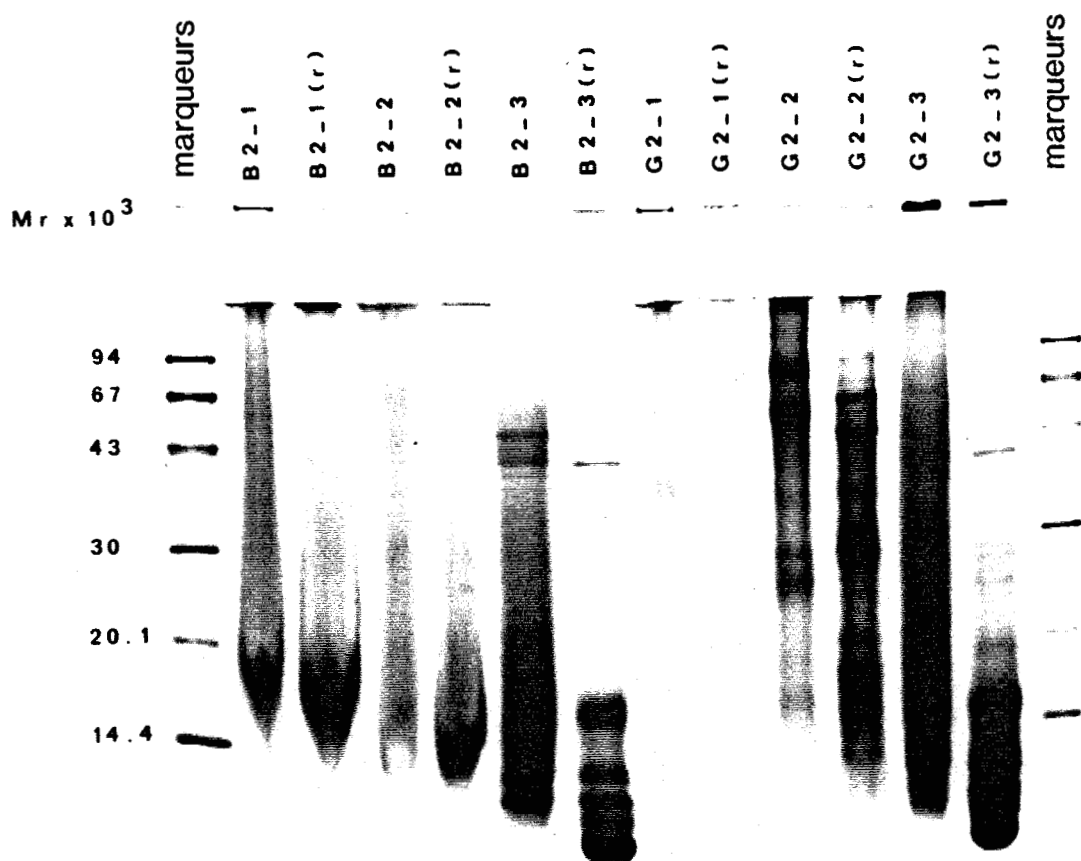


Figure 41 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des différentes fractions séparées à partir des surnageants B1 (mucoviscidose) et G1 (bronchite chronique) par chromatographie sur Sepharose CL-2B. Avant dépôt, les fractions ont été chauffées à 100°C pendant 3mn en l'absence ou en présence (r) de 2-mercaptoethanol. Les gels ont été ensuite colorés par le bleu Coomassie.

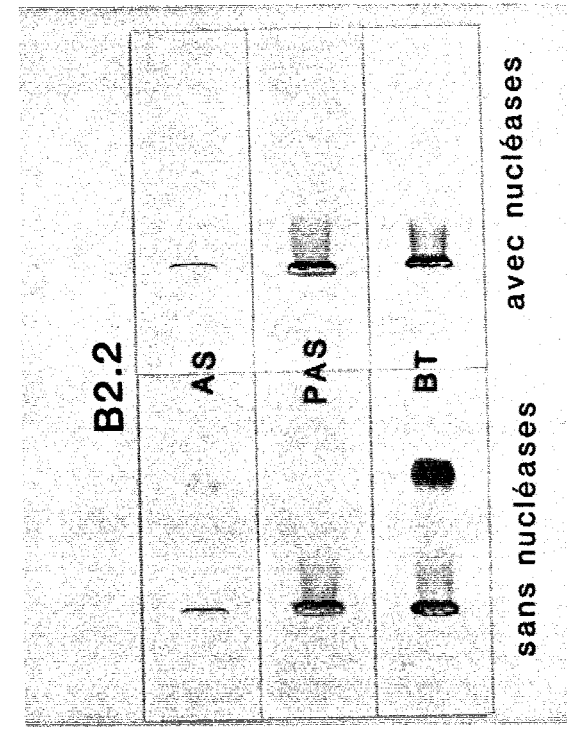
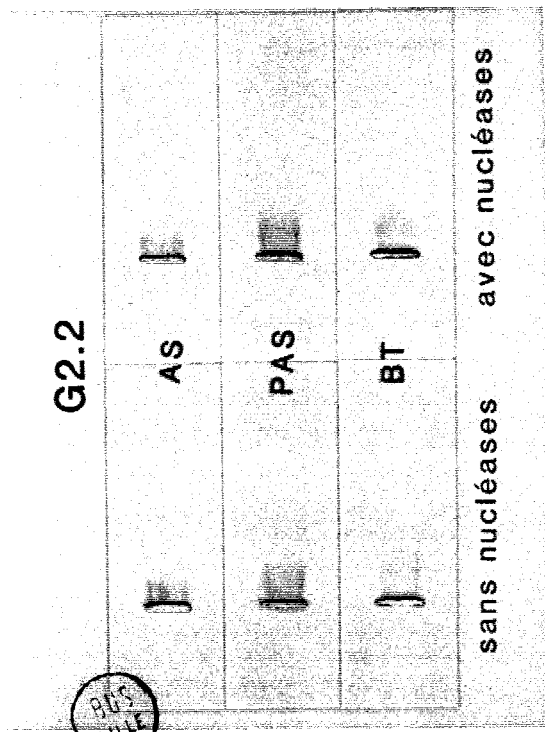
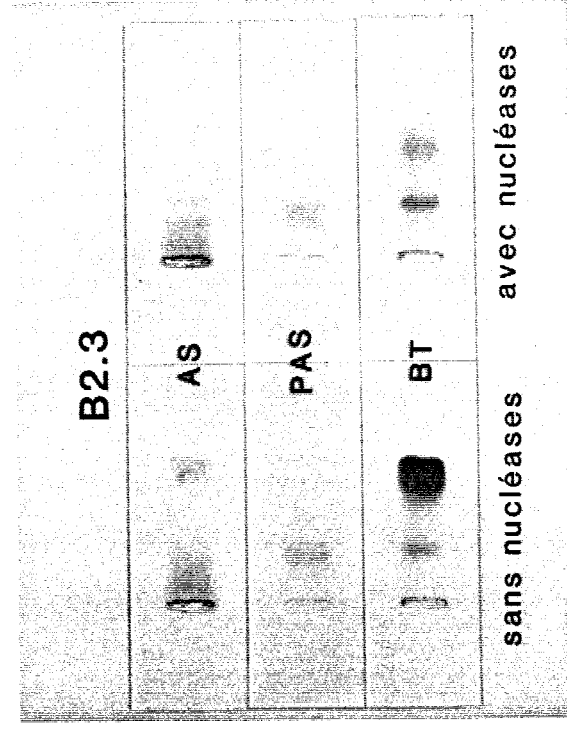
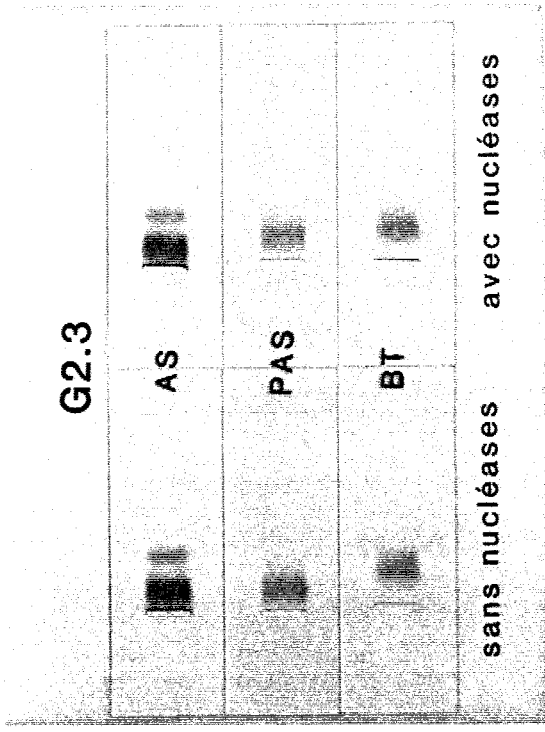


Figure 42 : Electrophorèse en gel d'agarose des fractions G2-2, G2-3, B2-2 et B2-3, incubées en l'absence ou en présence de nucléases. Après migration, les lames ont été colorées par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

se moléculaire, fortement retenus par le gel de Sepharose; les composants de masse moléculaire élevée (similaires à ceux des fractions G2-1 et G2-2) n'existent qu'à l'état de traces.

## B/ MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (\*)

De façon à pouvoir visualiser non seulement des molécules isolées mais aussi d'éventuels agrégats moléculaires susceptibles de ne pas être décelés dans les préparations standards, les différents échantillons ont été préparés selon plusieurs méthodes: méthode de réplique macromoléculaire, méthode d'étalement au cytochrome C et méthode de contraste négatif.

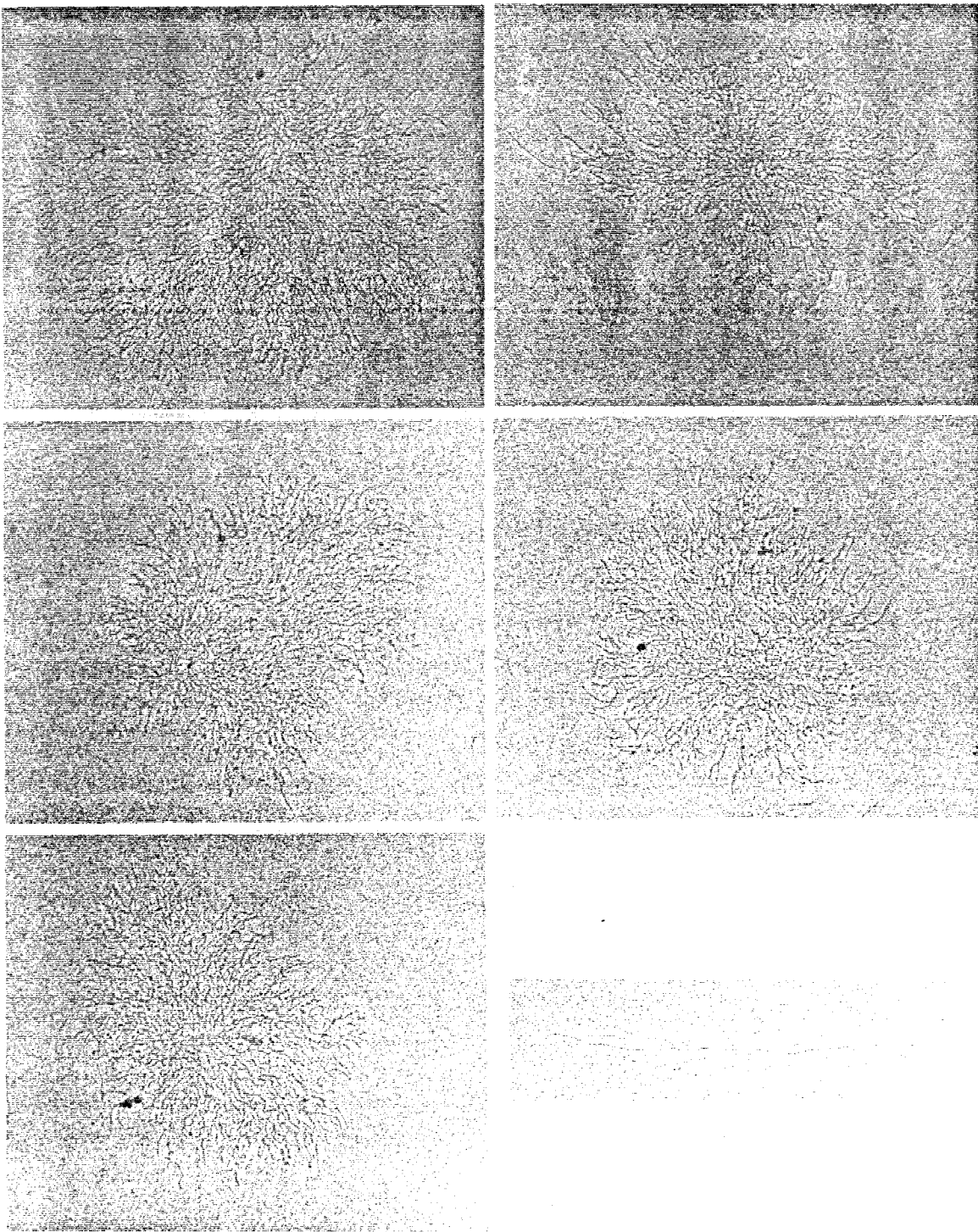
La fraction de mucines G2-1 (fraction exclue de la colonne de Sepharose CL-2B, et concentrée par lyophilisation) a été examinée selon la technique d'étalement par le cytochrome C. Il a ainsi été mis en évidence, non seulement les formes filamenteuses précédemment décrites par Lamblin et al. (1979) mais aussi parfois des agrégats en forme de "buissons" (Fig. 43). Dans les fractions G2-2 et G2-3, retenues par le gel de Sepharose, il n'a jamais été observé de tels aspects de "buissons". De la même façon, lorsque la fraction G2-1 lyophilisée a été préparée sous forme de réplique métallique, seules les formes filamenteuses ont été visualisées. Cette différence d'aspect selon la méthode de préparation peut avoir plusieurs origines: elle peut être liée à l'exclusion des agrégats au cours de la préparation des répliques macromoléculaires ou bien à leur dissolution dans le glycérol à 50%; la production de "buissons" peut également être liée à la présence du cytochrome C.

Considérant que l'observation des mucines devait se faire à une étape aussi précoce que possible de la purification, le surnageant G1\*, n'ayant pas subi de lyophilisation, a ensuite été examiné. Cette fraction est constituée de structures filamenteuses, dont la longueur va de 200nm environ à plus de 1000nm.

---

(\*): *la microscopie électronique a été réalisée dans le laboratoire du Docteur Henry S. Slayter (Dana-Farber Cancer Institute and Departments of Physiology and Biophysics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Nous l'en remercions très vivement.*





BIS  
LILLE

Figure 43 : Aspects en microscopie électronique de la fraction G2-1, préparée selon la méthode d'étalement au cytochrome C avec application de platine, montrant des agrégats en forme de "buissons". Quelques structures filamenteuses sont également visualisées (en bas, à droite). Grossissement 100 000 x .

La fraction G2-1\*, obtenue par filtration de G1\* sur Sepharose CL-2B et concentration sur membrane, a été examinée selon la méthode de la réplique macromoléculaire, dans des conditions légèrement différentes de celles décrites dans l'appendice technique (le tampon utilisé est un tampon acétate d'ammonium 0.1M, pH 6.8, contenant, pour faciliter l'étalement, 50% de glycérol; l'ombrage métallique a été réalisé par dépôt de  $0.5 \times 10^6$  g/cm<sup>2</sup> de tungstène). Cette technique permet de mettre en évidence des molécules isolées, de conformation relâchée et dont la longueur est facile à mesurer (Fig. 44). Par rapport aux images observées après application de platine, la déformation des molécules par accumulation de métal est moins prononcée dans la technique d'ombrage au tungstène. Néanmoins, même en n'appliquant qu'une couche très fine de métal il est parfois difficile, avec des images sur fond clair, d'examiner d'éventuels replis de la conformation moléculaire. En conséquence, pour améliorer le contraste, les préparations ont été également examinées sur fond noir. Dans la figure 44, le champ A est à fond clair tandis que les trois champs B sont à fond noir.

L'étude des fractions non lyophilisées G2-1\* ou G2-2\*, de même que celle de la fraction lyophilisée G2-1, en coloration négative ou par la technique d'étalement au cytochrome C, permet de déceler fréquemment l'existence de micelles de grande taille, polydispersées et de forme approximativement sphérique (Fig. 45). La taille moyenne de ces micelles, apparemment très riches en lipides, est plus importante dans la fraction exclue G2-1\* que dans la fraction retenue G2-2\*, et se situe entre 20 et 50nm pour les plus petites, jusqu'à 300nm pour les plus volumineuses.

Devant ces constatations, il a été décidé de délipider ces fractions par le mélange éthanol/éther diéthylique et d'en examiner les propriétés physico-chimiques.

## C/ PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MUCINES BRONCHIQUES DELIPIDEES

Les différentes fractions obtenues par filtration des mucines bronchiques non lyophilisées sur colonne de Sepharose CL-2B ont été délipidées puis étudiées sur le plan physico-chimique.

### 1) Composition chimique

Par rapport aux fractions non délipidées G2-1, G2-2, B2-1 et B2-2

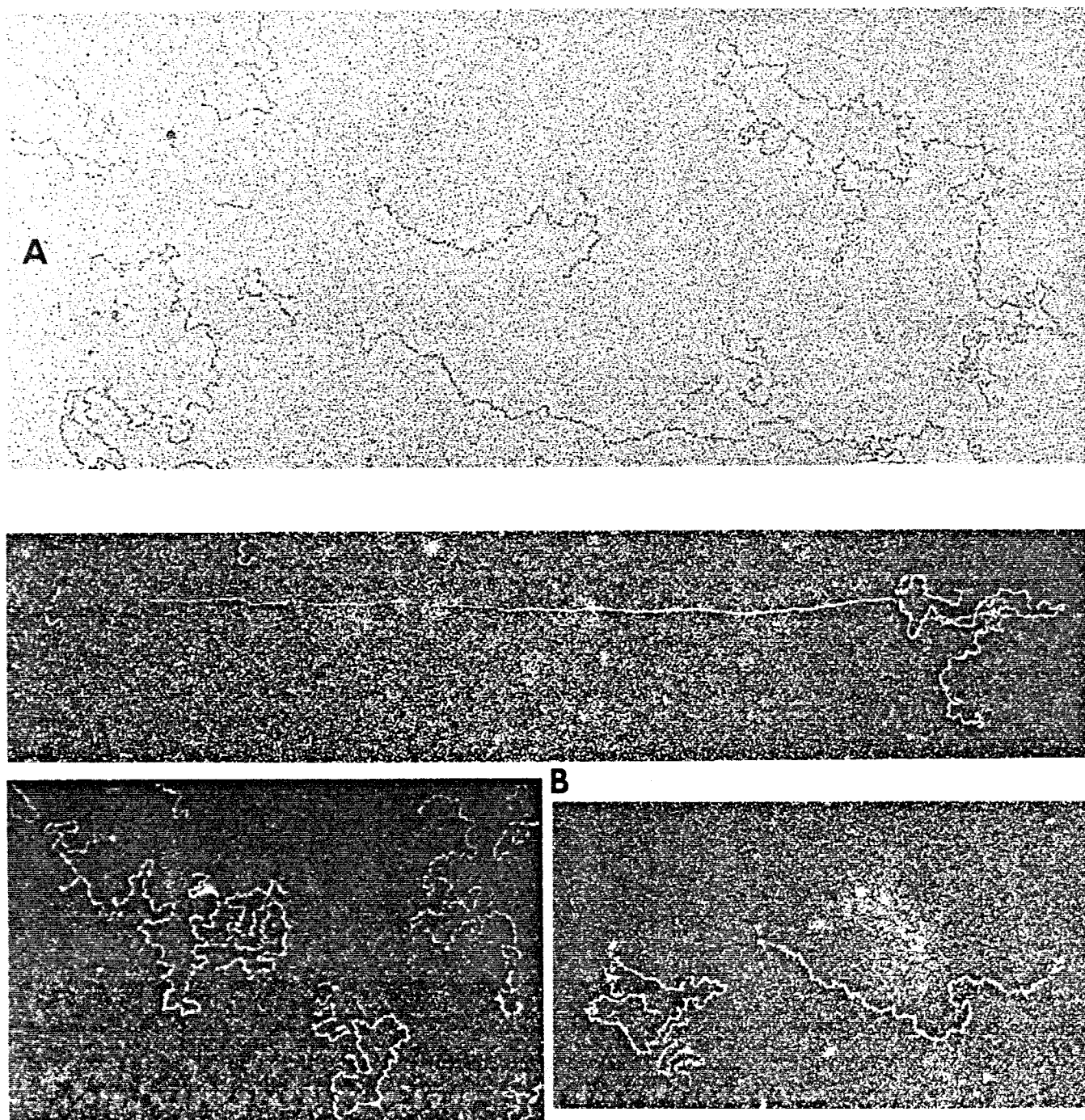


Figure 44 : Aspects en microscopie électronique de la fraction G2-1\* préparée selon la technique de la réplique macromoléculaire avec ombrage au tungstène. A = fond clair; B = fond noir. Grossissement 100 000 x .

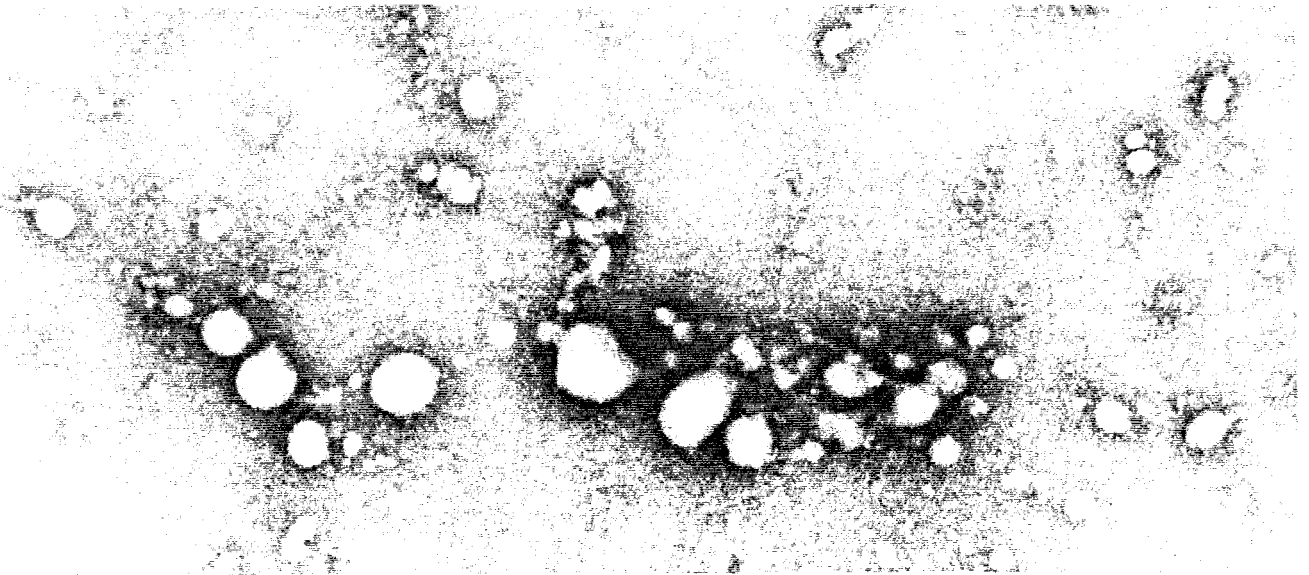


Figure 45 : Aspect en microscopie électronique des mucines préparées selon la méthode du contraste négatif, montrant les impuretés micellaires observées dans les préparations de mucines non délipidées telles que G2-1 ou G2-1\*. Grossissement 70 000 x.

(dont la composition chimique est donnée dans le tableau XVIII), les fractions délipidées correspondantes G2-1\*d, G2-2\*d, B2-1\*d et B2-2\*d apparaissent beaucoup plus riches en acides aminés hydroxylés et en sucres totaux (Tab. XX).

Quand on examine la somme [acides aminés + sucres] dans les différentes fractions, il apparaît un déficit de composition non négligeable dans la fraction B2-2\*d; ce déficit s'explique en fait par la présence d'une légère contamination par des acides nucléiques dont l'existence a déjà été notée dans les fractions lyophilisées non délipidées B2-2 et B2-3 (Fig. 42). La présence d'acides nucléiques dans la fraction B2-2\*d a été confirmée par la constatation d'un spectre d'absorption dans l'ultraviolet avec un maximum à 260nm.

2) L'électrophorèse des fractions G2-1\*d et B2-1\*d en gel de polyacrylamide en présence de SDS indique encore, outre les glycoprotéines de masse moléculaire très élevée, la présence de protéines de faible masse moléculaire (10 à 20 000 daltons), mais les lipides ou glycolipides de forte mobilité ne sont plus mis en évidence (résultats non présentés).

Dans les fractions G2-2\*d et B2-2\*d, comme dans les fractions précédentes, l'électrophorèse permet de visualiser non seulement les mucines de masse moléculaire très élevée qui ne peuvent entrer dans le gel, mais aussi quelques traces de contaminants protéiques de faible masse moléculaire. Tous ces aspects sont en accord avec les résultats de composition chimique.

3) Le coefficient de sédimentation dans la fraction glycoprotéique G2-1\*d a été mesuré dans trois conditions: 1) en tampon acétate de sodium 0.02M, pH 7.0; 2) en tampon acétate de sodium 0.02M, pH 7.0 contenant 50% de glycérol et 3) en guanidine/HCl 6M.

En se basant sur l'absorbance à 278nm, il est apparu que 75% du matériel sédimentait rapidement (à 5500 rpm dans le tampon acétate, et à 20 000 rpm en présence de glycérol). Le reste de l'échantillon sédimentait avec un coefficient  $S_{20,W}$  de 13.8 dans le tampon acétate, alors que dans le tampon contenant du glycérol le coefficient mesuré était  $S = 1.6$ , donnant un coefficient  $S_{20,W}$  de 9.8.

Lorsque la sédimentation était effectuée en guanidine/HCl 6M, aucun agrégat n'était observé, et le matériel sédimentait avec un coefficient

mesuré  $S = 9.3$ , et un coefficient  $S_{20,W}$  de 13.

4) Les fractions délipidées ont été observées au microscope électronique.

La figure 46 montre les structures observées dans les fractions G2-1\*d (partie A), B2-1\*d (partie B) et G2-2\*d (partie C) après ombrage au tungstène. La figure 47 indique la distribution de longueur des structures observées dans ces différentes fractions: dans la fraction G2-1\*d, la distribution apparaît large, avec un maximum de fréquence vers 500nm, mais avec également une petite population de molécules vers 850nm; la fraction G2-2\*d montre aussi une distribution bimodale, le pic principal se situant vers 400nm et le pic secondaire vers 1000nm. Dans la fraction B2-1\*d, provenant de l'expectoration de mucoviscidose, les longueurs les plus fréquemment observées se situent vers 300nm et 650nm.

Après délipidation, les fractions examinées par la méthode du contraste négatif ne contiennent pratiquement plus de structures micellaires caractéristiques des fractions non délipidées et représentées à la figure 45. La figure 48 montre l'aspect que donne, dans ces conditions de coloration négative, la fraction G2-1\*d: les formations qui sont visibles apparaissent constituées d'agrégats de structure amorphe et de taille assez grande, de l'ordre de 0.5 $\mu$ m. Etant donné que les formes filamenteuses n'ont été mises en évidence que dans les préparations comportant un ombrage métallique, et que, à l'ultracentrifugation, une grande partie du matériel sédimente sous forme d'agrégats, il est possible que les structures visualisées par le contraste négatif au microscope électronique puisse correspondre à ces agrégats. Les formes filamenteuses, décelées par la technique d'ombrage métallique, ne peuvent pas être mises en évidence par la technique du contraste négatif.

