

50376
1989
281

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

50376
1989
281

ANNÉE 1989

N° d'ordre 441

**THÈSE
DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ**

présentée à
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par
Michel CREPIN

**MISE EN ÉVIDENCE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE
L'AXE PEPTIDIQUE DES MUCINES
TRACHÉOBRONCHIQUES HUMAINES**



Présentée le 14 Décembre devant la Commission d'examen :

JURY

Président : Professeur André VERBERT
Rapporteurs : Professeur Philippe ROUSSEL
Professeur Steven BALL
Examineurs : Professeur Pierre LOUISOT
Professeur Pierre DEGAND
Docteur Jean-Pierre AUBERT

A LA MEMOIRE DE MON PERE

TON SOUVENIR DEMEURE

A MA MERE

A MA FEMME

A TOUTE MA FAMILLE

Ce travail a fait l'objet de publications et de communications.

PUBLICATIONS

Diversity of the peptide moiety of human mucins (1989), *Biorheology*, sous presse.

M. CREPIN, N. PORCHET, J.P. AUBERT, P. DEGAND

Evidence for different tracheal mucin peptides as deduced from nucleotide cDNAs sequences (1989), *J. Biol. Chem.*, soumis à publication.

J.P. AUBERT, N. PORCHET, M. CREPIN, M. DUTERQUE-COQUILLAUD, G. VERGNES, M. MAZZUCA, B. DEBUIRE, D. PETITPREZ, P. DEGAND

COMMUNICATIONS

a) 2ème Séminaire fondamental de Gastro-Entérologie, Clermond-Ferrand, 3 et 4 Décembre 1987

Biologie moléculaire : Perspectives, diagnostics et pronostics

M. CREPIN, N. PORCHET, J.P. AUBERT, P. DEGAND.

b) Seventh International Congress of Biorheology, Nancy, France, 18-23 Juin 1989, 26, 511

cDNAs coding for human tracheal mucins : characterization by immunohistochemistry and DNA sequences

J.P. AUBERT, N. PORCHET, M. CREPIN, G. VERGNES, P. DEGAND.

Ce travail a été effectué au sein de l'Unité des Protéines Normales et Pathologiques (Unité INSERM N°16), dirigée par Monsieur le Professeur P. DEGAND, sous la responsabilité scientifique de Messieurs J.P. AUBERT et P. DEGAND.

Il a bénéficié

de la collaboration du service du Docteur B. DEBUIRE de l'Unité INSERM N°124 (Expression des Gènes et Cancérogénèse Chimique).

de la collaboration de Monsieur le Professeur M. MAZZUCA du Laboratoire de Microscopie Electronique de la Faculté de Médecine de LILLE.

Cette thèse a bénéficié des aides financières

* de l'UER de Médecine de l'Université Droit et Santé

* du contrat de l'Association pour la Recherche contre le Cancer n°6780

* de la Fondation pour la Recherche Médicale.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Professeur P. ROUSSEL, qui m'a permis de travailler au sein de l'Unité INSERM N°16 pendant la préparation de mon DEA et de cette thèse.

Je tiens également à remercier

Monsieur le Professeur P. DEGAND, qui m'a accueilli dans son laboratoire et conduit depuis le DEA dans cette modeste approche du travail de recherche

Monsieur le Professeur A. VERBERT, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Ses qualités scientifiques et la clarté de son enseignement ont toujours provoqué mon admiration et m'ont appris à aimer la Biochimie au cours de mes études en Faculté des Sciences. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur P. LOUISOT qui me fait l'honneur d'être membre de ce jury de thèse. Son autorité scientifique, sa personnalité me font réclamer son indulgence dans l'appréciation de ce travail.

Monsieur le Professeur S. BALL qui m'a toujours accueilli avec gentillesse et compréhension et qui me fait l'honneur de juger cette thèse.

Ce travail doit beaucoup à

Madame le Docteur N. PORCHET qui, depuis mon DEA et durant toutes ces années de préparation de thèse, a su m'apporter conseils et encouragements

Monsieur le Docteur J.P. AUBERT, pour ses conseils, ses qualités humaines et scientifiques et l'attention avec laquelle il a suivi le déroulement de ce travail

Qu'ils soient tous deux assurés de ma profonde reconnaissance.

J'exprime toute ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation de cette thèse

Monsieur le Professeur M. MAZZUCA et Madame BAHEUX du Laboratoire de Microscopie Electronique de la Faculté de Médecine de LILLE II, pour le travail d'immunohistochimie

Madame le Docteur M. DUTERQUE-COQUILLAUD et Monsieur C. DENIS, pour les séquences nucléotidiques

Monsieur C. VANDEPERRE, pour la qualité des illustrations photographiques

Madame F. ROUSSEZ, qui a dactylographié cette thèse.

Madame D. PETITPREZ m'a toujours apporté une aide technique efficace, qu'elle en soit vivement remerciée.

Mes sincères remerciements vont également à chacun des membres de l'équipe pour leur collaboration.

Je voudrais ajouter que ce travail n'aurait pu se faire sans la compréhension et l'amitié de l'ensemble du personnel du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital C. HURIEZ. Mes collègues et amis des secteurs de l'Urgence et des Analyses Spécialisées ont supporté avec gentillesse et patience mon éloignement fréquent. Je tiens à leur exprimer mon profond attachement.

Monsieur le Professeur P. DEGAND, Directeur de ce Laboratoire, m'a sans cesse soutenu. Sa confiance et son dynamisme ont été pour moi source de perpétuelle motivation. Qu'il en soit ici remercié.

Technicien de laboratoire du Centre Hospitalier de LILLE, affecté depuis le 1er Février 1979 dans le service de Biochimie de l'Hôpital Claude HURIEZ, j'ai bénéficié, de la part de l'Administration Générale du Centre Hospitalier, de la part des membres et collègues du laboratoire dont je fais partie, de facilités qui m'ont permis

* de 1979 à 1981, de compléter mon grade initial de technicien supérieur (IUT de Biologie Appliquée de Lille, en 1978) par une licence et bientôt par une maîtrise de Biochimie avec la mention "bien"

* de 1982 à 1983, de suivre l'enseignement théorique et pratique du DEA de Biochimie et d'obtenir le diplôme avec la mention "très bien"

* de 1983 à 1989, de préparer une thèse de doctorat en Biochimie à l'Unité INSERM N°16.

Je voudrais remercier en particulier

* Monsieur A. SEGOND, Directeur Général du Centre Hospitalier Régional de Lille

* Monsieur F. GRATEAU, Directeur Général Adjoint qui, lorsqu'il était Directeur des Laboratoires, m'a toujours permis de poursuivre ce long travail dans les meilleures conditions

* Monsieur A. HOUTTEMANE, Directeur de la Pharmacie Centrale et ex-Directeur des Laboratoires qui, à la suite de Monsieur GRATEAU, a encouragé la poursuite de ce travail

* Madame C. MARTIN-LE RAY, Directeur des Laboratoires et de l'Imagerie Médicale, dont la compréhension m'a permis de mener cette thèse à terme.

°00°

TABLE DES MATIERES

°00°

INTRODUCTION.....	page	1
CHAPITRE I : DEFINITION GENERALE DES MUCINES.....	page	3
I - ELEMENTS DE STRUCTURE DES MUCINES.....	page	4
A - Isolement et purification des mucines bronchiques.....	page	4
B - Poids moléculaire des mucines.....	page	5
C - Composition en acides aminés des mucines.....	page	9
1 - Les acides aminés hydroxylés.....	page	10
2 - Les acides aminés dicarboxyliques.....	page	10
3 - Les acides aminés soufrés.....	page	13
4 - Les acides aminés basiques.....	page	13
5 - Le tryptophane.....	page	13
D - Acides aminés N-terminaux et séquences partielles de mucines	page	14
1 - Acide aminé N-terminal et séquence N-terminale de mucines purifiées.....	page	14
2 - Acides aminés N-terminaux de glycopeptides de mucines..	page	14
E - La copule glycanique des mucines.....	page	15
1 - Le "core" des O-glycannes.....	page	22
2 - Le squelette des O-glycannes.....	page	23
3 - La périphérie des O-glycannes.....	page	23
II - CONCEPT GENERAL DE L'ORGANISATION DES MUCINES.....	page	25
A - Données de la microscopie électronique.....	page	25
B - Données de l'analyse de l'axe peptidique des mucines.....	page	25
C - Modèles moléculaires proposés pour les mucines.....	page	26
CHAPITRE II : SEQUENCE PEPTIDIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES : APPROCHE BIOCHIMIQUE.....	page	32
I - DEGLYCOSYLATION PAR OXYDATION PERIODIQUE.....	page	32

A - Etude des glycopeptides de DAU.....	page	32
B - Etude des glycopeptides de LER.....	page	35
II - DEGLYCOSYLATION DES MUCINES A L'AIDE DE L'ACIDE FLUORORHYDRIQUE (HF) OU DE L'ACIDE TRIFLUOROMETHANE SULFONIQUE (TFMS).....	page	37
A - Mode d'action de ces acides.....	page	38
1 - Coupure au niveau des résidus de méthionine.....	page	38
2 - Modification des résidus de sérine et de thréonine.....	page	39
3 - Coupures par hydrolyse acide.....	page	40
B - Déglycosylation des mucines.....	page	41
1 - Déshydratation initiale des glycopeptides : qualité/rendement.....	page	44
2 - La température de déglycosylation et le temps de contact.....	page	46
3 - Rapport matériel glycopeptidique : agent de déglycosylation (TFMS).....	page	49
4 - Conditions d'élimination de l'anisole.....	page	49
5 - Neutralisation et dessalage.....	page	49
C - Analyse des produits de déglycosylation.....	page	52
1 - Analyse en gel de polyacrylamide.....	page	52
2 - Traitement alcalin.....	page	53
III - ETUDE COMPARATIVE DE LA DEGLYCOSYLATION DES SOUS-POPULATIONS GLYCOPEPTIDIQUES DE MUCINES DANS LES CONDITIONS STANDARDS.....	page	53
A - La fraction éluée par le NaCl 0,01M.....	page	56
B - La fraction éluée par le NaCl 0,1M.....	page	56
C - La fraction éluée par le NaCl 0,3M.....	page	59
D - La fraction éluée par le NaCl 0,5M dite "0,5Ma".....	page	59
E - La fraction éluée par le NaCl 0,5M dite "0,5Mb".....	page	60

F - La fraction éluée par le NaCl 0,7M.....	page	60
G - Conclusion.....	page	60
IV - TENTATIVES D'AMELIORATION DU POURCENTAGE DE DEGLYCOSYLATION AVEC RESPECT DE L'INTEGRITE PEPTIDIQUE.....	page	61
A - Utilisation d'un autre piège.....	page	61
B - Délipidation préalable.....	page	63
C - Utilisation de détergents.....	page	65
D - Association de la délipidation et des détergents.....	page	68
E - Association de la phénylalanine et des détergents.....	page	68
V - SEQUENCES AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DEGLYCOSYLES.....	page	71
VI - DEFINITION DE SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES ET IMMUNOLOGIQUES EN VUE D'UNE APPROCHE PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	page	72
A - Sondes oligonucléotidiques.....	page	72
B - Sondes immunologiques.....	page	74
1 - Obtention de l'immunsérum.....	page	74
2 - Caractérisation des antisera.....	page	74
VII- CONCLUSION.....	page	80
A - Les aspects négatifs.....	page	80
B - Les aspects positifs.....	page	81
CHAPITRE III : SEQUENCE PEPTIDIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES : APPROCHE PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	page	83
I - INTRODUCTION.....	page	83

A - Dans le cadre biochimique.....	page	83
1 - Anticorps monoclonaux.....	page	83
2 - Anticorps polyclonaux.....	page	85
B - Dans le cadre de la biologie moléculaire.....	page	85
1 - Anticorps monoclonaux.....	page	85
2 - Anticorps polyclonaux.....	page	86
II - STRATEGIES.....	page	86
A - Préparation des sondes nucléotidiques.....	page	86
B - Préparation des sondes immunologiques.....	page	87
C - Préparation d'ARN messagers.....	page	87
1 - Homogénéisation du matériel biologique.....	page	87
2 - Isolement des ARN cellulaires totaux.....	page	87
3 - Purification des ARN poly A ⁺	page	88
4 - Problèmes posés par l'intégrité des ARN poly A ⁺	page	88
- Critères physico-chimiques.....	page	88
- Critères biologiques.....	page	88
D - Obtention d'une banque d'ADNc.....	page	89
1 - Synthèse des ADNc.....	page	89
a) Principe.....	page	89
b) Aspects méthodologiques.....	page	92
2 - Analyse électrophorétique des ADNc synthétisés.....	page	92
E - Réalisation de banques d'ADNc en bactériophage.....	page	95
1 - Aspects généraux.....	page	96
2 - Aspects technologiques : Modification des ADNc		
pour l'insertion dans le bactériophage.....	page	97
a) Méthylation des ADNc.....	page	97
b) Ligation d'oligonucléotides de liaison EcoRI aux ADNc.....	page	97
c) Préparation des ADNc possédant un seul site EcoRI à		
chaque extrémité.....	page	97
d) Séparation des ADNc de l'excès d'adaptateurs.....	page	97
e) Insertion des ADNc dans le bactériophage λ gt10		
ou λ gt11.....	page	97

f) Encapsidation des recombinants ADNc- λ gt10 et ADNc- λ gt11.....	page 99
g) Etalement sur milieu de culture solide.....	page 99
III - RESULTATS.....	page 99
A - Banque d'ADNc en bactériophages λ gt10 ou λ gt11.....	page 99
B - Criblage d'une banque d'ADNc de trachée de porc à l'aide de la sonde oligonucléotidique.....	page 101
C - Criblage d'une banque d'ADNc de muqueuse trachéale humaine en bactériophage λ gt11 par les sondes immunologiques.....	page 102
1 - Principe.....	page 102
2 - Résultats.....	page 103
D - Etude immunohistochimique.....	page 103
E - Séquence nucléotidique.....	page 106
1 - Principe.....	page 106
2 - Résultats de séquence.....	page 106
F - Hétérogénéité peptidique.....	page 119
IV - CONCLUSION.....	page 120
CONCLUSION GENERALE.....	page 122
APPENDICE TECHNIQUE	
BIBLIOGRAPHIE	

°00°

ABBREVIATIONS

°00°

ADNc	ADN complémentaire des ARN messagers du tissu considéré
ARNm	ARN messenger
ATZ	2-anilino-5-thiazolinones
BAL	dimercapto-2-3-propanol-1
Bet	bromure d'éthidium
BME	β mercapto-éthanol
BHL	balance hydrophile-lipophile
CMC	concentration micellaire critique
cpm	coups par minute
dCTP	deoxy-cytidine-triphosphate
DEAE	diéthyl-amino-éthyl
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DMSO	diméthyl sulfoxyde
dNMP	deoxy-nucléotide-monophosphate
dNTP	deoxy-nucléotide-triphosphate
DO	densité optique
DTT	dithiothreitol
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
GTE	glucose-tris-EDTA
HFBA	acide heptafluorobutyrique
hfl	"high frequency lysogeny"
HF	acide fluorhydrique
HPRI	"human placental ribonuclease inhibitor"
HTC	hexamine trifluorure de Cobalt
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyrannoside
KAC	acétate de potassium
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
LB	Luria Bertani
MES	Acide 2 [N-morpholino]-éthane sulfonique
Milieu TMN	tris magnésium NaCl
Milieu TFB	"transformation buffer"
MOPS	acide-3-[N-morpholino]-propane sulfonique
NP40	Nonidet P-40

PEG	poly-éthylène glycol
PITC	phénylisothiocyanate
PTH	phényl thiohydantoine
RAV-2	"roux associated virus-2"
SDS	sodium dodecyl sulfate
SVF	sérum de veau foetal
Tampon GT	thiocyanate de guanidinium
Tampon SSC	citrate de sodium
Tampon STE	sodium-tris-EDTA
Tampon TBE	tris-borate-EDTA
Tampon TBS	"tris buffer saline"
Tampon TE	tris-EDTA
Tampon TMG	tampon magnésium-gélatine
TFMS	acide trifluorométhane sulfonique
Tris	tris-(hydroxy méthyl) aminométhane
Triton X100	isooctylphénoxy polyéthoxyéthanol
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyrannoside

°00°

I N T R O D U C T I O N

°00°

Les mucines, tant au plan quantitatif que qualitatif, représentent un constituant important des sécrétions qu'il s'agisse de produits d'origine respiratoire, digestive ou génitale. Le mucus, par sa composition, par ses propriétés physiques, assume de nombreuses fonctions d'intérêt local ou général. Au niveau de l'arbre respiratoire par exemple, la fonction muco-ciliaire dépend certes de l'intégrité des cellules de surface de la muqueuse mais aussi d'une définition biochimique, physique, précise et spécifique du mucus trachéo-bronchique. Toute modification par rapport à cet équilibre sécrétoire aura donc des conséquences et c'est bien ce que l'on observe dans la pathologie où stase du mucus, infection, dégradation de la muqueuse, sont les éléments séméiologiques d'une bronchite.

Les sécrétions sont des mélanges complexes où ont été caractérisés de nombreux composants, mais sans conteste, les mucines représentent par leur nature, leur structure, l'élément fondamental et original de cette sécrétion. On peut toutefois en donner une définition biochimique générale. Ce sont :

- des molécules de grande taille moléculaire pouvant atteindre plusieurs millions de daltons.

- des glycoprotéines fortement glycosylées où la copule osidique représente 70 à 90 % de la molécule (FELDHOF et coll, 1979 ; BHASKAR et coll, 1981) (43,13).

- des glycoprotéines dont l'axe peptidique possède une composition très originale où les hydroxyamino-acides interviennent pour environ 30 à 40 % et où est aussi à signaler la prédominance de trois autres résidus d'acides aminés : la proline, l'alanine et la glycine (20 à 25 %).

Très vite le concept de "répétitions" d'acides aminés ou même "d'unités répétitives" de séquences très homologues, représentatives de "domaines" a été évoqué (PIGMAN et coll, 1973 ; TIMPTE et coll, 1988) (139,186).

Toutefois les difficultés de purification et d'étude de ces glycoprotéines ont été un facteur limitant pour affirmer définitivement ou infirmer ces hypothèses. De même la notion de "structuration", "d'assemblage" d'unités simples par association non covalente ou par liaison covalente connue (pont disulfure) ou à découvrir, a été retenue pour intégrer les hauts poids moléculaires des mucines. De multiples propositions de modèles ont été avancées. Certaines apparaissent en relation avec l'origine tissulaire des mucines, d'autres avec leurs fonctions biologiques, d'autres enfin avec leur glycosylation.

Il est généralement admis qu'un squelette peptidique de mucines serait une alternance plus ou moins régulière de "touffes de glycosylation" et de "zones nues" dont la signification, la fonction ne sont pas établies.

Il reste que la partie glycanique des mucines est capitale et présente un rôle majeur support de la notion, pour ces glycoprotéines, de résine biologique ; de support sérologique ; d'haptène ; d'élément bactériostatique (RAMPHAL et PYLE, 1983) (144) ; de treillis moléculaire ; d'anti-enzyme ; de transporteur protéique, peptidique, lipidique, etc (LE TREUT, 1983) (108). Connaître mieux l'axe peptidique permettrait de mieux comprendre encore la relation structure / fonction de ces entités moléculaires.

Aborder ce sujet par la biologie cellulaire et moléculaire, ce serait, en cas de réussite, aller vers le gène et les mécanismes d'expression et de régulation de la biosynthèse des mucines.

Notre travail, malgré les difficultés techniques prévisibles, a été orienté vers la définition de l'axe peptidique des mucines.

Notre mémoire est articulé en trois parties :

- Une première partie où sont rappelés les points importants de la biochimie des mucines

- Une seconde partie expose les étapes de notre approche biochimique, à savoir l'obtention de glycopeptides de mucines trachéo-bronchiques ; leur déglycosylation ; les tentatives de séquence par la méthode de Edman de ce matériel et l'obtention d'anticorps polyclonaux par injection des préparations chez le lapin.

- Une troisième partie est consacrée à l'apport de la biologie moléculaire : la préparation d'ARN messager et celle d'ADN complémentaires de ces ARNm de muqueuse trachéo-bronchique humaine.

°00°

CHAPITRE I :

DEFINITION GENERALE DES MUCINES

°00°

Les mucines trachéo-bronchiques tirent leur origine de deux types cellulaires. Les cellules muqueuses, partie constituante de glandes mixtes trachéobronchiques, d'une part, et, d'autre part, les cellules caliciformes qui, avec les cellules ciliées, constituent le revêtement de surface de la muqueuse. Les mucines, rejetées dans la lumière, participent au film de mucus qui, en situation physiologique, tapisse l'arbre trachéobronchique.

Il n'est pas possible directement de distinguer les mucines en fonction de leur origine cellulaire. Leur classification est donc généralement en relation avec leur nature biochimique.

Les mucines se définissent comme des glycoprotéines de très haute masse moléculaire (supérieure à 10^6 daltons). Ce sont des O-GLYCOPROTEINES. En effet, plusieurs centaines de chaînes oligosaccharidiques sont reliées à l'axe peptidique par une liaison de type O-glycosidique impliquant la fonction hémiacétalique de la N-acétylgalactosamine et la fonction alcoolique de résidus de sérine ou de thréonine.

La partie glycanique représente 70 à 90% de la mucine : elle est constituée d'assemblages osidiques composés de résidus d'hexosamine (N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine), d'hexoses (galactose), de fucose, d'acide N-acétylneuraminique. Des résidus de sulfate peuvent substituer les chaînes glycaniques.

C'est en fonction de leur caractère anionique relatif que l'on a pu retenir la terminologie de mucines "neutres", faiblement acides ou très acides. Une autre écriture est également utilisée. Elle retient les termes de "fucomucines", "sialomucines" ou "sulfomucines". En fait, ces termes ne peuvent rendre compte du détail structural des mucines et peuvent être considérés comme "excessifs" du fait de l'extrême hétérogénéité des glycanes substituant leur axe peptidique.

Ainsi l'élément majeur définissant ce groupe de glycoprotéines est-il représenté par la notion de liaison O-glycosidique sensible aux agents alcalins. L'utilisation de ces agents a été le véritable point de départ des recherches structurales sur la partie glycanique des mucines, puisque la réaction de β -élimination suivie d'une réduction peut libérer les glycanes de l'axe peptidique (CARLSON, 1968 ; GINSBURG et coll, 1969 ; KORNFELD et coll, 1976) (22,47,94).

Quant à la partie peptidique, c'est plus récemment que les techniques de déglycosylation utilisant l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique ont rendu possible une approche, bien que limitée, de l'étude de l'axe peptidique (LENARD, 1969 ; EDGE et coll, 1981) (106,40).

I - ELEMENTS DE STRUCTURE DES MUCINES

Une étape essentielle avant la recherche structurale a consisté en la mise en place d'un protocole de préparation, d'isolement et de purification des mucines.

A - Isolement et purification des mucines bronchiques

Les mucines bronchiques ont été isolées et purifiées à partir de différentes sécrétions provenant de sujets sains ou de pathologies diverses. La recherche d'un matériel physiologique a conduit à l'utilisation de sécrétions provenant d'aspirations trachéales sous bronchofibroscopie (SACHDEV et coll, 1980) (156), d'aspirations par l'orifice d'une trachéotomie (SNYDER et coll, 1982a) (175), par lavages bronchoalvéolaires (LAFITTE et coll, 1977) (97). Certains auteurs (DEGAND et coll, 1973a, 1973b, 1974) (31,32,34) ont utilisé le contenu de kystes bronchogéniques comme matériel de référence de normalité.

Le plus souvent, les exigences en quantité de matériel ont amené les auteurs à recueillir les expectorations de sujets hypersécrétants présentant des états pathologiques tels que la bronchite chronique, l'asthme ou la mucoviscidose...

Les sécrétions sont congelées très rapidement après leur recueil et conservées à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation, ceci afin de limiter l'action de protéases, de glycosidases qui pourraient dégrader les mucines avant leur traitement.

Les mucus avant purification des mucines doivent être solubilisés. Cette étape nécessite des choix techniques importants qui influencent la qualité des mucines et surtout la conservation ou non de leur état natif. L'action d'enzymes protéolytiques a été proposée (ROUSSEL et coll, 1976) (155). Des agents réducteurs, tels que la N-acétyl cystéine ou le β -mercaptoéthanol ont été largement utilisés (ROBERTS, 1976) (148). Des méthodes physiques comme

la solubilisation des gels par dilution et agitation en sérum physiologique (HAVEZ et coll, 1967) (63) ou la sonication (SACHDEV et coll, 1980) (156) ont aussi été préconisées. Des agents dissociants, tels que l'urée, la guanidine, le SDS ont été à la base de protocoles de solubilisation des sécrétions (ROBERTS, 1974 ; WHITNEY et coll, 1978) (147,193). Il apparaît aujourd'hui que les méthodes de dilution seraient les plus fiables.

La purification des mucines a en général nécessité l'association de différentes étapes faisant appel à la chromatographie (gel perméation, échange ionique) mais aussi à la centrifugation isopycnique en gradient de densité de sels de césium (CREETH et coll, 1977) (28). D'autres techniques, telles que la précipitation au point isoélectrique, la précipitation par le cétavlon (TETTAMANTI et coll, 1968) (184) ; la dansylation (TABAK et coll, 1982) (182) sont plus anciennes et aujourd'hui peu utilisées.

L'état de pureté des préparations obtenues est testé par électrophorèse réalisée en gel d'agarose, l'électrophorégramme étant révélé par différents colorants tels que : le réactif de SCHIFF (après oxydation periodique (PAS) ; le bleu de toluidine. L'affinité des mucines pour ces deux colorants atteste de leur caractère glycoprotéique et de leur degré d'acidité relatif.

