

N° d'ordre : 61

50376
1986
253

50376
1986
253

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

T H E S E

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

Marie SMYRLAKI ép. THEODOROPOULOS

ELASTINE PULMONAIRE HUMAINE

ETUDE DE LA DEGRADATION PAR LES

ENZYMES LEUCOCYTAIRES HUMAINS



présentée le 13 Novembre 1986 devant le jury composé de :

Président : Professeur G.SPIK
Rapporteurs : Docteur L.ROBERT
Professeur B.FOURNET
Examineurs : Professeur P.ROUSSEL
Docteur A.HAYEM

A ma Fille, CATHERINE

A mon Mari, TAKI

A mes Parents

* * *

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherches N°16 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Ph. ROUSSEL de m'avoir accueillie à l'Unité des Protéines et de m'avoir permis de réaliser ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à Madame le Professeur G. SPIK qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Que Monsieur le Docteur L. ROBERT et Monsieur le Professeur B. FOURNET soient assurés de ma reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Ma profonde reconnaissance à Madame A. HAYEM de m'avoir intégrée dans son équipe et de m'avoir guidée par ses nombreux conseils. Je voudrais lui exprimer mes vifs remerciements pour les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

Mademoiselle M. DAVRIL m'a fait profiter de sa grande expérience en matière d'élastine. Je tiens à la remercier tout particulièrement pour ses nombreux conseils, sa disponibilité et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée au cours de ce travail.

Je remercie également Madame A. LAINE, Madame D. VERCAIGNE-MARKO et Mademoiselle M.P. DUCOUROUBLE pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail et l'aide efficace qu'elles ne m'ont jamais refusée. Leur amitié m'a été particulièrement précieuse lors des derniers mois passés à l'Unité 16.

J'adresse tous mes remerciements :

A Monsieur le Professeur LAFITTE qui a fourni les poumons et le mucus bronchique.

Au Service Commun de l'Unité 16 qui a réalisé les compositions en acide aminés sous la direction de Monsieur le Professeur P. DEGAND.

A Monsieur C. VANDEPERRE pour la réalisation des documents photographiques présentés dans ce travail. .

A l'ensemble du personnel de l'Unité 16 pour sa gentillesse et en particulier à mes camarades de l'Université pour l'amitié qu'ils m'ont accordée.

Enfin, je remercie Madame C. MASSON d'avoir dactylographié ce mémoire avec compétence, célérité et bonne humeur.

Que mes parents sachent que je leur suis très reconnaissante pour leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de mes études à Lille.

* *
* *

*
* * *

Nos travaux ont été supportés par la Communauté Européenne du Charbon et de l'Acier (contrat N°72.48.33.017), sous la forme d'une bourse dont j'ai bénéficié et d'une aide financière.

Ils ont donné lieu à :

- des publications

Column separation using Bio-Gel P-100 for the characterization of the products of human lung elastin degradation by leucocyte elastase and cathepsin G.

M. SMYRLAKI, M. DAVRIL et A. HAYEM (1986)

Biomedical Chromatography, 1, 27-30

Digestion de l'élastine pulmonaire humaine par l'élastase leucocytaire humaine.

M. SMYRLAKI, A. HAYEM et M. DAVRIL (1986)

A paraître dans Monographie INSERM

Journées du GERP, Chantilly 1986

- un poster

Solubilisation de l'élastine pulmonaire humaine par l'élastase leucocytaire.

M. SMYRLAKI, M. DAVRIL et A. HAYEM

Forum des Jeunes Chercheurs, Liège, 1985

Un manuscrit intitulé "HPLC studies of elastin digestion products" est en cours de préparation.

* *
* *

SOMMAIRE

* *
* *

INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
I. MORPHOLOGIE ET PROPRIETES DE L'ELASTINE FIBREUSE	3
II. BIOSYNTHESE DE L'ELASTINE	5
II.1. Structure du gène	5
II.2. Tropoélastine	7
II.3. Elastine fibreuse	9
II.3.1. Nature des liaisons croisées	9
II.3.2. Composition en acides aminés	15
II.4. Anomalies de la biosynthèse	15
II.4.1. Maladies cutanées	15
II.4.2. Autres affections	18
III. DEGRADATION "IN VIVO"	18
III.1. Catabolisme normal	18
III.2. Dégradation pathologique	19
III.2.1. Emphysème pulmonaire	20
III.2.2. Athérosclérose	20
III.3. Etude des produits de dégradation de l'élastine "in vivo"	21
IV. DEGRADATION "IN VITRO"	22
IV.1. Méthodes chimiques	22
IV.1.1. Solubilisation par l'acide oxalique : obtention des alpha- et bêta-élastines	22
IV.1.2. Solubilisation par hydrolyse organoalcaline : obtention de la kappa-élastine	23
IV.2. Méthodes enzymatiques	23
MATERIEL ET METHODES	25
I. PREPARATION DE L'ELASTINE PULMONAIRE	25
I.1. Dissection et homogénéisation du tissu pulmonaire	25
I.2. Elimination des composants extractibles par NaCl 1 M	25
I.3. Extraction du collagène	27
I.4. Extraction des composants microfibrillaires associés	27
I.5. Délipidation	27
I.6. Extraction des protéines contaminantes alcalisolubles	28

II. PREPARATION DES ENZYMES LEUCOCYTAIRES :	
ELASTASE ET CATHEPSINE G	28
II.1. Mode opératoire	28
II.2. Dosage de l'activité spécifique	31
III. SOLUBILISATION DE L'ELASTINE PAR L'ELASTASE ET	
LA CATHEPSINE G	31
IV. ETUDE DES PRODUITS DE DIGESTION	32
IV.1. Isoélectrofocalisation	32
IV.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	
en présence de SDS : SDS-PAGE	33
IV.3. Chromatographie de gel-filtration	35
IV.4. Chromatographie liquide de haute performance : HPLC	35
V. COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'ELASTINE NATIVE ET DES	
PRODUITS DE DIGESTION	36
RESULTATS ET DISCUSSION	39
I. DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ELASTINE PULMONAIRE D'ADULTE	39
I.1. Caractéristiques de la préparation d'élastine d'adulte	39
I.1.1. Procédé de purification	39
I.1.2. Composition en acides aminés	41
I.2. Solubilisation de l'élastine d'adulte	41
I.2.1. Principales techniques de solubilisation	
déjà décrites dans la littérature	41
I.2.2. Cinétiques de solubilisation	44
I.2.2.1. Effet de la concentration en	
élastase leucocytaire	44
I.2.2.2. Comparaison de l'action de l'élastase	
et de la cathepsine G	45
I.2.2.3. Action simultanée de l'élastase et	
de la cathepsine G leucocytaires	50
I.2.2.4. Solubilisation de l'élastine	
par d'autres élastases	53
I.2.2.5. Conclusion des études de solubilisation	55

I.3. Etude des produits de digestion de l'élastine pulmonaire	56
I.3.1. Digestion par un seul enzyme	56
I.3.1.1. Détermination du point isoélectrique(pI)	56
I.3.1.2. Estimation de la masse moléculaire relative	58
I.3.1.2.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	58
I.3.1.2.2. Chromatographie de gel-filtration	61
I.3.1.3. Analyse des fragments séparés sur colonne de Bio-Gel P-100	65
I.3.1.3.1. Composition en acides aminés	65
I.3.1.3.2. SDS-PAGE	65
I.3.1.3.3. Isoélectrofocalisation	68
I.3.1.3.4. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)	68
- description de la technique de PHAN DINH TUY et MOCZAR	68
- mise au point de la méthode sur nos fractions	70
* Essais sur une colonne C ₁₈ µ-Bondapack (WATERS)	70
a) gradient décrit par PHAN DINH TUY et MOCZAR	71
b) gradient linéaire de 20 à 70 % de solvant B	71
c) Gradient par paliers de 0 à 70 % de solvant B	71
* Essais sur une colonne RP-8 (HEWLETT-PACKARD)	73
a) gradient linéaire de 0 à 50 % de solvant B	73
b) Gradient par paliers de 0 à 50 % de solvant B	73

* Essais sur une colonne	
TSK ODS-120 T (LKB)	73
- Analyse des fractions F_1A	
obtenues après gel-filtration	75
- Analyse des fractions F_2A	
obtenues après gel-filtration	78
I.3.2. Digestions successives de l'élastine par	
l'élastase et la cathepsine G	81
I.3.2.1. Préparation des produits de digestion	81
I.3.2.2. Etude des produits de digestion de	
F_1A -élastase par la cathepsine G	82
I.3.2.2.1. SDS-PAGE	82
I.3.2.2.2. Isoélectrofocalisation	82
I.3.2.2.3. Chromatographie de gel-filtration	85
I.4. Conclusions à l'étude de l'élastine de poumons	
d'adulte	85
II. COMPARAISON DES PRODUITS DE DIGESTION DES ELASTINES DE	
NOUVEAUX-NES ET D'ADULTE	89
II.1. Comparaison des deux élastines	89
II.1.1. Préparation	89
II.1.2. Composition en acides aminés	89
II.2. Cinétiques de solubilisation	91
II.2.1. Solubilisation par l'élastase leucocytaire	91
II.2.2. Solubilisation par la cathepsine G	91
II.2.3. Conclusion	91
II.3. Détermination de la masse moléculaire relative des	
produits de digestion	91
II.3.1. Chromatographie de gel-filtration	94
II.3.2. SDS-PAGE	94
II.4. Composition en acides aminés des produits	
de digestion	94
II.5. Analyse des fractions en HPLC	98
II.5.1. Fraction F_1N -élastase	98
II.5.2. Fraction F_2N -élastase	98
II.5.3. Composition en acides aminés	101
II.6. Conclusion à l'étude comparative entre	
les deux élastines	104
CONCLUSION GENERALE	106
BIBLIOGRAPHIE	108

ABREVIATIONS UTILISEES

ATCA	: acide trichloracétique
CM-	: carboxyméthyl
DMSO	: diméthylsulfoxyde
EDTA	: acide éthylènediaminetétraacétique
Hepes	: acide [(hydroxy-2-éthyl)-4-pipérazinyl-1]-2-éthanesulfonique
SDS	: dodécylsulfate de sodium
TFA	: acide trifluoroacétique
Tris	: Tris (hydroxyméthyl)aminométhane

*
* *

INTRODUCTION

*
* *

* * *

L'étude de la défense de l'appareil respiratoire face aux agressions de l'environnement fait partie des objectifs de l'Unité INSERM N°16 depuis de nombreuses années.

La recherche des facteurs impliqués dans la genèse et la progression de la pneumoconiose du mineur de charbon, thème du contrat dont bénéficie l'Unité N°16 de la part de la Communauté Européenne du Charbon et de l'Acier, entre tout à fait dans ce cadre.

Alors que la pneumoconiose du mineur de charbon a été intensément étudiée depuis des décennies, deux publications récentes (SEATON, 1983), (SHEPPARD et coll., 1985) ont montré que les mineurs de charbon étaient atteints d'emphysème pulmonaire plus souvent que les sujets témoins, même si cette affection n'était souvent reconnue que lors de l'autopsie.

Il est également admis que l'élastine pulmonaire subit une dégradation au cours du processus qui conduit à l'emphysème, sans que l'on n'en connaisse exactement ni le mécanisme, ni la séquence (SNIDER et coll., 1985).

Pour contribuer à résoudre ces problèmes, le but de notre étude a été de définir les fragments obtenus après digestion enzymatique de l'élastine pulmonaire humaine ; dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire, ceux-ci peuvent constituer des marqueurs de l'élastolyse observée au cours de l'emphysème.

Notre mémoire débute par un chapitre "Généralités", dans lequel nous avons rassemblé les données de la littérature sur l'élastine, en mettant l'accent sur des travaux récents n'ayant pas encore fait l'objet de revues générales (structure du gène de l'élastine). Nous avons d'autre part traité plus spécialement les aspects pathologiques qui concernent l'élastine pulmonaire humaine. Pendant la mise en forme de ce manuscrit, une revue générale traitant plus spécialement de l'élastine pulmonaire a été publiée (STARCHEL, 1986).

Dans notre travail expérimental, nous avons décrit la préparation de deux élastines pulmonaires humaines (sujet âgé, sujet jeune) et leur digestion par deux enzymes leucocytaires ayant un pouvoir élastolytique (élastase et cathepsine G). La caractérisation des produits de dégradation a ensuite été entreprise par différentes méthodes.

* * *

* *
* *

GENERALITES

* *
* *

I. MORPHOLOGIE ET PROPRIETES PHYSIQUES DE L'ELASTINE FIBREUSE

Les propriétés élastiques de nombreux tissus tels que le poumon, le derme, les ligaments et les parois des gros vaisseaux sanguins sont dues à la présence de fibres élastiques dans l'espace extracellulaire. En microscopie photonique, l'élastine est constituée par un réseau de fibres qui apparaissent sous la forme de bâtonnets ondulés après révélation par des colorants tels que l'hématoxyline ferrique, l'orcéine ou la résorcine fuschine. La microscopie électronique a révélé, au niveau des fibres, la présence de deux composants (GREENLEE et coll., 1966) :

- un constituant dit "amorphe" puisqu'il ne possède aucune structure régulière répétitive ; il est quantitativement le plus important (plus de 90 % dans les fibres à maturité) et possède une affinité pour les colorants anioniques comme l'acide phosphotungstique ;

- un constituant "microfibrillaire" que l'on trouve au niveau de petites fibrilles de 100 à 120 Å de diamètre situées autour du constituant amorphe et qui sont visualisées par les colorants cationiques tels que l'acétate d'uranyle ou le tartrate de plomb. Une étude biochimique très poussée de la nature de ce composant microfibrillaire a été réalisée par ROBERT et coll., 1971).

La figure 1 montre l'aspect ultrastructural de ces deux constituants dans un tissu jeune comportant des lames élastiques en formation.

L'élastine qui est la protéine de la partie amorphe de la fibre élastique est responsable de ses propriétés élastiques. Les propriétés mécaniques de l'élastine sont comparables à celles d'un élastomère : la protéine s'étire rapidement sous tension sans grande perte d'énergie et se rétracte tout aussi rapidement en revenant à sa structure initiale. Des études aux rayons X faites sur le ligament de Boeuf ont montré que l'élastine pouvait être considérée comme un gel polymérique, constitué d'un réseau tridimensionnel de chaînes polypeptidiques disposées au hasard et reliées entre elles par des liaisons croisées (PARTRIDGE, 1963). Nous verrons plus loin que ces propriétés d'élasticité sont dues à une composition chimique tout à fait remarquable.



Figure 1 : Aspect morphologique des deux constituants des fibres élastiques dans un tissu aortique jeune (MOSCHETTO et coll., 1974).

EA : élastine amorphe

MF : microfibrilles

Au niveau pulmonaire, l'élastine constitue de 25 à 30 % (poids sec) du parenchyme humain normal (TURINO, 1985). Ce pourcentage varie en fonction de l'âge (JOHN et THOMAS, 1972), les sujets jeunes ayant le pourcentage le plus faible.

II. BIOSYNTHESE DE L'ELASTINE

La mise en évidence d'un précurseur de l'élastine insoluble date de plus de 20 ans. Les premiers, WEISSMAN et coll. (1963) observent que des porcs soumis à un régime pauvre en cuivre ont une teneur en élastine aortique abaissée, alors qu'existe un composant soluble ayant une composition en acides aminés voisine de celle de l'élastine. SANDBERG et coll. (1969) donnent le nom de tropoélastine à ce composé. Plus récemment, il est apparu que la tropoélastine était le véritable produit de synthèse du gène (BURNETT et ROSENBLOOM, 1979).

Dans ce chapitre, nous ne suivrons pas l'ordre historique des découvertes mais plutôt l'ordre des étapes de la biosynthèse de l'élastine. Nous étudierons d'abord le gène puis le produit du gène, c'est à dire la tropoélastine, et enfin la formation des liaisons croisées.

II.1. Structure du gène

Ce n'est que très récemment que sont apparues des notions concernant le gène de l'élastine dans différentes espèces : mouton (DAVIDSON et coll., 1982, 1984) ; (YOON et coll., 1984) ; boeuf (CICILA et coll., 1985). Chez l'homme, le gène de l'élastine a été localisé sur le chromosome 2. (ROSENBLOOM, 1986). Les derniers travaux de cette équipe (INDIK et coll., 1986) ont montré que dans la partie séquencée de l'extrémité 3' du gène humain manquaient deux des exons repérés dans le gène bovin. D'autre part, le mRNA correspondant au gène humain comporte 4 800 nucléotides, alors que 3 500 nucléotides ont été trouvés pour le mRNA du gène ovin.

La figure 2 présente le schéma de l'organisation de la seule partie du gène bovin qui soit actuellement connue : il s'agit de l'extrémité 3' comprenant 13 exons qui sont dispersés le long du gène, puisque le rapport exon/intron est de 1/15. Les régions hydrophobes et

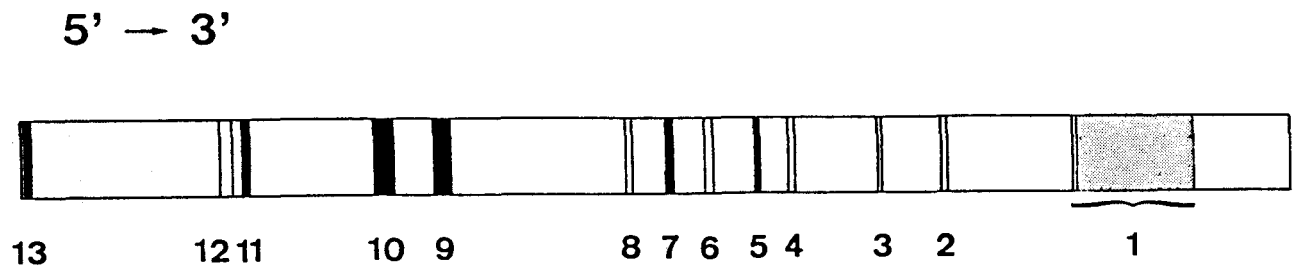





Figure 2 : Structure du gène de l'élastine bovine (d'après ROSENBLOOM, 1984)

-  exon codant pour les séquences hydrophobes
-  exon codant pour les séquences contenant des liaisons croisées
-  partie non traduite de l'exon 1

celles donnant naissance aux liaisons croisées sont codées par des exons différents, séparés sur le gène : ils alternent, sauf dans la région proche de l'extrémité C-terminale. Ils sont de petite taille (de 27 à 114 paires de bases) (ROSENBLOOM, 1984).

Jusqu'à présent, 7 exons codant pour les régions hydrophobes ont été séquencés : ce sont les exons 1, 2, 3, 4, 6, 8 et 12. Une grande partie de l'exon 1 n'est pas traduite, bien que transcrite en mRNA : on ne trouve aucune trace de sa traduction dans la séquence en acides aminés de la tropoélastine. L'exon 1 code pour une séquence que l'on ne connaissait pas dans la tropoélastine, puisque celle-ci contient 2 résidus de cystéine proches de l'extrémité C-terminale de la molécule :

-Gly-Gly-Ala-Cys-Leu-Gly-Lys-Ser-Cys-Gly-Arg-Lys-Arg-Lys

La même séquence a été décrite dans le produit de traduction du gène de l'élastine de Mouton (YOON et coll., 1984) et du gène humain (INDIK et coll., 1986). CICILA et coll. (1985) suggèrent que ces résidus de cystéine ainsi que les résidus basiques de cette partie C-terminale de la tropoélastine peuvent réagir fortement avec les autres composants de la trame conjonctive.

Parmi les exons séquencés, ceux codant pour les régions contenant des liaisons croisées sont les exons 5, 7, 11 et 13 (fig. 2). Ils codent tous pour des séquences contenant deux à trois résidus de lysine séparés par plusieurs résidus d'alanine, séquences indispensables à la formation des liaisons croisées (voir plus loin).

II.2. Tropoélastine

Le gène de l'élastine est exprimé dans de nombreuses cellules mésenchymateuses et la synthèse de la tropoélastine a pu être mise en évidence dans des cellules musculaires lisses et des fibroblastes en culture (ROSENBLOOM, 1982).

Le produit de traduction du gène possède à l'extrémité N-terminale une séquence hydrophobe de 26 acides aminés (DAVIDSON et coll., 1982), qui n'existe pas dans la tropoélastine sécrétée. Ces auteurs pensent qu'il s'agit d'une séquence signal nécessaire pour induire la sécrétion. La notion d'une préprotropoélastine comportant des peptides additionnels du côté N- et du côté C-terminal a été avancée récemment (FRANZBLAU, 1986).

La tropoélastine est une protéine monocaténaire de M_r voisine de 70 000 (de 68 000 à 74 000 selon les auteurs). Elle est caractérisée par sa richesse en résidus de lysine (38 résidus/mole) ; sa composition en acides aminés et certains enchaînements peptidiques sont connus, grâce aux travaux de l'équipe de SANDBERG : ces auteurs ont classé les peptides obtenus par digestion trypsique en deux groupes, l'un comprenant des peptides de faible taille moléculaire et riches en alanine et lysine (SANDBERG et coll., 1971) et l'autre constitué de peptides de taille moléculaire élevée riches en acides aminés hydrophobes (SANDBERG et coll., 1985).

La tropoélastine est très soluble dans les solutions alcooliques fortes et possède comme l'élastine la propriété de coacerver, c'est-à-dire d'être moins soluble aux températures supérieures à 20°C qu'à 4°C et de former alors une sorte de gel insoluble (SMITH et coll., 1968). La coacervation dépend de la température et du pH de la solution ; elle serait due à des interactions hydrophobes entre les molécules. Ce phénomène de coacervation est réversible.

La transformation de la tropoélastine soluble en élastine insoluble s'effectue par l'intermédiaire d'un métalloenzyme à Cu^{2+} , la lysyl-oxydase, qui initie le processus de formation des liaisons croisées en effectuant une désamination oxydative de certains résidus de lysine au niveau de leur fonction $\epsilon\text{-NH}_2$ pour les transformer en dérivés aldéhydiques. La présence de lysyl-oxydase a été démontrée dans plusieurs tissus conjonctifs (revue générale par KAGAN et SULLIVAN, 1982). La présence de Cu^{2+} est nécessaire à son action, ce qui explique l'accumulation de tropoélastine dans l'aorte de Porc nourri avec un régime pauvre en cuivre (WEISSMAN et coll., 1963). La lysyl-oxydase agit sélectivement sur deux résidus de lysine de la tropoélastine qui sont séparés par 2 ou 3 résidus d'alanine dans des séquences de type Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys-Ala (FOSTER et coll., 1975). Cet enzyme peut être inhibé par des lathyrogènes. C'est ainsi que SYKES et PARTRIDGE (1972) ont pu isoler une élastine soluble non réticulée à partir d'aortes de poulets rendus lathyriques par administration de β -aminopropionitrile.

II.3. Elastine fibreuse

La figure 3 résume les différentes étapes de la biosynthèse de l'élastine fibreuse à partir du gène. Dans le compartiment intracellulaire, après transcription du DNA en mRNA, la protropoélastine subit une hydroxylation de certains de ses résidus de proline par une prolyl-hydroxylase. Elle est ensuite sécrétée dans l'espace extracellulaire où elle est transformée en tropoélastine et s'associe aux fibres d'élastine déjà formées. Les protéines microfibrillaires constituent une sorte de canevas dans l'alignement des fibres élastiques.

La formation des liaisons croisées est l'étape finale de la biosynthèse de l'élastine fibreuse. Dans leur élaboration, la seule étape enzymatique connue est la désamination oxydative de certains résidus de lysine de la tropoélastine. Les étapes ultérieures qui conduisent à l'obtention des liaisons croisées bi-, tri- et tétra-fonctionnelles procèdent ensuite par association des fonctions réactives jusqu'à l'obtention des desmosines, acides aminés caractéristiques et spécifiques de l'élastine.

Un modèle moléculaire de structure de l'élastine expliquant le comportement élastique du polymère a été proposé par GRAY et coll. (1973) sur la base de leurs études structurales relatives à la tropoélastine (fig. 4).

II.3.1. Nature des liaisons croisées

La composition en acides aminés de l'élastine (voir chapitre suivant) montre que la réticulation de cette dernière ne pouvait être expliquée par l'existence de ponts disulfure, puisque la teneur en cystine est nulle (ou très faible). Par conséquent, d'autres types de liaisons croisées devaient être présents dans l'élastine. L'explication en a été fournie par THOMAS et coll. (1963). Ces auteurs ont soumis l'élastine à une hydrolyse par l'élastase, suivie d'une hydrolyse par la leucine aminopeptidase et par la carboxypeptidase. Ils ont isolé un peptide contenant une substance non identifiée qui présentait une forte absorption en UV. Cette substance possédait deux groupements N-terminaux et deux groupements C-terminaux. La dinitrophénylation suivie par l'hydrolyse acide totale a conduit à

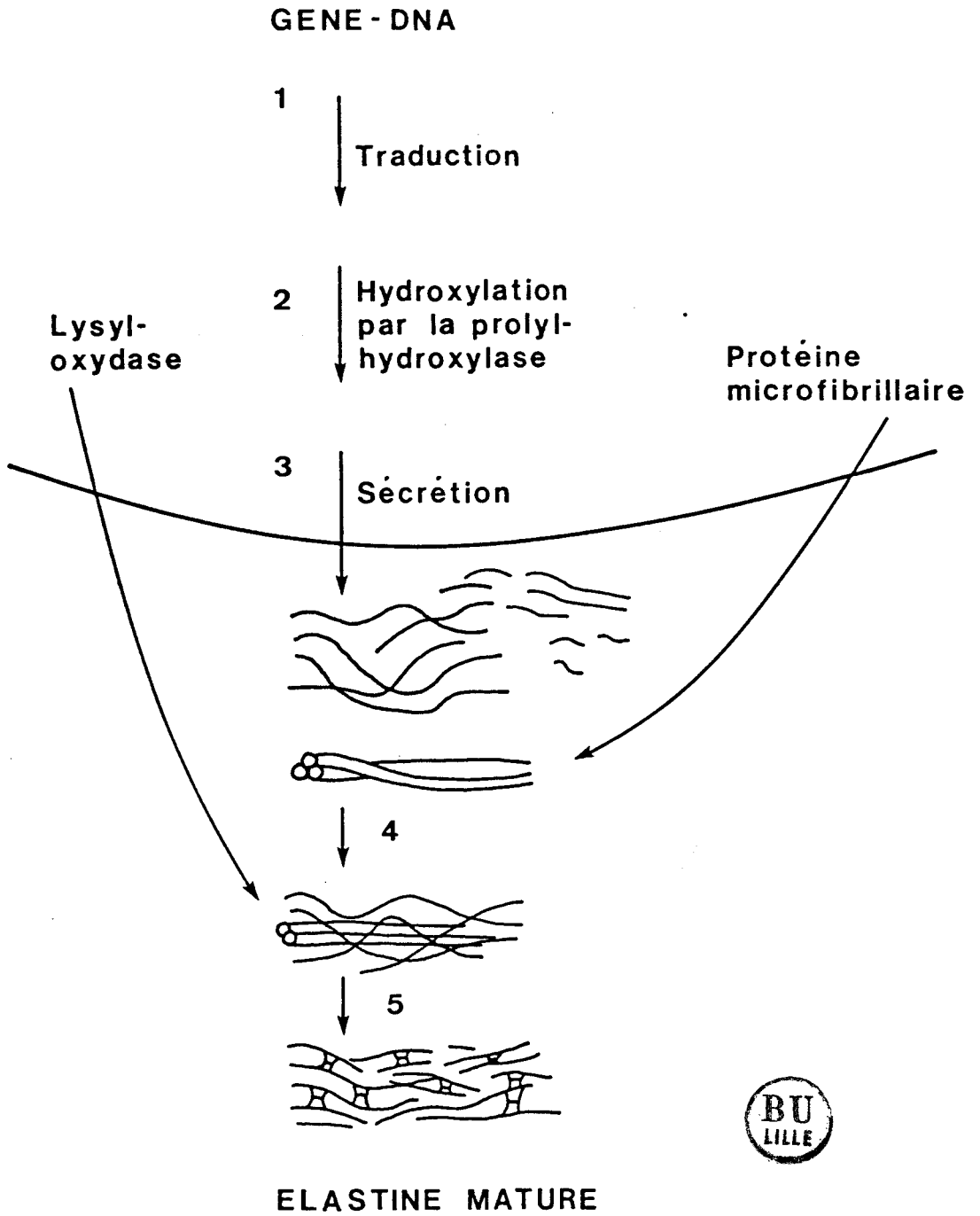


Figure 3 : Schéma de la biosynthèse de l'élastine fibreuse (d'après RUCKER et DUBICK, 1984)

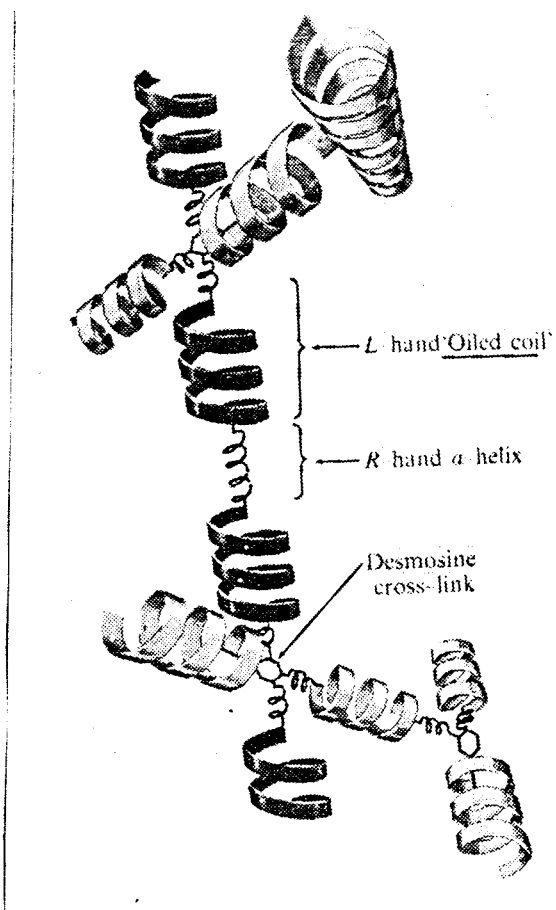


Figure 4 : Modèle moléculaire de structure et de fonction de l'élastine (d'après GRAY et coll., 1973)

l'isolement de DNP-alanine et d'un DNP-dérivé qui avait une forte absorption en UV. Ces mêmes auteurs ont finalement identifié deux isomères polyfonctionnels contenant un noyau pyridinique : ils les ont nommés desmosine et isodesmosine. Le nombre des chaînes peptidiques liées par l'un ou l'autre isomère peut être égal à deux, trois ou quatre selon FRANZBLAU et coll. (1970) qui ont proposé le schéma représenté dans la figure 5.

Après incorporation de lysine marquée dans des cultures d'aorte d'embryon de Poulet, MILLER et coll. (1964) ont montré que cet acide aminé était le précurseur des desmosines. PARTRIDGE et coll. (1966) ont confirmé ces résultats en travaillant sur l'aorte de Rat. D'autres preuves ont été apportées par ANWAR et ODA (1966) ; ces auteurs ont démontré que quatre résidus de lysine sont nécessaires pour former un seul résidu de desmosine.

La lysine est également le précurseur d'une autre liaison croisée, la lysinonorleucine, comme l'ont démontré FRANZBLAU et coll. (1970). Ces auteurs ont incorporé de la lysine (^{14}C) à des cultures d'aorte d'embryon de Poulet et ont démontré que deux résidus de lysine sont impliqués dans la formation d'un seul résidu de lysinonorleucine, celui-ci pouvant lier deux chaînes polypeptidiques. Le taux de lysinonorleucine est plus élevé dans l'élastine réduite par le borohydrure de sodium que dans l'élastine non réduite. On peut donc supposer qu'un précurseur, la déhydrolysinonorleucine, est également présent dans l'élastine (LENT et FRANZBLAU, 1967).

STARCHER et coll. (1967) ont encore isolé un autre type de liaison croisée qui pourrait être un intermédiaire dans la formation des desmosines : la mérodesmosine. Le précurseur de cet acide aminé dans l'élastine non réduite est la déhydromérodesmosine (PAZ et coll., 1971).

Enfin, MILLER et coll. (1967) ont montré l'existence d'une part de l'allysine ou δ -semialdéhyde de l'acide α -aminoadipique et d'autre part d'un deuxième composant aldéhydique formé de deux résidus d'allysine : ce produit de condensation aldolique a été isolé par LENT et coll. (1969) sous sa forme réduite à partir d'un hydrolysate alcalin d'élastine qui a été d'abord traitée par un agent réducteur. Ces auteurs ont estimé que l'élastine contient 2 à 3 résidus d'allysine et 4 à 5 résidus du produit de condensation aldolique. Un schéma récapitulatif de la formation des liaisons croisées de l'élastine est présenté sur la figure 6.