## D/ DISCUSSION

L'utilisation d'une méthode douce de solubilisation des mucines bronchiques, fondée sur la dilution et l'agitation dans l'eau distillée, permet de solubiliser la majeure partie des composants macromoléculaires de l'expectoration recueillie chez deux malades. Ce résultat confirme donc les observations de Feldhoff et al. (1979) ainsi que nos propres observations sur l'influence de l'hydratation sur la solubilisation du mucus bron-

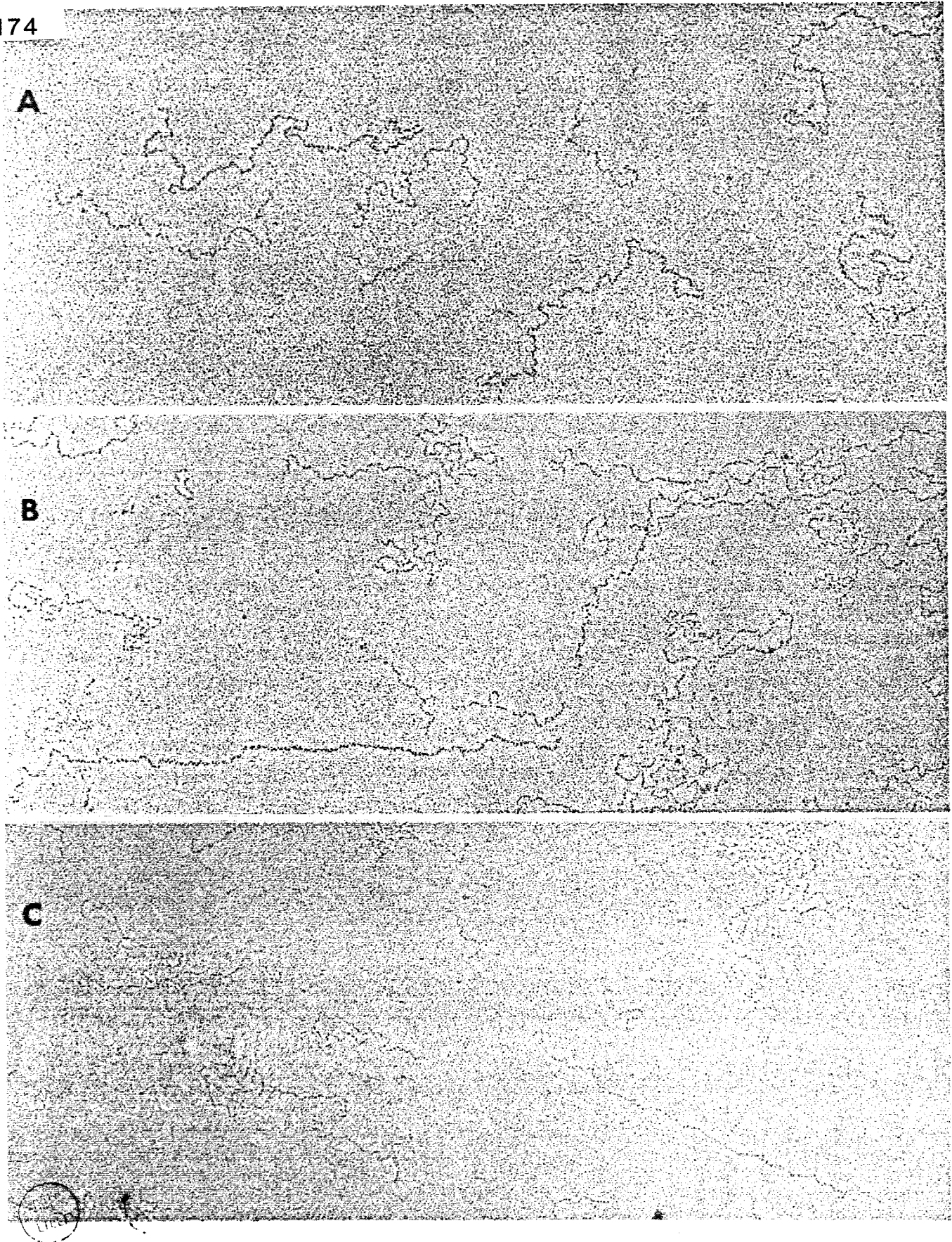


Figure 46 : Aspect des fractions G2-1\*d (A), B2-1\*d (B) et G2-2\*d (C) en microscopie électronique. Ces fractions ont été préparées par la technique de la réplique macromoléculaire après ombrage au tungstène. Grossissement 100 000 x.

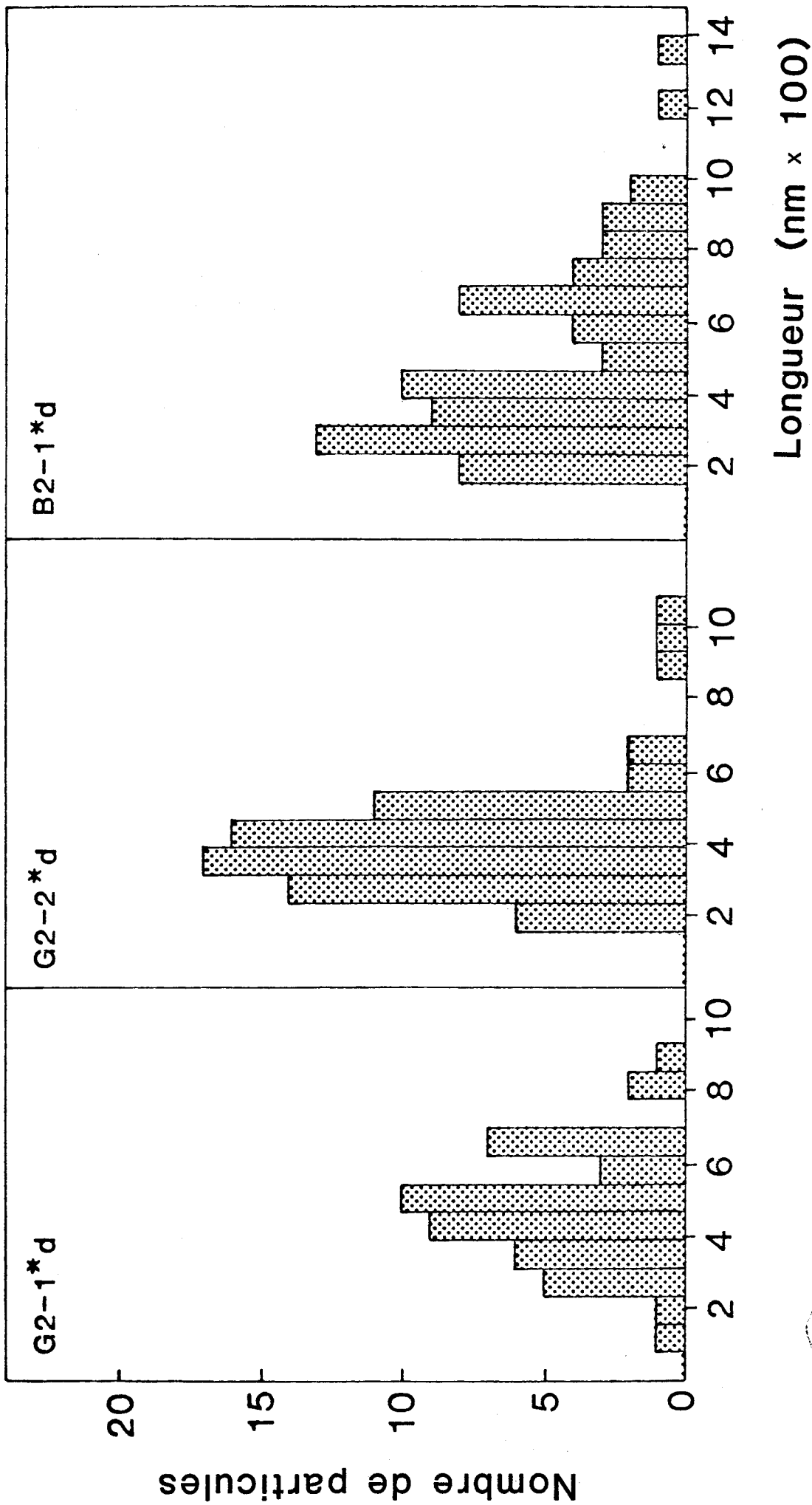


Figure 47: Histogramme de distribution des longueurs dans différentes fractions de mucines observées en microscopie électronique selon la technique de la réplique macromoléculaire.





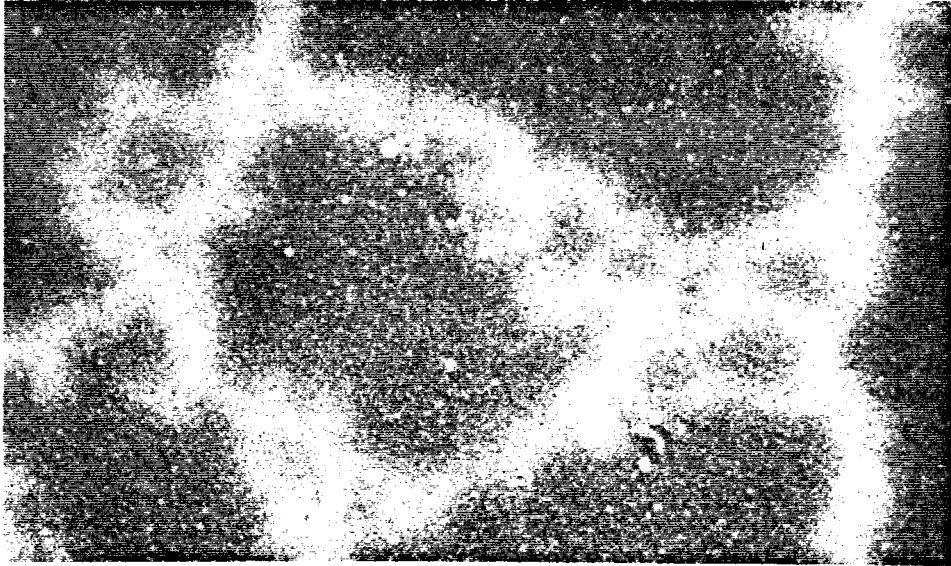


Figure 48 : Aspect des mucines délipidées G2-1\*d en microscopie électronique montrant des formations amorphes de grande taille. Grossissement 60 000 x.



chique.

La composition en acides aminés et en sucres des fractions G2-1 et B2-1, exclues de la colonne de Sepharose CL-2B, ainsi que des fractions G2-2 et B2-2, partiellement retenues, indique que ces fractions sont riches en glycoprotéines du type des mucines (Tab. XVIII). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS montre que la majeure partie du matériel glycoprotéique, fortement coloré par le PAS, ne pénètre pas dans le gel (Fig. 39 et Fig. 40), ce qui indique l'importance de la masse moléculaire de ces substances. En outre, bien que la chromatographie ait été effectuée en guanidine/HCl 6M, l'électrophorèse montre encore la présence d'autres composants de faible masse moléculaire:

- il apparaît ainsi dans les fractions G2-1, G2-2, B2-1 et B2-2, des éléments colorés par le bleu Coomassie dont l'intensité se renforce dans la zone de masse moléculaire 15 à 20 000. Ces éléments paraissent plus marqués dans la fraction exclue B2-1 que dans la fraction G2-1, et cette différence pourrait être liée à la présence de peptides (la fraction B2-1 est plus riche que la fraction G2-1 en acides aminés, en particulier en acides aminés dicarboxyliques).

- il apparaît également dans les mucines exclues une fraction assez large colorée à la fois par le réactif de Schiff et par le noir Soudan. Des substances de même mobilité électrophorétique ont déjà été identifiées à des glycolipides (Gahmberg et al., 1973; Steck et al., 1974).

A ce stade de leur purification dans le chlorhydrate de guanidine 6M, les fractions de mucines apparaissent donc encore associées à des lipides, et peut être également à de faibles quantités de peptides à caractère hydrophobe.

- La teneur en lipides est relativement élevée dans les deux fractions exclues G2-1 et B2-1; elle est deux fois plus élevée dans la fraction B2-1 provenant du malade atteint de mucoviscidose (40%) que dans la fraction G2-1 provenant du malade atteint de bronchite chronique (20%).

- La présence de lipides dans l'expectoration recueillie chez des malades atteints de bronchopathies variées a déjà été signalée par de nombreux auteurs: Potter et al. (1963), Lewis (1971), Sahu et al. (1978b), Bhaskar et al. (1981), Galabert et al. (1981). Parmi ces lipides, ont ainsi

été caractérisés des triglycérides, du cholestérol libre et estérifié, des glycolipides et des acides gras. Lhermitte et al. (1977) ont également montré que les mucines bronchiques solubilisées par action des agents réducteurs étaient encore associées à des lipides, la teneur de ceux-ci restant néanmoins plus faible que celle rapportée ici dans le cas de mucines non réduites.

- Woodward et al. (1982) ont également mis en évidence l'association existant entre lipides et mucines bronchiques. Ces auteurs ont montré que, dans les mucines bronchiques filtrées sur colonne de Sepharose CL-4B puis purifiées en deux fractions par ultracentrifugation dans un gradient de densité de bromure de césium, la quantité de lipides associés aux mucines était trois fois plus importante dans la fraction de densité basse que dans la fraction de densité élevée.

- Lorsqu'on examine les résultats de composition lipidique dans les fractions que nous avons étudiées (G2-1 et B2-1), il apparaît des différences quantitatives entre la fraction provenant de l'expectoration de bronchite chronique (G2-1), et celle provenant de l'expectoration de mucoviscidose (B2-1). Il existe aussi quelques différences entre ces résultats et ceux rapportés par Woodward et al. (1982) qui ont enregistré une proportion plus élevée de lipides neutres mais n'ont pas décelé l'existence d'acides gras. Outre la possibilité de variations individuelles de composition, les écarts observés pourraient aussi s'expliquer par les éventuels effets du chlorhydrate de guanidine et/ou du bromure de césium sur l'association lipides-mucines: les acides gras par exemple pourraient former des sels de césium solubles; Bhaskar et al. (1981) ont observé la dissociation progressive entre lipides et mucines par centrifugations répétées en gradient de bromure de césium. Il n'est donc pas surprenant que, selon la méthode de préparation utilisée, la teneur des mucines en lipides puisse varier.

- La composition lipidique des fractions G2-1 et B2-1 diffère de celle du surfactant alvéolaire (Goerke, 1974), ce qui suggère que les lipides associés aux mucines ont une autre origine. La participation des résidus membranaires de cellules glandulaires ou de cellules épithéliales desquamées, ou encore celle de bactéries ou de leucocytes lysés peut à cet égard être envisagée.

Pearson et al. (1981) ont, sur la base des résultats obtenus par

l'utilisation des agents réducteurs et des agents protéolytiques, suggéré que les mucines gastriques possédaient une structure polymérique résultant de la liaison covalente entre des sous-unités et une protéine de masse moléculaire 70 000. Sous l'action des agents de réduction, cette liaison est rompue, libérant la protéine de liaison et les sous-unités.

D'après les résultats de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les mucines bronchiques G2-1 et B2-1, préparées par chromatographie en milieu dissociant, apparaissent encore associées, de façon non-covalente, à quelques structures peptidiques (Fig. 41). Cependant, la réduction de ces fractions par le mercaptoéthanol en présence de SDS à 100°C pendant 3mn ne se traduit pas par la libération de nouvelles espèces peptidiques dans la zone de masse moléculaire 50 à 100 000. Dans ces conditions, nos résultats ne plaident pas en faveur d'un modèle dans lequel la formation des mucines bronchiques résulterait de l'association de sous-unités avec une protéine de liaison.

Ayant clairement établi l'existence d'une association entre les mucines examinées et des lipides, et après avoir montré l'efficacité de la délipidation sur la composition chimique de ces mucines (augmentation de la teneur en hydroxyaminoacides et en sucres, disparition à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de tout matériel lipophile), il était également intéressant d'examiner quel était l'effet de ce traitement sur le plan de la morphologie moléculaire.

Les images de microscopie électronique ont ainsi montré que la délipidation entraînait la disparition presque totale des grandes formations micellaires décrites dans les fractions non délipidées. Par ailleurs la délipidation n'a paru affecter ni le nombre ni la qualité des formations filamenteuses également présentes dans ces fractions.

La conclusion qui s'impose à partir de ces observations est que, dans l'association lipides-mucines, les lipides constituent des structures micellaires pouvant interagir avec les formations filamenteuses des mucines, mais que, en tout état de cause, ces mucines gardent leur propre individualité et constituent donc une entité bien séparée.

L'examen en microscopie électronique a donc permis de mettre en évidence la coexistence, dans les fractions non délipidées, à la fois des filaments flexibles de mucines et des formations micellaires. Ce-

pendant, il convient de remarquer que la technique du contraste négatif ne permet pas de visualiser les fins filaments étirés de mucines, et que la technique de la réplique macromoléculaire en présence de glycérol ignore les grandes structures micellaires. L'incapacité par cette dernière technique à visualiser les micelles peut résulter d'un phénomène d'exclusion physique au cours de la pulvérisation de l'échantillon; elle peut aussi être liée à l'emploi de glycérol à 50% comme milieu de dispersion, ou encore à des pertes survenant par apparition d'une insolubilité après lyophilisation. Quoiqu'il en soit, les points importants sont que la délipidation des fractions selon la technique utilisée se traduise par la disparition des formes micellaires à l'examen en contraste négatif, et que les caractéristiques morphologiques des filaments de mucines ne soient pas affectées par ce traitement.

La principale différence que l'on enregistre entre les résultats exposés ici, acquis par l'examen des mucines extraites par dilution aqueuse de l'expectoration, et les résultats antérieurs de Lamblin et al. (1979), obtenus sur des mucines réduites, concerne la taille des molécules.

En effet alors que dans les travaux antérieurs, la longueur des particules se situait dans la fourchette 100 à 300nm, l'examen des mucines non réduites a montré que la taille moyenne des particules était deux à cinq fois plus importante, de l'ordre de 400 à 1000nm. Comme cela a déjà été montré dans le travail exposé dans la deuxième partie de ce mémoire, et comme l'ont encore récemment rappelé Houdret et al. (1983), la caractérisation, dans les fractions préparées par réduction, de molécules beaucoup plus courtes et plus hétérogènes est le résultat de l'attaque protéolytique des mucines natives induites par l'action des agents réducteurs.

Cependant, il faut savoir que la mesure de la longueur des mucines est une opération délicate et que de nombreux facteurs peuvent rendre l'opération difficile:

- dans certaines techniques de microscopie électronique, les structures étirées flexibles peuvent sécher sous une conformation ramassée ou se superposer les unes sur les autres, ce qui peut affecter la précision des mesures, et donc constituer une source d'hétérogénéité apparente des molécules observées;

- par ailleurs, l'existence éventuelle de ponts disulfure non réduits, intramoléculaires ou intermoléculaires (entre mucine et protéine de liaison par exemple), pourrait aussi, par réaction

d'échange, conduire à la constitution de liaisons croisées qui, si elles s'établissaient dans les régions terminales des molécules, seraient susceptibles de produire des polymères  $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$ , etc... La constitution de liaisons croisées pourrait même être plus aléatoire, et apporter ainsi un degré de complexité encore plus important dans les molécules; cependant ces effets devraient être observés dans les préparations avec étalement dans le glycérol, ce qui n'est pas le cas. D'autres mécanismes de constitution de liaisons croisées peuvent aussi être évoqués: celui par exemple qui intervient dans la formation de la fibrine et qui est catalysée par une transglutaminase; enfin tout autre type de modification post-transcriptionnelle pourrait aussi affecter la structure native des molécules. L'éventualité d'une protéolyse limitée des mucines survenant pendant ou après la sécrétion ne doit pas non plus être éliminée;

- les forces de cisaillement auxquelles sont soumises les molécules pendant les différentes manipulations de laboratoire (agitation, pipettages), peuvent être suffisantes pour casser la longue chaîne polypeptidique des mucines. On sait par exemple que par agitation on peut casser les filaments d'ADN, la cassure se produisant statistiquement au centre de la macromolécule (Levinthal et al., 1961);

- enfin le fait que, selon la conformation hélicoïdale ou étirée de la molécule, la longueur de la chaîne polypeptidique puisse physiquement varier de 0.15 à 0.36nm par résidu d'acide aminé, constitue aussi une source non négligeable de dispersion apparente de la longueur des structures examinées.

Il n'est pas toujours aisé d'attribuer à une mucine donnée une masse moléculaire précise: les valeurs déterminées à l'aide de différentes méthodes physiques sont en effet parfois très dispersées, même pour des mucines d'origine similaire (Allen et al., 1983b; Carlstedt et al., 1983c). Au cours de la présente étude, des difficultés du même ordre ont été également rencontrées avec la fraction délipidée G2-1\*d.

C'est pourquoi, afin de déterminer si la conformation des mucines observées en microscopie électronique est bien représentative de celle que ces molécules adoptent en solution, il a été décidé de comparer le coefficient de sédimentation mesuré ( $S_{20,w}$ ) et celui calculé à partir des données morphologiques ( $S$ ). En effet, dans un système monodispersé, il exis-

te une bonne correspondance entre la valeur mesurée  $S_{20,w}$  et la valeur calculée à partir de la masse moléculaire et du rayon de gyration déduit des mesures de microscopie électronique (Slayter, 1976; Lamblin et al., 1979).

L'estimation de la masse moléculaire peut être obtenue à partir de mesures de longueurs. Considérant que la fraction G2-1\*d contient 21.3% de protéines, et que pour une conformation complètement étirée la longueur par résidu d'acide aminé est de 0.364nm, pour des molécules de 500 et de 900nm de longueur, la masse moléculaire calculée serait respectivement 650 000 et 1 200 000. Ces valeurs se situent dans la fourchette de celles qui ont été trouvées par mesures de sédimentation à l'équilibre. En utilisant la valeur de 0.71cm<sup>3</sup>/g (déterminée par pycnométrie) comme valeur du volume spécifique partiel des mucines, le calcul du coefficient de sédimentation donne alors la valeur de 3.1 à 3.2, estimation qui est très différente de la valeur mesurée  $S_{20,w}$  de la fraction G2-1\*d. En conséquence, la conformation des protomères de mucines en solution se rapprocherait davantage de celle d'un modèle hélicoïdal compact que de celle d'une structure parfaitement étirée.

La mesure du coefficient de sédimentation de la fraction G2-1\*d a été réalisée dans trois solvants différents. Il a ainsi été montré que, en tampon acétate, 25% de cette fraction sédimente avec une constante de 13.8S, le reste sédimentant très rapidement à 5500 rpm; par contre en milieu dissociant guanidine/HCl 6M, la totalité de la fraction sédimente avec une constante de 13S. Cette différence de comportement suggère que les grands agrégats qui apparaissent en milieu non dissociant sont convertis en protomères en présence de guanidine/HCl 6M.

La tendance des mucines à former de grands agrégats à structure gélifforme est encore objectivée par les images de microscopie électronique en contraste négatif, même si l'on ignore dans quelle mesure l'emploi dans cette technique d'acétate d'uranyle à 1%, pH 4.5, ne pourrait pas être responsable de cette agrégation.

L'observation de mucines sous forme de flaques a déjà été signalée par différents auteurs après ombrage métallique (Slayter et al., 1973, 1974; Lamblin et al., 1979; Harding et al., 1983a). La présence et les caractéristiques de ces flaques ou de ces agrégats apparaissent fortement dépendantes de la nature du solvant dans lequel ils se trouvent (eau, solution saline, glycérol ou chlorhydrate de guanidine), ainsi que de la charge

nette négative des molécules de mucines : en solution aqueuse saline, l'agrégabilité diminue lorsque la charge électrique augmente. En conséquence, les mucines peuvent donc se présenter soit sous forme d'agrégats, soit sous forme d'entités macromoléculaires bien définies, soit encore sous ces deux aspects à la fois.

La faculté de se présenter sous deux états, que l'on peut qualifier de protomérique et de multimérique, peut être considérée comme typique des macromolécules biologiques de structure. Les protéines fibreuses, telles que la myosine ou le collagène, se présentent dans l'organisme essentiellement sous forme polymérique bien définie; cependant en solution, elles peuvent aussi se présenter sous forme protomérique, tout aussi bien définie. De la même façon, des protéines comme la fibronectine et la thrombospondine forment aussi dans les agrégats un ciment structural important, bien que cependant moins bien ordonné. En ce qui concerne les glycoprotéines du type des mucines, dont on sait maintenant qu'elles apparaissent constituées de protomères bien définis, longs de 1000nm environ dans leur conformation la plus étirée, et qui fonctionnent principalement sous forme de gels très concentrés, il est peu probable qu'à l'état d'agrégats leur structure soit bien ordonnée, sauf peut être lors de leur écoulement où, du fait de leur rapport axial élevé, elles s'orientent dans le sens du flux.

Comme cela est le cas de toutes les macromolécules précédemment citées (myosine, collagène, etc...), les mucines doivent pouvoir être caractérisées, à la fois dans leur état de macromolécule individualisée et leur état de gel, par des paramètres physiques bien définis tels que taille, forme, masse moléculaire, coefficient de sédimentation, coefficient de diffusion, viscosité intrinsèque, pourcentage d'hélicité, etc... La description de la forme agrégée des mucines peut cependant se révéler complexe du fait de leur association avec des lipides et avec d'autres protéines. Par ailleurs, étant donné l'influence de la méthode de purification et de celle des solvants utilisés sur ces paramètres physiques, la caractérisation des mucines doit être faite avec précision, en ne perdant pas de vue que des altérations structurales peuvent survenir en cours de purification, ou du fait de modifications post-transcriptionnelles. Connaissant ces difficultés, on comprend mieux pourquoi l'analyse des mucines préparées dans différents laboratoires selon des protocoles également différents, a pu conduire à des résultats divergents et souvent contradictoires. Pour faire progresser nos



connaissances sur les mucines et expliquer certains résultats apparemment contradictoires, il serait aujourd'hui intéressant qu'une même préparation de mucine homogène puisse être analysée dans divers laboratoires selon des méthodes de caractérisation différentes.

A la lumière des résultats actuellement disponibles, un modèle d'organisation moléculaire peut être proposé pour le protomère de mucines bronchiques: ce protomère apparaîtrait principalement sous la forme d'un filament plus ou moins étiré, dont la flexibilité serait stériquement limitée du fait de la présence des chaînes glycaniques latérales, et portant une charge nette négative variable; en solution, cependant, cette structure filamenteuse adopterait une conformation hélicoïdale flexible et relâchée; en milieu non dissociant le protomère serait amené à s'agréger et à former un gel. Il paraît difficile, comme l'a souligné Gibbons (1972), de décrire un modèle plus précis pour les mucines, et l'assimilation faite par cet auteur à une pelote statistique expansée répond bien de l'aspect que les molécules présentent dans les préparations faites en présence de glycérol et examinées par ombrage métallique.

L'analyse chimique des mucines et l'aspect des préparations examinées au microscope électronique avec contraste négatif, avant et après délipidation, ont clairement établi l'existence d'une association de mucines à des lipides. L'origine de ces lipides reste obscure; cependant il est tentant de penser que les résidus membranaires provenant d'éléments sécréteurs de mucus, ou de cellules épithéliales desquamées, ou encore de leucocytes ou de bactéries lysés puissent contribuer à la production de ces lipides. L'association lipides-mucines pourrait se faire au niveau de régions hydrophobes de la chaîne peptidique ou des chaînes glycaniques dans la mucine, la solubilité du complexe ainsi formé dépendant essentiellement des régions polaires de la molécule de mucine. L'analyse chimique des fractions de mucines G2-1 et B2-1 a montré une teneur en acides aminés dicarboxyliques et en lipides plus élevée que celles habituellement rencontrées dans les mucines réduites ou protéolysées. Ces différences pourraient correspondre à la présence de protéines contaminantes de faible masse moléculaire; mais elles pourraient aussi refléter la présence dans la mucine de régions spécifiques riches en acides aspartique et glutamique, sensibles à la protéolyse et impliquées plus ou moins directement dans la liaison aux lipides et dans le

phénomène d'agrégation micellaire. Il faut enfin rappeler l'observation tout récente de Slomiany et al. (1983) qui ont mis en évidence l'abondance des lipides associés aux mucines gastriques de malades atteints de mucoviscidose. L'hydrophobicité de ces molécules pourrait s'expliquer, selon ces auteurs, par l'existence de résidus d'acides gras qui leur seraient liés de façon covalente.



# **QUATRIEME PARTIE**

**RECHERCHE D'AUTRES FACTEURS**

**D'ASSOCIATION**

**DES MUCINES BRONCHIQUES**

Au cours de l'étude de l'action des agents réducteurs sur les mucines bronchiques (deuxième partie du mémoire), il a été mis en évidence dans la partie soluble du mucus recueilli chez l'enfant Vid..., atteint de mucoviscidose, un composant de faible masse moléculaire, présentant une forte mobilité électrophorétique et doué de propriétés métachromatiques après coloration par le bleu de toluidine (fractions AIII, Fig. 19; CIII, Fig. 20; DIII, Fig. 22). Ce composant résiste en outre à l'hydrolyse par les nucléases ce qui permet de le distinguer des acides nucléiques. Un composant similaire, offrant le même comportement électrophorétique, les mêmes affinités tinctoriales et également résistant à l'hydrolyse en présence de nucléases, a été observé dans le surnageant d'extraction aqueuse (12 volumes d'eau) du mucus de l'enfant B... également atteint de mucoviscidose (troisième partie du mémoire, fraction B2-3, Fig. 42). Ces deux observations nous ont paru devoir retenir l'attention car les diverses caractéristiques énumérées laissent suggérer la présence dans ces fractions de glycosaminoglycannes, substances dont on connaît par ailleurs le rôle structural important dans l'organisation macromoléculaire des protéoglycannes.

Les protéoglycannes qui constituent l'un des composants principaux de la matrice extra-cellulaire du tissu conjonctif, résultent en effet de la liaison covalente d'un nombre élevé de chaînes de glycosaminoglycannes à un axe unipeptidique central. Dans le cartilage par exemple, où ils ont été particulièrement explorés (Heinegård, 1972; Heinegård et al., 1974, 1977; Oegema et al., 1977), les protéoglycannes se présentent sous forme de sous-unités dont la masse moléculaire moyenne est de  $2.5 \times 10^6$ , dans lesquelles les chaînes polysaccharidiques se distribuent le long de l'axe polypeptidique en deux régions: une région riche en chondroïtine-sulfate et une région riche en kératane-sulfate; une troisième région, située à l'une des extrémités de la protéine, possède en outre la propriété de se lier de façon non covalente à une molécule d'acide hyaluronique. Il en résulte que, bien que pouvant se présenter à l'état libre, les protéoglycannes forment volontiers des agrégats de grande taille (masse moléculaire pouvant aller jusqu'à  $10^8$ ) par liaison d'un nombre élevé de ces sous-unités à une seule chaîne d'acide hyaluronique, tandis que des protéines dites de liaison concourent en outre à la stabilité de l'édifice macromoléculaire (Périn et al., 1978a, 1978b, 1980).