B - Poids moléculaire des mucines

Les éléments contenus dans la littérature quant à l'estimation de la masse moléculaire des mucines, apportent des résultats très différents, selon les auteurs, selon les techniques utilisées mais aussi selon le protocole de purification retenu.

On sait en effet que les mucines dans les sécrétions représentent un assemblage associatif avec nombre de constituants aussi variés que des protéines, des glycoprotéines (protéines sériques, telles que la sérum-albumine ; des immunoglobulines A sériques 7 S et sécrétoires 11 S (HARBITZ et coll, 1980 ; HAYEM et DEGAND, 1980 ; KOTLAR et coll, 1980 ; STOCKLEY et BURNETT, 1980) (59,65,95,179), des acides nucléiques (PICOT et coll, 1978) (137) et des composants de faible poids moléculaire tels que les polypeptides riches en proline ou P.R.P. (BAILLEUL et coll, 1977 (8)), les lipides, les glycolipides en quantités importantes en cas de surinfection (HOUDRET et coll, 1986) (78).

D'autres éléments jouent aussi un rôle considérable (JONES et REID, 1978) (86) :

- des composants d'origine plasmatique tels que l'eau, les électrolytes
- et surtout les phospholipides, dont le surfactant produit par les pneumocytes de type II des alvéoles pulmonaires et les cellules de CLARA à l'extrémité des bronchioles.

A l'énumération de tous ces constituants, on mesure la difficulté d'obtenir des préparations de mucines satisfaisantes, homogènes où tout contaminant serait éliminé.

Il n'est pas non plus négligeable de considérer en fonction de la présence d'un grand nombre d'enzymes la possibilité de voir la dégradation des mucines avant purification, dégradation pouvant intervenir tant au niveau de leur copule glucidique qu'au niveau de leur axe peptidique.

Nous avons rassemblé (Tableaux n°1 et 2) les résultats les plus significatifs au regard :

- de l'origine normale ou pathologique des sécrétions à partir desquelles les mucines ont été purifiées
- des méthodes de solubilisation du mucus : par des agents dissociants, réducteurs, chaotropiques ou protéolytiques
- des méthodes de purification des mucines : ultracentrifugation, sédimentation à l'équilibre, gel perméation, précipitation par des solvants organiques, précipitation au point isoélectrique, précipitation par formation de complexes avec des ammonium-quaternaires.

De l'ensemble des données, nous retenons :

- que les techniques non dégradantes de solubilisation des mucines donnent en règle générale les masses moléculaires les plus élevées (CREETH et coll, 1977 ; FELDHOFF et coll, 1979) (28,43).
- que l'utilisation d'agents dissociants respecte semble-t-il l'intégrité des mucines et leur taille : l'urée 6M (JENSSEN et coll, 1980 ; ROBERTS et coll, 1974) (84,144) ou 8M (HILL et coll, 1977a) (74) ; le chlorhydrate de guanidine 6M (CARLSTEDT et coll, 1983) (24) ; le SDS 1% (MANTLE et coll, 1981) (116).
- enfin, que la protéolyse ou les agents réducteurs donnent des masses moléculaires beaucoup plus faibles (DEGAND et coll, 1973a, 1973c ; LHERMITTE et coll, 1976 ; ROUSSEL et coll, 1976 ; LAMBLIN et coll, 1979) (31,33,109, 155,99).

Tableau n°1 : Estimations de masses moléculaires de mucines trachéobronchiques humaines de sécrétions normales ou pathologiques

REFERENCES	ORIGINE DE LA MUCINE	AGENT DE SOLUBILISATION:	AGENT MUCOLYTIQUE	METHODE DE MESURE	MASSE MOLECULAIRE (DALTONS)
DEGAND et coll (1973a.c) (31,33) HAVEZ et coll (1973) (64)	Divers états d'hyper sécrétion bronchique	-	Réduction. 4h 37°C: βmercapto. 1%(v/v):	Ultracentrifugation:	400 à 600000
ROBERTS (1974) (147)	Bronchite chronique	-	Urée 6 M	Sédimentation à l'équilibre	1,28.10 ⁶
ROUSSEL et coll (1976) (155)	Mucoviscidose	-	Papaine/pronase ou: βmercaptoéthanol 1%:	Ultracentrifugation:	450000
LHERMITTE et coll (1976) (109)	Mucoviscidose	-	βmercaptoéthanol 1% 37°C 4h	Sédimentation à l'équilibre	350000
CREETH et coll (1977) (28)	. Bronchite chronique . Asthme	Dispersion en solution concentrée de chlorure de césium	- + réduction par βmercaptoéthanol	Ultracentrifugation:	3,3 à 7.10 ⁶ 0,57 à 2,3.10 ⁶
WHITNEY et coll (1978) (193)	Normale	-	Guanidine 6M. 60°C: + réduction	Gel filtration (Sephrose CL 2B)	180000
LAMBLIN et coll (1979) (99)	. Bronchite chronique . Mucoviscidose	-	βmercaptoéthanol 1%:	Sédimentation à l'équilibre	315 à 450000
ROSE et coll (1979) (150)	Asthme	-	Bain marie 10 mn 100°C + réduction: dithiothréitol 0,1M:	Gel filtration (Sephrose CL 2B)	2.10 ⁶
FELDHOFF et coll (1979) (43)	Asthme	Dilution au 1/10 ^e dans l'eau:	-	Sédimentation à l'équilibre	1,8.10 ⁶
SACHDEV et coll (1980) (156)	Normale	-	Ultra sons	Sédimentation à l'équilibre	69400
JENSSEN et coll (1980b) (84)	Bronchite chronique	-	Urée 6M pH 12,5	Microscopie électronique	2 à 6.10 ⁶

Tableau n°2 : Masses moléculaires de mucines de diverses origines avant et après action d'agents mucolytiques

AUTEURS	TETTAMANTI et coll (1968) (184)	HILL et coll(1977a) (74)	ALLEN et SNARY (1972) (1)	MANTLE et coll (1981b) (116)	MARSHALL et ALLEN (1978) (120)	PEARSON et coll (1982) (133)	CARLSTEDT et coll (1983a) (24)
Origine de la mucine	mucine sous-maxillaire ovine	mucine salivaire de mouton	mucine gastrique humaine	mucine intestinale de porc	mucine colique de porc	mucine biliaire humaine	mucine cervicale humaine
Mode de purification	-Formation d'un complexe par le cétaïvon -Précipitation: fractionnée par l'éthanol	- Dansylation (blo-cage des fonctions amines libres) - Diminution des interactions électrostatiques entre les fonctions aminées (lysine) et les fonctions β ou γ carboxyliques des mucines (TABAK et coll,1982)(182)	Mesure de la vitesse de sédimentation	- Raclage de la muqueuse (NaCl0,2M) - Centrifugation à 6000 g -Ultracentrifugation du surnageant en Cscl - Sepharose 4 B	- Gel filtration - Ultracentrifugation à l'équilibre	-SepharoseCL4B:(gelfiltration) - Ultracentrifugation à l'équilibre en Cscl -Exclusion en gel filtration: Sepharose 2B	- Extraction par le chlorure de guanidinium 6M - Purification par: ultracentrifugation: en gradient de densité Cscl/chlorure de guanidinium
Masse moléculaire (DALTONS)	394000 en solution de NaCl 0,2 M	-547000 (NaCl0,5M) -155000 (NaCl 2M) -224000 (asialo-mucine) -58300D(apomucine)	2.10^6	$1,7.10^6$	15.10^6	10^6	10^7
REMARQUES	Autres méthodes de purification : - chauffage 100°C. extraction - CHCl ₃ et Biogel P300 (OEMRAWSINGH et ROUKEMA, 1974) (126) (mucine sous-maxillaire humaine) - Sephadex G200 : réduction - Sepharose en urée 6M puis échange ionique CM52 cellulose en urée 6M: (HERZBERG et coll, 1979) (69) - mucine salivaire de singe - 100°C SephacrylS ₂₀₀ (MALINOWSKI et coll, 1981) (114) mucine salivaire de rat	Diminution de la masse moléculaire à 5.10^5 Da après β mercapto éthanol ou action d'enzymes protéolytiques: SCAVEN et coll: (1977) (162) PEARSON et coll: (1980) (131)	- après pronase : 4 X 450000 Da - pronase puis β mercapto éthanol : 270000 Da - β mercapto éthanol seul : 240000 Da et 90000 Da	- β mercapto éthanol 0,2M : 6.10^6 Da - pronase : $1,5.10^6$ Da - pronase et β mercapto éthanol sous unité: 760000Da	- Dithiothreitol en: miligu dissociant : 2.10^6 Da - Trypsine : 380000 Da (SHEEHAN et CARLSTEDT, 1984) - mucines natives : 10 à 15.10^6 Da - réduites 2,1 à $2,9.10^6$ Da - digestion trypsique = 4.10^5 Da (164)		

Pour certains auteurs, l'action des enzymes tels que la pronase, la trypsine, la pepsine serait capable de libérer les sous-unités structurales des mucines. La masse moléculaire de ces sous-unités représenterait, dans le cas des mucines gastriques et intestinales, le quart environ de la mucine native (SCAWEN et coll, 1977 ; MANTLE et coll, 1981) (162,116).

Au niveau du protocole de purification, qu'il s'agisse de centrifugation, de chromatographie de perméation en milieu dissociant, d'échange ionique, cette étape ne peut influencer la valeur mesurée de la masse moléculaire des mucines que si elle favorise l'élimination d'éléments interactifs facilitant leur agrégation.

Quant à l'estimation des masses moléculaires des mucines, diverses méthodes ont été préconisées :

- la détermination de la S_{20}^0W par ultracentrifugation (DEGAND et coll, 1973a,c ; HAVEZ et coll, 1973 ; CREETH et coll, 1977) (31,33,64,28).
- les mesures de sédimentation à l'équilibre (ROBERTS, 1974 ; MARSHALL et ALLEN, 1978 ; LAMBLIN, 1979) (147,120,99).
- la microscopie électronique (LAMBLIN et coll, 1979 ; JENSSEN et coll, 1980 ; HARDING et coll, 1983a) (99,84,60).
- la chromatographie de gel filtration (WHITNEY et coll, 1978 ; ROSE et coll, 1979 ; PEARSON et coll, 1982) (193,150,133).

Au total, des poids moléculaires allant de 180000 à $7 \cdot 10^6$ daltons ont pu être avancés pour les mucines trachéobronchiques. Ils sont, nous y insistons, fonction des protocoles suivis, des origines tissulaires des mucines, de leur caractère normal ou pathologique. Des masses moléculaires de 500000 à plusieurs millions pourraient être, nous le pensons, représentatives des mucines natives.

C - Composition en acides aminés des mucines

La partie protéique des mucines représente, selon leur provenance, de 14% (mucines coliques de rat : MURTY et coll, 1978) (124) à 37% (mucines salivaires de mouton : HILL et coll, 1977a) (74) du poids moléculaire. Dans le cas particulier des mucines trachéobronchiques, il existe de grandes variations entre les résultats rapportés dans la littérature (de 10% (ROUSSEL et coll, 1975) (154) à 30% (SNYDER et coll, 1982b) (176)).

Au plan qualitatif, la composition en acides aminés est tout à fait originale, les résidus de sérine, thréonine, proline, glycine et alanine représentant de 66 à 75% des résidus amino-acides totaux dosés (Tableaux n°3 et 4).

1 - Les acides aminés hydroxylés

La teneur en acides aminés hydroxylés (sérine + thréonine) varie de 19 à 48%, ce qui constitue une "grande variabilité" de situation à l'intérieur des mucines. Le rapport sérine/thréonine varie relativement peu : de 0,59 à 0,77 pour les mucines bronchiques. Il peut être très différent dans le cas de mucines d'autres localisations :

- supérieur à 1 dans le cas de préparations de mucines salivaires de boeuf (TETTAMANTI et coll, 1968) (184) ; de mouton (HILL et coll, 1977a) (74) ; ou de chien (MALINOWSKI et HERP (1981) (114).

- égal à 0,45 dans le cas des mucines cervicales humaines (YUREWICZ et MOGHISSI, 1981) (203).

Quant aux mucines bronchiques, leur taux d'hydroxyamino-acides varie en fonction du protocole de purification adopté. Les préparations de mucines bronchiques les plus riches en acides aminés hydroxylés (40 à 50%) sont en effet celles qui ont été obtenues après solubilisation du mucus par réduction en milieu non dissociant (ROSE et coll, 1979 ; LAMBLIN et coll, 1979 ; HOUDRET et coll, 1981) (150,99,77). L'addition de l'agent réducteur provoque dans ce cas l'activation de certaines protéases (LE TREUT et coll, 1981) (107) qui sont d'autant plus efficaces sur les mucines qu'elles se trouvent en milieu non dissociant (HOUDRET et coll, 1981) (77). Les "mucines" ainsi obtenues correspondraient en réalité à des sous-fragments de mucines.

2 - Les acides aminés dicarboxyliques

Les préparations les plus pauvres en acides aminés hydroxylés sont généralement les plus riches en acides aminés dicarboxyliques. Comme en témoignent les taux d'AS(X) et de GL(X) de ces préparations. L'explication peut être à relier au fait que ces préparations sont souillées par des contaminants peptidiques (TABACHNIK et coll, 1981) (181) voire lipidiques (SLAYTER et coll, 1984) (169).

Tableau n°3 : Composition en amino-acides de quelques mucines trachéobronchiques humaines d'après LE TREUT (1983) (108)

AUTEURS	ROUSSEL et coll (1975) (154)	CREETH et coll (1977) (28)	LAFITTE et coll (1977) (97)	FELDHÖFF et coll (1979) (43)	LAMBLIN et coll (1979) (99)	ROSE et coll (1979) (150)	SACHDEV et coll (1980) (156)	BHASKAR et coll (1981) (13)	TARACHNIK et coll (1981) (181)	SNYDER et coll (1982b) (176)	HOUDRET et coll (1981) (77)		
Origine mucus	mucovis- cidose	asthme	normal	asthme	bronchite: chronique	asthme	normale	asthme	mucovis- cidose	mucovis- cidose	bronchite chronique		
Fraction étudiée	"S" réduite	18,1* native	"3b" réduite	"I" native	"C ₂ b" réduite	MGP 0,3M "HA" réduite	"HO-4" native	"AsEXT" native	"AsEXT" réduite	"IA" natif	"CF-C" native	"Bc"ré: duite enmili: eu non: disso ciant	"Bb"ré: duite en mi lieu disso ciant
Acides aminés mol/100mol													
AS(X)	2,2	8,3	2,7	7,0	3,6	4,0	6,9	7,1	5,5	10,6	8,9	2,3	5,3
THR	28,7	18,1	27,5	17,0	24,4	23,2	16,4	17,9	22,5	9,3	19,8	29,0	24,0
SER	17,0	12,7	18,6	11,0	16,1	16,9	12,5	14,1	13,7	10,1	15,2	19,5	14,5
GL(X)	4,4	8,1	3,9	7,8	4,2	4,3	9,5	9,7	7,8	8,7	8,1	3,2	6,3
PRO	11,8	10,5	14,7	10,3	11,1	12,8	10,1	12,7	13,7	5,8	12,4	12,5	9,3
GLY	8,8	7,6	6,5	7,2	8,2	7,1	7,1	8,1	7,6	8,8	9,7	5,7	7,0
ALA	10,4	7,2	8,2	8,6	9,2	7,6	7,6	7,1	7,5	8,5	8,1	9,0	7,0
1/2 CYS	-	2,6	0,6	1,5	0,7	1,3	2,3	1,1	1,5	9,2	1,2	0,9	1,5
VAL	4,0	4,8	4,0	6,9	3,8	4,2	6,1			6,2	4,0	3,7	4,2
MET	traces	0,4	0,8	1,0	1,2	0,6	0,9			1	0,4	0,6	0,
ILE	2,2	2,1	2,1	2,9	2,1	1,7	2,5			2,7	2,4	1,8	2,0
LEU	4,5	4,9	2,3	6,3	4,3	3,8	6,5			6,9	6,5	3,1	4,5
TYR	traces	1,8	1,1	1,1	1,1	1,6		24,2	20,2	2,2	traces	1,1	1,8
PHE	traces	2,1	1,2	2,1	1,1	2,2	2,6			1,8	traces	1,2	1,9
LYS	1,6	2,1	2,2	2,9	2,7	3,2	3,6			2,7	2,4	1,7	2,2
HIS	2,1	2,5	1,5	2,1	3,8	2,0	1,9			1,7	0,3	2,8	2,4
ARG	2,1	4,2	2	4,0	2,5	3,5	3,5			3,5	0,5	1,7	3,0
Acides aminés totaux (g/100g)	10,15	29	19,53	28	13	15	23,2	24	18	?	30,3	12,8	18,
OH AA %	45,7	30,8	46,1	28,0	40,5	40,1	28,9	30	36,2	19,4	35,0	48,5	38,5
Ser/Thr	0,59	0,70	0,68	0,65	0,66	0,73	0,76	0,68	0,61	1,09	0,77	0,67	0,63

Tableau n°4 : Composition en amino-acides de diverses mucines

AUTEURS :	PRAKOBPHOL : et coll (1982) (142) homme	HERZBERG : et coll (1979) (69) singe	HILL : et coll (1977a) (74) mouton	TETTAMANTI : et coll (1968) (184) boeuf	LOMBART : et WINZLER : (1974) (112) chien	MALINOWSKI : et HERP : (1981) (114) rat	MURTY : et coll : (1978) (124) rat	LAMONT : et VENTOLA : (1980) (102) rat	GOLD : et coll : (1981) (52) homme	YUREWICZ : et MOGHISSI : (1981) (203) homme
ASP(X)	4,9	2,5	1,69	2,1	2,4	7,27	10,2	9,9	6,4	3,6
THR	20,9	22,2	14,11	15,3	14,0	9,84	18,1	11,1	20,1	26,6
SER	16,2	15,6	18,55	20,1	11,0	13,28	11,7	7,9	9,7	12,1
GLU(X)	6,9	6,9	5,25	7,5	5,4	6,60	15,7	13,9	8,3	5,7
PRO	23,7	5,7	10,61	11,1	9,5	8,64	9,6	6,5	9,3	10,7
GLY	1,4	16,7	19,31	17,7	25,5	5,30	8,5	8,3	6,5	6,8
ALA	14,4	8,5	13,94	12,2	11,3	5,90	6,9	7,4	7,0	9,1
1/2CYS	0,10	0,35	-	-	1,2	-	< 1	0,7	-	0,5
VAL	3,1	7	6,78	6,7	4,9	2,19	5,1	5,6	6,4	5,0
MET	0,11	0,12	-	0,09	0,2	0,33	-	0,9	-	2,0
ILE	1,50	3,0	1,14	1,6	0,9	1,97	3,0	2,9	4,5	2,3
LEU	2,80	3,70	3,36	3,7	3,8	2,24	4,6	8,2	7,5	5,4
TYR	0,14	0,35	-	-	0,6	0,82	< 1	2,2	1,8	0,3
PHE	0,86	0,94	1,08	0,44	2,2	0,82	1,7	2,8	2,6	1,8
LYS	1,40	1,9	0,36	0,56	1,0	24,87	2,9	6,1	4,5	1,4
HIS	0,87	1,6	0,31	0,15	1,2	8,34	< 1	1,8	3,4	1,8
ARG	0,69	2,7	3,52	4,3	5,0	1,59	1,6	3,9	2,1	2,7
pro- téines totales g/100g	30,4	18,7	37,2	30,9	36,5	-	14	-	-	-
OHAAs SER/THR	37,1 0,78	37,8 0,70	32,7 1,32	35,4 1,31	25,0 0,79	23,1 1,35	29,8 0,65	19,0 0,71	29,8 0,48	38,7 0,45
	mucines salivaires					mucines coliques			mucines cervicales	

AS(X) : acide aspartique ou asparagine
GL(X) : acide glutamique ou glutamine

Toutefois LAMONT et VENTOLA, en 1980 (102), ont remarqué que l'acidité de certaines mucines coliques est en partie la conséquence de leur richesse particulière en acides aminés dicarboxyliques (acide aspartique et glutamique). GOLD et coll (1981), MURTY et coll (1978) (52,124) ont rapporté que ces deux acides aminés représentent respectivement 15 et 26% du total des acides aminés dosés (Tableau n°4). Le taux atteint 20% dans le cas des mucines intestinales de rat (DE LUCA et coll, 1970) (35).

3 - Les acides aminés soufrés

La teneur des mucines en résidus de cystéine a fait l'objet de nombreuses controverses. Certains auteurs tels que ROUSSEL et coll (1975) (154), HERZBERG et coll (1979) (69) ou LAMONT et VENTOLA (1980) (102) en trouvent moins de 0,7 mole/100 moles d'acides aminés dosés. D'autres groupes obtiennent des taux plus élevés : 1,2% (LOMBART et WINZLER, 1974) (112), 2,3% (SACHDEV et coll, 1980) (156), 2,6% (CREETH et coll, 1977) (28). Ces divergences sont provoquées par les taux faibles enregistrés qui sont à la limite d'une estimation rigoureuse par les techniques classiques d'hydrolyse chlorhydrique des mucines et leur étude sur analyseur automatique (résine, ninhydrine).

4 - Les acides aminés basiques

Les acides aminés basiques représentent généralement 3 à 5% des résidus dosés. Des variations sont notables selon l'origine de la mucine. Elles sont toutefois difficiles à interpréter.

5 - Le tryptophane

Enfin rares sont les articles s'intéressant au contenu en tryptophane dans les mucines. Très faiblement représenté, il est hors limite des dosages.

Pour les autres acides aminés : la proline, la glycine, l'alanine sont au total représentatifs de 30% et plus de l'axe peptidique. Quant aux résidus de valine, leucine, isoleucine, tyrosine, phénylalanine, nous devons noter une certaine constance dans leurs rapports relatifs.

Au total, les mucines sont surtout caractérisées par leur richesse en acides aminés hydroxylés, acides aminés qui, dans une très large proportion sont impliqués dans les liaisons O-glycosidiques.

D - Acides aminés N-terminaux et séquences partielles de mucines

Peu de travaux ont été publiés concernant des déterminations de séquences amino-acides de mucines. En effet leur haut degré de glycosylation, la fréquence des points de branchement des chaînes glycaniques sur l'axe peptidique constituent des obstacles majeurs pour l'application de la classique dégradation récurrente de Edman.

1 - Acide aminé N-terminal et séquence N-terminale de mucines purifiées

Sur des préparations de mucines bronchiques purifiées (réduction, gel filtration, échange ionique), DEGAND et coll (1972) (1973a), HAVEZ et coll (1973) (30,31,64) ont identifié un seul acide aminé en position amino-terminale : l'arginine. Ce même résidu amino-acide était identifié au niveau d'un mucus cervical de singe (HATCHER et coll, 1977) (62). La thréonine chez l'homme (WOLF et coll, 1980) (197), l'alanine chez les bovidés (BHUSHANA RAO et coll, 1977) (15) ont été décrits au niveau de mucus cervicaux.

HASHIMOTO et coll (1963), PIGMAN et PAYZA (1969) (61,138) ont proposé la séquence suivante pour l'extrémité amino-terminale de mucine sous-maxillaire bovine :



2 - Acides aminés N-terminaux de glycopeptides de mucines

Toute une série d'acides aminés très différents ont été situés en position N-terminale de glycopeptides de mucines traités enzymatiquement. Ainsi PIGMAN et PAYZA (1969) (138) ; HASHIMOTO et coll (1963) (61) ont obtenu le glycocolle en position N-terminale de glycopeptides de mucine sous-maxillaire bovine de 28 résidus.

HILL et coll (1977b) (75) ont obtenu la sérine en tant qu'acide aminé N-terminal à partir de peptides tryptiques de mucine sous-maxillaire ovine. L'isoleucine occupe la même position pour un peptide tryptique provenant de la glande sous-maxillaire de porc (ECKHARDT et coll 1987) (39).

Sur le plan séquence, à partir de glycopeptides, des enchaînements amino-acides de longueurs variables ont été décrits par :

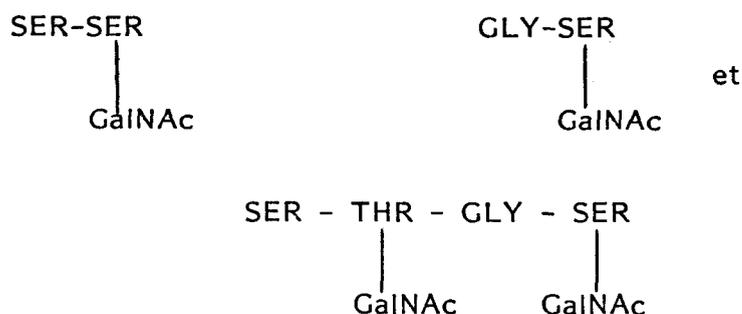
- DEGAND et coll (1972, 1973a) (30,31)

au niveau de fucoglycopeptides : ASP-PRO-X-SER-PRO.....

au niveau de sialoglycopeptides : PRO-THR-ARG-PRO.....

- OZEKI et YOSIZAWA (1971) (129)

au niveau de galactosaminyl peptides :



- HILL et coll (1977b) (75) sont parvenus à séquencer partiellement trois peptides tryptiques qui dérivent de l'apomucine sous-maxillaire ovine. La séquence amino-terminale de 50 résidus sur 74 de l'un des peptides et les séquences complètes des deux autres hexadécapeptides ont été réalisées. Ils n'ont observé aucune séquence répétitive et ont identifié un résidu hydroxylé tous les trois résidus en moyenne.

Enfin ECKHARDT et coll (1987) (39) ont réalisé la séquence amino-acide d'un peptide tryptique de 36 résidus provenant de la déglycosylation enzymatique de mucine sous-maxillaire de porc. Plus récemment ROSE et coll (1989) (152) ont obtenu quelques éléments de séquence amino-acide de peptides tryptiques de mucine trachéobronchique humaine (Figure n°1).