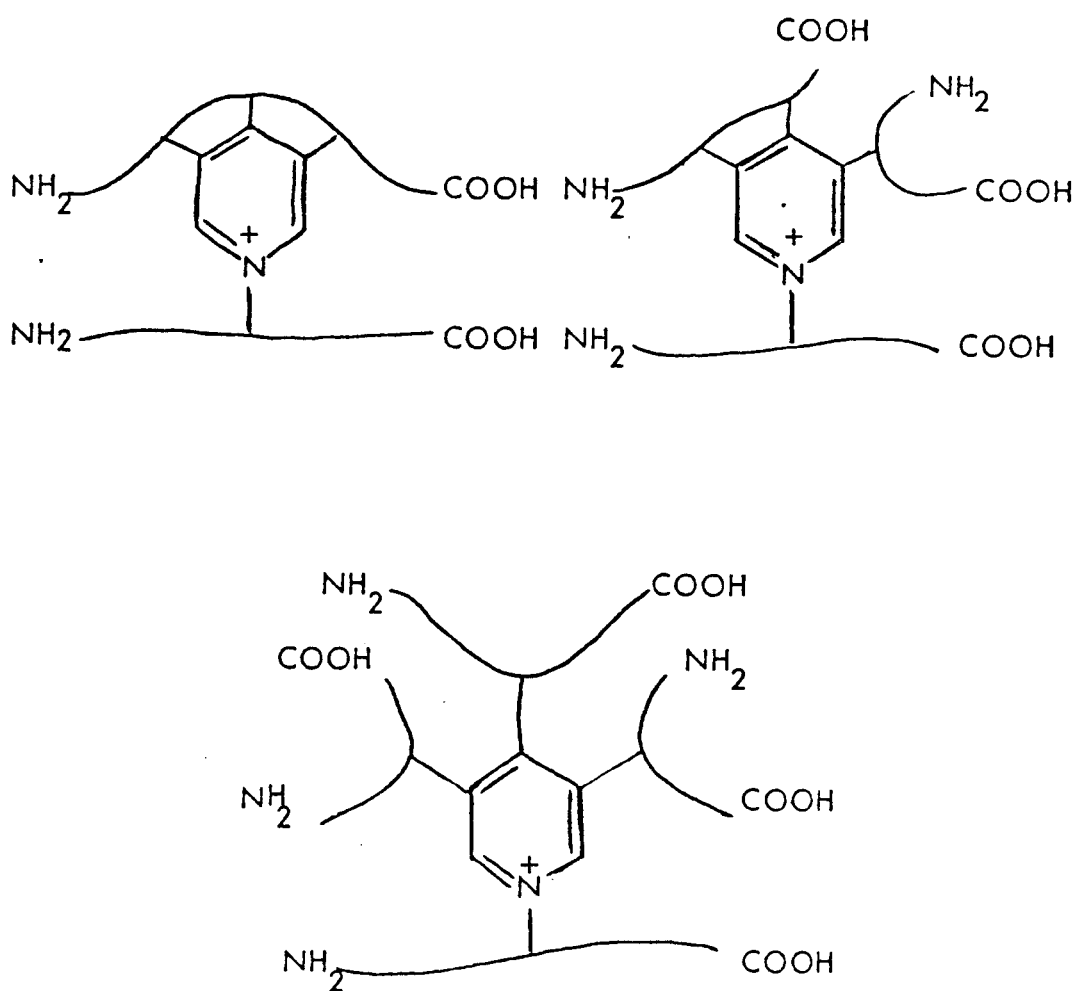


Figure 5 : Nombre de chaînes peptidiques pouvant être liées par l'isodesmosine ou par la desmosine (d'après FRANZBLAU et coll., 1970)

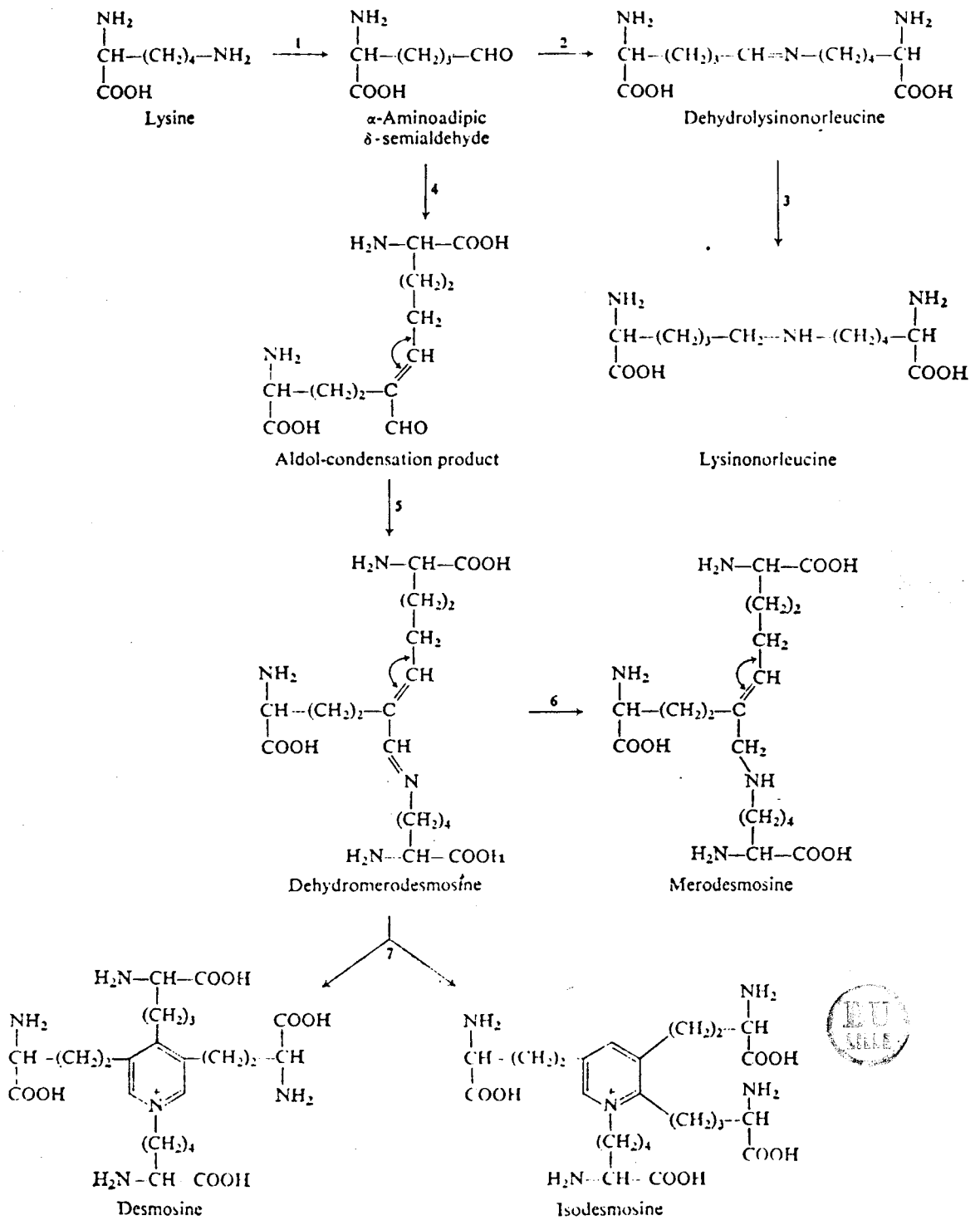


Figure 6 : Schéma de la formation des liaisons croisées (d'après FRANCIS et coll., 1973)

II.3.2. Composition en acides aminés

Indépendamment des méthodes de préparation, la composition en acides aminés de l'élastine hautement purifiée est très constante. Elle est caractérisée par un taux élevé d'acides aminés non polaires et un taux faible d'acides aminés polaires.

Le tableau I rassemble les compositions en acides aminés de l'élastine pulmonaire de différentes espèces : elles présentent les mêmes caractéristiques. Comme dans le collagène, un tiers des acides aminés est représenté par le glycoacide et un neuvième environ par la proline. Les autres acides aminés non polaires tels que l'alanine, la valine, la leucine et l'isoleucine sont prédominants (40 %), tandis que les acides aminés polaires tels que les acides aspartique et glutamique, la lysine et l'arginine existent en très faible proportion. Contrairement au collagène, l'élastine a une teneur faible en hydroxyproline et elle est dépourvue d'hydroxylysine. Toutefois, la teneur en tyrosine de l'élastine varie selon les espèces : 2,4 résidus/100 chez l'Homme contre 0,7 résidu/100 chez le Boeuf. Enfin, il faut souligner la présence des acides aminés caractéristiques, desmosine et isodesmosine.

Les compositions en acides aminés de l'élastine extraite de différents tissus d'une même espèce (tableau II) sont très semblables.

II.4. Anomalies de la biosynthèse

II.4.1. Maladies cutanées

Des anomalies dans la morphologie des fibres élastiques ont été décrites au niveau de la peau.

Certaines affections sont caractérisées par une diminution de la quantité de fibres élastiques ou par une anomalie dans leur qualité fonctionnelle. Elles sont génétiquement transmissibles : ce sont le pseudoxanthome élastique (ROSS et coll., 1978), le syndrome appelé cutis laxa (NANKO et coll., 1979), le syndrome de Menkes (UITTO, 1979) et le syndrome d'Ehlers-Danlos de type V (UITTO, 1979). Ces maladies se manifestent également au niveau des autres tissus conjonctifs (vaisseaux, articulations).

Tableau I

Composition en acides aminés de l'élastine pulmonaire
de différentes espèces (nombre de résidus/100 résidus)
(d'après STARCHER et GALIONE, 1976)

	Homme	Boeuf	Lapin	Rat
HYP	1,2	1,4	1,5	1,8
ASP	0,9	1,1	0,9	0,7
THR	1,3	1,2	1,5	2,1
SER	0,9	1,3	1,5	1,4
GLU	2,3	2,3	1,8	1,4
PRO	12,7	11,1	11,2	10,3
GLY	29,1	32,2	33,1	38,3
ALA	22,5	22,1	22,7	19,7
VAL	13,6	13,0	10,9	9,5
ILE	2,4	2,8	2,2	2,5
LEU	6,0	6,1	6,1	6,6
TYR	2,4	0,9	2,8	2,8
PHE	2,2	3,0	2,1	1,5
IDE*	0,25	0,15	0,10	0,1
DES*	0,27	0,23	0,11	0,12
HIS	0,03	0,05	0,1	0,01
LYS	0,7	0,7	0,4	0,4
ARG	1,3	0,8	0,9	0,8



* IDE : isodesmosine ; DES : desmosine

Tableau II

Composition en acides aminés de l'élastine
de différents tissus chez l'Homme (nombre de résidus/100 résidus)
(d'après STARCHER et GALIONE, 1976)

	Aorte	Poumon	Utérus
HYP	1,0	1,2	1,3
ASP	0,6	0,9	0,9
THR	1,2	1,3	1,3
SER	0,8	0,9	0,9
GLU	1,8	2,3	2,1
PRO	13,1	12,7	12,6
GLY	29,5	29,1	29,4
ALA	23,3	22,5	23,1
VAL	14,3	13,6	13,9
ILE	2,3	2,4	2,5
LEU	5,8	6,0	5,9
TYR	2,3	2,4	2,3
PHE	2,2	2,2	2,1
IDE	0,22	0,25	0,27
DES	0,28	0,27	0,30
HIS	0,05	0,03	0,04
LYS	0,4	0,7	0,4
ARG	0,9	1,3	0,7



Une autre pathologie cutanée appelée élastoderma se caractérise par une accumulation excessive d'élastine au niveau de la peau et s'accompagne de modifications structurales des fibres élastiques visualisées au microscope électronique (KORNBERG et coll., 1985).

II.4.2. Autres affections

Des maladies héréditaires comme les syndromes de Marfan et de Buschke-Ollendorf (ROSENBLOOM, 1984) ont été décrites. Elles affectent la fonction des fibres élastiques et conduisent à des anomalies des tissus concernés (vaisseaux, peau, tissu osseux).

III. DEGRADATION "IN VIVO"

III.1. Catabolisme normal

Une fois la tropoélastine transformée en élastine selon le processus précédemment décrit, les fibres élastiques sont stables et l'élastine n'est pas sujette à un turnover comparable à celui des autres protéines (LEFEVRE et RUCKER, 1980 ; DUBICK et coll., 1981). D'après ces auteurs, il faudrait estimer le turnover en années.

La destruction de l'élastine est réalisée "in vivo" par les enzymes élastolytiques ; leur définition est très restrictive, puisque ce groupe ne comprend que des enzymes capables de solubiliser l'élastine par un processus de protéolyse. Pour la plupart ce sont des élastases mais la cathepsine G leucocytaire, par exemple, possède également une telle activité (voir plus loin). La première élastase a été isolée du pancréas de Porc par BANGA (1952). La présence d'élastases a été décrite dans différents tissus et cellules d'origine humaine : deux élastases ont été isolées du pancréas par LARGMAN et coll. (1976) ; les élastases des plaquettes et de l'aorte ont été purifiées par l'équipe de ROBERT (LEGRAND et coll., 1975), (HORNEBECK et coll., 1975) ; une élastase propre aux macrophages alvéolaires a été décrite par RODRIGUEZ et coll. (1977) et DE CREMOUX et coll. (1978) ; l'élastase des polynucléaires a été mise en évidence dès 1968 par JANOFF et SCHERER. Cet enzyme a été intensément étudié du fait de sa capacité destructrice potentielle au cours des phénomènes inflammatoires. Nous rappellerons donc ici quelques caractéristiques de cet enzyme.

L'élastase leucocytaire est une sérine-protéase qui hydrolyse de préférence des liaisons peptidiques impliquant des résidus de valine ou d'alanine en libérant leur extrémité C-terminale. L'enzyme est un polypeptide monocaténaire qui contient 18 à 20 p. 100 de sucres et dont la M_r est égale à 29 000 ; son point isoélectrique est supérieur à 10. Il est formé d'au moins 4 isoenzymes (BAUGH et TRAVIS, 1976) qui ont été récemment partiellement séparés par une technique chromatographique (BRUCH et BIETH, 1986) ; ces isoenzymes ont la même activité élastolytique. L'élastase leucocytaire est capable de dégrader, outre l'élastine, d'autres protéines composant le tissu conjonctif comme le collagène et la fibronectine ainsi que la plupart des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (STARKEY, 1980) ; elle a donc un pouvoir protéolytique très important.

A l'état normal, son activité "in vivo" est régulée par la présence d'inhibiteurs d'origine plasmatique ou tissulaire qui empêchent une autodigestion des tissus. La notion d'un équilibre protéases-antiprotéases est généralement admise. Des activités d'anti-élastase leucocytaire ont été décrites pour au moins trois protéines plasmatiques : l' α_1 -antiprotéase (α_1 -PI) qui inhibe l'élastase leucocytaire d'une manière irréversible selon un mécanisme bien connu maintenant (revue générale de TRAVIS et SALVESEN, 1983), l' α_2 -macroglobuline (α_2 -M) qui transporte l'élastase au niveau du système réticulo-endothélial en vue de son élimination (OHLSSON, 1974) et l'inter- α -trypsine inhibiteur (ITI) dont l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase leucocytaire est de connaissance plus récente (ALBRECHT et coll., 1983 ; JOCHUM et BITTNER, 1983).

Le rôle protecteur de l' α_1 -PI a été amplement démontré aussi bien à l'étage bronchique qu'au niveau alvéolaire. Il existe d'autre part au moins un inhibiteur d'origine bronchique (appelé Br1 ou antileucoprotéase), susceptible également d'empêcher l'action de l'élastase leucocytaire sur l'élastine pulmonaire (BRUCH et BIETH, 1986).

III.2. Dégradation pathologique

Lorsque s'établit "in vivo" une situation modifiant l'équilibre protéases-antiprotéases en faveur des protéases, l'élastine est soumise à une agression protéasique. Deux pathologies semblent résulter de la digestion de l'élastine : l'emphysème pulmonaire et l'athérosclérose.

III.2.1. Emphysème pulmonaire

Le poumon emphysémateux est caractérisé par un élargissement permanent des espaces aériens, accompagné de la destruction des parois alvéolaires.

L'hypothèse du rôle de l'élastase leucocytaire dans la pathogénèse de l'emphysème pulmonaire repose sur la mise en évidence dès 1963 de l'association entre emphysème pulmonaire et déficit en α_1 -PI (LAURELL et ERIKSSON). GROSS et coll. (1965) montrèrent ensuite les premiers la possibilité de provoquer des lésions emphysémateuses chez l'animal par instillation intrapulmonaire d'un enzyme protéolytique, la papaïne.

De nombreuses études ont été consacrées à ce sujet, mais beaucoup de questions n'ont pas encore reçu de réponses (revue générale par JANOFF, 1985). Notons qu'une étude récente (DAMIANO et coll., 1986), effectuée sur des poumons de sujets emphysémateux, a montré que l'élastase était non seulement présente dans les polynucléaires de l'interstitium mais aussi associée aux fibres élastiques. Ces auteurs précisent qu'il existe une corrélation entre la quantité d'élastase associée à l'élastine et l'importance des lésions emphysémateuses. Cette étude vient donc confirmer l'hypothèse du rôle de l'élastase leucocytaire au cours de l'emphysème.

III.2.2. Athérosclérose

Au niveau morphologique, cette affection est caractérisée par une fragmentation des fibres élastiques de la média des parois artérielles. Le rôle de différentes élastases a été suggéré dans la pathogénèse de cette maladie. Il est peu probable que l'élastase pancréatique puisse être impliquée du fait de sa très faible réabsorption intestinale, ce qui exclut sa présence en quantité significative dans le sang où elle rencontre un large excès d'inhibiteurs capables de la neutraliser.

D'autres élastases jouent probablement un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. HORNEBECK et coll. (1976) ont caractérisé au niveau de la paroi aortique humaine une activité élastolytique qui augmente avec l'âge et le degré d'athérome. Cet enzyme d'origine artérielle a pu être isolé et caractérisé à partir de cultures de cellules musculaires lisses (LEAKE et coll., 1983).

L'élastase d'origine plaquettaire (LEGRAND et coll., 1975) est susceptible d'intervenir également dans le processus et d'accélérer la formation des plaques d'athérome après adhésion de plaquettes sanguines à la paroi des vaisseaux et pénétration de l'enzyme au niveau de l'endothélium jusqu'à la média.

De plus, une activité de type élastase, métal-dépendante et associée aux apolipoprotéines de haute densité (apo HDL), a été décrite dans le sérum humain (JACOB et coll., 1981). Les auteurs suggèrent que cet enzyme pourrait pénétrer avec les lipoprotéines dans la paroi aortique et exercer alors son activité protéolytique sur la matrice élastique.

III.3. Etude des produits de dégradation de l'élastine "in vivo"

HAREL et coll. (1980) ont montré que, lors de la destruction de l'élastine par les enzymes élastolytiques "in vivo", la desmosine libérée n'était pas réutilisée pour une nouvelle synthèse ni réabsorbée par l'intestin, mais qu'elle était excrétée dans les urines ; ces auteurs ont donc mis au point une méthode radioimmunologique permettant de doser la desmosine dans les urines. Cependant on ne connaît pas, bien entendu, l'origine tissulaire de cette desmosine ; cette méthode n'offre donc que peu d'intérêt dans les états pathologiques.

D'autres méthodes ont été mises au point pour évaluer la dégradation "in vivo" de l'élastine ; il s'agit essentiellement de techniques immunologiques destinées à mesurer dans le sérum, l'urine et récemment le liquide de lavage bronchoalvéolaire, les peptides résultant de la dégradation de l'élastine (DARNULE et coll., 1982 ; KUCICH et coll., 1983, 1985a). Le liquide de lavage bronchoalvéolaire mis à part, on peut opposer à ces différents auteurs la même critique que celle qui a été faite pour le dosage de la desmosine dans l'urine.

Les peptides résultant de la digestion de l'élastine possèdent une propriété biologique intéressante à signaler dans le cadre de l'emphysème pulmonaire. Plusieurs équipes (SENIOR et coll., 1980 ; HUNNINGHAKE et coll., 1981 ; KUNIMOTO et JAY, 1985) ont en effet démontré leur activité chimiotactique pour les monocytes, précurseurs

des macrophages. Puisque les macrophages alvéolaires sécrètent un facteur chimiotactique pour les polynucléaires (MERRIL et coll., 1980), ces derniers sont attirés dans la lumière alvéolaire ; la digestion de l'élastine pourrait ainsi être auto-entretenu et amener la formation de lésions emphysemateuses.

Les peptides les plus actifs ont une M_r comprise entre 14 000 et 20 000 (SENIOR et coll., 1980) ou entre 10 000 et 50 000 (HUNNINGHAKE et coll., 1981). Cependant, le peptide Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, que l'on trouve d'une manière répétitive dans l'élastine, est également chimiotactique pour les monocytes (SENIOR et coll., 1984). Il ne semble pas que la présence de desmosines dans les peptides soit une condition nécessaire à l'activité chimiotactique, aussi bien pour les monocytes que pour les fibroblastes (SENIOR et coll., 1982).

IV. DEGRADATION "IN VITRO"

IV.1. Méthodes chimiques

IV.1.1. Solubilisation par l'acide oxalique : obtention des alpha- et bêta-élastines

PARTRIDGE et coll. (1955) et PARTRIDGE et DAVIS (1955) ont réalisé des études de solubilisation de l'élastine de ligament de Boeuf par l'acide oxalique 0,25 M. La séparation des fragments acidosolubles de l'élastine par coacervation ou par chromatographie de gel-filtration a montré la présence de deux fractions majeures dans l'hydrolysat :

- une première correspondant à une M_r de 68 000 à 75 000, appelée alpha-élastine, coacervable,
- une deuxième de faible M_r (de l'ordre de 5 500), appelée bêta-élastine, non coacervable.

L'hétérogénéité de ces fractions d'élastine a été évaluée par l'analyse des acides aminés en position N-terminale.

IV.1.2. Solubilisation par hydrolyse organoalcaline : obtention de la kappa-élastine

Une méthode de solubilisation "in vitro" de l'élastine insoluble après hydrolyse organoalcaline a été mise au point dans le laboratoire du Dr L. ROBERT. Des études systématiques de l'influence de la concentration en ion alcalin et en solvant ainsi que de la température sur la vitesse d'élastolyse ont été réalisées (ROBERT et POUILLAIN, 1963). L'effet de différents solvants organiques a été aussi étudié (KORNFELD-POUILLAIN et ROBERT, 1968). La composition en acides aminés de la kappa-élastine ne varie pas de façon significative par rapport à celle de l'élastine insoluble (COMTE et ROBERT, 1968).

DAVRIL et coll. (1972) ont montré que les peptides obtenus dans les premiers temps de la cinétique d'hydrolyse de l'élastine par une solution de KOH 1 M dans 80 % d'éthanol à 37°C sont peu réticulés ; les peptides riches en liaisons croisées (desmosine, isodesmosine) n'apparaissent que dans les temps ultérieurs de la dégradation alcaline.

La détermination des acides aminés en position N-terminale après des temps variables d'hydrolyse indique la présence de glycolle et, en quantité plus faible, d'alanine (JACOB et HORNEBECK, 1985). Après séparation des produits solubles sur Sephadex G-100, quatre fractions ont été obtenues par ces auteurs. Leurs M_r sont comprises entre 100 000 et 80 000 pour la première, entre 60 000 et 29 000 pour la deuxième et de 16 000 pour la troisième. La quatrième fraction renfermant moins de 5 % de la totalité des peptides a une M_r comprise entre 12 000 et 8 000.

IV.2. Méthodes enzymatiques

Des enzymes d'origines diverses ont été utilisés pour solubiliser l'élastine fibreuse "in vitro". L'élastase pancréatique de Porc qui a été la première élastase isolée et caractérisée (SHOTTON, 1970) a été largement utilisée pour l'obtention de fragments solubles d'élastine (LABELLA, 1961). L'élastase et la cathepsine G des polynucléaires humains utilisées dans le présent travail ont également été étudiées par d'autres auteurs pour leur activité élastolytique "in vitro". Nous décrirons les différentes techniques de solubilisation de l'élastine humaine et bovine par ces enzymes dans la partie Résultats et Discussion.

La solubilisation de l'élastine de ligament de Boeuf par d'autres enzymes du type aspartyl-protéases comme la pepsine et la cathepsine D a été décrite par COLLINS et FINE (1981). Ces études ont été effectuées à différents pH ; la pepsine solubilise l'élastine à un pH optimal inférieur à 2,0. Les produits de digestion ont été analysés par chromatographie de gel filtration et électrophorèse en gel de polyacrylamide ; leur M_r est estimée proche de 68 000. La dégradation de l'élastine par la pepsine est inhibée par la pepstatine, la présence de SDS ou de NaCl. Ces mêmes auteurs ont décrit que la cathepsine D, qui est également inhibée par la pepstatine, n'a pas d'activité élastolytique si le pH est compris entre 3,2 et 7,2.

Un certain nombre d'enzymes élastolytiques ont été isolés à partir de plantes et de micro-organismes. Certains de ces enzymes sont des métalloprotéases, comme l'élastase de Pseudomonas aeruginosa (NISHINO et POWERS, 1980), et la thermolysine (SANDBERG et coll., 1986).

Des enzymes d'origine végétale de la famille des thiol-protéases ont été aussi utilisés pour solubiliser l'élastine : ce sont la papaïne (THOMAS, 1971), la ficine (YATCO-MANZO et WHITAKER, 1962) et la bromélaïne (THOMAS et PARTRIDGE, 1960). D'autre part, une autre thiol-protéase, la cathepsine L isolée récemment de foie humain, possède une activité élastolytique à pH 5,5 comparable à celle de l'élastase pancréatique de Porc à son pH optimal de 8,8 (MASON et coll., 1986).

Il faut souligner que, si l'on excepte les enzymes élastolytiques de la famille des sérine-protéases (élastases, cathepsine G) dont les spécificités sont les mieux connues, les enzymes des trois autres familles (aspartyl-, métallo- et thiol-protéases) utilisés pour digérer l'élastine ont une activité protéolytique non spécifique et conduisent à des ruptures au hasard des liaisons peptidiques.

* *
*

*
* *

MATERIEL ET METHODES

* *
*

I. PREPARATION DE L'ELASTINE PULMONAIRE

La méthode utilisée, présentée dans la figure 7, consiste en une série d'extractions fractionnées des différents constituants macromoléculaires autres que l'élastine avant l'obtention du résidu final comportant l'élastine fibreuse.

Dans le but d'obtenir de l'élastine d'adulte, nous avons utilisé comme matériel de départ le parenchyme d'un sujet âgé de 57 ans, décédé d'une affection non pulmonaire d'après l'examen nécropsique effectué dans le service du Professeur GOSSELIN (Hôpital Calmette) ; au cours de la dissection, nous avons constaté cependant que les poumons de ce patient étaient très empoissés. Un protocole analogue ne comportant pas d'étape de délipidation a été appliqué au parenchyme obtenu après dissection des poumons de sept nouveaux-nés, décédés de cause inconnue.

I.1. Dissection et homogénéisation du tissu pulmonaire

Les poumons fournis par le Professeur LAFITTE (Clinique Pneumophtisiologique - Hôpital Calmette) ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Dans un premier temps, après décongélation des poumons dans du sérum physiologique, nous avons éliminé le mieux possible les bronches, les vaisseaux et la plèvre viscérale. Le parenchyme ainsi récupéré est coupé en petits morceaux qui sont lavés dans du sérum physiologique et homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur POLYTRON (type PT-10) à 1 600 t/mn pendant des périodes successives de 3 mn entrecoupées de temps d'arrêt. La suspension est ensuite soumise à une centrifugation à 20 000 g pendant 30 mn à 4°C ; enfin trois lavages successifs sont effectués dans 600 ml de sérum physiologique.

I.2. Elimination des composants extractibles par NaCl 1 M

Dans un second temps, le culot précédemment récupéré (résidu 1, fig. 7) est repris par 600 ml de NaCl 1 M et, après homogénéisation, est maintenu sous agitation magnétique pendant 1 h à 4°C . Cet homogénat est ensuite centrifugé selon les mêmes conditions que précédemment. Quatre extractions successives sont effectuées. Le culot est gardé pour l'étape suivante alors que les surnageants sont éliminés.

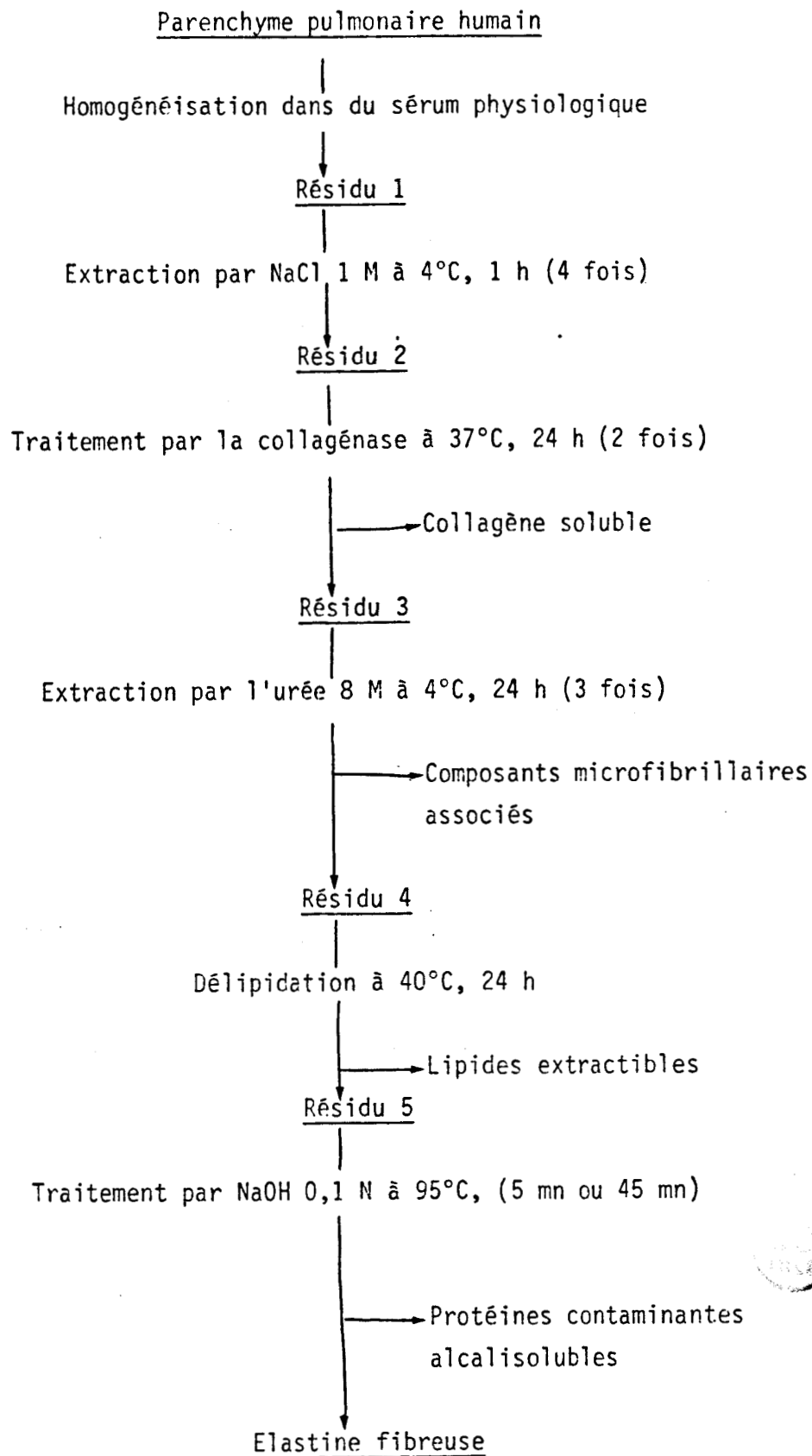


Figure 7 : Préparation de l'élastine pulmonaire

I.3. Extraction du collagène

Le culot précédent (résidu 2) est repris par 600 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,8 et incubé avec 650 unités de collagénase* par gramme de résidu humide, sous agitation magnétique durant 24 h à 37°C. La suspension est ensuite centrifugée. Le surnageant contenant des fragments solubilisés de collagène est dialysé contre de l'eau désionisée, puis lyophilisé. Deux extractions successives par la collagénase sont réalisées et le culot (résidu 3) est gardé pour l'étape suivante.

I.4. Extraction des composants microfibrillaires associés

Trois extractions sont ensuite effectuées par 300 ml d'une solution d'urée 8 M tamponnée par du Tris-HCl 0,1 M à pH 8,0, 0,1 M en EDTA et contenant 0,1 % de β-mercaptoéthanol. La suspension est maintenue sous agitation magnétique pendant 24 h à 4°C puis elle est centrifugée comme précédemment. Les surnageants sont mis en dialyse contre de l'eau désionisée, puis lyophilisés. Le résidu 4 constitué par le stroma élastique dépourvu de collagène et des glycoprotéines associées à l'élastine est lavé dans l'eau et l'éthanol puis séché à l'acétone.

I.5. Délipidation

Le résidu sec est ensuite soumis à une délipidation à reflux. Celle-ci est réalisée à l'aide d'un extracteur de Soxhlet dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v), durant 24 h à 40°C sous ébullition douce.

* Collagénase bactérienne de Clostridium histolyticum (B grade CALBIOCHEM, 100 000 U/g). Bien que ce type de collagénase contienne une impureté élastolytique (ROBERT et ROBERT, 1969), l'enzyme a été utilisé sans purification.

I.6. Extraction des protéines contaminantes alcalisolubles

Après lavage dans l'éthanol et séchage à l'acétone, le résidu fibreux délipidé (résidu 5) est repris par la soude 0,1 N et il est maintenu sous agitation dans un bain-marie à ébullition pendant des temps variables (5 ou 45 mn). La suspension de fibres est immédiatement refroidie et neutralisée par HCl 1 N, puis centrifugée. Le résidu d'élastine est rincé à l'eau désionisée et à l'éthanol puis séché par l'acétone et l'éther.

Les fibres d'élastine sont ensuite tamisées. Les mailles des tamis utilisés comportent les tailles suivantes : 0,315, 0,160 et 0,040 mm.

Le tableau III présente les quantités des résidus obtenus lors de chaque étape de la préparation. Etant donné la faible teneur en résidu 4 (1 g en poids humide) pour la préparation d'élastine de nouveaux-nés, nous n'avons pas effectué de délipidation à ce niveau mais soumis directement ce résidu au lavage et séchage avant la dernière étape de purification.

II. PREPARATION DES ENZYMES LEUCOCYTAIRES : ELASTASE ET CATHEPSINE G

II.1. Mode opératoire

Deux enzymes d'origine humaine, la cathepsine G et l'élastase, ont été utilisés pour l'étude de la dégradation de l'élastine. Ces enzymes sécrétés par les polynucléaires sont préparés à partir d'expectorations bronchiques purulentes selon la méthode de MARTODAM et coll. (1979) présentée sur la figure 8. Lors de la dernière étape de purification, les deux enzymes sont séparés par chromatographie sur colonne de CM-Sephadex en utilisant un gradient concave de force ionique croissante ; l'élastase est éluée la première et la cathepsine G est éluée en fin de gradient.

La pureté de chaque protéine a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (LAEMMLI, 1970). Etant donné que les deux enzymes sont des protéines basiques, nous avons aussi effectué une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH acide (REISFELD et coll., 1962), où l'on peut distinguer les différents isoenzymes présents dans chacune des deux protéases.