Dans les tissus non cartilagineux, les protéoglycannes ne forment qu'un composant très minoritaire dont la composition et la structure demeurent encore souvent obscures. Dans les parois artérielles, des protéoglycannes ont cependant été caractérisés, montrant une structure moins agrégée que dans le cartilage, avec une composition hybride comportant des chaînes de chondroïtine-sulfate et de dermatane-sulfate, ainsi que de l'héparine et de l'héparane-sulfate (Oegema et al., 1979; Breton et al., 1979, 1981; Deudon et al., 1980). Dans les poumons, où ils constituent moins de 0.5% du poids sec du tissu, les glycosaminoglycannes apparaissent sous forme d'acide hyaluronique, de chondroïtine-4- et 6-sulfate, de dermatane-sulfate, d'héparine et d'héparane-sulfate; le dermatane-sulfate n'a été mis en évidence que dans le cartilage trachéo-bronchique (Wusteman, 1972; Hance et al., 1975; Horwitz et al., 1975; Vaccaro et al., 1979; Karlinsky, 1982). De toutes ces substances, et sans que la raison en soit connue, l'acide hyaluronique occupe une place à part, du moins dans diverses conditions pathologiques pleuro-pulmonaires. C'est ainsi que la présence de concentrations élevées d'acide hyaluronique dans les épanchements pleuraux est devenue un élément essentiel dans le diagnostic du mésothéliome pleural (Havez et al., 1971; Boersma et al., 1980). L'existence de quantités non négligeables d'acide hyaluronique a par ailleurs été mise en évidence dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire obtenus chez des patients atteints d'asthme (Sahu et al., 1978a, 1978b), de protéinose alvéolaire (Sahu et al., 1978c), ou de mucoviscidose (Sahu et al., 1978b, 1980a).

Compte tenu du rôle structural que joue l'acide hyaluronique comme facteur d'association dans les protéoglycannes du cartilage, compte tenu aussi de la caractérisation de cette molécule dans un certain nombre de sécrétions bronchiques pathologiques, il était important d'examiner la fraction qui dans certains mucus bronchiques nous a paru, par ses caractères, évoquer la présence de glycosaminoglycannes. S'il était établi que cette fraction contenait de l'acide hyaluronique, cela constituerait en effet un élément nouveau à prendre en considération comme éventuel facteur de liaison dans l'organisation macromoléculaire des mucines bronchiques. Une étude, exposée dans la quatrième et dernière partie de ce mémoire, a donc été entreprise au cours de laquelle des glycosaminoglycannes ont été purifiés et identifiés à partir de l'expectoration d'un enfant atteint de mucoviscidose.

L'isolement des glycosaminoglycannes a été réalisé selon le protocole représenté à la figure 49 à partir de l'expectoration d'un enfant (Res...) appartenant au groupe sanguin O et atteint de mucoviscidose.

A partir de 2500ml d'expectoration, il a été possible, par lavage en présence de 3 vol. de sérum physiologique puis centrifugation, dialyse et lyophilisation, de préparer 25.50g de phase soluble (soit 10.20g/l de mucus) et 19.10g de phase fibrillaire (soit 7.64g/l de mucus).

#### A/ ISOLEMENT DE GLYCOSAMINOGLYCANNES A PARTIR DE LA PHASE SOLUBLE

1) Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose CL-2B en milieu non dissociant.

1g de phase soluble a été fractionné au cours de 10 expériences successives. Le diagramme type obtenu à l'élution des composants solubles du mucus en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0 (absorbance à 280nm et absorbance après réaction à l'orcinol) est représenté à la figure 50. Le profil enregistré est en tous points semblable à celui apparaissant à la figure 19, obtenu à partir de la phase soluble Vid... traitée dans les mêmes conditions. Trois fractions glycoprotéiques (F1= 52mg; F2= 150mg; F3= 439mg) ont été recueillies, dialysées et lyophilisées.

2) La fraction F3, la plus retenue par la colonne, a ensuite été incubée en présence de la nucléase de Staphylococcus aureus, puis en présence de pronase (extraite de Streptomyces griseus). Le mélange obtenu a été traité par l'acide trichloracétique (ATCA) à 5%, ce qui, par centrifugation, a permis de récupérer après dialyse et lyophilisation 84mg de surnageant.

3) 80mg de glycopeptides présents dans le surnageant après précipitation par l'acide trichloracétique ont été soumis à une chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephacryl S-300, en milieu non dissociant. Le profil d'élution obtenu (absorbance à 278nm, absorbance après réaction à l'orcinol et après réaction au carbazole) est représenté à la figure 51. Cinq fractions ont été recueillies: F3-1 = 7mg; F3-2 = 16mg; F3-3 = 33.8mg; F3-4 = 5.3mg et F3-5 = 1.7mg.

4) Bien que la fraction F3-3 fût la fraction glycoprotéique prin-

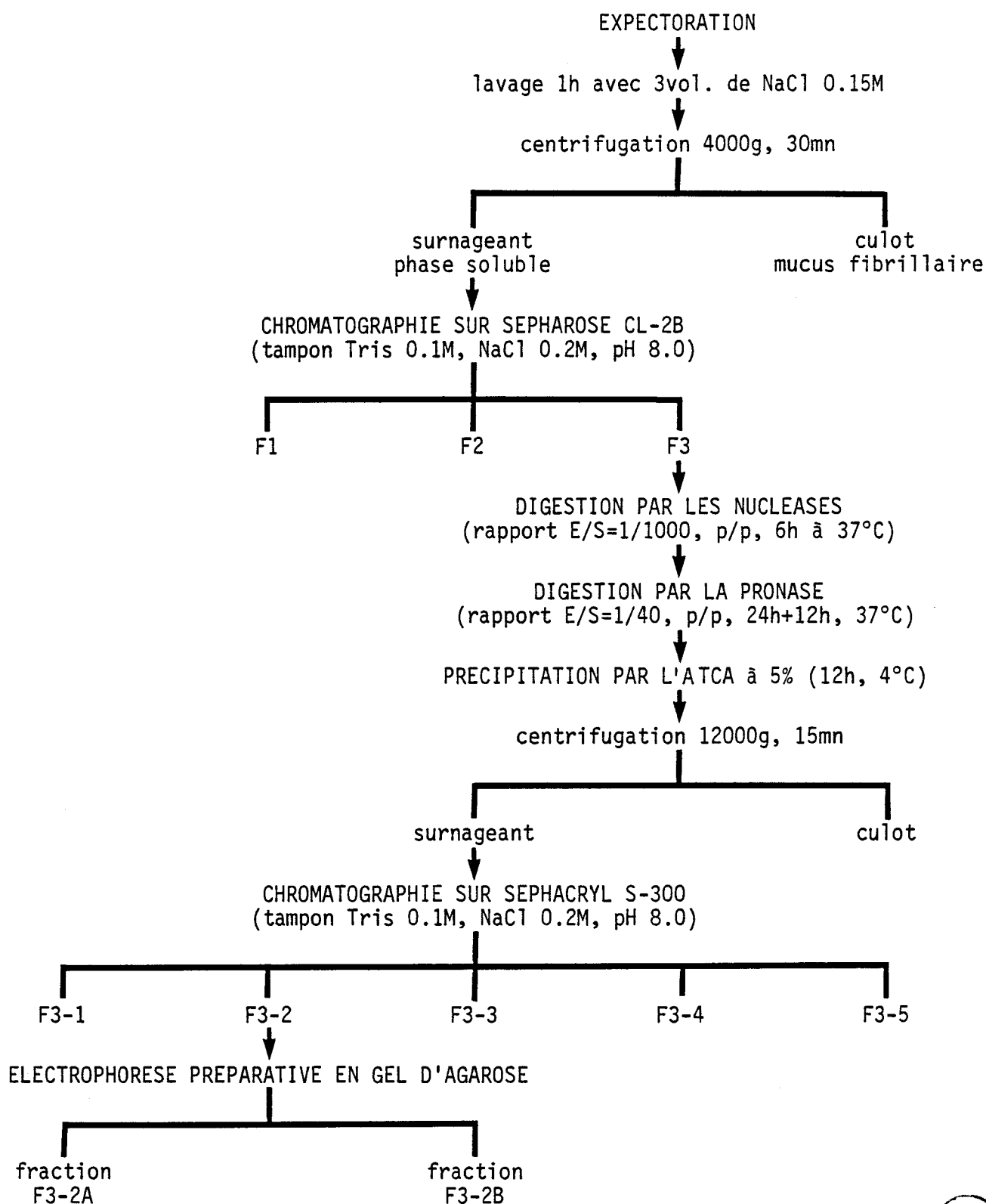


Figure 49 : Protocole d'isolement des glycosaminoglycannes à partir de l'expectoration.



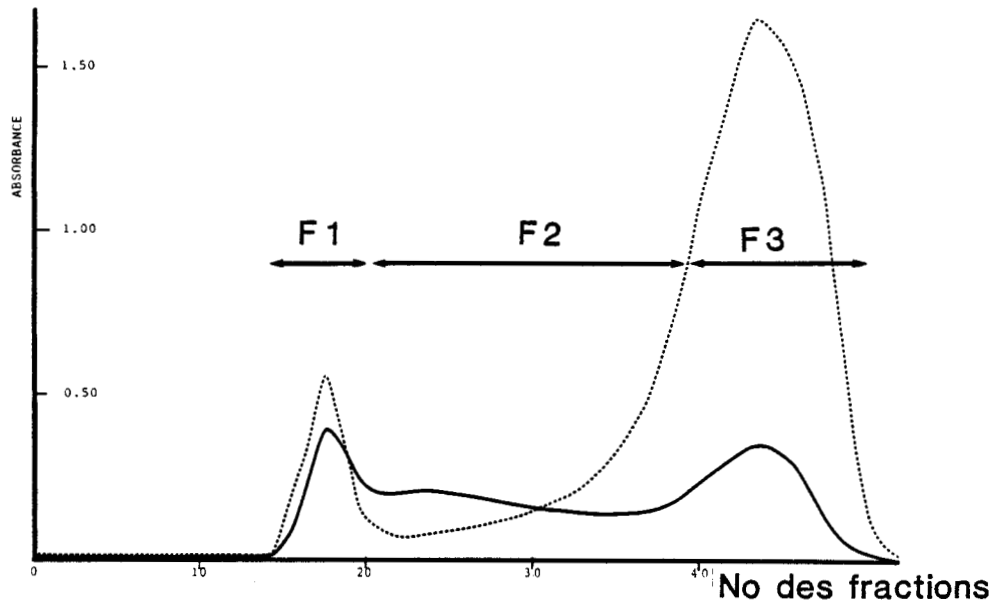


Figure 50 : Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Res... (mucoviscidose) sur colonne de Sepharose CL-2B équilibrée et éluée en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'élution: — = hexoses, ..... = A 278nm. Echantillon déposé au cours de 10 expériences successives: 1g; fractions recueillies après dialyse et lyophilisation: F1 = 52mg, F2 = 150mg, F3 = 439mg

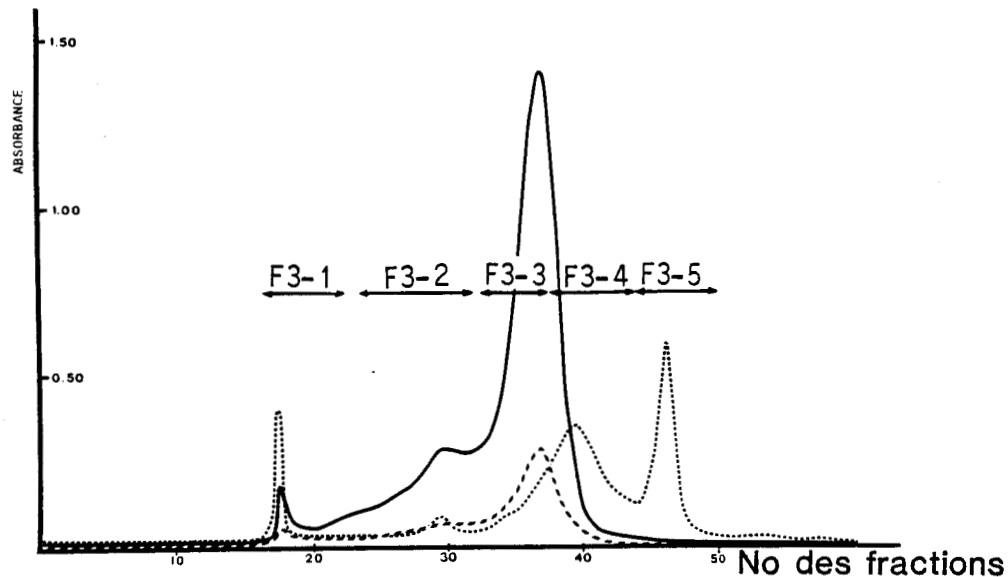


Figure 51 : Chromatographie de gel filtration des glycopeptides pronasiques sur colonne de Sephacryl S-300 équilibrée et éluée en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0. Profil d'élution: — = hexoses, ..... = A 278nm, - - - = acides uroniques. Echantillon déposé: 80mg; fractions obtenues après dialyse et lyophilisation: F3-1= 7mg, F3-2= 16mg, F3-3 = 33.8mg, F3-4 = 5.3mg, F3-5 = 1.7mg.

cipale, la purification des glycosaminoglycannes a été poursuivie sur la fraction F3-2 dans laquelle le rapport des absorbances carbazole/orcinol était plus élevé (0.28) que dans la fraction F3-3 (0.20); un autre critère de ce choix était l'importance de la contamination protéique estimée d'après le profil d'absorbance à 278nm: celle-ci était en effet plus élevée dans la fraction F3-3 que dans la fraction F3-2.

L'analyse de la fraction F3-2 par électrophorèse en gel d'agarose (Fig. 52) montre la présence de 2 composants: un composant de faible mobilité, prenant légèrement l'amidoschwarz, plus intensément le réactif de Schiff après oxydation periodique, et plus intensément encore le bleu de toluidine dans sa partie anodique; un autre composant de plus grande mobilité était uniquement coloré par le bleu de toluidine.

La fraction F3-2 a été soumise à l'action de divers enzymes spécifiques des glycosaminoglycannes, et les produits obtenus ont été analysés par électrophorèse analytique en gel d'agarose, avec coloration par le bleu de toluidine. Les résultats (Fig. 53) montrent la disparition presque totale du composant rapide après digestion par la hyaluronidase testiculaire de Boeuf; ce composant résiste cependant à l'action de la hyaluronidase de Streptomyces hyalurolyticus. Après incubation en présence des chondroitinases ABC et AC, il y a disparition totale du composant rapide, avec également une diminution sensible de l'intensité du composant lent.

Dans le but d'examiner si l'affinité pour le bleu de toluidine du composant de plus faible mobilité électrophorétique n'était pas liée à la présence d'acide N-acétylneuraminique, la fraction F3-2 a été traitée par la neuraminidase et les produits obtenus ont été étudiés par électrophorèse en gel d'agarose avec coloration par le bleu de toluidine; les résultats obtenus après intégration des bandes à l'aide d'un densitomètre indiquaient qu'avant incubation en présence de neuraminidase le composant lent représentait 42% de l'ensemble des substances colorées et seulement 20% après action de l'enzyme (tracés non reproduits ici).

5) De façon à pouvoir caractériser plus précisément les deux composants présents dans la fraction F3-2, 10mg de cette fraction ont été soumis à une électrophorèse préparative en gel d'agarose, ce qui a permis d'isoler, après élution dans l'eau, dialyse et lyophilisation, 5.8mg du composant lent (fraction F3-2A) et 1.7mg du composant rapide (fraction F3-2B).

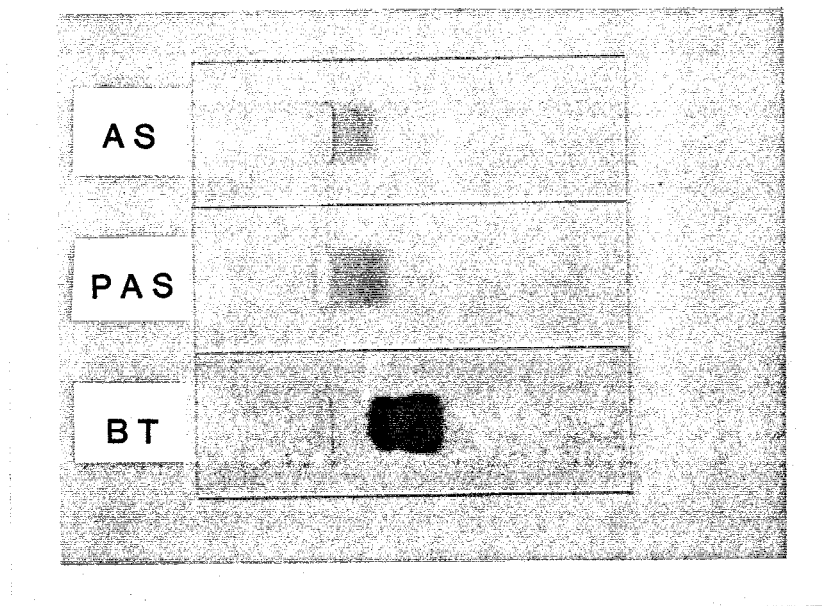


Figure 52 : Electrophorèse analytique de la fraction F3-2 en gel d'agarose à pH 8.2. Coloration par l'amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff (PAS) et le bleu de toluidine (BT).

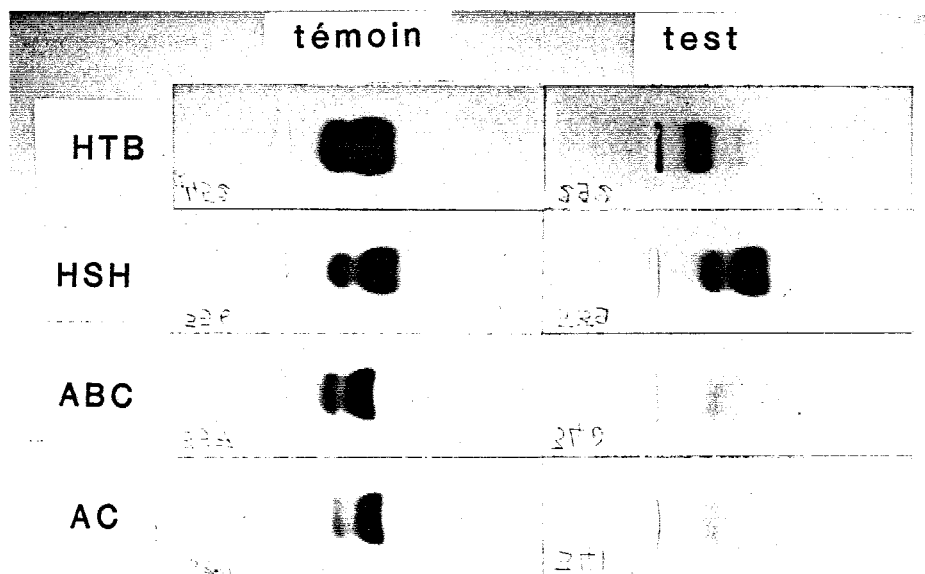


Figure 53 : Electrophorèse analytique en gel d'agarose de la fraction F3-2 avant (témoin) et après (test) action de divers enzymes: hyaluronidase testiculaire de Boeuf (HTB), hyaluronidase de *Streptomyces hyalurolyticus* (HSH), chondroïtinase ABC (ABC) et chondroïtinase AC (AC). Coloration par le bleu de toluidine.

B/ PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRACTIONS F3-2A ET F3-2B

Les résultats de la composition chimique sont présentés dans le tableau XXI. L'éluat obtenu à partir du segment de gel prélevé après électrophorèse pour servir de blanc d'extraction n'a pas permis, après dialyse et lyophilisation, de recueillir la moindre trace de matériel; dans ces conditions il est donc peu vraisemblable que les résultats de la composition chimique puissent être beaucoup affectés en raison du choix de l'agarose comme support d'électrophorèse préparative.

La teneur en acides aminés de la fraction rapide F3-2B est faible (7.84g/100g, poids sec). Sérine et glycolle représentent à eux deux 48% de l'ensemble des acides aminés. Dans la fraction lente F3-2A, la teneur en acides aminés est plus élevée (20.33g/100g, poids sec), avec 22.5% d'acides aminés hydroxylés et 20.6% d'acides aminés dicarboxyliques.

La composition glucidique de la fraction F3-2B indique que le galactose et la N-acétylgalactosamine sont les sucres principaux; le xylose est moins abondant, et un peu de glucose est également détecté. Dans la fraction F3-2A, la composition est différente: en plus des sucres présents dans la fraction F3-2B, on y trouve aussi du fucose, un peu de mannose, ainsi que de l'acide sialique, ce qui vient confirmer les résultats de l'action de la neuraminidase sur cette fraction. Les proportions de galactose et de N-acétylglucosamine sont plus élevées et celles du xylose et de N-acétylgalactosamine plus faibles que dans la fraction F3-2B.

Des groupements sulfate sont présents dans les deux fractions, un peu plus dans la fraction F3-2B que dans la fraction F3-2A. Etant donné la faible quantité de matériel disponible dans ces deux fractions, l'enregistrement des spectres infrarouge n'a été réalisé que sur la fraction F3-2 éluee de la colonne de Sephacryl S-300. Les spectres obtenus (Fig. 54) ont été comparés à ceux de glycosaminoglycannes purs du commerce (Miles Laboratories): le spectre obtenu à partir de la fraction F3-2, comme à partir de chondroïtine-4-sulfate pur, montre l'existence d'une bande d'absorption à  $1230\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée à la vibration de valence de la liaison  $\text{S} = \text{O}$  du groupe sulfate (Lloyd et al., 1961).

Des acides uroniques sont présents dans les fractions F3-2A et F3-2B, avec cependant une plus forte teneur dans cette dernière fraction. Les résultats d'acides uroniques apparaissant dans le tableau XXI sont des ré-

	FRACTION F3-2A		FRACTION F3-2B	
ACIDES AMINES	$\mu\text{mol/g}$ (poids sec)	mol/100mol	$\mu\text{mol/g}$ (poids sec)	mol/100mol
Asp	198	10.26	74	8.78
Thr	242	12.57	36	4.31
Ser	191	9.94	201	23.79
Glu	199	10.35	65	7.73
Pro	180	9.36	44	5.25
Gly	157	8.17	204	24.19
Ala	137	7.12	47	5.56
Val	104	5.41	44	5.17
Met	29	1.51	-	-
Ile	66	3.44	26	3.11
Leu	144	7.49	31	3.67
Tyr	24	1.23	14	1.61
Phe	92	4.75	29	3.41
Lys	81	4.21	16	1.89
His	39	2.03	13	1.52
Arg	41	2.14	-	-
Acides aminés totaux g/100g (poids sec)	20.33		7.84	
SUCRES	$\mu\text{mol/g}$ (poids sec)	rapport molaire †	$\mu\text{mol/g}$ (poids sec)	rapport molaire †
Fuc	410	7.8	-	-
Xyl	50	1.0	150	1.0
Man	60	1.2	-	-
Gal	1230	23.8	810	5.5
Glc	60	1.2	120	0.8
GalNAc	290	2.0	650	4.4
GlcNAc	670	4.5	110	0.7
NANA	400	7.7	-	-
Acides hexuroniques <sup>φ</sup>	250	4.9	740	4.4
Sulfate	320	6.1	740	5.0

† : le rapport molaire est exprimé en moles par moles de xylose

φ : les acides hexuroniques sont exprimés en acide glucuronique, avec correction pour tenir compte de l'interférence due au galactose



Tableau XXI : Composition chimique des fractions F3-2A et F3-2B séparées par électrophorèse préparative en gel d'agarose.

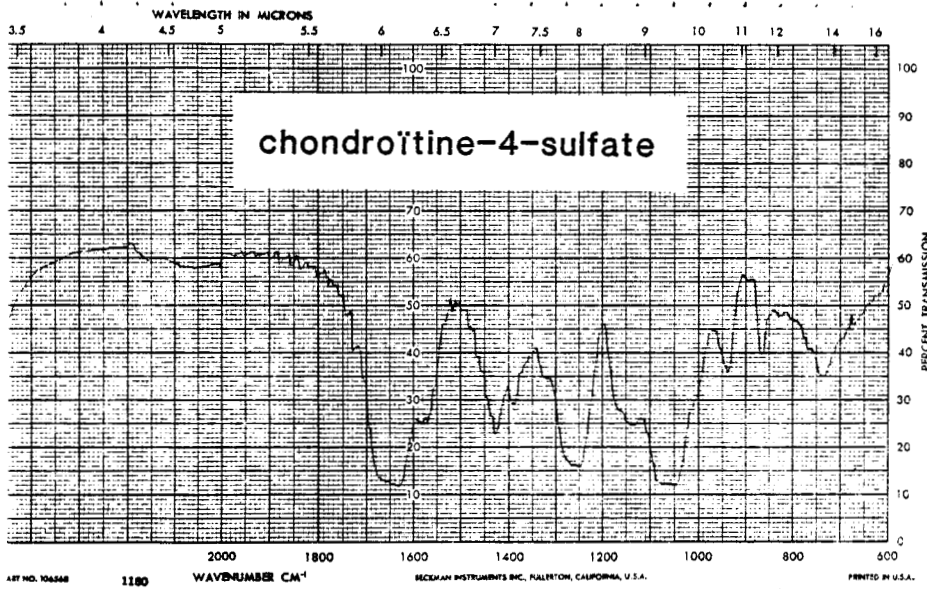
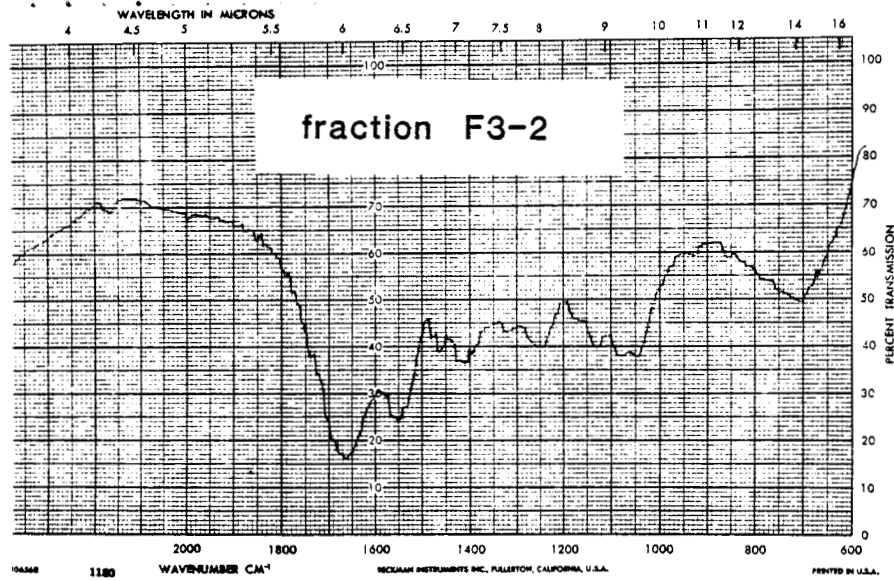


Figure 54 : Spectres infrarouge de la fraction F3-2 et d'un standard de chondroïtine-4-sulfate. Chaque spectre a été réalisé sur une pastille confectionnée par mélange de 1mg d'échantillon avec 150mg de bromure de potassium anhydre (qualité spectroscopique, Merck). L'enregistrement a été fait sur un spectrophotomètre Beckman Acculab I.

sultats corrigés pour tenir compte, au cours du dosage avec le carbazole, de l'interférence due au galactose également présent dans ces fractions: il a en effet été établi qu'à concentrations équimoléculaires l'acide glucuronique et le galactose donnent, lors du dosage au carbazole selon Bitter et al. (1962), une coloration dont les intensités sont dans le rapport 7.8/1. L'examen des spectres d'absorption des complexes colorés (Fig. 55) permet de constater la bonne ressemblance existant entre le spectre donné par la fraction F3-2B et ceux que donnent l'acide glucuronique ou des standards purs de glycosaminoglycannes (chondroïtine-4-sulfate et acide hyaluronique); il y a en particulier identité des longueurs d'onde des maxima d'absorption ( $\lambda_{\max} = 512$  à  $517\text{nm}$ ). Le spectre que donne la fraction F3-2A est nettement différent, et se rapproche davantage de celui obtenu à partir du galactose pur dont la  $\lambda_{\max}$  est  $532\text{nm}$ . En outre, lorsque l'on compare les rapports d'absorbance  $A_{510\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$ , la valeur calculée pour la fraction F3-2B (2.55) est plus proche de celle du chondroïtine-4-sulfate (3.28) que ne l'est celle de la fraction F3-2A (0.83).

### C/ DISCUSSION

Les glycosaminoglycannes constituent une famille de polysaccharides hétérogènes à caractère polyanionique, résultant de l'enchaînement d'un nombre élevé d'unités disaccharidiques, elles mêmes généralement constituées par une molécule de N-acétylhexosamine (N-acétyl-D-glucosamine ou N-acétyl-D-galactosamine), éventuellement sulfatée, liée à une molécule d'acide hexuronique (essentiellement l'acide D-glucuronique, plus rarement l'acide L-iduronique; dans le keratane-sulfate cependant, du galactose se substitue à l'acide uronique).