Au total il existe peu de résultats de séquence peptidique qui, de toute façon, ne sont représentatifs que de régions très limitées des mucines et ne peuvent en aucun cas fournir une réelle idée de l'organisation des zones glycosylées ou non glycosylées.

E - La copule glycanique des mucines

La composition glycanique des mucines représente de 70 à 85% de leur masse moléculaire. C'est donc la fraction majoritaire. Les chaînes oligosaccharidiques qui la constituent sont linéaires ou ramifiées. Les chaînes sont constituées de L-fucose, D-galactose, N-acétyl-D-galactosamine et de N-acétyl-D-glucosamine. Des résidus d'acide sialique (N-acétyl et N-glycolylneuraminique) peuvent faire partie intégrante de la fraction glycanique qui peut aussi être sulfatée (Tableaux n°5 et 6).

Tableau n°5 : Composition osidique de quelques mucines trachéobronchiques humaines d'après LE TREUT (1983) (176)

AUTEURS	ROUSSEL (1975) (154)	CREETH (1977) (28)	LAFITTE (1977) (97)	FELDHOFF (1979) (43)	LAMBLIN (1979) (99)	ROSE (1979) (150)	SACHDEV (1980) (156)	BHASKAR (1981) (13)	TARACHNIK (1981) (181)	SNYDER (1982b) (176)	HOUDRET (1981) (77)		
Origine mucus	mucovis- cidose	asthme *	normale	asthme	bronchite- chronique	asthme	normale	asthme	mucovis- cidose	mucovis- cidose	bronchite chronique		
Fraction étudiée	"S" réduite	18,1 native	"3b" réduite	"I" native	"C ₃ b" réduite	MGP 0,3M "HA" réduite	"HO-4" native	"AsEXT" native	"AsEXT" réduite	"IA" natif	"CF-C" native	"Bc"ré duite en mi lieu non disso ciant	"Bb"ré duite en mi lieu disso ciant
Résidus de sucres													
Rapports molaires													
Fuc	2,53	1,39	0,68	1,86	1,91	0,69	1,00	0,90	0,90	1,54	5,70	0,98	0,75
Gal	4,03	2,82	1,52	2,21	3,48	1,61	2,10	2,60	2,60	10,04	3,50	2,01	1,5
GalNAC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GlcNAc	2,78	2,50	0,72	1,43	2,36	0,97	1,50	1,90	1,80	1,35	2,30	1,48	1,30
NANA	0,28	0,17	0,58	0,71	0,24	0,75	1,30	1,10	1,10	3,29	1,30	0,85	0,7
Glc		0,16						<0,10	<0,10	traces	0	0,08	0,06
Man		0,16						<0,10	<0,10	traces	0	traces	0
Sucres totaux (g/100g)	84,6	84,6	70,4	70	73,9	45,3	72,8	78	86	80	69,7		
Sulfate Rapports molaires /GalNAc	0,65	1,46	0,13	-	0,71	1,56	0,85	0,18	0,16	6,41	?	0,13	0,07
Sulfate (g/100g)	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau n°6 : Composition osidique de mucines de diverses origines

:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	OEMROWSINGH	SCHRAGER et	JABBAL et	GOLD et coll	YUREWICZ et	:	:	:	:	:	:
:	et coll (1974)	coll (1971)	coll (1976)	(1974)	coll (1981)	:	:	:	:	:	:
:	salivaire	gastrique	intestinale	colique	cervicale	:	:	:	:	:	:
:	(126)	(163)	(83)	(51)	(203)	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	*										
:	Résidus de sucres	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	Fuc	2,1	2,1	0,3	0,5	1,1	:	:	:	:	:
:	Gal	3,1	3,1	1,3	1,1	1,8	:	:	:	:	:
:	GalNac	1	1	1	1	1	:	:	:	:	:
:	GlcNac	2,7	2,4	1	1	0,9	:	:	:	:	:
:	NANA	1,2	-	0,10	-	0,45	:	:	:	:	:
:	:										
:	Sulfates ⁺	-	7	ND	1,6	1	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	:										

* Rapport molaire (par rapport à GalNac)

+ Pourcentage du poids sec

ND : Non déterminé

La plupart des chaînes glycaniques sont situées dans les régions hautement glycosylées de l'axe peptidique et leur confèrent des propriétés particulières telles que, par exemple, une résistance à la protéolyse. Certains résultats de compositions glycaniques des mucines trachéobronchiques ont fait l'objet de nombreuses interrogations.

Ainsi certaines fractions contiennent des traces de glucose et de mannose qui pourraient être les témoins de glycoprotéines contaminantes (CREETH et coll, 1977 ; BHASKAR et coll, 1981 (28,13)). Dans certains cas publiés, le taux de sucres totaux est inférieur à 50% (ROSE et coll, 1979) (150). Parfois la composition osidique est inhabituelle surtout en ce qui concerne le galactose, l'acide sialique et la richesse en groupements sulfatés (TABACHNIK et coll, 1981) (181). Pour GOLD et coll (1981) (52), il n'est pas impossible de retenir l'hypothèse que les mucines de faible taille moléculaire pourraient être le résultat d'une protéolyse d'une mucine de plus grosse taille. Dans le cas décrit, les mucines résultant de la protéolyse sont pour l'une très riche en fucose ("fucomucine") et pour l'autre très riche en acide sialique ("sialomucine").

L'analyse des structures publiées pour les chaînes glycaniques de mucines montre qu'il existe trois régions distinctes dans ces oligosaccharides (Figure n°2) :

- une première région immédiatement au voisinage de la liaison glycanne-protéine appelée "noyau" ou "core" de l'oligosaccharide. Cette partie peut être de différents types structuraux (BROCKHAUSEN et coll, 1985) (19) (Figure n°3).

- une deuxième région ou "squelette" de l'oligosaccharide de situation centrale dans le glycanne est formée par l'addition alternée de résidus de galactose et de N-acétylglucosamine. Elle représente l'essentiel des glycanes les plus longs (Figure n°2).

- une troisième région ou "périphérie" peut enfin correspondre à un antigène de groupe sanguin tels les systèmes A,B.H. et LEWIS (HOUNSELL et FEIZI, 1982) (79) mais peut être aussi plus simple.

La copule osidique des mucines quelles que soient leurs origines se caractérise essentiellement par une grande hétérogénéité de longueur des chaînes oligosaccharidiques.

Les chaînes glycaniques libérées par β -élimination peuvent être fractionnées puis purifiées à l'aide de différents protocoles chromatographiques permettant ensuite l'étude de leurs structures.

Figure n°2 : Schématisation des mucines d'après T. MARIANNE (1987a)(118)

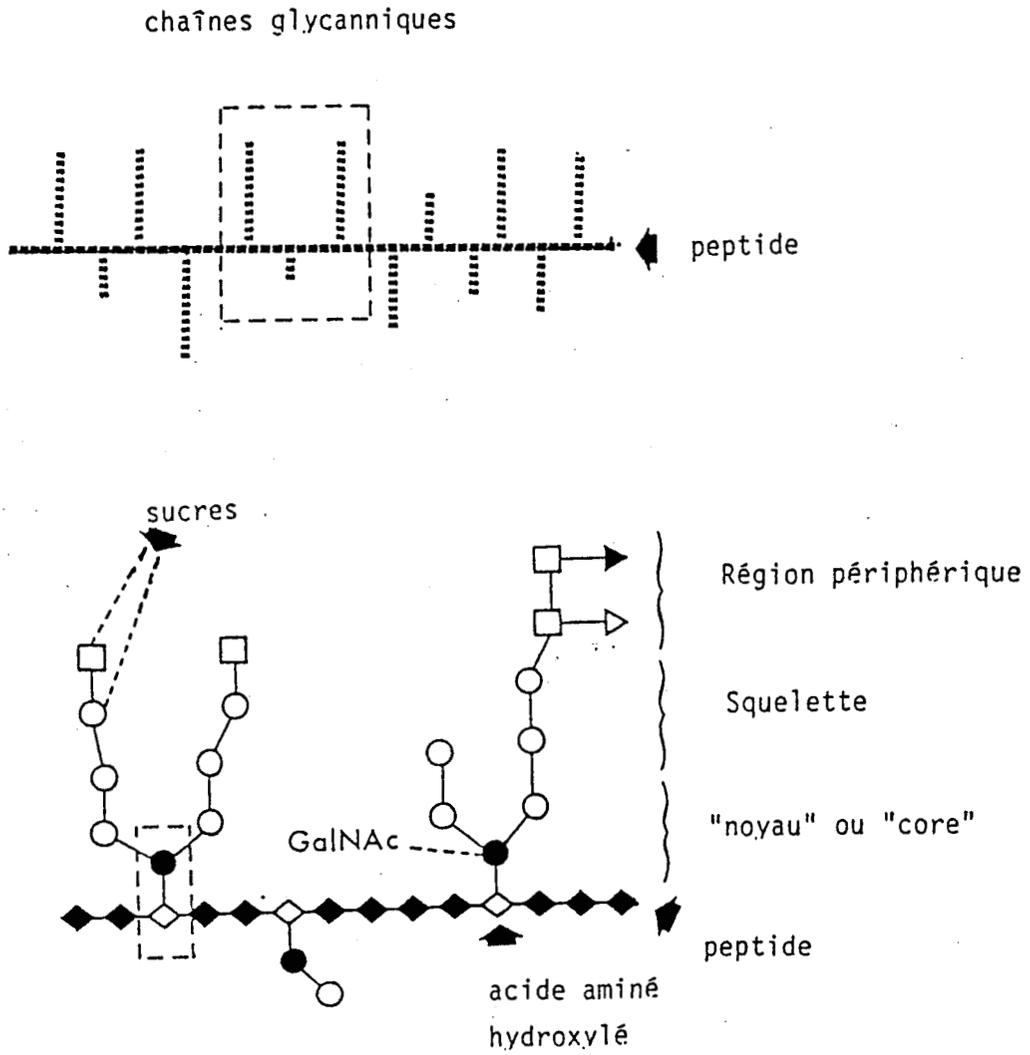
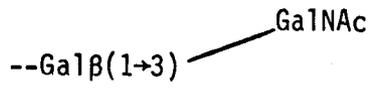
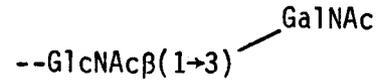


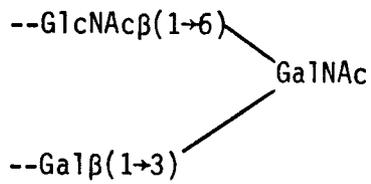
Figure n°3 : Différents types de "noyaux" existant au niveau des chaînes oligosaccharidiques des mucines



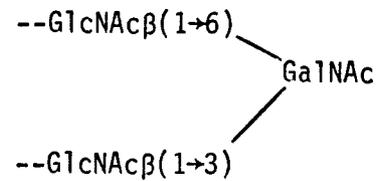
type 1



type 3

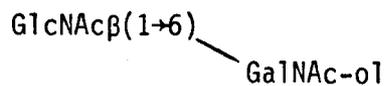
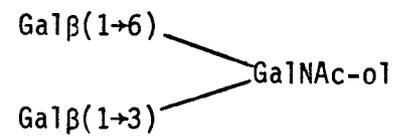
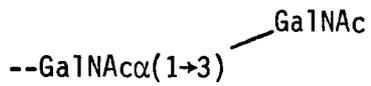


type 2



type 4

Figure n°4 : "Cores" de types "rares"



Les méthodes de chromatographie d'échange ionique permettent une séparation des mucines en fonction de leur caractère d'acidité lié aux chaînes glycaniques (LAMBLIN et coll, 1977 ; FORSTNER, 1978) (98,44) :

- les mucines neutres pauvres en acide sialique et riches en fucose
- les mucines plus riches en acide sialique qu'en groupements sulfatés
- les mucines plus riches en groupements sulfatés qu'en acide sialique

Ces mucines neutres et acides, sulfatées et/ou sialylées peuvent coexister dans la sécrétion muqueuse d'un même individu (ROUSSEL et coll, 1975) (154). Les fractions obtenues peuvent être sous-fractionnées par gel filtration. On citera : la chromatographie liquide (HPLC) qui permet de purifier des oligosaccharides-alditols dont la structure peut être déterminée ensuite par R.M.N. du proton (LAMBLIN et coll, 1980, 1981 ; VAN HALBEEK et coll, 1982) (100,101,189).

Une description détaillée des différentes chaînes oligosaccharidiques obtenues au niveau des mucines bronchiques a été décrite par KLEIN en 1988 (92). Nous en reprendrons certains éléments.

1) Le "core" des O-glycannes

Les différents "noyaux" ou "cores" des glycannes sont rapportés dans la figure n°3.

Le "core" de type 1 est le premier à avoir été décrit (CARLSON, 1968) (22). Il est présent dans un grand nombre de mucines.

CARLSSON et coll (1978) (23) ont depuis décrit le "core" de type 3 dans les mucines intestinales de rat.

Les "cores" de types 2 et 4 résultent de la substitution des 2 "cores" précédents par un résidu de N-acétylglucosamine lié en $\beta 1 \rightarrow 6$ sur la N-acétyl-galactosamine.

La majorité des structures glycaniques isolées à partir des mucines, possède l'un de ces 4 "cores". Cependant, d'autres noyaux plus rares ont été décrits (Figure n°4) :

- le "core" $\text{GalNAc } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ GalNAc}$ a été isolé de mucines salivaires d'hirondelles (genre Collocalia) par WIERUZESKI et coll (1987) (194) et de glycoprotéines de méconium humain (HOUNSELL et coll, 1985) (80).

- ce même groupe a isolé une structure de type $\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 6 \text{ GalNAc-ol}$ mais il se pourrait que ce glycanne provienne de la dégradation d'un oligosaccharide ayant un "core" de type 2 ou 4.

- SLOMIANY et coll (1984a) (171) ont isolé un "core" de type Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ [Gal $\beta 1 \rightarrow 6$] GalNAc-ol à partir de mucines gastriques humaines.

2) Le squelette des O-glycannes

Ce squelette est formé de sous-unités disaccharidiques comportant un résidu de galactose et un résidu de N-acétylglucosamine. Ces disaccharides sont soit de type 1 (Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc), soit de type 2 (Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc). L'association de ces sous-unités s'effectue de façon linéaire ou ramifiée.

* Les associations linéaires sont ou mixtes ou formées uniquement de chaînes de type 1 ou de type 2.

* L'association d'un disaccharide en $\beta 1 \rightarrow 6$ sur un galactose permet d'obtenir plusieurs types de squelettes branchés.

Il existe cependant des structures qui s'écartent des règles générales. Ainsi RANA et coll (1987) (146) ont décrit des structures chez le porc, où le branchement n'est représenté que par un résidu de N-acétylglucosamine lié en $\beta 1 \rightarrow 6$ et non par une N-acétyllactosamine.

3) La périphérie des O-glycannes

Elle comporte différents résidus qui définissent des antigènes tels les systèmes A, B, H et Lewis.

L'antigène H est obtenu par substitution des chaînes de types 1 ou 2 par un résidu de fucose en $\alpha 1 \rightarrow 2$. L'addition respective de résidu de N-acétylgalactosamine ou de galactose en $\alpha 1 \rightarrow 3$ sur la structure H définit les antigènes A et B. Les structures Lewis a (Le^a) et Lewis b (Le^b) sont obtenues par substitution de la sous-unité disaccharidique de type 1 à l'aide de fucose en $\alpha 1 \rightarrow 4$ auquel vient s'ajouter un résidu de fucose en $\alpha 1 \rightarrow 2$ sur le galactose dans le cas de Lewis b.

Au niveau de la sous-unité disaccharidique de type 2, la substitution du résidu de N-acétylglucosamine par du fucose permet de définir des antigènes indépendants du système Lewis : les antigènes X ou SSEA-1 et Y.

L'acide sialique peut être lié au galactose par une liaison $\alpha 2 \rightarrow 6$ donnant par exemple naissance à la structure sialyl-Lewis b ou antigène 19-9, mais également à l'antigène sialyl-X.

De plus, certaines structures particulières ont été isolées au niveau des mucines coliques. L'unité N-acétyllactosaminique est substituée par exemple par du galactose en $\beta 1 \rightarrow 4$ ou de la N-acétylglucosamine en $\beta 1 \rightarrow 3$ (PODOLSKI, 1985a et b) (140,141).

Ainsi, au sein des mucines sécrétées par les mammifères, il existe un grand nombre d'exemples de structures glycaniques. Il y aurait une relation entre acidité et longueur des chaînes (LAMBLIN et coll, 1979) (99). Les mucines neutres et sulfatées auraient des chaînes plus longues que les mucines riches en acide sialique.

CARLSON (1968) (22) a isolé des mucines sous-maxillaires de porc, cinq structures dont la plus complète est un pentasaccharide. Plus récemment, SAVAGE et coll (1986) (161) ont obtenu trois trisaccharides sialylés différents par la nature et la position de l'acide sialique.

SLOMIANY et coll (1984a,b) (171,172) ont décrit 9 oligosaccharides plus complexes contenant, au niveau des mucines gastriques de 6 à 15 oses. Ce même groupe avait décrit en 1980 chez le rat huit oligosaccharides de mucine colique contenant de 2 à 12 résidus osidiques. PODOLSKI (1985a,b) (140,141) a identifié plus de 20 structures neutres et acides contenant 2 à 12 résidus osidiques qui dérivent en majorité du "core" de type 3.

Au niveau des mucines cervicales humaines, YUREWICZ et coll (1982, 1987) (204,205) ont isolé seize oligosaccharides neutres, sialylés, sulfatés pouvant contenir 10 résidus et dérivés du "core" de type 2. Les structures les plus grandes sont des hexasaccharides. NASIR-UD-DIN et coll (1986) (125) ont étudié le mucus cervical de singe (Macaca radiata) et décrit sept structures sialylées dont la plus grande est octasaccharidique. Cinq de ces structures ont un "core" de type 2 et les deux dernières ont un "core" de type 1 sialylé.

Au niveau des mucines de kyste ovarien, DUA et coll (1984) (37) ont associé l'HPLC et la RMN pour décrire un vingtaine de structures différentes avec des "cores" de types 1, 2 ou 3 et la présence des antigènes A, B, H, Lewis et Y.

LAMBLIN et coll (1980), VAN HALBEEK et coll (1982), BREG et coll (1987) (100,189,16) ont décrit au niveau bronchique un grand nombre d'oligosaccharides neutres et sialylés qui présentent quatre "cores" différents. KLEIN et coll (1988), BREG et coll (1988) (93,17) ont identifié de nombreux oligosaccharides différents provenant de glycopeptides bronchiques d'un seul malade.

RANA et coll (1984), CHANDRASEKARAN et coll (1984) (145,25) ont obtenu dix chaînes ramifiées à partir des mucines trachéales de porc.

Ces chaînes dérivent en majorité du "core" de type 2.

Les exemples donnés dans la description détaillée de KLEIN (1988) (92) montrent la grande hétérogénéité des glycanes mais aussi en général le schéma commun d'organisation des glycanes avec un "core", un squelette (unités disaccharidiques branchées ou non) et l'expression plus ou moins fréquente de spécificités antigéniques au niveau de la région périphérique.

II - CONCEPT GENERAL DE L'ORGANISATION DES MUCINES

L'étude du modèle moléculaire "mucine" a été une approche très progressive. Les données généralement admises aujourd'hui sont souvent encore à considérer en tant qu'hypothèses. Elles peuvent relever d'observations directes : la microscopie électronique, ou indirectes : l'identification de structures sous-unitaires dont la nature glycosylée, la richesse éventuelle en cystéine, le caractère hydrophobe ou hydrophile fait discuter une fonction particulière par exemple associative.

A - Données de la microscopie électronique

Des mucines bronchiques (LAMBLIN et coll, 1979 ; JENSSEN et coll, 1980 ; HARDING et coll, 1983 ; SLAYTER et coll, 1984 ; MIKKELSEN et coll, 1985 ; MARIANNE et coll, 1987b (99,84,60,169,122,119)), sous-maxillaires (ROSE et coll, 1984) (151), gastriques ou cervicales (SHEEHAN et coll, 1986 (165)) ont été observées en microscopie électronique. Dans tous les cas, ces molécules se présentaient sous la forme de filaments longs, flexibles, de tailles très inégales. Cette polydispersion des molécules n'est aujourd'hui pas encore totalement expliquée. Elle pourrait être le reflet d'une dégradation enzymatique avant purification, mais elle pourrait aussi représenter des étapes de biosynthèse. Il est à souligner que les tailles moléculaires majoritairement présentes s'accordent avec les poids moléculaires de mucines obtenues par ultracentrifugation.

B - Données de l'analyse de l'axe peptidique des mucines

L'étude de l'action des agents réducteurs et des enzymes protéolytiques sur les mucines a démontré le concept de domaines moléculaires très différents à savoir des régions hautement glycosylées résistantes à l'action protéolytique et des zones nues peu ou pas glycosylées, très facilement clivées. On peut en effet considérer que les régions glycosylables présentent des

séquences amino-acides riches en sérine et thréonine alors que les portions nues comporteraient un pourcentage élevé d'acides aminés dicarboxyliques (ROBERTS, 1976 ; SCAWEN et coll, 1977 (148,162)). L'alternance des sites de glycosylation et des zones nues le long de l'axe peptidique se ferait au hasard selon HILL et coll (1977b) (75).

La notion de stabilisation des mucines par interactions hydrophobes au niveau des zones non glycosylées a été avancée par TABAK et coll (1982) (182). De même c'est au niveau des parties nues que se situeraient les liaisons par ponts disulfures entre sous-unités élémentaires (SHOGREN et coll, 1984) (167). Ce dernier résultat est d'ailleurs remis en cause par ECKHARDT et coll (1986, 1987) (38,39) qui n'ont pas caractérisé de résidu de cystéine sur l'apomucine sous-maxillaire de porc. De même aucun résidu de cystéine n'a été détecté dans les mucines salivaires de mouton (HILL et coll, 1977a) (74) ou de tatou (WU et coll, 1979) (200). Par contre, HERZBERG et coll (1979) (69) ont obtenu des composés de plus faible masse moléculaire par réduction et alkylation des mucines salivaires de singe.

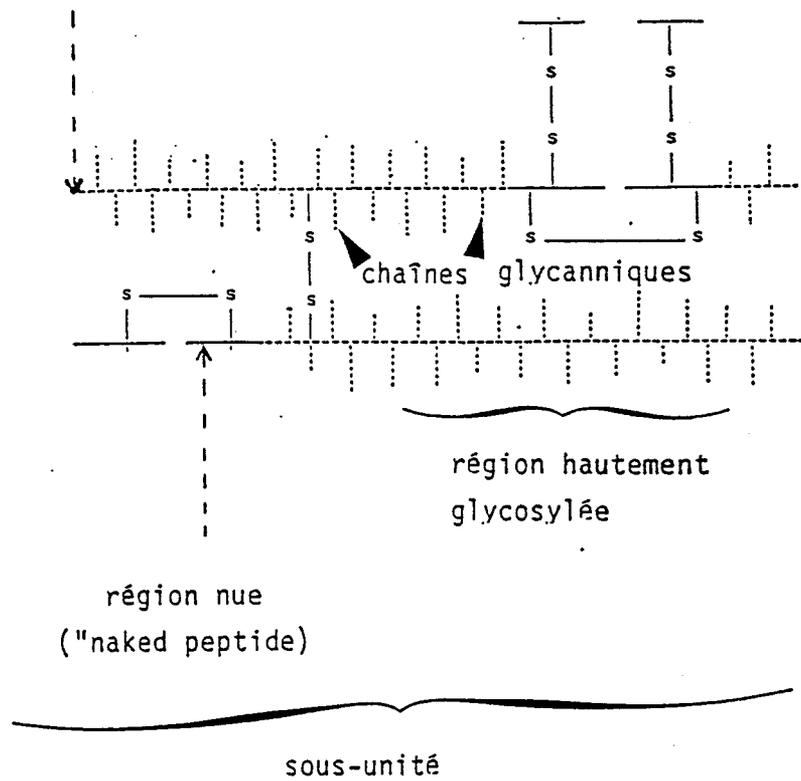
En fait, le rôle des liaisons covalentes de type pont disulfure est encore très discuté. ROBERTS et coll (1976) (148) ont obtenu une diminution de la taille des mucines bronchiques par réduction (200 à 400 kDa) alors que FELDHOFF et coll (1979) (43) observent que la rupture des ponts disulfure par le dithiothréitol ne conduit pas à une diminution de la masse moléculaire des mucines bronchiques. WILLIAMS et coll (1982) (195) n'écartent pas l'existence de ponts disulfure dans les zones non glycosylées, qui affecteraient la structure secondaire sans modifier de façon significative la masse moléculaire. SLOMIANY et coll (1985) (173) ont envisagé l'existence d'acides gras liés aux parties peptidiques par des thiols esters, car l'activité acyl transférase diminue après réduction au 2-mercaptoéthanol et carboxyméthylation du mucus gastrique de rat utilisé comme substrat. Le site accepteur de l'acyl transférase serait situé dans la région non-glycosylée.

C - Modèles moléculaires proposés pour les mucines

La notion de sous-unités de mucines réunies entre elles par ponts disulfures a été proposée par ROBERTS et coll en 1976 (148). Le modèle décrit par ces auteurs (Figure n°5) est voisin de celui proposé en 1978 par ALLEN et

Figure n°5 : Modèle d'organisation moléculaire des
mucines trachéobronchiques (ROBERTS. 1976. 1978a)(148,149)

axe
polypeptidique



coll (3) pour les mucines gastriques (Figure n°6). L'action des enzymes protéolytiques sur les mucines l'amène à suggérer l'existence au sein de chacune des sous-unités de régions hautement glycosylées peu sensibles aux enzymes protéolytiques et de régions nues au contraire facilement dégradées par ces enzymes.