Tableau III

Poids des résidus obtenus lors
de chaque étape de la préparation

	Nouveaux-nés	Adulte
Parenchyme (poids humide)	300 g	277 g
Résidu 1 (poids humide)	108 g	114 g
Résidu 2 (poids humide)	77 g	94 g
Résidu 3 (poids humide)	21 g	33 g
Résidu 4 (poids humide)	1 g	26 g
(poids sec)	0,15 g	
Résidu 5 (poids sec)	-	4 g
Elastine fibreuse [*]	0,108 g	3,8 g
(poids sec)		

*Après traitement par la soude 0,1 N à 95°C pendant 5 mn



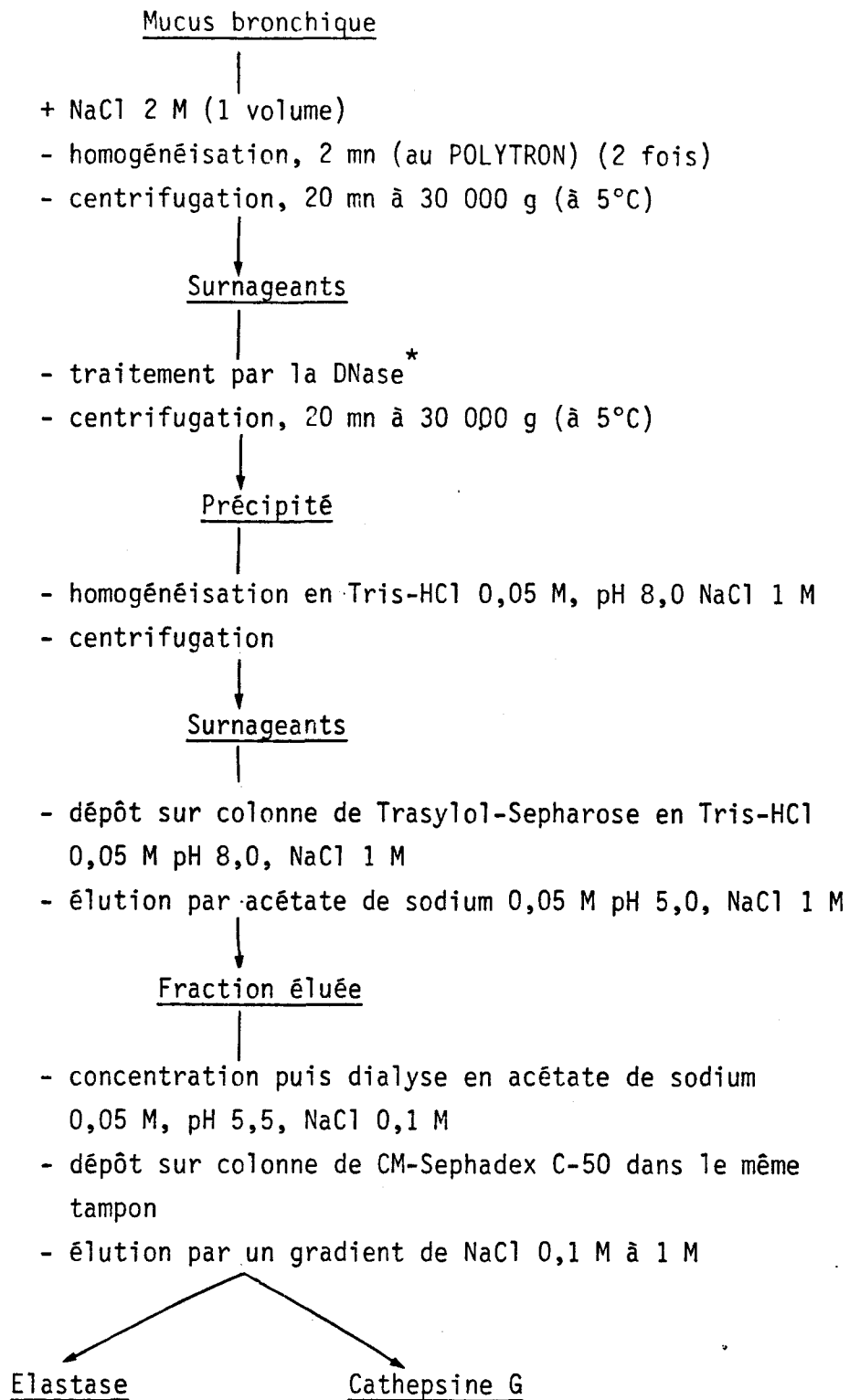


Figure 8 : Protocole de purification de l'élastase et de la cathepsine G à partir du mucus bronchique selon MARTODAM et coll. (1979)

* DNase : désoxyribonucléase I de pancréas de Boeuf, (SIGMA, 1950 U Kunitz/mg)

II.2. Dosage de l'activité spécifique

Les solutions d'enzymes sont préparées dans un tampon acétate de sodium 0,05 M, pH 5,5, NaCl 0,1 M. Leur concentration en protéine peut être déterminée par la mesure de leur absorption UV. Le coefficient d'extinction de l'élastase ($E_{280 \text{ nm}}^{1\%}$) est égal à 9,85 (BAUGH et TRAVIS, 1976). Des valeurs différentes de coefficient d'extinction ont été données par plusieurs auteurs pour la cathepsine G : 6,64 selon TRAVIS et coll. (1978), 10,0 selon STARKEY et BARRETT (1976). Etant donné la discordance de ces valeurs, nous avons préféré utiliser la valeur obtenue par le dosage de LOWRY et coll. (1951) afin de déterminer la concentration de cette solution.

Le principe du dosage de l'activité spécifique de chaque enzyme est la mesure à 410 nm de la libération de paranitroaniline en fonction du temps à partir d'un substrat chromogénique synthétique hydrolysé par l'enzyme. Le dosage est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON (KONTRON) dont le compartiment à cuves est thermostaté à 25°C.

L'activité spécifique de l'élastase est déterminée en tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, NaCl 0,5 M avec le substrat Suc-(Ala)₃-pNA* dissous dans la N-méthyl-pyrrolidone, décrit par BIETH et coll. (1974). En ce qui concerne la cathepsine G, son dosage est réalisé selon la méthode de NAKAJIMA et coll. (1979) en tampon Hepes 0,1 M, pH 7,5, contenant NaCl 0,5 M et 9 % de DMSO, avec le substrat spécifique Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA** dissous dans le DMSO.

III. SOLUBILISATION DE L'ELASTINE PAR L'ELASTASE ET LA CATHEPSINE G

Les fibres d'élastine de taille comprise entre 0,315 et 0,160 mm sont mises en suspension à raison de 5 mg/ml, sous agitation magnétique dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,2 M, pH 8,0, en présence de l'un ou l'autre des enzymes. Les rapports pondéraux enzyme actif/substrat (E/S) utilisés sont égaux à 1:1000, 1:100, 2:100 pour l'élastase leucocytaire et à 1:100, 2:100, 5:100 pour la cathepsine G.

* Suc-(Ala)₃-pNA : succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-p-nitroanilide.

** Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA : succinyl-L-alanyl-L-alanyl-prolyl-L-phenylalanyl-p-nitroanilide.

Les cinétiques de solubilisation sont réalisées à 37°C sur 1 ml de la suspension. Des prélèvements de 100 µl sont effectués à des temps choisis, la réaction étant stoppée par acidification : 34 µl de HCOOH 1 M sont ajoutés. Les échantillons sont dilués à 1 ml puis filtrés sur filtres MILLIPORE de porosité égale à 1,2 µm, afin d'enlever les fines particules insolubles en suspension. Le dosage des protéines par la méthode de LOWRY permet ensuite de quantifier l'élastine solubilisée.

Lorsque la solubilisation est effectuée afin d'analyser les peptides obtenus, ce même procédé est utilisé sur plusieurs centaines de mg de fibres d'élastine. La durée de la solubilisation est de 24 h à 37°C et le rapport E/S est de 1:100. Les produits obtenus sont centrifugés puis lyophilisés, afin d'être étudiés par des méthodes électrophorétiques et chromatographiques.

IV. ETUDE DES PRODUITS DE DIGESTION

IV.1. Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation est réalisée sur plaque de gel de polyacrylamide (5 % en acrylamide) contenant 3 % d'un mélange d'ampholytes (LKB) formant un gradient de pH de 3 à 10. Le gel est coulé entre deux plaques de verre (9 x 11 cm) espacées de 1 mm. Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons sont soumis à un dessalage sur une colonne de Bio-Gel P-2 (1 x 58 cm) équilibrée en HCOOH 0,01 M, puis lyophilisés et dissous dans l'eau désionisée à raison de 10 mg/ml.

L'électrophorèse est effectuée à l'aide d'un appareil LKB 2117 Multiphor, sous une puissance constante de 4 Watts. Le contact du gel avec les électrodes est réalisé avec des mèches épaisses imprégnées d'électrolytes (SERVA). Comme anolyte, nous utilisons un mélange contenant de l'acide L-aspartique (0,83 g) et de l'acide L-glutamique (0,92 g) pour 250 ml d'eau, de pH 3,0 et comme catholyte un mélange de L-arginine (1,09 g), de L-lysine (0,91 g) et d'éthylène diamine (30 ml) pour 250 ml d'eau, de pH 10,0. Au cours de la migration (2 h environ), l'ampérage décroît jusqu'à atteindre une valeur minimale

constante, ce qui indique que les échantillons sont alors focalisés à leur point isoélectrique (pI).

La fixation des échantillons focalisés dans le gel est effectuée par une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 12,5 % et d'acide sulfosalicylique à 3,4 % (g pour 100 ml) sous agitation pendant 1 h 30. Cette solution nous permet également d'éliminer les ampholytes. Le gel est ensuite coloré durant 20 mn par une solution de bleu de Coomassie (R-250) à 0,05 % dans un mélange méthanol/eau/acide acétique (40/55/5, v/v). La décoloration est effectuée par deux bains successifs de méthanol/eau/acide acétique en proportions différentes (40/55/5, v/v pour le premier et 4/90/6, v/v pour le second). Des témoins de pI connus (PHARMACIA) sont utilisés pour établir une courbe des valeurs de pI en fonction de la distance de migration.

IV.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS : SDS-PAGE

L'électrophorèse est réalisée sur plaque de gel de polyacrylamide de 1 mm d'épaisseur, avec un appareillage semblable à celui décrit par KERCKAERT (1978), en gradient de 5 % à 30 % d'acrylamide en présence de 0,1 % de SDS et à pH 8,9. La méthode utilisée est celle de LAEMMLI (1970), légèrement modifiée en ce qui concerne la concentration en Tris dans le gel de séparation et en Tris-glycocolle dans le tampon d'électrophorèse (tableau IV). La concentration en polyacrylamide du gel supérieur est égale à 5 % et son pH est de 6,8. L'électrophorèse est réalisée sous un ampérage constant de 35 mA pendant 3 h.

Les échantillons sont dénaturés par ébullition pendant 3 mn après dissolution dans un tampon de pH 6,8 contenant Tris-HCl 0,05 M, 2 % de SDS, 10 % de glycérol avec ou sans 4 % de β -mercaptoéthanol. Bien que, dans cette technique, un dépôt de 0,5 à 1 μ g d'une protéine purifiée soit suffisant pour sa visualisation, il est nécessaire de déposer de l'ordre de 30 μ g d'élastine soluble pour avoir une coloration satisfaisante.

La coloration est effectuée dans une solution contenant 100 ml d'acide trichloracétique à 12,5 % auxquels sont ajoutés 10 ml d'une solution de bleu de Coomassie G-250 (0,25 g/100 ml H₂O) pendant au moins 3 h. Le gel est ensuite placé dans un bain d'acide acétique à 5 % qui permet de développer la coloration des protéines en un bleu intense.

Tableau IV

Concentration en Tris et en glycolle dans le système de LAEMMLI (1970)
et dans le système modifié

	Système de LAEMMLI		Système modifié	
	Tris	Glycolle	Tris	Glycolle
Gel de séparation	380 mM	-	750 mM	-
Tampon d'électrophorèse	192 mM	25 mM	146 mM	15 mM



IV.3. Chromatographie de gel-filtration

L'équivalent de 5 mg d'élastine solubilisée (dosée par la méthode de LOWRY) a été mis en solution dans 1 ml d'HCOOH 0,02 M et déposé sur une colonne de Bio-Gel P-100 (BIO-RAD) (1,2 x 75 cm) équilibrée dans le même solvant. L'élution a été effectuée avec un débit de 5 ml/h et des fractions de 2,5 ml ont été collectées. L'absorption des liaisons peptidiques a été repérée à 226 nm.

IV.4. Chromatographie liquide de haute performance : HPLC

La chromatographie liquide de haute performance en phase inverse a été utilisée comme moyen de séparation des peptides obtenus après solubilisation de l'élastine par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires.

La séparation repose sur la différence d'hydrophobicité de ces peptides. Les différentes conditions utilisées seront discutées dans le chapitre Résultats et Discussion. Nous ne donnerons ici que des généralités pour l'utilisation de l'appareillage et les précautions à prendre pour la préparation des tampons.

Réactifs

Eau : qualité spéciale HPLC (CARLO ERBA)

Réactifs ultrapurs de qualité HPLC :

- acétate d'ammonium (MERCK)
- 1-propanol (MERCK)
- acide trifluoroacétique (PIERCE, HPLC Spectro grade)
- acétonitrile (CARLO ERBA)

Préparation des réactifs

Filtration : filtres MILLIPORE de porosité égale à 0,45 µm ;
Dégazage des solutions par sonication

Préparation des échantillons

Les échantillons à déposer sont d'abord dissous dans le tampon d'équilibre de la colonne puis filtrés sur filtres MILLIPORE de porosité égale à 0,45 µm.

Appareillage utilisé

La chromatographie est effectuée à l'aide d'un système HPLC LKB comportant :

- un injecteur avec boucle de 200 μ l,
- un programmeur,
- deux pompes,
- un absorptiomètre équipé d'un filtre à 206 nm,
- un collecteur de fractions.

L'appareillage a été installé sous une hotte afin de se protéger des vapeurs de solvants.

V. COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'ELASTINE NATIVE ET DES PRODUITS DE DIGESTION

L'analyse de la composition en acides aminés de l'élastine native et des fractions solubilisées est déterminée à l'aide d'un auto-analyseur BECKMAN de type 119CL, après hydrolyse acide totale de la protéine (service commun de l'Unité N°16 INSERM). L'hydrolyse s'effectue en tube scellé sous vide par 1 ml d'HCl 5,6 N pendant 24 h à 100°C.

La séparation des acides aminés est réalisée sur une colonne de résine de type DC6A (DURRUM) (6 mm x 370 mm) au débit de 44 ml/h. Si les résidus d'isodesmosine et de desmosine* peuvent être séparés et quantifiés en utilisant le programme standard, il faut un programme spécial pour l'hydroxyproline. Le tampon d'élution est le citrate de sodium 0,2 M à différents pH : 3,3 (3,28 pour le programme permettant la séparation de l'hydroxyproline) (T_1), 4,25 (T_2) et 6,04 (T_3). Le tampon T_3 est renforcé en NaCl de manière à obtenir une molarité finale en ions Na^+ de 1 M. Pendant l'élution, la température de la colonne monte de 30°C à 60°C. Le programme d'élution est présenté sur le tableau V.

* Standards d'isodesmosine et de desmosine : ELASTIN PRODUCTS COMPANY, INC. P.O. BOX 147 - PACIFIC, MISSOURI 63069, USA.

Tableau V

Programmes d'élution des acides aminés

	Temps (mn)	
	Programme standard	Programme spécial (hydroxyproline)
T ₁	0 - 39,5	0 - 39,5
T ₂	39,5 - 75	39,5 - 73
T ₃	75 - 180	73 - 180
NaOH 0,2 N	180 - 190	180 - 190
Température :		
30°C	0 - 9,5	0 - 22
Gradient 30°-60°	9,5 - 39,5	22 - 52
60°C	39,5 - 190	52 - 190

L'isodesmosine et la desmosine sont éluées à 105,3 et 106,8 mn respectivement, en utilisant l'un ou l'autre de ces programmes.



La détection est effectuée par une solution de ninhydrine tamponnée en acétate de sodium 4 M, pH 5,5 au débit de 68 ml/h. La quantité de chaque acide aminé de la solution standard déposée est de 5 nmoles et la sensibilité de détection est de 0,2 unité d'absorption à 570 nm.

* *
* * .

* * *

RESULTATS

&

DISCUSSION

* * *

I. DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ELASTINE PULMONAIRE D'ADULTE

I.1. Caractéristiques de la préparation d'élastine d'adulte

I.1.1. Procédé de purification

Le principe qui préside à tout procédé de purification de l'élastine est le suivant : l'élastine est insoluble dans toutes les solutions couramment utilisées pour l'extraction des protéines. Donc, tous les procédés séquentiels mis en oeuvre pour obtenir de l'élastine purifiée doivent répondre à deux impératifs :

1/ les techniques utilisées doivent préserver l'intégrité de la molécule d'élastine.

2/ les différentes étapes de purification doivent enlever complètement tous les contaminants associés à la molécule d'élastine (collagène, glycoprotéines, lipides).

Les différents protocoles décrits par d'autres auteurs sont rassemblés dans la figure 9.

Le procédé séquentiel de préparation que nous avons utilisé est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Nous avons débarrassé la préparation du collagène par l'action de la collagénase, procédé préconisé par MOCZAR et ROBERT (1970) moins drastique pour conserver l'intégrité de l'élastine que les traitements acides, alcalins (LANSING et coll., 1952) ou à l'autoclave (PARTRIDGE et coll., 1955). REILLY et TRAVIS (1980) ont indiqué que l'utilisation de la collagénase conduisait à la purification d'élastine plus adaptée à des études de solubilisation que celle préparée par une méthode dénaturante.

La préparation de fibres d'élastine que nous avons obtenue est de couleur noire. Il s'agit vraisemblablement de contaminants d'origine minérale (poussières et/ou charbon).

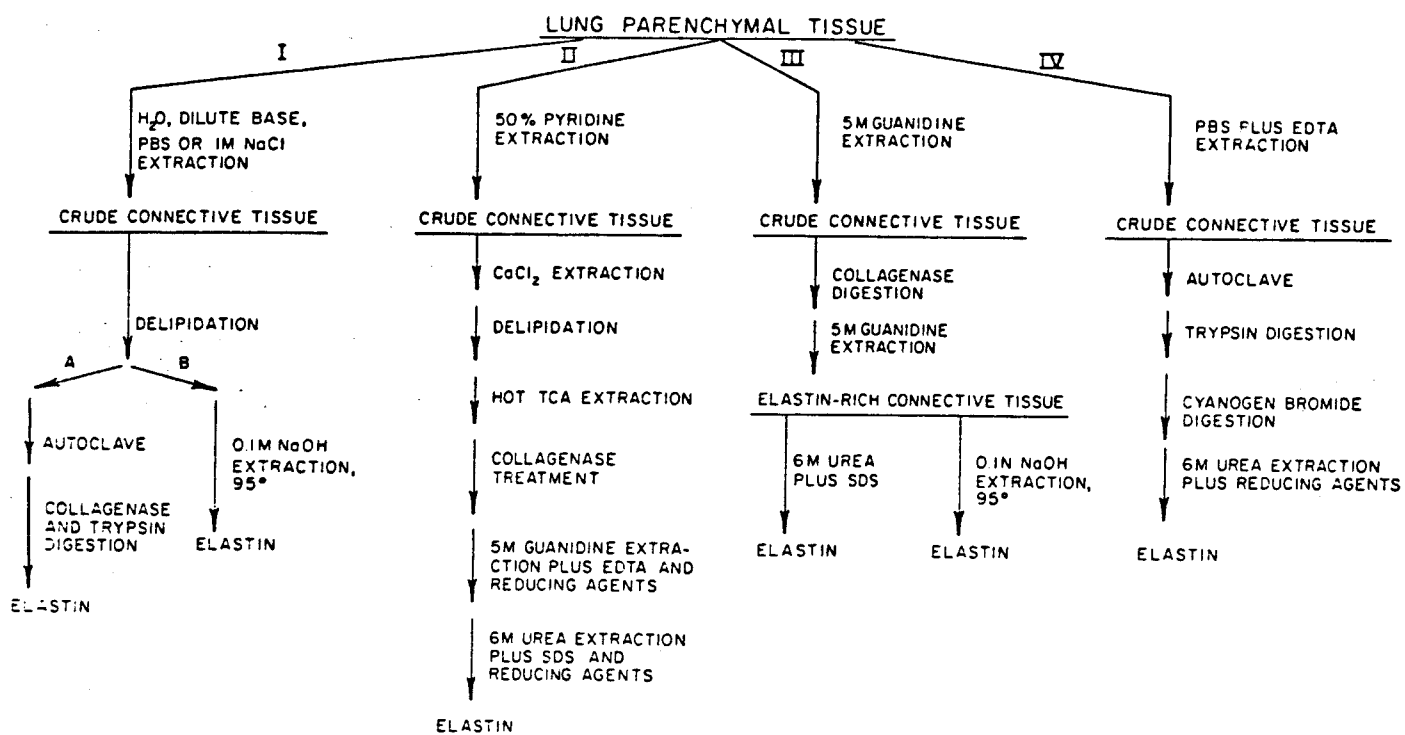


Figure 9 : Différents protocoles d'isolement de l'élastine (d'après RUCKER et DUBICK, 1984)

I.1.2. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés est indiquée dans le tableau VI, colonne F ; elle est comparée à celles données par d'autres auteurs pour l'élastine pulmonaire humaine (tableau VI, colonnes A, B, C, D et E). Nous observons d'une part une richesse en acides aminés hydrophobes et la présence de desmosine et d'isodesmosine. D'autre part, nous constatons une faible teneur en acides aminés polaires (acides, basiques) et en hydroxyproline, et un taux encore plus faible de méthionine, histidine et demi-cystine. Dans les colonnes A, B, C, D et E, le glycolle, l'alanine et la proline représentent respectivement environ le 1/3, le 1/4 et le 1/9 de l'ensemble des acides aminés. Dans notre préparation d'élastine, une teneur plus faible que celle donnée par les autres auteurs en glycolle et en alanine s'accompagne d'une augmentation de la teneur en acides aminés polaires et en hydroxyproline. Nous avons pensé à effectuer un traitement prolongé par NaOH (45 mn), afin d'éliminer des contaminants protéiques résiduels et d'obtenir une élastine dont la composition soit conforme à celles données par d'autres auteurs. Cependant après ce traitement, la teneur en glycolle est toujours plus faible (23 p. 100 résidus), comparée à celles des colonnes A à E (29 à 33 %). Il faut souligner que les pourcentages des autres acides aminés sont comparables à ceux des préparations des autres auteurs, en particulier pour la valine.

D'après l'analyse de la composition en acides aminés, les protéines représentent 60 % de la préparation.

I.2. Solubilisation de l'élastine d'adulte

I.2.1. Principales techniques de solubilisation déjà décrites dans la littérature

REILLY et TRAVIS (1980) ont étudié la dégradation de l'élastine pulmonaire humaine par l'élastase leucocytaire, la cathepsine G et l'élastase pancréatique porcine. L'élastine a été préparée par deux méthodes : l'une dénaturante (procédé de LANSING, 1952, légèrement modifié), l'autre non dénaturante qui consiste en un traitement par la collagénase bactérienne.

Tableau VI

Composition en acides aminés de l'élastine pulmonaire humaine
(nombre de résidus/100 résidus)

	A (72 h)	B (72 h)	C (72 h)	D (72 h)	E (24 h)	F (24 h)
HYP	1,20	1,22	1,10	1,00	ND	4,31
ASP	0,90	1,18	1,20	0,64	0,9	2,92
THR	1,30	1,81	1,60	0,94	1,1	2,28
SER	0,90	1,50	1,40	0,72	1,0	3,11
GLU	2,30	2,69	2,60	2,24	2,50	4,53
PRO	12,70	12,18	10,90	12,15	8,50	12,57
GLY	29,10	30,59	30,90	30,60	33,1	19,08
ALA	22,50	23,11	24,10	22,90	25,8	18,51
CYS/2	ND	0,0	ND	ND	0,1	1,08
VAL	13,60	10,90	11,80	13,50	12,80	12,06
MET	ND	0,0	0,40	ND	0,1	0
ILE	2,40	2,41	2,10	2,82	2,10	2,65
LEU	6,00	5,63	5,70	6,24	5,90	6,09
TYR	2,40	2,60	3,20	2,00	2,10	3,02
PHE	2,20	1,76	2,10	2,38	2,20	2,93
IDE	0,25	0,09	0,06	0,11	0,08	0,11
DES	0,27	0,13	0,11	0,16	0,12	0,16
LNL*	ND	ND	ND	0,17	ND	0,04
HIS	0,03	0,2	0,20	ND	ND	0,73
LYS	0,7	0,94	0,80	0,7	0,8	1,87
ARG	1,30	1,05	0,80	0,62	0,8	2,07



A : STARCHER et GALIONE (1976) : traitement par le bromure de cyanogène.

B : DARNULE et coll. (1977) : traitement par la collagénase.

C : REILLY et TRAVIS (1980) : traitement par la collagénase.

D : JOHN et THOMAS (1972) : extraction par NaOH 0,1 N.

E : BOUDIER et coll. (1981) : extraction par NaOH 0,1 N.

F : Résultats personnels : collagénase + NaOH 0,1 N, 5 mn.

Les temps portés entre parenthèses indiquent la durée d'hydrolyse par HCl 5,6 N.

*LNL : lysinonorleucine.

La suspension de fibres d'élastine (5 mg/ml) est incubée à 37°C dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 7,5 contenant NaCl 0,15 M. Le rapport E/S (enzyme/substrat) utilisé est de 2:1000 pour les élastases leucocytaires humaine et pancréatique porcine, et de 5:1000 pour la cathepsine G. La détermination de la quantité d'élastine solubilisée est effectuée par une méthode colorimétrique à l'aide de ninhydrine.

BOUDIER et coll. (1981) ont étudié l'action simultanée de l'élastase et de la cathepsine G sur l'élastine pulmonaire humaine. Ils ont utilisé un rapport élastase/cathepsine G égal à 1/2 (concentrations : 1 μ M en élastase et 2 μ M en cathepsine G), ainsi qu'un rapport équimoléculaire. La suspension de fibres d'élastine (3 mg/ml) est incubée dans un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 à 37°C. L'élastine solubilisée est déterminée par la mesure de l'absorption à 280 nm. Le facteur de stimulation dû à l'action de la cathepsine G est calculé par le rapport $(V_{ec}-V_c)/V_e$ dans lequel V_{ec} est la vitesse initiale d'élastolyse catalysée par les deux enzymes ; V_c et V_e sont les vitesses obtenues respectivement avec la cathepsine G et l'élastase.

Afin d'étudier l'action simultanée des deux enzymes leucocytaires, REILLY et coll. (1984) ont utilisé un rapport molaire élastase/cathepsine G égal à 1/2 (concentrations : 1 μ M en élastase et 2 μ M en cathepsine G). Le mélange enzyme-substrat (élastine préparée selon LANSING et coll., 1952) est incubé dans un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 à 37°C. Les auteurs ne précisent pas la concentration en fibres d'élastine du mélange. La détermination de la quantité d'élastine solubilisée est effectuée par les méthodes suivantes :

- mesure d'absorption à 280 nm,
- méthode colorimétrique à la ninhydrine,
- mesure de la radioactivité (élastine tritiée).

Le facteur de stimulation calculé par ces auteurs est le rapport de la vitesse initiale d'élastolyse catalysée par le mélange des 2 enzymes à la vitesse obtenue avec l'élastase seule : V_{ec}/V_c .

LUCEY et coll. (1985) ont étudié l'action des deux enzymes leucocytaires sur l'élastine humaine tritiée. Le tampon utilisé est le Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, contenant NaCl 0,14 M et azide de sodium 0,05 %. Ces auteurs ont déterminé la teneur en élastine solubilisée par la mesure de la radioactivité et ont décrit un facteur de synergie égal à $V_{ec}/(V_e + V_c)$.

Etant donné la diversité des conditions de solubilisation (tampon, concentrations en élastine et en enzyme) et de quantification de l'élastine solubilisée, il nous a été difficile de comparer les résultats obtenus par ces différents auteurs.

I.2.2. Cinétiques de solubilisation

Avant de pouvoir étudier les produits de dégradation de l'élastine "in vitro" nous avons effectué des cinétiques de solubilisation par les enzymes pour déterminer les conditions optimales.

L'activité des enzymes a été contrôlée sur des substrats synthétiques spécifiques décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes. Leur pourcentage d'activité a été estimé à environ 100 % pour l'élastase leucocytaire et 65 % pour la cathepsine G, après mesure des vitesses d'hydrolyse obtenues dans des conditions bien déterminées en utilisant les paramètres cinétiques décrits dans la littérature (NAKAJIMA et coll., 1979).

I.2.2.1. Effet de la concentration en élastase leucocytaire

Nous avons étudié l'effet de la concentration en élastase sur la vitesse de solubilisation de l'élastine. Deux rapports E/S ont été utilisés : E/S = 1:1000 (E = 0,17 μ M) et E/S = 1:100 (E = 1,7 μ M). Les conditions opératoires sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les quantités d'élastine solubilisée sont estimées par la mesure de la teneur en protéine des solutions filtrées, à l'aide de la méthode de LOWRY ; elles sont déterminées en mg/ml avec comme référence une gamme de sérumalbumine bovine puis exprimées en pourcentages, 3 mg/ml correspondent à 100 % de solubilisation, puisque notre préparation contient 60 % d'acides aminés.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 10. Avec un rapport E/S de 1:1000, 17 % de l'élastine contenue dans la suspension initiale sont solubilisés au bout de 24 h. Par contre, avec un rapport E/S égal à 1:100, la solubilisation de l'élastine est totale (avec un plateau au bout d'environ 16 h). Le choix d'un rapport E/S de 1:100 semble donc judicieux pour préparer des produits solubilisés en grande quantité.

1.2.2.2. Comparaison des actions de l'élastase et de la cathepsine G

Nous avons comparé tout d'abord l'activité élastolytique de l'élastase leucocytaire à celle de la cathepsine G dans le même rapport E/S égal à 1:100 (fig. 11). Après 24 h de digestion, 23 % de l'élastine sont solubilisés par la cathepsine G, comparés aux 100 % obtenus avec l'élastase leucocytaire. Bien que la cathepsine G ait une activité élastolytique mesurable, celle-ci est beaucoup plus faible que celle de l'élastase leucocytaire. Ceci est confirmé par les résultats exposés dans la figure 12 où la solubilisation complète de l'élastine n'est obtenue par la cathepsine G qu'avec un rapport E/S égal à 5:100.

Les vitesses initiales d'élastolyse ont été déterminées sur les parties linéaires des courbes de solubilisation obtenues avec les deux enzymes dans des rapports E/S égaux à 1:100 et 2:100. Le tableau VII présente les valeurs calculées sachant que 100 % d'élastine solubilisée correspondent à 3 mg/ml de protéines. Nous remarquons que les vitesses de solubilisation de l'élastine par la cathepsine G sont 8,6 et 4,2 fois plus faibles que celles obtenues par l'élastase pour des rapports égaux à 1:100 et 2:100. Ce tableau permet aussi de comparer la vitesse d'élastolyse pour un même enzyme et pour les deux rapports : cette vitesse est 1,7 fois plus élevée pour l'élastase et 3,4 fois pour la cathepsine G quand la quantité d'enzyme est multipliée par 2.

Elastine solubilisée (%)

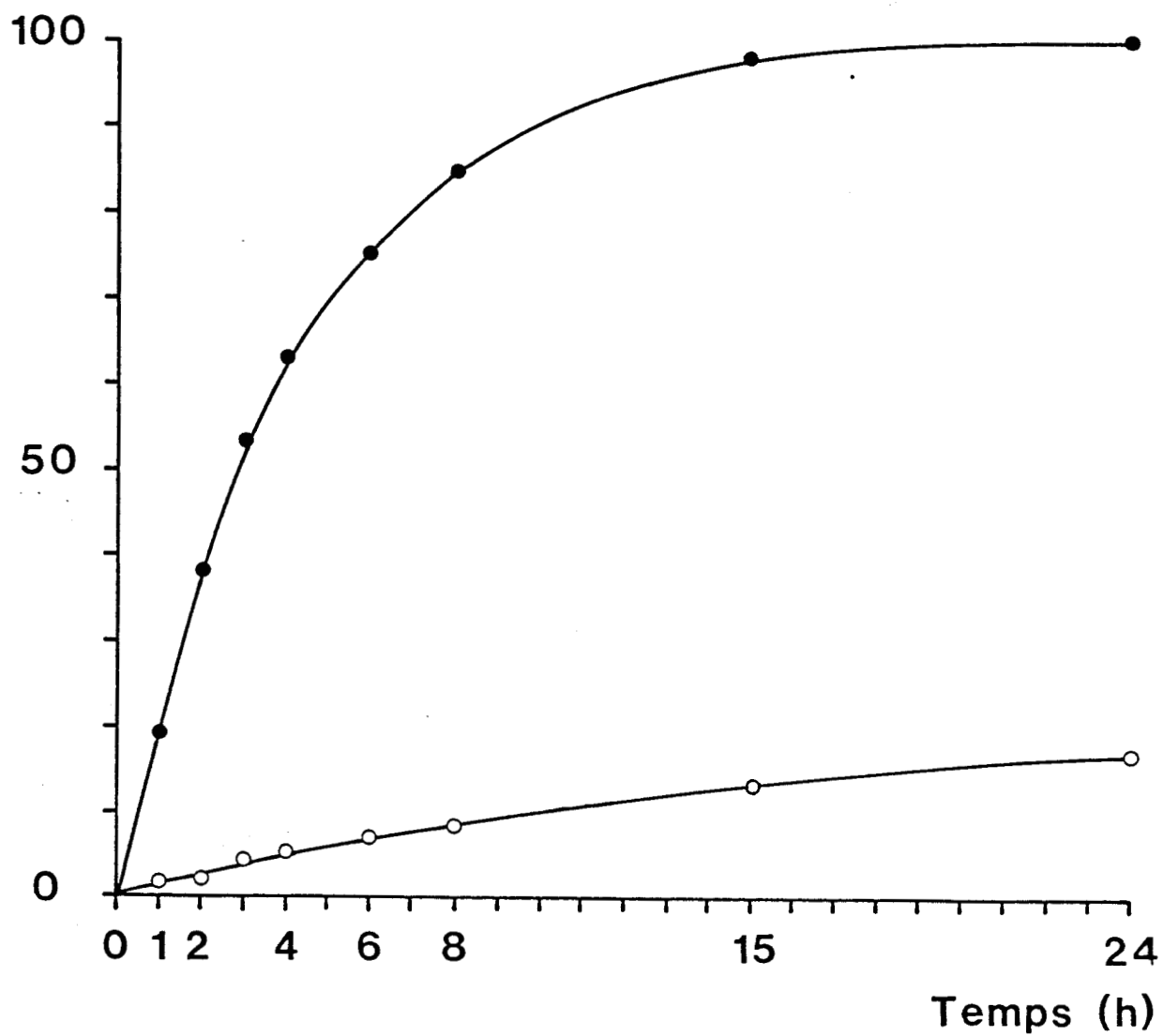


Figure 10 : Cinétiques de solubilisation de l'élastine d'adulte par l'élastase leucocytaire.