Partant de l'expectoration d'un enfant atteint de mucoviscidose, des fractions contenant des glycosaminoglycannes ont été isolées selon un protocole comportant une filtration sur Sepharose CL-2B, une hydrolyse par la nucléase et la pronase et une nouvelle filtration sur Sephacryl S-300. Deux fractions glycoprotéiques principales ont été obtenues (F3-2 et F3-3), la fraction la moins importante F3-2 présentant cependant le rapport acides uroniques/hexoses le plus élevé, et contenant moins de protéines que la fraction la plus abondante (F3-3). Du fait de son hétérogénéité à l'électrophorèse, la fraction F3-2 a été fractionnée par électrophorèse préparative

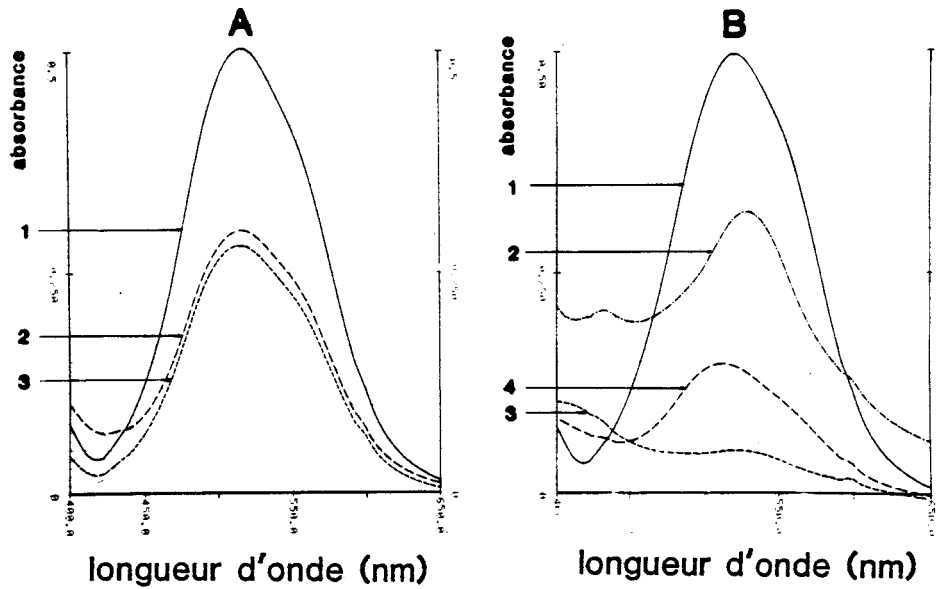


Figure 55 : Spectres d'absorption des complexes obtenus par la réaction au carbazole sulfurique en présence de borate. Partie A : 1 = acide glucuronique (40µg); 2 = chondroïtine-4-sulfate (100µg); 3 = acide hyaluronique (100µg). Partie B : 1 = acide glucuronique (40µg); 2 = galactose (200µg); 3 = fraction F3-2A (67µg); 4 = fraction F3-2B (81µg).

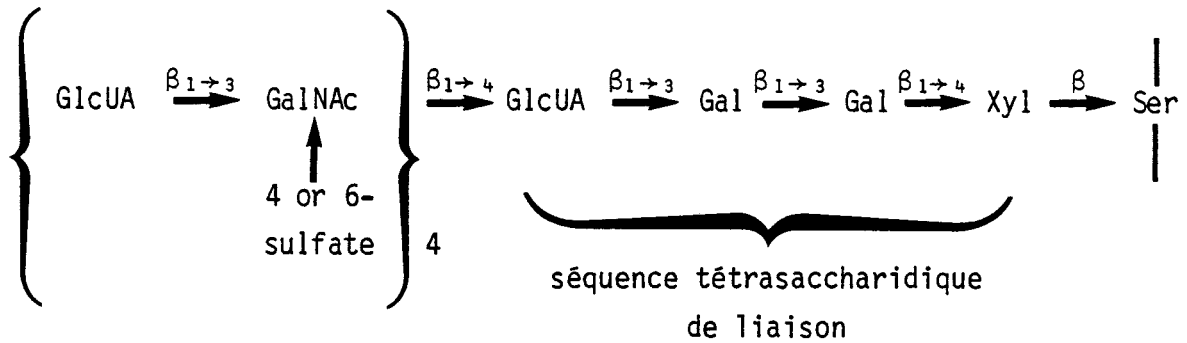


Figure 56 : Structure d'une courte chaîne de chondroïtine-sulfate montrant la séquence tétrasaccharidique qui lui permet de se lier à l'axe peptidique au sein d'un protéoglycane.



en agarose en deux composants (F3-2A et F3-2B).

La fraction F3-2B, présentant la mobilité électrophorétique la plus élevée, n'est colorée que par le bleu de toluidine. Elle est dégradée sous l'action de la hyaluronidase testiculaire et des chondroïtinases ABC et AC, mais résiste à l'attaque par la hyaluronidase de Streptomyces hyalurolyticus. Etant donné la spécificité absolue de cet enzyme pour l'acide hyaluronique, cette observation permet d'établir la non-identité de la fraction F3-2B et de l'acide hyaluronique.

A l'analyse chimique, la fraction F3-2B apparaît essentiellement composée de sucres parmi lesquels galactose, N-acétylgalactosamine et acides uroniques sont respectivement dans un rapport molaire de 5.5, 4.4 et 4.4 par rapport au xylose. Les groupes sulfate, dont la présence dans la fraction F3-2 a également été établie par l'étude des spectres d'absorption infrarouge, et la sérine sont, toujours par rapport au xylose, respectivement dans le rapport molaire 5.0 et 1.3.

Ces différentes observations pourraient s'interpréter par la présence de protéoglycannes relativement courts et comportant des chaînes de chondroïtine-sulfate. La longueur moyenne des chaînes polysaccharidiques, calculée sur la base des rapports molaires au xylose, serait d'environ 4 motifs disaccharidiques de chondroïtine-sulfate auxquels viendrait s'ajouter la séquence tétrasaccharidique habituelle glucuronosyl-galactosyl-galactosyl-xylose connue pour assurer dans les protéoglycannes la liaison covalente des chaînes glycaniques sur un résidu de sérine de la chaîne polypeptidique. La structure représentée à la figure 56, que l'on trouve dans les protéoglycannes contenant des chaînes de chondroïtine-sulfate, pourrait ainsi être représentative d'une partie des composants présents dans la fraction F3-2B.

La présence de glycosaminoglycannes type keratane pourrait en outre rendre compte d'une partie du galactose et de la N-acétylglucosamine présents dans la fraction F3-2B. Etant donné qu'après hydrolyse de cette fraction par la hyaluronidase testiculaire ou par les chondroïtinases, il ne reste plus de matériel présentant d'affinité pour le bleu de toluidine, il est possible que ces chaînes de kérateane soient peu ou pas sulfatées. Le fait que les résidus de galactose soient plus nombreux que ne l'exigerait la présence de chaînes de chondroïtine-sulfate et de kérateane n'est pas sur-

prenant: une telle éventualité a déjà été rapportée, en particulier dans certains protéoglycannes à chaînes de kératane, et il est admis que ces résidus supplémentaires de galactose en position indéterminée se brancheraient latéralement sur la chaîne polysaccharidique (Roden, 1980). On peut aussi admettre que, comme dans le cartilage, la fraction F3-2B comporte des molécules à structure hybride, contenant à la fois des chaînes de chondroïtine-sulfate et des chaînes de kératane reliées par liaison covalente à un polypeptide central. Compte tenu de sa faible proportion d'acides aminés, la fraction F3-2B correspondrait alors à des résidus de protéoglycannes fortement dégradés, avec des chaînes courtes de chondroïtine-sulfate et de kératane-sulfate.

La fraction F3-2A, qui migre plus lentement que la fraction F3-2B, apparaît hétérogène à l'électrophorèse prenant à la fois l'amidoschwarz, le PAS et le bleu de toluidine. Elle est plus riche en acides aminés (20g/100g, poids sec), avec 22.5% d'hydroxyaminoacides et 20.6% d'acides aminés dicarboxyliques. L'ensemble thréonine + sérine + proline + glycolle + alanine représente 47% des acides aminés totaux, et la cystéine est absente. Cette fraction est fortement glycosylée, contenant du galactose, des N-acétylhexosamines, du fucose, de l'acide sialique et des groupes sulfate. Malgré la présence d'un peu de mannose et d'une quantité non négligeable d'acides aspartique et glutamique, ces caractéristiques chimiques, électrophorétiques et tinctoriales suggèrent la présence dans cette fraction de glycopeptides provenant de glycoprotéines acides du type des mucines. Cette constatation serait donc une indication que dans l'expectoration étudiée une partie des mucines aurait été dégradée en glycopeptides sous l'action d'enzymes protéolytiques. Enfin, la sensibilité partielle de la fraction F3-2A à l'action des chondroïtinases, jointe à l'existence de faibles quantités de xylose et d'acides uroniques, suggèrent aussi la présence de glycosaminoglycannes dans cette fraction.

A notre connaissance, il s'agit ici de la première description de protéoglycannes ou de glycosaminoglycannes dans les sécrétions bronchiques recueillies au cours de la mucoviscidose. Nos résultats suggèrent que ces glycosaminoglycannes seraient constitués principalement de chaînes de chondroïtine-sulfate, avec des chaînes de kératane associées au sein de protéo-

glycannes de petite taille, et donc fortement dégradés. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec ceux de Sahu et al. (1978a, 1978b, 1978c, 1980a) qui ont montré que l'acide hyaluronique était le seul glycosaminoglycane retrouvé dans les sécrétions pulmonaires des malades atteints de mucoviscidose, d'asthme ou de protéinose alvéolaire. En effet, ces travaux ont tous été réalisés à partir de liquides de lavage broncho-alvéolaire, et l'on sait que l'acide hyaluronique est un produit sécrété par les pneumocytes foetaux humains de type II en culture, cellules qui, sur le plan métabolique, sont les plus actives de l'épithélium alvéolaire (Sahu et al., 1980b, 1980c).

L'origine et la signification biologique des protéoglycannes dans l'expectoration restent inconnues. Leur présence peut cependant, selon Sahu et al. (1980d), être considérée comme l'indication d'une lésion pulmonaire. Dans cette optique, l'identification de glycosaminoglycannes dans l'expectoration d'un malade atteint de mucoviscidose pourrait être le reflet moléculaire des remaniements épithéliaux bronchiques observés dans cette maladie; en particulier des lésions des membranes basales peuvent constituer des brèches par lesquelles des composants du tissu conjonctif sous-jacent pourraient s'échapper vers la lumière bronchique. Il serait à cet égard intéressant de rechercher si la présence de protéoglycannes à chaînes de chondroïtine-sulfates se retrouve aussi dans d'autres bronchopathies, ou si au contraire elle présente une certaine spécificité pour la mucoviscidose.

Au cours de ce travail sur les constituants solubles de l'expectoration recueillie chez un enfant atteint de mucoviscidose, nous n'avons pu en aucun cas caractériser la présence d'acide hyaluronique, substance qui, selon l'hypothèse de départ et à l'image de ce que l'on connaît des protéoglycannes des tissus cartilagineux, aurait pu constituer un facteur supplémentaire d'association des mucines au sein du mucus bronchique. Cette étude a néanmoins permis d'isoler des glycosaminoglycannes qui ont été identifiés comme étant constitués de chaînes de chondroïtine-sulfate et de kératane-sulfate probablement associées sous forme de protéoglycannes de taille réduite. La présence de ces protéoglycannes dans l'expectoration pourrait être une indication de l'étendue des lésions sous-jacentes de la muqueuse bronchique.

**DISCUSSION GENERALE**

**ET CONCLUSION**

Les glycoprotéines du type des mucines, qui constituent le principal composant macromoléculaire des sécrétions bronchiques, et dont on ignore toujours l'organisation moléculaire exacte, demeurent aujourd'hui encore l'objet de très nombreuses recherches. Elucider leur structure représente en effet une question d'importance primordiale: cette connaissance doit permettre non seulement de mieux comprendre les propriétés du mucus bronchique (en particulier son rôle dans le transport mucociliaire), mais aussi de mieux saisir la pathogénie de l'encombrement bronchique et, partant de là, de mieux définir les orientations thérapeutiques à prendre au cours des diverses bronchopathies.

L'examen de la littérature (première partie du mémoire) nous a permis d'enregistrer un certain nombre de divergences dans les conceptions émises sur l'organisation macromoléculaire des mucines. Parmi les différents schémas de structure proposés figure le modèle de Roberts (1978a, Fig. 16) dans lequel les sous-unités glycoprotéiques sont organisées en structures filamenteuses par association covalente avec des protéines de liaison non glycosylées qui assurent en outre le pontage entre chaînes adjacentes grâce à des ponts disulfure et à des liaisons non covalentes. Ce modèle, qui confère aux liaisons disulfure une responsabilité importante dans la cohésion macromoléculaire, ne permet cependant pas de rendre compte de la résistance d'un certain nombre de préparations de mucines aux agents réducteurs (Roberts, 1974; Feldhoff et al., 1979; Rose et al., 1979; Mian et al., 1982). Lamblin et al. (1979) ont montré qu'au microscope électronique les mucines bronchiques obtenues par réduction du mucus présentent une grande hétérogénéité de taille. Cette hétérogénéité pourrait, selon les auteurs, résulter d'une protéolyse activée par les agents réducteurs.

Le premier objectif que nous nous sommes donné au cours de ce travail (deuxième partie du mémoire) était, à la lumière de cette dernière hypothèse, de réexaminer le mode d'action des agents réducteurs sur les mucines bronchiques. Compte tenu du fait que le comportement des mucines vis-à-vis des réducteurs pouvait être différent dans la phase soluble et dans la

phase fibrillaire du mucus bronchique, ces deux phases ont été explorées successivement.

Les résultats ont montré qu'en milieu dissociant, les agents réducteurs entraînent une diminution très sensible de la taille et de la masse moléculaires des mucines à la fois dans la phase soluble et dans la phase fibrillaire. Les mucines réduites dans ces conditions présentent cependant une hétérogénéité de taille et de charge électrique. L'analyse chimique montre une teneur encore élevée en acides aminés, avec présence de mannose. Ces résultats indiquent donc de façon indiscutable que des ponts disulfure ont été rompus sous l'action du mercaptoéthanol en milieu dissociant. Cependant, étant donné la faible teneur des mucines en cystéine, on peut se demander si une partie des ponts disulfure n'appartient pas à des structures protéiques de plus faible poids moléculaire, jouant peut-être le rôle de facteurs de liaison, et associées aux mucines par des liaisons non covalentes malgré la présence de guanidine/HCl 6M.

En milieu non dissociant, la diminution de taille moléculaire après action du mercaptoéthanol est encore plus importante que celle observée en guanidine/HCl 6M. Les mucines obtenues apparaissent plus homogènes par la taille comme par la mobilité électrophorétique. La teneur en glucides est nettement plus élevée, et celle des acides aminés plus faible; il n'y a plus de mannose; la proportion des acides aminés hydroxylés est plus élevée et celle des acides aminés dicarboxyliques plus faible qu'en milieu dissociant.

De ces résultats, il ressort que la rupture de ponts disulfure, qui rend compte de l'action des réducteurs en milieu dissociant, ne peut suffire à elle seule pour expliquer la dégradation plus importante des mucines obtenues par réduction en milieu non dissociant. La possibilité dans certains mucus d'une mucolyse activée par les agents réducteurs doit être envisagée; un certain nombre d'éléments montrent que cette activité mucolytique est de nature enzymatique:

- les différences de composition chimique des mucines obtenues après réduction du mucus en milieu dissociant ou non dissociant;

- l'inhibition partielle du phénomène en présence de PMSF, inhibiteur des sérine-protéases, ou après chauffage à 100°C;

- l'inhibition en présence de guanidine/HCl 6M;

- le fait que la phase soluble Lak..., spontanément peu sensible à l'action des réducteurs, subisse une dissociation plus importante après mélange avec une phase soluble où cette activité mucolytique existe. Ce fait indique en outre que la sensibilité des mucus aux agents réducteurs, et donc leur contenu en protéases, peut varier d'une sécrétion à l'autre.

Le deuxième objectif poursuivi au cours de ce travail a été de rechercher une nouvelle méthode de solubilisation des mucines bronchiques. Des résultats obtenus précédemment, il découle en effet que si l'utilisation des agents réducteurs est une méthode très efficace pour solubiliser la phase fibrillaire du mucus, il n'en reste pas moins qu'elle constitue aussi une méthode dégradante non seulement du fait de la rupture de ponts disulfure, mais aussi en raison de la protéolyse induite par les agents à thiol. L'observation faite par Feldhoff et al. (1979) qu'une part importante de la sécrétion trachéobronchique pouvait être solubilisée après agitation dans 10 volumes d'eau, nous a, dans ces conditions, amené à examiner l'influence de l'hydratation du mucus sur la solubilisation des mucines bronchiques.

Les résultats obtenus ont confirmé l'observation de Feldhoff et al. (1979) qu'une large part (plus de 90%) des composants macromoléculaires du mucus peut être solubilisée par agitation en présence de 12 volumes d'eau distillée. Ces résultats montrent que le concept de phase fibrillaire immuable au sein du mucus n'est probablement pas exact puisqu'à la limite presque tout le mucus peut être solubilisé par l'eau.

Cette partie du travail a permis en outre de préciser que l'expectoration des sujets atteints de bronchiectasie est en moyenne plus pauvre en composants macromoléculaires totaux que celle des sujets atteints de bronchite chronique ou de mucoviscidose. Par ailleurs, les composants macromoléculaires sont beaucoup moins solubles au cours de la mucoviscidose qu'au cours de la bronchite chronique.

Après avoir montré l'inconvénient qu'il y a à utiliser les agents réducteurs pour l'étude ultérieure des mucines, et après avoir testé l'efficacité de l'extraction des mucines par 12 volumes d'eau distillée, il apparaissait intéressant, comme objectif N° 3 de ce travail, d'isoler des mucines bronchiques selon cette dernière méthode non dégradante, et d'étudier

leurs propriétés physico-chimiques. Leur aspect au microscope électronique a été étudié selon trois procédés d'examen différents. Par ailleurs, la lyophilisation étant une étape pouvant entraîner des modifications irréversibles de la conformation des molécules, deux protocoles légèrement différents de préparation des mucines ont été adoptés, l'un comportant une étape de lyophilisation, tandis que dans l'autre la lyophilisation a été remplacée par une étape de concentration sur membrane poreuse.

Dans les fractions lyophilisées, les mucines ne pénètrent pas dans le gel d'électrophorèse mais elles sont associées à des composants de faible masse moléculaire, de nature peptidique et de nature glycolipidique. Le fait qu'après réduction en présence de SDS à 100°C, il n'apparaît pas de composants protéiques supplémentaires, ne plaide pas en faveur d'un modèle dans lequel les mucines résulteraient de l'association de sous-unités avec une protéine de liaison. La teneur en lipides est importante (20 à 40%), plus élevée au cours de la mucoviscidose qu'au cours de la bronchite chronique; ces lipides, qui sont constitués de phospholipides, de glycolipides, de cholestérol, d'acides gras et de triglycérides, peuvent être extraits par délipidation. Au microscope électronique, les mucines lyophilisées, exclues du gel de Sepharose CL-2B, montrent après étalement par le cytochrome C des formes filamenteuses mais aussi des agrégats en forme de buissons; seules les formes filamenteuses sont visibles par la technique de réplique métallique.

Dans les fractions de mucines non lyophilisées, aucune forme en buissons n'a pu être caractérisée; par contre, après ombrage au tungstène, il apparaît des filaments de 200 à 1000nm. La coloration négative ou l'étalement par le cytochrome C permettent de déceler fréquemment des micelles plus ou moins sphériques, de taille importante, polydispersées, pouvant aller jusqu'à 300nm et qui apparaissent riches en lipides. Après délipidation, les mucines gardent leur conformation filamenteuse polydispersée mais il y a disparition des micelles lipidiques. Il en résulte que l'association des lipides aux mucines est de type non covalent.

L'étude du coefficient de sédimentation des fractions de mucines non lyophilisées et délipidées montre qu'en tampon non dissociant 75% du matériel sédimente rapidement sous forme d'agrégats, tandis que le reste sédimente avec un coefficient  $S_{20,w}$  de 13.8 en tampon acétate, et de 9.8 en présence de glycérol à 50%; en présence de guanidine/HCl 6M, les



agrégats se dissocient totalement en protomères et sédimentent avec un coefficient  $S_{20,w}$  de 13; la comparaison du coefficient de sédimentation mesuré et corrigé avec le coefficient de sédimentation calculé à partir des données morphologiques indique que les mucines en solution adoptent une conformation plutôt compacte. De cet ensemble de données, il ressort que, selon le solvant, les mucines bronchiques peuvent se présenter soit sous forme d'agrégats, soit sous forme d'entités macromoléculaires dissociées, soit encore sous ces deux aspects à la fois. Ce polymorphisme des mucines pourrait expliquer, en partie du moins, un certain nombre de divergences qui existent dans la littérature sur les caractéristiques de ces substances.

La découverte dans certains mucus de substances ressemblant à des glycosaminoglycannes nous a incité à rechercher, comme dernier objectif de ce mémoire (quatrième partie), si de l'acide hyaluronique ne pouvait pas, en jouant le même rôle structural qu'au sein des protéoglycannes du cartilage, constituer un facteur d'association des mucines bronchiques. S'il n'a pas été possible d'identifier de l'acide hyaluronique, par contre, des protéoglycannes fortement dégradés, contenant des chaînes de chondroïtine-sulfate et peut-être de kératane, ont été caractérisés dans l'expectoration d'un sujet atteint de mucoviscidose. Ces protéoglycannes, dont la présence dans les sécrétions bronchiques pourrait traduire l'existence de lésions de la membrane basale de l'épithélium, peuvent être, en raison de leur faible masse moléculaire, facilement dissociés des mucines: ils ne semblent donc jouer aucun rôle dans l'organisation moléculaire des mucines bronchiques.

Dans l'état actuel des choses, il n'est pas possible de proposer un modèle d'organisation des mucines bronchiques. Néanmoins, compte tenu des résultats exposés dans ce mémoire, il apparaît possible de retenir quelques éléments fondamentaux de leur structure:

1) les mucines bronchiques adoptent en solution une conformation filamenteuse aléatoire plutôt ramassée, et manifestent une tendance importante à l'agrégation lorsque le degré d'hydratation du milieu diminue. Le modèle "moulin à vent", proposé par Allen (1983a) dans le cas des mucines gastriques, ne peut donc être considéré comme un modèle universel d'organisation des mucines;

2) des interactions non covalentes existent entre mucin-

nes et peptides ou protéines; de la même façon, il est maintenant établi que d'autres interactions non covalentes se font avec des lipides, sans qu'il soit toutefois possible de préciser dans quelle mesure et sous quelle forme ces substances sont impliquées dans la structuration du mucus; il est remarquable que ces interactions sont suffisamment stables pour résister à l'action d'agents dissociants tels que la guanidine/HCl 6M;

3) pour expliquer l'hétérogénéité de longueur des filaments observés en microscopie électronique, deux hypothèses peuvent être formulées:

a) les mucines pourraient être synthétisées sous forme de longs filaments de taille homogène, et ensuite être plus ou moins dégradées pendant ou après leur sécrétion;

b) à l'inverse, les mucines pourraient être synthétisées sous forme de monomères de plus faible poids moléculaire et être ultérieurement polymérisées par l'intermédiaire de liaisons qui restent cependant encore à définir;

4) le mécanisme de polymérisation des monomères de mucines met en jeu des liaisons dont la nature demeure imprécise:

a) une organisation résultant de la liaison bout à bout des monomères par l'intermédiaire de ponts disulfure, selon le schéma proposé pour les mucines cervicales par Carlstedt et al. (1983b), peut être envisagée. Nos résultats seraient en effet compatibles avec l'existence de quelques ponts disulfure dans l'organisation des mucines; cependant, une telle organisation résultant de l'enchaînement de motifs identiques s'accorde mal avec la grande hétérogénéité des sous-unités obtenues après action des agents réducteurs;

b) d'autres types de liaisons croisées, telles que celles qui pourraient résulter de l'action d'une transglutaminase, devraient être maintenant recherchées.

Quoi qu'il en soit, qu'il y ait ou non des ponts disulfure dans les mucines bronchiques, notre contribution expérimentale a permis de préciser le mode d'action des agents réducteurs lors de la mucolyse: outre leur action de clivage éventuel de ponts disulfure, les réducteurs manifestent la propriété dans certains mucus d'activer un ou des systèmes protéolytiques reconnaissant comme substrat les mucines. Le mécanisme exact de cette activation reste encore hypothétique. Malgré l'abondante littérature déjà parue

sur ce sujet, beaucoup de travail reste donc encore à faire dans le domaine des glycoprotéines du type des mucines avant que ne soit parfaitement comprise leur organisation macromoléculaire.

# APPENDICE TECHNIQUE

## S O M M A I R E      T E C H N I Q U E

\*\*\*\*\*

	Page
<u>I. TRAITEMENT DES EXPECTORATIONS</u>	
A/ Préparation des phases soluble et fibrillaire du mucus bronchique .....	214
B/ Extraction du mucus bronchique par dilution au 1/12è dans l'eau .	214
<u>II. FRACTIONNEMENT DES COMPOSANTS DU MUCUS BRONCHIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION</u>	
A/ Sur colonne de Sepharose CL-2B .....	215
B/ Sur colonne de Sephacryl S-300 .....	215
<u>III. REDUCTION DES MUCINES BRONCHIQUES</u>	
A/ Dans la phase soluble .....	216
B/ Dans le gel fibrillaire .....	216
<u>IV. INACTIVATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE ENDOGENE DE LA PHASE SOLUBLE DU MUCUS BRONCHIQUE</u>	
A/ Par la chaleur .....	217
B/ Par les inhibiteurs de protéases .....	217
<u>V. HYDROLYSES ENZYMATIQUES</u>	
A/ Action de la nucléase .....	217
B/ Action de la pronase .....	218
C/ Action de la neuraminidase .....	218
D/ Action des hyaluronidases .....	219
E/ Action des chondroïtinases .....	220
<u>VI. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES</u>	
A/ Electrophorèse analytique en gel d'agarose .....	221
B/ Electrophorèse analytique de polyacrylamide-SDS .....	222

	Page
C/ Electrophorèse préparative en gel d'agarose .....	222
<u>VII. COMPOSITION EN ACIDES AMINES : CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE</u>	
<u>D'IONS</u> .....	223
<u>VIII. TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DES GLYCOCONJUGUES</u>	
A/ Teneur en oses combinés : réaction à l'orcinol sulfurique .....	224
B/ Teneur en acides uroniques : réaction au carbazole sulfurique ..	224
C/ Composition glucidique : technique de chromatographie en phase gazeuse .....	228
D/ Dosage de l'acide sialique .....	229
E/ Dosage des groupements sulfate .....	229
<u>IX. TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DU MUCUS BRONCHIQUE</u>	
A/ Méthodes d'extraction des lipides .....	230
B/ Composition lipidique .....	231
<u>X. DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES MUCINES PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE</u>	
.....	232
<u>XI. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u>	
A/ Méthode d'ombrage macromoléculaire .....	232
B/ Méthode d'étalement au cytochrome C .....	233
C/ Méthode du contraste négatif .....	233

## I. TRAITEMENT DES EXPECTORATIONS.

Chaque expectoration étudiée a été recueillie tous les jours pendant un mois et conservée à l'état congelé (-20 °C) jusqu'à son utilisation. Les expectorations ont été traitées selon deux méthodes différentes.

### A/ PREPARATION DES PHASES SOLUBLE ET FIBRILLAIRE DU MUCUS BRONCHIQUE

Après décongélation, les échantillons sont réunis et lavés pendant une heure sous agitation mécanique douce en présence de trois volumes de sérum physiologique. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 30mn à 4000g, donnant un surnageant appelé phase soluble et un culot appelé phase fibrillaire.

Phase soluble et phase fibrillaire sont dialysées pendant trois jours à 4°C contre de l'eau distillée (renouvelée matin et soir), lyophilisées et pesées.

Pour l'étude ultérieure du matériel ainsi recueilli, les échantillons sont placés sous agitation douce pendant 2h (phase soluble) ou 4h (phase fibrillaire) à la température du laboratoire en présence du tampon choisi en fonction de l'étude, à la concentration de 20mg/ml (phase soluble) ou 10mg/ml (phase fibrillaire).

### B/ EXTRACTION DU MUCUS BRONCHIQUE PAR DILUTION AU 1/12<sup>e</sup> DANS L'EAU

Après décongélation, le mucus est dilué au 1/12<sup>e</sup> dans l'eau distillée et agité à 4°C pendant une nuit. Le mélange obtenu est centrifugé à 3000g pendant 30mn. Le surnageant et le culot (contenant des débris cellulaires) sont directement lyophilisés et pesés.

Dans certaines expériences cependant, là où l'on souhaite examiner au microscope électronique des préparations dans un état aussi proche que possible de leur état natif, et donc où la lyophilisation était à éviter, le surnageant est concentré par passage sur filtre microporeux cellulosique (filtre Amicon DP02, diamètre moyen des pores: 0.2µm) préalablement lavé par de la guanidine/HCl 6M, puis par de l'eau. Le filtrat est directement lyophilisé, tandis que la fraction retenue sur le filtre est dialysée pendant 2 jours contre de la guanidine/HCl 6M, puis concentrée pour obtenir

une solution qui sera déposée directement comme échantillon sur une colonne de chromatographie.

## II. FRACTIONNEMENT DES COMPOSANTS DU MUCUS BRONCHIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION.

### A/ SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL-2B

Le gel de Sepharose CL-2B (Pharmacia), suspendu dans le tampon d'élution, est coulé dans une colonne de verre (colonne Kontes, 50 x 2.5cm, équipée d'un disque de verre fritté de porosité médium), sur une hauteur de 48cm. La colonne est équilibrée dans le tampon d'élution.