Actuellement le modèle de mucine bronchique le plus probable est une structure filamenteuse de taille variable comportant des régions hautement glycosylées résistantes à la protéolyse (taille 50 à 250nm) séparées par des régions nues dépourvues de glycanes (Figure n°7).

Un exemple de structure polymérique constituée de quatre sous-unités de 200000 daltons a tout d'abord été proposé par SNARY et coll (1970) (174) pour les mucines gastriques. Le groupe d'ALLEN (1976, 1978) (2,3) a ensuite proposé un modèle dit "moulin à vent" (Figure n°6). Ce modèle a été remis en question par PEARSON et coll (1981) (132) notamment au niveau du mode d'association des sous-unités de mucines. Une fraction protéique de 70000 daltons est libérée lorsque les mucines sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol 0,2M. Ils ont mis en évidence une protéine non glycosylée, de composition en acides aminés originale et qui existe dans un rapport 1/1 au sein de la molécule polymérique native. Elle aurait un rôle central dans la macromolécule. Elle serait liée par liaison disulfure covalente aux quatre sous-unités de la mucine native. Le 2-mercaptoéthanol scindant ces liaisons libèrerait les quatre sous-unités et la protéine centrale. Les enzymes protéolytiques dégraderaient la protéine centrale non glycosylée. Un nouveau modèle moléculaire a vu le jour (Figure n°8) où la protéine de 70000 D constitue l'élément de "pontage" des quatre sous-unités glycoprotéiques (ALLEN et coll, 1982 ; ALLEN, 1983 (4,5)).

Enfin des quantités appréciables de lipides liés de manière covalente au reste de la molécule ont été mis en évidence par SLOMIANY et coll (1983) (170). L'incorporation in vitro d'acides gras tritiés est plus importante au niveau des sous-unités qu'au niveau de la structure polymérique. L'acylation s'opèrerait à la fin dy "processing" de la partie peptidique de la sous-unité mais avant l'assemblage de la glycoprotéine en polymère.

Figure n°6 : Représentation schématique de la structure d'une mucine gastrique de porc (d'après ALLEN et coll. 1978)(3)

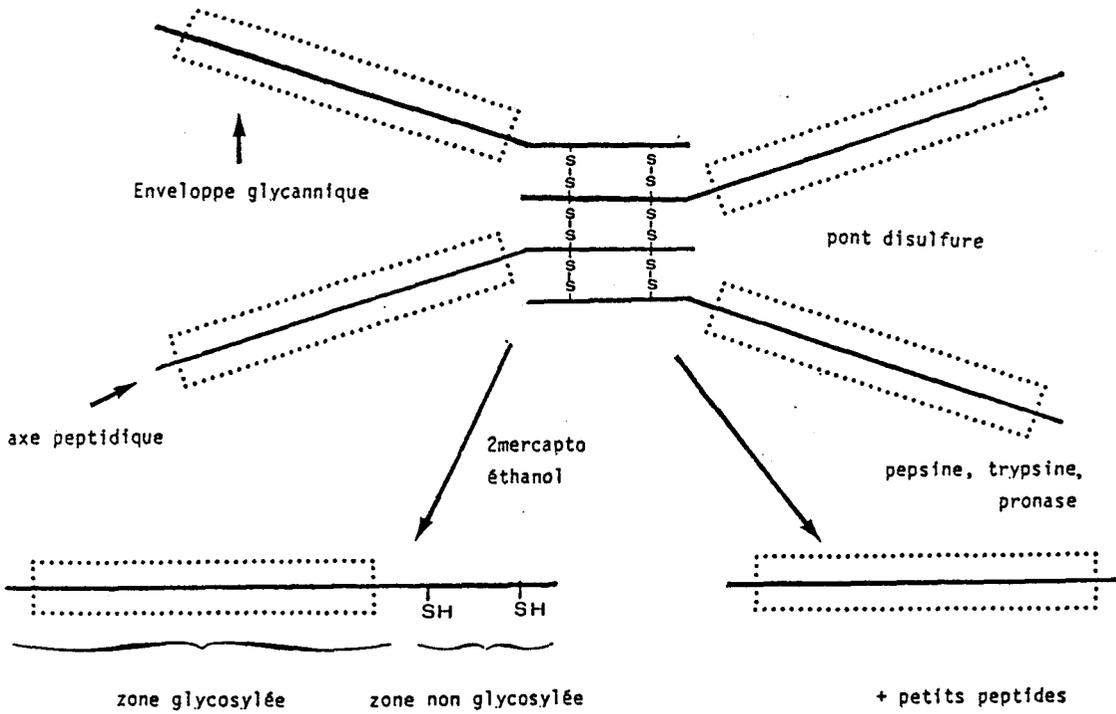


Figure n°7 : Modèles de structure des mucines bronchiques
(d'après MARIANNE, 1987)(118)

pont S-S inter peptides glycosylés

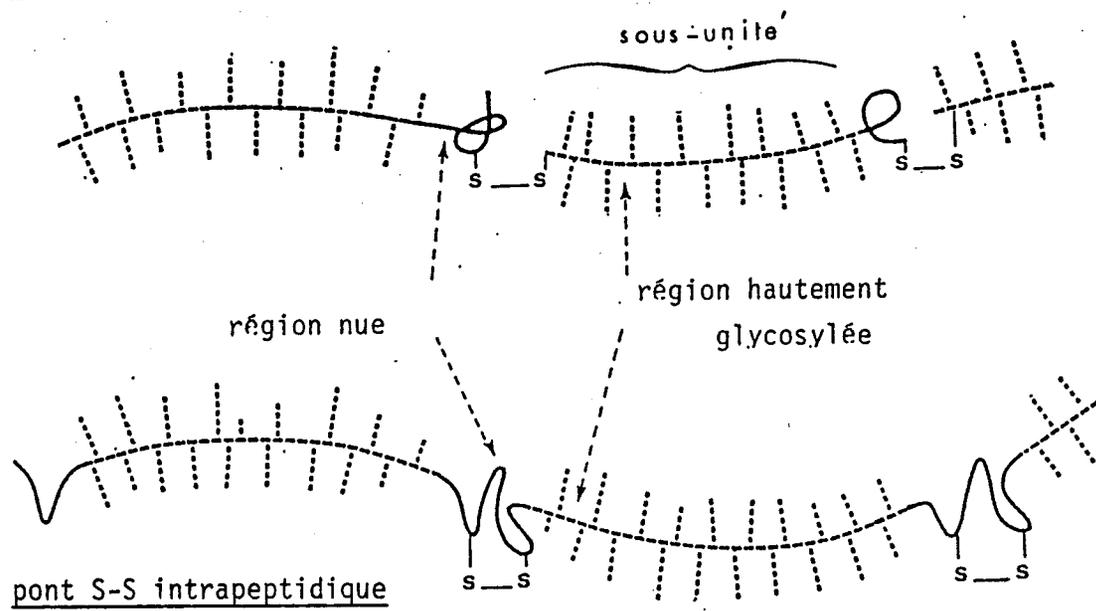
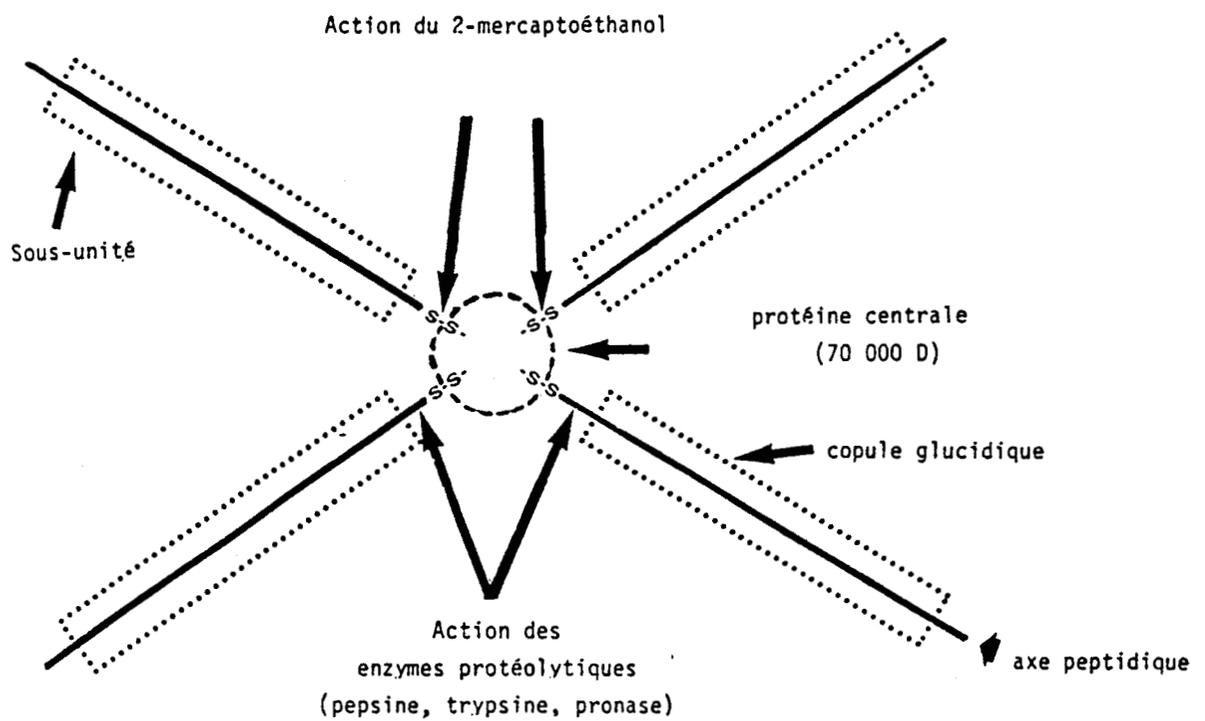


Figure n°8 : Modèle d'organisation proposé pour la mucine gastrique de porc
(d'après ALLEN et coll. 1982)(4)



°00°

CHAPITRE II :

SEQUENCE PEPTIDIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES :

APPROCHE BIOCHIMIQUE

°00°

Pour réaliser la détermination de la séquence peptidique des mucines, s'impose en préalable une déglycosylation du matériel étudié. Cette étape est particulièrement délicate car elle nécessite un respect aussi complet que possible de l'intégrité de l'axe peptidique. Ainsi sont à éliminer les hydrolyses douces à pH acide, ou les traitements par agents alcalins.

Deux protocoles d'élimination des glycanes ont été retenus. Nous en exposerons les résultats. Le premier fait appel à l'oxydation periodique, le second à la déglycosylation par l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique.

L'oxydation periodique donne, en fonction de la complexité des glycanes, une déglycosylation souvent incomplète, elle a le désavantage d'oxyder des acides aminés tels que la cystéine ou la tyrosine (MORT et LAMPORT, 1977) (123). La solvolysé des glycoprotéines en milieu strictement anhydre utilisant des acides tels que acide sulfurique, acide chlorhydrique, acide bromhydrique a été proposée dès 1967 (IWAI et ANDO) (82), cependant les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide fluorhydrique (LENARD, 1969) (106) puis avec l'acide trifluorométhane sulfonique (EDGE et coll, 1981) (40) qui selon les conditions retenues permettent d'atteindre une déglycosylation complète.

I - DEGLYCOSYLATION PAR OXYDATION PERIODIQUE

La déglycosylation par oxydation periodique suivie d'hydrolyse acide permettant le clivage de l'élément osidique a été réalisée sur des "mélanges" de glycopeptides de mucines préparés par protéolyse à partir de sécrétions bronchiques de malades atteints de bronchite chronique.

A - Etudes des glycopeptides de mucines de DAU...

Les sécrétions bronchiques d'un malade bronchitique chronique DAU... de groupe sanguin O ont été conservées à -20°C depuis leur recueil et ont été ramenées au moment de leur utilisation à température du laboratoire. Le mucus fibrillaire est séparé par centrifugation (3000 tr/mn pendant 10 minutes) d'une phase aqueuse correspondant pour l'essentiel à des produits de dégradation des mucines. La phase géliforme de l'expectoration est alors soumise à une hydrolyse par enzymes protéolytiques en deux étapes (appendice technique).

La première étape consiste en l'addition de mercuripapaïne dans un rapport enzyme/substrat de 1/100. Du tampon phosphate de sodium 0,01M pH 6,5 est ajouté au gel dans le rapport 1:10 (v:v). L'enzyme est activé par addition de dimercapto-2-3-propanol-1 ou B.A.L. (DEGAND et coll, 1974) (34). Au bout de 24 heures, une recharge en enzyme est effectuée.

En deuxième étape, le pH est amené à la valeur de 7,3, le tampon étant enrichi en calcium à la concentration finale de 0,01M. La pronase est alors utilisée dans un rapport enzyme/substrat de 1/40. Au bout de 24 heures, une quantité équivalente de pronase est introduite.

Le produit d'hydrolyse papaïne-pronase est alors soumis à une centrifugation de 10 minutes à 3000 tr/mn pour éliminer un culot insoluble. Le surnageant est précipité par 4 volumes d'alcool absolu, dialysé et lyophilisé.

Les glycopeptides papaïne-pronase de mucus sont alors soumis à une oxydation périodique suivie d'hydrolyse en milieu HCl. L'opération est répétée deux fois et mène à un matériel qui est déposé sur une colonne de Sephadex G15 équilibrée en eau désionisée. Seule la fraction exclue, orcinol positive, est conservée. Elle est soumise à nouveau à une protéolyse papaïne-pronase 48 heures - 8 jours dans les mêmes conditions que la protéolyse initiale du mucus gélatineux, la seule différence étant la durée de la digestion pronasique.

A la suite de ce traitement, les glycopeptides sont déposés sur une colonne de Biogel P2 équilibrée en eau désionisée. La fraction exclue, orcinol positive, est conservée.

Les données analytiques en acides aminés, oses, groupements sulfatés, des différentes étapes du traitement sont rassemblées dans le tableau n°7. On notera que le glycopeptide final, sur le plan amino-acide, correspond pour 52% aux acides aminés hydroxylés, thréonine et sérine et que l'ensemble proline, glycolle et alanine atteint 30%. Ces acides aminés sont largement dominants. La proportion en résidus amino-acides du glycopeptide correspond pour 14 résidus à 6 thréonine, 3 à 4 sérine, 2 proline, 2 alanine sur la base d'un résidu de glycine.

Le glycopeptide a fait alors l'objet de deux traitements :

- un traitement alcalin en milieu réducteur (borohydrure de sodium)
- une dégradation récurrente de Edman.

L'analyse des sucres avait permis de constater la présence de N-acétyl-D-galactosamine (6 à 7 résidus), de 14 résidus de N-acétyl-D-

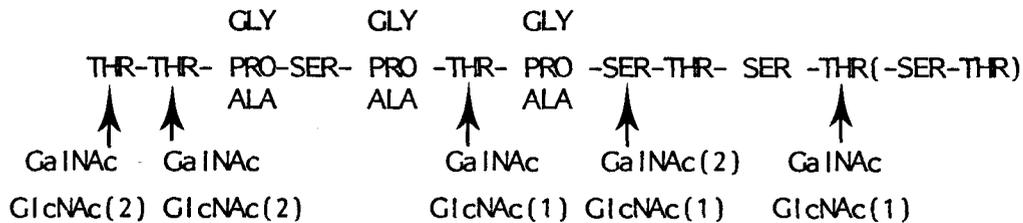
Tableau n°7 : Composition en acides aminés et sucres des glycopeptides DAU...
après hydrolyse papaine: pronase et oxydation périodique

:Glycopeptides DAU...pp(48-48):		: après 1 tour d'oxydation périodique :		: après 2 tours d'oxydation périodique :		: après 2 tours d'oxydation périodique + p/p 48h/8j :			
: % résidus	: µm/g :	: % résidus	: µm/g :	: % résidus	: µm/g :	: % résidus	: µm/g :		
: AS(X) :	7,58	: 3,82	54	: 3,03	71	: 1,34	22		
: THR :	17,21	: 30,78	432	: 29,71	691	: 33,87	562	6	
: SER :	15,69	: 17,47	245	: 19,85	463	: 18,09	300	3à4	
: GL(X) :	8,82	: 4,86	68	: 3,85	90	: 3,62	60		
: PRO :	8,57	: 12,43	174	: 11,73	274	: 12,92	214	2	
: GLY :	9,61	: 6,16	86	: 7,76	181	: 5,87	97	1*	
: ALA :	8,98	: 9,71	136	: 10,14	237	: 9,88	164	2	
: 1/2CYS :									
: VAL :	4,28	: 3,58	50	: 3,73	87	: 3,81	63		
: MET :									
: ILE :	2,43	: 2,12	30	: 1,89	44	: 1,98	33		
: LEU :	3,72	: 3,12	44	: 2,92	68	: 3,20	53		
: TYR :	1,85								
: PHE :	1,48								
: LYS :	4,04	: 2,04	29	: 1,71	40	: 1,93	32		34
: HIS :	2,38	: 1,69	24	: 1,77	41	: 1,57	26		
: ARG :	3,36	: 2,22	31	: 2,02	47	: 1,92	32		
: Total :			1402		2334		1658		
: % AA :	18,14	: 13,65		: 22,32		: 15,98			
: Fucose :	11,1	678	0,0	-	0,00	-	0,0	-	
: Mannose :	1,0	56	0,4	24	0,3	19	0	-	
: Galactose :	20,6	1745	20,9	1163	20,3	1126	25,5	1386	14
: Glucose :	1,8	99	1,0	56	1,0	56	0,2		
: GalNAc :	14,6	659	11,5	520	11,5	521	12,4	549	6à7
: GlcNAc :	19,1	863	25,2	1138	23,6	1067	30,6	1353	14
: acide sialique :	7,0	226	0,7	23	0,2	6	0,3	10	
: % sucres :	75,2		61,4		58,5		69		
: sulfates :			1,7	210	1,6	198			

*gly pris comme base unitaire pour l'établissement du rapport molaire acides aminés/sucres des glycopeptides ayant subi oxydation périodique (2 cycles) et protéolyse papaine 48h, pronase 8 jours

glucosamine et de 14 résidus de galactose. La base du calcul pour l'estimation des sucres du matériel étudié était le contenu en glycocolle. L'avantage de l'utilisation de la composition en acides aminés après chaque cycle de la dégradation de Edman est qu'il permet d'estimer en dehors de la disparition d'un acide aminé, la diminution également perceptible d'hexosamines lors de la "traversée" d'un site de branchement. Les résultats de la dégradation de Edman sont rassemblés dans le tableau n°8 :

La séquence déduite est la suivante :



Elle indique le départ des osamines. Elle rend compte de ce que les chaînes glycaniques résiduelles les plus longues après oxydation périodique (2 cycles) se trouvent en extrémité N-terminale du glycopeptide et que la majorité des résidus de thréonine et de sérine sont substitués par des chaînes osidiques.

L'analyse des résultats montre aussi que la séquence a été réalisée sur un mélange de glycopeptides et on notera que les positions des résidus d'alanine, de proline et de glycocolle sont a priori échangeables. Pour le même peptide, le traitement alcalin en milieu réducteur détruit 74% des résidus de thréonine et 58% des résidus de sérine. En fait, le nombre de μ moles d'acides aminés hydroxylés détruits correspond au nombre de μ moles de résidus de N-acétylgalactosamine séparément dosées et vérifiées en chromatographie en phase gazeuse. Ainsi la notion de glycopeptides de 14 résidus comportant 6 branchements a-t-elle été retenue (voir tableau n°7). On ajoutera que, sur 6 thréonines, nous attendions 4 à 5 résidus glycosylés et 4 sites thréonyl-O-glycosidiques sont mis en évidence et localisés. Pour la sérine, demeure une ambiguïté. Sur 3 à 4 résidus, on attendait 2 résidus glycosylés. Nous n'en localisons qu'un seul, le second pouvant se situer en toute extrémité C-terminale.

B - Etude des glycopeptides de mucines de LER...

En suivant un protocole tout à fait identique à celui décrit pour DAU..., un "mélange" de glycopeptides de LER... bronchitique chronique et

Tableau n°8 : Glycopeptide DAU... 2o.p. + pp 48 h:8 j : composition en acide aminé différentielle

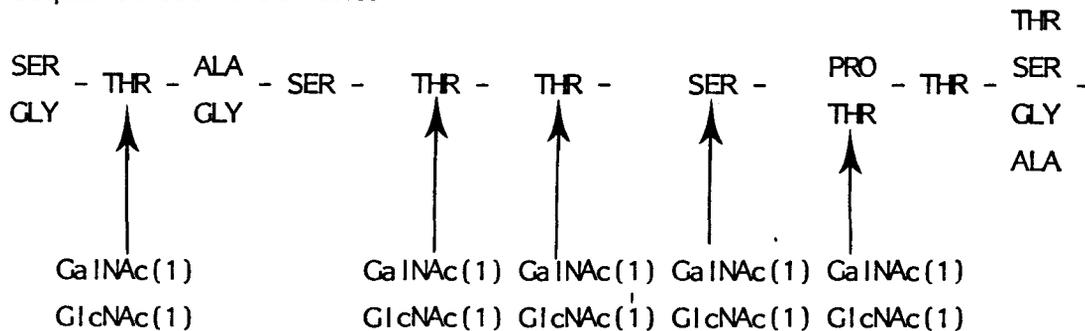
Départ	:Cycle n°1:		:Cycle n°2:		:Cycle n°3:		:Cycle n°4:		:Cycle n°5:		:Cycle n°6:		:Cycle n°7:	
	µm/g	résidus												
THR	561	6	1,49	1	1,16	1,84	1,7	1,36	1,36	1,36				
SER	300	3ã4												
PRO	214	2												
GLY	97	1												
ALA	164	2												
TOTAL	1336	14												
GlcNH ₂	819	8ã9												
GalNH ₂	598	6ã7	7	5	5	3ã4		4	3					
			5ã6	3ã4										
acide aminé déduit			THR*	THR*	PRO GLY ALA	SER	PRO GLY ALA	THR*	THR*	PRO GLY ALA				

		:Cycle n°8:		:Cycle n°9:		:Cycle n°10:		:Cycle n°11:		:Cycle n°12:		:Cycle n°13:	
THR	1,6	1,38	1,8	1,56	1,6	1,6							
SER													
PRO													
GLY													
ALA													
TOTAL													
GlcNH ₂	2	2	2	1									
GalNH ₂	2	2	2	1									
acide aminé déduit	SER*	THR	SER	THR*	(SER THR)								

Les acides aminés porteurs de * sont substitués par l'oligosaccharide résiduel

+ lorsque le taux de sérine ou de thréonine ne chute pas celui correspondant à la somme des résidus de glycolle, proline et alanine perd une unité

de groupe sanguin O a pu également faire l'objet d'une étude de séquence. La composition en acides aminés différentielle permet d'obtenir un peptide dont la séquence est la suivante :



Quatre résidus de thréonine ainsi qu'un résidu de sérine appartenant à ce glycopeptide, sont glycosylés. On notera la notion de proximité entre hydroxyamino-acides THR-THR-SER et un résidu de sérine non glycosylée précédant la touffe de glycosylation ; quant aux résidus de glycolle, d'alanine, de proline ils semblent être échangeables mais l'hétérogénéité peptidique de la préparation étudiée demande à vérifier cette observation.

Au total, cette déglycosylation partielle à l'aide de deux étapes d'oxydation périodique, cette protéolyse intense avant et après déglycosylation, nous ont permis d'isoler "des glycopeptides de mucine" minimum qui semblent bien correspondre à la notion de "touffe de glycosylation". Cette stratégie ne permettant pas l'obtention de fragments comportant un nombre élevé d'acides aminés, nous nous sommes tournés vers un autre type de déglycosylation qui utilise l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique. Par ces techniques, nous pouvons en effet espérer un respect de l'axe peptidique sur une plus grande longueur et une déglycosylation plus complète intéressant même le résidu de N-acétylgalactosamine impliqué dans la liaison. Cette méthode ne peut nous permettre de situer les points de branchement.

II - DEGLYCOSYLATION DES MUCINES A L'AIDE DE L'ACIDE FLUORHYDRIQUE (HF) OU DE L'ACIDE TRIFLUOROMETHANE SULFONIQUE (TFMS)

La déglycosylation par l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique offre l'avantage par un choix de conditions optimisées de :

- mener à une déglycosylation totale
- respecter l'intégrité du squelette peptidique et ainsi d'obtenir des peptides de taille suffisante et avec un rendement tel qu'il autorise des

études conduisant à l'identification de l'acide aminé en position N-terminale, à l'établissement de séquences amino-acides par dégradation de Edman et même à des recoupes par protéolyse limitée.

Les produits obtenus peuvent aussi être utiles, nous le montrerons, à la préparation d'anticorps dirigés contre le squelette amino-acide des mucines.