- rapport E/S = 1:1000 (E = 0,17 μ M)
- rapport E/S = 1:100 (E = 1,7 μ M)

Elastine solubilisée (%)

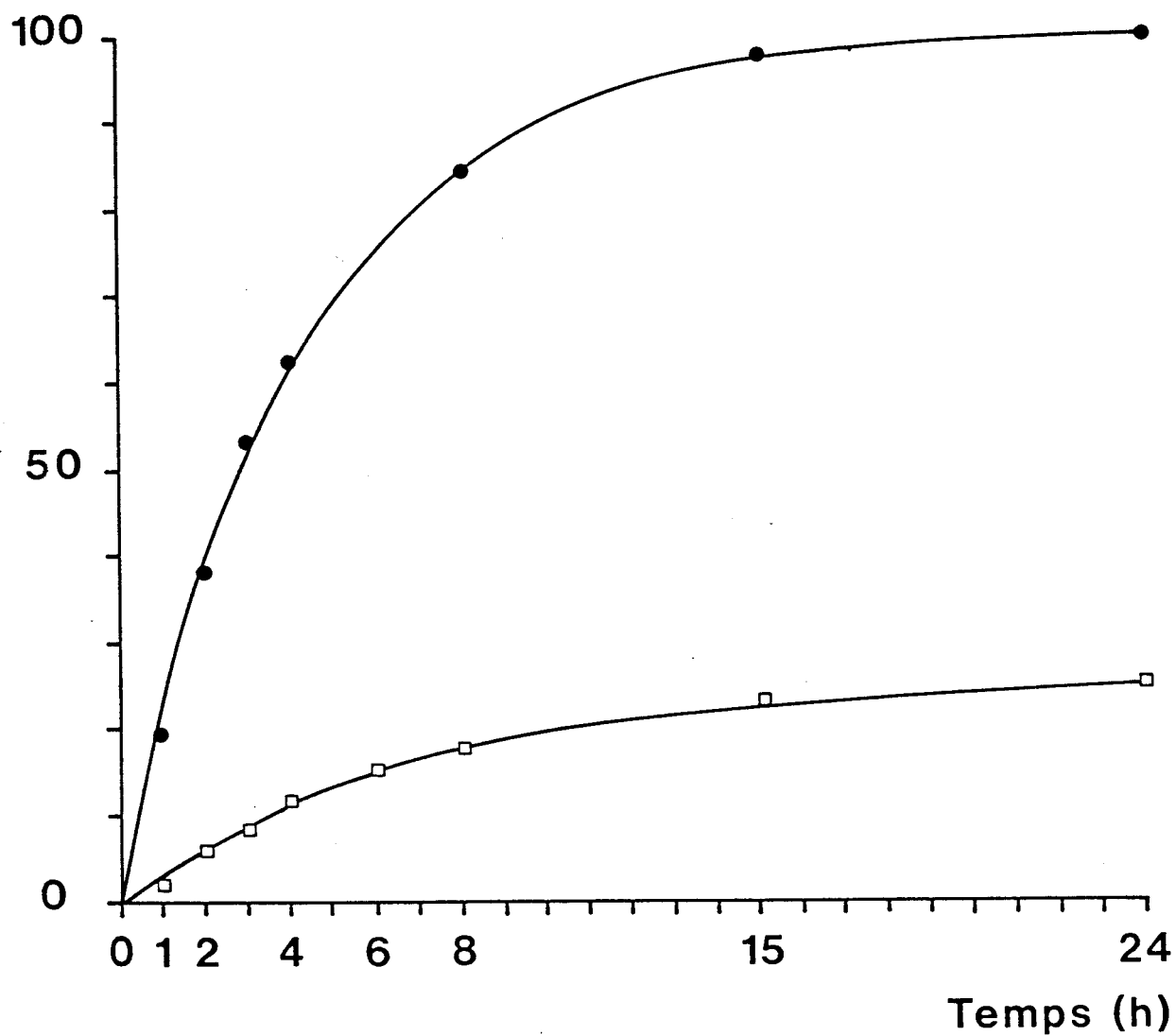


Figure 11 : Cinétiques de solubilisation de l'élastine d'adulte par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires (E/S égal à 1:100)

●—● solubilisation par l'élastase leucocytaire

□—□ solubilisation par la cathepsine G

Elastine solubilisée (%)

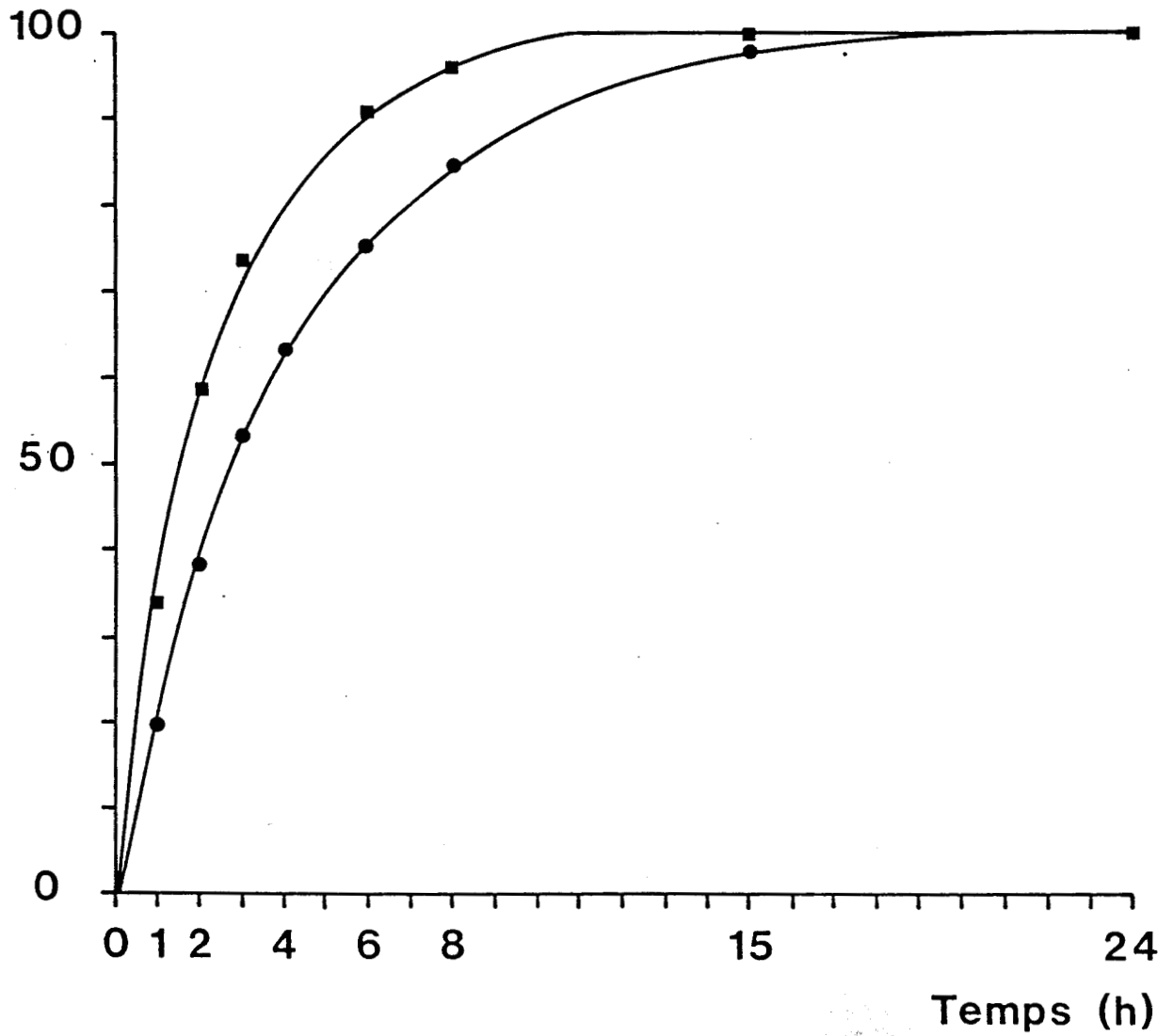


Figure 12 : Cinétiques de solubilisation de l'élastine d'adulte par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires.

- solubilisation par l'élastase (E/S égal à 1:100)
- solubilisation par la cathepsine G (E/S égal à 5:100)

Tableau VII

Vitesses initiales de solubilisation de l'élastine du poumon d'adulte
par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires

Rapport enzyme/substrat (poids)	Vitesses initiales d'élastolyse ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{mn}$)	
	Elastase	Cathepsine G
1:100	9,5	1,1
2:100	16,0	3,8

Les vitesses initiales sont déterminées sur la partie linéaire des courbes.



Des résultats similaires ont été décrits par REILLY et TRAVIS (1980). Ces auteurs ont solubilisé l'élastine pulmonaire dans des conditions différentes de force ionique et de pH. Ils ont montré que la cathepsine G solubilise l'élastine avec une vitesse plus faible : elle est de l'ordre de 12 % de celle de l'élastase leucocytaire. D'autres auteurs ont également signalé la faible activité élastolytique de la cathepsine G. Ainsi LUCEY et coll. (1985) ont montré que cet enzyme possède seulement 5,8 % de l'activité de l'élastase leucocytaire sur l'élastine de poumon humain.

I.2.2.3. Action simultanée de l'élastase et de la cathepsine G leucocytaires

Nous avons étudié la solubilisation de l'élastine par les deux enzymes agissant simultanément (fig. 13). Le rapport E/S a été choisi égal à 1:1000 pour l'élastase (concentration : 0,17 μ M) et à 2:1000 pour la cathepsine G (concentration : 0,34 μ M) de manière à ralentir le processus de solubilisation et à pouvoir en examiner les premiers temps. En effet, le phénomène est trop rapide avec l'élastase leucocytaire utilisée dans un rapport E/S égal à 1:100. D'autre part, nous avons utilisé un rapport molaire entre les enzymes de 1/2 (élastase/cathepsine G) pour pouvoir comparer nos résultats à ceux des autres auteurs (tableau VIII).

Dans la figure 13, nous constatons qu'au bout de 6 h d'incubation 0,7 % seulement de l'élastine est solubilisé par la cathepsine G utilisée dans un rapport E/S égal à 2:1000, contre 7,2 % solubilisés par l'élastase leucocytaire dans un rapport de 1:1000. Quand les deux enzymes agissent simultanément, 12,7 % de l'élastine sont solubilisés au bout du même temps de digestion. Une légère stimulation de la digestion de l'élastine catalysée par l'élastase est donc observée (tableau VIII) en présence de cathepsine G.

Nos résultats sont proches de ceux de REILLY et coll. (1984) qui ont montré une faible stimulation de l'élastolyse quand celle-ci est réalisée avec le mélange élastase-cathepsine G, comparativement à l'élastase seule (tableau VIII).

Elastine solubilisée (%)

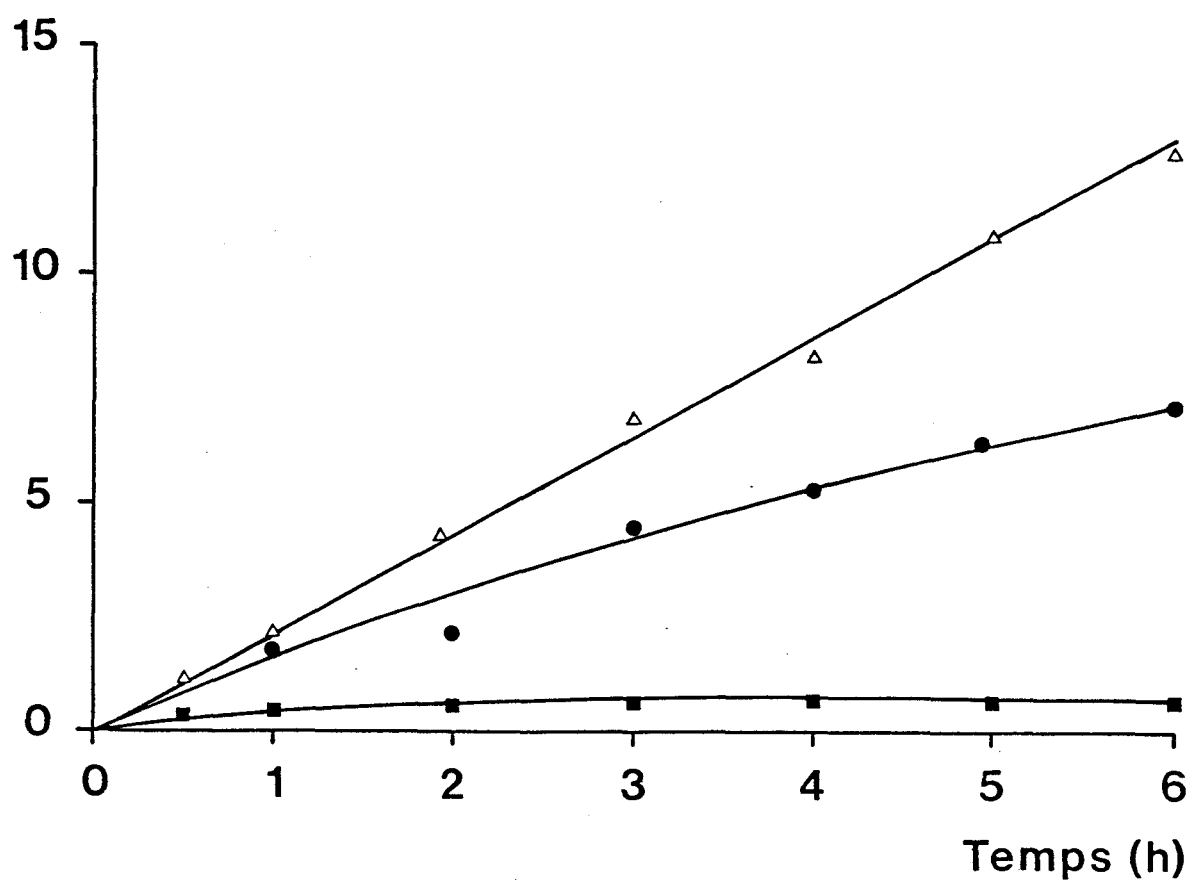


Figure 13 : Cinétiques de solubilisation de l'élastine d'adulte par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires.

- solubilisation par l'élastase (E/S égal à 1:1000)
- solubilisation par la cathepsine G (E/S égal à 2:1000)
- ▽—▽ solubilisation simultanée par l'élastase (E/S égal à 1:1000) et la cathepsine G (E/S égal à 2:1000)

Tableau VIII

Etude du facteur de stimulation de l'élastase par la cathepsine G

Auteurs	Elastase/ cathepsine G (rapport molaire)	Tampon utilisé	Méthode de détermination de l'élastolyse	Facteur de stimulation*
BOUDIER et coll. (1981)	1/2	Tris-HCl 0,05 M pH 8,0	absorption à 280 nm	7,2
REILLY et coll. (1984)	1/2	Tris-HCl 0,05 M pH 8,0	absorption à 280 nm	2,9
Résultats personnels	1/2	bicarbonate d'ammonium 0,2 M pH 8,0	dosage par la ninhydrine	2
			dosage de protéines (LOWRY)	1,3

*Le facteur de stimulation donné par la formule $(V_{ec}-V_c)/V_e$ (BOUDIER et coll., 1981) a été utilisé pour nos calculs. Le facteur donné par REILLY et coll. (1984) est V_{ec}/V_e .

V_e, V_c = vitesses initiales d'élastolyse par l'élastase et par la cathepsine G respectivement

V_{ec} = vitesse initiale d'élastolyse par le mélange des deux enzymes.



L'une ou l'autre de ces formules conduit à des résultats très voisins, V_c étant toujours beaucoup plus faible que V_{ec} et V_e .

Par contre, les résultats de BOUDIER et coll. (1981) ont montré que, dans un rapport élastase/cathepsine G égal à 1/2, le facteur de stimulation de l'élastolyse est égal à 7,2 (tableau VIII) ; avec un mélange équimoléculaire d'élastase et de cathepsine G, l'activité élastolytique est encore 5 fois supérieure à celle de l'élastase seule.

Comme REILLY et coll. (1984) ont repris les conditions expérimentales décrites par BOUDIER et coll. (1981), la divergence de leurs résultats ne peut être expliquée que par une différence dans la qualité de leurs préparations d'élastines. Nos conditions expérimentales (nature et force ionique du tampon de solubilisation, concentrations respectives en élastase et en cathepsine G, méthode de quantification des fragments solubilisés) sont différentes de celles des auteurs cités ci-dessus : cependant, la valeur du facteur de stimulation que nous avons calculée est proche de celle donnée par REILLY et coll. (1984).

I.2.2.4. Solubilisation de l'élastine par d'autres élastases

Nous avons étudié l'action de l'élastase pancréatique porcine* (CHOAY) et celle de l'élastase pancréatique humaine** (don de Mr RABAUD, Unité INSERM N°8, Pessac) : les résultats sont comparés à ceux obtenus avec l'élastase leucocytaire (fig. 14). Dans les trois cas, le rapport E/S est égal à 1:100 ; les mêmes conditions que celles décrites précédemment ont été utilisées.

Nous constatons que l'élastase porcine est la plus efficace pour solubiliser l'élastine. La solubilisation complète est obtenue au bout de 4 h d'incubation, alors que pour les deux autres enzymes (élastases pancréatique et leucocytaire humaines), elle n'est obtenue qu'après plus de 14 h. La vitesse initiale d'élastolyse est de 120 µg/ml/mn

* élastase pancréatique porcine : activité spécifique 17,4 U/mg mesurée sur Suc-Ala₃-pNA selon BIETH et coll. (1974), ce qui correspond à 98 % d'enzyme actif (BIETH, 1978).

** élastase pancréatique humaine : élastase 2 décrite par LARGMAN et coll. (1976), estimée 70 % active après mesure d'activité sur Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNA dans les conditions décrites par DEL MAR et coll. (1980).

Elastine solubilisee (%)

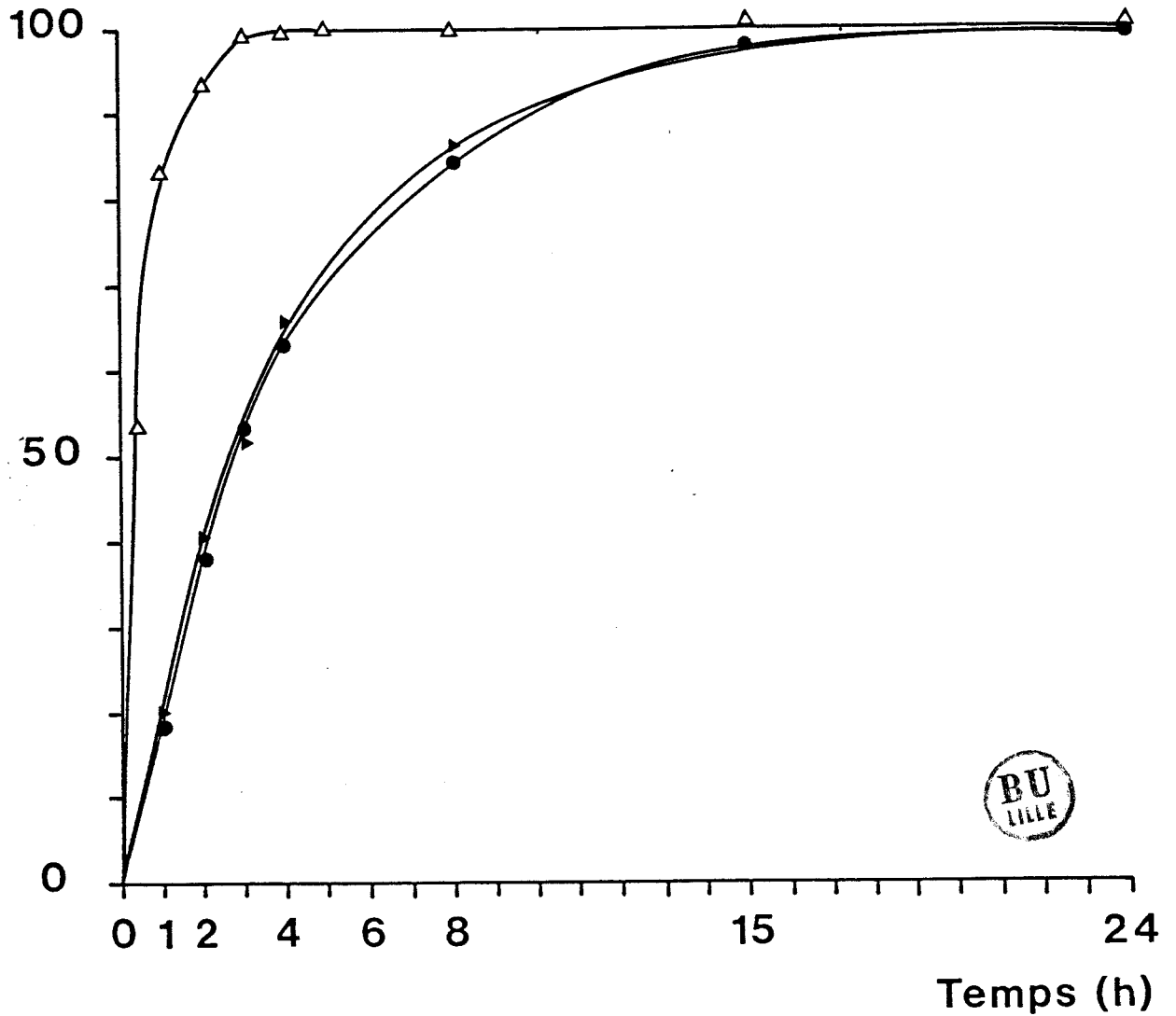


Figure 14 : Cinétiques de solubilisation de l'élastine d'adulte par les élastases pancréatiques humaine et porcine et par l'élastase leucocytaire (E/S = 1:100)

- ▽-▽ solubilisation par l'élastase pancréatique porcine,
- ▼-▼ solubilisation par l'élastase pancréatique humaine,
- solubilisation par l'élastase leucocytaire humaine.

pour l'élastase porcine et de 9,5 µg/ml/mn pour les deux autres, soit 12 fois supérieure pour l'élastase porcine. Il existe donc une grande différence dans les vitesses d'élastolyse par les deux enzymes d'origine pancréatique, alors que pour les deux enzymes humains les vitesses observées sont identiques.

Dans leurs conditions de solubilisation, REILLY et TRAVIS (1980) et BOUDIER et coll. (1980) ont également observé que l'élastase pancréatique porcine solubilise l'élastine pulmonaire humaine avec une vitesse initiale nettement supérieure à celle obtenue avec l'élastase leucocytaire. Selon REILLY et TRAVIS (1980), cette vitesse est 6 fois supérieure à celle obtenue avec l'élastase leucocytaire humaine et, selon BOUDIER et coll. (1980), elle est 21 fois supérieure. Les différences dans les rapports de vitesses d'élastolyse par ces deux enzymes peuvent être expliquées par le fait suivant : dans des tampons de force ionique plus élevée (phosphate de sodium 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5 employé par REILLY et TRAVIS (1980) ou bicarbonate d'ammonium 0,2 M pH 8,0 utilisé dans ce travail), comparés au tampon Tris 0,05 M pH 8,0 (BOUDIER et coll., 1980), il peut y avoir une inhibition de l'élastase pancréatique porcine et une activation de l'élastase leucocytaire humaine (BOUDIER et coll., 1980).

I.2.2.5. Conclusion des études de solubilisation

Nos résultats concernant les vitesses d'élastolyse déterminées sur l'élastine pulmonaire, dans les conditions utilisées, permettent de classer les enzymes suivants par l'ordre décroissant de leur activité : élastase pancréatique porcine, élastases leucocytaire et pancréatique humaine, cathepsine G.

Cette différence de vitesses d'élastolyse par les protéases peut être due à la différence de spécificité de chaque enzyme. L'élastase pancréatique porcine hydrolyse les liaisons Gly-X, Ala-X et Val-X qui représentent respectivement 19 %, 18 % et 12 % des liaisons peptidiques de notre préparation d'élastine. Ceci peut expliquer le fait que cet enzyme ait une activité élastolytique supérieure à celle de l'élastase leucocytaire. Cette dernière n'hydrolyse que les liaisons Val-X et Ala-X (BLOW, 1977).

L'élastase pancréatique humaine et la cathepsine G sont des enzymes de type chymotrypsique. Ces protéases sont capables d'hydrolyser les liaisons peptidiques adjacentes aux fonctions carboxyliques des résidus de Tyr, Phe, Leu, Ile et Met (DEL MAR et coll., 1979), (NAKAJIMA et coll., 1979). Ces acides aminés ne sont présents qu'en faible proportion dans l'élastine ; ceci peut expliquer la faible activité élastolytique de la cathepsine G. L'activité supérieure de l'élastase pancréatique humaine peut être due à une spécificité préférentielle pour certains de ces résidus.

I.3. Etude des produits de digestion de l'élastine pulmonaire

I.3.1. Digestion par un seul enzyme

Les produits obtenus après 24 h de solubilisation par l'élastase leucocytaire ou la cathepsine G sont étudiés par des méthodes électrophorétiques et chromatographiques. La plupart des expériences ont été faites en utilisant un rapport E/S 1:100.

I.3.1.1. Détermination du point isoélectrique (pI)

Peu d'études ont été publiées concernant la caractérisation des fragments solubles d'élastine et en particulier la détermination de leur pI. Nous avons donc déterminé ce paramètre par isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide.

La figure 15 nous montre le profil électrophorétique obtenu selon les conditions décrites précédemment (Matériel et Méthodes).

Dans ces conditions, nous pouvons observer la résolution en 6 bandes majeures dont les pI sont très proches. Les valeurs déterminées à l'aide de témoins de pI connus sont les suivantes : 4,2 ; 4,35 ; 4,4 ; 4,5 ; 4,6 et 4,7. Les fragments solubilisés par l'élastase leucocytaire présentent donc un caractère acide. Il faut signaler que, dans un gradient de pH plus restreint, la séparation n'a pas été meilleure car les bandes sont plus larges et donc moins nettes.

Des valeurs identiques pour les pI sont obtenues en effectuant l'isoélectrofocalisation en Isogel, agarose dépourvu d'électroendosse (INDUSTRIE BIOLOGIQUE FRANCAISE).

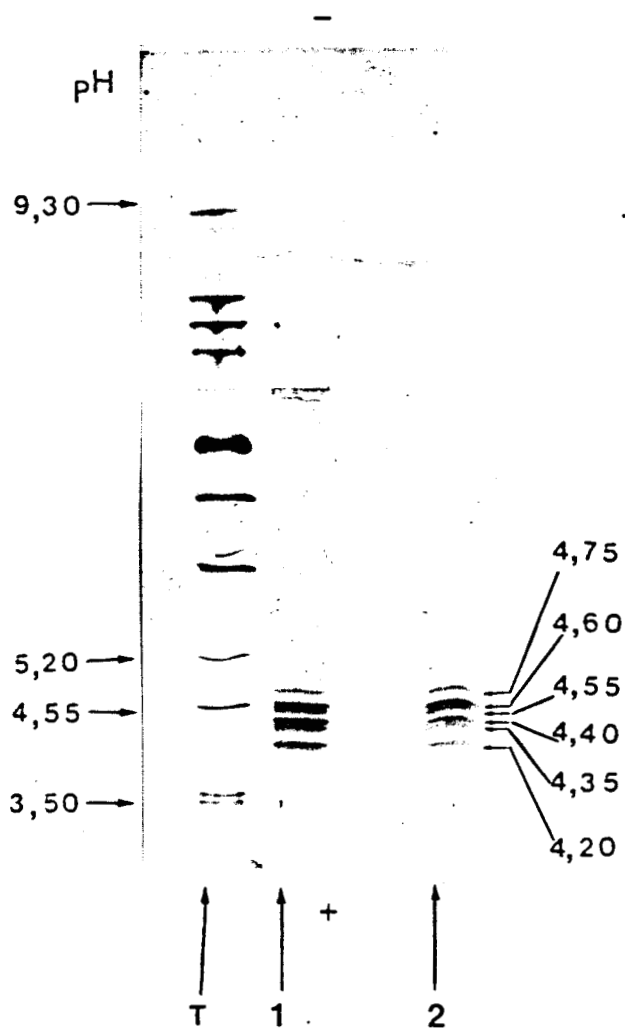


Figure 15 : Etude en isoélectrofocalisation en plaque de gel de polyacrylamide des produits de digestion de l'élastine d'adulte. Gradient de pH de 3 à 10.

T : témoins de pI (PHARMACIA),

1 : élastine solubilisée par l'élastase leucocytaire,

2 : élastine solubilisée par la cathepsine G,

Rapport E/S égal à 1:100, 24 h de solubilisation.

Quantité déposée de l'ordre de 100 µg pour les fragments d'élastine.

Coloration au bleu de Coomassie R-250.

Lorsque l'élastine est solubilisée par l'élastase leucocytaire dans des rapports E/S différents (1:1000 et 2:100) pendant des temps de solubilisation variables, la même répartition en ces 6 bandes majeures est obtenue (résultats non montrés).

En ce qui concerne les produits de digestion de l'élastine après action de la cathepsine G, nous avons pu observer (fig. 15) la même répartition des bandes. Nous pouvons donc conclure que les fragments solubilisés par l'élastase leucocytaire ou la cathepsine G présentent le même caractère acide.

L'isoélectrofocalisation préparative en milieu liquide a été utilisée par MOCZAR et coll. (1979) pour séparer des peptides obtenus après hydrolyse organoalcaline d'élastine de ligament de Boeuf. Bien que ni l'origine de l'élastine ni le mode de solubilisation, ni les conditions d'isoélectrofocalisation ne soient identiques à ceux de notre étude, les pI des peptides majeurs obtenus par ces auteurs sont compris entre 2,5 et 6. Aucun fragment de pI plus élevé (6-10) n'a pu être mis en évidence, ce qui peut être expliqué par la faible teneur de l'élastine en acides aminés basiques.

I.3.1.2. Estimation de la masse moléculaire relative

La caractérisation des produits de digestion a été poursuivie par la détermination de leur masse moléculaire relative. Deux techniques ont été utilisées : l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et la chromatographie de gel filtration.

I.3.1.2.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Plusieurs systèmes électrophorétiques ont été utilisés afin de déterminer la masse moléculaire relative des peptides provenant de la digestion de l'élastine. Le diagramme électrophorétique en gel de polyacrylamide, en gradient de 5 % à 30 % (LAEMMLI, système modifié) montre (fig. 16) :

- une grande polydispersité (M_r : 150 000 - 10 000), des fragments solubilisés par la cathepsine G dans un rapport E/S égal à 5:100 (dépôt n°1),

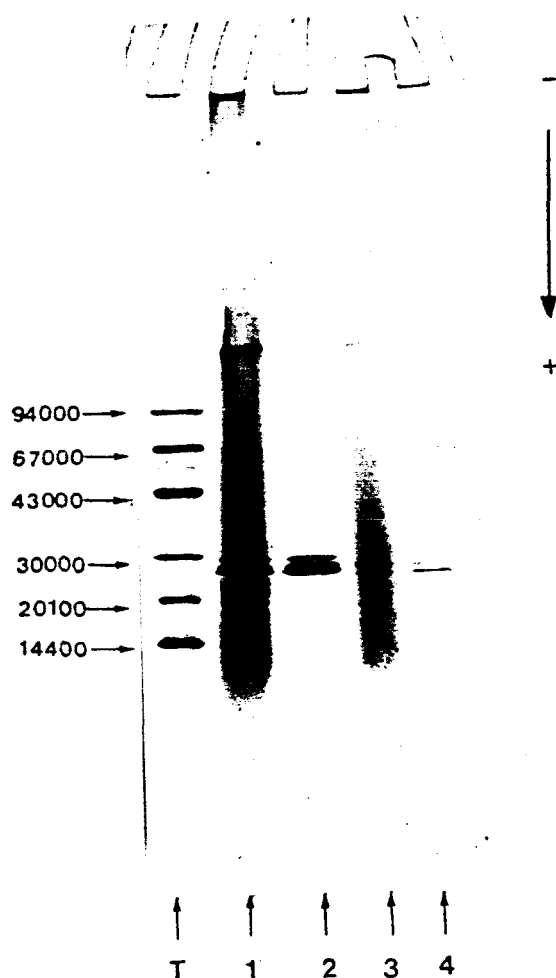


Figure 16 : Etude électrophorétique en gel de polyacrylamide, en gradient de 5 % à 30 % en présence de SDS, de l'élastine solubilisée par l'élastase leucocytaire et la cathepsine G (système LAEMMLI modifié).

Temps de solubilisation 24 h.

T : témoins de M_r (PHARMACIA).

1 : élastine solubilisée par la cathepsine G (E/S 5:100) (30 μ g).

2 : cathepsine G (1,5 μ g).

3 : élastine solubilisée par l'élastase (E/S 1:100) (30 μ g).

4 : élastase leucocytaire (0,3 μ g).

Les enzymes sont déposés, à titre de témoins, en quantités équivalentes à celles contenues dans les fractions solubilisées.

Coloration au bleu de Coomassie G-250

- une aussi grande hétérogénéité de répartition des M_r des fragments solubilisés par l'élastase (E/S égal à 1:100) (dépôt n°3).

Les seules bandes nettes observées sont d'une part une bande de M_r proche de 150 000 et un ensemble de bandes très voisines (M_r : 29 000 - 27 000) représentant les différents isoenzymes des protéases.

La faible quantité de fragments solubles obtenus avec la cathepsine G utilisée dans un rapport E/S égal à 1:100 n'a pas permis leur visualisation.

En SDS-PAGE selon la technique de LAEMMLI, l'élastine solubilisée présente le même comportement électrophorétique, excepté la bande de M_r égale à 150 000 qui apparaît moins nette. Ceci est probablement dû à la différence de composition des tampons des deux systèmes électrophorétiques, différence qui porte essentiellement sur la force ionique des tampons du gel et d'électrophorèse.

Une grande hétérogénéité dans la taille des produits de digestion de l'élastine pulmonaire par l'élastase leucocytaire a été également signalée par KUCICH et coll. (1985b). Ces auteurs ont décrit que, dans un rapport E/S égal à 1:40, les fragments obtenus migrent en grande partie dans une zone diffuse correspondant à une M_r comprise entre 30 000 et 10 000 tandis que moins de 5 % des fragments migrent sous la forme d'une bande de M_r égale à 70 000. Par contre, dans un rapport E/S égal à 1:1000, les fragments obtenus migrent en une bande plus homogène correspondant à une M_r de 70 000.

Dans le but d'obtenir une séparation analogue à celle signalée par ces auteurs, nous avons essayé d'une part la solubilisation de l'élastine par l'élastase dans un rapport E/S égal à 1:1000, d'autre part des conditions électrophorétiques différentes : présence d'urée (PERRIE et PERRY, 1970), urée et SDS (HAYASHI et NAGAI, 1979). Des colorations ne faisant pas appel à la précipitation en milieu acide et plus sensibles que la coloration au bleu de Coomassie, comme la coloration par le nitrate d'argent (MORRISSEY, 1981) ont été expérimentées. En aucun cas, nous n'avons obtenu la bande correspondant à une M_r de 70 000 décrite par KUCICH et coll. (1985b).