100 à 150mg de l'échantillon à analyser, déposés sous un volume de 5ml (phase soluble) ou de 10ml (phase fibrillaire), sont élués de la colonne par le tampon d'élution (soit tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0; soit guanidine/HCl, 6M), avec un débit de 25ml/h et à la température du laboratoire. L'éluat est recueilli sur un collecteur de fractions réglé pour un volume de 5ml. Pour chaque fraction, l'absorbance à 278nm et la teneur en hexoses sont mesurées, ce qui permet de tracer les diagrammes d'élution correspondants de l'échantillon.

En fonction de ces diagrammes, les fractions sont réunies, dialysées à 4°C contre de l'eau distillée, lyophilisées et pesées. Cependant, certaines fractions destinées à être examinées en microscopie électronique ne sont pas lyophilisées, mais concentrées sur filtre Amicon DPO2 jusqu'à l'obtention d'une concentration de 1mg/ml environ en composants macromoléculaires.

### B/ SUR COLONNE DE SEPHACRYL S-300

Le gel de Sephacryl S-300 (Pharmacia), suspendu dans le tampon d'élution, est coulé dans une colonne de verre (colonne Kontes, 100 x 2.5cm, équipée d'un disque de verre fritté de porosité médium) sur une hauteur de 95cm. La colonne est équilibrée en tampon Tris 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0.

L'échantillon, à la concentration de 20mg/ml, est élué par le tampon avec un débit de 25ml/h, à la température du laboratoire. Des fractions de 10ml sont collectées; leur absorbance à 278nm est mesurée de même



que leur teneur en hexoses (dosage à l'orcinol) et en acides uroniques (dosage au carbazole).

En fonction des profils enregistrés, les fractions sont réunies, dialysées et lyophilisées.

### III. REDUCTION DES MUCINES BRONCHIQUES.

Le 2-mercaptoéthanol et l'iodoacétamide (produits Sigma) ont été utilisés respectivement comme agent de réduction et agent d'alkylation.

#### A/ REDUCTION DES MUCINES DE LA PHASE SOLUBLE

##### 1) En tampon non dissociant

100mg de phase soluble lyophilisée sont solubilisés en tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7.3, à la concentration de 20mg/ml par agitation douce pendant 2h à la température du laboratoire, puis incubés pendant 18h à 37°C, toujours sous agitation, en présence de mercaptoéthanol à 1% v/v (0.143M).

Dans une expérience, les mucines réduites ont ensuite été alkylées par incubation à l'obscurité pendant 2h, à la température du laboratoire, en présence d'iodoacétamide 0.2M (concentration finale).

##### 2) En tampon dissociant

100mg de phase soluble lyophilisée sont solubilisés dans une solution de guanidine/HCl 6M à la concentration de 20mg/ml par agitation pendant 2h à la température du laboratoire, puis incubés pendant 18h à 37°C sous agitation en présence de mercaptoéthanol à 1% v/v.

#### B/ REDUCTION DES MUCINES DE LA PHASE FIBRILLAIRE

##### 1) En tampon non dissociant

100mg de mucus fibrillaire sont agités pendant 2h à 37°C dans 10ml de tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7.3, puis réduits en présence de mercaptoéthanol à 1% v/v pendant 24h à 37°C. Après élimination du culot par centrifugation, le surnageant contenant les mucines réduites est dialysé puis lyophilisé.

## 2) En tampon dissociant

100mg de mucus fibrillaire sont solubilisés par agitation 2h à 37°C dans 10ml d'un tampon Tris/HCl 0.3M, pH 8.0, contenant de la guanidine/HCl 6M .

La réduction est obtenue en présence de mercaptoéthanol 0.1M (concentration finale) et agitation pendant 24h à 37°C.

Le mélange est alkylé par agitation pendant 2h à la température du laboratoire en présence d'iodoacétamide 0.36M (concentration finale), puis dialysé et lyophilisé.

## IV. INACTIVATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE ENDOGENE DE LA PHASE SOLUBLE DU MUCUS BRONCHIQUE.

### A/ INACTIVATION PAR LA CHALEUR

L'échantillon (100mg) en solution dans un tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7.3 (20mg/ml) est porté au bain-marie bouillant pendant 20mn.

### B/ INACTIVATION PAR LES INHIBITEURS DE PROTEASES

L'échantillon (100mg), en solution dans un tampon phosphate de sodium 0.075M, pH 7.3 (20mg/ml) est incubé pendant 4h à 37°C sous agitation en présence de PMSF (phényl-méthyl-sulfonyl fluorure, Pierce), à la concentration finale de 0.5mM (solution mère de PMSF = 10mM dans l'isopropanol).

## V. HYDROLYSES ENZYMATIQUES.

### A/ ACTION DE LA NUCLEASE

La nucléase du staphylocoque doré (Micrococcal Nuclease, E.C.3.1.4.7) possède une activité exo- et endo-3'-5'-phosphodiesterase et catalyse l'hydrolyse des acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques en produisant des 3'-nucléosides-phosphates (Alexander et al., 1961).

Une solution mère de l'enzyme (15000 U/mg, Worthington) est préparée à la concentration de 1mg/ml d'eau distillée. La solution de travail

est faite à 20 $\mu$ g/ml de tampon borate de sodium 100mM, pH 8.8, contenant 0.1% de sérumalbumine bovine.

L'échantillon est solubilisé à la concentration de 20mg/ml de tampon borate de sodium 25mM, chlorure de calcium 2.5mM, pH 8.8.

Enzyme et substrat sont mélangés dans le rapport pondéral 1/1000, et incubés, sous agitation douce pendant 6h à 37°C. Le mélange est alors dialysé à 4°C contre de l'eau distillée, et lyophilisé.

### B/ ACTION DE LA PRONASE

La pronase de Streptomyces griseus (protéase type XIV, Sigma) est un enzyme protéolytique non spécifique.

L'enzyme est solubilisé dans l'eau distillée à la concentration de 1mg/ml.

L'échantillon est dissous dans un tampon Tris/acétate 0.15M, chlorure de calcium 2.5mM, pH 7.8 à la concentration de 20mg/ml.

Enzyme et substrat sont mélangés dans le rapport pondéral 1/40, et incubés sous agitation douce à 37°C. Au bout de 24h, une quantité équivalente d'enzyme fraîchement préparé est ajouté au milieu, et l'incubation est poursuivie pendant 12h supplémentaires. Le mélange est alors dialysé à 4°C, additionné d'acide trichloracétique solide jusqu'à la concentration finale de 5% (p/v), et agité pendant une nuit à 4°C. La centrifugation (12 000g, 15mn) permet d'isoler un surnageant et un culot. Ce dernier est ré-extrait par addition d'une solution froide d'acide trichloracétique à 5%, puis le mélange est agité et recentrifugé dans les mêmes conditions. Les surnageants sont combinés, dialysés et lyophilisés.

### C/ ACTION DE LA NEURAMINIDASE

La neuraminidase ou sialidase (mucopolysaccharide N-acétylneuraminylhydrolase, E.C.3.2.1.18) catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques qui assurent la liaison de résidus d'acide N-acétylneuraminique à des structures oligo- ou polysaccharidiques.

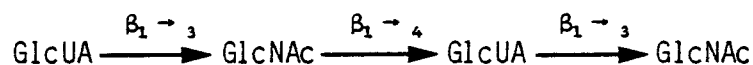
L'enzyme, provenant de Clostridium perfringens (Sigma, type X), est dissous à la concentration de 1U (soit 7 $\mu$ g), dans 20 $\mu$ l d'un tampon acétate de sodium 0.1M, pH 5.0.

L'échantillon (1mg) est dissous dans 80 $\mu$ l de sérum physiologique. Les deux solutions ainsi préparées sont mélangées et incubées pendant 20h à 37°C.

#### D/ ACTION DES HYALURONIDASES

Deux sources d'enzymes différentes ont été utilisées:

1) La hyaluronidase testiculaire de Boeuf (hyaluronate-4-glycanhydrolase, E.C.3.2.1.35) manifeste une activité endo- $\beta$ -N-acétylhexosaminidase. La spécificité de l'enzyme est large: elle catalyse l'hydrolyse de liaisons N-acétylhexosaminiques internes dans l'acide hyaluronique, les chondroïtines sulfates A et C. Sous l'action de cet enzyme, l'acide hyaluronique est dégradé en oligosaccharides de tailles variées, possédant à leur extrémité réductrice un résidu de N-acétylglucosamine: le produit principal est le tétrasaccharide:



Les hexasaccharides et disaccharides, homologues supérieurs et inférieurs de ce tétrasaccharide, sont produits en plus faible proportion.

La hyaluronidase testiculaire de Boeuf (Sigma type VI, 10600 unités NF/mg), (NF = National Formulary), est préparée à la concentration de 1mg/2ml de tampon acétate de sodium 1M, chlorure de sodium 1.5M, pH 5.5.

L'échantillon est solubilisé à la concentration de 20mg/ml de sérum physiologique.

Enzyme et substrat sont mélangés dans le rapport pondéral 1/120, et incubés sous agitation douce, pendant 18h à 37 °C. Le mélange est alors dialysé à 4°C contre de l'eau distillée et lyophilisé.

#### 2) La hyaluronidase de Streptomyces hyalurolyticus

Cette hyaluronidase (hyaluronate lyase, E.C.4.2.2.1) est différente de la hyaluronidase testiculaire. Elle catalyse la rupture des liaisons N-acétylglucosaminiques par une réaction d'élimination, produisant des tétrasaccharides et des hexasaccharides comportant à leur extrémité non

réductrice un résidu d'acide glucuronique  $\Delta$ -4,5-insaturé. La spécificité de l'enzyme est absolue pour l'acide hyaluronique (Ohya et al., 1970; Vaccaro et al., 1979).

La hyaluronidase de Streptomyces hyalurolyticus (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, 2000 TRU/mg), (TRU = "Turbidity Reducing Unit"), est préparée à la concentration de 1mg/12.5ml de tampon acétate de sodium 0.1M, pH 6.0 .

L'échantillon est solubilisé à la concentration de 20mg/ml de sérum physiologique.

Enzyme et substrat sont mélangés dans le rapport pondéral 1/500, et incubés, sous agitation douce pendant 4h à 50 °C. Le mélange est dialysé à 4°C contre de l'eau distillée et lyophilisé.

#### E/ ACTION DES CHONDROÏTINASES

Deux types de chondroïtinases ont été utilisées.

1) La chondroïtinase ABC (chondroïtine ABC lyase, E.C.4.2.2.4) purifiée à partir de Proteus vulgaris, catalyse la dégradation, au cours d'une réaction d'élimination, des chondroïtines sulfates A, B et C en disaccharides  $\Delta$ -4,5-insaturés ( $\Delta$ -Di-4S et  $\Delta$ -Di-6S). L'enzyme est également actif, bien qu'à vitesse plus faible, sur la chondroïtine et l'acide hyaluronique.

L'enzyme (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo) est solubilisé à la concentration de 25 unités/ml de tampon Tris/HCl 0.25M, acétate de sodium 0.18M, chlorure de sodium 0.25M, pH 8.0.

Le substrat est dissous à raison de 20mg/ml de sérum physiologique.

Enzyme et substrat sont mis à incuber dans le rapport 1 unité enzymatique pour 4mg de substrat, pendant 12h à 37°C, puis sont dialysés et lyophilisés.

2) La chondroïtinase AC (chondroïtine AC lyase, E.C.4.2.2.5) purifiée à partir d'Arthrobacter aurescens, catalyse le même type de réaction que la chondroïtinase ABC. Sa spécificité est peu différente: elle reconnaît comme substrat la chondroïtine, les chondroïtines sulfates A et C, et l'acide hyaluronique. Par contre elle reste inactive sur la chondroïtine

sulfate B (Dermatane sulfate) qui se comporte en inhibiteur compétitif de l'enzyme.

L'enzyme (Seikagaku Kogyo Co.,Tokyo) est solubilisé à la concentration de 25 unités/ml de tampon acétate de sodium 0.1M, pH 6.0.

Le substrat est dissous à raison de 20mg/ml de sérum physiologique.

Enzyme et substrat sont mélangés et incubés sous agitation douce, dans le rapport 1 unité enzymatique pour 4mg de substrat pendant 12h à 37°C. Le mélange obtenu est ensuite dialysé et lyophilisé.

## VI. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES.

### A/ ELECTROPHORESE ANALYTIQUE EN GEL D'AGAROSE

La technique employée est une adaptation de la méthode décrite par Scheidegger (1955).

Le support est un gel d'agarose (Indubiose A 45, L'Industrie Biologique Française) à 0.9% dans un tampon véronal de sodium pH 8.2, force ionique 0.1, coulé sur lame de microscope (3ml pour une lame 25 x75mm).

L'échantillon (1mg, solubilisé dans 50 $\mu$ l de sérum physiologique) est soumis à électrophorèse pendant 1h par application d'une différence de potentiel de 20 volts entre les extrémités de la lame, à la température du laboratoire.

Pour l'étude des protéines, les lames sont fixées pendant 2h dans le fixateur de Carnoy (éthanol absolu/chloroforme/acide acétique pur, 6:3:1, v/v), séchées sous papier Whatman No 3 puis colorées pendant 5mn dans l'amidoschwarz (solution à 1% p/v dans le mélange méthanol/eau/acide acétique pur, 6:3:1, v/v).

Pour l'étude des glycoprotéines, les lames sont fixées pendant 2h dans le fixateur de Carnoy, séchées sous papier Whatman No 3, et colorées après oxydation periodique par le réactif de Schiff (Biserte,1957).

Pour l'étude des substances à caractère acide, les lames sont fixées pendant 1h dans une solution aqueuse à 0.1% de Cetavlon, séchées sous papier Whatman No 3 et colorées pendant 15mn par le bleu de toluidine (solution à 0.4% p/v dans le mélange acétone/eau, 8:2, v/v).

## B/ ELECTROPHORESE ANALYTIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS

Le gel de séparation est un gel de polyacrylamide à 15%, coulé en plaque selon la technique de Kerckaert (1978), dans un tampon Tris/HCl 0.76M, pH 8.9 (concentration finale) et en présence de 0.1% de SDS.

Un gel de concentration à 5% de polyacrylamide en tampon Tris/HCl 0.44M, pH 8.8, a été utilisé.

L'électrophorèse est conduite selon la technique de Laemmli (1970), avec un tampon d'électrode constitué de Tris 0.165M, glycolle 0.128M, SDS 0.1%, pH 7.8.

Après électrophorèse, les protéines sont colorées par le bleu Coomassie; les sucres sont révélés selon la technique de Zaccharius et al. (1969). Pour la mise en évidence des lipides, la solution d'échantillon est, avant électrophorèse, soumise à une précoloration par incubation pendant 30mn à l'obscurité en présence d'un volume d'une solution de noir Soudan (Produit Sebia).

## C/ ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN GEL D'AGAROSE

25ml d'un gel d'agarose (Indubiose A 45, l'Industrie Biologique Française) à 0.9% en tampon véronal de sodium pH 8.2, de force ionique 0.1, sont coulés sur une plaque de verre de dimensions 10 x 10cm.

0.2ml de l'échantillon à fractionner, dissous à la concentration de 20mg/ml dans du sérum physiologique, sont appliqués dans une fente de 8cm de long réalisée à 2cm d'un des bords de la plaque.

La séparation électrophorétique est obtenue par application d'un champ électrique constant de 22.5V/cm entre les extrémités de la plaque, pendant une période de 1h45mn, à l'issue de laquelle deux bandes latérales de gel de 2cm de côté sont découpées pour le repérage des substances à caractère acide. Ce repérage est assuré par immersion des bandes pendant 1h dans une solution aqueuse à 0.1% de cétaflon. Le reste du gel d'agarose est découpé en fonction des résultats de ce repérage, et les segments ainsi découpés sont élués dans 5ml d'eau distillée, dialysés et lyophilisés. Un segment de surface équivalente de gel, ne contenant aucun échantillon, est traité dans les mêmes conditions pour servir de témoin d'extraction.

## VII. COMPOSITION EN ACIDES AMINES : CHROMATOGRAPHIE SUR RESINE ECHANGEUSE D'IONS

### A/ Hydrolyse

L'échantillon (0.3 à 0.7mg selon la richesse en acides aminés) est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 5.6M pendant 24h à 110°C en tube scellé sous azote. L'hydrolysat est ensuite évaporé sous vide à basse température (Evapomix Büchler).

### B/ Analyse des acides aminés

La composition en acides aminés est déterminée sur analyseur automatique (Beckman, Multichrom B). Les tampons et le programme d'élution ont été conçus de façon à séparer en une seule étape et sur la même colonne (350x6mm, résine Durrum DC 6 A) à la fois acides aminés et osamines.

Les tampons utilisés ont la composition suivante :

TAMPON No	1	2	3	4
pH	2.97	2.97	4.10	7.10
citrate de sodium, 2H <sub>2</sub> O	15.7g	15.7g	15.7g	15.7g
chlorure de sodium		30g		37.5g
thiodiglycol	2ml	2ml	2ml	2ml
acide N-caprylique	0.08ml	0.08ml	0.08ml	0.08ml
eau distillée q.s.p.	1l	1l	1l	1l

Le pH de chaque tampon est ajusté avec de l'acide chlorhydrique concentré.

L'utilisation du tampon No 2 (citrate de sodium enrichi en chlorure de sodium, pH 2.97) permet d'éluer les hexosamines (glucosamine puis galactosamine) entre l'alanine et la valine.

Le programme de passage des tampons est le suivant:

	temps en mn
tampon No 1	0 - 93
tampon No 2	93 - 125
tampon No 3	125 - 142
tampon No 4	142 - 234
NaOH 0.2M (régénération)	234 - 242
tampon No 1 (rééquilibration)	242 - 283



Le programme de température est le suivant:

	temps en mn
50°C	0 - 185
60°C	185 - 242 (ce qui accélère l'élution de l'arginine)
50°C	242 - 283 (début de rééquilibration)

La composition du réactif à la ninhydrine est la suivante:

ninhydrine (Touzart et Matignon) .....	75g
chlorure stanneux (Merck) .....	1.5g
tampon acétate de sodium pH 5.5 .....	1.25l
méthylcellosolve (Solv.Doc.Synt) .....	3.75l

Le réactif est conservé sous atmosphère d'azote.

Les débits d'élution sont de 35ml/h pour les tampons et de 17.5 ml/h pour le réactif à la ninhydrine.

#### VIII. TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE DES GLYCOCONJUGUES.

##### A/ TENEUR EN OSES COMBINÉS : REACTION A L'ORCINOL SULFURIQUE

La présence d'oses combinés dans les éluats de colonne est mise en évidence par la méthode de dosage à l'orcinoï sulfureux adaptée sur autoanalyseur Technicon (Demaille et al., 1965).

Réactif à l'orcinoï : 3.2g d'orcinoï sont dissous dans 200ml d'acide sulfureux 1M, on complète à 2l par addition d'une solution aqueuse d'acide sulfureux à 66% (v/v).

Une gamme de galactose (12.5 $\mu$ g/ml à 100 $\mu$ g/ml) est préparée dans l'eau distillée.

Mode opératoire : les fractions à analyser (débit = 0.32 ml/mn, cadence de passage 50/h, rapport prélèvement/rinçage 2/1) sont mélangées au réactif à l'orcinoï (débit = 2.88ml/mn) préalablement segmenté par bullage d'air (0.42ml/mn). La coloration se développe par passage dans un bain-marie à 95°C puis, après refroidissement, on mesure l'absorbance à 520nm.

##### B/ TENEUR EN ACIDES URONIQUES : REACTION AU CARBAZOLE SULFURIQUE

###### 1) Méthode manuelle

Le dosage des acides uroniques a été réalisé par la réaction au carbazole sulfurique selon la méthode de Dische (1947), modifiée par Bitter et Muir (1962).

Réactifs:

solution de tétraborate de sodium 0.025M dans l'acide sulfurique concentré ( $d = 1.84$ ).

réactif au carbazole: solution de carbazole à 0.125% dans l'alcool absolu.

gamme standard de D-glucuronolactone: 12.5 à 200 $\mu$ g/ml d'eau.

Mode opératoire: à 5ml de la solution de tétraborate sulfurique placés à 4°C, on ajoute 1ml d'échantillon. Le tube est bouché hermétiquement et porté 10mn au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on ajoute 0.2ml de la solution de carbazole. Le mélange est placé pendant 15mn au bain-marie bouillant puis refroidi. L'absorbance est lue à 530nm.

## 2) Méthode automatique

La présence d'acides uroniques dans les éluats de colonne a été mise en évidence par la réaction au carbazole sulfurique (Dische, 1947), modifiée selon Bitter et Muir (1962) et adaptée à l'autoanalyseur Technicon.

Réactifs :

solution de tétraborate de sodium 0.025M dans l'acide sulfurique concentré ( $d = 1.84$ ).

réactif au carbazole: solution de carbazole à 0.062% dans l'alcool absolu.

gamme standard de D-glucuronolactone: 12.5 à 200 $\mu$ g/ml d'eau.

Mode opératoire: les fractions à analyser (débit=0.32ml/mn, cadence de passage 50/h avec interposition d'un godet d'eau entre chaque échantillon, rapport prélèvement/rinçage=2/1) sont mélangées au tétraborate en milieu sulfurique segmenté par bullage d'air (débit = 0.60ml/mn). Le mélange passe dans un bain-marie à 95°C puis, après refroidissement, reçoit la solution de carbazole (débit = 0.70ml/mn). Le mélange passe dans un bain-marie à 95°C puis, après refroidissement, son absorbance est mesurée à 520nm. (Fig. 57). Un exemple de tracé obtenu avec la gamme de D-glucuronolactone est donné en figure 58.

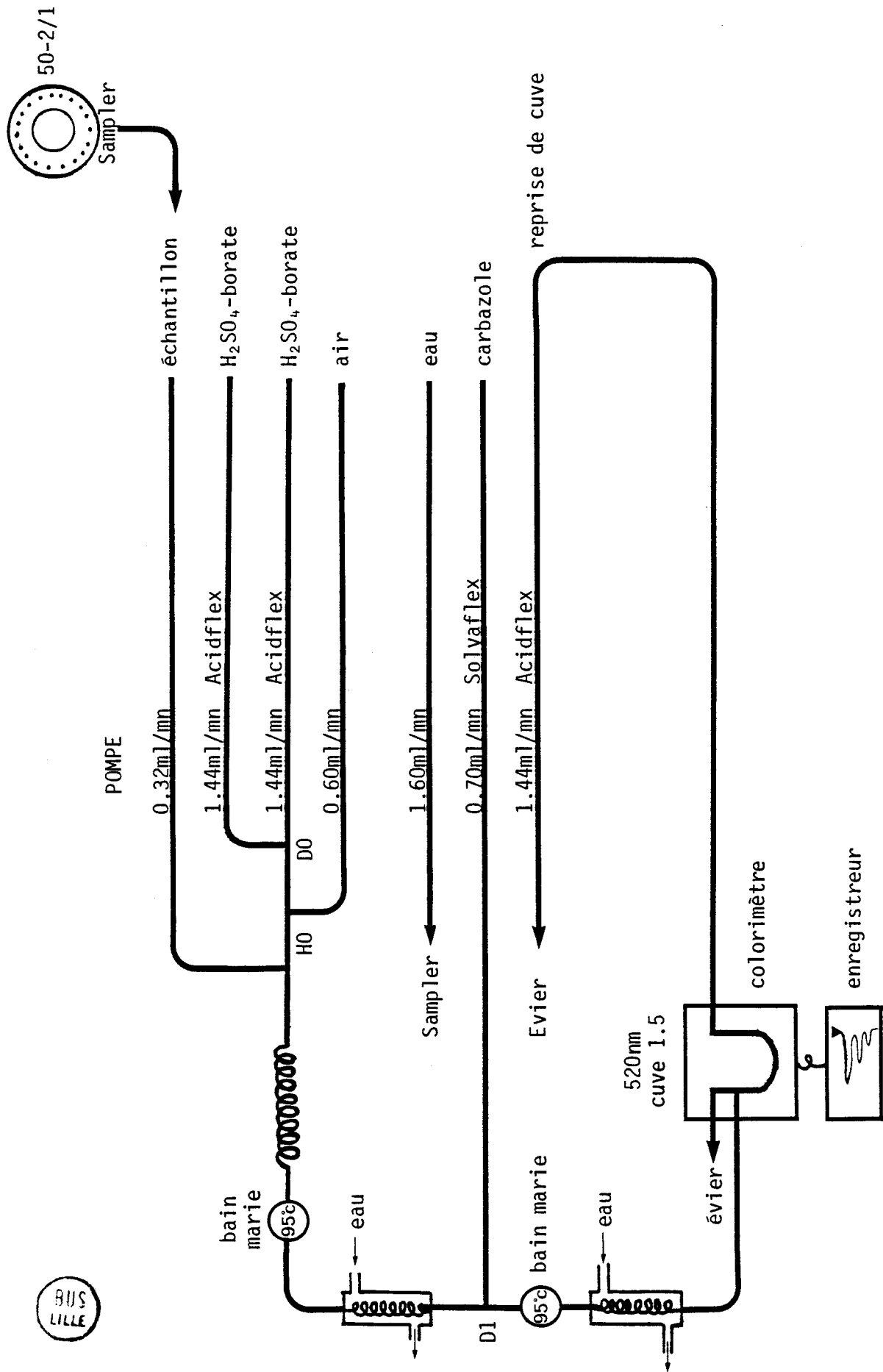


Figure 57 : Schéma du manifold pour le dosage automatique des acides uroniques sur autoanalyseur Technicon AAI. (Adaptation de la méthode manuelle de Bitter et Muir, 1962).

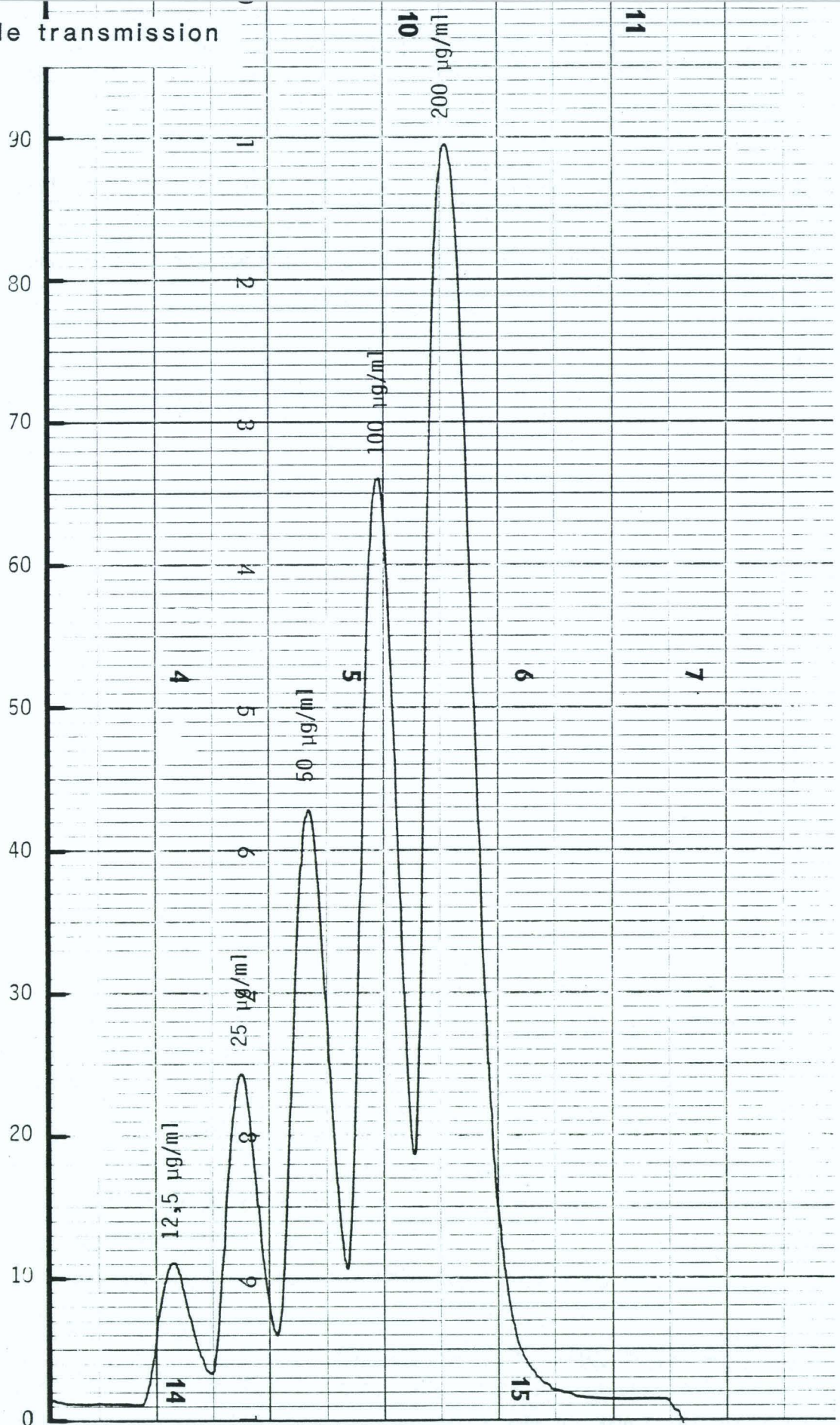


Figure 58 : Gamme standard de D-glucuronolactone (12.5 à 200 $\mu$ g/ml) utilisée pour le dosage automatique des acides uroniques sur autoanalyseur Technicon AAI. (Adaptation de la méthode manuelle de Bitter et Muir, 1962).

## C/ COMPOSITION GLUCIDIQUE : TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La composition en oses neutres et en osamines est déterminée par la méthode de Reinhold (1972) modifiée par Roussel et al. (1975).