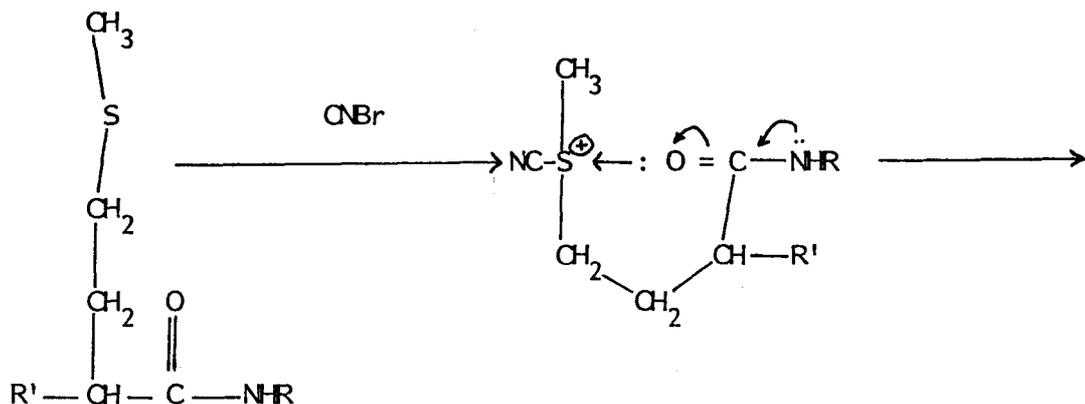
A - Mode d'action de ces acides

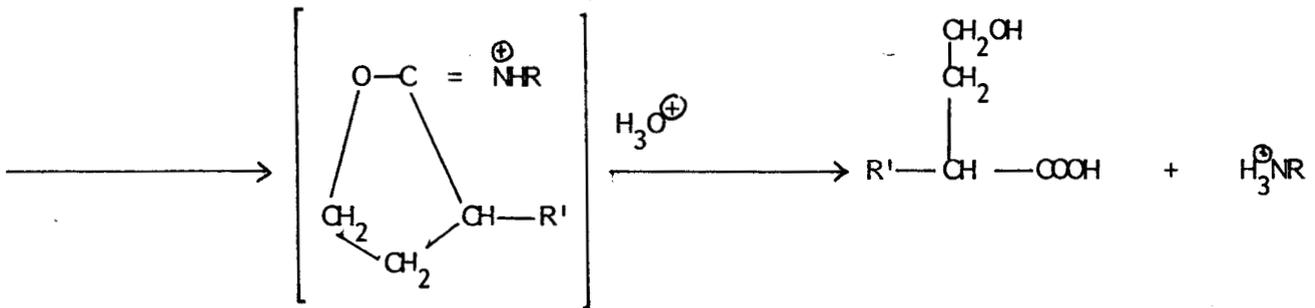
Les deux acides (HF et TFMS) ont des modalités d'intervention identiques sur la structure des glycopeptides. L'attaque principale en fonction de conditions d'utilisation douces (1 heure à 0°C) se situe essentiellement au niveau des liaisons inter-oses neutres ou entre oses neutres et oses acides (MORT et LAMPORT, 1977) (123), les liaisons O-glycosidiques intervenant entre osamines et acides aminés hydroxylés sont alors respectées. Lorsque les conditions de clivage sont plus sévères (3 heures à 23°C), la coupure entre osamine et acide aminé de branchement est alors obtenue.

La méthode peut donc apparaître idéale. Il faut cependant savoir que surviennent des alkylations secondaires d'acides aminés aromatiques par les composés glycosyl-fluorés générés par la solvolysse. Pour minimiser cette réaction, l'addition d'un agent de protection ou "scavenger" tel que l'anisole est efficace. Plusieurs phénomènes peuvent amener une modification de l'intégrité des axes peptidiques après déglycosylation :

1 - Coupure au niveau des résidus de méthionine

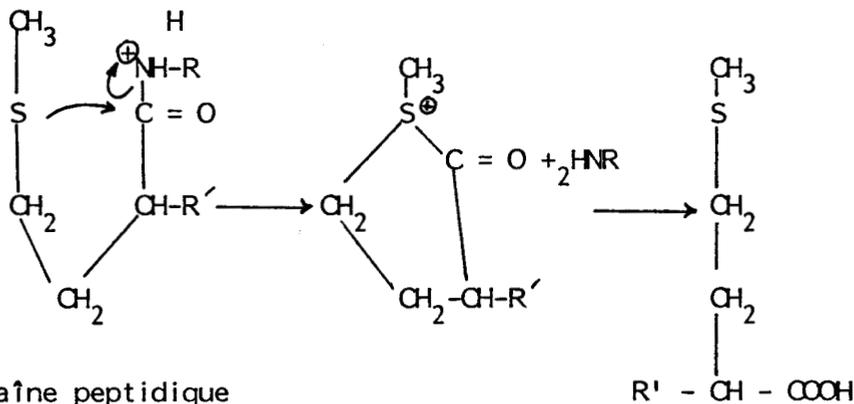
LENARD (1969) (106) a montré qu'un traitement par le HF en 12 heures à la température du laboratoire d'un dipeptide MET-GLY se traduisait par 67% de coupure de ce dipeptide. Le mécanisme de coupure est différent de celui du bromure de cyanogène :





Le thioester de la méthionine réagit avec le bromure de cyanogène pour former un ion sulfonium, ensuite lui-même éliminé pour donner naissance à un résidu d'homosérine en position C-terminale.

Dans le cas du HF, la méthionine n'est pas convertie en homosérine. L'atome de soufre agirait comme un agent nucléophile alors que l'azote protoné du peptide fait partie du groupement éliminé.

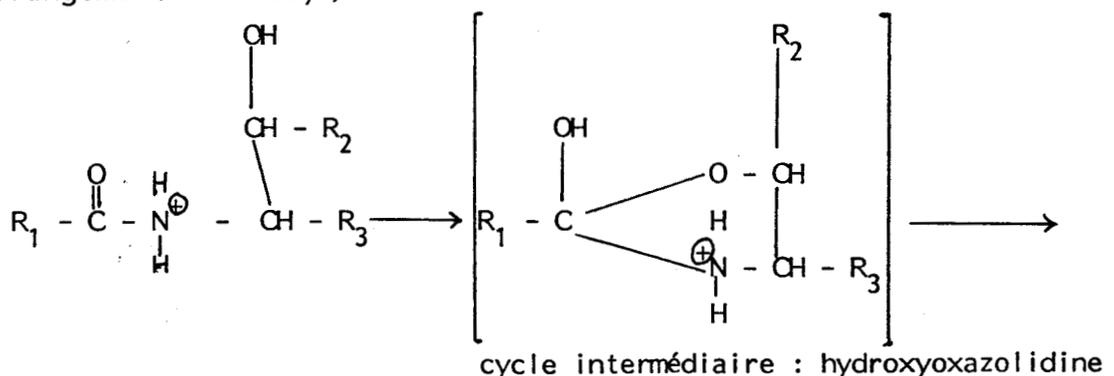


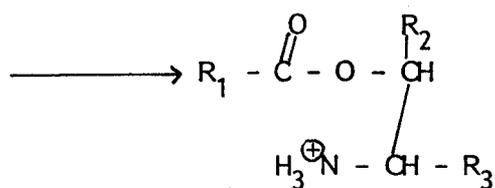
R,R' = chaîne peptidique

Le pourcentage de coupure varie en fonction des composés étudiés, et des conditions opératoires. Nous retiendrons que les coupures de la liaison peptidique intéressant les résidus de méthionine sont plus le fait de la durée du traitement que du facteur température.

2 - Modification des résidus de sérine et de thréonine

Au cours du traitement par le HF ou le TFMS, les résidus de sérine et de thréonine peuvent subir une transformation ou "N to O acyl shift" (réarrangement N O acyl)





Liaison ester

- R₁, R₃ = chaîne peptidique
- R₂ = H ou CH₃

La réaction génère une liaison ester et un groupement aminé libre avec pour intermédiaire réactionnel un anneau hydroxyoxazolidine (IWAI et ANDO, 1967 ; LENARD, 1969 (82,106)).

Ce processus est lent (12 à 15 heures). Il est de plus réversible en milieu alcalin. Le raccourcissement du temps de traitement apparaît donc comme une donnée allant vers une optimisation, tandis que la température sera augmentée dans un souci de compromis entre limitation des altérations de l'axe peptidique et déglycosylation la plus complète possible.

3 - Coupures par hydrolyse acide

Lorsque le traitement est appliqué à un matériel non totalement déshydraté, l'hydrolyse acide peut s'ajouter à la solvolysse et cliver le peptide. Pour limiter ce phénomène, les matériels traités seront soigneusement déshydratés. Le temps de contact sera réduit et la température réactionnelle sera augmentée dans les limites strictes de la déglycosylation souhaitée.

La littérature montre que de nombreuses glycoprotéines N-glycosidiques et O-glycosidiques ont été étudiées aux plans : structuraux, biologiques, immunologiques avant et après solvolysse. Les exemples abondent. Nous citerons : l'antigène carcino-embryonnaire (GLASSMAN et coll, 1978, PAXTON et SHIVELY, 1984 (48,130)), le noyau protéique du protéoglycane à chondroïtine sulfate de cartilage (COUDRON et coll, 1980 ; OLSON et coll, 1985 (27,128)), la fibronectine (GNIEWEK et coll, 1984 (50)), l'endopeptidase 24-11 (STEWART et coll, 1984) (178)), l'hormone lutéinisante (SAIRAM et SCHILLER, 1979 ; SAIRAM, 1980 ; SAIRAM et FLESHNER, 1981 ; BEWLEY et SAIRAM, 1985 (157,158,159,12)) ou la gonadotrophine chorionique (KALYAN et BAHL, 1981 ; THOTAKURA et coll, 1982 ; KALYAN et BAHL, 1983 ; KEUTMAN et coll, 1983 (87,185,88,90)) ou le récepteur de l'insuline (HERZBERG et coll, 1985) (70). Il ressort de ces travaux que la solvolysse :

- respecte l'axe peptidique
- ne modifie pas ou ne remanie pas profondément sa conformation
- n'altère pas sensiblement son caractère antigénique.

Dans le cadre des mucines, l'essentiel des travaux a eu pour but jusqu'ici la définition de la masse moléculaire du squelette peptidique support de l'édifice macromoléculaire.

Le tableau n°9 résume l'essentiel des résultats obtenus sur les mucines trachéobronchiques : soulignons les travaux de WOODWARD et coll (1983) (198) qui ont associé la déglycosylation chimique (TFMS) et enzymatique (N-acétylgalactosaminidase) pour obtenir une fraction peptidique partiellement déglycosylée où l'axe peptidique correspondait à 45000 daltons.

WOODWARD et DAVIDSON (1983) (198), MARIANNE et coll (1986) (117), WOODWARD et coll (1987) (199) ont essentiellement recherché l'optimisation expérimentale pour l'élimination des sucres en tenant compte du pourcentage initial de sucres dans le glycopeptide, de la nature des sucres, en particulier de la présence ou non de résidus d'acide sialique, enfin du nombre de branchements par unité peptidique.

B - Déglycosylation des mucines

Nous avons retenu la déglycosylation par le TFMS appliquée à des mélanges de glycopeptides obtenus par protéolyse de mucines trachéobronchiques provenant de 2 malades bronchitiques chroniques DUF... et LER... de groupe sanguin O (DEGAND et coll, 1972, 1973a (30,31)). Le protocole retenu est inspiré de celui proposé par EDGE et coll (1981) (40). Le schéma de la figure n°9 représente très succinctement ce protocole et les différents paramètres susceptibles d'intervenir dans la qualité et le rendement de la déglycosylation.

Nous rapportons nos résultats personnels d'une étude systématique de comparaison de qualité et de rendement en fonction :

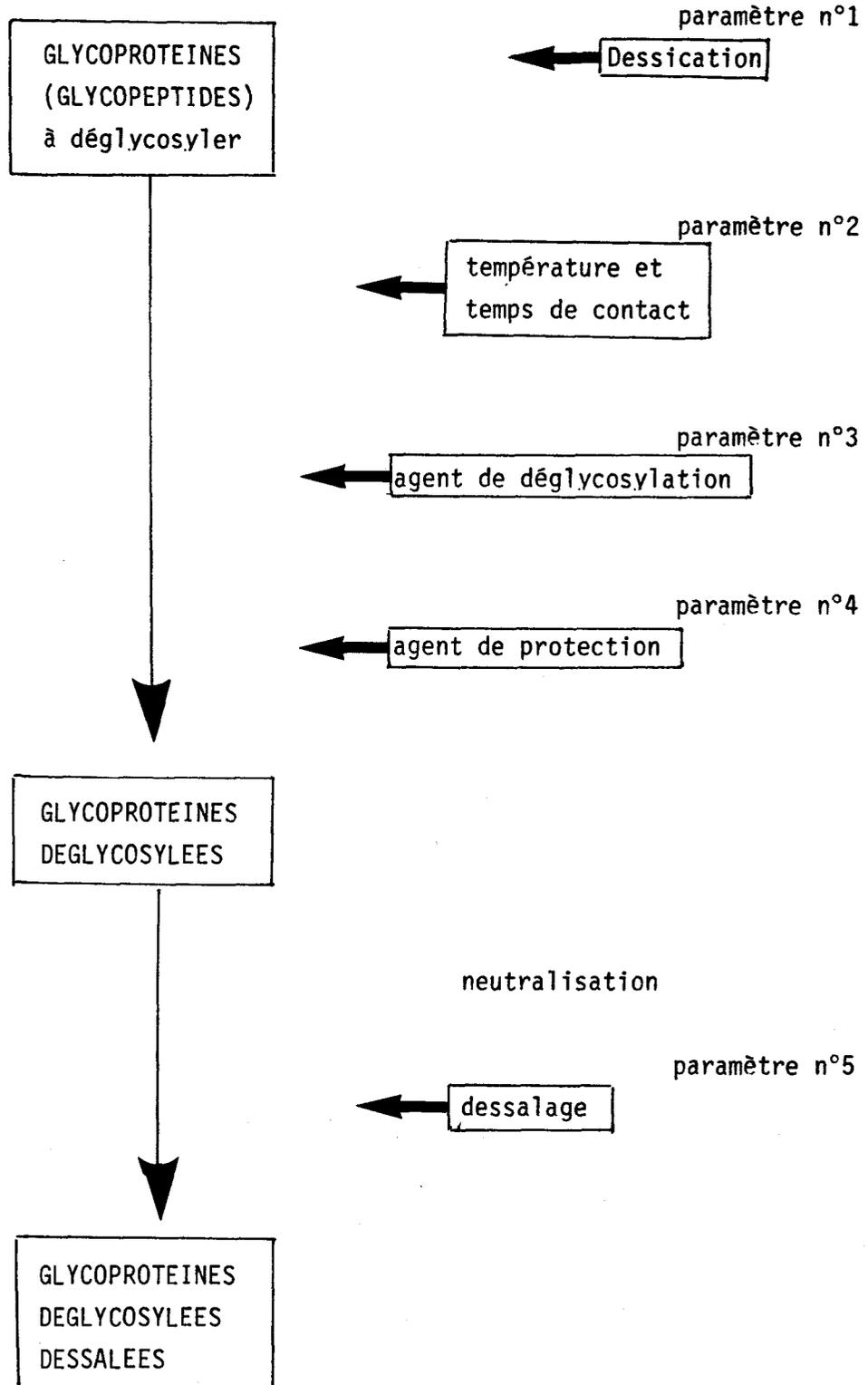
- des conditions de dessiccation du matériel à déglycosyler
- du facteur température et temps de contact
- du rapport TFMS / glycopeptides bronchiques
- des conditions d'élimination de l'agent de protection
- des conditions de neutralisation et de dessalage

Trois critères ont été retenus pour apprécier le résultat final :

Tableau n°9 : Etude de la déglycosylation chimique, de diverses mucines à l'aide de l'acide trifluorométhane sulfonique

GLYCOPROTEINES	AUTEURS	ANNEE	CONDITIONS EXPERIMENTALES	POURCENTAGE DE DEGLYCOSYLATION	INTEGRITE DE L'AXE PEPTIDIQUE
Mucines bronchiques humaines	WOODWARD et DAVIDSON	(1983) (198)	0°C 3à5h	Elimination de 65% des oses. Les osamines de liaison GalNAc restent en place	maintenue
Glycopeptides de mucus bronchique humain	MARIANNE et coll	(1986) (117)	25°C 45,90 et 150mn	45mn: Elimination des oses périphériques et 75% GalNAc (rapport TFMS:anisole de 3:2 et 2:1) 150mn : Elimination de 86% Gal, 33% des GalNAc (rapport TFMS:anisole de 1:1) Elimination du fucose, 97% Gal, 95% GlcNAc et il reste 1 GalNAc/5 acides aminés (rapport TFMS:anisole 3:2 et 2:1)	maintenue
Glycopeptides de mucines trachéales de chien réduites (C.T.M.)	WOODWARD et coll	(1987) (199)	- 0°C 3h - 0°C 3h puis 0°C 3à5h - 20°C 5h	- 500000 D → 110000 D - perte 100% Fucose et GlcNAc, 70% galactose, moins de 40% de GalNAc - perte de 80 à 90% du poids de la CTM désialilée - il reste des GalNAc	Altération d'acides-amino (Ser, Thr, Glu, Asp)
Glycopeptides de mucines trachéales humaines réduites et délipidées (H.L.M.)	WOODWARD et coll	(1987) (199)	- 0°C 3à4h - 0°C 3à4h puis 0°C 5h	- perte de 60% du poids (masse moléculaire 96000 D) - perte de 74% du poids de 99% des oses neutres, 85% des acides sialiques, 98% des GlcNAc et 58% des GalNAc - la perte de GalNAc augmente encore si la mucine est désialylée avant	maintenue

Figure n°9 : Paramètres étudiés lors de la déglycosylation des glycoprotéines de mucus trachéobronchique humain par l'acide trifluorométhane sulfonique



- le rendement de peptide déglycosylé : nous l'avons calculé en mesurant le nombre de nanomoles d'acides aminés obtenues après traitement par rapport à celui des nanomoles d'acides aminés traitées. Ce paramètre permet de faire une évaluation quantitative mais aussi qualitative (sélection éventuelle de matériel résistant) du processus de déglycosylation.

- le pourcentage de déglycosylation : il correspond à une qualité relative d'osamines rémanentes obtenues après déglycosylation et ceci par rapport au nombre d'osamines du produit non traité. La glucosamine évalue la déglycosylation des chaînes périphériques, la galactosamine témoigne de l'élimination des points de branchement au peptide (malade de groupe sanguin O).

- l'intégrité de l'axe peptidique : les pourcentages respectifs de chacun des acides aminés dosés avant et après traitement permettent une appréciation du maintien des qualités de l'axe peptidique. Cependant, pour mieux percevoir des variations minimales portant sur les acides aminés les moins représentés et susceptibles d'altérer en particulier la longueur de cet axe peptidique il nous a paru nécessaire de tenir compte des rapports molaires entre les acides aminés et donc de définir un résidu de base 1. L'analyse de nombreuses compositions en acides aminés nous a permis de porter notre choix sur l'histidine, une double vérification pouvant être fournie par l'étude des rapports molaires à la valine.

1 - Déshydratation initiale des glycopeptides : qualité/rendement

Deux conditions de traitement des poudres lyophilisées de glycopeptides ont été retenues, à savoir un passage, sous vide partiel, à 56°C pendant 4 jours ou à 100°C pendant 24 heures.

- 56°C : cette température devrait, en principe, conserver l'intégrité de l'axe peptidique

- 100°C : cette température devrait permettre a priori une dessiccation complète.

De l'analyse des résultats (Tableau n°10) il ressort que, quelles que soient les conditions de dessiccation, les résidus de sérine et de thréonine sont maintenus à environ 45% des acides aminés dosés avant ou après déglycosylation.

Aussi cette étude préliminaire nous a-t-elle amené à utiliser un traitement à 56°C sous vide partiel pendant 4 jours, en présence de pentoxyde de phosphore.

Tableau n°10 : Etude du paramètre "dessiccation" sur la déglycosylation chimique de glycopeptides de mucus DUF... (de groupe sanguin O)

avant traitement		** 56°C/0°C/4h		** 100°C/0°C/4h		** 56°C/25°C/2h		** 100°C/25°C/2h	
résidus▲	µm/g	résidus	µm/g	résidus	µm/g	résidus	µm/g	résidus	µm/g
AS(X)	2	76	38	3	53	2 à 3	53	2	46
THR	15	509	363	17	331	18 à 19	395	17 à 18	345
SER	7 à 8	255	174	9	169	8 à 9	182	8	167
GL(X)	3	94	62	4	77	3 à 4	78	3	65
PRO	7	231	162	7 à 8	148	8 à 9	185	8	159
GLY	4	120	85	4 à 5	101	4 à 5	97	4 à 5	91
ALA	4 à 5	152	108	5	104	6	123	5	106
VAL	2	67	49	2 à 3	51	3	57	2 à 3	51
MET	0	6	7	0	5	0	7	0	6
CYS	0	6	-	0	4	0	7	0	5
ILE	1	36	28	2	31	1 à 2	33	1 à 2	29
LEU	2	59	45	2 à 3	53	2 à 3	55	2 à 3	48
TYR	-	-	4	-	8	-	8	-	8
PHE	1	19	16	1	21	1	19	1	17
LYS	1	14	10	1	18	1	12	1	11
HIS*	1*	34	19	1*	19	1*	21	1*	20
ARG	1	30	22	1	26	1	18	1	25
Total µm/g	-	1696	1185	-	1210	-	1336	-	1188
Total résidus▲	51 à 53	61 à 63	-	60 à 63	-	59 à 67	-	56 à 61	-
Total OHAA▲	22 à 23	(43%)	(45%)	26	(42%)	26 à 28	(43%)	25 à 26	(43%)
GlcNH ₂ ▲	29	978	244	11	211	2	37	1 à 2	32
Ga1NH ₂ ▲	14	473	263	11 à 12	224	5	112	4 à 5	29

▲ Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

** La 1ère température est la température de dessiccation, la deuxième, celle de la déglycosylation.

2 - La température de déglycosylation et le temps de contact

LENARD et coll (1969) (106) ont montré que l'intensité de déglycosylation est fonction de la température. Ces mêmes auteurs signalent que les modifications de l'axe peptidique sont proportionnelles au temps de contact. Il serait donc en théorie bénéfique :

- d'augmenter la température de déglycosylation
- de diminuer le temps de contact pour minimiser les coupures secondaires.

Dans notre approche préliminaire, nous avons testé les températures suivantes : 0°C, 25°C, 30°C et 35°C pendant des temps de contact allant de 30 minutes à 24 heures.

Les tableaux n°11 et 12 rassemblent les éléments analytiques obtenus avant et après différents protocoles.

Lorsque la déglycosylation est réalisée à 0°C, le temps de contact ne remet pas en cause l'intégrité de l'axe peptidique. Le nombre total de résidus par rapport au témoin reste sensiblement le même : 51 à 53 résidus amino acides pour 55 résidus avant traitement. Les hydroxyamino-acides totaux ne sont pas modifiés. Seule la N-acétylglucosamine est affectée. Elle passe de 32 résidus à 18 pour un temps de contact de 4 heures. A 25°C, le nombre total de résidus amino-acides est encore respecté après 3 heures de traitement. Il se modifie progressivement entre 3 heures et 6 heures pour se stabiliser à 24 heures entre 39 et 43 résidus. Du point de vue qualitatif, les hydroxy amino-acides, et plus particulièrement la thréonine, sont affectés au-delà de 3 heures. La chute de la N-acétylgalactosamine passe de 65% en 3 heures à 89% en 6 heures puis à 94% en 24 heures. A 30°C, 89% de rendement de déglycosylation sont obtenus en 4 heures. A 35°C, ce même pourcentage est obtenu en 2 heures.

De l'ensemble de ces résultats, nous retiendrons que les conditions optimales semblent être représentées par un temps de contact de 3 heures pour une température réactionnelle de 25°C. Ces conditions offrent en effet l'avantage de maintenir à son maximum l'intégrité de l'axe peptidique. Toute augmentation de la température réactionnelle, si elle permet de raccourcir le temps de contact pour un même rendement de déglycosylation, se traduit par une perte de l'intégrité du peptide déglycosylé. Apparaissent donc particulièrement sensibles lors d'une élévation de température les résidus de sérine et surtout de thréonine qui viennent de perdre leur résidu O-galactosaminyl.

Tableau n°11 : Déglycosylation de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)
après dessiccation à 56°C : cinétique de durée de contact réactionnel à 0°C

	Témoïn		0°C					
	résidus▲	µm/g	2h résidus	µm/g	3h résidus	µm/g	4h résidus	µm/g
AS(X)	3	60	2	17	2	28	2	26
THR	14	308	14	133	13	156	14	190
SER	8	170	8	75	8	93	8	107
GL(X)	3	64	3	25	3	42	3	38
PRO	6	137	7	64	6	77	6	88
GLY	4	96	4	41	5	58	4	58
ALA	5	113	5	46	5	59	5	69
VAL	2	51	2	21	2	28	2	29
MET	0	5	0	2	-	-	0	3
CYS	0	0	0	3	0	1	0	4
ILE	1	24	1	10	1	15	1	15
LEU	2	42	2	18	2	29	2	28
TYR	1	12	0	3	0à1	7	0	5
PHE	1	16	1	7	1	11	1	9
LYS	2	49	1	9	1	14	1	13
HIS*	1*	22	1*	9	1*	12	1*	14
ARG	2	46	1	12	1	17	1	17
GlcNH ₂ ▲	32	702	25	237	21	255	18	237
GalNH ₂ ▲	17	377	17	164	15	184	16	218
Rendement déglycosyl./ % galNAC clivé:	-		0		10		8	
Nombre de ré- sidus AA total:	55		53		51 à 52		51 à 52	
AA g/100g	12,33		4,86		6,44		7,01	
Nombre de ré- sidus hydroxy- amino-acides	22		22		21		22	

▲Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Tableau n° 12 : Déglycosylation de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)
après dessiccation à 56°C, cinétiques de temps et de températures.