I.3.1.2.2. Chromatographie de gel-filtration

L'équivalent de 5 mg (estimés par la méthode de LOWRY) de fragments solubles d'élastine après action de l'élastase leucocytaire ou de la cathepsine G (rapport E/S égal à 1:100) ont été déposés sur une colonne de Bio-Gel P-100 équilibrée en HCOOH 0,02 M, molarité qui permet d'éviter les problèmes de coacervation rencontrés à concentration plus élevée (supérieure à 0,04 M). Il faut rappeler que dans les conditions de solubilisation utilisées (E/S égal à 1:100), l'élastase solubilise entièrement l'élastine alors que la cathepsine G n'en solubilise que 23 % ; ce rapport a été néanmoins utilisé dans le cas de la cathepsine G pour mieux suivre les premiers stades de la solubilisation, puisque la vitesse initiale d'élastolyse par la cathepsine G est faible par rapport à celle de l'élastase.

La figure 17 présente les diagrammes obtenus. Nous observons pour l'élastine solubilisée par l'élastase leucocytaire (fig. 17a) :

- une fraction (F_1A -élastase) exclue (M_r : 100 000-20 000) qui est une fraction majeure,
- une fraction (F_2A -élastase) retenue (M_r : 6 000-3 000).

En ce qui concerne l'élastine solubilisée par la cathepsine G, (Fig. 17b) nous obtenons :

- une fraction (F_1A -cathepsine G) exclue, moins importante que dans le cas précédent d'après son absorption à 226 nm.
- une fraction (F_2A -cathepsine G) retenue, qui contient des fragments de faible taille moléculaire (M_r : 6 000-3 000) et qui présente une absorption à 226 nm beaucoup plus élevée que celle de la fraction F_2A -élastase (fig. 17a).

L'importance relative des fractions F_1A et F_2A dans les deux diagrammes de la figure 17 pourrait indiquer que l'élastase leucocytaire conduit principalement à l'obtention de fragments de taille moléculaire élevée alors que la cathepsine G permet l'isolement d'une majorité de fragments de faible taille moléculaire. En réalité, après la lyophilisation des fragments digérés par chacun des deux enzymes, on observe la présence de sels résiduels non volatils. Pour une même quantité de tampon utilisé pour la solubilisation, le rendement en fragments solubles est 4 fois plus faible pour la

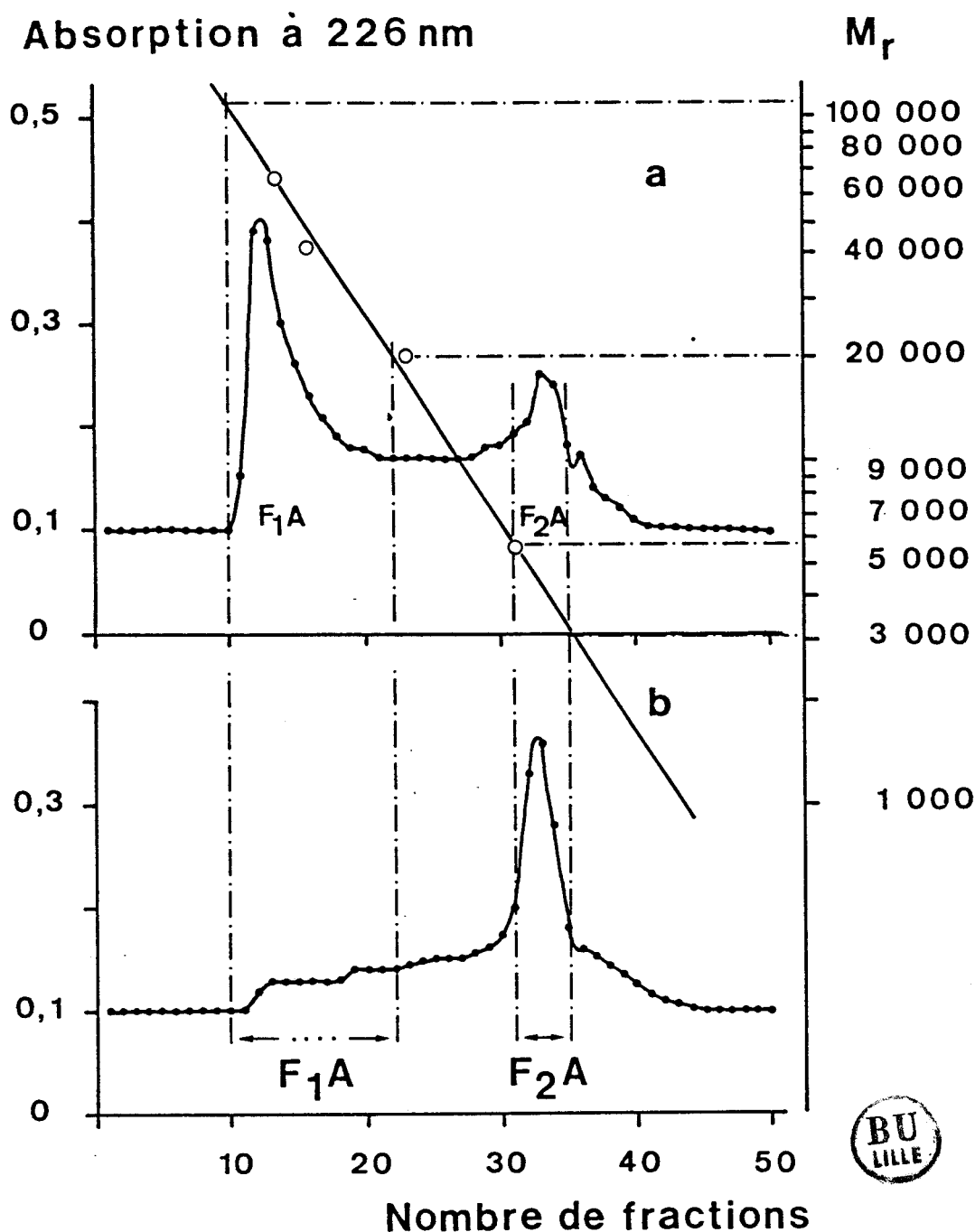


Figure 17 : Profils d'élution obtenus après gel-filtration sur une colonne de Bio-Gel P-100 (12 x 750 mm) de l'élastine solubilisée par
 (a) l'élastase leucocytaire,
 (b) la cathepsine G.

(E/S, 1:100, pour les deux enzymes, temps 24 h),

Dépôt 5 mg de fragments solubles dans 1 ml de solvant d'élution (HCOOH 0,02 M), débit 5 ml/h.

M_r estimées à l'aide de la droite d'étalonnage réalisée avec les protéines suivantes : sérumalbumine bovine (M_r : 67 000), ovalbumine (M_r : 43 000), inhibiteur trypsique du soja (M_r : 21 000) et insuline bovine (M_r 5 700).

cathepsine G : le rapport pondéral sels/élastine soluble est par conséquent plus élevé avec cet enzyme. Ceci pourrait expliquer l'absorption importante de la fraction F_2A -cathepsine G. Nous avons vérifié cette hypothèse en effectuant au préalable un dessalage sur une colonne de Bio-Gel P-2 des fragments solubles après action de la cathepsine G. Dans ce cas, la séparation sur Bio-Gel P-100 permet l'obtention d'une fraction F_2A -cathepsine G moins importante.

Le tableau IX présente les différentes tailles des fragments d'élastine humaine obtenus après digestion par l'élastase leucocytaire décrites par d'autres auteurs. Nous pouvons constater que l'élastine d'aorte humaine est digérée en fragments de taille moléculaire plus faible que l'élastine de poumon.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de travaux concernant l'isolement et la caractérisation par chromatographie de gel-filtration de fragments d'élastine pulmonaire humaine obtenus après digestion par l'élastase et la cathepsine G leucocytaire.

VERED et coll. (1985) ont étudié la solubilisation de l'élastine de ligament de Boeuf par les élastases I et II de pancréas de Porc. Après chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sephadex G-50 équilibrée en $HCOOH$ à 10 %, les fragments solubilisés sont séparés en deux fractions : une première fraction est de M_r comprise entre 68 000 et 45 000, et une deuxième entre 45 000 et 9 000. Ces auteurs ont montré que les produits de digestion par l'élastase pancréatique II contiennent plus de fragments de faible taille moléculaire que les produits de digestion par l'élastase I. Il faut noter que l'élastase II est un enzyme de type chymotrypsique comme la cathepsine G.

MOCZAR et coll. (1979) ont montré que, après hydrolyse organo-alcaline de l'élastine de ligament de Boeuf, les fragments solubles sont séparés, par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sephadex G-100 équilibrée en acide acétique 0,1 M, en deux fractions : une fraction exclue coacervable de M_r de 120 000 à 60 000 et une fraction retenue non coacervable de 60 000 à 10 000.

Tableau IX

Taille des différents fragments obtenus après chromatographie de gel-filtration de l'élastine humaine digérée par l'élastase leucocytaire

Auteurs	Origine de l'élastine	Support et éluant	M_r des fragments
KUNITOMO et JAY (1985)	aorte	Sephadex G-75 NH_4HCO_3 1 M pH 8,3	14 000
SENIOR et coll. (1982)	aorte	Bio-Gel P-10 NH_4HCO_3 1 M pH 8,3	< 25 000
Résultats personnels	poumon	Bio-Gel P-100 HCOOH 0,02 M	1ère fraction 100 000 - 20 000 2ème fraction 6 000 - 3 000



I.3.1.3. Analyse des fragments séparés sur colonne de Bio-Gel P-100

I.3.1.3.1. Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés des fractions F_1A et F_2A de l'élastine solubilisée par l'élastase leucocytaire ou par la cathepsine G ainsi que celles des échantillons de départ sont indiquées dans le tableau X. Nous remarquons que, quel que soit l'enzyme utilisé, les compositions en acides aminés des produits solubilisés sont relativement proches les unes des autres (tableau X, colonnes B et E). Comparativement à la composition en acides aminés de l'élastine native nous pouvons constater une teneur nettement plus élevée en glycocolle des fractions F_1A et F_2A -élastase (colonnes C et D) alors que la teneur en valine est abaissée. Les fractions F_2A sont en outre caractérisées par un pourcentage très faible en hydroxyproline (colonnes D et G).

En ce qui concerne les liaisons croisées (desmosine et isodesmosine), elles ne sont mises en évidence que dans les fractions F_1A qui ont une M_r élevée. Les fractions F_2A -élastase et F_2A -cathepsine G (colonnes D et G) en sont dépourvues. Ce fait est en faveur de l'hypothèse du rôle joué par les liaisons croisées dans la résistance de l'élastine aux enzymes protéolytiques. D'ailleurs, la teneur en liaisons croisées des fractions F_1A dépasse nettement celle de l'élastine native.

I.3.1.3.2. SDS-PAGE

En SDS-PAGE en gradient de 5 % à 30 % (fig. 18, méthode de LAEMMLI modifiée), nous constatons que les fractions F_1A -cathepsine G (dépôt n°1) et F_1A -élastase (dépôt n°3) ont sensiblement le même profil électrophorétique et présentent une grande hétérogénéité de masse moléculaire relative (M_r : 150 000 à 30 000). Une bande nette de M_r voisine de 150 000 est observée comme dans la figure 16. La fraction F_2A -cathepsine G (dépôt n°2) migre en une zone diffuse correspondant à une M_r de l'ordre de 10 000 et la fraction F_2A -élastase (dépôt n°4) n'est pas visualisée. Aucune bande n'est visible aux environs de 29 000, ce qui exclut la présence dans ces fractions des enzymes ayant servi à la solubilisation.

Tableau X

Compositions en acides aminés de l'élastine native
et des produits de digestion séparés sur colonne de Bio-Gel P-100
(nombre de résidus/100 résidus)

	A	B	C	D	E	F	G
HYP	4,31	4,04	3,50	0,48	3,78	3,20	0,25
ASP	2,92	2,72	2,11	3,09	3,08	4,66	6,16
THR	2,28	2,07	1,99	3,09	1,94	3,08	4,13
SER	3,11	3,28	2,62	3,27	3,16	6,15	3,75
GLU	4,53	4,41	3,35	6,00	4,21	8,41	8,13
PRO	12,57	13,06	12,09	9,21	14,10	8,77	9,56
GLY	19,08	20,84	25,74	26,59	17,68	21,45	21,90
ALA	18,51	19,49	23,29	17,99	20,01	16,84	12,68
CYS/2	1,08	0,89	0,00	0,31	1,24	tr	tr
VAL	12,06	11,78	9,13	8,44	13,09	7,52	7,59
ILE	2,65	2,26	2,48	4,27	2,65	3,21	3,00
LEU	6,09	4,96	5,88	8,24	5,10	5,64	9,71
TYR	3,02	2,89	2,46	1,99	2,32	2,10	0,95
PHE	2,93	2,19	1,81	3,37	2,47	2,50	3,41
IDE	0,11	0,09	0,19	0	0,05	0,37	0
DES	0,16	0,12	0,20	0	0,08	0,22	0
LNL	0,04	0,08	0,08	tr	tr	tr	tr
HIS	0,73	0,75	0,38	0,64	0,60	1,19	1,15
LYS	1,87	1,75	1,39	1,59	1,70	2,40	3,31
ARG	2,07	2,33	1,31	1,74	1,67	2,35	4,32

A : élastine native

B : élastine solubilisée par l'élastase leucocytaire (E/S 1:100, 24 h), fraction globale

C : F₁A-élastase (fraction obtenue en Bio-Gel P-100)

D : F₂A-élastase (fraction obtenue en Bio-Gel P-100)

E : élastine solubilisée par la cathepsine G (E/S 1:100, 24 h), fraction globale

F : F₁A-cathepsine G (fraction obtenue en Bio-Gel P-100)

G : F₂A-cathepsine G (fraction obtenue en Bio-Gel P-100)

tr : traces



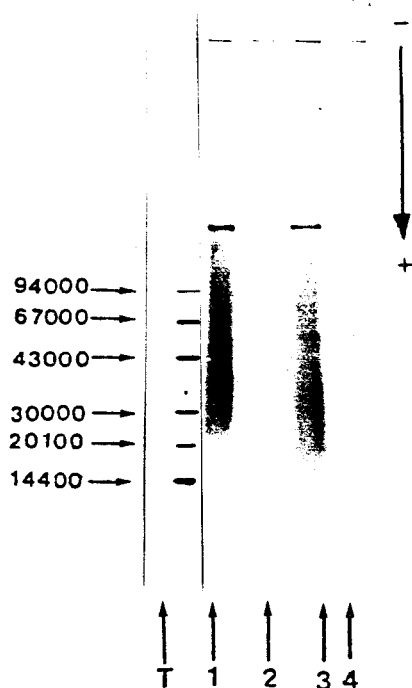


Figure 18 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient de 5 à 30 % d'acrylamide et en présence de SDS, des fractions F_1A et F_2A -élastase et des fractions F_1A et F_2A -cathepsine G (E/S 1:100, 24 h).

T : témoins de M_r (PHARMACIA)

1 : F_1A -cathepsine G (30 μ g)

2 : F_2A -cathepsine G (30 μ g)

3 : F_1A -élastase (30 μ g)

4 : F_2A -élastase (30 μ g)

Coloration au bleu de Coomassie G-250



I.3.1.3.3. Isoélectrofocalisation

En isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide selon les conditions décrites précédemment, seule la fraction F_1A -élastase est visualisée, donnant les mêmes bandes que l'élastolysat total. Malgré les différents essais de coloration (bleu de Coomassie R-250 et G-250, nitrate d'argent (MORRISSEY, 1981), stain ail (GREEN et coll., 1973), les fractions F_2A n'ont pas pu être visualisées. Il est possible que ces fractions de faible masse moléculaire relative soient solubles dans le mélange de fixation (ATCA 12,5 % et acide sulfosalicylique 3,5 %).

I.3.1.3.4. Chromatographie liquide de haute performance en phase inverse

La chromatographie liquide de haute performance en phase inverse a été utilisée par PHAN DINH TUY et MOCZAR (1984) pour séparer les peptides résultant de l'hydrolyse organoalcaline de l'élastine de ligament de Boeuf. Ces auteurs concluaient à l'intérêt de cette méthode pour réaliser des études comparatives des peptides d'élastine au cours de processus pathologiques pouvant engendrer des altérations de l'élastine native.

Nous avons donc repris cette technique en utilisant tout d'abord les conditions expérimentales de ces auteurs, puis en développant nos propres conditions.

- Description de la technique de PHAN DINH TUY et MOCZAR

Ces auteurs utilisent une colonne C18 μ -Bondapack (WATERS) et un gradient d'élution formé d'acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,8 (solvant A) et de 1-propanol à 80 % (solvant B). La figure 19a montre le profil d'élution des fractions non coacervables retenues sur une colonne de Sephadex G-100, préparées à partir d'un hydrolysate organoalcalin de l'élastine de ligament de Boeuf ; 5 pics sont obtenus : les pics 3, 4, 5 sont riches en acides aminés non polaires. Les rapports Gly/Ala dans ces derniers sont respectivement de 1:1, 2,5:1 et 0,5:1.

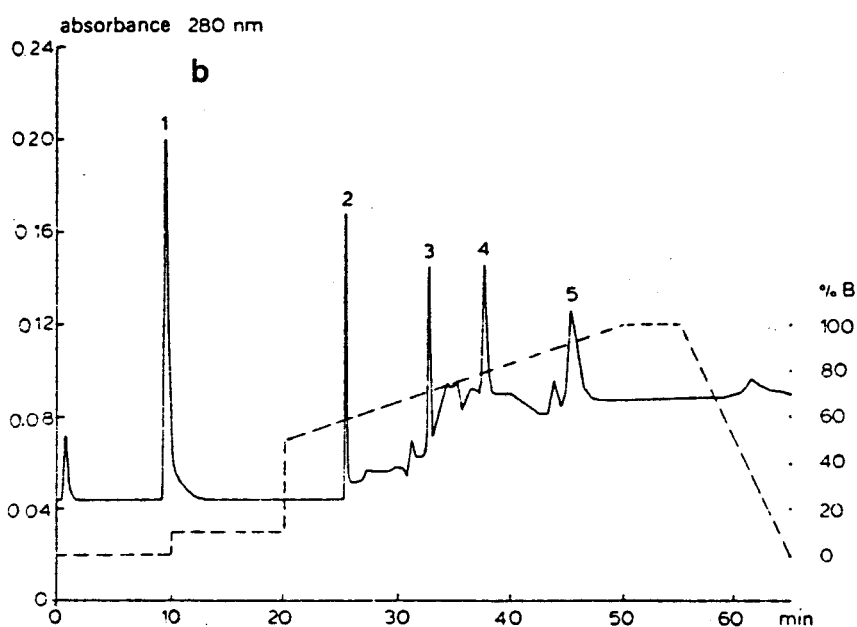
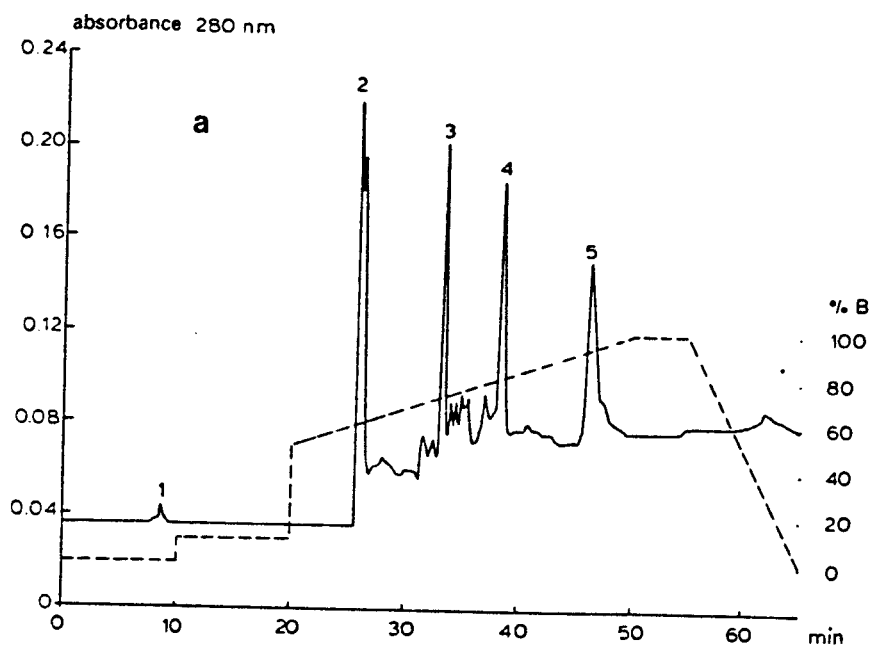


Figure 19 : Séparation en HPLC des peptides retenus (a) et non retenus (b) sur colonne de Sephadex G-100 obtenus à partir d'un hydrolysât organoalcalin d'élastine de ligament de Boeuf (PHAN DINH TUY et MOCZAR, 1984).



Les peptides exclus de la colonne de Sephadex G-100, de M_r comprise entre 120 000 et 60 000, donnent un profil pratiquement identique mis à part le fait que la fraction majeure (pic 1) faiblement retenue sur la colonne est éluée par 10 % de solvant B (fig. 19b). La composition en acides aminés de ce pic n'est pas connue. Les auteurs pensent que des peptides de faible taille moléculaire fortement associés à ceux de taille moléculaire élevée sont dissociés en présence de 1-propanol et se répartissent entre les pics 2, 3, 4, 5 du diagramme de la figure 19b.

- Mise au point de la méthode sur nos fractions

Les fractions d'élastine de poumon d'adulte, obtenues après solubilisation par l'élastase leucocytaire (E/S 1:100) et dessalées sur une colonne de Bio-Gel P-2 équilibrée en HCOOH 0,02 M, ont été utilisées afin de mettre au point une méthode qui puisse ensuite être employée pour la séparation des fractions obtenues ultérieurement après chromatographie de gel-filtration sur Bio-Gel P-100.

* Essais sur une colonne C18 μ -BONDAPACK (WATERS)

La colonne μ -BONDAPACK (3,9 x 300 mm) est constituée d'un gel de silice (taille des particules de 10 μ m) portant des chaînons hydrocarbonés à 18 carbones (C18). Le débit choisi est de 0,5 ml/min.

Les échantillons à déposer sont préparés comme il est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes : des dépôts de 100 μ g sont effectués. La lecture de l'absorption à 206 nm permet de suivre l'élution des fractions. Deux systèmes d'élution ont été utilisés :

Dans un premier temps, nous avons utilisé un système d'élution comportant les solvants suivants :

- solvant A : TFA à 0,01 %
- solvant B : TFA à 0,01 % contenant de l'acétonitrile à 80 %.

Après avoir effectué un gradient linéaire de 0 à 100 % de solvant B durant 50 mn, les fragments solubles d'élastine sont élués en un seul pic très hétérogène entre 65 et 75 % de solvant B (diagramme non présenté).

Dans un deuxième temps, nous avons préféré utiliser le système d'élution décrit par PHAN DINH TUY et MOCZAR, étant donné que le 1-propanol a un pouvoir éluant plus élevé que l'acétonitrile. La phase mobile est donc constituée des solvants suivants :

- solvant A : acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5
- solvant B : acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 contenant du 1-propanol à 80 %.

Plusieurs gradients ont été essayés. Nous en citons ici quelques-uns.

a) Gradient décrit par PHAN DINH TUY et MOCZAR

Après avoir reproduit le gradient décrit par ces auteurs (fig. 19), nous avons observé que les fractions d'élastine solubilisée sont éluées en un seul pic hétérogène, aux environs de 65 % de solvant B. Etant donné que ce gradient n'était pas satisfaisant, nous en avons essayé d'autres.

b) Gradient linéaire de 20 à 70 % de solvant B

La figure 20a montre le profil d'élution des fragments d'élastine dans un gradient linéaire de 20 à 70 % de solvant B. Nous constatons qu'une fraction mineure (pic 1) est éluee au bout de 8 mn à 25 % de solvant B. La partie majeure (pic 2) est éluee sous forme d'un pic étalé entre 35 et 50 % de solvant B de 21 mn à 37 mn.

c) Gradient par paliers de 0 à 70 % de solvant B

Après avoir effectué le gradient par paliers décrit sur la figure 20b, nous avons pu obtenir une ébauche de séparation de la précédente fraction (pic 2) en trois pics (2-1, 2-2 et 2-3) élués à 25 %, 30 % et 35 % de solvant B après 35 mn, 43 mn et 46 mn respectivement. Le pic 1 précédent est élué à 15 % de solvant B au bout de 22 mn.

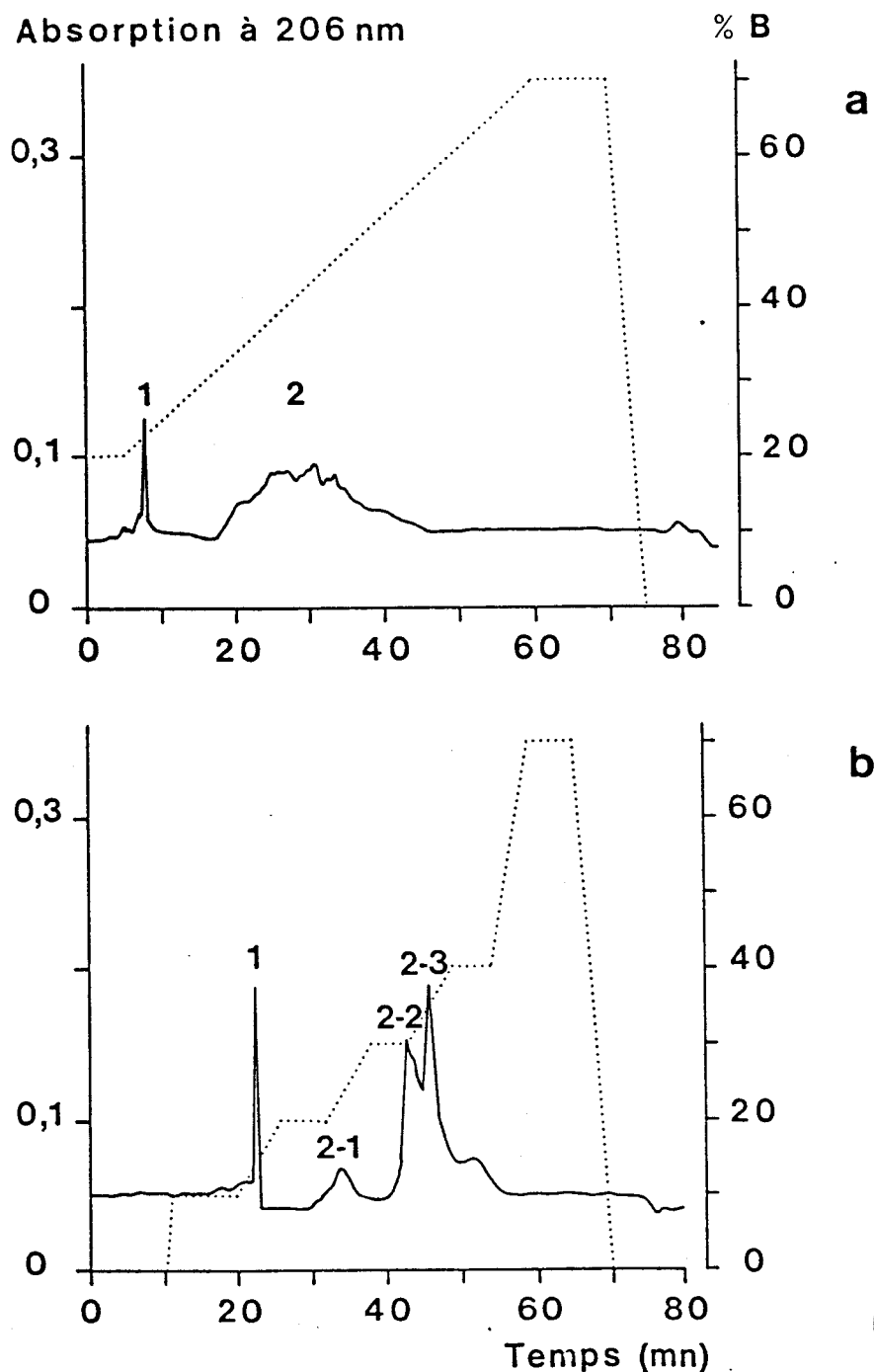


Figure 20 : Profil d'élution de HPLC de l'élastine solubilisée par l'élastase (E/S = 1:100); (a, b : différents profils de gradients),

Colonne C18 ; débit 0,5 ml/mn.

Dépôt : 100 µg par échantillon.

Eluant : solvant A, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 ;

solvant B, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 contenant 80 % de 1-propanol.



* Essais sur une colonne RP-8 (HEWLETT-PACKARD)

Aucun des précédents gradients n'étant satisfaisant, nous avons décidé de changer de phase stationnaire. Nous avons donc essayé une colonne RP-8 (4,6 x 250 mm) dont la taille des particules est égale à 10 μm .

Nous avons utilisé les mêmes tampons que précédemment (système acétate d'ammonium - 1-propanol) mais des gradients différents.

a) Gradient linéaire de 0 à 50 % de solvant B

Dans un gradient linéaire entre 0 et 50 % de solvant B (fig. 21a), nous constatons un pic très étroit (pic 1) élué à 18 % de solvant B et une fraction majeure très hétérogène (pic 2) élue entre 23 % et 45 % de solvant B et de 35 à 51 mn.

b) Gradient par paliers de 0 à 50 % de solvant B

Une meilleure séparation des fragments d'élastine a été obtenue en effectuant un gradient complexe par paliers (fig. 21b). Nous pouvons constater que le pic 1 précédent est également élué à 18 % de solvant B (à 23 mn), alors que le pic hétérogène 2 se sépare en deux sous-fractions éluées à 25 % et 34 % de solvant B : entre 35 et 43 mn pour la première (pic 2-1) et entre 53 et 65 mn pour la seconde (pic 2-2).

* Essais sur une colonne TSK ODS-120T (LKB)

La meilleure séparation des fragments solubilisés d'élastine que nous avons obtenue a été effectuée sur une colonne TSK ODS-120T (4,6 x 250 mm). La colonne est constituée d'un gel de silice greffée totalement substituée C18 (ODS) (taille des particules 5 μm).

Les solvants utilisés sont les mêmes que précédemment mais le gradient utilisé est différent (fig. 22). C'est dans ces conditions que l'on obtient les meilleures résolutions : elles seront donc utilisées pour la suite du travail.

Il faut noter qu'en reproduisant ce même gradient par paliers, mais dans un système d'élution comportant du TFA à la place de l'acétate d'ammonium, les fragments d'élastine sont fortement retenus sur la colonne et ne sont élués qu'à la fin du gradient à 70 % de solvant B (profil non montré).

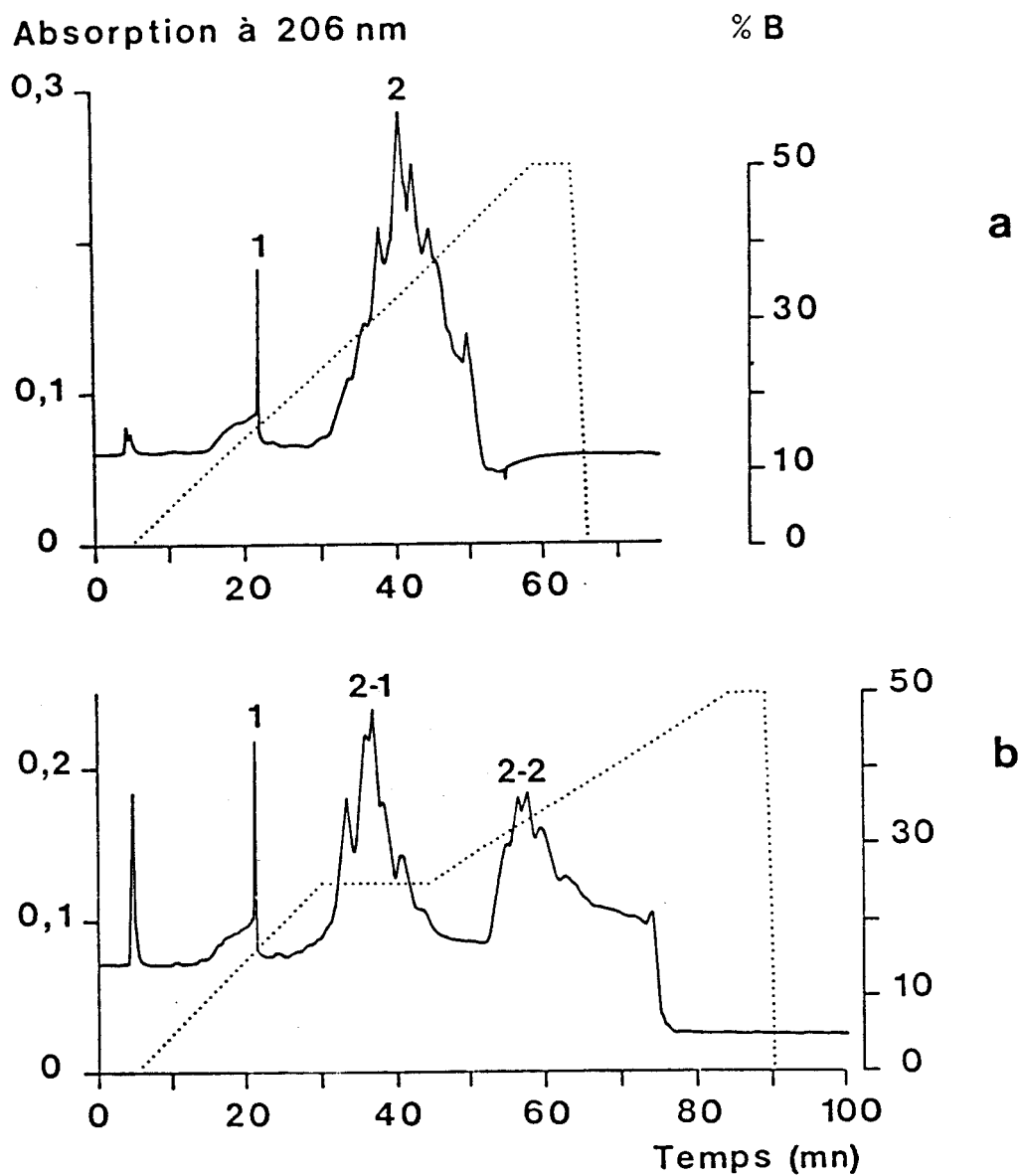


Figure 21 : Profil d'élution de HPLC de l'élastine solubilisée par l'élastase (E/S = 1:100) (a, b : différents profils de gradients).

Colonne RP-8 ; débit 0,5 ml/mn.