### 1) Méthanolyse

L'échantillon (150 à 300 $\mu$ g) additionné de 50 $\mu$ g de méso-inositol (standard interne) est placé dans un tube (bouchon vissant et joint téflon), et traité par 0.5ml de méthanol/HCl 0.5M à 65 °C pendant 16h. Les compositions réalisées dans le cadre de la troisième partie (isolement de mucines bronchiques en l'absence d'agents réducteurs) et de la quatrième partie du mémoire (recherche d'autres facteurs d'association des mucines bronchiques) ont été obtenues après méthanolyse de l'échantillon en présence de 0.5ml de méthanol/HCl 1.5M à 85°C pendant 24h. Le tube est alors séché sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

### 2) N-acétylation et dé-O-acétylation

N- et O-acétylation: les produits sont acétylés par addition de 0.1ml d'anhydride acétique et 0.1ml de pyridine. Après 3mn de contact à température ambiante, les tubes sont séchés sous courant d'azote dans un bain-marie à 37°C.

dé-O-acétylation: les produits sont traités par 0.5ml d'ammoniaque à 20% dans le méthanol à 65°C pendant 1h. Les tubes sont séchés sous courant d'azote au bain-marie à 37°C.

### 3) Triméthylsilylation

La silylation des produits est obtenue par addition de 0.1ml de Sylon HTP (Supelco Inc.). Après 1h de contact à température ambiante, les tubes sont séchés sous courant d'azote à température ambiante. Les produits sont repris par 0.1ml de n-heptane. Après 30mn de contact, on injecte 1 à 2 $\mu$ l de la phase heptanique dans la colonne de chromatographie.

### 4) Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des méthyl-O-glycosides triméthylsilylés est réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur appareil Perkin-Elmer (modèle 900), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

La colonne (180x0.3cm) est en verre et contient de l'OV-17 à 3% sur chromosorb W-HP, 80-100 mesh (Supelco).

Une programmation de température est mise en oeuvre: la température initiale est de 120°C et augmente selon un gradient de 8°C/mn jusqu'à la température finale de 240°C.

Le temps de rétention et l'aire de chaque pic sont enregistrés grâce à un intégrateur Hewlett Packard (modèle 5840).

#### D/ DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE

L'acide sialique est dosé après, hydrolyse de l'échantillon, par la méthode d'Aminoff (1961).

Hydrolyse : 1mg d'échantillon est traité par 0.5ml d'acide sulfurique 0.05M à 80°C pendant 30mn dans des tubes bouchés hermétiquement.

Dosage de l'acide sialique :

- à l'échantillon hydrolysé on ajoute 0.25ml d'acide periodique 25mM dans l'acide sulfurique 0.1M. Le mélange est placé à 37°C pendant 30mn.

- l'excès d'acide periodique est réduit par addition de 0.2ml d'arsénite de sodium (solution à 2% dans l'acide chlorhydrique 0.5M). On ajoute ensuite 2ml d'une solution aqueuse d'acide thiobarbiturique 0.1M, ajustée à pH 9.0 par la soude.

- les tubes, bouchés, sont portés au bain-marie bouillant pendant 7mn30. Après refroidissement dans la glace fondante, on ajoute 5ml de n-butanol contenant 5% d'acide chlorhydrique 12M. Après mélange et centrifugation, l'absorbance de la phase butanolique est lue à 549nm.

- l'étalonnage est réalisé à partir des dilutions croissantes d'une solution aqueuse d'acide N-acétylneuraminique à 100µg/ml, traitées comme les échantillons.

#### E/ DOSAGE DES GROUPEMENTS SULFATE

Les groupements sulfate sont dosés après hydrolyse chlorhydrique de l'échantillon, par la méthode de Spencer (1960) au chloranilate de baryum.

Hydrolyse : 1mg d'échantillon est traité par 1ml d'acide chlorhydrique 1M au bain-marie bouillant pendant 5h. Après évaporation sous azote, le résidu est repris dans 0.4ml d'eau distillée.

Dosage du sulfate :

- à 0.1ml d'hydrolysate, on ajoute 0.4ml d'éthanol et 0.05ml de tampon acétate de sodium 0.5M, pH 4.0 contenant 0.0725mg/ml de sulfate de potassium. Après agitation, on ajoute 0.05ml de tampon acétate de sodium 0.5M, pH 4.0 contenant 20mg/ml de chloranilate de baryum. On agite toutes les minutes pendant 10mn puis on centrifuge (10mn-3000g).

- 0.2ml de surnageant sont dilués par addition de 2ml de tampon acétate de sodium 0.5M, pH 4.0. La lecture de l'absorbance à 327.5nm permet de mesurer la quantité d'acide chloranilique libéré.

- l'étalonnage est réalisé à partir des dilutions croissantes d'une solution aqueuse de sulfate de potassium à 1mg/ml, traitées comme les échantillons.

## IX. TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DU MUCUS BRONCHIQUE

### A/ METHODES D'EXTRACTION DES LIPIDES

Deux méthodes de délipidation ont été mises en oeuvre selon que l'échantillon à analyser était lyophilisé ou en solution.

#### 1) Délipidation du matériel lyophilisé

100mg d'échantillon sont hydratés par addition de 1ml d'eau distillée. La suspension obtenue est homogénéisée par agitation avec 3.75ml d'un mélange chloroforme/méthanol (1:2, v/v), selon la technique de Bligh et al. (1959). L'émulsion apparaissant à l'interface entre les deux couches est cassée par immersion du tube dans l'azote liquide puis par centrifugation.

La couche chloroformique est recueillie, tandis que la couche méthanolique est réextraite deux fois de suite par addition de 2.5ml de chloroforme. Les extraits chloroformiques, contenant les lipides, sont réunis puis évaporés sous azote, séchés dans un dessiccateur et enfin pesés. Le résidu obtenu est dissous dans le minimum d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) en vue de l'analyse lipidique.

## 2) Délipidation sur matériel non lyophilisé

La délipidation a été conduite selon la technique de Nalbone et al. (1979): l'échantillon en solution aqueuse est dilué par addition de 2 volumes du mélange éther diéthylique/éthanol (1:3, v/v) et agité pendant 1h à 4°C, puis centrifugé à 3000g.

Le culot recueilli est soumis à deux nouvelles extractions, chacune pendant 15mn. Le culot final est séché sous azote et solubilisé dans le volume nécessaire d'eau distillée pour les investigations ultérieures.

Les différents extraits sont réunis, gardés une nuit à 4°C, et, par centrifugation, il est parfois possible d'obtenir un culot qui est dissous dans l'eau.

## B/ COMPOSITION LIPIDIQUE

1) La teneur en phospholipides est estimée par le dosage du phosphore (selon la technique de Kraml, 1966) après oxydation des phospholipides en présence d'acide perchlorique et de peroxyde d'hydrogène, et en multipliant la teneur en phosphore par un coefficient égal à 25.

2) Les glycérides neutres sont mesurés selon la technique d'Eggstein et al. (1966).

3) Les acides gras libres sont dosés selon la technique de Duncombe (1964).

4) Le cholestérol libre et les stérides sont dosés selon la technique de Roschlau et al. (1974).

5) l'étude quantitative des sphingoglycolipides est réalisée selon la technique de Saito et al. (1971). Les glycolipides, séparés par chromatographie sur couche mince, sont colorés par pulvérisation d'une solution d'acétate de cuivre 0.15M dans l'acide phosphorique 1.4M (Fewster et al., 1969), suivie d'un chauffage à 140 °C pendant 25mn. L'absorbance de chaque tache est mesurée à 450nm grâce à un densitomètre Vitatron TLD 100, et comparée à celle de mélanges témoins contenant des quantités connues de mono-, di- et trihexosécéramides et de globosides.



## X. DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES MUCINES PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE.

La masse moléculaire est déterminée selon la méthode d'Yphantis (1964) modifiée par Chervenka (1970).

Les échantillons (0.8mg) sont dissous dans 1ml soit de tampon Tris/HCl 0.1M, pH 7.0, soit de chlorhydrate de guanidine 6M, et dialysés contre le même tampon pendant 24h à 4°C.

Les préparations sont centrifugées à la vitesse de 6400 rpm à 20°C dans une ultracentrifugeuse analytique Beckman (modèle E), équipée d'une optique Schlieren avec cellules capillaires à double secteur, jusqu'à obtention de l'équilibre de sédimentation (6h).

Le volume spécifique partiel ( $\bar{v} = 0.590\text{cm}^3/\text{g}$ ) utilisé dans le calcul de la masse moléculaire, a été préalablement déterminé par pycnométrie à partir d'autres mucines bronchiques (Degand et al., 1973c).

## XI. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (\*)

Les échantillons pour la microscopie électronique ont été préparés selon trois méthodes différentes.

A/ Méthode d'ombrage macromoléculaire ("macromolecular replica method") selon la technique décrite par Slayter (1976; 1983a).

La technique consiste à pulvériser l'échantillon en solution aqueuse dans un tampon acétate d'ammonium 0.15M, pH 7.0, sur une lamelle de mica fraîchement clivée, puis à appliquer successivement une couche métallique (tungstène à raison de  $10^{-7}\text{g}/\text{cm}^2$ ), une couche de carbone et de parlodion, et enfin à décoller la réplique. Dans certains cas, pour faciliter l'étalement, le tampon contenait 50% de glycérol.

---

(\*): *La microscopie électronique a été réalisée dans le laboratoire du Docteur Henry S. Slayter (Dana-Farber Cancer Institute and Departments of Physiology and Biophysics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Nous l'en remercions très vivement.*

### B/ Méthode d'étalement au cytochrome C

Cette méthode a été mise en oeuvre pour la recherche d'éventuels agrégats de mucines. La technique consiste à mélanger une solution de mucines à 5 $\mu$ g/ml avec une solution de cytochrome C à 20 $\mu$ g/ml, et à laisser diffuser une goutte de ce mélange sur une grille couverte de carbone, puis, après séchage, à pulvériser du platine, selon la technique précédemment décrite (Lamblin et al., 1979).

### C/ Méthode du contraste négatif (coloration négative)

Les structures examinées par la méthode d'ombrage métallique ont également été préparées selon la méthode du contraste négatif. La technique consiste à enrober les préparations par un très mince film d'un sel de métal lourd (acétate d'uranyle à 1%), ce qui donne un fond sombre sur lequel les molécules apparaissent en clair.

Si cette technique paraît adaptée pour visualiser les grands agrégats compacts, par contre il est peu probable qu'elle puisse permettre de voir des structures filamenteuses comme les mucines. Par ailleurs, il faut savoir, que, en raison de leur assez bonne visibilité dans les milieux de contraste négatif, de faibles quantités d'impuretés compactes et de grande taille ont été, par le passé, parfois prises à tort pour les structures principales de l'échantillon.



# **BIBLIOGRAPHIE**

- ADLER K.B., BRODY A.R. and CRAIGHEAD J.E. (1981)  
Studies on the mechanism of mucin secretion by cells of the porcine tracheal epithelium. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*,166,96-106
- AL-BAZZAZ F.J. and AL-AWQATI Q. (1979)  
Interaction between sodium and chloride transport in canine tracheal mucosa  
*J.Appl.Physiol.*,46,111-119
- ALEXANDER M., HEPPEL L.A. and HURWITZ J. (1961)  
The purification and properties of micrococcal nuclease  
*J.Biol.Chem.*,236,3014-3019
- ALLEN A. (1978)  
Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus  
*Brit.Med.Bull.*,34,28-33
- ALLEN A. (1983a)  
Mucus - A protective secretion of complexity  
*Trends Biochem.Sci.*,8,169-173
- ALLEN A., BELL A., MANTLE M. and PEARSON J.P. (1982)  
The structure and physiology of gastrointestinal mucus  
*Adv.Exp.Med.Biol.*,144,115-133
- ALLEN A.,BURGESS R., HUTTON D. and PAIN R.H. (1983b)  
Structure of pig gastric mucous glycoprotein. In:"Glycoconjugates", *Proc.*, VIIth Intern.Symp., Lund-Ronneby, Chester A. et al. Eds., pp. 582-583, Rahms I Lund, Pub.
- ALLEN A.,GARNER A. (1980)  
Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection  
*Gut*,21,249-262
- ALLEN A.,PAIN R.H., and ROBSON T.R. (1976)  
Model for the structure of the gastric mucus gel  
*Nature (Lond.)*,264,88-89
- ALLEN A.,SNARY D. (1972)  
The structure and function of gastric mucus  
*Gut*,13,666-672
- AMINOFF D. (1961)  
Methods for the quantitative estimation of N-Acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids  
*Biochem.J.*,81,384-392
- AMINOFF D., BAIG M.M. and GATHMANN W.D. (1979)  
Glycoproteins and blood group activity  
*J.Biol.Chem.*,254,1788-1793
- BAILLEUL V., RICHET C., HAYEM A. et DEGAND P. (1977)  
Propriétés rhéologiques des sécrétions bronchiques : mise en évidence et rôle des polypeptides riches en proline (PRP)  
*Clin.Chim.Acta*,74,115-123

- BELLA A. and KIM Y.S. (1972)  
Rat small intestinal mucin : isolation and characterization of a water - soluble mucin fraction. Arch.Biochem.Biophys.,150,679-689
- BERTOLINI M. and PIGMAN W. (1970)  
The existence of oligosaccharides in bovine and ovine submaxillary mucins Carbohyd.Res.,14,53-63
- BHASKAR K.R. and REID L. (1981). Application of density gradient methods for the study of mucus glycoprotein and other macromolecular components of the sol and gel phases of asthmatic sputa J.Biol.Chem.,256,7583-7589
- BHUSHANA RAO K.S.P. and MASSON P.L. (1977). A tentative model for the structure of bovine oestrus cervical mucin.In "Mucus in health and disease" Elstein M. and Parke D.V.,Eds, pp. 275-282. Plenum Press, New York & London
- BISERTE G. (1957)  
Les glycoprotéides du sérum sanguin et de l'urine. Exploration et signification physiopathologique. Bull.Soc.Chim.Biol.,39 Suppl. No 3,93-158
- BITTER T. and MUIR H.M. (1962)  
A modified uronic acid carbazole reaction Anal.Biochem.,4,330-334
- BLAKE J.R. and WINET H. (1980)  
On the mechanics of muco-ciliary transport Biorheology,17,125-134
- BLIGH E.G. and DYER W.J. (1959)  
A rapid method of total lipid extraction and purification Can.J.Biochem.Physiol.,37,911-917
- BOAT T.F. and CHENG P.W. (1978)  
Alteration of glycoproteins released from human tracheal explants by meta-choline stimulation Am.Rev.Resp.Dis.,117,288Abs
- BOAT T.F. and CHENG P.W. (1980)  
Biochemistry of airway mucus secretions Fed.Proc.,39,3067-3074
- BOAT T.F.,CHENG P.W,IYER R.N.,CARLSON D.M. & POLONY I.(1976).Human respiratory tract secretion. Mucous glycoproteins of non purulent tracheobronchial secretions, and sputum of patients with bronchitis and cystic fibrosis. Arch.Biochem.Biophys.,177,95-104
- BOERSMA A., DEGAND P.et BISERTE G. (1980)  
Diagnostic étiologique des épanchements pleuraux. L'acide hyaluronique reste-t-il un paramètre biologique intéressant à étudier? Nouv. Presse Med.,9,1098
- BOLAND C.R., MONTGOMERY C.K. and KIM Y.S. (1982)  
Alterations in human colonic mucin occurring with cellular differentiation and malignant transformation. Proc.Nat.Acad.Sci.,79,2051-2055

- BRADBURY J.E., BLACK J.W. and WYLLIE J.H. (1980)  
Stimulation of mucus output from Rat colon in vivo  
Eur.J.Pharmacol.,68,417-425
- BRETON M., DEUDON E., BERROU E. et PICARD J. (1979)  
Hétérogénéité structurale des protéoglycannes de la paroi artérielle de Porc  
Cell.Mol.Biol.,24,249-256
- BRETON M., PICARD J. and BERROU E. (1981)  
Isolation and characterization of proteoglycans from pig arterial wall  
Biochimie,63,515-526
- BROGAN T.D. (1959)  
The carbohydrate complexes of bronchial secretion  
Biochem.J.,71,125-131
- BROGAN T.D. (1960)  
The high molecular weight components of sputum  
Br.J.Exp.Pathol.,41,288-297
- BROWN D.T., MARRIOTT C., BEESON M.F. and BARRETT-BEE K. (1981)  
Isolation and partial characterization of a rheologically active glycoprotein fraction from pooled human sputum  
Am.Rev.Resp.Dis,124,285-291
- BÜRGI H. (1964)  
Die Viskosität des purulenten und sterilen Sputums bei chronischer Asthma Bronchitis  
Med.Thorac.,21,156-167
- BÜRGI H. (1965a)  
Sputum-Mukopolysaccharide  
Ther.Umsch.,22,331-332
- BÜRGI H. (1965b)  
Erste klinisch-experimentelle Erfahrungen mit dem Mucolyticum Bisolvon  
Schweiz.Med.Wschr.,95,274-278
- BUTLER W.T. and CUNNINGHAM L.W. (1966)  
Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylysine in tropo-collagen  
J.Biol.Chem.,241,3882-3888
- CARLSON D.M. (1968)  
Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from Pig submaxillary mucins  
J.Biol.Chem.,243,616-626
- CARLSTEDT I. (1982)  
"Normal" respiratory mucin  
Eur.J.Resp.Dis.,63,493-495
- CARLSTEDT I., LINDGREN H., SHEEHAN J.K., ULMSTEN U. and WINGERUP L.(1983a)  
Isolation and characterization of human cervical-mucus glycoproteins  
Biochem.J.,211,13-22

- CARLSTEDT I., LINDGREN H. and SHEEHAN J.K. (1983b)  
The macromolecular structure of human cervical-mucus glycoproteins  
*Biochem.J.*,213,427-435
- CARLSTEDT I. and SHEEHAN J.K. (1983c)  
Isolation and characterization of pig gastric mucins. In:"Glycoconjugates",  
Proc. VIIth Intern.Symp., Lund-Ronneby, Chester A. et al. Eds., pp. 580-581  
Rahms I Lund, Pub.
- CHANTLER E. (1982)  
Structure and fonction of cervical mucus. In "Mucus in health and disease",  
II, Chantler E.N., Ed., *Adv.Exp.Med.Biol.*,144,251-263
- CHANTLER E. and DEBRUYNE E. (1977)  
The uterine cervix in reproduction. Workshop conference, Rottach Egern,  
Insler V. and Bettendorf G., Eds., p77, Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- CHERVENKA C.H. (1970)  
Long-column meniscus depletion sedimentation equilibrium technique for the  
analytical ultracentrifuge  
*Anal.Biochem.*,34,24-29
- CLAMP J.R., ALLEN A., GIBBONS R.A. and ROBERTS G.P. (1978)  
Chemical aspects of mucus  
*Brit.Med.Bull.*,34,25-41
- CLAMP J.R., FRASER G. and READ A.E. (1981)  
Study of the carbohydrate content of mucus glycoprotein from normal and  
diseased colons  
*Clin.Sci.*,61,229-234
- CLARKE S.W. and PAVIA D. (1980)  
Lung mucus production and muco-ciliary clearance : methods of assessment  
*Br.J.Clin.Pharmacol.*,9,537-546
- CREETH J.M. (1978)  
Constituents of mucus and their separation  
*Brit.Med.Bull.*,34,17-24
- CREETH J.M., BHASKAR K.R., HORTON J.R., DAS I., LOPEZ-VIDRIERO M.T. and  
REID L. (1977). The separation and characterization of bronchial glyco-  
proteins by density-gradient methods  
*Biochem.J.*,167,557-569
- DAS I. (1977)  
Separation of sol and gel from several hypersecretory bronchial diseases  
and comparison of the macromolecules in each phase  
*Adv.Exp.Med.Biol.*,89,514
- DAVIS B. and NADEL J.A. (1980)  
New methods used to investigate the control of mucus secretion and ion  
transport in airways  
*Env.Health Pers.*,35,121-130
- DE LUCA L., SCHUMACHER M. and WOLF G. (1970)  
Biosynthesis of a fucose-containing glycopeptide from Rat small intestine  
in normal and vitamin A-deficient conditions  
*J.Biol.Chem.*,245,4551-4558



- DE SALEGUI M. and PLONSKA H. (1969)  
Preparation and properties of porcine submaxillary mucins  
Arch.Biochem.Biophys., 129, 49-56
- DEGAND P. (1972)  
Classification et éléments de structure des mucines bronchiques  
Thèse Doct.Sci., Lille.
- DEGAND P., ROUSSEL P. et LAMBLIN G. (1974)  
Définition des mucines synthétisées au niveau de kystes bronchogéniques  
Clin.Chim.Acta, 50, 223-236
- DEGAND P., ROUSSEL P., LAMBLIN G., DURAND G. and HAVEZ R. (1973a)  
Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration.  
I. Définition biochimique des mucines dans l'expectoration. Bull.Physio-  
Pathol.Resp., 9, 199-216
- DEGAND P., ROUSSEL P., LAMBLIN G. et HAVEZ R. (1973b)  
Purification et étude des mucines de kystes bronchogéniques  
Biochim.Biophys.Acta, 320, 318-330
- DEGAND P., RUFFIN P., LAMBLIN G. et HAVEZ R. (1973c)  
Etude en ultracentrifugation de deux mucines bronchiques humaines  
C.R.Acad.Sci., 276, 113-116
- DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. and BISERTE G. (1965)  
Isolement, propriétés physico-chimiques et composition de l' $\alpha$ -2-macroglobu-  
line de Porc. Bull.Soc.Chim.Fr., 12, 3506-3511
- DEUDON E., BRETON M., BERROU E. and PICARD J. (1980)  
Metabolism of glycosaminoglycans in cultured smooth muscle cells from pig  
aorta  
Biochimie, 62, 811-821
- DISCHE Z. (1947)  
A new specific color reaction of hexuronic acids  
J.Biol.Chem., 167, 189-198
- DUNCOMBE W.G. (1964)  
The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in  
plasma  
Clin.Chim.Acta, 9, 122-125
- DUNSTONE J.R. and MORGAN W.T.J. (1965)  
Further observations on the glycoproteins in human ovarian cyst fluids  
Biochim.Biophys.Acta, 101, 300-314
- DUTTA B. and RAO C.V.N. (1982)  
Structures of carbohydrate chains of glycoprotein isolated from goat sub-  
maxillary mucin. Biochim.Biophys.Acta, 701, 72-85
- EGGSTEIN M. and KREUTZ F.H. (1966)  
Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. I. Prinzip,  
Durchführung und Besprechung der Methode  
Klin.Wschr., 44, 262-267

- ELSTEIN M. (1978)  
Functions and physical properties of mucus in the female genital tract  
Brit.Med.Bull.,34,83-88
- FEIZI T. (1981)  
Carbohydrate differentiation antigens  
Trends Biochem.Sci., 6, 333-335
- FEIZI T., KABAT E.A., VICARI G., ANDERSON B. and MARSH W.L. (1971). Immuno-chemical studies on blood groups. XLIX The I antigen complex : specificity differences among anti-I sera revealed by quantitative precipitin studies; partial structure of the I determinant specific for one anti-I serum  
J.Immunol.,106,1578-1592
- FELDHOFF P.A., BHAVANANDAN V.P. and DAVIDSON E.A. (1979)  
Purification, properties and analysis of human asthmatic bronchial mucin  
Biochemistry,18,2430-2436
- FERENCZ A., ORSKOV I., ORSKOV F. and KLEMM P. (1980)  
Deoxyribonucleic acid is a significant component of the small-intestinal mucus. Acta Path.Microbiol.Scand.Sect. B.,88,347-348
- FEWSTER M.E., BURNS B.J. and MEAD J.F. (1969)  
Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent.  
J.Chromatog.,43,120-126
- FILIPE M.I., SMUGHAL S. and BUSSEY H.J. (1980)  
Pattern of mucus secretion in the colonic epithelium in familial polyposis  
Invest.Cell.Pathol.,3,329-343
- FORSTNER J.F. (1978)  
Intestinal mucins in health and disease  
Digestion,17,234-263
- FORSTNER J.F., JABBAL I. and FORSTNER G.G. (1973)  
Goblet cell mucin of Rat small intestine. Chemical and physical characterization  
Can.J.Biochem.,51,1154-1166
- FORSTNER J.F., JABBAL I., QURESHI R., KELLS D.I.C. & FORSTNER G.G. (1979)  
The role of disulphide bonds in human intestinal mucin  
Biochem.J.,181,725-732
- FORSTNER G., STURGESS J. and FORSTNER J. (1977)  
Malfunction of intestinal mucus and mucus production  
Adv.Exp.Med.Biol.,89,349-369
- FOURNET B., LEROY Y. and MONTREUIL J. (1974)  
General procedure of identification of methylated monosaccharides present in permethylated glycans  
Actes du Colloque International No 221 du CNRS sur les Glycoconjugués. Villeneuve d'Ascq,20-27 Juin 1973, Tome I, pp. 111-130, Paris CNRS, Montreuil J., Ed.
- GADDUM - ROSSE P., BLANDAU R.J. and LEE W.I. (1980a)  
Sperm penetration into cervical mucus in vitro. I. Comparative studies  
Fertil.Steril.,33,636-643

- GADDUM-ROSSE P., BLANDAU R.J. and LEE W.I. (1980b)  
Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II. Human spermatozoa in bovine mucus  
*Fertil.Steril.*, 33,644-648
- GAHMBERG C.T. and HAKOMORI S.I. (1973)  
External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes.  
*J.Biol.Chem.*, 248,4311-4317
- GALABERT C., FILLIAT M. and LAMBLIN G. (1981)  
Lipid analysis of sputum from patients with chronic bronchial diseases  
*Clin.Resp.Physiol.*, 17,197-208
- GALLAGHER J.T. and CORFIELD A.P. (1978)  
Mucin-type glycoproteins. New perspectives on their structure and synthesis  
*Trends Biochem.Sci.*, 3,38-41
- GELMAN R.A. and VERED J. (1976)  
Cyanogen bromide fragments of bovine cervical mucus glycoprotein  
*Biochim.Biophys.Acta*, 427,627-633
- GERNEZ-RIEUX C.,BISERTE G.,HAVEZ R.,VOISIN C.,ROUSSEL P. & DEGAND P. (1964)  
Etude de l'activité "in vitro" de différents agents réduisant la viscosité de l'expectoration. *Acta Tuberc.Pneumol.Belg.*, 55,138-164
- GIBBONS R.A.(1972). Physico-chemical methods for the determination of the purity, molecular size and shape of glycoproteins. In "Glycoproteins: their composition, structure and function". Gottschalk A. Ed., Elsevier,Amsterdam Vol. 5, Part A,pp. 31-157
- GIBBONS R.A. (1978)  
Mucus of the mammalian genital tract  
*Brit.Med.Bull.*, 34,34-38
- GIBBONS R.A. and MATTNER P.E. (1966)  
Some aspects of the chemistry of cervical mucus  
*Int.J.Fertil.*, 11,366-372
- GINSBURG V. and NEUFELD E.F. (1969)  
Complex heterosaccharides of animals  
*Ann.Rev.Biochem.*, 38,371-388
- GOERKE J. (1974)  
Lung surfactant  
*Biochim.Biophys.Acta*, 344,241-261
- GOLD D.V. and MILLER F. (1974)  
Characterization of human colonic mucoprotein antigen  
*Immunochemistry*, 11,369-375
- GOLD D.V., SHOCHAT D. and MILLER F. (1981)  
Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins  
*J.Biol.Chem.*, 256,6354-6358

- GOOI H.C., FEIZI T., KAPADIA A., KNOWLES B.B., SOLTER D. and EVANS M.J. (1981)  
Stage-specific embryonic antigen involves  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 fucosylated type 2 blood group chains  
*Nature (Lond)*, 292, 156-158
- GOTTSCHALK A., BHARGAVA A.S. and MURTY V.L.N. (1972)  
Submaxillary gland glycoproteins. In "Glycoproteins: their composition, structure and function". Gottschalk A. Ed., Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, Part B, pp. 810-829
- HAMMERSCHLAG M.R., HARDING L., MACONE A., SMITH A.L. and GOLDMANN (1980)  
Bacteriology of sputum in cystic fibrosis : evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent  
*J.Clin.Microbiol*, 11, 552-557
- HANCE A.J. and CRYSTAL R.G. (1975)  
The connective tissue of lung  
*Ann.Rev.Resp.Dis.*, 112, 657- 711
- HARBITZ O., JENSSEN A.O. and SMIDSRØD O. (1980)  
Quantitation of proteins in sputum from patients with chronic obstructive lung disease  
*Eur.J.Resp.Dis.*, 61, 84-94
- HARDING S.E., ROWE A.J. and CREETH J.M. (1983a)  
Further evidence for a flexible and high expanded spheroidal model for mucus glycoproteins in solution  
*Biochem.J.*, 209, 893-896
- HARDING S.E. and CREETH J.M. (1983b)  
Polyelectrolyte behaviour in mucus glycoproteins  
*Biochim.Biophys.Acta*, 746, 114-119
- HARRIES J.T. (1978)  
Meconium in health and disease  
*Brit.Med.Bull.*, 34, 75-78
- HATCHER V.B., SCHWARZMANN G.O.H., JEANLOZ R.W. and McARTHUR J.W. (1977a)  
Purification, properties and partial structure elucidation of a high-molecular weight glycoprotein from cervical mucus of the bonnet monkey (*Macaca radiata*)  
*Biochemistry*, 16, 1518-1524
- HATCHER V.B., SCHWARZMANN G.O.H., JEANLOZ R.W. and McARTHUR J.W. (1977b)  
Changes in the sialic acid concentration in the major cervical glycoprotein from the bonnet monkey (*Macaca radiata*) during a hormonally induced cycle  
*Fertil.Steril.*, 28, 682-688
- HATTON M.N., TABAK L.A. and LEVINE M.J. (1982)  
Immunochemistry of monkey salivary mucin  
*J.Dental Res.*, 61, 512-515
- HAVEZ R., DEGAND P., BOERSMA A. et RICHET C. (1971)  
Caractérisation et dosage de l'acide hyaluronique dans le liquide pleural de mésothéliome.  
*Clin.Chim.Acta*, 33, 443-454