	Témoïn		25°C				30°C				35°C							
	résidus	µm/g	rés.	µm/g	rés.	µm/g												
AS(X)	3	60	2	28	3	141	3	3,2	2	124	3	1,9	2	1,7	3à4	2,3	3	3,4
THR	14	306	14	207	13	683	10	10,4	10	636	8	6,0	7	5,3	9	6,0	8	9,4
SER	8	170	8	116	7	366	7	7,3	6	363	7à8	5,5	7	5,3	8	5,4	7à8	8,5
GL(X)	3	64	3	40	4	199	4	3,8	3	181	3	2	3	2,4	2	1,3	2	2,1
PRO	6	137	7	95	7à8	392	5	5,3	5à6	356	5	4	3	2,5	4	2,6	4	4,5
GLY	4	96	4à5	63	5	249	4à5	4,7	4	281	5	4	6	5,0	6	3,8	6	6,2
ALA	5	113	5	74	5	266	4	4,2	4	285	4	3,0	4	3,1	4	2,9	4	5,0
VAL	2	51	2	31	2	108	2	2,1	1à2	95	2	1,5	2	1,6	3	2,2	3	3,0
MET	0	5	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ILE	1	24	1	16	1	58	1	1	1	53	1	0,8	1	1,1	1	0,6	1	1,1
LEU	2	42	2	27	2	103	2	1,7	1	87	1à2	1,1	2	1,9	1	1,0	1	1,9
TYR	1	11	-	6	0à1	26	0à1	0,6	0à1	34	1	0,5	1	0,9	-	-	1	0,8
PHE	1	16	-	9	0à1	30	1	1,2	0	23	1à2	1,1	2	1,5	-	-	1	0,9
LYS	2	49	1	15	1	36	1	0,9	0à1	36	1	0,7	1	1,1	1	0,7	1	1,1
HIS*	1*	22	1*	14	1*	52	1*	1	1*	64	1*	0,7	1*	0,8	1*	0,7	1*	1,3
ARG	2	46	1	20	1	71	1	0,9	1	62	-	-	-	-	-	-	-	-
GlcNH ₂ ▲	32	702	4	60	1à2	79	1	1,0	1	63	2	1,2	3	2,5	2	1,2	0	0,3
GalNH ₂ ▲	17	377	7	98	6	321	2	1,8	1	50	3	2,3	2	1,7	2	1,3	1	1,1
Rendement: déglycos./ % GalNAC clivé	-		59		65		89		94		82		89		89		94	
Résidus AA: total▲	55		51 à 52		52 à 54		46 à 48		39 à 43		43 à 46		42		43 à 44		43 à 44	
Nombre de résidus▲ hydroxylés:	22		22		20		17		16		15 à 16		14		17		15 à 16	

▲ Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Enfin, les conditions optimales permettent aussi d'éliminer 97% de la N-acétylglucosamine constitutive des chaînes glycosidiques périphériques. Les conditions retenues permettent d'obtenir un rendement en peptide de 20 à 25%.

3 - Rapport matériel glycopeptidique : agent de déglycosylation (TFMS)

Nous avons déjà souligné que la qualité de dessiccation obtenue dans la réaction dépend de la quantité de matériel traité. La poudre doit en effet être "étalée" pour permettre un échange maximal avec l'environnement. Deux conditions-tests ont été retenues et étudiées pour apprécier le rendement en fonction du rapport glycopeptide/milieu réactionnel :

- 1,7mg / pour 1ml de milieu réactionnel (TFMS/anisole) (2:1)(v:v)
- 10mg / pour 1ml de milieu réactionnel.

Bien que la réaction de déglycosylation par l'acide trifluorométhane sulfonique soit une solvolysse et, par conséquent, plus aisée si le rapport matériel sur milieu réactionnel est faible, nous n'avons pas observé de variations significatives de la qualité mais aussi du rendement de déglycosylation du matériel. Pour des raisons de commodité, (quantité de matériel traité supérieure, donc plus de peptides en fin de réaction), nous avons ultérieurement utilisé le rapport :

10mg pour 1ml de milieu réactionnel.

4 - Conditions d'élimination de l'anisole

L'anisole utilisé lors de la réaction de déglycosylation, joue un rôle protecteur de l'axe peptidique. Il est ajouté au TFMS à raison de 1 volume pour 2 volumes d'acide. Son élimination par l'éther (anhydre et conservé sur agent desséchant) n'est cependant pas totale en une seule étape et elle demande à être répétée. La présence, en effet, d'anisole résiduel dans la fraction de glycopeptides déglycosylés est une source majeure de difficultés. Il gêne dans le repérage densitométrique ultra-violet des peptides après chromatographie et la lyophilisation des poudres. Il participe aux problèmes de resolubilisation des glycopeptides déglycosylés après lyophilisation.

5 - Neutralisation et dessalage

Le matériel déglycosylé après élimination de l'anisole doit être neutralisé par la pyridine aqueuse à 50% pour stopper la réaction de solvolysse.

Cette étape nécessite un refroidissement à très basse température (bain-marie d'alcool réfrigéré) pour éviter la dégradation des peptides.

* La quantité considérable des sels de trifluorométhane sulfonate de pyridium oblige, pour leur élimination, à réaliser des dialyses nombreuses contre l'eau désionisée.

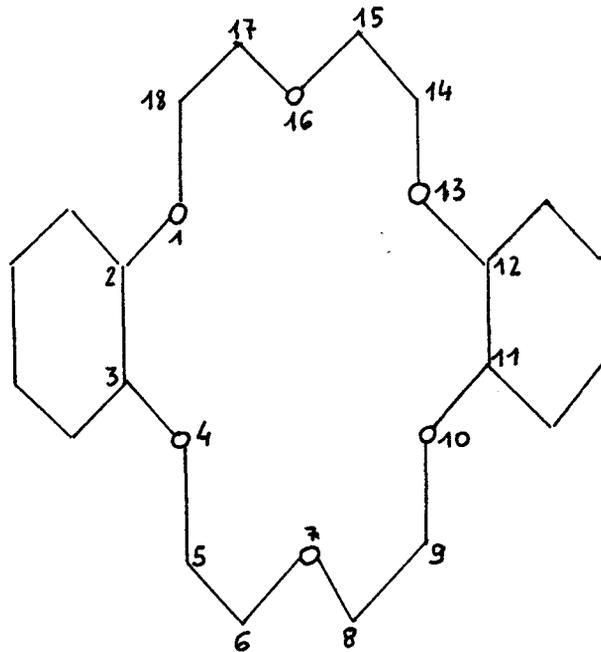
L'utilisation de membranes de cellophane, si elle minimise les risques de perte de peptides, ne les élimine pas totalement. Nous avons été amenés à optimiser le dessalage en adoptant les conditions suivantes :

- une dialyse sous un volume de 500ml, sous agitation et à température ambiante
- un changement fréquent des bains de dialyse en fonction d'un suivi de la valeur de la conductivité des dialysats
- le contrôle de la conductivité de l'adialysable et la lyophilisation
- une nouvelle dialyse du lyophilisat à travers une nouvelle membrane, le suivi du protocole étant le même.

Ainsi, dans ces conditions, le rendement de dialyse et d'élimination des sels peut-il atteindre plus de 95%. Le recours à une autre approche que la dialyse apparaissant nécessaire pour le dessalage final, nous avons testé :

* La chromatographie liquide haute performance sur colonne C₁₈ SEP-PAK Waters qui a en effet permis l'élimination totale des sels mais a livré un rendement très faible en peptides (1 à 5% du matériel peptidique déposé).

* L'élimination des sels en phase organique a été envisagée dans le cas de réactions entre des composés hydrosolubles et des composés organiques non hydrosolubles. Certains auteurs ont préconisé l'utilisation de catalyseurs de transfert de phases. Parmi ces catalyseurs, des composés appelés "éthers-couronnes" ont pu être envisagés. Ce sont des polyéthers macrocycliques. Ils forment des complexes cristallins stables avec certains cations (Na, K, NH₄...) qui sont alors "emprisonnés" au centre de la couronne et deviennent extractibles en phase organique. Le cation "tombe" alors au centre de la couronne et y est maintenu grâce aux forces électrostatiques existant entre les atomes d'oxygène formant l'anneau polyéther et le cation à extraire (PEDERSEN, 1971 ; JONES, 1976) (134,85). Les "éthers-couronnes" possèdent des cavités de différents diamètres au centre des anneaux poly-éthers et les rapports molaires des complexes "poly-éther:cation" varient en fonction des dimensions de ces cavités et des cations. Ainsi le 18-Crown-6 réagit mole à mole avec le cation ammonium NH₄⁺.



Les meilleurs agents complexants sont ceux ayant de 15 à 24 atomes dont 5 à 8 oxygènes. Les complexes formés sont plus solubles dans les solvants que "l'éther-couronne" seul. Les "éther-couronnes" sont en général solubles dans le dichlorométhane et le chloroforme. Ainsi, lors des études de dessalage que nous avons menées, différents agents de dissolution des "éthers-couronnes" et d'extraction des complexes ont été testés (éther ; dichlorométhane ; chloroforme). "L'éther-couronne" peut être récupéré à partir du complexe. Il doit être pour cela chauffé dans un large excès d'eau et réextrait par un solvant tel que le toluène. Un "éther-couronne" particulier s'associe fortement avec un nombre restreint de cations et plus faiblement avec d'autres. Le 18-Crown-6, par exemple, lie le sodium, le potassium et plus faiblement le lithium. Nous avons utilisé ce système "d'éther-couronne" pour compléter la série de dialyses contrôlées qui avaient amené plus de 95% d'élimination des sels de pyridinium. Une étude systématique d'autres agents de neutralisation que la pyridine avait été entreprise : soude, ammoniacque... Le meilleur système solvant-base utilisé avec le 18-Crown-6 s'est révélé être une neutralisation du TFMS par la soude avec extraction en phase organique des sels par le chloroforme. Cependant, le coût des "éthers-couronnes" nous a fait reculer devant ce protocole et a limité l'utilisation du procédé à l'élimination terminale des sels de pyridinium.

* La précipitation du peptide déglycosylé.

La précipitation, à froid, par l'acétone, du peptide déglycosylé s'est révélée être aussi une bonne technique, complémentaire des techniques de dessalage précédemment décrites. Nous avons utilisé l'acétone anhydre à raison

de 1ml pour 10mg de matériel partiellement dessalé. Celui-ci a été solubilisé dans l'acétone et conservé 3 fois 24 heures à -20°C avec 3 centrifugations de 5 minutes à 0°C et à 3000 t/minute. Le rendement de dessalage, exprimé en nanomoles d'acides aminés obtenus par rapport aux nanomoles d'acides aminés attendus à l'issue de la première étape de dessalage s'avère être satisfaisant.

En conclusion de ces études critiques systématiques, le protocole finalement retenu a été le suivant :

- lyophilisation des glycopeptides obtenus par protéolyse des mucines
- dessiccation 4 jours à 56°C sous vide partiel en présence d'anhydride phosphorique
- préparation à -50°C du milieu réactionnel constitué de TFMS-anisole à raison de 2 volumes d'acide pour un volume d'agent protecteur
- contact avec le produit à déglycosyler pendant 3 heures à 25°C
- extraction de l'anisole par de l'éther anhydre porté à -60°C
- neutralisation par de la pyridine aqueuse à 50% à basse température
- dessalage associant une série de dialyses contrôlées et une succession de précipitations acétoniques des peptides déglycosylés.

C - Analyse des produits de déglycosylation

Différentes approches analytiques des produits déglycosylés ont été utilisées pour rendre compte de la qualité des peptides de mucines obtenues.

1 - Analyse en gel de polyacrylamide

Nous avons utilisé la technique décrite par LAEMMLI (1970 (96), à savoir un gel de gradient 5-30% en présence de SDS. Les fractions peptidiques sont testées quant à l'homogénéité de leurs tailles moléculaires après révélation par le bleu de Coomassie. Le résultat obtenu est celui d'une traînée "bleu Coomassie positive" objectivant toute une série de sous-populations peptidiques.

La coloration par le noir Soudan selon le protocole de PRATT et LAMY (1969) (143) s'est révélée positive laissant entendre la possibilité d'une contamination lipidique des peptides étudiés qui pourrait être à l'origine des difficultés de migration électrophorétique.

Nous verrons ultérieurement que cette observation a été mise à profit pour éliminer les lipides par une étape additionnelle d'extraction.

2 - Traitement alcalin

Dans le but de suivre la déglycosylation, le traitement alcalin s'est révélé être aussi d'un grand intérêt. Ce traitement est réalisé par la soude 0,5N pendant 24 heures à température du laboratoire sur le matériel natif et sur le produit déglycosylé. Les résultats sont rassemblés dans le tableau n°13. Différents éléments peuvent être notés :

- la stabilité analytique de toute une série de résidus acides aminés tels que la valine, l'histidine, l'isoleucine, le leucine, la tyrosine, la phénylalanine...

- la stabilité relative des résidus d'acides aminés hydroxylés tant à 0°C qu'à 25°C, quel que soit le temps : 30 minutes, 1 heure, 1 heure 30 minutes et 2 heures

- l'élimination de la galactosamine au cours de la déglycosylation selon des critères déjà décrits

En fait lorsque le traitement des glycopeptides par le TFMS précède le traitement alcalin, l'interprétation est la suivante :

si l'action du TFMS a suffisamment éliminé les oses périphériques (comme en témoigne le pourcentage de glucosamine), le traitement alcalin trouve un rendement supérieur à celui observé lorsqu'il est réalisé seul, vraisemblablement en augmentant l'accessibilité de l'agent alcalin aux galactosamines de liaison. Cependant la température de déglycosylation a son importance, car la déglycosylation à 0°C n'augmente pas ensuite l'efficacité du traitement alcalin au contraire d'une déglycosylation réalisée à 25°C.

III - ETUDE COMPARATIVE DE LA DEGLYCOSYLATION DES SOUS-POPULATIONS GLYCOPEPTIDIQUES DE MUCINES DANS LES CONDITIONS STANDARDS

Les résultats précédemment rapportés concernaient la mise au point de conditions de déglycosylation sur un "mélange" de glycopeptides de mucines. Or la structure des chaînes osidiques, leur acidité relative (substitution par des résidus d'acide sialique, substitution par des groupements sulfatés) laissent supposer une sensibilité réactionnelle au TFMS différente.

Nous avons donc voulu encore optimiser les conditions de déglycosylation en les adaptant aux glycopeptides de mucines au regard de leur acidité relative.

Tableau n°13 : Etude de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)
par traitement alcalin et déglycosylation chimique.

	: témoin avant :		: 0°C 2h :				: 0°C 3h :				: 25°C 30mn :				: 25°C 1h :					
	: NaOH 0,5N :		: avant NaOH :		: après NaOH :		: avant NaOH :		: après soude :		: avant :		: après :		: avant :		: après :			
	: résidus	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :	: rés.	: µm/g :		
: AS(X)	: 3	: 60	: 3	: 83	: 2	: 17	: 3	: 42	: 2	: 28	: 2	: 47	: 2	: 15	: 2	: 28	: 2	: 24	: 3	: 49
: THR	: 14	: 308	: 5à6	: 167	: 14	: 133	: 4à5	: 71	: 13	: 156	: 5	: 96	: 11	: 62	: 3à4	: 43	: 14	: 169	: 6	: 118
: SER	: 8	: 171	: 3à4	: 107	: 8	: 75	: 4à5	: 70	: 8	: 93	: 3	: 56	: 8	: 47	: 3	: 39	: 8	: 96	: 4	: 70
: GL(X)	: 3	: 64	: 4	: 118	: 3	: 25	: 4	: 66	: 3	: 42	: 3	: 55	: 4	: 22	: 3	: 36	: 3	: 32	: 3	: 61
: PRO	: 6	: 137	: 4à5	: 130	: 7	: 64	: 6	: 91	: 6	: 77	: 4à5	: 89	: 5	: 31	: 4	: 50	: 6	: 76	: 5	: 96
: GLY	: 4	: 96	: 5	: 142	: 4	: 41	: 6	: 96	: 5	: 58	: 3à4	: 72	: 6	: 35	: 4	: 49	: 4à5	: 53	: 4	: 74
: ALA	: 5	: 113	: 3	: 84	: 5	: 46	: 4	: 60	: 5	: 59	: 3	: 58	: 5	: 27	: 2à3	: 29	: 5	: 58	: 3à4	: 62
: VAL+	: 2+	: 51	: 2+	: 60	: 2+	: 21	: 2+	: 31	: 2+	: 28	: 2+	: 40	: 2+	: 14	: 2+	: 24	: 2+	: 26	: 2+	: 37
: MET	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -
: CYS	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -
: ILE	: 1	: 24	: 1	: 24	: 1	: 10	: 1	: 17	: 1	: 15	: 1	: 22	: 1	: 7	: 1	: 9	: 1	: 14	: 1	: 19
: LEU	: 2	: 42	: 1	: 30	: 2	: 20	: 2	: 31	: 2	: 29	: 2	: 36	: 2	: 13	: 1à2	: 17	: 2	: 24	: 2	: 35
: TYR	: 1	: 11	: 1	: 17	: -	: -	: 1	: 10	: -	: -	: 0à1	: 9	: -	: -	: 0à1	: 5	: -	: -	: 0à1	: 10
: PHE	: 1	: 16	: 1	: 23	: 1	: 7	: 1	: 14	: 1	: 11	: 1	: 14	: 1	: 6	: 1	: 10	: 1	: 8	: 1	: 15
: LYS	: 2	: 49	: 1à2	: 46	: 1	: 9	: 1	: 15	: 1	: 14	: 1	: 15	: 1	: 7	: 1	: 8	: 1	: 11	: 1	: 15
: HIS*	: 1*	: 22	: 1*	: 17	: 1*	: 9.5	: 1*	: 12	: 1*	: 12	: 1*	: 11	: 1*	: 6	: 1*	: 7	: 1*	: 12	: 1*	: 11
: ARG	: 2	: 46	: 1à2	: 42	: 1	: 12	: 1	: 20	: 1	: 17	: 1	: 21	: 1	: 7	: 1	: 10	: 1	: 14	: 1	: 21
: Total rés▲	: 55	: 36 à 41	: 53	: 41 à 43	: 51	: 32 à 35	: 51	: 29 à 34	: 51	: 29 à 34	: 51	: 29 à 34	: 51	: 29 à 34	: 51	: 37 à 39				
: GLCNH ₂ ▲	: 32	: 702	: 17	: 510	: 25	: 237	: 16à17	: 257	: 21	: 255	: 9	: 183	: 8	: 46	: 5	: 62	: 5	: 69	: 3à4	: 66
: GALNH ₂ ▲	: 17	: 377	: 6	: 182	: 17	: 164	: 9	: 137	: 15	: 184	: 7à8	: 151	: 11	: 66	: 5à6	: 65	: 13	: 151	: 7	: 129
: AA hydro- xylés▲	: 22	: 8 à 10	: 22	: 8 à 10	: 21	: 8			: 19	: 6 à 7	: 22	: 10								
: AA g/100g:	: 12,23	: 11,06	: 4,86	: 6,46	: 6,44	: 6,55	: 3,04	: 3,62	: 6,19	: 6,99										
: % galacto- samine éliminée ->% effi- cacitéΔ	: -	: 65	: (a) 0	: (b) 47	: (a) 12	: (b) 46	: (a) 35	: (b) 33	: (a) 24	: (b) 35	: 47	: 58	: 68	: 59						
: % gluco- samine éliminée	: 47	: 22	: 27	: 34	: 37,5	: 75	: 9	: 84	: 5	: 49	: 71,5	: 84	: 89							

▲ Les calculs ont été effectués en utilisant comme double base *1'Histidine et la +Valine
Δ % de galactosamine éliminée après déglycosylation chimique (a) et traitement alcalin (b)

Tableau n° 13 (suite) Etude de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin O) par traitement alcalin et déglycosylation chimique.

		25°C 1h30		25°C 2h		
		avant NaOH		après NaOH		
		avant NaOH		après NaOH		
	résidus▲	µm/g	résidus	µm/g	résidus	
AS(X)	3	47	5	108	2	
THR	14	227	7	160	14	
SER	8	135	5	116	8	
GL(X)	3 à 4	61	4	95	3	
PRO	6	103	4	95	7	
GLY	5	83	5	118	4 à 5	
ALA	5	86	2 à 3	59	5	
VAL+	2+	38	2+	45	3	
MET	-	-	-	-	2+	
CYS	-	-	-	-	-	
ILE	1	23	1	29	-	
LEU	2	43	2	53	1	
TYR	1	11	1	19	2	
PHE	1	13	1	22	1	
LYS	1	21	1	26	1	
HIS*	1*	17	1*	15	1*	
ARG	1	28	1 à 2	34	1	
Total AA ▲	54 à 55		42 à 44		51 à 52	
GlcNH ₂ ▲	4 à 5	76	3	61	4	
GalNH ₂ ▲	10	169	5	112	7	
AA hydroxylés▲	22		12		22	
AA g/100g	9,38		10,22		7,53	
% galactosamine éliminée	(a) 41	+	(b) 30	(a) 59	+	
= efficacité▲	71		82		23	
% glucosamine éliminée	86	+	5	87,5	+	
	91		93,5		6	
						39 à 40
						2
						3
						11
						9,50
						(b)
						23
						82
						6

▲ Les calculs ont été effectués en utilisant comme double base *1'Histidine et la +Valine
 ▲% de galactosamine éliminée après déglycosylation chimique (a) et traitement alcalin (b)

Ainsi les glycopeptides pronasiques de mucus ont-ils été fractionnés sur DEAE Sephadex-A25 lors d'une étape préalable (appendice technique). Après dialyse et lyophilisation, chacune des fractions de glycopeptides (Figure n°10) a été soumise séparément à la déglycosylation chimique en TFMS à 25°C pendant 3 heures et dans un rapport glycopeptides / TFMS de 10mg/ml.

La composition en acides aminés nous a permis de calculer la longueur moyenne du squelette peptidique de chaque fraction éluée au cours du gradient discontinu. La teneur en N-acétylgalactosamine étant le témoin des branchements osidiques, sa diminution a été suivie et considérée comme un critère d'efficacité de la déglycosylation. La teneur en résidus de N-acétylglucosamine et la composition en sucres sont les témoins de la complexité des chaînes oligosaccharidiques périphériques. La teneur en acide sialique et en groupements sulfatés permet d'évaluer l'acidité relative des fractions les unes par rapport aux autres.

A - La fraction éluée par le NaCl 0,01M

C'est la première fraction éluée, elle coïncide avec une structure en acides aminés de 60 à 62 résidus sur la base d'un résidu d'histidine (Tableau n°14). Cette structure supporte 56 oses neutres et osamines. Elle est peu fournie en résidus de N-acétylgalactosamine. Après déglycosylation chimique, l'axe peptidique est peu modifié ; il n'est plus porteur que d'un résidu de galactose et d'un résidu de N-acétylglucosamine. La fraction initiale des "glycopeptides 0,01M" est contaminée par des N-glycopeptides (présence de mannose) provenant des N-glycoprotéines présentes dans les mucines.

B - La fraction éluée par le NaCl 0,1M

Cette fraction présente un axe peptidique moyen plus court (51 à 52 résidus). La fraction osidique est formée de 77 oses neutres et osamines. Après déglycosylation chimique, il reste 2 résidus de N-acétylgalactosamine, et aussi 2 résidus de N-acétylglucosamine avec un résidu de mannose, ce dernier résidu pouvant éventuellement correspondre à un résiduel de N-glycane. Au total nos conditions semblent particulièrement adaptées aux "glycopeptides 0,1M". On constate que la longueur moyenne des peptides est de 60-61 résidus, élément qui confirme que le traitement retenu respecte au maximum l'intégrité peptidique et aurait tendance à sélectionner des peptides plus riches en acides aminés hydroxylés et en proline.