Dépôt : 100 µg par échantillon.

Eluant : solvant A, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 ;

solvant B, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 contenant 80 % de 1-propanol.



- Analyse des fractions F_1A obtenues après gel-filtration

Les fractions F_1A -élastase et F_1A -cathepsine G ont été analysées par HPLC en phase inverse selon les conditions décrites dans la légende de la figure 22, à l'aide du gradient par paliers. Vu la grande hétérogénéité des fractions, la séparation en HPLC est complexe. Les diagrammes obtenus pour F_1A -élastase (fig. 22a) et F_1A -cathepsine G (fig. 22b) sont assez semblables. Cinq pics ont été individualisés :

- pic 1 : non retenu (absent dans a)
- pic 2 : élué à 15 % de solvant B
- pic 3 : élué à 25 % de solvant B
- pic 4 : élué à 40 % de solvant B
- pic 5 : élué à 60 % de solvant B

Le pic 1 non retenu sur la colonne n'existe que lorsque la digestion de l'élastine est effectuée à l'aide de la cathepsine G.

Le tableau XI rassemble les résultats de l'analyse en acides aminés des fractions de départ (F_1A -élastase et F_1A -cathepsine G), ainsi que de celles des sous-fractions obtenues après HPLC.

Le pic 1 est caractérisé par une teneur élevée en Glu, Ser et Gly, une absence de Ide et Des, un rapport Gly/Ala égal à 2/1. Le caractère hydrophile de cette fraction peut être dû à la quantité d'acide glutamique qui représente environ 1/5 du total des acides aminés.

Bien qu'élusés avec le même pourcentage de tampon B (15 %), les pics 2 de F_1A -élastase et F_1A -cathepsine G présentent des différences dans leurs compositions en acides aminés, différences qui se situent essentiellement dans la teneur en Hyp et Gly. Les pourcentages élevés que représentent Glu + Asp (19 % après digestion par l'élastase et 16 % après digestion par la cathepsine G) expliquent l'élution de ces fractions en début de gradient. Celles-ci proviennent probablement des régions situées dans la molécule d'élastine à distance des liaisons croisées.

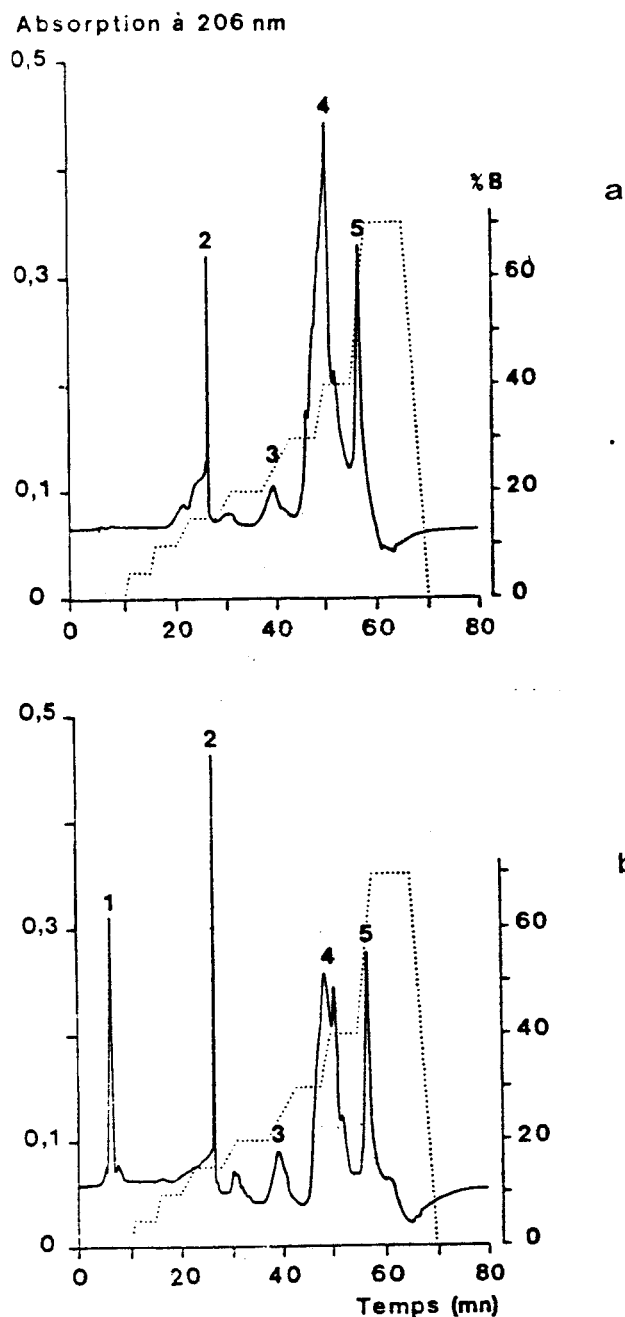


Figure 22 : Profil d'élution de HPLC de F₁A-élastase (a) et de F₁A-cathepsine G (b).

Colonne TSK ODS 120T ; débit 0,5 ml/mn.

Dépôt : 150 µg par échantillon.

Eluant : solvant A, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 ;

solvant B, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 contenant 80 % de
1-propanol ;

Gradient complexe de 0 à 70 % de solvant B, durée de 80 mn.

Les pics sont numérotés de manière homologue dans a et b en fonction de leur temps de rétention.



Tableau XI
Composition en acides aminés des fractions F₁A-élastase F₁A-cathepsine G
et des sous-fractions séparées en HPLC (en nombre de résidus/100 résidus)

	F ₁ A-élastase					F ₁ A-cathepsine G					
	globale	sous-fractions de HPLC				globale	sous-fractions de HPLC				
		2	3	4	5		1	2	3	4	5
HYP	3,50	5,18	1,80	1,55	1,42	3,20	1,41	tr	5,68	3,60	1,83
ASP	2,11	6,86	3,74	2,38	1,03	4,66	5,38	7,65	4,95	2,85	2,04
THR	1,99	4,44	3,11	1,55	1,68	3,08	4,30	4,37	3,10	2,27	2,15
SER	2,62	8,10	6,16	1,37	3,03	6,15	22,37	12,45	6,90	2,99	3,60
GLU	3,35	12,74	6,30	2,98	4,67	8,41	19,40	9,57	7,18	5,64	3,60
PRO	12,09	6,62	9,85	12,95	9,08	8,77	2,88	6,87	9,94	10,82	10,61
GLY	25,74	18,60	24,05	25,84	29,66	21,45	23,85	22,46	24,56	26,04	28,14
ALA	23,29	9,70	20,68	28,16	25,35	16,84	10,63	10,67	13,58	22,09	22,70
VAL	9,13	5,86	6,95	9,12	9,28	7,52	2,57	4,56	5,24	6,95	10,49
ILE	2,48	2,81	2,40	2,14	2,62	3,21	0,59	2,17	3,40	2,87	2,86
LEU	5,88	4,55	5,19	4,93	4,98	5,64	0,90	3,82	4,84	4,78	4,82
TYR	2,46	2,47	1,91	2,42	2,21	2,10	0,00	1,54	1,47	2,27	1,42
PHE	1,81	3,34	2,49	1,74	2,49	2,50	1,82	5,27	2,50	2,06	2,23
IDE	0,19	0,00	0,10	0,32	0,28	0,37	0,00	0,00	0,48	0,24	0,09
DES	0,20	0,00	0,20	0,31	0,27	0,22	0,00	0,00	0,30	0,30	0,14
LNL	0,08	0,00	tr	tr	tr	tr	0,00	tr	tr	tr	tr
HIS	0,38	2,73	1,05	0,17	0,29	1,19	1,49	2,19	1,33	0,64	0,46
LYS	1,39	3,36	1,87	1,02	0,85	2,40	2,20	3,01	2,01	1,64	1,42
ARG	1,31	2,64	2,16	1,05	0,81	2,35	0,21	2,70	2,54	1,93	1,40

1 : pic non retenu ; 2 : pic élué à 15 % du tampon B ; 3 : pic élué à 25 % du tampon B ; 4 : pic élué à 40 % du tampon B ; 5 : pic élué à 60 % du tampon B.



Les pics 3, 4, 5 de F₁A-élastase et 4, 5 de F₁A-cathepsine G semblent les plus intéressants. En effet, ils sont les plus riches en liaisons croisées, ont un rapport Gly/Ala voisin de 1 et renferment environ 25 % de chacun de ces acides aminés. Ils sont donc représentatifs des régions contenant les liaisons croisées. Le pic 4 est toujours la fraction majeure, mais il est encore hétérogène.

- Analyse des fractions F₂A obtenues après gel-filtration

Avec le même gradient que celui utilisé pour les fractions F₁A, nous avons tenté la séparation des peptides de plus petite masse moléculaire relative (F₂A). Le diagramme obtenu pour F₂A-élastase est montré dans la figure 23 : il est beaucoup plus complexe que celui décrit précédemment pour F₁A-élastase, ce qui traduit une hétérogénéité encore plus importante.

La présence d'un pic non retenu est notée ici, puis trois pics majeurs sont relativement bien individualisés :

pic 2 élué à 16 % de solvant B
 pic 3 élué à 20 % de solvant B
 pic 5 élué à 40 % de solvant B

Nous avons appelé pic 4 l'ensemble des pics élués entre 25 et 30 % de tampon B. Contrairement à ce qui est obtenu pour les fractions F₁A, le passage à 70 % de tampon B n'élué aucun matériel.

Le profil de fractionnement de F₂A-cathepsine G n'est pas présenté car il est identique à celui de F₂A-élastase.

Les compositions en acides aminés sont rassemblées dans le tableau XII. Comme la fraction F₂A-élastase, les sous-fractions obtenues après HPLC (pics 2 à 5) sont essentiellement composées de quatre acides aminés : Pro, Gly, Ala et Val dans des rapports différents :

	Pro/Gly/Ala/Val
fraction F ₂ A-élastase	1/2,5/2/1
pic 2	1/2/3/0,7
pic 3	1/3/1/1
pic 4	1/3/1/1
pic 5	1/3/1/1

Absorption à 206 nm

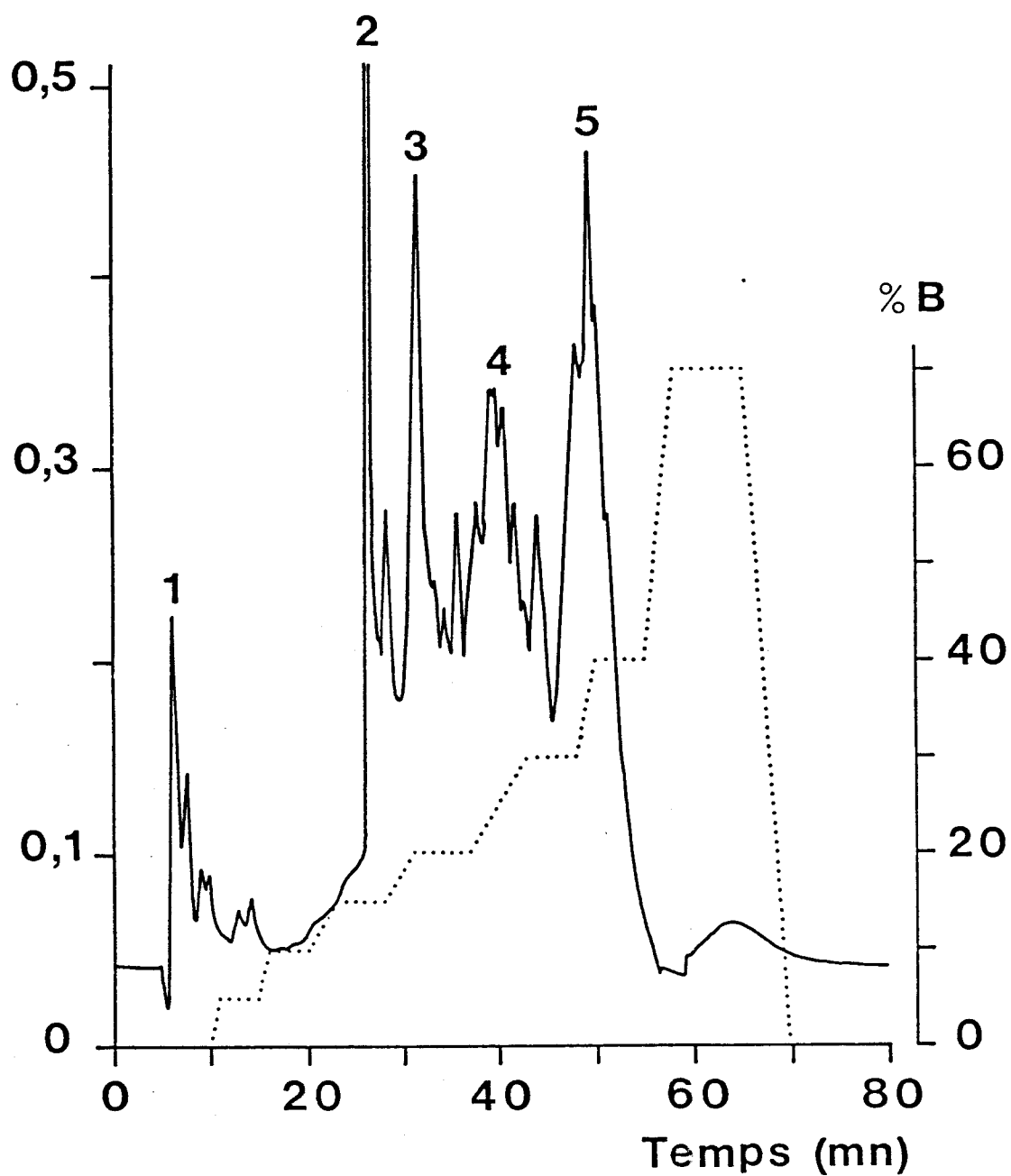


Figure 23 : Profil d'élution de HPLC de la fraction F₂A-élastase sur une colonne TSK ODS 120T selon les conditions décrites dans la figure 22.

Tableau XII

Composition en acides aminés des fractions F₂A-élastase F₂A-cathepsine G et des sous-fractions obtenues en HPLC (en nombre de résidus/100 résidus)

	F ₂ A-cathepsine G										
	F ₂ A-élastase					F ₂ A-cathepsine G					
	sous-fractions de HPLC					sous-fractions de HPLC					
globale	1	2	3	4	5	globale	1	2	3	4	5
HYP	0,48	0,57	0,56	0,96	0,73	1,10	0,25	0,38	0,72	1,94	1,14
ASP	3,09	4,11	2,22	2,64	2,23	1,89	6,16	6,46	5,41	4,26	4,32
THR	3,09	2,91	3,85	3,36	2,40	2,50	4,13	3,96	4,05	3,28	3,44
SER	3,27	5,80	2,43	1,90	1,86	2,10	3,75	9,39	4,54	3,78	3,66
GLU	6,00	5,69	6,08	3,73	5,15	3,97	8,13	11,99	8,30	7,16	6,20
PRO	9,21	1,19	9,61	11,75	10,01	11,55	9,56	2,12	9,32	10,52	9,16
GLY	26,59	19,60	23,96	31,41	31,63	29,34	21,90	33,85	16,79	26,15	25,46
ALA	17,99	54,37	31,44	14,11	12,76	13,19	12,68	21,50	12,14	10,80	11,66
CYS/2	0,31	0,00	0,06	0,07	0,05	0,10	tr	0,00	0,78	0,13	0,00
VAL	8,44	1,20	7,13	10,67	10,52	9,02	7,59	1,19	7,11	7,74	7,40
ILE	4,27	0,37	3,09	5,14	2,31	3,49	3,00	0,45	2,94	3,70	3,12
LEU	8,24	0,51	3,68	6,15	11,78	10,41	9,71	0,72	8,56	8,32	9,72
TYR	1,99	tr	1,12	2,61	1,68	2,52	0,95	0,09	4,12	3,00	3,85
PHE	3,37	0,49	0,62	1,85	3,75	5,47	3,41	0,57	2,64	4,60	5,01
HIS	0,64	0,60	0,48	0,48	0,45	0,47	1,15	0,78	1,25	1,06	0,90
LYS	1,59	1,94	1,66	1,50	1,15	0,95	3,31	4,67	2,30	0,53	1,82
ARG	1,74	0,52	2,01	1,68	1,54	1,93	4,32	1,88	3,33	3,03	3,17

1 : pic non retenu ; 2 : pic élué à 16 % de tampon B ; 3 : pic élué à 20 % de tampon B ; 4 : pic élué entre 25 et 30 % de tampon B ; 5 : pic élué à 40 % de tampon B.

Seul le pic 1 (non retenu) est essentiellement composé de plus de 70 % de Gly et d'Ala (rapport 2/5).

Ces composés de faible taille moléculaire sont probablement dérivés de chaînons situés à distance des liaisons croisées, la présence de celles-ci entravant l'action de l'enzyme.

Le tableau XII rassemble également les compositions en acides aminés des sous-fractions obtenues après chromatographie de F₂A-cathepsine G ; comme pour la fraction F₂A-élastase, les pics 2, 3, 4, 5 sont essentiellement composés des mêmes acides aminés majeurs dans des rapports différents :

	Pro/Gly/Ala/Val
fraction F ₂ A-cathepsine G	1/2/1/0,7
pic 2	1/3/3/1
pic 3	1/2/1/0,7
pic 4	1/2,6/1/0,7
pic 5	1/2,6/1/0,7

Le pic 1 est composé de plus de 50 % de Gly + Ala.

Les différentes sous-fractions obtenues à partir de F₂A-élastase et F₂A-cathepsine G ne renferment pas de liaisons croisées et sont constituées principalement des acides aminés situés en majorité dans des régions hydrophobes de la molécule d'élastine. Ceci montre que l'élastase et la cathepsine G sont capables de dégrader la molécule d'élastine au niveau de ces régions hydrophobes pour conduire à l'obtention de fragments peptidiques de taille moléculaire réduite, puisque ceux-ci sont retenus sur la colonne de Bio-Gel P-100.

I.3.2 Digestions successives de l'élastine par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires

I.3.2.1. Préparation des produits de digestion

La fraction F₁A-élastase obtenue par gel filtration sur Bio-Gel P-100 a été soumise à l'action de la cathepsine G dans les conditions décrites dans Matériel et Méthodes.

Dans une première série d'expériences, la digestion est effectuée dans un rapport E/S = 1:100 pendant des temps variables (1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24 h). Après arrêt de la réaction par acidification puis lyophilisation, les produits obtenus ont été étudiés en isoélectrofocalisation et SDS-PAGE.

Dans une deuxième série d'expériences, un rapport E/S = 2:100 a été utilisé, afin de voir l'influence de la concentration en cathepsine G sur la digestion de la fraction F₁A-élastase. Les produits obtenus ont été étudiés en isoélectrofocalisation et en gel-filtration.

I.3.2.2. Etude des produits de digestion de F₁A-élastase par la cathepsine G

I.3.2.2.1. SDS-PAGE

Nous avons d'abord soumis à une analyse en SDS-PAGE les produits obtenus par digestion de F₁A-élastase par la cathepsine G dans un rapport E/S 1:100. Cette technique électrophorétique a été utilisée ici dans le but de mettre en évidence l'apparition au cours du temps de fragments plus petits. Les résultats ont plutôt été décevants car la même polydispersité que pour la fraction non traitée est observée quel que soit le temps de digestion (fig. 24).

I.3.2.2.2. Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation a été réalisée sur la fraction F₁A avant et après digestion par la cathepsine G dans les rapports E/S de 1:100 et 2:100 (fig. 25). Dans le rapport E/S 1:100, il semble que les premiers temps de digestion (dépôts 1, 2, 3) soient insuffisants car si l'on compare à la fraction non traitée (dépôt 4), aucun changement dans la répartition et dans l'intensité des bandes n'est observé. Par contre, au bout de 24 h de digestion, il subsiste une bande majeure de pI égal à 4,2 (dépôt 7). Cet aspect est beaucoup plus net quand la digestion est effectuée avec un rapport E/S 2:100 (dépôt 6) en comparaison avec le témoin non traité (dépôt 5).

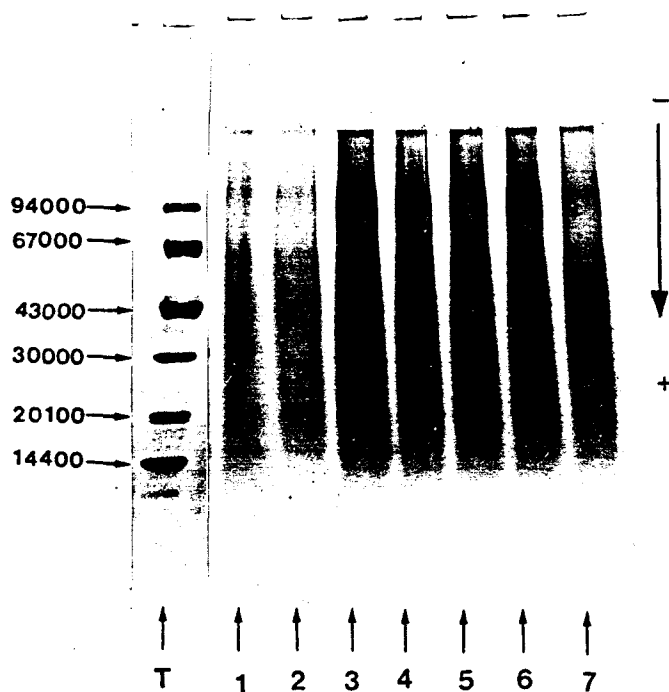


Figure 24 : Etude électrophorétique, en gel de polyacrylamide de 5 à 30 % en présence de SDS, des produits de digestion de F_1A -élastase par la cathepsine G.

T : témoins de M_r (PHARMACIA)

1 : F_1A -élastase non traitée

2 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S, 1:100, 1 h)

3 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S, 1:100, 2 h)

4 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S, 1:100, 3 h)

5 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S, 1:100, 4 h)

6 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S, 1:100, 5 h)

7 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S, 1:100, 6 h)

Dépôt : 50 μ g par échantillon.

Coloration : Bleu de Coomassie G-250

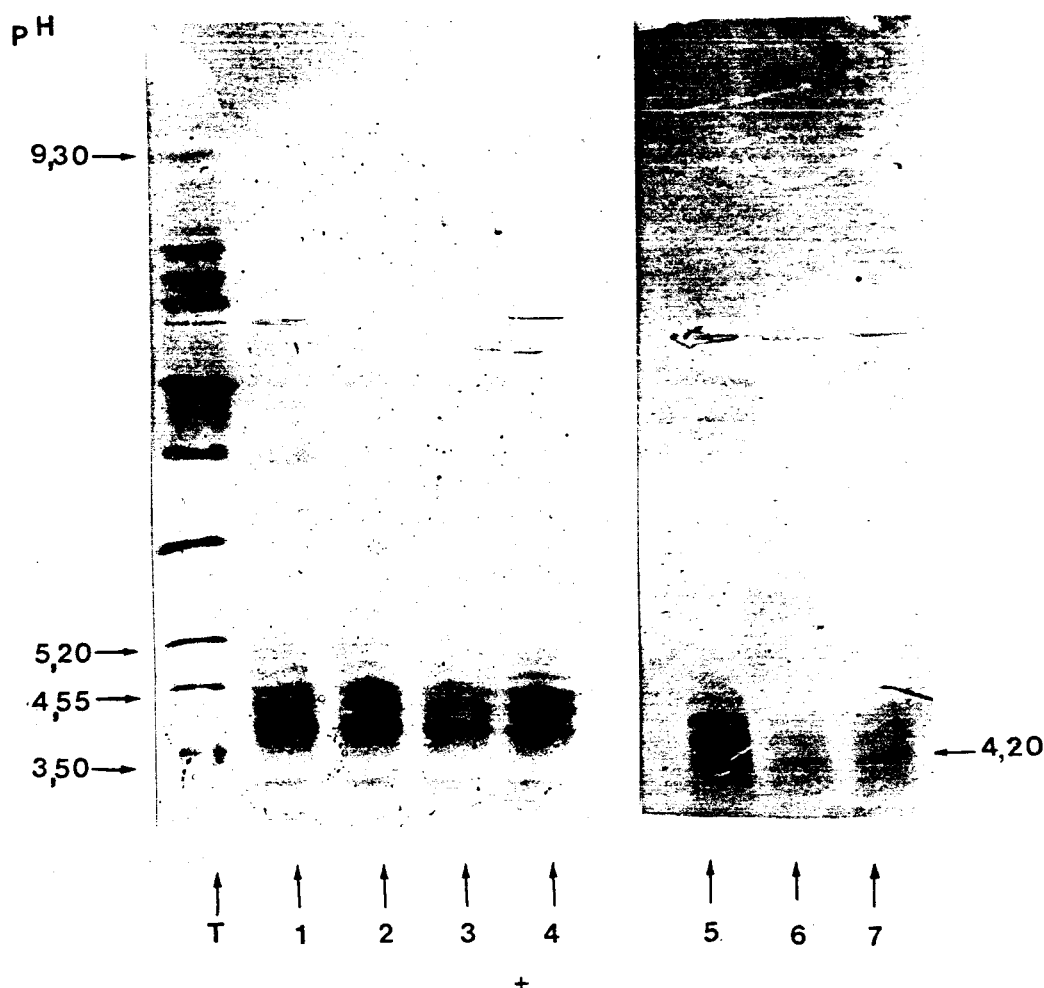


Figure 25 : Etude en isoélectrofocalisation en plaque de gel de polyacrylamide des produits de digestion de F_1A -élastase par la cathepsine G.

Gradient de pH de 3,5 à 10.

T : témoins de pI (PHARMACIA)

4,5 : F_1A -élastase

1 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S 1:100, 4 h)

2 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S 1:100, 5 h)

3 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S 1:100, 6 h)

6 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S 2:100, 24 h)

7 : F_1A -élastase + cathepsine G (E/S 1:100, 24 h)

Dépôt : 100 μ g par échantillon.

Coloration : Bleu de Coomassie R-250



Il semblerait donc que la digestion de F_1A -élastase par la cathepsine G soit possible mais qu'elle soit très lente. Ce système électrophorétique n'a pas permis la visualisation d'autres fragments.

1.3.2.2.3. Chromatographie de gel-filtration

Pour rechercher l'éventuelle apparition de fragments plus petits, nous nous sommes alors orientée vers la chromatographie de gel-filtration.

7 mg de F_1A -élastase ont été utilisés pour cette expérience. La moitié a été dissoute dans 1 ml d' $HCOOH$ 0,02 M et soumise à une nouvelle chromatographie sur une colonne de Bio-Gel P-100 (12 x 750 mm) pour servir de témoin (fig. 26a). L'autre moitié a été incubée avec la cathepsine G (rapport E/S égal à 2:100) pendant 24 h. Les fragments obtenus sont lyophilisés puis dissous dans 1 ml d' $HCOOH$ 0,02 M et soumis également à un fractionnement sur Bio-Gel P-100.

Le diagramme obtenu (fig. 26b) est comparé à celui obtenu pour la fraction F_1A native ; nous pouvons observer une diminution de la fraction exclue, alors qu'un petit pic de M_r voisine de 6 000 est mis en évidence, ce qui pourrait indiquer une digestion partielle par la cathepsine G. Ceci confirme les résultats obtenus après isoélectrofo-calisation de la fraction F_1A -élastase digérée par la cathepsine G dans les mêmes conditions (fig. 25, dépôt 6).

Ces résultats nous permettent de conclure que la fraction F_1A -élastase de M_r élevée, qui contient des liaisons croisées, est relativement résistante à l'action de la cathepsine G.

1.4. Conclusions à l'étude de l'élastine de poumons d'adulte

L'élastine a été préparée à partir des poumons très empoussiérés d'un sujet âgé de 57 ans ; ceci peut expliquer la forte proportion (34 %) de matériel non protéique dans les fibres d'élastine obtenues au stade final de la préparation. La composition en acides aminés de cette élastine se distingue essentiellement de celles décrites par d'autres auteurs par une teneur plus faible en glyco-colle et par une teneur plus élevée en hydroxyproline. Cependant, la teneur normale en valine et en liaisons croisées exclut la présence en quantité

Absorption à 226 nm

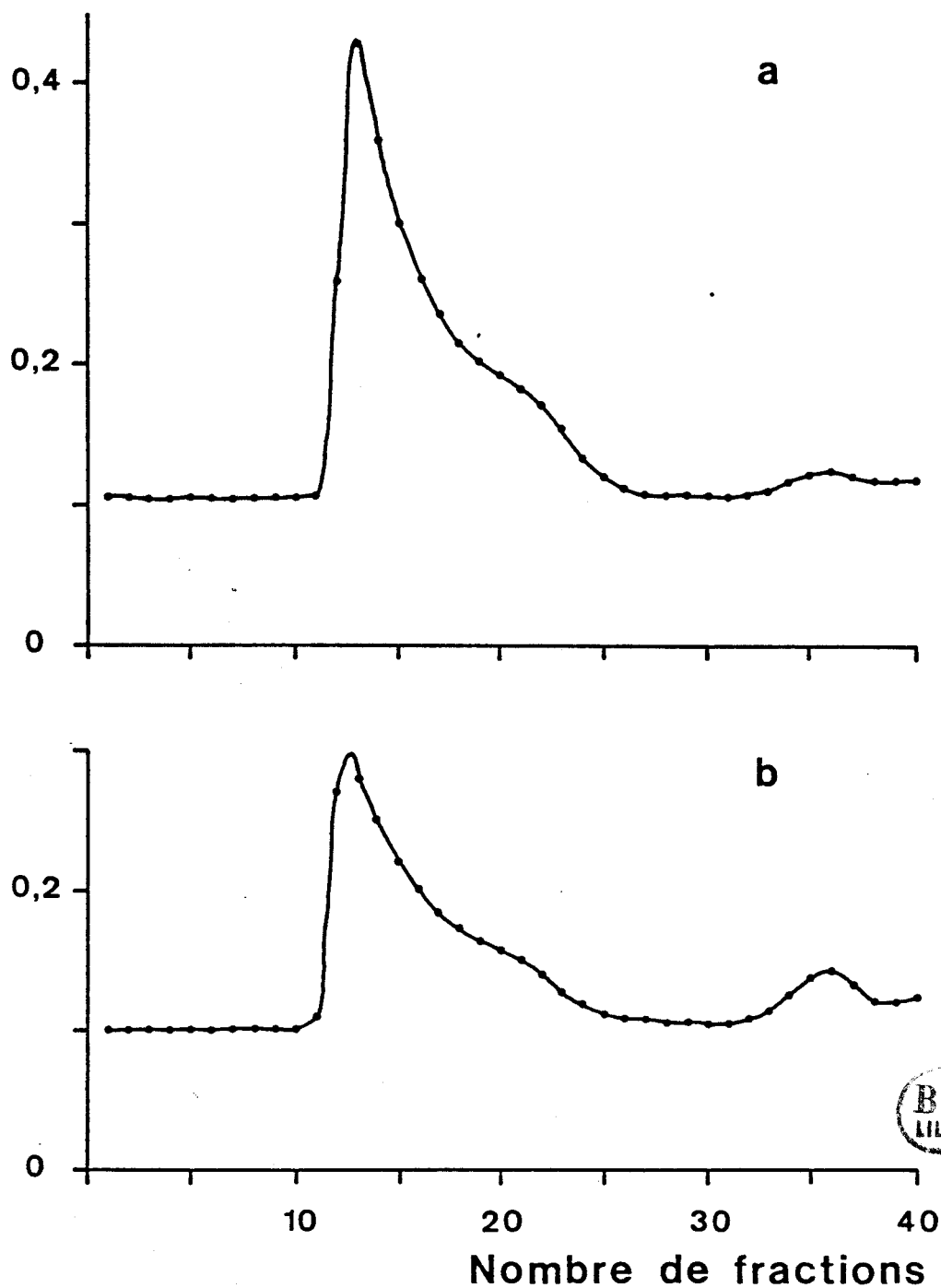


Figure 26 : Etude en gel-filtration sur colonne de Bio-Gel P-100 (12 x 750 mm) des produits de digestion de F_1A -élastase par la cathepsine G.

(a) F_1A native

(b) F_1A digérée par la cathepsine G (E/S 2:100, 24 h)

importante de protéines contaminantes. L'âge du sujet et les agressions dues à l'environnement, objectivées par la présence de poussières dans ses poumons, pourraient être la cause de modifications structurales au niveau de l'élastine, responsables des différences observées dans sa composition.

Des modifications de la composition en acides aminés de l'élastine isolée de parenchyme pulmonaire ont été décrites en fonction de l'âge des sujets. Une augmentation des acides aminés polaires et une diminution de la teneur en desmosines a été mise en évidence (JOHN et THOMAS, 1972). Les mêmes constatations ont été faites au niveau de la composition de l'élastine d'aortes humaines au cours du vieillissement (MOSCHETTO et coll., 1974).

Notre étude des cinétiques de solubilisation de l'élastine pulmonaire d'adulte par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires nous amène aux conclusions suivantes :

- l'élastase a une activité élastolytique nettement supérieure à celle de la cathepsine G, comme l'avaient déjà montré d'autres auteurs,
- dans nos conditions opératoires, une faible stimulation de l'activité élastolytique de l'élastase est obtenue en présence de cathepsine G.

Les fragments solubilisés par chaque enzyme ont été caractérisés :

- en SDS-PAGE, ils montrent une très grande hétérogénéité de taille moléculaire (M_r : 150 000 - 10 000)
- en isoélectrofocalisation, leur caractère relativement acide (pI de 4,2 à 4,7) a été mis en évidence,
- la chromatographie de gel-filtration a permis la séparation des fragments en deux groupes : l'un (F_1A) de M_r élevée mais très hétérogène (M_r de 100 000 à 20 000) et l'autre (F_2A) de M_r beaucoup plus faible (6 000 à 3 000),
- les fractions F_1A -élastase et F_1A -cathepsine G contiennent les acides aminés caractéristiques de l'élastine (isodesmosine - desmosine) alors que les fractions F_2A -élastase et F_2A -cathepsine G en sont dépourvues,

- la fraction F₁A-élastase n'est que très partiellement dégradée par la cathepsine G,
- en HPLC, les profils de répartition des pics obtenus à partir des fractions F₁A-élastase et F₁A-cathepsine G sont identiques. Dans les deux cas, l'élution par paliers que nous avons mise au point permet de séparer des peptides hydrophobes enrichis en desmosine et isodesmosine de peptides plus hydrophiles ayant une teneur nulle ou très faible en liaisons croisées. Les fractions F₂A-élastase et F₂A-cathepsine G donnent un diagramme identique mais très complexe, car un grand nombre de pics ont des temps de rétention très proches. Les peptides les moins retenus sur la colonne sont très riches en résidus d'alanine et de glycocolle.