- HAVEZ R., DEGAND P., ROUSSEL P. et RANDOUX A. (1970)  
Mode d'action biochimique des dérivés de la cystéine sur le mucus bronchique  
Poumon Coeur, 26, 81-90
- HAVEZ R. and ROUSSEL P. (1976)  
Bronchial mucus : physical and biophysical features  
In : "Bronchial Asthma", Weiss E.B. and Segal M.S., Eds., Boston, Little, Brown and Co., 409-422
- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G. (1967)  
Etudes des structures fibrillaires de la sécrétion bronchique humaine  
Clin.Chim.Acta, 17, 281-295
- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., DELMAS-MARSALET Y. et BISERTE G. (1969)  
Etude des substances de groupe sanguin A isolées de mucus bronchique  
Bull.Soc.Chim.Biol., 51, 245-259
- HAVEZ R., ROUSSEL P., DEGAND P. et LAMBLIN G. (1973)  
Eléments de structure et activités biologiques des mucines bronchiques  
In : "Exp. Ann. Biochim. Med.", 32, 121-148, Masson et Cie, Ed.
- HAYEM A. and DEGAND P. (1980a)  
Some biological components of bronchial mucus in relation to rheological properties  
Eur.J.Resp.Dis., 61S, 27-31
- HAYEM A., SCHARFMAN A., LAINE A., LAFITTE J.J. and SABLONNIERE B. (1980b)  
Proteases and antiproteases in bronchoalveolar lavage  
Clin.Resp.Physiol., 16S, 247-258
- HEINEGÅRD D. (1972). Hyaluronidase digestion and alkaline treatment of bovine tracheal cartilage proteoglycans. Isolation and characterization of different keratan sulfate proteins. Biochim.Biophys.Acta, 285, 193-207
- HEINEGÅRD D. and AXELSSON I. (1977)  
Distribution of keratan sulfate in cartilage proteoglycans  
J.Biol.Chem., 252, 1971-1979
- HEINEGÅRD D. and HASCALL V.C. (1974)  
Aggregation of cartilage proteoglycans. III. Characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregates.  
J.Biol.Chem., 249, 4250-4256
- HERZBERG M.C., LEVINE M.J., ELLISON S.A. and TABAK L.A. (1979)  
Purification and characterization of monkey salivary mucin  
J.Biol.Chem., 254, 1487-1494
- HILL H.D., REYNOLDS J.A. and HILL R.L. (1977a)  
Purification, composition, molecular weight and subunit structure of ovine submaxillary mucin  
J.Biol.Chem., 252, 3791-3798
- HILL H.D., SCHWYZER M., STEINMAN H.M. and HILL R.L. (1977b)  
Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-Acetylgalactosamine:mucin transferase  
J.Biol.Chem., 252, 3799-3804

- HOCHSTRASSER K, ALBRECHT GJ, SCHONBERGER OL, RASCHE B and LEMPART K. (1981)  
An elastase-specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization. *Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.*,362,1369-1376
- HOROWITZ M.I. (1967)  
Chemistry of the secretion layer  
*Ann.N.Y.Acad.Sci.*,140,784-796
- HORWITZ A.L. and CRYSTAL R.G. (1975)  
Content and synthesis of glycosaminoglycans in the developing lung  
*J.Clin.Invest.*,56,1312-1318
- HOUDRET N. (1980)  
Contribution à l'étude de l'organisation macromoléculaire du mucus bronchique  
Thèse Doct.Biol.Hum., Lille
- HOUDRET N., LAMBLIN G., SCHARFMAN A., HUMBERT P. and ROUSSEL P. (1983)  
Activation of bronchial mucin proteolysis by 4-aminophenylmercuric acetate and disulfide bond reducing agents. *Biochim.Biophys.Acta*, in press
- HOUDRET N, LE TREUT A, LHERMITTE M, LAMBLIN G, DEGAND P. & ROUSSEL P. (1979)  
Revaluation of the action of disulfide-bond cleaving reagents on the structure of gel-like bronchial mucus. In:"Glycoconjugates", Proc. Vth Intern. Symp., Kiel, Schauer et al. Eds., pp. 536-537, Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- HOUDRET N., LE TREUT A., LHERMITTE M., LAMBLIN G., DEGAND P. & ROUSSEL P. (1981). Comparative action of reducing agents on fibrillar human bronchial mucus under dissociating and non-dissociating conditions. *Biochim.Biophys. Acta*,668,413-419
- HOUNSELL E., FUKUDA M., POWELL M.E., FEIZI T. and HAKOMORI S. (1980)  
A new O-glycosidically linked tri-hexosamine core structure in sheep gastric mucin : a preliminary note. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*,92,1143-1150
- HOUNSELL E.F. and FEIZI T. (1982)  
Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease  
*Med.Biol.*,60,227-236
- JABBAL I., KELLS D.I.C., FORSTNER G. and FORSTNER J. (1976)  
Human intestinal goblet cell mucin  
*Can.J.Biochem.*,54,707-716
- JENSSEN A.O., HARBITZ O. and SMIDSRØD O. (1980a)  
The importance of lysozyme for the viscosity of sputum from patients with chronic obstructive lung disease. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*,40,727-731
- JENSSEN A.O., HARBITZ O. and SMIDSRØD O. (1980b)  
Electron microscopy of mucin from sputum in chronic obstructive bronchitis  
*Eur.J.Resp.Dis.*,61,71-76
- JONES R. and REID L. (1978)  
Secretory cells and their glycoproteins in health and disease  
*Brit.Med.Bull.*,34,9-16

- KABAT E.A. (1973). Immunochemical studies on the carbohydrate moiety of water soluble blood group A, B, H, Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> substances and their precursor I antigens. In : "Carbohydrates in solution", pp.334-361. Adv.Chem.Ser,117. Amer.Chem.Soc., Washington
- KARLINSKY J.B. (1982)  
Glycosaminoglycans in emphysematous and fibrotic Hamster lungs  
Ann.Rev.Resp.Dis.,125,85-88
- KERCKAERT J.P. (1978)  
Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis  
Anal.Biochem.,84,354-360
- KING M. (1980a)  
Viscoelastic properties of airway mucus  
Fed.Proc.,39,3080-3085
- KING M. (1980b)  
Relationship between mucus visco-elasticity and ciliary transport in guaran gel/frog palate model system  
Biorheology,17,249-254
- KNOWLES M., GATZY J. and BOUCHER R. (1981)  
Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis  
N.Engl.J.Med.,305,1489-1495
- KORNFELD R. and KORNFELD S. (1976)  
Comparative aspects of glycoprotein structure  
Ann.Rev.Biochem.,45,217-238
- KOTLAR H.K., HARBITZ O., JENSSEN A.O. and SMIDSRØD O. (1980). Quantitation of proteins in sputum from patients with chronic obstructive lung disease. II. Determination of albumin, transferrin,  $\alpha$ 1-acid-glycoprotein, IgG, IgM, lysozyme and C3-complement factor  
Eur.J.Resp.Dis.,61,233-239
- KRAML M. (1966)  
A semi-automated determination of phospholipids  
Clin.Chim.Acta,13,442-448
- KRISTIENSEN T. and PORATH J. (1968). Studies on blood group substances. I. Purification of active material from hog gastric mucin by specific precipitation with *Vicia cracca* phytohemagglutinin. Biochim.Biophys.Acta, 158,351-357
- KUEPPERS F. and BROMKE B.J. (1982)  
Protease inhibitors in human tracheobronchial secretions  
Chest,81/5 S 43
- LAEMMLI U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
Nature (Lond.),227,680-685

- LAFITTE J.J., LAMBLIN G., LHERMITTE M., HUMBERT P., DEGAND P. & ROUSSEL P. (1977)  
Etude des glycoprotéines bronchiques humaines de type mucique obtenues par lavage de bronches macroscopiquement saines  
Carbohyd.Res.,56,383-389
- LAFITTE J.J., LHERMITTE M., LAMBLIN G., DOUAY B., DEGAND P. & ROUSSEL P. (1980)  
Isolement des mucines bronchiques obtenues par lavage de bronches humaines macroscopiquement saines  
C.R.Acad.Sci.,281,1901-1904
- LAMBLIN G., HOUDRET N., HUMBERT P., LE TREUT A. et ROUSSEL P. (1981a)  
Etude de la conformation macromoléculaire des mucines bronchiques humaines.  
9è Journée sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, 12-14 janvier 1981, Aussois (Savoie) France
- LAMBLIN G., HUMBERT P., DEGAND P. et ROUSSEL P. (1977a)  
Hétérogénéité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques acides isolées à partir de deux sujets atteints de bronchite chronique  
Clin.Chim.Acta,79,425-436
- LAMBLIN G., LAFITTE J.J., LHERMITTE M., DEGAND P. and ROUSSEL P. (1977b)  
Mucins from cystic fibrosis sputum  
in : "Mod.Probl.Paediat.",19,153-164, Falkner F. et al. Ed., Yellow Springs, Ohio, S. Karger, Basel, Pub.
- LAMBLIN G., LHERMITTE M., BOERSMA A., ROUSSEL P. and REINHOLD V. (1980)  
Oligosaccharides of human bronchial glycoproteins. Neutral Di- and Trisaccharides isolated from a patient suffering from chronic bronchitis  
J.Biol.Chem.,255,4595-4598
- LAMBLIN G., LHERMITTE M., BOERSMA A., ROUSSEL P., VAN HALBEEK H., DORLAND L. and VLIEGENTHART J.F.G. (1981b). Isolation and characterization of neutral oligosaccharides from bronchial glycoproteins of cystic fibrosis patients  
Monogr.Paediatr.,14,46-49
- LAMBLIN G., LHERMITTE M., DEGAND P., ROUSSEL P. and SLAYTER H.S. (1979)  
Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins  
Biochimie,61,23-43
- LAMBLIN G., LHERMITTE M., DEGAND P., SERGEANT Y.H. and ROUSSEL P. (1973)  
Isolation and immunological properties of neutral bronchial mucins from a patient with chronic bronchitis. Biochim.Biophys.Acta,322,372-382
- LAMONT J.T. and VENTOLA A.S. (1980)  
Purification and composition of colonic epithelial mucin  
Biochim.Biophys.Acta,626,234-243
- LE TREUT A., LAMBLIN G., JEZEQUEL A., LERAY G., GUENET L., DEGAND P., LE GALL J.Y. and ROUSSEL P. (1983). Identification of proteoglycans in the sputum of a patient suffering from cystic fibrosis. Biochim.Biophys.Acta, Submitted for publication
- LE TREUT A., LAMBLIN G., HOUDRET N., DEGAND P. and ROUSSEL P. (1979)  
Action of mercaptoethanol on soluble mucus glycoproteins from human sputum  
In : "Glycoconjugates", Proc. Vth Intern.Symp., Kiel, Schauer R. et al. Eds., pp. 538-539, Stuttgart, Georg Thieme Verlag



- LE TREUT A., LAMBLIN G., HOUDRET N., DEGAND P. and ROUSSEL P. (1981)  
Reevaluation of the action of reducing agents on soluble mucus glycoproteins from human bronchial secretion  
*Biochimie*,63,425-434
- LEE S.P. (1980)  
The mechanism of mucus secretion by the gallbladder epithelium  
*Br.J.Exp.Pathol.*,61,117-119
- LEE S.P. (1981)  
Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis  
*J.Pathol.*,134,199-207
- LEE W.I., VERDUGO P., BLANCAU R.J. and GADDUM-ROSSE P. (1977)  
Molecular arrangement of cervical mucus : a reevaluation based on laser light-scattering spectroscopy  
*Gynecol.Invest.*,8,254-266
- LEVINTHAL C. and DAVISON P.F. (1961)  
Degradation of deoxyribonucleic acid under hydrodynamic shearing forces  
*J.Mol.Biol.*,3,674-683
- LEWIS R.W. (1971)  
Lipid composition of human bronchial mucus  
*Lipids*,6,859-861
- LHERMITTE M., LAMBLIN G., DEGAND P., ROUSSEL P. and MAZZUCA M. (1977)  
Affinity of bronchial secretion glycoproteins and cells of human bronchial mucosa for *Ricinus communis* lectins  
*Biochimie*,59,611-620
- LHERMITTE M., LAMBLIN G., LAFITTE J.J., ROUSSEAU J., DEGAND P. & ROUSSEL P. (1976)  
Properties of human neutral bronchial mucins after modification of the peptide or the carbohydrate moieties  
*Biochimie*,58,367-372
- LHERMITTE M., LE TREUT A., LAFITTE J.J., GALABERT C., FILLIAT M., LAMBLIN G. and ROUSSEL P. (1983). Concentration and distribution of soluble and insoluble macromolecules from sputum  
*Clin.Resp.Physiol.*, submitted for publication
- LI P.K., LEE J.T. and BAKER L.M. (1980)  
Before-assay liquefaction of pulmonary mucous secretions with N-Acetyl-L-Cysteine  
*Clin.Chem.*,26,1631-1632
- LIAO T.H., BLUMENFELD O.O. and PARK S.S. (1979)  
Isolation and characterization of glycoproteins from canine tracheal pouch secretions. *Biochim.Biophys.Acta*,577,442-453
- LIEBERMAN J. and GAWARD M.A. (1971)  
Inhibitors and activators of leukocytic proteases in purulent sputum. Digestion of human lung and inhibition by alpha-1-antitrypsin.  
*J.Lab.Clin.Med.*,77,713-727

- LINDAHL U. and RODEN L. (1972). Carbohydrate-peptide linkages in proteoglycans of animal, plant and bacterial origin. In "Glycoproteins: their composition, structure and function". Gottschalk A. Ed., Elsevier, Amsterdam, Vol. 5, Part A, pp. 491-517
- LISTINSKY C.M. and RIDDELL R.H. (1981)  
Patterns of mucin secretion in neoplastic and non-neoplastic diseases of the colon  
Hum.Pathol.,12,923-929
- LLOYD A.G., DODGSON K.S., PRICE R.G. and ROSE F.A. (1961)  
Infrared studies on sulfate esters. I. Polysaccharide sulphates  
Biochim.Biophys.Acta,46,108-115
- LLOYD K.O. and KABAT E.A. (1968). Immunochemical studies on blood groups. XLI : proposed structures for the carbohydrate portions of blood group A, B, H, Lewis-a and Lewis-b substances. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,61,1470-1477
- LOMBART C. and WINZLER R.J. (1972)  
Isolation and characterization of canine submaxillary mucin  
Biochem.J.,128,975-977
- LOMBART C.G. and WINZLER R.J. (1974)  
Isolation and characterization of oligosaccharides from canine submaxillary mucin  
Eur.J.Biochem.,49,77-86
- LOPEZ - VIDRIERO M.T., BHASKAR K.R. and REID L. (1978a)  
Mucus and serum components in sol and gel phases of sputum from hypersecretory diseases  
Am.Rev.Resp.Dis.,117 S,365
- LOPEZ - VIDRIERO M.T., DAS I., SMITH A.P., PICOT R. and REID L. (1977)  
Bronchial secretion from normal human airways after inhalation of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ , acetylcholine, histamine and citric acid  
Thorax,32,734-739
- LOPEZ-VIDRIERO M.T. and REID L. (1978b). Chemical markers of mucous and serum glycoproteins and their relation to viscosity in mucoid and purulent sputum from various hypersecretory diseases  
Am.Rev.Resp.Dis,117,465-477
- LOPEZ -VIDRIERO M.T. and REID L. (1978c)  
Bronchial mucus in health and disease  
Brit.Med.Bull.,34,63-74
- LOPEZ -VIDRIERO M.T. and REID L. (1980)  
Respiratory tract fluid. Chemical and physical properties of airway mucus  
Eur.J.Resp.Dis,61 S,21-26
- MALINOWSKI C.E. and HERP A. (1981)  
Purification and partial characterization of Rat submaxillary mucin  
Comp.Biochem.Physiol.,69,605-609
- MANTLE M. and ALLEN A. (1981a)  
Isolation and characterization of the native glycoprotein from Pig small-intestinal mucus  
Biochem.J.,195,267-275

- MANTLE M., MANTLE D. and ALLEN A. (1981b)  
Polymeric structure of Pig small-intestinal mucus glycoprotein. Dissociation by proteolysis or by reduction of disulphide bridges  
*Biochem.J.*, 195, 277-285
- MARSHALL T. and ALLEN A. (1978)  
Isolation and characterisation of the high molecular weight glycoprotein from Pig colonic mucus  
*Biochem.J.*, 173, 569-578
- MARTIN G.P., MARRIOTT C. and KELLAWAY I.W. (1981)  
The interaction of progesterone with mucus glycoproteins  
*Pharm.Acta Helv.*, 56, 5-8
- MATTHEWS L.W., SPECTOR S., LEMM J. and POTTER J. (1963). Studies on pulmonary secretions. 1. The overall chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and laryngectomy  
*Am.Rev.Resp.Dis.*, 88, 199-204
- MELVILLE G.N., ISMAIL S. and SEALY C. (1980)  
Tracheobronchial function in health and disease. Effect of mucolytic substances  
*Respiration*, 40, 329-336
- MEYER F.A., KING M. and GELMAN R.A. (1975)  
On the role of sialic acid in the rheological properties of mucus  
*Biochim.Biophys.Acta*, 392, 223-232
- MEYER F.A. and SILBERBERG A. (1980)  
The rheology and molecular organization of epithelial mucus  
*Biorheology*, 17, 163-168
- MIAN N., ANDERSON C.E., POPE A.J. and KENT P.W. (1982)  
Physicochemical properties of avian tracheal mucins  
*Biochem.J.*, 201, 533-542
- MITCHELL - HEGGS P. (1977)  
Physical properties of bronchial secretion  
*Adv.Exp.Med.Biol.*, 89, 203-215
- MOGHISSI K.S. and SYNER F.N. (1970)  
The effect of seminal protease on sperm migration through cervical mucus  
*Int.J.Fertil.*, 15, 43-49
- MOSSBERG B. (1980)  
Human tracheobronchial clearance by mucociliary transport and cough  
*Eur.J.Resp.Dis.*, 61 S, 51-58
- NADEL J.A. (1980a)  
Mucus secretion and ion transport in airways. Introductory remarks  
*Fed.Proc.*, 39, 3061
- NADEL J.A. and DAVIS B. (1980b)  
Parasympathetic and sympathetic regulation of secretion from submucosal glands in airways  
*Fed.Proc.*, 39, 3075-3079

- NADEL J.A., DAVIS B. and PHIPPS R.J. (1979)  
Control of mucus secretion and ion transport in airways  
*Ann.Rev.Physiol.*, 41, 369-381
- NALBONE G., LAFONT H., VIGNE J.L., DOMINGO N., LAIRON D., CHABERT C., LECHENE P. and HAUTON J.C. (1979). The apoprotein fraction of the bile lipoprotein complex: isolation, partial characterization and phospholipid binding properties  
*Biochimie*, 61, 1029-1041
- NASIR-UD-DIN, JEANLOZ R.W., REINHOLD V.N. and McARTHUR J.W. (1979)  
Changes in the glycoprotein structure of the cervical mucus of the bonnet monkey during the menstrual cycle. Study of the premenstrual-phase mucus  
*Carbohyd.Res.*, 75, 349-356
- NEUHAUS O.W. and LETZRING M. (1957)  
Determination of hexosamines in conjunction with electrophoresis on starch  
*Anal.Chem.*, 29, 1230-1233
- NIMMERFALL F. and ROSENTHALER J. (1980).  
Significance of the goblet-cell mucin layer, the outermost luminal barrier to passage through the gut wall. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 94, 960-966
- OATES M.D., ROSBOTTOM A.C. and SCHRAGER J. (1974)  
Further investigations into the structure of human gastric mucin : the structural configuration of the oligosaccharide chains  
*Carbohyd.Res.*, 34, 115-137
- ODEBLAD E. (1973)  
In "Cervical mucus in human reproduction". Elstein M., Moghissi K.S. and Borth R., Eds., pp. 58-74, Scriptor, Copenhagen
- OEGEMA T.R., BROWN M. and DZIEWIATKOWSKI D. (1977)  
The link protein in proteoglycan aggregates from the swarm Rat chondrosarcoma  
*J.Biol.Chem.*, 252, 6470-6477
- OEGEMA T.R., HASCALL V.C. and EISENSTEIN R. (1979)  
Characterization of bovine aorta proteoglycan extracted with guanidine hydrochloride in the presence of protease inhibitors  
*J.Biol.Chem.*, 254, 1312-1318
- OEMRAWSINGH I. and ROUKEMA P.A. (1974)  
Isolation, purification and chemical characterization of mucins from human submandibular glands  
*Arch.Oral.Biol.*, 19, 615-626
- OHYA T. and KANEKO Y. (1970)  
Novel Hyaluronidase from *Streptomyces*  
*Biochim.Biophys.Acta*, 198, 607-609
- OLVER R.E., DAVIS B., MARIN M.G. and NADEL J.A. (1975)  
Active transport of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> across the canine tracheal epithelium in vitro. *Am.Rev.Resp.Dis.*, 112, 811-815
- PEARSON J.P., ALLEN A. and PARRY S. (1981). A 70 000-molecular-weight protein isolated from purified Pig gastric mucus glycoprotein by reduction of disulphide bridges and its implication in the polymeric structure  
*Biochem.J.*, 197, 155-162

- PEARSON J., ALLEN A. and VENABLES C. (1980)  
Gastric mucus : isolation and polymeric structure of the undegraded glycoprotein : its breakdown by pepsin  
Gastroenterol.,78,709-715
- PEARSON J.P., KAURA R., TAYLOR W. and ALLEN A. (1982)  
The composition and polymeric structure of mucus glycoprotein from human gallbladder bile. Biochim.Biophys.Acta,706,221-228
- PEATFIELD A.C. and RICHARDSON P.S. (1980a)  
Receptors involved in sympathomimetic stimulation of mucus secretion in the cat trachea  
J.Physiol.,303,47 P
- PEATFIELD A.C. and RICHARDSON P.S. (1980b)  
Sympathic nerve activity stimulates cat tracheal mucin output via beta-adrenoceptors  
J.Physiol.,305,78 P-79 P
- PERIN J.P., BONNET F. and JOLLES P. (1978a)  
Comparative studies on human and bovine nasal cartilage proteoglycan complex components  
Mol.Cell.Biochem.,21,71-82
- PERIN J.P., BONNET F. and JOLLES P. (1978b)  
The action of trypsin on purified link proteins from bovine nasal cartilage proteoglycan complex  
FEBS Lett.,94,257-260
- PERIN J.P., BONNET F., PIZON V., JOLLES J. and JOLLES P. (1980)  
Structural data concerning the link proteins from bovine nasal cartilage proteoglycan complex  
FEBS Lett.,119,333-336
- PFEIFFER C.J. (1981)  
Experimental analysis of hydrogen ion diffusion in gastrointestinal mucus glycoprotein  
Am.J.Physiol.,240,G 176-182
- PHIPPS R.J. (1980)  
Physiological control of airway mucus secretion  
Eur.J.Resp.Dis.,61 S,33-38
- PICOT R., DAS I. and REID L. (1978)  
Pus, deoxyribonucleic acid and sputum viscosity  
Thorax,33,235-242
- PIGMAN W., MOSCHERA J., WEISS M. and TETTAMANTI G. (1973)  
The occurrence of repetitive glycopeptide sequences in bovine submaxillary glycoprotein  
Eur.J.Biochem.,32,148-154
- POLICARD A. et GALY P. (1945)  
Les Bronches. Structure et mécanisme à l'état normal et pathologique.  
in "Les Bronches". 1 Vol., Masson et Cie, Ed., Paris.

- POTTER J.L., MATTHEWS L.W., LEMM J. and SPECTOR S. (1963)  
Human pulmonary secretions in health and disease  
Ann.N.Y.Acad.Sci.,106,692-697
- POTTER J.L., MATTHEWS L.W., SPECTOR S. and LEMM J.(1967). Studies on pulmonary secretions. II. Osmolality and the ionic environment of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis,bronchiectasis and laryngectomy  
Am.Rev.Resp.Dis.,96,83-87
- PRAKOBPHOL A., LEVINE M.J., TABAK L.A. and REDDY M.S. (1982)  
Purification of a low-molecular-weight, mucin-type glycoprotein from human submandibular-sublingual saliva  
Carbohyd.Res.,108,111-122
- PUCHELLE E. and SADOUL P. (1980a)  
The effect of mucolytic agents on the rheologic and transport properties of canine tracheal mucus  
Am.Rev.Resp.Dis.,122,808-809
- PUCHELLE E,ZAHM JM,GIRARD F, BERTRAND A, POLU JM, AUG F & SADOUL P (1980b)  
Mucociliary transport in vivo and vitro. Relations to sputum properties in chronic bronchitis  
Eur.J.Resp.Dis.,61,254-264
- PUCHELLE E., ZHAM J.M. and HAVEZ R. (1973). Biochemical and rheological data in sputum. III. Relationship between the biochemical constituents and the rheological properties of sputum. Bull.Physiopath.Resp.,9,237-256
- PUSZTAI A. and MORGAN W.T.J. (1961)  
Studies in immunochemistry. 20. The action of papain and ficin on blood-group-specific substances  
Biochem.J.,81,639-647
- REINHOLD V.N. (1972)  
Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins  
Methods Enzymol.,25,244-249
- RICHARDSON P.S. (1980)  
The physical and chemical properties of airway mucus and their relation to airway function  
Eur.J.Resp.Dis.,61 S,13-15
- ROBERTS G.P. (1974)  
Isolation and characterization of glycoproteins from sputum  
Eur.J.Biochem.,50,265-280
- ROBERTS G.P. (1976)  
The role of disulfide bonds in maintaining the gel structure of bronchial mucus. Arch.Biochem.Biophys.,173,528-537
- ROBERTS G.P. (1978a)  
Chemical aspects of respiratory mucus  
Brit.Med.Bull.,34,39-41

- ROBERTS G.P. (1978b)  
Structural studies on the glycoproteins from bovine cervical mucus  
Biochem.J., 173, 941-947
- RODEN L. (1980). Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans  
In "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans". Lennarz W.J. Ed.,  
Plenum Press, New York and London, pp. 267-371
- RÖSCHLAU P., BERNT E. and GRUBER W. (1974)  
Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum  
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem., 12, 403-407
- ROSE M.C., LYNN W.S. and KAUFMAN B. (1979)  
Resolution of the major components of human lung mucosal gel and their  
capabilities for reaggregation and gel formation  
Biochemistry, 18, 4030-4037
- ROUKEMA P.A., ODERKERK C.H. and AMERONGEN A.V.N. (1982)  
Ultracentrifugation of salivary mucins  
Adv.Exp.Med.Biol., 144, 179-181
- ROUKEMA P.A., ODERKERK C.H. and SALKONOJA-SALONEN M.S. (1976)  
The murin sublingual and submandibular mucins : their isolation and cha-  
racterization. Biochim.Biophys.Acta, 428, 432-440
- ROUSSEL P., DEGAND P., LAMBLIN G., LAINE A. and LAFITTE J.J. (1978)  
Biochemical definition of human tracheobronchial mucus  
Lung, 154, 241-260
- ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P., WALKER-NASIR E. and JEANLOZ R.W. (1975)  
Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycopro-  
teins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis  
J.Biol.Chem., 250, 2114-2122
- ROUSSEL P., LAMBLIN G., LHERMITTE M., LAFITTE J.J., DEGAND P. & BISERTE G. (1976)  
Les mucines bronchiques secrétées au cours de la mucoviscidose  
VII Congrès International de la Mucoviscidose. Paris, 31 Mai-3 Juin, 1976
- ROUSTAN C., BOYER M., FATTOUM A., JEANNEAU R., BENYAMIN Y., ROGER M. and  
PRADEL L.A. (1982). Isolation and structural properties of a high-molecular-  
weight Actin-binding protein (Filamin-like protein) in Hog thyroid gland  
Europ.J.Biochem., 129, 149-155
- RYLEY H.C. (1970)  
An electrophoretic study of the sol phase of sputum  
J.Lab.Clin.Med., 75, 382-390
- SACHDEV G.P., MYERS F.J., HORTON F.O., FOX O.F., WEN G., ROGERS R.M & al. (1980)  
Isolation, chemical composition and properties of the major mucin component  
of normal human tracheobronchial secretions  
Biochem.Med., 24, 82-94
- SACHDEV G.P., ZODROW J.M. and CARUBELLI R. (1979)  
Hydrophobic interaction of fluorescent probes with fetuin, ovine submaxil-  
lary mucin, and canine tracheal mucins. Biochim.Biophys.Acta, 580, 85-90