Figure n°10 : Séparation des différentes populations de glycopeptides de mucines par chromatographie d'échange ionique

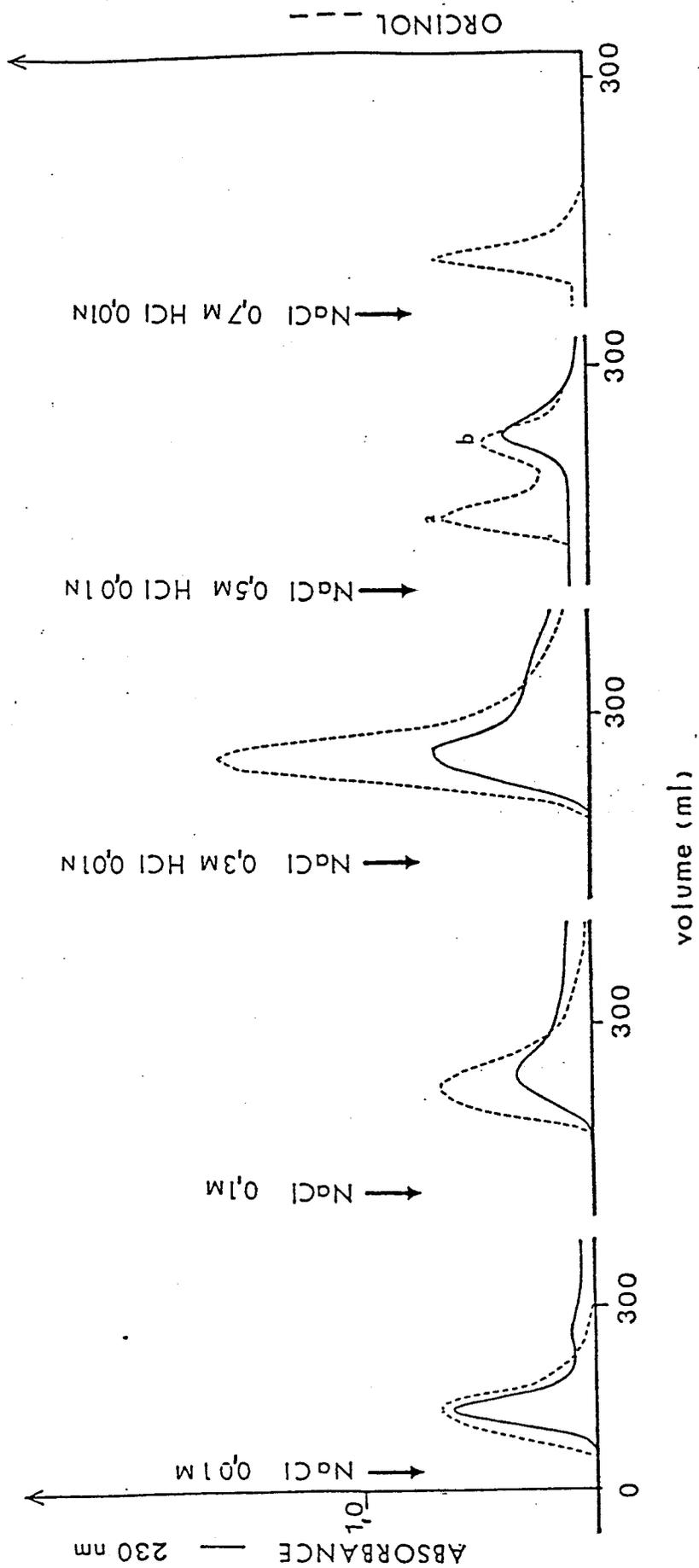


Tableau n°14 : Déglycosylation de sous-populations de glycopeptides de mucines LER...
(de groupe sanguin O) fractionnées sur DEAE Sephadex

	NaCl 0,01M		NaCl 0,1M		NaCl 0,3M		NaCl 0,5Ma		NaCl 0,5Mb		NaCl 0,7M									
	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après								
	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g	rés. µm/g								
AS(X)	6	143 : 6a7	365 : 4a5	86	4	92	4	140	6	213	4	324 : 5a6	160	3	197	2	70	2	147	
THR	7	169 : 7	412 : 7	136	11	730	12	265	8	252	10a11	795 : 8	243	10	642	8	255	13	969	
SER	6	144 : 6	317 : 6	110	6	371	7	163	6	192	6	448 : 5a6	161	6	390	6a7	204	7	498	
GL(X)	5	116 : 5	279 : 5	97	6	413 : 4a5	3	213	8	202	4	333 : 6	180	4	235	2	74	3	204	
PRO	6	142 : 6a7	377 : 7	142	10	667 : 7	157	7	476	5	172	6	464 : 5	149	5	335	4	131	6	450
GLY	9	216 : 9a10	539 : 6	124	7	457 : 4a5	102	3a4	227	5	158	4	311 : 4	124	4	272	4	127	3	250
ALA	6	149 : 6	353 : 5	90	6	380 : 5	104	5	312	4	114	4	286 : 3	100	4	241	4	114	4	329
VAL	3	78 : 3	167 : 2	39	2	135 : 2	52	2	117	2	61	2	131 : 2	48	2	112	2	58	2	143
MET	0	3 : 0	6 : 0	5	0	8 : 0	4	-	-	0	9	0	12 : 0	7	0	6	0	11	0	11
CYS	0	0 : 0	0 : 0	-	0	-	-	-	-	2	59	1	79 : 0	-	-	-	0	11	0	0
ILE	2	40 : 2	90 : 1	21	1	74 : 1	25	1	66	1	31	1	67 : 1	29	1	61	1	32	1	80
LEU	2a3	62 : 2a3	151 : 2	36	2	152 : 1	38 : 1a2	113	1	46	1a2	120 : 1a2	43	2	113	1a2	50	2	144	
TYR	2	40 : 2	90 : 1	13	1	40 : 0	6	0	17	0a1	13	0	19 : 0	8	0	15	0a1	16	0	22
PHE	1a2	33 : 1	72 : 1	19	1	50 : 0	13	0	29	1	28	0a1	39 : 1	24	0a1	36	1	25	0a1	40
LYS	2	50 : 1a2	86 : 2	33	1	75 : 1	30 : 0a1	42	1	41	1	62 : 1	29	1	50	1	28	1	45	
HIS*	1*	24 : 1*	57 : 1*	19	1*	67 : 1*	23 : 1*	65	1*	33	1*	75 : 1*	29	1*	64	1*	32	1*	76	
ARG	2	56 : 2	132 : 1	26	1a2	107 : 1	25	1	76	1	28	1	76 : 1	25	1	65	1	23	1	78
AAG %	14,72	35,5	9,99	40,51	12,19	32,40	17,07	37,16	14,62	29,4	12,44	35,01								
% OHAA	21	21,5	25	28	37	42	23	33	30	36	37	43								
longueur:																				
AA	60 à 62	59 à 64	51 à 52	60 à 61	50 à 52	49 à 52	52 à 53	49 à 52	44 à 47	44 à 45	38 à 41	46 à 47								
THR/SER	1,17	1,17	1,17	1,83	1,71	2,5	1,33	1,75	1,45	1,67	1,23	1,86								
PRO/GLY	0,67	0,68	1,17	1,43	1,55	2	1,14	1,5	1,25	1,25	1,00	2,0								
GlcNH ₂	8	205 : 1	54 : 19	363	2	141 : 22a23	495 : 3	190	14a15	500 : 0a1	53 : 17a18	508 : 2	133	17	530	0a1	61			
GalNH ₂	3	74 : 0	22 : 7	140	2	130 : 12a13	276 : 7	442	8	251 : 2a3	171 : 8a9	249 : 1	45	9	272	2a3	196			
Fuc	9	225 : 0	0 : 17	317	0	17 : 22	487 : 1a2	104	12	396 : 0	0 : 13	372 : 0	0	15	475	0	0			
Man	22	555 : 0	11 : 10	189	1	88 : 2a3	56 : 0	17	1	44 : 0	17 : 1	27 : 0	6	1	28	0	1			
Gal	14	350 : 1	50 : 24	467	0	39 : 40	877 : 5	295	20	655 : 2	139 : 26	744 : 1	67	32	1022	1	10			
ac.sial.	0a1	16 : 0	1 : 3	55 : 0	3	9a10	218 : 0	10	4	136 : 0	4 : 4	117 : 0	4	9	280	0	2			
sulfates	4	99 : 0	4 : 1	25 : 0	1	5	111 : 0	5	10	321 : 0	10 : 13	383 : 0	13	17	550	0	2			
oses +																				
osamines	56	2	77	5	98 à 101	16 à 17	55 à 56	4 à 6	66	4	74	3 à 5								

▲ Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine.

C - La fraction éluée par le NaCl 0,3M

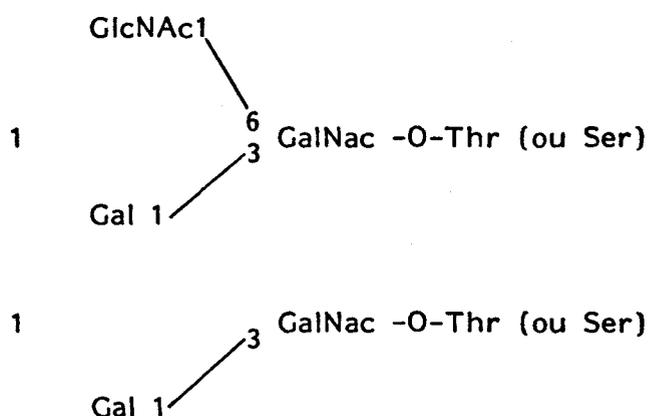
Cette fraction possède un squelette peptidique de 50 résidus environ sur la base d'un résidu d'histidine. L'axe peptidique présente une plus grande densité en sites potentiels de glycosylation (19 résidus de sérine et de thréonine). La structure comporte environ 100 oses neutres et osamines qui ne sont plus que 17 après déglycosylation. Cette fraction est la seule à se colorer au P.A.S. après déglycosylation. Ceci impliquerait des structures osidiques résiduelles plus longues voire complètes. La déglycosylation chimique n'élimine que 45% des points de branchement des chaînes oligosaccharidiques (il reste 7 résidus de N-acétylgalactosamine). Le nombre relativement faible de résidus de glucosamine après déglycosylation et relativement élevé en résidus de galactose orienterait en toute hypothèse vers la fréquence de présence de noyaux de type :

Gal 1—³GalNAc -O-Thr (ou Ser) (VAN HALBEEK et coll, 1982 (189)).

Après déglycosylation donc, il demeure 7 résidus de N-acétylgalactosamine, 3 résidus de N-acétylglucosamine, 5 résidus de galactose et 1 à 2 résidus de fucose (Tableau n°14), ce qui laisse à entendre que les conditions de déglycosylation ne sont pas optimales pour cette catégorie de glycopeptides.

D - La fraction éluée par le NaCl 0,5M dite "0,5Ma"

Cette fraction comporte environ 50 résidus amino-acides avant déglycosylation. La déglycosylation n'affecte pas les résidus d'acides aminés hydroxylés. Cette structure est porteuse d'environ 55 oses neutres et osamines et de 8 branchements osidiques potentiels (8 résidus de N-acétylgalactosamine). Deux à trois de ces points de branchement persistent après déglycosylation. Il reste en effet 2 résidus de N-acétylgalactosamine, 1 résidu de N-acétylglucosamine et 2 résidus de galactose. Ici encore on note une "résistance" de types structuraux compatibles en toute hypothèse avec l'existence de noyaux de type :



E - La fraction éluee par le NaCl 0,5M dite "0,5Mb"

Cette fraction est éluee un peu après la fraction "0,5Ma". Or le squelette peptidique est plus court (44 à 47 résidus) que celui de la fraction précédente. La déglycosylation chimique par contre n'ampute pas le peptide. Celui-ci, s'il est plus court que l'axe peptidique défini au niveau de la fraction "0,5Ma", est porteur d'une fraction osidique plus importante puisqu'elle est de 66 oses neutres et osamines (soit 10 résidus de plus que la fraction "0,5Ma"). Le nombre de points de branchement potentiels est le même (8 à 9). Il ne reste plus qu'un seul point de branchement potentiel (1 résidu de N-acétylgalactosamine) après déglycosylation. Il reste en fait 4 oses et osamines qui sont 2 résidus de N-acétylglucosamine, 1 résidu de N-acétylgalactosamine et 1 résidu de galactose.

Il semble donc qu'à nouveau, comme pour la fraction NaCl 0,1M, les conditions retenues soient sinon optimales, tout au moins utilisables.

F - La fraction éluee par le NaCl 0,7M

C'est la fraction la plus acide, la plus riche en groupements sulfatés. Sa structure peptidique est très courte (38 à 41 résidus d'acides aminés) sur la base d'un résidu d'histidine. Un hydroxyamino-acide sur 2 pourrait intervenir dans le branchement d'une chaîne oligosaccharidique. Le peptide est porteur de 74 oses neutres et osamines. Le TFMS ne laisse que 4 oses en place : un résidu de galactose, 1 de N-acétylglucosamine et 2 résidus de N-acétylgalactosamine. Cette fraction après déglycosylation est PAS négative. Le rendement en peptides est bon, au même titre que celui des fractions NaCl 0,1M et 0,5Ma.

G - Conclusion

Nous avons pu séparer 6 fractions bien individualisées en fonction de leur degré d'acidité croissante et de leur hétérogénéité osidique. Ces fractions possèdent toutes une richesse notable en acides aminés hydroxylés, en résidus de proline et de glyco-colle. La longueur du motif peptidique varie cependant de 40 à 60 résidus sur la base d'un résidu d'histidine.

Il existe de plus une grande dispersion dans le nombre de résidus d'oses et d'osamines portés par le squelette peptidique. Ainsi, la fraction éluee au milieu du chromatogramme par la solution de chlorure de sodium 0,3M est-elle porteuse d'environ 100 oses et osamines au niveau de 12 à 13 points de branchement potentiels. Une fraction plus acide par contre, comme celle éluee par le chlorure de sodium 0,7M porte des points de branchement moins nombreux (9). La fraction "0,3M" s'avère être plus résistante à la déglycosylation puisque plus d'un résidu de N-acétylgalactosamine sur 2 reste en place après traitement alors que les autres fractions du chromatogramme perdent les trois quart de leurs résidus de N-acétylgalactosamine. Les rendements de déglycosylation, exprimés en masse de peptides obtenues par rapport à la masse de peptides attendus, sont très dispersés (Tableau n°15). Ils varient de 12% (fraction "0,5Mb") à 45% (fraction "0,1M"). La déglycosylation obtenue à partir de "pool" de glycopeptides était une moyenne entre les rendements sur différentes populations de glycopeptides présents dans le mucus et plus ou moins sensibles aux conditions retenues.

Lorsque nous regardons en parallèle le nombre d'acides aminés hydroxylés et le nombre de résidus de N-acétylgalactosamine, nous remarquons que la sérine conserve un taux relativement constant avant et après déglycosylation, qui pourrait être rapproché du nombre de résidus de N-acétylgalactosamine résistants. Aussi pourrions-nous "associer" la résistance du glycanne à la déglycosylation et la notion de résidu de sérine intervenant dans le point de branchement.

Ainsi s'établit la nécessité de tenter d'optimiser les conditions de traitement au regard de la qualité et surtout du degré d'acidité des glycopeptides de mucus.

IV - TENTATIVES D'AMELIORATION DU POURCENTAGE DE DEGLYCOSYLATION AVEC RESPECT DE L'INTEGRITE PEPTIDIQUE

A - Utilisation d'un autre piège

L'anisole utilisé pour la protection de l'axe peptidique lors de la déglycosylation est, nous l'avons vu, très difficile à éliminer. Du fait de son interaction avec le matériel déglycosylé, il pourrait être responsable de la

Tableau n°15 : Déglycosylation au TFMS des glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin O) séparés sur DEAE Séphadex.

fraction de DEAE éluee NaCl	masse de matériel à traiter mg	% AA fraction non déglycosylée	% AA fraction après TFMS 25°C	masse de peptide avant déglycosylation mg	quantité de poudre obtenue après déglycosylation mg	masse de peptide après déglycosylation mg	rendement de déglycosylation %
0,01 M	40	14,72	35,5	5,89	4,8	1,7	29
0,1 M	3 x 88,5	9,99	40,51	26,52	29,4	11,91	45
0,3 M	3 x 88,5	12,19	32,39	32,36	24,88	8,06	25
0,5 Ma	40	18,52	37,16	7,41	8	2,97	40
0,5 Mb	40	14,62	29,36	5,85	2,4	0,704	12
0,7 M	40	12,44	35,00	4,98	4,8	1,68	34

mauvaise résolution des peptides étudiés en gel de polyacrylamide. De ce fait, nous avons remplacé cet agent protecteur par un acide aminé aromatique : la phénylalanine. Celui-ci est structurellement beaucoup plus proche que l'anisole, des acides aminés constituant le matériel peptidique à déglycosyler. Pour des problèmes de solubilité, la molarité en phénylalanine ajoutée n'atteint que 3mM. Elle représente le dixième de celle atteinte par l'anisole lors du traitement. Cette modification technique permet d'alléger le protocole expérimental en éliminant directement la phénylalanine. Après déglycosylation et neutralisation par la pyridine, le matériel subit une évaporation sous azote puis une seule série de dialyses. L'étape de l'extraction à l'éther n'est plus nécessaire. Le matériel lyophilisé est alors précipité à l'acétone anhydre à -20°C pendant 24 heures. En ce qui concerne les glycopeptides de mucus, ce nouvel agent protecteur permet une déglycosylation importante (Tableau n°16). En effet le nombre de résidus de N-acétylglucosamine passe de 20-21 à 1-2. Au niveau des points de branchement, la déglycosylation est également efficace comme en témoigne la chute du nombre de résidus de N-acétylgalactosamine (élimination de 92%). Parallèlement à cette dernière observation, le nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés reste stable (16 résidus) de même que sa proportion (28%) par rapport à l'ensemble des autres résidus amino acides. La phénylalanine n'est pas totalement éliminée après une première série de dialyses contrôlées. Si le rendement de déglycosylation par rapport à la galactosamine est de l'ordre de 92%, celui exprimé en nanomoles d'acides aminés est multiplié par un facteur de 1,2. Il passe en effet de 20-25% dans les conditions standards à 31% avec le nouveau "scavenger".

B - Délipidation préalable

L'affinité pour le noir Soudan des peptides déglycosylés en électrophorèse de polyacrylamide nous a amené à envisager l'utilité d'une délipidation préalable à la déglycosylation. Cette délipidation est réalisée suivant une méthode dérivée de celle de FOLCH. Le matériel est repris par un mélange de chloroforme-méthanol (2:1,v:v) et il est agité énergiquement. Un volume d'eau égal au volume précédent est ajouté et le déphasage est réalisé à 4°C pendant 24 heures.

Trois phases sont alors obtenues :

- une phase supérieure hydrométhanolique
- un précipité intermédiaire protéique
- une phase inférieure chloroformique.

Tableau n°16 : Utilisation d'un autre agent protecteur pour la déglycosylation

Glycopeptides LER... 25°C 3 heures 88.5mg + 600mg phényl alanine			
Témoin avant déglycosylation		précipité acétonique après déglycosylation	
résidus▲	µm/g	résidus	µm/g
AS(X)	4	4	123
THR	9 à 10	10	305
SER	5 à 6	6	172
GL(X)	5	4	124
PRO	6	7	207
GLY	5	5 à 6	161
ALA	5	5	145
VAL	3	2 à 3	76
CYS/2	0	0	-
MET	-	1	27
ILE	1	2	64
LEU	2	2	64
TYR	1	0	6
PHE	1	4	115
LYS	2	1 à 2	45
HIS*	1*	1*	29
ARG	1 à 2	1 à 2	41
% AA g/100	13,17	18,12	
longueur(résidusAA)▲	51 à 54	56 à 60	
GlcNH ₂ ▲	20 à 21	1 à 2	41
GalNH ₂ ▲	12	1	34
% AA hydroxylés▲	28	28	
masse de matériel dé départ mg	88,5	20,2	
masse de peptide mg	11,6	3,66	
rendement déglyco- sylation % par rapport GalNAc	-	92	
rendement déglyco- sylation en masse de produit	-	31	

▲Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Dans la phase hydrométhanolique (Tableau n°17), 22% du matériel de départ est retrouvé et subit la déglycosylation à 25°C pendant 3 heures dans un rapport glycopeptides / TFMS de 10mg/ml.

La composition en acides aminés du tableau n°17 atteste des rendements catastrophiques (10 à 20 fois moins importants) en peptides par rapport au produit déglycosylé non délipidé au départ. Ce matériel est peu déglycosylé comme le montre le nombre de résidus de N-acétylglucosamine et de N-acétylgalactosamine (élimination de 58%). Enfin, le nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés est conservé.

La délipidation préalable pourrait donc sensibiliser à l'action d'agents chimiques de déglycosylation particulièrement agressifs. Les lipides pourraient jouer un rôle protecteur de l'axe peptidique.

C - Utilisation de détergents

Nous avons vu précédemment que l'axe peptidique des glycopeptides de mucus présente une grande fragilité aux hydrolyses acides secondaires. Nous avons donc tenté de le protéger, de "l'envelopper" pour éviter l'agrégation des peptides déglycosylés après leur déglycosylation et l'intervention sur les liaisons CO-NH d'agents d'hydrolyse. Nous avons utilisé deux détergents de nature différente :

- le dodécyl sulfate de sodium (SDS), détergent anionique
- le triton X100, détergent non ionique.

De par son caractère non ionique, le triton X100 ou isooctylphenoxy polyéthoxyéthanol peut permettre des interactions hydrophobes avec le matériel étudié. Les détergents appartiennent au groupe des lipides. La notion de B.H.L. ou balance hydrophile lipophile permet de sélectionner le détergent pour des applications particulières. Les détergents les plus efficaces ont une B.H.L. comprise entre 12,5 et 14,5 (HELENIUS et SIMONS, 1975 (67)). Le triton X100 possède une B.H.L. de 13,5. Le dodécyl sulfate de sodium est ajouté au matériel avant lyophilisation et dessiccation sous forme d'une solution de concentration 50mg/ml. Le matériel est déglycosylé dans les conditions standards. L'association d'un détergent tel que le SDS à l'agent de protection habituel (anisole) semble renforcer cette protection de l'axe peptidique. Le taux de N-acétylgalactosamine restant correspond à un rendement de 50%. L'intégrité de l'axe peptidique semble conservée comme le montre la composition en acides aminés du tableau n°18.

Tableau n°17 : Délipidation et déglycosylation
de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)

Glycopeptides de mucus LER...						
Témoïn avant délipidation		Phase hydro- méthanolique		après traitement 25°C 3h		
	résidus▲	µm/g	résidus	µm/g	résidus	µm/g
AS(X)	4	107	4	102	5 à 6	89
THR	9 à 10	231	9 à 10	256	10	165
SER	5 à 6	133	6	156	8	131
GL(X)	5	113	4	117	6	98
PRO	6	150	6	172	5	86
GLY	5	118	5	132	8	134
ALA	5	120	5	139	6	92
VAL	3	83	2	51	2	34
MET	0	7	-	7	-	-
CYS	0	-	-	6	-	-
ILE	1	29	1	28	2	38
LEU	2	43	2	45	4	62
TYR	1	18	1	14	1	17
PHE	1	21	1	19	1	21
LYS	2	57	2	65	2	27
HIS*	1*	24	1*	26	1*	16
ARG	1 à 2	37	1 à 2	40	2	35
% AA g/100g	13,17		13,96		10,78	
nombre AA▲	51 à 54		51 à 53		63 à 64	
GlcNH ₂ ▲	20 à 21	499	18	488	1	15
GalNH ₂ ▲	12	289	10	269	5	85
masse de matériel mg	75		15,65		1,1	
masse de peptide mg	9,88		2,18		0,119	
rendement en peptide par rapport au produit de départ %	-		22		1	

▲Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Tableau n°18 : Utilisation de SDS et déglycosylation chimique de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)

	Témoïn avant		SDS / TFMS	
	résidus▲	µm/g	résidus	µm/g
AS(X)	4	107	4	150
THR	9 à 10	231	14 à 15	595
SER	5 à 6	133	8	312
GL(X)	5	113	5	195
PRO	6	150	9	358
GLY	5	118	5	216
ALA	5	120	6	258
VAL	3	83	2	94
MET	0	7	-	-
CYS	-	0	-	-
ILE	1	29	1 à 2	62
LEU	2	43	2 à 3	107
TYR	1	18	1	33
PHE	1	21	1	30
LYS	2	57	1	36
HIS*	1*	24	1*	41
ARG	1 à 2	38	1 à 2	67
AA g/100g	13,17		25,7	
nombre AA▲	51 à 54		61 à 65	
GlcNH ₂ ▲	20 à 21	499	1	56
GalNH ₂ ▲	12	290	6	257
masse de matériel mg	75		14,8	
masse de peptide mg	9,88		3,8	
rendement en peptide %	-		38,5	

▲ Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Ainsi le rendement en peptides double et passe à 38%. Cependant si les chaînes oligosaccharidiques périphériques semblent profondément remaniées, les points de branchement (N-acétylgalactosamine) résistent mieux au traitement que lorsque la phénylalanine est utilisée comme agent de protection.

D - Association de la délipidation et des détergents

L'utilisation des détergents semble offrir une bonne protection au squelette peptidique. Aussi avons-nous essayé de mettre ce phénomène à profit pour délipider le matériel de façon à pouvoir le déglycosyler dans des conditions plus favorables. Lors d'une délipidation réalisée antérieurement, et après déglycosylation, les rendements sont de l'ordre de 4% (Tableau n°19). De plus, si les chaînes osidiques périphériques sont éliminées il reste encore environ la moitié des points de branchement potentiels (5 sur 12). Ces rendements sont donc très bas même s'ils sont deux fois supérieurs à ceux obtenus après délipidation seule. La protection de l'axe peptidique existe mais elle semble insuffisante pour le maintien du rendement obtenu sans délipidation.

E - Association de la phénylalanine et des détergents

L'association de plusieurs détergents tels que le SDS et le triton X100 a été envisagée. Lorsque deux détergents sont introduits lors de la réaction, le premier est ajouté avant la dessiccation du matériel, il intervient donc lors de la phase de déglycosylation proprement dite. Le deuxième est introduit lors de la neutralisation, dissous dans la pyridine aqueuse ; il interviendrait sur la conformation du peptide lors du repassage en phase aqueuse.

La concentration en triton X100 doit être supérieure à la C.M.C. (Concentration micellaire critique : 154mg/l). Nous nous plaçons à une molarité de SDS telle que tous les sites de la protéine soient saturés (321 μ moles de SDS/ μ mole de protéine). Deux produits différents ont été testés :

- un "mélange" global de glycopeptides de mucus
- une fraction éluée de la DEAE Sephadex par du chlorure de sodium 0,3M.