Ces résultats montrent que l'élastase et la cathepsine G hydrolysent les liaisons peptidiques de la molécule d'élastine à distance des liaisons croisées, c'est-à-dire dans les domaines hydrophobes. L'accessibilité des enzymes à ces domaines serait plus facile que dans les zones de réticulation où la proximité des chaînes due à la présence des liaisons croisées provoquerait un encombrement stérique. Ceci infirme l'hypothèse émise par YASUTAKE et POWERS (1981) suggérant que l'élastase leucocytaire serait un enzyme sélectif des liaisons croisées. Il faut préciser que ces auteurs ont montré la réactivité de l'élastase leucocytaire sur des peptides synthétiques contenant des résidus de structure apparentée à celle des desmosines mais qu'ils n'ont pas étudié son action sur l'élastine réticulée.

II. COMPARAISON DES PRODUITS DE DIGESTION DES ELASTINES DE NOUVEAUX-NES ET D'ADULTE

Dans la deuxième partie de cette expérimentation, nous avons préparé et caractérisé les produits de digestion obtenus à partir d'une élastine provenant de poumons de nouveaux-nés. Le but poursuivi était une étude comparative de la susceptibilité aux enzymes leucocytaires de cette élastine et de l'élastine d'adulte présentée dans la première partie de ce travail.

II.1. Comparaison des deux élastines

II.1.1. Préparation

Le parenchyme de poumons de 7 nouveaux-nés décédés de cause inconnue a été traité par le même procédé de purification que le parenchyme de poumon d'adulte, excepté l'étape de délipidation qui dans ce cas a été omise (fig. 7). Les fibres d'élastine obtenues sont d'une couleur blanc-jaunâtre. Les résultats rassemblés dans le tableau III indiquent que, pour les poumons de nouveaux-nés, le rendement en élastine est très largement inférieur à celui obtenu pour l'adulte.

II.1.2. Composition en acides aminés

La pureté de l'élastine de poumons de nouveaux-nés a été contrôlée par l'analyse de la composition en acides aminés (tableau XIII) ; celle-ci est caractéristique de l'élastine : richesse en acides aminés hydrophobes, présence d'isodesmosine et de desmosine. Cette composition est très proche de celles rapportées dans le tableau VI pour des élastines de poumons d'adulte préparées par d'autres auteurs, en particulier pour les teneurs en hydroxyproline et en glycocolle. La seule différence observée est une teneur plus faible en valine. L'élastine de nouveaux-nés a donc une composition beaucoup plus conforme à celles décrites dans la littérature que l'élastine d'adulte que nous avons préparée et dont nous rappelons la composition dans le tableau XIII.

Tableau XIII

Composition en acides aminés des deux élastines
(nombre de résidus/100 résidus)

	Elastine de nouveaux-nés	Elastine d'adulte
HYP	1,35	4,31
ASP	1,48	2,92
THR	1,85	2,28
SER	1,81	3,11
GLU	4,09	4,53
PRO	10,83	12,57
GLY	30,29	19,08
ALA	24,26	18,51
CYS/2	0,00	1,08
VAL	8,78	12,06
ILE	2,34	2,65
LEU	5,38	6,09
TYR	1,84	3,02
PHE	2,48	2,93
IDE	0,30	0,11
DES	0,28	0,16
LNL	tr	0,04
HIS	0,16	0,73
LYS	1,24	1,87
ARG	1,24	2,07

II.2. Cinétiques de solubilisation

Nous avons pu réaliser sur l'élastine de nouveaux-nés des expériences de solubilisation par les enzymes comparables à celles exposées précédemment, bien que la faible quantité de cette élastine ne nous ait pas permis d'effectuer l'ensemble des expériences réalisées sur l'élastine d'adulte.

II.2.1. Solubilisation par l'élastase leucocytaire

La solubilisation par l'élastase leucocytaire a été réalisée en cinétique avec un rapport E/S égal à 1:100. Dans la figure 27, on constate que la solubilisation par l'élastase est moins rapide pour l'élastine de nouveaux-nés que pour celle d'adulte. Les vitesses initiales d'élastolyse sont respectivement de 5,9 et 9,5 $\mu\text{g/ml/mn}$. Néanmoins, après 24 h, les deux élastines sont entièrement solubilisées.

II.2.2. Solubilisation par la cathepsine G leucocytaire

La cathepsine G a été utilisée dans le même rapport E/S égal à 1:100. La solubilisation est lente pour les deux élastines (fig. 28) : elle est plus lente pour l'élastine de nouveaux-nés puisque 19 % seulement sont solubilisés après 48 h contre 33 % pour l'élastine d'adulte.

II.2.3. Conclusion

On peut conclure de ces études de solubilisation par l'élastase et la cathepsine G que l'élastine de nouveaux-nés semble avoir une résistance plus grande à l'action de ces enzymes que l'élastine d'adulte.

II.3. Détermination de la masse moléculaire relative des produits de digestion

La préparation d'élastine de nouveaux-nés a été soumise à l'action de l'élastase leucocytaire dans un rapport E/S égal à 1:100 pendant 24 h ; la taille moléculaire des fragments obtenus a été déterminée en gel-filtration et en SDS-PAGE dans les mêmes conditions que dans la partie I des Résultats.

Elastine solubilisée (%)

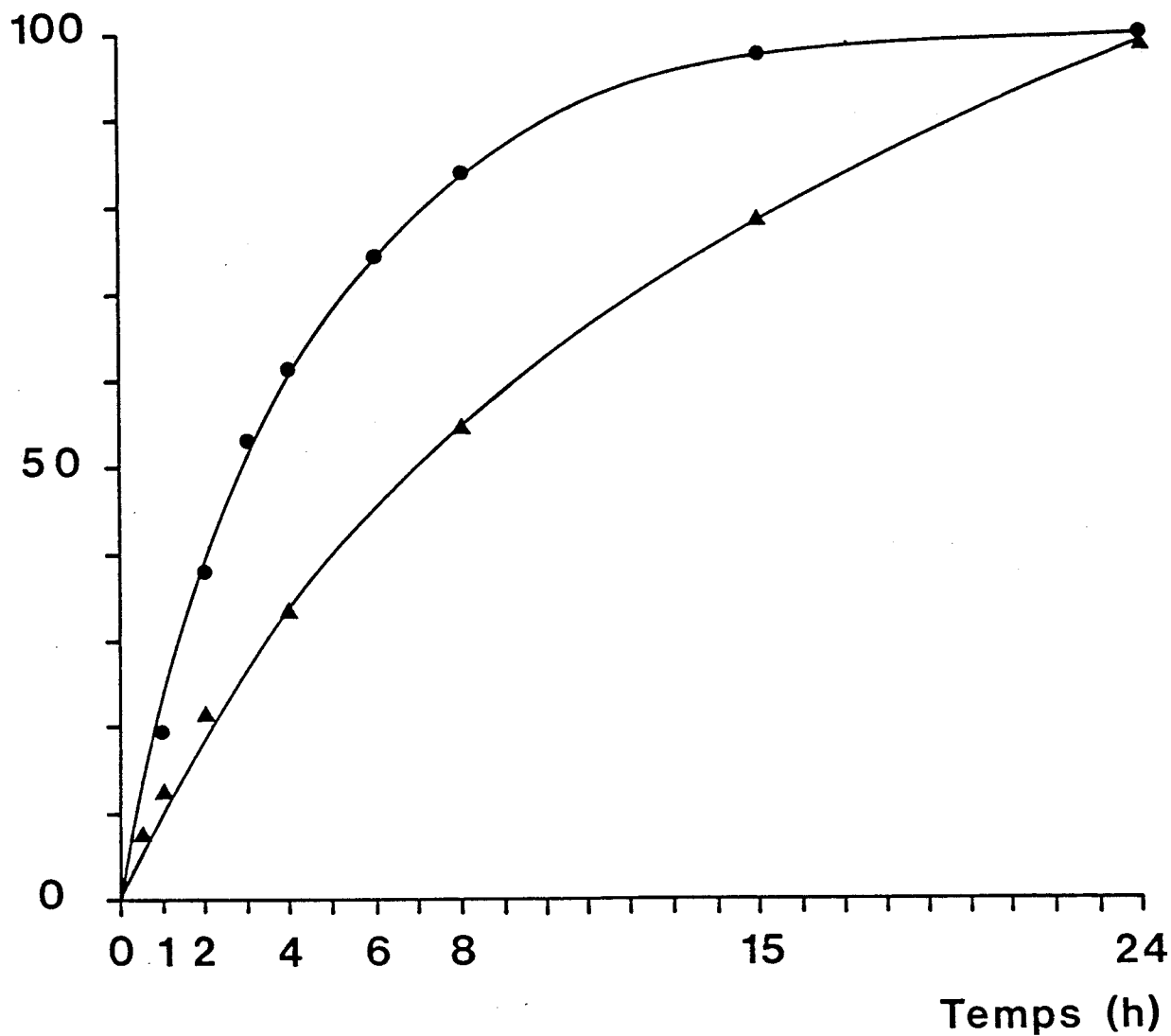


Figure 27 : Cinétiques de solubilisation des élastines de nouveaux-nés et d'adulte par l'élastase leucocytaire.

Le rapport E/S est égal à 1:100

▼—▶ élastine de nouveaux-nés

●—● élastine d'adulte

Elastine solubilisée (%)

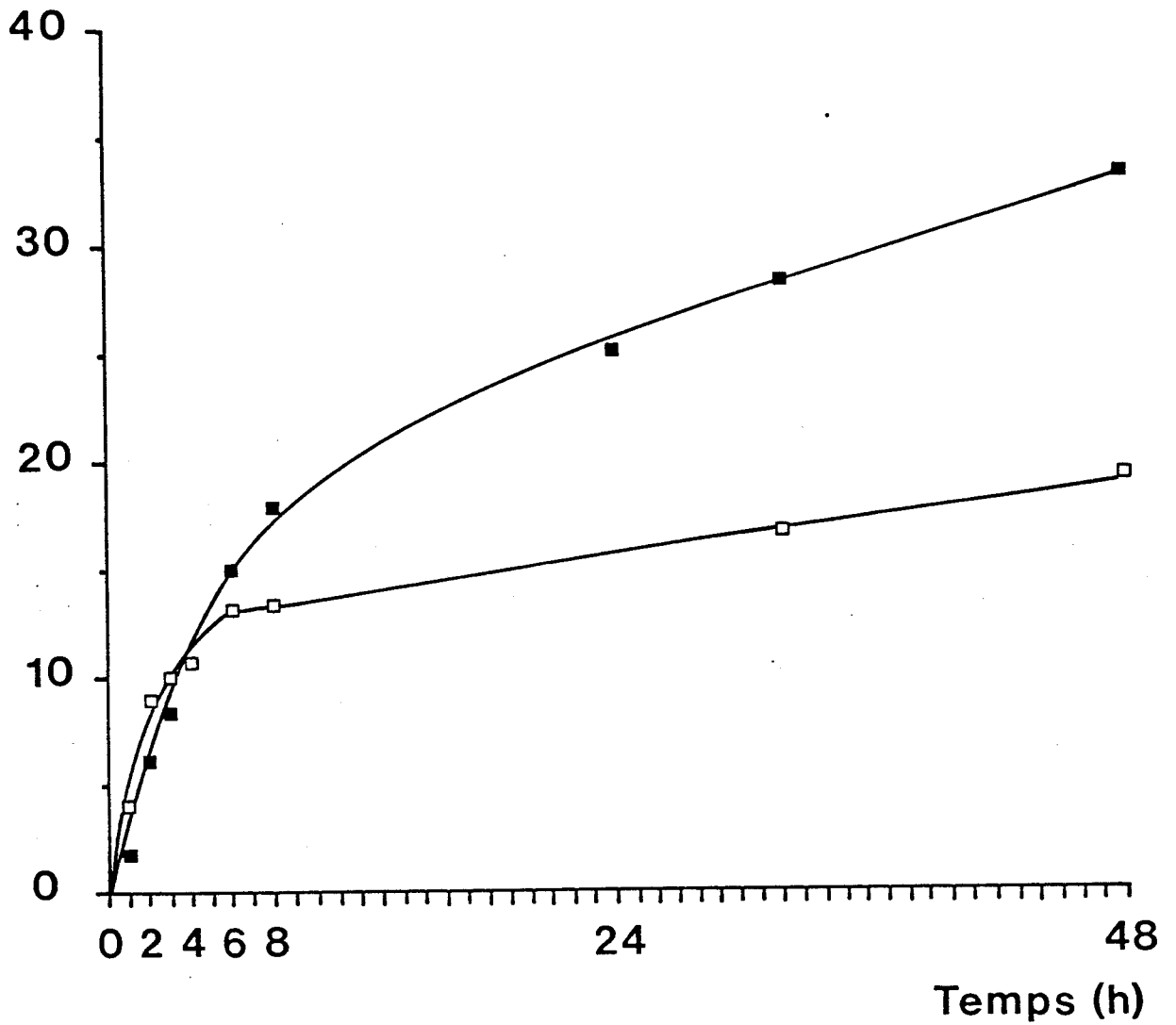


Figure 28 : Cinétiques de solubilisation des élastines de nouveaux-nés et d'adulte par la cathepsine G leucocytaire.

Le rapport E/S est égal à 1:100

□—□ élastine de nouveaux-nés

■—■ élastine d'adulte

II.3.1 Chromatographie de gel-filtration

La figure 29 montre le profil d'élution de la colonne de Bio-Gel P-100 des fragments résultant de la solubilisation de l'élastine de nouveaux-nés par l'élastase leucocytaire. Si on les compare à ceux obtenus dans les mêmes conditions à partir de l'élastine d'adulte (fig. 29a), ceux-ci sont de plus faible taille moléculaire ; en particulier aucune fraction exclue n'est observée (fig. 29b). Nous pouvons constater la présence d'une fraction dont l'élution se situe entre celles des fractions F_1A et F_2A . Nous avons séparé deux fractions F_1N et F_2N (fig. 29b), la plus importante par son absorption à 226 nm étant F_2N .

II.3.2. SDS-PAGE

La figure 30 montre très clairement que, pour l'élastine de nouveaux-nés, les fragments solubilisés ont des M_r inférieures à 30 000 (dépôt 3) : la zone diffuse observée se situe en dessous des bandes correspondant à l'élastase leucocytaire qui ne sont plus visibles après fractionnement de l'élastolysat sur Bio-Gel P-100 (F_1N , dépôt 4). Au contraire, les fragments obtenus à partir de l'élastine d'adulte présentent une hétérogénéité beaucoup plus grande et des M_r comprises entre 150 000 et 30 000 (dépôt 1). Nous n'avons pu visualiser la fraction F_2N par la méthode de fixation et de coloration utilisée : ceci peut être dû à la très faible taille moléculaire de cette fraction.

II.4. Composition en acides aminés des produits de digestion

Les compositions en acides aminés des fractions F_1N et F_2N -élastase sont indiquées dans le tableau XIV. Celles-ci sont très proches de la composition de l'élastine native (donnée dans le tableau XIII). La comparaison effectuée entre les fractions obtenues à partir de l'élastine de nouveaux-nés et celles obtenues à partir de l'élastine d'adulte conduit aux remarques suivantes :

- la fraction F_1N diffère essentiellement de la fraction F_1A par une teneur plus faible en hydroxyproline et par une teneur plus élevée en glycocolle et en desmosines,

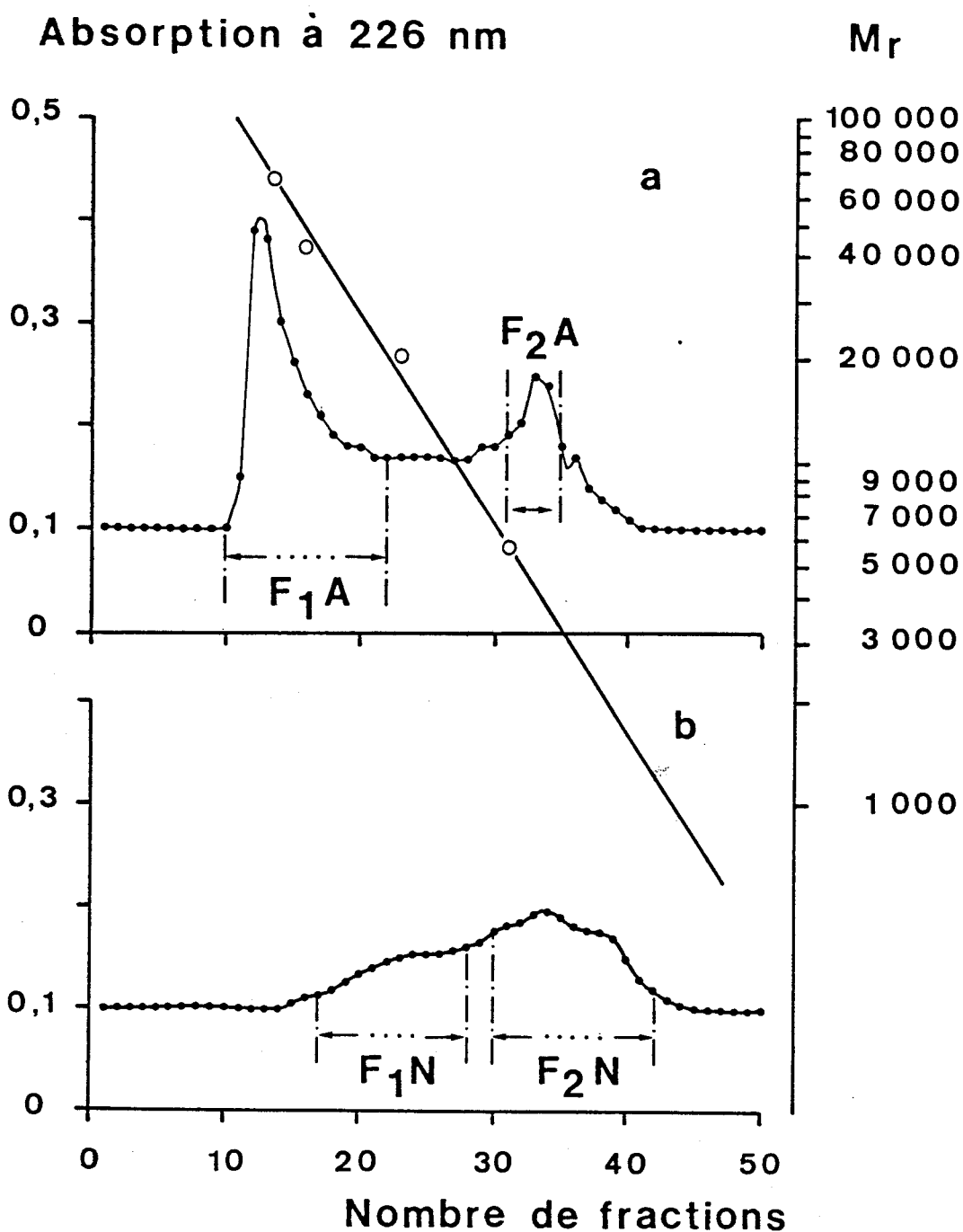


Figure 29 : Comparaison des profils d'élution sur colonne de Bio-Gel P-100 (12 x 750 mm) des fragments solubilisés par l'élastase leucocytaire (E/S égal à 1:100, 24 h).

(a) élastine d'adulte

(b) élastine de nouveaux-nés

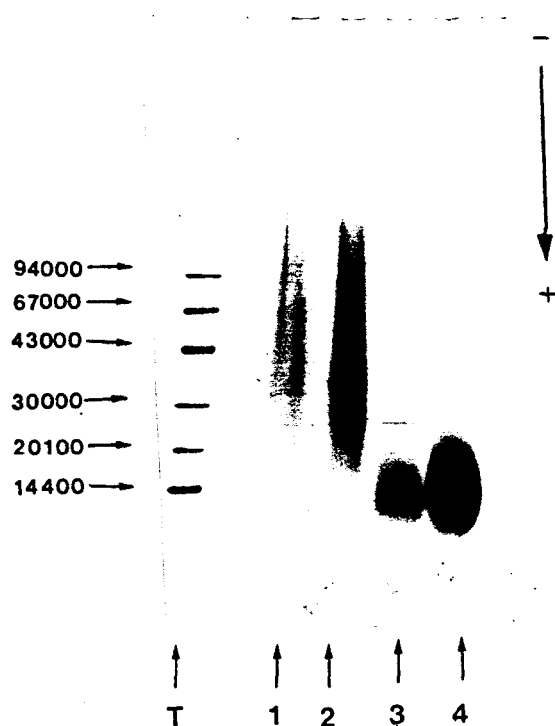


Figure 30 : Etude électrophorétique comparative des produits de digestion des deux élastines par l'élastase, en gel de polyacrylamide en gradient de 5 % à 30 % et en présence de SDS.

T : témoins de M_r (PHARMACIA)

1 : élastine d'adulte solubilisée par l'élastase

2 : F_1A -élastase après Bio-Gel P-100

3 : élastine de nouveaux-nés solubilisée par l'élastase

4 : F_1N -élastase après Bio-Gel P-100

Rapport E/S égal à 1:100, 24 h.

Dépôt : 30 μ g par échantillon

Coloration au Bleu de Coomassie G-250



Tableau XIV

Composition en acides aminés des fractions séparées sur
colonne de Bio-Gel P-100
(nombre de résidus/100 résidus)

	F ₁ N	F ₂ N	F ₁ A	F ₂ A
HYP	1,42	ND	3,50	0,48
ASP	0,94	1,35	2,11	3,09
THR	1,57	1,75	1,99	3,09
SER	1,39	1,46	2,62	3,27
GLU	3,51	2,61	3,35	6,00
PRO	10,23	13,43	12,09	9,21
GLY	32,52	27,31	25,74	26,59
ALA	24,29	23,61	23,29	17,99
CYS/2	0,00	0,00	0,00	0,31
VAL	9,38	11,32	9,13	8,44
ILE	2,41	3,32	2,48	4,27
LEU	5,29	7,26	5,88	8,24
TYR	1,93	1,89	2,46	1,99
PHE	2,52	2,49	1,81	3,37
IDE	0,29	0,10	0,19	0,00
DES	0,30	0,13	0,20	0,00
LNL	0,00	tr	0,08	0,00
HIS	0,14	0,15	0,38	0,64
LYS	0,97	0,72	1,39	1,59
ARG	0,90	0,89	1,31	1,74

F₁N, F₂N : fractions d'élastine de nouveaux-nés

F₁A, F₂A : fractions d'élastine d'adulte



- la fraction F_2N se différencie d'abord de la fraction F_2A par des teneurs plus faibles en acides aminés polaires (acides et basiques) puis par des teneurs plus élevées en proline, alanine et valine. Elle se caractérise surtout par la présence de desmosines, alors que F_2A n'en contient pas, même à l'état de traces.

II.5. Analyse des fractions en HPLC

II.5.1. Fraction F_1N -élastase

La fraction F_1N -élastase obtenue après gel-filtration sur Bio-Gel P-100 a été analysée par HPLC en phase inverse selon les conditions décrites dans Matériel et Méthodes.

La figure 31 présente le diagramme obtenu ; les 4 pics séparés sont numérotés par analogie de temps de rétention avec ceux obtenus pour l'élastine d'adulte :

- pic 2 : élué à 15 % de tampon B
- pic 3 : élué à 25 % de tampon B
- pic 4 : élué à 40 % de tampon B
- pic 5 : élué à 60 % de tampon B

Bien que la fraction F_1N -élastase soit de taille moléculaire plus faible que F_1A -élastase, elle a le même profil de répartition des pics que cette dernière ; toutefois, les pics 4 et 5 (fig. 31) ont une hauteur plus faible. Les pics 2 et 4 restent les pics majeurs.

II.5.2. Fraction F_2N -élastase

La fraction F_2N -élastase obtenue après gel-filtration sur Bio-Gel P-100 a été analysée en HPLC ; 5 sous-fractions ont été séparées (fig. 32) :

- pic 1 : non retenu
- pic 2 : élué à 15 % de tampon B
- groupe 3 : élué à 20 % de tampon B
- groupe 4 : élué entre 25 et 30 % de tampon B
- groupe 5 : élué à 40 % de tampon B

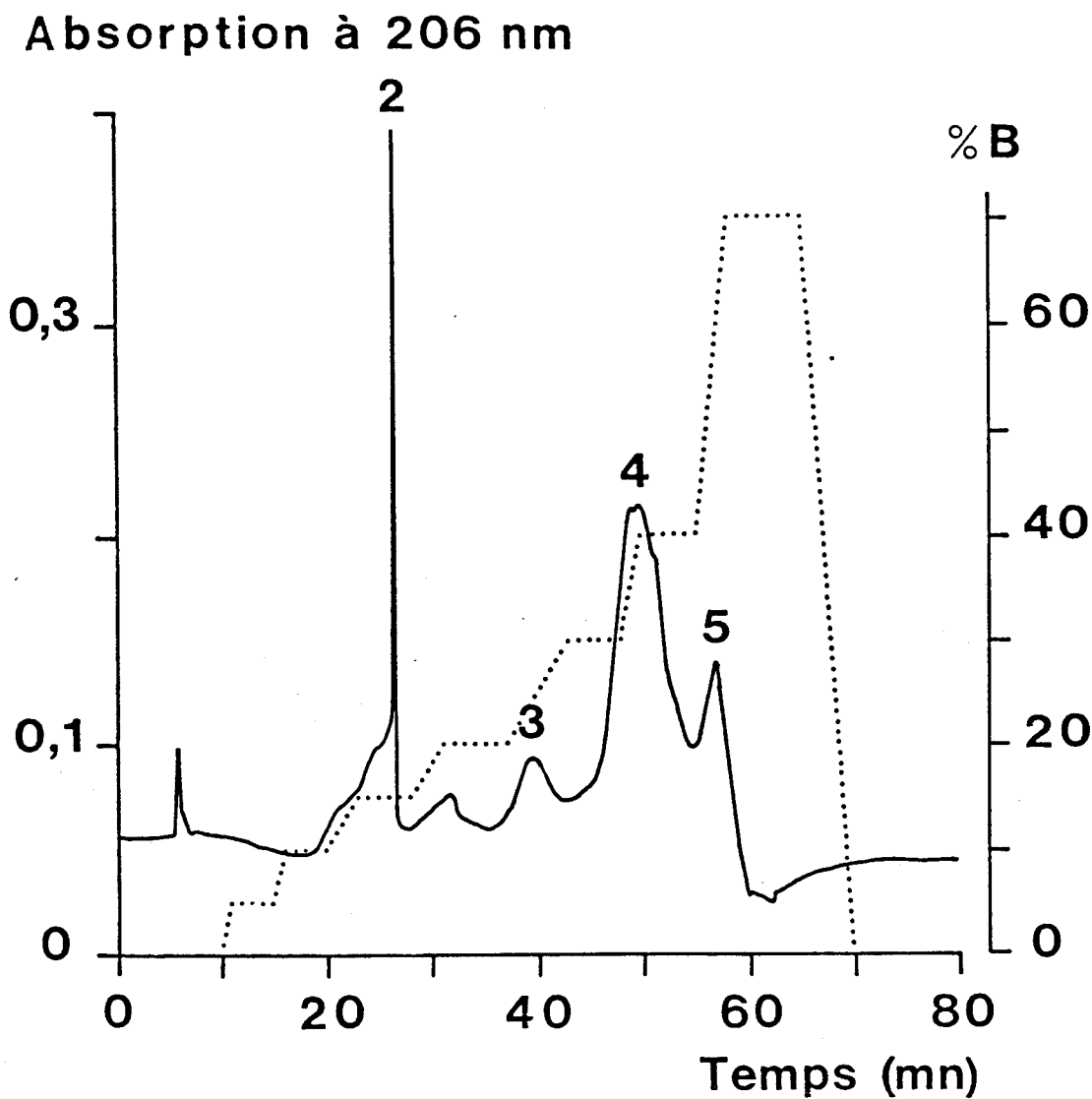


Figure 31 : Profil d'élution en HPLC de la fraction F₁N-élastase.

Colonne : TSK ODS 120T ; débit 0,5 ml/mn

Dépôt : 150 µg

Eluant : solvant A, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5

solvant B, acétate d'ammonium 0,01 M pH 7,5 contenant 80 % de
1-propanol.

Gradient par paliers de 0 à 70 % de solvant B, durée de 80 mn.

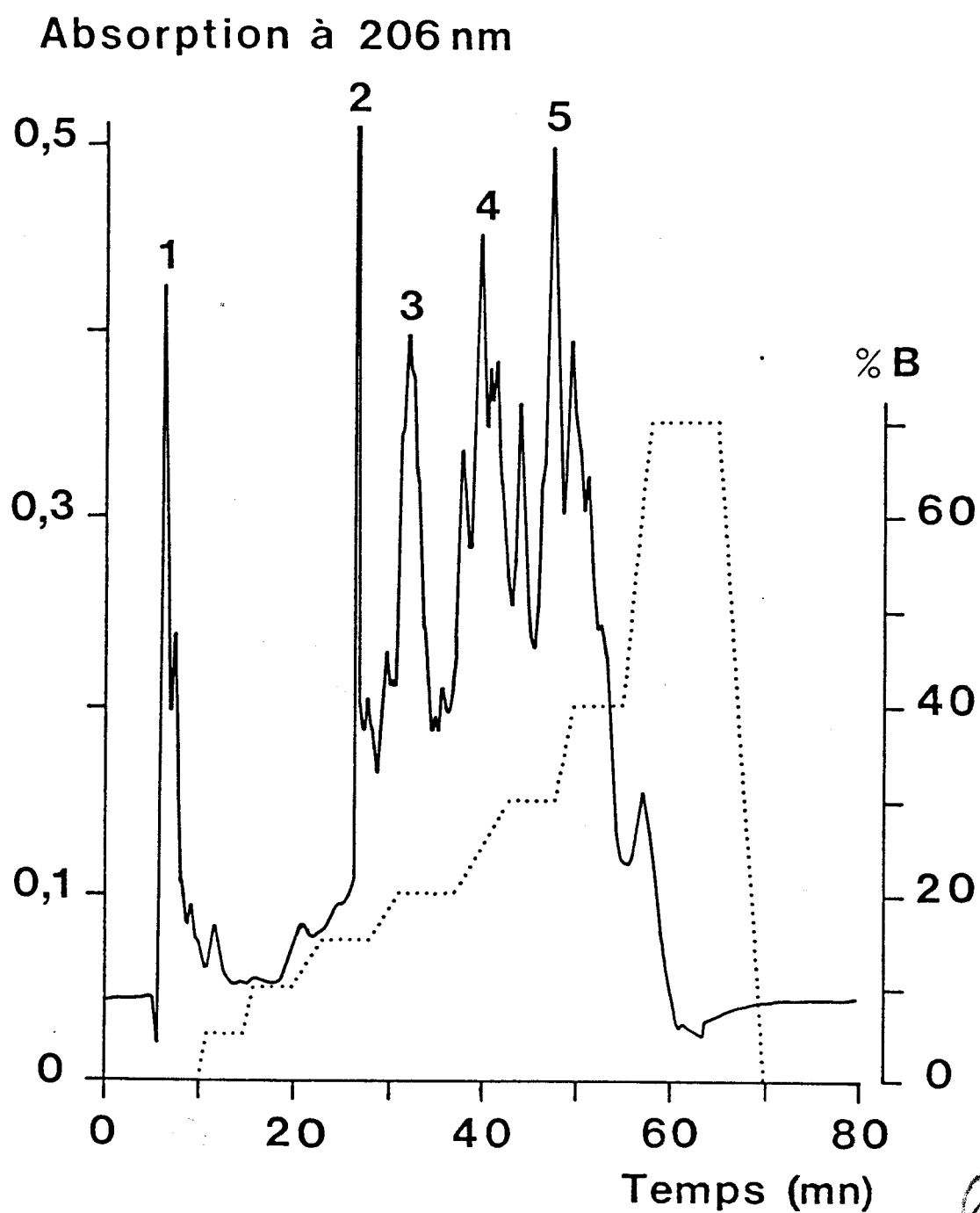


Figure 32 : Profil d'élution en HPLC de la fraction F_2N -élastase.
Conditions décrites dans la légende de la figure 31.



Le profil observé est très voisin de celui obtenu pour F₂A-élastase (fig. 23) ; il se caractérise par la même complexité dans les groupes de pics 3, 4 et 5.

II.5.3. Compositions en acides aminés

Le tableau XV rassemble les compositions en acides aminés de la fraction F₁N-élastase et des sous-fractions obtenues après HPLC. Comparé à la fraction globale, le pic 2 (élué à 15 % de tampon B) est caractérisé par sa teneur plus élevée en acides aminés acides, en thréonine et sérine, par sa teneur plus faible en glycolle et alanine et par l'absence de desmosines. Le pic 3 possède, par rapport à F₁N, une teneur plus faible en glycolle et une teneur plus élevée en alanine. Les pics 3 et 4 sont les plus riches en desmosines (teneur double de celle de F₁N). La teneur très élevée en glycolle (59 %) du pic 5, qui contient également une quantité de desmosines non négligeable, nous a semblé très surprenante ; il est probable qu'une contamination de ce pic, minoritaire dans le profil de fractionnement, ait eu lieu.

Le tableau XVI présente les résultats obtenus pour les compositions en acides aminés de la fraction F₂N-élastase et des sous-fractions séparées en HPLC. Seuls les pics 1 et 2 sont bien individualisés. Pour faciliter la comparaison avec les sous-fractions de F₂A, nous avons fait des groupes de pics correspondant aux temps de rétention observés précédemment.

Le pic 1 qui n'est pas retenu sur la colonne est caractérisé par sa teneur très élevée en alanine (55 %). Le pic 2 et les groupes 3, 4 et 5 sont composés essentiellement de Pro, Gly, Ala et Val dans des rapports différents de ceux de la fraction F₂N-élastase :

	Pro/Gly/Ala/Val
fraction F ₂ N-élastase :	1/2/2/1
pic 2 :	1/2/3/0,7
groupe 3 :	1/2/1,5/1
groupe 4 :	1/2/1/1
groupe 5 :	1/2/1/0,7

Ces trois groupes sont caractérisés également par la présence de desmosines, avec pour le groupe 5 des teneurs doubles de celles de la fraction F₂N-élastase.