- SAHU S.C. (1980a)  
Hyaluronic acid. An indicator of pathological conditions of human lungs ?  
Inflammation,4,107-112
- SAHU S. and LYNN W.S. (1978a)  
Hyaluronic acid in the pulmonary secretions of patients with asthma  
Biochem.J.,173,565-568
- SAHU S. and LYNN W.S. (1978b)  
Lipid composition of sputum from patients with asthma and patients with  
cystic fibrosis  
Inflammation,3,27-36
- SAHU S. and LYNN W.S. (1978c)  
Hyaluronic acid in the pulmonary secretions of patients with alveolar  
proteinosis  
Inflammation,3,149-158
- SAHU S., TANSWELL A.K. and LYNN W.S. (1980b)  
Isolation and characterization of glycosaminoglycans secreted by human  
fetal lung type II pneumocytes in culture  
J.Cell.Sci.,42,183-188
- SAHU S.C., TANSWELL A.K. and LYNN W.S. (1980c)  
A high-molecular weight alveolar glycoprotein in the cell-free culture  
medium of human fetal lung type II pneumocytes  
Lung,158,143-150
- SAHU S.C. and ULSAMER A.G. (1980d)  
Hyaluronic acid. An indicator of pulmonary injury ?  
Toxicol.Letters,5,283-286
- SAITO T. and HAKOMORI S.I. (1971)  
Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells  
J.Lipid.Res.,12,257-259
- SCAWEN M. and ALLEN A. (1977)  
The action of proteolytic enzymes on the glycoprotein from Pig gastric  
mucus  
Biochem.J.,163,363-368
- SCHEIDEGGER J.J. (1955)  
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse  
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.,7,103-110
- SCHIESSLER H., HOCHSTRASSER K. and OHLSSON K. (1978)  
in "Neutral proteases of human polymorphonuclear leucocytes",pp.195-214,  
Havemann K. and Janoff A.,Ed., Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich
- SCHRAGER J. (1969)  
The composition and some structural features of the principle gastric  
glycoprotein  
Digestion,2,73-89
- SCHRAGER J. and OATES M.D.G. (1971)  
The isolation and partial characterization of the principal gastric glyco-  
protein of "visible" mucus  
Digestion,4,1-12



- SCHRAGER J. and OATES M.D.G. (1974). The isolation and partial characterization of a glycoprotein isolated from human gastric aspirates and from extracts of gastric mucosae. *Biochim.Biophys.Acta*,372,183-195
- SCHWARZMANN G., REINHOLD V., JEANLOZ R.W. (1974)  
Identification of methylated sugar derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry  
Actes du Colloque International No 221 du CNRS sur les glycoconjugués.  
Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973, Tome I, pp. 85-94, Paris CNRS,  
Montreuil J., Ed.
- SHEFFNER A.L. (1963)  
The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solution by a new mucolytic agent, N-acetyl-cysteine. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,106,298-310
- SHELHAMER J.H., MAROM Z. and KALINER M. (1980)  
Immunologic and neuropharmacologic stimulation of mucous glycoprotein release from human airways in vitro  
*J.Clin.Invest.*,66,1400-1408
- SHERMAN J.M., CHENG P.W., TANDLER B. and BOAT T.F. (1981)  
Mucous glycoproteins from cat tracheal goblet cells and mucous glands separated with EDTA  
*Am.Rev.Resp.Dis*,124,476-479
- SLAYTER H.S. (1976)  
High-resolution metal replication of macromolecules  
*Ultramicroscopy*,1,341-357
- SLAYTER H.S. (1979)  
Photogenic impurities  
*Nature (Lond.)*,280,13
- SLAYTER H.S. (1983a)  
Electron microscopic studies of fibrinogen structure : historical perspectives and recent experiments. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,408,131-145
- SLAYTER H.S. and CODINGTON J.F. (1973)  
Size and configuration of glycoprotein fragments cleaved from tumor cells by proteolysis  
*J.Biol.Chem.*,248,3405-3410
- SLAYTER H.S., COOPER A.G. and BROWN M.C. (1974)  
Electron microscopy and physical parameters of human blood group i, A, B and H antigens. *Biochemistry*,13,3365-3371
- SLAYTER H.S., LAMBLIN G., LE TREUT A., GALABERT C., HOUDRET N., DEGAND P. and ROUSSEL P. (1983b)  
Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein  
*Eur.J.Biochem.*, submitted for publication
- SLOMIANY A. and SLOMIANY B.L. (1978)  
Structures of the acidic oligosaccharides isolated from Rat sublingual glycoprotein  
*J.Biol.Chem.*,253,7301-7306

- SLOMIANY A., WITAS H., AONO M. and SLOMIANY B.L. (1983)  
Covalently linked fatty acids in gastric mucus glycoprotein of cystic fibrosis patients  
J.Biol.Chem., 258, 8535-8538
- SLOMIANY B.L., BANAS-GRUSZKA Z., ZDEBSKA E. and SLOMIANY A. (1982)  
Characterization of the Forssman active oligosaccharides from dog gastric mucus glycoprotein isolated with the use of a monoclonal antibody  
J.Biol.Chem., 257, 9561-9565
- SLOMIANY B.L. and MEYER K. (1972)  
Isolation and structural studies of sulfated glycoproteins of hog gastric mucosa  
J.Biol.Chem., 247, 5062-5070
- SMITHSON K.W., MILLAR D.B., JACOBS L.R. and GRAY G.M. (1981)  
Intestinal diffusion barrier : unstirred water layer or membrane surface mucous coat ?  
Science, 214, 1241-1244
- SNARY D., ALLEN A. and PAIN R.H. (1970). Structural studies on gastric mucoproteins : lowering of molecular weight after reduction with 2-mercaptoethanol. Biochem.Biophys.Res.Comm., 40, 844-851
- SNYDER C.E., NADZIEJKO C.E. and HERP A. (1982a)  
Binding of basic proteins to glycoproteins in human bronchial secretions  
Int.J.Biochem., 14, 895-898
- SNYDER C.E., NADZIEJKO C.E. and HERP A. (1982b)  
Isolation of bronchial mucins from cystic fibrosis sputum by use of citraconic anhydride  
Carbohyd.Res., 105, 87-93
- SPECIAN R.D. and NEUTRA M.R. (1980)  
Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine  
J.Cell.Biol., 85, 626-640
- SPENCER B. (1960)  
The ultramicrodetermination of inorganic sulphate  
Biochem.J., 75, 435-440
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S. & MONTREUIL J. (1975)  
Complete structure of the two carbohydrate units of human serotransferrin  
FEBS Lett., 50, 296-299
- SPIRO R.G. (1967)  
The structure of the disaccharide unit of the renal glomerular basement membrane  
J.Biol.Chem., 242, 4813-4823
- STARKEY B.J., SNARY D. and ALLEN A. (1974)  
Characterization of gastric mucoproteins isolated by equilibrium density gradient centrifugation in caesium chloride  
Biochem.J., 141, 633-639

- STECK T.L. and DAWSON G. (1974)  
Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane  
J.Biol.Chem.,249,2135-2142
- STOCKLEY R.A., AFFORD S.C. and BURNETT D. (1980a)  
Assessment of 7S and 11S immunoglobulin A in sputum  
Am.J.Resp.Dis.,122,959-964
- STOCKLEY R.A. and BURNETT D. (1980b)  
Alpha-1-antichymotrypsin in infected and noninfected sputum  
Am.Rev.Resp.Dis.,122,81-88
- STRECKER G. and MONTREUIL J. (1979)  
Glycoprotéines et glycoprotéinoses  
Biochimie,61,1199-1246
- TABACHNIK N.F., BLACKBURN P. and CERAMI A. (1981)  
Biochemical and rheological characterization of sputum mucins from a patient with cystic fibrosis  
J.Biol.Chem.,256,7161-7165
- TABACHNIK N.F., PETERSON C.M. and CERAMI A. (1980)  
Studies on the reduction of sputum viscosity in cystic fibrosis using an orally absorbed protected thiol. J.Pharmacol.Exp.Ther.,214,246-249
- TABAK L.A., LEVINE M.J., MANDEL I.D. and ELLISON S.A. (1982)  
Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity  
J.Oral Pathol.,11,1-17
- TAKISHIMA T., SATO S., AOKI T. and MAEDA S. (1980)  
The effects of mucolytic agents and stirring on sputum viscoelasticity  
Tohoku J.Exp.Med.,131,103-117
- TAM P.Y. and VERDUGO P. (1981)  
Control of mucus hydration as a Donnan equilibrium process  
Nature (Lond.),292,340-342
- TETTAMANTI G. and PIGMAN W. (1968)  
Purification and characterization of bovine and ovine submaxillary mucins  
Arch.Biochem.Biophys.,124,41-50
- TWUMASI D.Y. and LIENER I.E. (1977)  
Proteases from purulent sputum. Purification and properties of the elastase and chymotrypsin-like enzymes  
J.Biol.Chem.,252,1917-1926
- VACCARO C.A. and BRODY J.S. (1979)  
Ultrastructural localization and characterization of proteoglycans in the pulmonary alveolus  
Am.Rev.Resp.Dis.,120,901-910
- VAN HALBEEK H., DORLAND L., HAVERKAMP J., VELDINK G.A., VLIEGENTHART J.F.G., FOURNET B., RICART G., MONTREUIL J., GATHMANN W.D. and AMINOFF D. (1981)  
Structure determination of oligosaccharides isolated from A+,H+ and A-,H- hog-submaxillary-gland mucin glycoproteins by 360 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Permethylated analysis and mass spectrometry  
Eur.J.Biochem.,118,487-495

- VAN HALBEEK H., DORLAND L., Vliegenthart J.F.G., HULL W.E., Lamblin G., LHERMITTE M., BOERSMA A. & ROUSSEL P. (1982). Primary structure determination of 14 neutral oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis, employing 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy *Eur.J.Biochem.*, 127, 7-20
- VAN KOOIJ R.J., ROELOFS H.J.M., KATHMANN G.A.M. and KRAMER M.F. (1980) Human cervical mucus and its mucous glycoprotein during the menstrual cycle *Fertil.Steril.*, 34, 226-233
- VARIYAM E.P. and HOSKINS L.C. (1983) In vitro degradation of gastric mucin. Carbohydrate side chains protect polypeptide core from pancreatic proteases *Gastroenterology*, 84, 533-537
- WAREMBOURG H., HAVEZ R., SEZILLE G., SHERPEREEL P., ROUSSEL P. et DEGAND P. (1968). Les lipides de l'expectoration. In "Hypersecretion bronchique", *Coll.Int.Pathol.Thorac.*, Lille, pp.181-192, Poincot, Clichy.
- WATKINS W.M. (1980) Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. In "Advances in human genetics". Harris H. and Hirschhorn K., Ed., Plenum Pub. Vol.10, pp.1-136 and 379-385
- WEBB W.R. (1962) Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl-cysteine *J.Thorac.Cardiov.Surg.*, 44, 330-343
- WHITE J.C., ELMES P.C. and WALSH A. (1954). Fibrous proteins of pathological bronchial secretions studied by optical and electron microscopy : deoxyribonucleoprotein and mucoprotein in bronchial secretions *J.Path.Bact.*, 67, 105-108
- WHITNEY P.L., MENDE T.J. and BREW K. (1978) Respiratory mucous glycoprotein from individuals with healthy lungs and patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis *Fed.Proc.*, 37, 1439
- WIDDICOMBE J.H. and WELSH M.J. (1980) Ion transport by dog tracheal epithelium *Fed.Proc.*, 39, 3062-3066
- WILLIAMS I.P., HALL R.L., MILLER R.J. and RICHARDSON P.S. (1982) Analyses of human tracheobronchial mucus from healthy subjects *Eur.J.Resp.Dis.*, 63, 510-515
- WILLIAMS S.E. and TURNBERG L.A. (1980) Retardation of acid diffusion by Pig gastric mucus : a potential role in mucosal protection *Gastroenterology*, 79, 299-304
- WOLF D.P., SOKOLOSKI J.E. and LITT M. (1980) Composition and function of human cervical mucus *Biochim.Biophys.Acta*, 630, 545-558

- WOOD E., HOUNSELL E.F., LANGHORNE J. and FEIZI T. (1980)  
Sheep gastric mucins as a source of blood-group-I and -i antigens  
*Biochem.J.*,187,711-718
- WOODWARD H., HORSEY B., BHAVANANDAN V.P. and DAVIDSON E.A. (1982)  
Isolation, purification and properties of respiratory mucus glycoproteins  
*Biochemistry*,21,694-701
- WU A.M., SLOMIANY A., HERP A. and SLOMIANY B.L. (1979)  
Structural studies of the carbohydrate units of Armadillo submandibular glycoprotein. *Biochim.Biophys.Acta*,578,297-304
- WUSTEMAN F.S. (1972)  
Glycosaminoglycans of bovine lung parenchyma and pleura  
*Experientia*,28,887-888
- YANAURA S., TAKEDA H. and MISAWA M. (1982)  
Behavior of mucus glycoproteins of tracheal secretory cells following L-Cysteine methylester treatment. *J.Pharmacobio-dynam.*,5,603-610
- YPHANTIS D.A. (1964)  
Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions  
*Biochemistry*,3,297-317
- YUREWICZ E.C., MATSUURA F. and MOGHISSI K.S. (1982)  
Structural characterization of neutral oligosaccharides of human midcycle cervical mucin  
*J.Biol.Chem.*,257,2314-2322
- YUREWICZ E.C. and MOGHISSI K.S. (1981)  
Purification of human midcycle cervical mucin and characterization of its oligosaccharides with respect to size, composition and microheterogeneity  
*J.Biol.Chem*,256,11895-11904
- ZACHARIUS R.M., ZELL T.E., MORRISON J.H. and WOODLOCK J.J. (1969)  
Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels  
*Anal.Biochem.*,30,148-152

## I N D E X     D E S     F I G U R E S

\*\*\*\*\*

FIGURE No	L E G E N D E	PAGE
1	Représentation schématique de la muqueuse bronchique .....	3
2	Monosaccharides constitutifs des mucines .....	14
3	Liaisons O-Glycosidiques observées dans les mucines .....	17
4	Autres types de liaisons Glycane - Protéines .....	18
5	Exemples de structures oligosaccharidiques proposées pour des mucines d'origines variées .....	21
6	Représentation schématique de la relation existant entre le caractè- re d'acidité des mucines et la longueur moyenne de leurs chaînes glycaniques .....	22
7	Exemples de structures oligosaccharidiques dans quelques mucines salivaires .....	30
8	Représentation schématique de la structure d'une mucine gastrique de Porc (d'après Allen, 1978) .....	39
9	Protocole expérimental d'étude des mucines gastriques de Porc (d'après Pearson <u>et al.</u> , 1981) .....	40
10	Nouveau schéma d'organisation proposé pour la mucine gastrique de Porc (d'après Allen <u>et al.</u> , 1982) .....	43
11	Exemples de chaînes oligosaccharidiques neutres isolées à partir de mucines cervicales humaines périovulatoires (d'après Yure- wicz <u>et al.</u> , 1982) .....	59
12	Modèles d'organisation macromoléculaire du mucus cervical selon la phase hormonale du cycle menstruel .....	63
13	Modèle d'organisation macromoléculaire des mucines cervicales humaines (d'après Carlstedt <u>et al.</u> , 1983b) .....	66
14	Structures de quelques oligosaccharides-alditols neutres isolés à partir de l'expectoration d'enfants atteints de mucoviscidose (d'après Van Halbeek <u>et al.</u> , 1982) .....	82
15	Filiation des structures oligosaccharidiques présentées en Fig.14 .	83

FIGURE No	L E G E N D E	PAGE
16	Modèle d'organisation macromoléculaire des mucines trachéobronchiques (d'après Roberts, 1978a) .....	89
17	Modèle d'organisation macromoléculaire des mucines trachéobronchiques et mode d'action des agents protéolytiques (d'après Carlstedt, 1982) .....	89
18	Protocole de l'étude de l'action des agents de réduction sur la phase soluble du mucus bronchique .....	97
19	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... native en milieu non dissociant (Profil A) .....	98
20	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... native en guanidine 6M (Profil C) .....	99
21	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... réduite en milieu non dissociant (Profil B) .....	101
22	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... réduite en guanidine 6M (Profil D) .....	102
23	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Lak... native en milieu non dissociant (Profil E) .....	104
24	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Lak... native en guanidine 6M (Profil G) .....	104
25	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Lak... réduite en milieu non dissociant (Profil F) .....	105
26	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Lak... réduite en guanidine 6M (Profil H) .....	105
27	Chromatographie de gel filtration du mélange à parties égales des phases solubles Vid... et Lak..., réduites en milieu non dissociant (Profil I) .....	106
28	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... chauffée et réduite en milieu non dissociant (Profil J) .....	108
29	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Vid... traitée par le PMSF et réduite en milieu non dissociant (Profil K) ....	108
30	Chromatographie de gel filtration de la phase fibrillaire native Nas... en guanidine 6M .....	121
31	Chromatographie de gel filtration de la phase fibrillaire Nas... réduite et alkylée en guanidine 6M .....	123

FIGURE No	L E G E N D E	PAGE
32	Chromatographie de gel filtration de la phase fibrillaire Nas... réduite en milieu non dissociant .....	124
33	Schéma de la dilution progressive des expectorations par l'eau distillée .....	145
34	Effet de la dilution progressive par l'eau sur l'extractabilité des composants macromoléculaires des expectorations .....	145
35	Protocole de solubilisation du mucus bronchique en présence ou en l'absence de PMSF .....	150
36	Schéma de fractionnement des composants du mucus bronchique dilué 1:12 (v/v) par l'eau distillée .....	157
37	Chromatographie de gel filtration du surnageant G1 (mucus de bronchite chronique dilué 1:12 (v/v) par l'eau distillée) .....	158
38	Chromatographie de gel filtration du surnageant B1 (mucus de mucoviscidose dilué 1:12 (v/v) par l'eau distillée) .....	158
39	Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS du surnageant G1 et des fractions G2-1, G2-2 et G2-3 .....	162
40	Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS du surnageant B1 et des fractions B2-1, B2-2 et B2-3 .....	163
41	Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des fractions B2-1, B2-2, B2-3, G2-1, G2-2 et G2-3 chauffées en l'absence ou en présence de 2-mercaptoéthanol .....	165
42	Electrophorèse en gel d'agarose des fractions G2-2, G2-3, B2-2 et B2-3 incubées en l'absence ou en présence de nucléases .....	166
43	Aspects en microscopie électronique de la fraction G2-1, préparée selon la méthode d'étalement au cytochrome C avec application de platine .....	168
44	Aspects en microscopie électronique de la fraction G2-1* préparée selon la technique de la réplique macromoléculaire avec ombrage au tungstène .....	170
45	Aspect en microscopie électronique des mucines préparées selon la méthode du contraste négatif .....	171
46	Aspect des fractions G2-1*d (A), B2-1*d (B) et G2-2*d (C) en microscopie électronique .....	174
47	Histogramme de distribution des longueurs dans différentes frac- tions de mucines .....	175



FIGURE No	L E G E N D E	PAGE
48	Aspect des mucines délipidées G2-1* <sup>d</sup> en microscopie électronique ..	176
49	Protocole d'isolement des glycosaminoglycannes à partir de l'expectoration .....	191
50	Chromatographie de gel filtration de la phase soluble Res... (mucoviscidose) sur colonne de Sepharose CL-2B en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0 .....	192
51	Chromatographie de gel filtration des glycopeptides pronasiques sur colonne de Sephacryl S-300 en tampon Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.2M, pH 8.0 .....	192
52	Electrophorèse analytique de la fraction F3-2 en gel d'agarose à pH 8.2 .....	194
53	Electrophorèse analytique en gel d'agarose de la fraction F3-2 avant et après action de divers enzymes .....	194
54	Spectres infrarouge de la fraction F3-2 et d'un standard de chondroïtine-4-sulfate .....	197
55	Spectres d'absorption des complexes obtenus par la réaction au carbazole sulfurique en présence de borate .....	199
56	Structure d'une courte chaîne de chondroïtine-sulfate .....	199
57	Schéma du manifold pour le dosage automatique des acides uroniques sur autoanalyseur Technicon AAI .....	226
58	Gamme standard de D-glucuronolactone utilisée pour le dosage automatique des acides uroniques .....	227

## I N D E X      D E S      T A B L E A U X

\*\*\*\*\*

TABLEAU No	L E G E N D E	PAGE
I	Composition-type en acides aminés d'une mucine bronchique humaine (mucine à caractère neutre isolée chez un patient atteint de bronchite chronique; d'après Lamblin <u>et al.</u> , 1979 .....	13
II	Composition chimique de diverses mucines d'origine humaine .....	16
III	Composition chimique de quelques mucines salivaires .....	29
IV	Composition chimique de quelques mucines intestinales .....	46
V	Protocoles de solubilisation et de fractionnement de diverses mucines trachéobronchiques normales .....	68
VI	Protocoles de solubilisation et de fractionnement des mucines trachéobronchiques au cours de circonstances pathologiques variées .....	74-75
VII	Composition en acides aminés de quelques mucines trachéobronchiques humaines .....	78
VIII	Composition glucidique de quelques mucines trachéobronchiques humaines .....	79
IX	Masse moléculaire de diverses mucines trachéobronchiques humaines .....	85
X	Composition chimique des fractions obtenues après filtration de la phase soluble native ou réduite en milieu non dissociant .....	112
XI	Composition chimique des fractions obtenues après filtration de la phase soluble native ou réduite en milieu dissociant .....	113
XII	Composition en acides aminés des fractions obtenues par filtration du mucus fibrillaire Nas. ....	127
XIII	Composition glucidique des fractions obtenues par filtration du mucus fibrillaire Nas. ....	128
XIV	Concentration et distribution des composants macromoléculaires	

TABLEAU No	L E G E N D E	PAGE
	dans l'expectoration diluée par addition de 12 volumes d'eau .....	147
XV	Concentration moyenne et distribution moyenne des composants macromoléculaires dans les expectorations diluées par addition de 12 volumes d'eau .....	148
XVI	Comparaison de la concentration moyenne et de la distribution moyenne des composants macromoléculaires dans les expecto- rations diluées par addition de 12 volumes d'eau .....	148
XVII	Comparaison de la distribution des composants macromoléculaires dans 7 expectorations extraites en présence ou en l'absence de PMSF .....	150
XVIII	Composition chimique des différentes fractions séparées par chromatographie de gel filtration des surnageants lyophi- lisés G1 et B1 .....	160
XIX	Composition lipidique des fractions exclues de la colonne de Sepharose CL-2B: G2-1 (bronchite chronique) et B2-1 (mucoviscidose) .....	161
XX	Composition chimique des fractions obtenues par délipidation du mucus bronchique .....	161
XXI	Composition chimique des fractions F3-2A et F3-2B séparées par électrophorèse préparative en gel d'agarose .....	196

## T A B L E   D E S   M A T I E R E S

\*\*\*\*\*

	Page
INTRODUCTION GENERALE .....	1
 <u>PREMIERE PARTIE : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR L'ORGANISATION</u>	
<u>MOLECULAIRE DES MUCINES</u> .....	9
<u>I. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES GENERALES DES MUCINES</u> .....	11
<u>II. ORGANISATION MOLECULAIRE DES MUCINES DE DIVERSES ORIGINES</u> .....	25
A/ Les mucines digestives .....	26
1) organisation moléculaire des mucines salivaires .....	27
2) organisation moléculaire des mucines gastriques .....	35
3) organisation moléculaire des mucines intestinales .....	44
4) organisation moléculaire des mucines coliques .....	50
5) autres mucines digestives .....	53
a) les mucines biliaires .....	53
b) les mucines méconiales .....	55
B/ Les mucines cervicales .....	56
C/ Les mucines trachéo-bronchiques .....	67
 <u>DEUXIEME PARTIE : ACTION DES AGENTS REDUCTEURS SUR LES MUCINES</u>	
<u>BRONCHIQUES</u> .....	93
<u>I. ETUDE DE L'ACTION DES AGENTS REDUCTEURS SUR LES MUCINES DE LA</u>	
<u>PHASE SOLUBLE DU MUCUS BRONCHIQUE</u> .....	95
A/ Préparation de la phase soluble du mucus bronchique .....	96
B/ Comportement des constituants de la phase soluble en chroma-	
tographie de gel filtration sur Sepharose CL-2B .....	96
1) phase soluble du malade Vid., atteint de mucoviscidose ..	96
2) phase soluble du malade Lak., atteint de bronchite	
chronique .....	103
3) mélange en proportions égales des phases du malade Vid.	
(mucoviscidose) et du malade Lak. (bronchite chronique).	103

	Page
4) phase soluble du malade Vid. traitée par la chaleur ou le PMSF .....	107
C/ Etude électrophorétique des composants de la phase soluble après fractionnement sur Sepharose CL-2B .....	107
1) électrophorèse des fractions AI, AII et AIII .....	109
2) électrophorèse des fractions CI, CII et CIII .....	109
3) électrophorèse des fractions BII et BIII .....	109
4) électrophorèse des fractions DI, DII et DIII .....	110
5) électrophorèse des fractions AII, AIII, BII, BIII, CII, CIII, DII et DIII après hydrolyse par la nucléase .....	110
D/ Composition chimique .....	110
1) composition en acides aminés .....	111
2) composition glucidique .....	111
E/ Discussion .....	114

## II. ETUDE DE L'ACTION DES AGENTS REDUCTEURS SUR LES MUCINES DE LA

<u>PHASE FIBRILLAIRE DU MUCUS BRONCHIQUE</u> .....	119
A/ Préparation de la phase fibrillaire du mucus bronchique .....	120
B/ Comportement des constituants de la phase fibrillaire du malade Nas... en chromatographie de gel filtration sur Sepharose CL-2B .....	120
1) phase fibrillaire native solubilisée en guanidine 6M .....	120
2) phase fibrillaire réduite en milieu dissociant .....	122
3) phase fibrillaire réduite en milieu non dissociant .....	122
C/ Etude électrophorétique des fractions glycoprotéiques du malade Nas... séparées par gel filtration du mucus fibrillaire sur Sepharose CL-2B .....	125
1) mucus fibrillaire natif solubilisé en guanidine 6M .....	125
2) mucus fibrillaire réduit en guanidine 6M .....	125
3) mucus fibrillaire réduit en tampon phosphate .....	125
D/ Composition chimique .....	126
1) fractions recueillies après filtration du mucus fibrillaire natif en guanidine 6M .....	126
2) fractions recueillies après filtration du mucus fibrillaire réduit en guanidine 6M .....	129
3) fractions recueillies après filtration du mucus fibril-	

laire réduit en tampon phosphate .....	129
E/ Discussion .....	130
<u>III. DISCUSSION GENERALE SUR L'ACTION DES AGENTS DE REDUCTION SUR LES MUCINES BRONCHIQUES</u> .....	133
<u>TROISIEME PARTIE : ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DES MUCINES BRONCHIQUES</u> .....	139
<u>I. INFLUENCE DE L'HYDRATATION SUR LA SOLUBILISATION DU MUCUS BRONCHIQUE</u> .....	143
A/ Solubilisation des expectorations dans l'eau distillée .....	144
1) effet de la dilution progressive de l'expectoration par l'eau .....	144
2) répartition des composants macromoléculaires après dilution de l'expectoration par 12 volumes d'eau .....	144
3) effet de l'agitation mécanique sur la solubilisation du mucus .....	146
4) rôle éventuel de la protéolyse dans la solubilisation du mucus .....	149
B/ Discussion .....	151
<u>II. ISOLEMENT DES MUCINES BRONCHIQUES EN L'ABSENCE DES AGENTS REDUCTEURS. ETUDE DE LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES. APPROCHE DE LEUR CONFIGURATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u> .	155
A/ Purification et analyse chimique des mucines .....	156
1) Purification et analyse chimique des surnageants lyophilisés .....	156
2) Purification des surnageants non lyophilisés .....	164
B/ Microscopie électronique .....	167
C/ Propriétés physico-chimiques des mucines bronchiques délipidées .....	169
D/ Discussion .....	173
<u>QUATRIEME PARTIE : RECHERCHE D'AUTRES FACTEURS D'ASSOCIATION DES MUCINES BRONCHIQUES</u> .....	187

	Page
A/ Isolement de glycosaminoglycannes à partir de la phase soluble .....	190
B/ Propriétés physico-chimiques des fractions F3-2A et F3-2B ..	195
C/ Discussion .....	198
<u>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</u> .....	203
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u> .....	211
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	235
<u>INDEX DES FIGURES</u> .....	261
<u>INDEX DES TABLEAUX</u> .....	265



# LES MUCINES BRONCHIQUES HUM

## APPROCHE DE LEUR STRUCTURE MACROMOLECULAIRE

### RESUME:

L'organisation moléculaire des mucines de diverses origines (salivaire, gastrique, intestinale, colique, cervicale et trachéobronchique) est présentée sous forme d'une revue générale de la littérature.

Le mécanisme d'action des agents réducteurs au cours de la mucolyse bronchique est double: action de clivage de ponts disulfure, et activation d'un système protéolytique actif sur les mucines.

L'extractibilité des mucines bronchiques est conditionnée par le degré d'hydratation du mucus. L'agitation du mucus en présence de 12 volumes d'eau distillée, qui solubilise la majeure partie des composants macromoléculaires, est une méthode non dégradante de préparation des mucines bronchiques.

Les mucines solubilisées dans ces conditions sont associées de façon non covalente à des lipides. Elles adoptent en solution une conformation filamenteuse plutôt compacte, avec une tendance à l'agrégation en milieu non dissociant.

Des protéoglycannes fortement dégradés, contenant des chaînes de chondroïtine-sulfate et de kératane, peuvent être caractérisés dans certaines sécrétions bronchiques. Ces substances ne participent pas à la conformation macromoléculaire des mucines; leur présence dans le mucus suppose l'existence d'altérations de la membrane basale bronchique.

MOTS CLES: Mucines — Mucus bronchique — Réduction — Chondroïtine-sulfate  
Association — Lipides — Hydratation — Microscopie électronique