Tableau XV

Composition en acides aminés de F₁N-élastase
et des sous-fractions de HPLC
(nombre de résidus/100 résidus)

	sous-fractions de HPLC				
	F ₁ N-élastase globale	2	3	4	5
HYP	1,42	ND	ND	ND	ND
ASP	0,94	6,23	2,53	1,70	2,10
THR	1,57	4,72	2,66	1,65	0,20
SER	1,39	10,94	3,99	1,64	5,01
GLU	3,51	6,64	4,22	2,38	3,00
PRO	10,23	7,77	10,70	12,41	5,16
GLY	32,52	14,05	22,76	28,43	59,53
ALA	24,29	18,02	31,25	27,76	10,04
VAL	9,38	10,24	8,90	8,83	4,99
ILEU	2,41	4,20	1,93	1,65	1,38
LEU	5,29	5,50	4,85	5,36	3,30
TYR	1,93	1,50	0,24	2,85	0,13
PHE	2,52	4,94	1,94	1,25	2,90
IDE	0,29	0,00	0,54	0,57	0,40
DES	0,30	0,00	0,81	0,66	0,60
HIS	0,14	1,43	0,63	0,23	0,31
LYS	0,97	3,10	1,07	1,83	0,95
ARG	0,90	0,72	0,98	0,80	0,00



Tableau XVI

Composition en acides aminés de F₂N-élastase
et des sous-fractions de HPLC
(nombre de résidus/100 résidus)

	sous-fractions de HPLC					
	F ₂ N-élastase globale	1	2	3	4	5
ASP	1,35	2,81	1,89	2,20	1,78	1,37
THR	1,75	4,34	3,51	1,94	1,56	1,17
SER	1,46	6,29	2,19	1,73	1,34	1,89
GLU	2,61	5,17	5,56	2,16	2,70	2,38
PRO	13,43	2,19	11,12	14,55	14,28	14,41
GLY	27,31	17,22	20,99	27,60	32,14	32,73
ALA	23,61	55,61	34,85	20,83	15,93	15,12
VAL	11,32	2,08	7,72	12,24	14,42	11,57
ILE	3,32	0,41	2,69	5,83	2,43	4,08
LEU	7,26	1,04	3,64	4,12	8,07	8,87
TYR	1,89	0,00	1,92	3,09	1,25	0,94
PHE	2,49	1,22	1,27	1,74	2,60	3,47
IDE	0,10	0,00	0,00	0,11	0,10	0,19
DES	0,13	0,00	0,00	0,16	0,14	0,26
HIS	0,15	0,54	0,19	0,18	0,15	0,16
LYS	0,72	1,08	1,48	0,68	0,48	0,48
ARG	0,89	0,00	0,98	0,84	0,63	0,92

II.6. Conclusion à l'étude comparative entre les deux élastines

La faible quantité d'élastine de nouveaux-nés dont nous disposions (150 mg) ne nous a pas permis d'effectuer l'ensemble des études réalisées sur l'élastine d'adulte. Sur certains points, nous avons cependant pu faire une étude comparative entre les deux élastines.

La composition en acides aminés de l'élastine de nouveaux-nés est très proche de celles des élastines d'adultes décrites par d'autres auteurs et rapportées dans le tableau VI. Les teneurs en desmosines sont très voisines de celles données dans la colonne A de ce tableau ; la présence de ces liaisons croisées en quantité identique à celle d'élastine d'adulte est un argument en faveur d'un état de maturation normal de cette élastine jeune.

La solubilisation plus lente par les enzymes d'origine leucocytaire de l'élastine de nouveaux-nés, comparée à l'élastine d'adulte, pourrait être le témoin de l'intégrité structurale de cette élastine. La sensibilité plus grande à l'action de ces enzymes de l'élastine d'adulte peut être la conséquence d'une protéolyse partielle de cette élastine "in situ" : l'âge du sujet (57 ans) et les agressions auxquelles il a été soumis sont des éléments en faveur de cette hypothèse. Une augmentation de l'élastolyse avec l'âge a été démontrée au niveau de l'aorte et du derme chez l'Homme (BOUISSOU et coll., 1976). Les altérations observées dans ces différents tissus élastiques impliquent des enzymes élastolytiques d'origines diverses.

La taille des fragments solubilisés par l'élastase est beaucoup moins hétérogène que dans le cas de l'élastine d'adulte ; tous les fragments obtenus ont une M_r inférieure à 30 000. De plus, les liaisons croisées sont aussi présentes dans des fragments de plus faible taille moléculaire (F_2N , $M_r < 6\ 000$), ce qui n'était pas le cas pour les fragments de taille analogue obtenus à partir de l'élastine d'adulte (F_2A).

Une répartition de pics identique a été observée en HPLC pour les sous-fractions provenant de F_1A et F_1N qui ont cependant des tailles moléculaires différentes. La même constatation a été faite pour les fractions F_2A et F_2N qui présentent entre elles des profils d'élution très voisins.

L'examen des compositions en acides aminés des sous-fractions obtenues en HPLC a montré une majorité d'acides aminés hydrophobes et la présence de desmosines dans les pics élués entre 25 et 60 % pour F_1A et F_1N et entre 20 et 40 % pour F_2N .

Ces résultats montrent que l'élastase leucocytaire agit sur l'élastine de nouveaux-nés au niveau des domaines hydrophobes de la molécule de manière plus uniforme que dans le cas de l'élastine d'adulte, puisqu'une moins grande dispersité de taille moléculaire des fragments solubilisés est observée. De plus, la présence de desmosines dans des fragments de faible taille moléculaire de l'élastine de nouveaux-nés semblent indiquer une sensibilité à cet enzyme de liaisons peptidiques plus proches des sites de réticulation que dans l'élastine d'adulte.

* *
* *

CONCLUSION GENERALE

* *
* *

L'étude que nous avons réalisée a été effectuée sur deux préparations d'élastine pulmonaire humaine, l'une obtenue à partir de poumons "âgés" (sujet de 57 ans) et l'autre à partir de poumons de nouveaux-nés. Cette dernière préparation peut être considérée comme de l'élastine à maturité, puisqu'elle contient une teneur normale en liaisons croisées (desmosines).

Il s'est avéré au cours de notre étude que le sujet "âgé" dont nous avons obtenu les poumons avait vraisemblablement subi un certain nombre d'agressions dues à l'environnement, attestées par la présence de contaminants minéraux noirs dans la préparation d'élastine. La différence constatée entre les vitesses initiales d'hydrolyse des deux préparations d'élastine évoque un processus de réparation qui peut être responsable de la moindre résistance à l'attaque enzymatique de l'élastine d'adulte. L'élastine de nouveaux-nés représente donc bien un témoin valable pour une étude de solubilisation par les enzymes. Pour vérifier l'hypothèse du processus de réparation, nous aurions aimé disposer de l'élastine pulmonaire d'un sujet jeune qui n'aurait subi que peu d'agressions au niveau respiratoire.

La différence de structure entre les deux préparations d'élastine se traduit au niveau de la taille et de la composition en acides aminés des fragments obtenus sous l'action de l'élastase leucocytaire : en ce qui concerne l'élastine d'adulte, la majorité des fragments est de taille élevée ($100\ 000 < M_r < 20\ 000$) ; seuls ces fragments contiennent des desmosines, car ceux de petite taille sont essentiellement composés d'acides aminés hydrophobes. Pour l'élastine de nouveaux-nés, les fragments obtenus dans les mêmes conditions expérimentales ont une $M_r < 30\ 000$ et contiennent des desmosines. L'accessibilité de l'élastase leucocytaire aux régions de la molécule contenant des liaisons croisées est donc différente pour les deux élastines.

La mise en oeuvre de la chromatographie liquide de haute performance sur les produits de digestion par l'élastase leucocytaire avait pour but l'isolement d'un peptide renfermant des liaisons croisées, dont les caractéristiques d'élution soient suffisamment nettes pour permettre un repérage aisé dans les liquides de lavage

bronchoalvéolaire. La polydispersité des produits de digestion et les difficultés rencontrées au cours de la mise au point de la technique nous ont empêchée d'atteindre notre but. En effet, la séparation obtenue avec le gradient par paliers que nous avons utilisé individualise certains pics dont la composition en acides aminés est caractéristique, mais qui sont encore hétérogènes.

Nous avons donc pensé réussir la mise en évidence des peptides dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire à l'aide des propriétés antigéniques des fragments. Le seul immunosérum commercial disponible est dirigé contre de l' α -élastine humaine d'origine aortique (élastine solubilisée par un procédé chimique). Nous avons effectué de nombreux essais avec cet immunosérum en immunodiffusion et en chromatographie d'immunoaffinité (non rapportés dans le chapitre Résultats et Discussion) et toujours échoué dans nos tentatives de reconnaissance entre nos antigènes et l'anticorps. La fraction F_1A -élastase que nous avons préparée sert actuellement à l'immunisation de deux lapins. Les premiers essais en immunoblot montrent que les immunosérums obtenus révèlent l'antigène d'immunisation, la fraction F_1A -cathepsine G et la fraction F_1N -élastase. Ils réagissent aussi avec des fragments d'élastine d'origines diverses (α -élastine d'aorte humaine, α - et κ -élastines d'aorte de Porc et α -élastine de ligament de Boeuf), ceci montrant qu'il existe des motifs antigéniques communs entre ces différents fragments.

Notre travail ne constitue donc que la première étape d'une étude qui devrait permettre par la suite la quantification des fragments d'élastine dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire et contribuer ainsi à la détection précoce de l'emphysème pulmonaire.

* *
* *

BIBLIOGRAPHIE

* *
* *

- ALBRECHT G.J., HOCHSTRASSER K. et SALIER J.P. (1983)
Elastase inhibition by the inter-alpha-trypsin inhibitor and derived inhibitors of man and cattle.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1703-1708.
- ANWAR R.A. et ODA G. (1966)
The biosynthesis of desmosine and isodesmosine.
J. Biol. Chem., 241, 4638-4641.
- BANGA I. (1952)
Isolation and crystallization of elastase from the pancreas of cattle.
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 3, 317-324.
- BAUGH R.J. et TRAVIS J. (1976)
Human leukocyte granule elastase : rapid isolation and characterization.
Biochemistry, 15, 836-841.
- BIETH J.G., SPIESS B. et WERMUTH C. (1974)
The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase.
Biochem. Med., 11, 350-357.
- BIETH J.G. (1978)
Elastases : structure, function and pathological role.
in Frontiers of Matrix Biology, (Robert L. ed.) vol 6, pp. 1-82,
Karger, Bâle.
- BLOW A.M.J. (1977)
Action of human lysosomal elastase on the oxidized B chain of insulin.
Biochem. J., 161, 13-16.
- BOUDIER C., ANDERSSON K.K., BALNY C. et BIETH J.G. (1980)
Enhancement of human leukocyte elastase activity by ionic strength.
Biochem. Med., 23, 219-222.

- BOUDIER C., HOLLE C. et BIETH J.G. (1981)
Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G.
J. Biol. Chem., 256, 10256-10258.
- BOUISSOU H., PIERAGGI M.T., JULIAN M. et DOUSTE-BLAZY L. (1976)
Simultaneous degradation of elastin in dermis and in aorta.
in Frontiers of Matrix Biology (Robert A.M., Robert L. eds) Vol. 3, pp 242-255, Karger, Bâle.
- BRUCH M. et BIETH J.G. (1986)
Influence of elastin on the inhibition of leucocyte elastase by α_1 -proteinase inhibitor and bronchial inhibitor.
Biochem. J., 238, 269-273.
- BURNETT W. et ROSENBLOOM J. (1979)
Isolation and translation of elastin mRNA from chick aorta.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 478-484.
- CICILA G., MAY M., ORNSTEIN-GOLDSTEIN N., INDIK Z., MORROW S., YEH H.S., ROSENBLOOM J., BOYD C., ROSENBLOOM J. et YOON K. (1985)
Structure of the 3' portion of the bovine elastin gene.
Biochemistry, 24, 3075-3080.
- COLLINS J.F. et FINE R. (1981)
The enzymatic digestion of elastin at acidic pH.
Biochim. Biophys. Acta, 657, 295-303.
- COMTE P. et ROBERT L. (1968)
Composition en amino acides de la kappa-élastine.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1349-1351.
- DAMIANO V.V., TSANG A., KUCICH U., ABRAMS W.R., ROSENBLOOM J., KIMBEL P., FALLAHNEJAD M. et WEINBAUM G. (1986)
Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs.
J. Clin. Invest., 78, 482-493.

DARNULE T.V., McKEE M., DARNULE A.T., TURINO G.M. et MANDL I. (1982)
Solid-phase radioimmunoassay for estimation of elastin peptides in human sera.

Anal. Biochem., 122, 302-307.

DAVIDSON J.M., LESLIE B., WOLT T., CRYSTAL R.G. et SANDBERG L.B. (1982)

Characterization of a signal peptide sequence in the cell-free translation product of sheep elastin mRNA.

Arch. Biochem. Biophys., 218, 31-37.

DAVIDSON J.M., SHIBAHARA S., SCHAFER M.P., HARRISON M., LEACH C., TOLSTOSHEV P. et CRYSTAL R.G. (1984)

Sheep elastin genes. Isolation and preliminary characterization of a 9.9-kilobase genomic clone.

Biochem. J., 220, 643-652.

DAVRIL M., DEBACKER M. et MOSCHETTO Y. (1972)

Evolution des taux de réticulation de l'élastine d'aorte humaine en fonction du degré d'athérome.

C.R. Acad. Sc. Paris, 274, 3131-3134.

DE CREMOUX H., HORNEBECK W., JAURAND M.C., BIGNON J. et ROBERT L. (1978)

Partial characterization of an elastase-like enzyme secreted by human and monkey alveolar macrophages.

J. Pathol., 125, 171-177.

DEL MAR E.G., LARGMAN C., BRODRICK J.W., FASSETT M. et GEOKAS M.C. (1980)

Substrate specificity of human pancreatic elastase 2.

Biochemistry, 19, 468-472.

DUBICK M.A., RUCKER R.B., CROSS C.E. et LAST J.A. (1981)

Elastin metabolism in rodent lung.

Biochim. Biophys. Acta, 672, 303-306.

FOSTER J.A., SHAPIRO R., VOYNOW P., CROMBIE G., FARIS B. et FRANZBLAU C. (1975)

Isolation of soluble elastin from lathyrotic chicks. Comparison to tropoelastin from copper deficient pigs.

Biochemistry, 14, 5343-5347.

FRANCIS G., JOHN R. et THOMAS J. (1973)

Biosynthetic pathway of desmosines in elastin.

Biochem. J., 136, 45-55.

FRANZBLAU C., FARIS B., LENT R.W., SALCEDO L.L., SMITH B., JAFFE R. et CROMBIE G. (1970)

Chemistry and biosynthesis of crosslinks in elastin.

in "Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix".

(Balzars E.A. ed.), vol. 1, pp. 617-639, Academic Press, New-York.

FRANZBLAU C. (1986)

Communication au Workshop Structure and metabolism of connective tissue proteins in the lung.

Londres, 5-6 août.

GRAY W.R., SANDBERG L.B. et FORSTER J.A. (1973)

Molecular model for elastin structure and function.

Nature, 246, 461-466.

GREEN M.R., PASTEWKA J.V. et PEACOCK A.C. (1973)

Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye.

Anal. Biochem., 56, 43-51.

GREENLEE T.K., ROSS R. et HARTMAN J.L. (1966)

The fine structure of elastin fibers.

J. Cell. Biol., 30, 59-71.

GROSS P., PFITZER E.A., TOKER E., BABYAK M.A. et KASCHAK M. (1965)

Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats.

Arch. Environ. Health, 11, 50-58.

HAREL S., JANOFF A., YU S.Y., HUREWITZ A. et BERGOFKY E.H. (1980)
Desmosine radioimmunoassay for measuring elastin degradation "in vivo".

Am. Rev. Respir. Dis., 122, 769-773.

HAYASHI T. et NAGAI Y. (1979)

Separation of the alpha chains of type I and III collagens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biochem., 86, 453-459.

HORNEBECK W., DEROUETTE J.C. et ROBERT L. (1975)

Isolation, purification and properties of aortic elastase.

FEBS Lett., 58, 66-70.

HORNEBECK W., DEROUETTE J.C., ROLAND J., CHATELET F., BOUISSOU H. et ROBERT L. (1976)

Correlation entre l'âge, l'artériosclérose et l'activité élastinolytique de la paroi aortique humaine.

C.R. Acad. Sc. Paris, 282, 2003-2006.

HUNNINGHAKE G.W., DAVIDSON J.M., RENNARD S., SZAPIEL S., GADEK J.E. et CRYSTAL R.G. (1981)

Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema.

Science, 212, 925-927.

INDIK Z., YOON K., MORROW S., CICILA G., ROSENBLUM J.C., BOYD C.D., DEAK S., ROSENBLUM J. et ORNSTEIN-GOLDSTEIN N. (1986)

The 3' region of the human elastin gene is rich in Alu repetitive sequences and has few coding sequences.

Fed. Proc., 45, 1907 (Abstract).

JACOB M.P., BELLON G., ROBERT L., HORNEBECK W., AYRAULT-JARRIER M., BURDIN J. et POLONOVSKI J. (1981)

Elastase-type activity associated with high density lipoproteins in human serum.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 311-318.

JACOB M.P. et HORNEBECK W. (1985)

Isolation and characterization of insoluble and kappa-elastins.

Frontiers of Matrix Biology, (Robert L., Moczar M., Moczar E. eds)

Vol. 10, pp. 92-129, Karger, Bâle.

JANOFF A. et SCHERER J. (1968)

Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes.

J. Exp. Med., 128, 1137-1140.

JANOFF A. (1985)

Elastases and emphysema.

Am. Rev. Respir. Dis., 132, 417-433.

JOCHUM M. et BITTNER A. (1983)

Inter-alpha-trypsin inhibitor of human serum : an inhibitor of polymorphonuclear granulocyte elastase.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1709-1715.

JOHN R. et THOMAS J. (1972)

Chemical compositions of elastins from aortas and pulmonary tissues of humans of different ages.

Biochem. J., 127, 261-269.

KAGAN H.M. et SULLIVAN K.A. (1982)

Lysyl-oxidase : preparation and role in elastin biosynthesis.

Methods Enzymol., 82A, 637-650.

KERCKAERT J.P. (1978)

Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis.

Anal. Biochem., 84, 354-360.

KORNBERG R.L., HENDLER S.S., OIKARINEN A.I., MATSUOKA L.Y. et UITTO J. (1985)

Elastoderma. Disease of elastin accumulation within the skin.

N. Engl. J. Med., 312, 771-773.

KORNFELD-POULLAIN N. et ROBERT L. (1968)

Effet de différents solvants organiques sur la dégradation alcaline de l'élastine.

Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 759-771.

KUCICH U., CHRISTNER P., LIPPMANN M., FEIN A., GOLDBERG A., KIMBEL P., WEINBAUM G. et ROSENBLOOM J. (1983)

Immunological measurement of elastin-derived peptides in human serum.

Am. Rev. Respir. Dis., 127, S28-S30.

KUCICH U., CHRISTNER P., LIPPMANN M., KIMBEL P., WILLIAMS G., ROSENBLOOM J. et WEINBAUM G. (1985a)

Utilization of a peroxidase-antiperoxidase complex in an enzyme-linked immunosorbent assay of elastin-derived peptides in human plasma.

Am. Rev. Respir. Dis., 131, 709-713.

KUCICH U., ABRAMS W.R., ROSENBLOOM J. et WEINBAUM G. (1985b)

Immunological characterization of lung elastin derived peptides.

Am. Rev. Respir. Dis., 131, A62 (Abstract).

KUNITOMO M. et JAY M. (1985)

Elastin fragment-induced monocyte chemotaxis. The role of desmosines.

Inflammation, 9, 183-188.

LABELLA F.S. (1961)

Studies on the soluble products released from purified elastic fibers by pancreatic elastase.

Arch. Biochem. Biophys., 93, 72-79.

LAEMMLI U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.

Nature, 227, 680-685.

LANSING A.I., ROSENTHAL T.B., ALEX M. et DEMPSEY E.W. (1952)

The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and electron microscopy.

Anat. Rec., 114, 555-570.

LARGMAN C., BRODRICK J.W. et GEOKAS M.C. (1976)

Purification and characterization of two human pancreatic elastases.
Biochemistry, 15, 2491-2500.

LAURELL C.B. et ERIKSSON S. (1963)

The electrophoretical α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency.
Scand. J. Clin. Invest., 15, 132-140.

LEAKE D.S., HORNEBECK W., BRECHEMIER D., ROBERT L. et PETERS T.J. (1983)

Properties and subcellular localization of elastase-like activities of arterial smooth muscle cells in culture.
Biochim. Biophys. Acta, 761, 41-47.

LEFEVRE M. et RUCKER R.B. (1980)

Aorta elastin turnover in normal and hypercholesterolemic japanese quail.
Biochim. Biophys. Acta, 630, 519-529.

LEGRAND Y., PIGNAUD G., CAEN J.P., ROBERT B. et ROBERT L. (1975)

Separation of human blood platelet elastase and proelastase by affinity chromatography.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 224-231.

LENT R.W. et FRANZBLAU C. (1967)

Studies on the reduction of bovine elastin : evidence for the presence of delta 6,7-dehydrolysinonorleucine.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, 43-50.

LENT R.W., SMITH B., SALCEDO L.L., FARIS B. et FRANZBLAU C. (1969)

Studies on the reduction of elastin. II Evidence for the presence of alpha-amino adipic acid δ -semialdehyde and its aldol condensation product.
Biochemistry, 8, 2837-2845.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LUCEY E.C., STONE P.J., BREUER R., CHRISTENSEN T.G., CALORE J.D., CATANESE A., FRANZBLAU C. et SNIDER G.L. (1985)

Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamsters with "in vitro" observations on elastolysis by these enzymes.

Am. Rev. Respir. Dis., 132, 362-366.

MARTODAM R.R., BAUGH R.J., TWUMASI D.Y. et LIENER I.E. (1979)

A rapid procedure for the large scale purification of elastase and cathepsin G from human sputum.

Prep. Biochem., 9, 15-31.

MASON R.W., JOHNSON D.A., BARRETT A.J. et CHAPMAN H.A. (1986)

Elastinolytic activity of human cathepsin L.

Biochem. J., 233, 925-927.

MERRILL W.M., NAEGEL G.P., MATTHAY R.A. et REYNOLDS H.Y. (1980)

Alveolar macrophage-derived chemotactic factor.

J. Clin. Invest., 65, 268-276.

MILLER E.J., MARTIN G.R. et PIEZ K.A. (1964)

The utilization of lysine in the biosynthesis of elastin crosslinks.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 248-253.

MILLER E.J., PINNELL S.R., MARTIN G.R. et SCHIFFMANN E. (1967)

Investigation of the nature of the intermediates involved in desmosine biosynthesis.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, 132-137.

MOCZAR M. et ROBERT L. (1970)

Extraction and fractionation of the media of the thoracic aorta : isolation and characterization of structural glycoproteins.

Atherosclerosis, 11, 7-25.

MOCZAR M., MOCZAR E. et ROBERT L. (1979)

Peptides obtained from elastin by hydrolysis with aqueous ethanolic potassium hydroxide.

Connect. Tissue Res., 6, 207-213.

MORRISSEY J.H. (1981)

Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity.

Anal. Biochem., 117, 307-310.

MOSCHETTO Y., DEBACKER M., PIZIEUX O., BOUISSOU H., PIERAGGI M.T. et JULIAN M. (1974)

Evolution de l'élastine d'aortes humaines au cours du vieillissement.

Paroi Artérielle, 2, 161-177.

NAKAJIMA K., POWERS J.C., ASHE B.M. et ZIMMERMAN M. (1979)

Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the α_1 -protease inhibitor reactive site.

J. Biol. Chem., 254, 4027-4032.

NANKO H., JEPSEN L.V., ZACHARIAE H. et SOGAARD H. (1979)

Acquired cutis laxa (generalized elastolysis) : light and electron microscopic studies.

Acta Dermatovener, 59, 315-324.

NISHINO N. et POWERS J.C. (1980)

Pseudomonas aeruginosa elastase. Development of a new substrate, inhibitors and an affinity ligand.

J. Biol. Chem., 255, 3482-3486.

OHLSSON K. (1974)

Interaction between endogenous proteases and plasma proteases inhibitors in vitro and in vivo.

in Proceedings of the 2nd international research conference on proteinase inhibitors (Fritz H., Tschesche H., Greene L.J., Truscheit E., eds), pp. 96-105, Springer Verlag, New-York.

PARTRIDGE S.M., DAVIS H.F. et ADAIR G.S. (1955)

The chemistry of connective tissues. 2. Soluble protein derived from partial hydrolysis of elastin.

Biochem. J., 61, 11-21.

PARTRIDGE S.M. et DAVIS H.F. (1955)

The chemistry of connective tissues. 3. Composition of the soluble proteins derived from elastin.

Biochem. J., 61, 21-30.

PARTRIDGE S.M. (1963)

La nature chimique de l'élastine.

Exp. Ann. Biochimie Médicale, 24, 133-149, Masson, Paris.

PARTRIDGE S.M., ELDBEN D.F., THOMAS J., DORFMAN A., TELSER A. et HO P.L. (1966)

Incorporation of labelled lysine into the desmosine cross-bridges in elastin.

Nature, 209, 399-400.

PAZ M.A., HENSON E., BLUMENFELD O.O., SEIFTER S. et GALLOP P.M. (1971)

Dehydromerodesmosine and merodesmosine in elastin.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1518-1523.

PERRIE W.T. et PERRY S.V. (1970)

An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin.

Biochem. J., 119, 31-38.

PHAN DINH TUY B. et MOCZAR E. (1984)

Analysis of elastin peptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr., 291, 445-448.

REILLY C.F. et TRAVIS J. (1980)

The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases.

Biochim. Biophys. Acta, 621, 147-157.

REILLY C.F., FUKUNAGA Y., POWERS J.C. et TRAVIS J. (1984)

Effect of neutrophil cathepsin G on elastin degradation by neutrophil elastase.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365, 1131-1135.

REISFELD R.A., LEWIS U.J. et WILLIAMS D.E. (1962)

Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels.

Nature, 195, 281-283.

ROBERT B. et ROBERT L. (1969)

Determination of elastolytic activity with ^{125}I and ^{131}I labelled elastin.

Eur. J. Biochem., 11, 62-67.

ROBERT L. et POUILLAIN N. (1963)

Etudes sur la structure de l'élastine et le mode d'action de l'élastase. I. Nouvelle méthode de préparation de dérivés solubles de l'élastine.

Bull. Soc. Chim. Biol., 45, 1317-1326.

ROBERT B., SZIGETI M., DEROUETTE J.C., ROBERT L., BOUISSOU H. et FABRE M.T. (1971)

Studies on the nature of the "microfibrillar" component of elastic fibers.

Eur. J. Biochem., 21, 507-516.

RODRIGUEZ R.J., WHITE R.R., SENIOR R.M. et LEVINE E.A. (1977)

Elastase release from human alveolar macrophages : comparison between smokers and non-smokers.

Science, 198, 313-314.

ROSENBLOOM J. (1982)

Biosynthesis of soluble elastin in organ and cell culture.

Methods Enzymol., 82A, 716-731.

ROSENBLOOM J. (1984)

Biology of Disease. Elastin : relation of protein and gene structure to disease.

Lab. Invest., 51, 605-623.

ROSENBLOOM J. (1986)

Communication orale au 2nd international symposium on pulmonary emphysema and proteolysis.

Pasadena (USA), 14-16 janvier.

ROSS R., FIALKOW P.J. et ALTMAN L.K. (1978)

Fine structure alterations of elastic fibers in pseudoxanthoma elasticum.

Clin. Genet., 13, 213-223.

RUCKER R.B. et DUBICK M.A. (1984)

Elastin metabolism and chemistry : potential roles in lung development and structure.

Environ. Health Perspectives, 55, 179-191.

SANDBERG L.B., WEISSMAN N. et SMITH D.W. (1969)

The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from copper-deficient porcine aorta.

Biochemistry, 8, 2940-2945.

SANDBERG L.B., WEISSMAN N. et GRAY W.R. (1971)

Structural features of tropoelastin related to the sites of cross-links in aortic elastin.

Biochemistry, 10, 52-56.

SANDBERG L.B., LESLIE J.G., LEACH C.T., ALVAREZ V.L., TORRES A.R. et SMITH D.W. (1985)

Elastin covalent structure as determined by solid phase amino acid sequencing.

Path. Biol., 33, 266-274.

SANDBERG L.B., WOLT T.B. et LESLIE J.G. (1986)

Quantitation of elastin through measurement of its pentapeptide content.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 136, 672-678.

SEATON A. (1983)

Coal and the lung.

Thorax, 38, 241-243.

SENIOR R.M., GRIFFIN G.L. et MECHAM R.P. (1980)

Chemotactic activity of elastin derived peptides.

J. Clin. Invest., 66, 859-862.

SENIOR R.M., GRIFFIN G.L. et MECHAM R.P. (1982)

Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin derived peptides.

J. Clin. Invest., 70, 614-618.

SENIOR R.M., GRIFFIN G.L., MECHAM R.P., WRENN D.S., PRASAD K.U. et URRY D.W. (1984)

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes.

J. Cell. Biol., 99, 870-874.

SHEPPARD D., YEUNG M., RYLANDER R. et BECKLAKE M.R. (1985)

Mechanisms of airway responses to occupational and environmental agents.

Am. Rev. Respir. Dis., 132, 1335-1336.

SHOTTON D.M. (1970)

Elastase.

Methods Enzymol. XIX, 113-140.

SMITH D.W., WEISSMAN N. et CARNES W.H. (1968)

Cardiovascular studies on copper deficient swine. XII. Partial purification of a soluble protein resembling elastin.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 309-315.

SNIDER G.L., KLEINERMAN J., THURLBECK W.M. et BENGALI Z.H. (1985)

The definition of emphysema.

Am. Rev. Respir. Dis., 132, 182-185.

STARCHER B.C., PARTRIDGE S.M. et ELSDEN D.F. (1967)

Isolation and partial characterization of a new amino acid from reduced elastin.

Biochemistry, 6, 2425-2432.

STARCHER B.C. et GALIONE M.J. (1976)

Purification and comparison of elastins from different animal species.

Anal. Biochem., 74, 441-447.

STARCHER B.C. (1986)

Elastin and the lung.

Thorax, 41, 577-585.

STARKEY P.M. et BARRETT A.J. (1976)

Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G.

Biochem. J., 155, 255-263.

STARKEY P.M. (1980)

The role of cellular elastases in inflammation.

in Frontiers of Matrix Biology, (Robert A.M., Robert L. eds) Vol. 8, pp. 188-198, Karger, Bâle.

SYKES B.C. et PARTRIDGE S.M. (1972)

Isolation of a soluble elastin from lathyritic chicks.

Biochem. J., 130, 1171-1172.

THOMAS J. et PARTRIDGE S.M. (1960)

The chemistry of connective tissues. 5. The elastase activity of proteolytic enzymes.

Biochem. J., 74, 600-607.

THOMAS J., ELSDEN D.F. et PARTRIDGE S.M. (1963)

Degradation products from elastin. Partial structure of two major degradation products from the cross-linkages in elastin.

Nature, 200, 651-652.

THOMAS J. (1971)

The isolation and composition of cross-linked peptides following enzymic hydrolysis of elastin.

Int. J. Biochem., 2, 644-650.

TRAVIS J., BAUGH R., GILES P.J., JOHNSON D., BOWEN J. et REILLY C.F. (1978)

Human leukocyte elastase and cathepsin G : isolation, characterization and interaction with plasma proteinase inhibitors.

in Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes (Havemann K. and Janoff A. eds) pp. 118-128, Urban and Schwarzenberg, Inc. Baltimore-Munich.

TRAVIS J. et SALVESEN G.S. (1983)

Human plasma proteinase inhibitors.

Ann. Rev. Biochem., 52, 655-709.

TURINO G.M. (1985)

The lung parenchyma. A dynamic matrix.
Am. Rev. Respir. Dis., 132, 1324-1334.

UITTO J. (1979)

Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases.
J. Invest. Dermatol., 72, 1-10.

VERED M., BURSTEIN Y. et GERTLER A. (1985)

Digestion of elastin by porcine pancreatic elastase I and elastase II.
Int. J. Peptide Protein Res., 25, 76-84.

WEISSMAN N., SHIELDS G.S. et CARNES W.H. (1963)

Cardiovascular studies on copper-deficient swine : IV content and solubility of the aortic elastin, collagen and hexosamine.
J. Biol. Chem., 238, 3115-3118.

YASUTAKE A. et POWERS J.C. (1981)

Reactivity of human leukocyte elastase and porcine pancreatic elastase toward peptide-4-nitroanilides containing model desmosine residues. Evidence that human leukocyte elastase is selective for cross-linked regions of elastin.
Biochemistry, 20, 3675-3679.

YATCO-MANZO E. et WHITAKER J.R. (1962)

Ficin-catalyzed hydrolysis of elastin.
Arch. Biochem. Biophys., 97, 122-127.

YOON K., MAY M., GOLDSTEIN N., INDIK Z., OLIVER L., BOYD C. et ROSENBLOOM J. (1984)

Characterization of a sheep elastin cDNA clone containing translated sequences.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 118, 261-269.

YOON K., DAVIDSON J.M., BOYD C., MAY M., LUVALLE P., ORNSTEIN-GOLDSTEIN N., SMITH J., INDIK Z., ROSS A., GOLUB E. et ROSENBLOOM J. (1985)

Analysis of the 3' region of the sheep elastin gene.
Arch. Biochem. Biophys., 241, 684-691.

RESUME

Une mise au point bibliographique rappelle les connaissances actuelles sur l'élastine.

Une protéolyse de l'élastine pulmonaire étant constatée durant le processus qui conduit à l'emphysème, la dégradation de l'élastine pulmonaire humaine par les enzymes leucocytaires a été entreprise "in vitro" dans le but de caractériser des produits de digestion susceptibles d'être mis en évidence dans les liquides biologiques.

L'élastine pulmonaire d'un sujet âgé et celle de poumons de nouveau-nés ont été préparées et soumises à des études de solubilisation par l'élastase et la cathepsine G leucocytaires. Les fragments solubles ont été caractérisés.

Les fragments provenant de l'élastine d'adulte présentent un caractère acide en isoélectrofocalisation. La gel-filtration sépare deux fractions : l'une (F_1A) de taille élevée (M_r 100 000 - 20 000), l'autre (F_2A) de taille réduite (M_r 6 000 - 3 000). Seule la fraction F_1A contient des liaisons croisées de type desmosine. L'analyse des fractions séparées ensuite en HPLC montre que l'action de l'élastase leucocytaire sur la préparation d'élastine adulte s'exerce de préférence dans les régions hydrophobes de la molécule éloignées des liaisons croisées.

Les produits de digestion par l'élastase leucocytaire de l'élastine de nouveau-nés sont caractérisés par l'absence de fragments de taille moléculaire élevée et par la présence de liaisons croisées même dans les fragments de $M_r < 6 000$. L'élastase leucocytaire agit donc de manière différente et plus uniformément sur l'élastine de nouveau-nés que sur l'élastine d'adulte. L'hypothèse d'un processus de réparation en réponse à diverses agressions au cours de la vie d'un sujet adulte a été envisagée.