Ces fractions ont été déglycosylées dans les conditions standards, en présence de phénylalanine + SDS ; + SDS et triton X100 ; + triton X100 ; + triton X100 et SDS (Tableau n°20). L'utilisation de SDS et de phénylalanine

Tableau n° 19 : Utilisation de la délipidation et du SDS pour la déglycosylation de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)

Glycopeptides de mucus LER...						
	Témoïn avant délipidation		Phase hydro-méthanolique		Après traitement SDS/TFMS 25°C 3h	
	résidus▲	µm/g	résidus	µm/g	résidus	µm/g
AS(X)	4	107	5	98	4 à 5	66
THR	9 à 10	231	9	192	9	140
SER	5 à 6	133	6	121	7	110
GL(X)	5	113	4	87	5	74
PRO	6	150	6	133	5	75
GLY	5	118	4	91	7	102
ALA	5	120	5	105	5	81
VAL	3	83	2	36	2	32
MET	0	7	-	-	-	-
CYS	0	-	-	10	-	-
ILE	1	29	1	25	1 à 2	24
LEU	2	43	2	38	3	42
TYR	1	18	0 à 1	13	1	17
PHE	1	21	0 à 1	13	1	18
LYS	2	57	2	49	1	19
HIS*	1*	24	1*	21	1*	15
ARG	1 à 2	38	1	30	2	26
% AA g/100g	13,17		10,78		8,50	
nombre AA▲	51 à 54		48 à 52		54 à 56	
GlcNH ₂ ▲	20 à 21	499	17 à 18	367	1	21
GalNH ₂ ▲	12	290	9 à 10	199	5	80
masse de matériel mg	75		15,65		4,6	
masse de peptide mg	9,88		1,7		0,39	
rendement/témoïn %	-		17		4	
rendement/délipidation %	-		-		23	

▲ Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Tableau n°20 : Déglycosylation, en présence de détergents et de phénylalanine, de glycopeptides de mucus LER... (de groupe sanguin 0)

	Fraction 0.3M (NaCl)								"Pool"							
	avant		SDS+Phe		SDS+Phe : TX100+Phe		TX100+Phe+SDS		avant		SDS+Phe		SDS+Phe : TX100+Phe		TX100+Phe+SDS	
	rés	µm/g	rés	µm/g	rés	µm/g	rés	µm/g	rés	µm/g	rés	µm/g	rés	µm/g	rés	µm/g
AS(X)	4	92	4	40	5	39	3	157	5	20	4	103	4	20	3	226
THR	12	264	10	100	7	60	12	642	4	18	7à8	214	8	40	8	65
SER	7	162	6	62	5à6	44	5	278	5à6	22	6	111	5	26	4à5	37
GL(X)	4à5	98	5	47	5	39	4à5	240	6à7	26	4	115	5	24	3à4	29
PRO	7	157	8	77	4	34	6	303	4	15	5à6	144	8à9	44	7	55
GLY	4à5	102	6	57	5	42	5	264	7	27	5	112	6	31	5	38
ALA	5	104	4	37	3à4	29	4	230	4à5	18	3à4	88	4	19	3	23
VAL	2	51	3	28	5	39	2	114	4	15	2	45	3	15	2à3	20
MET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ILE	1	25	1à2	16	2	17	1	69	2à3	10	1	26	1à2	8	1	10
LEU	1	37	2	21	3	23	2	127	3	11	2	47	2	9	2	14
TYR	0	6	0à1	4	1	5	0à1	30	2	6	0à1	12	0	-	0	2
PHE	0	3	12	117	5	37	2	92	8à9	33	1	23	7à8	39	9	74
LYS	1	29	1	13	1à2	13	1	68	2	7	2	64	1à2	8	1à2	11
HIS*	1*	23	1*	10	1*	8	1*	53	1*	4	1*	24	1*	5	1*	8
ARG	1	25	1	12	1	11	1à2	79	2	7	2	55	1	6	1	11
GlcNH ₂ ▲	22à23	495	13	125	5	39	0à1	32	2	8	19	584	13	66	6	50
GalNH ₂ ▲	12à13	276	9	90	6	50	1	37	2	6	7à8	247	8	42	7	56
nombre de résidus	50 à 52		52 à 54		48 à 51		47 à 50		51 à 55		44 à 48		49 à 52		41 à 45	
▲			(sansPhe)		(sansPhe)		(sansPhe)		(sansPhe)		(sansPhe)		(sansPhe)		(sansPhe)	
AA g/100g	12,19		7,05		4,60		28,7		2,67		17,4		3,09		4,6	
Masse de produit traité mg	35		35		35		35		35		40		40		40	
Masse de peptides mg	4,27		-		-		-		-		6,96		-		-	
Masse de matériel après TFMS mg	-		50,7		22,1		1,1		420		-		90		53	
Masse de peptides après TFMS mg	-		3,57		1,01		0,316		11,21		-		2,78		2,44	
% de déglycosylation / GlcNAc			42		78		98		91		-		32		69	
/ GalNAc			28		52		92		84		-		0		93	
rendement en peptides %	-		83		24		7		ininterprétable		-		40		35	

▲ Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

d'une part, de SDS, de phénylalanine et de triton X100 d'autre part, donne un matériel passablement déglycosylé avec une élimination de 32 à 78% des résidus de N-acétylglucosamine et de 0 à 93% des résidus de N-acétylgalactosamine. La phénylalanine est bien dialysée lorsqu'elle est utilisée en présence de triton X100 seul et seulement dans ce cas. D'ailleurs l'association phénylalanine - triton X100 donne un matériel très bien déglycosylé que ce soit au niveau des chaînes périphériques ou des points de branchement potentiels. Ce matériel est de plus riche en acides aminés (29 à 40%). Cependant le rendement en peptides est faible (7 à 16%). L'utilisation du triton X100 puis du SDS dans un même essai donne un matériel très difficile à précipiter à l'acétone et par conséquent pauvre en acides aminés. Nous remarquons de plus une chute sensible du taux des acides aminés hydroxylés. Cette diminution est à rapprocher d'un raccourcissement d'un tiers de la longueur du peptide dans le cas du "pool". Ceci pourrait trahir une altération importante du squelette peptidique due à un encombrement stérique entre l'un ou l'autre ou les deux détergents et le piège, qui pourrait alors empêcher l'accessibilité du matériel à l'agent de déglycosylation.

V - SEQUENCES AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DEGLYCOSYLES

Les glycopeptides de mucus bronchique isolés par chromatographie sur DEAE Sephadex et élués par du chlorure de sodium 0,3M ou 0,7M ont été analysés par dégradation automatique de Edman (1956) (41) après déglycosylation. Les étapes de cette dégradation sont décrites dans l'appendice technique. Dans le cas des glycopeptides de mucus élués par le NaCl 0,3M, 320 nanomoles (10mg) de produit ont été déposés en deux temps dans la coupelle d'un séquenceur automatique Beckman 890C. Dix nanomoles de glycopeptides de mucus élués par du NaCl 0,7M et déglycosylés ont pu également être utilisés en faisant appel cette fois à un séquenceur en phase gazeuse Applied Biosystems couplé à une HPLC. Les rendements obtenus sont faibles. Nous nous heurtons aussi aux problèmes inhérents à la nature de certains acides aminés qui représentent de réelles difficultés d'identification de leur PTH dérivés (par exemple : la thréonine et la sérine ne se retrouvent qu'à 10% de la quantité d'acides aminés attendue au cours du cycle. D'autres acides aminés tels que la proline ne donnent, au cours de la dégradation récurrente de Edman, que des rendements de l'ordre de 50% car ils posent de gros problèmes au niveau de l'étape de clivage. Aussi lorsque les séquences sont du type SER-THR-PRO-PRO-ALA-THR, nous cumulons les difficultés technologiques et nous obtenons un

nombre de cycles interprétables en toute rigueur, relativement restreint (Figure n°11). Le fait qu'il puisse exister des motifs répétitifs faisant intervenir les acides aminés cités précédemment, est aussi un obstacle supplémentaire pour l'obtention de séquences conséquentes. Les résultats obtenus, malgré des conditions expérimentales de déglycosylation jugées satisfaisantes à l'étape analytique, nous ont amené à abandonner l'approche structurale des mucines bronchiques par les techniques biochimiques de dégradation de Edman.

A ce stade, notre orientation vers la Biologie Moléculaire s'imposait à nous : en exploitant les résultats fragmentaires de séquence amino-acide pour préparer des oligonucléotides de synthèse, en mettant à profit l'optimisation des conditions expérimentales de déglycosylation pour obtenir un immunsérum spécifique de l'axe peptidique des mucines trachéobronchiques. Nous avons choisi d'utiliser parallèlement ces deux voies et préparer des sondes oligonucléotidiques et immunologiques représentatives de l'axe peptidique des mucines au niveau des touffes de glycosylation.

VI - DEFINITION DES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES ET IMMUNOLOGIQUES EN VUE DE L'APPROCHE PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

A - Sondes oligonucléotidiques

Les résultats de séquences partielles amino-acides obtenues à partir de glycopeptides déglycosylés par oxydation periodique ou chimique par l'acide trifluorométhane sulfonique nous ont permis par compilation de concevoir une séquence "représentative" des zones de glycosylation des glycopeptides de mucines trachéobronchiques humaines.

PRO	PRO
SER-THR-ALA-SER-ALA-THR-THR	
GLY	GLY
ARG	ARG

La synthèse d'oligonucléotides étant destinée au criblage d'une banque de muqueuse trachéale humaine en vecteur gt10 dont la construction sera présentée dans le troisième chapitre.

Figure n°11 : Séquences N-terminales de glycopeptides de mucus isolés après DEAE Sephadex et déglycosylés dans les conditions standards. Programmes QUADROL 1M (NaCl 0,3M). TMA BIOBRENE (NaCl 0,7M)

CYCLE N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
glycopeptides de mucus (NaCl 0,3M) déglycosylés dans les conditions standards	SER	PRO THR	PRO	PRO SER GLY	ALA	THR SER	ALA X	THR	THR	ALA	THR	LYS
nanomoles	29,6(x10)	29,7 19,4(x7)	41,3	35,9 2,5(x10) 21,1	19,7	19,6(x10) 3,4(x10)	18	9,5(x10)	12,8	8,5(x10)	2,1	
nanomoles corrigées	29,6	29,7 135,8	-	35,9 25 21,1		196 34	-	95	-	85	-	
glycopeptides de mucus (NaCl 0,7M) déglycosylés dans les conditions standards	SER	ALA PRO	THR PRO	THR SER	GLY SER							
nanomoles	34,5	7,6 4,3	43,5(x10) 19,1	7,36 42,2(x10)	15,2 49,5(x10)							
nanomoles corrigées	345	-	435 19,1	736 422	15,2 495							

B - Sondes immunologiques

1 - Obtention de l'immunsérum

Dans le but de préparer un immunsérum polyclonal reconnaissant la fraction peptidique des mucines trachéobronchiques, avec une spécificité la plus large possible à l'égard des sous-fractions des fuco-, sialo-, sulfomucines, nous avons réalisé un mélange du produit de déglycosylation des glycopeptides de mucines en tenant compte des critères analytiques suivants :

- sélection du matériel le mieux déglycosylé dans le respect de l'axe peptidique (Tableau n°21) et ceci, dans les conditions expérimentales les plus diverses possibles (conditions standards, après délipidation, en présence de phénylalanine, de triton X100), de façon à éventuellement diversifier l'immunogénicité du matériel peptidique.

- utilisation de fractions "mélanges" et de fractions purifiées par échange ionique et éluées dans les zones de NaCl 0,3M, 0,5M, 0,7M considérées comme les plus représentatives des mucines trachéobronchiques du sujet sain.

- constitution du mélange de façon à offrir une égale représentativité des différentes classes de mucines.

- injection à deux lapins selon les modalités figurant dans l'appendice technique pour tenir compte de la spécificité individuelle de réponse des animaux.

2 - Caractérisation des antisera

* par "immunoblotting"

Les antisera des deux lapins ont été testés par "immunoblotting" vis-à-vis de divers matériels :

- le mélange de glycopeptides déglycosylés ayant servi à l'immunisation
- un mélange de glycopeptides pronasiques "natifs" de mucines trachéobronchiques humaines
- une préparation de mucines "natives"
- des glycopeptides déglycosylés obtenus à partir de la fraction éluée en NaCl 0,3M au cours du fractionnement sur DEAE Sephadex-A25.

La figure n°12 montre que les lapins ont réagi vis-à-vis du matériel injecté :

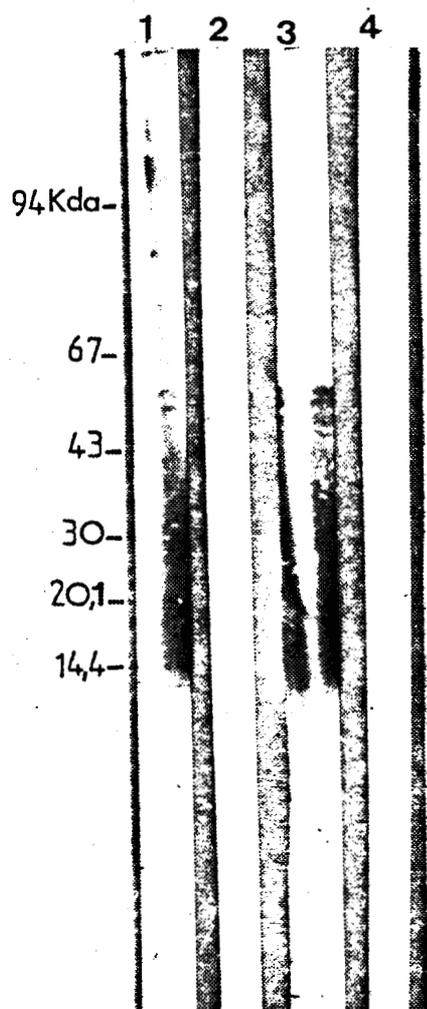
- les couloirs 1 et 3 font apparaître une forte réactivité par immunoblotting, les couloirs 2 et 4 correspondant aux "sera" de préinoculation, donnent une réponse négative ou non détectable.

Tableau n°21 : Rendements de déglycosylation obtenus sur des glycopeptides de mucines de LER...
(de groupe sanguin O), selon les conditions expérimentales utilisées

Matériel	Conditions expérimentales de déglycosylation	Longueur du peptide avant▲	Longueur du peptide après▲	Rendement déglycosylation /GalNAc %	Rendement:GlcNAc %	Rendement: / peptide %	% AA g/100g	% oses restants
glycopeptides LER... papaine/pronase	standards 25°C 3h	55	52 à 54	65	95	20 à 25	28	-
	traitement alcalin		36 à 41	65	50	-	11	-
	déglycosylation 25°C 3h + traitement alcalin		39 à 40	82	94	-	9,50	-
fraction de DEAE NaCl "0,01M"	standards 25°C 3h	60 à 62	59 à 64	100	87,5	29	35,5	4
0,1M		51 à 52	60 à 61	72	90	45	40,5	6
0,3M		50 à 52	49 à 52	44	87	25	32,4	17
0,5Ma		59 à 63	49 à 52	69	97	40	37,2	11
0,5Mb		44 à 47	44 à 45	89	89	12	29,4	6
0,7M		38 à 41	46 à 47	73	98	34	35	7
glycopeptides LER...	-standards + phényl alanine	51 à 54	56 à 60	92	93	31	18	-
	-délipidation+déglycosylation	51 à 54	63 à 64	58	96	1	10,8	-
	-SDS + déglycosylation	51 à 54	61 à 65	50	96	38,5	25,7	
	-délipidation. SDS et déglycosylation	51 à 54	54 à 56	59	96	4	8,5	
	-triton X100 + phényl alanine	51 à 54	51 à 53	95	87	16	40	
fraction de DEAE NaCl "0,3M"	triton X100 + phényl alanine	50 à 52	47 à 50	92	98	7	28,7	

▲Les calculs ont été effectués sur la base d'1* résidu d'histidine

Figure n°12 : Analyse par immunoblotting des "sera" avant (couloirs 2 et 4) et après (couloirs 1 et 3) immunisation



Bien que les deux lapins présentent une réactivité centrée sur des masses moléculaires allant de 15 à 200KDa, le premier lapin (couloir n°1) reconnaît du matériel de plus haut poids moléculaire, alors que le deuxième lapin (couloir n°3) donne une définition plus nette pour certaines bandes d'un poids moléculaire voisin de 60000 daltons. La réponse diffuse observée correspond à une mauvaise définition électrophorétique des glycopeptides de mucine déglycosylés ou non, classiquement observée dans les systèmes électrophorétiques.

La figure n°13 permet d'apprécier la réactivité des lapins à l'égard du matériel glycosylé du mucus bronchique : les mucines natives ou les glycopeptides pronasiques. Le premier lapin montre une très faible réactivité pour les produits glycosylés (couloirs n°1 et 2), alors que le deuxième lapin présente une réponse négative ou non détectable (couloirs n°5 et 6). Ce dernier lapin, de plus, semble reconnaître plus intensément que l'autre (couloir n°4) les glycopeptides déglycosylés et purifiés (couloir n°8). Les couloirs n°3 et 7 sont les témoins positifs de la figure n°12.

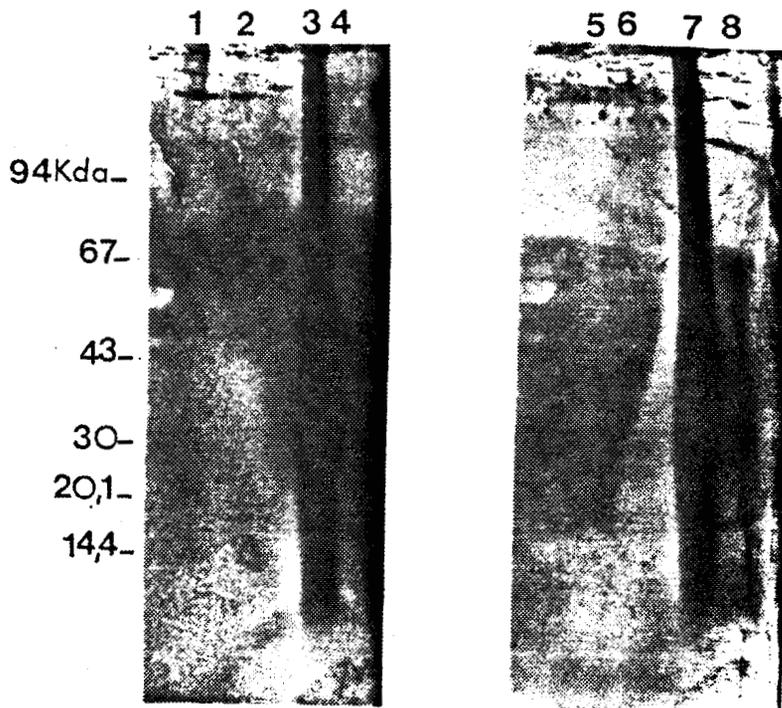
Si certains anticorps sont susceptibles de réagir vis-à-vis d'épitopes peptide-sucre (Figure n°13, couloir n°1 et 2), les "immunsera" obtenus réagissent essentiellement vis-à-vis du domaine peptidique correspondant aux régions hautement glycosylées ou de régions dites nues démasquées ou exposées à la suite de la déglycosylation

* par immunohistochimie

La qualité de nos anticorps ainsi que leur spécificité au niveau tissulaire et cellulaire ont été testées sur coupes histologiques (voir appendice technique). La photographie n°1 révèle que l'anticorps total est capable de reconnaître les cellules caliciformes (1A,1C) et les glandes muqueuses (1B) de la muqueuse trachéale humaine ainsi que les cellules caliciformes (1D) de la muqueuse colique humaine.

Le marquage est observé autour du noyau dans les cellules caliciformes et en périphérie des glandes muqueuses ("cup-shaped") c'est-à-dire sur le lieu de synthèse précoce, et jamais au niveau des grains de sécrétions (mucines glycosylées). Ceci est la preuve d'une réelle spécificité de l'immun-sérum à l'égard des épitopes peptidiques du matériel injecté aux lapins.

Figure n°13 : Analyse par immunoblotting des "antisera" vis-à-vis de mucines natives (couloirs 1 et 5), de glycopeptides pronasiques (couloirs 2 et 6), de glycopeptides déglycosylés (couloirs 3 et 7) et de la fraction de DEAE éluée par le NaCl 0,3M (couloirs 4 et 8)





VII - CONCLUSION

De l'ensemble de ces résultats, des aspects négatifs et positifs sont à noter.

A - Les aspects négatifs

Il est apparu que l'électrophorèse de tamisage moléculaire n'a pas permis d'étudier les critères d'homogénéité et de masse moléculaire des produits déglycosylés.

L'axe peptidique, une fois débarrassé de la volumineuse copule glycanique hydrophile qui l'entoure, semble susceptible de voir sa structure secondaire se réorganiser. Si le réarrangement se matérialise en une super hélice grâce à des interactions hydrophobes de brin à brin, on peut supposer que les molécules de colorant, ne parviennent plus à s'immiscer dans la structure peptidique et ceci limite leur révélation après migration. D'autre part, ces interactions hydrophobes, qui par ailleurs peuvent piéger les lipides, sont peut-être responsables d'aggrégats volumineux non dissociables par le SDS si celui-ci est ajouté après leur formation et de tels aggrégats pourraient entraîner des phénomènes d'adsorption sur les matrices de tamisage moléculaire.

Un autre fait négatif est la difficulté d'interprétation des résultats de séquence en acides aminés sur le matériel déglycosylé. En effet, comme nous l'avons vu, les résultats de séquence automatique sont assez décevants. Nous avons eu la malchance de trouver en situation N-terminale les acides aminés qui sont en eux-mêmes des difficultés technologiques de séquence automatique : SER, PRO, THR dont les rendements très faibles en dérivés PTH rendent l'interprétation délicate.

Ces résultats très fragmentaires ont cependant l'intérêt de démontrer en situation amino-terminale l'existence d'une zone dense en sites potentiels de glycosylation ou "touffes" au voisinage desquels on rencontre toujours de la proline, de la glycine et de l'alanine et qui sont par contre pauvres en résidus hydrophobes tels que LEU, ILE, VAL. Ces résultats permettent d'envisager l'éventualité de sites de glycosylation rapprochés malgré l'environnement stérique des "cores" glycaniques. Ils confirment aussi ceux des séquences peptidiques de glycopeptides de mucines traitées par oxydation périodique (Chapitre II, partie I).

B - Les aspects positifs

Le rendement en peptide obtenu après déglycosylation, même s'il n'est voisin que de 20%, constitue une amélioration sensible par rapport aux rendements de 2 à 3% obtenus il y a quelques années par l'utilisation du HF.

Nous avons acquis la certitude que, pour déglycosyler une entité moléculaire, il n'existe pas de recette expérimentale qui puisse être tirée de la littérature. Chaque molécule est un cas particulier. La coupure des sucres par le TFMS est un mécanisme non récurrent, non proportionnel au temps. Si les liaisons osidiques sont sensibles au TFMS, dans les conditions de température choisies, le phénomène de coupure est explosif, par contre si les liaisons sont résistantes, l'allongement du temps de contact n'est que peu efficace. En même temps qu'il est déglycosylé, le peptide peut subir des altérations. Celles-ci sont fonction du nombre de points de fragilité potentielle présents dans sa séquence. La méthionine est un point de fragilité reconnu dans la littérature, la thréonine l'est également pour le cas qui nous intéresse.

La déglycosylation complète du modèle étudié ne peut être obtenue que dans des conditions expérimentales déjà sensibles pour l'axe peptidique. Les faibles rendements obtenus lors de la dégradation de Edman pourraient être attribuables en partie à la présence de lipides. Les matériels déglycosylés présentent une intensification d'affinité pour le noir Soudan et, si le réarrangement structural du peptide après déglycosylation crée une super hélice amphiphile intériorisant les amino acides hydrophiles et extériorisant au contraire les acides aminés hydrophobes et les lipides, ceci pourrait expliquer les échecs de la dégradation de Edman et de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

L'acquis de cette approche biochimique classique est aussi utile à une réflexion générale pour imaginer un modèle moléculaire de l'axe peptidique des mucines bronchiques. Sans avoir d'élément pour expliquer l'association de mucines de plusieurs millions de daltons, on peut retenir la notion de "mucines réduites" qui présentent

- une masse moléculaire de 500000 daltons
- et dans lesquelles la pronase trouve 4 à 5 points de fragilité au niveau de régions accessibles. Elle livre alors des glycopeptides de l'ordre de 100000 daltons comportant un axe peptidique de 8 à 10000 daltons compatible avec une séquence amino-acide de 50 à 70 résidus. Ce peptide contiendrait une "zone hydrophile" et une "zone hydrophobe" que l'on peut imaginer de deux façons :
 - * une extrémité amino-terminale hydrophile glycosylée associée à une extrémité carboxy-terminale hydrophobe

* une alternance de zones hydrophiles glycosylées et de zones hydrophobes nues.

La deuxième hypothèse semble la plus réaliste. En effet :

- des glycopeptides de mucus bronchique contenant un axe peptidique d'environ 55 résidus (valeur moyenne pour un résidu d'histidine) avec 15 amino-acides hydrophobes, 20 amino-acides hydroxylés et 20 autres, ont été caractérisés.

Rappelons que les travaux de séquence après oxydation périodique ont permis d'isoler des peptides plus courts. Ces peptides comportent une séquence de 14 acides aminés dense en sites de glycosylation, soit 7 hydroxy amino-acides avec 1 acide aminé site de glycosylation sur 2.

On peut donc imaginer 3 de ces "touffes" de glycosylation dans un "glycopeptide pronasique". L'ensemble des 3 "touffes" représentent les deux tiers du glycopeptide avec une densité en sérine, thréonine, proline, glycine, alanine, le tiers restant correspondant aux zones hydrophobes intercalaires riches en résidus de valine, leucine, isoleucine et phénylalanine.

On peut aussi envisager le même modèle correspondant à un multiple de ce motif.

Un certain nombre de questions demeurent toutefois :

- . quel est le rôle de ces zones hydrophobes ?
- . s'agit-il d'un rôle dévolu à la structuration même du mucus bronchique grâce à l'établissement de pontages intermoléculaires ?
- . s'agit-il d'un site de reconnaissance lors de la biosynthèse pour l'amorçage d'un type glycanique ou d'un autre ?
- . y'a-t-il une relation entre la nature de l'hydroxyamino-acide de liaison (sérine ou thréonine) et la structure de la substitution glycanique ?
- . y'a-t-il une relation entre glycanne sensible au TFMS et thréonine et au contraire relation entre glycanne résistant au TFMS et sérine ?

Un autre acquis a été pour nous la possibilité de préparer à partir de ce matériel un immunosérum et en fonction des résultats de séquence, de concevoir une sonde oligonucléotidique. Ces deux sondes nous permettent d'aborder la structure des mucines par la biologie moléculaire et selon deux stratégies différentes mais complémentaires.

- le criblage, à l'aide d'oligonucléotides de synthèse, d'une banque d'ADN complémentaires aux ARN messagers de muqueuse trachéobronchique constituée en vecteur λ gt10.

- le criblage d'une banque d'ADNc construite en vecteur d'expression λ gt11 à l'aide de l'immunosérum obtenu.

Nous décrivons dans le troisième chapitre successivement ces deux stratégies d'approche.

°00°

CHAPITRE III :

SEQUENCE PEPTIDIQUE DES MUCINES BRONCHIQUES

APPROCHE PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

°00°

I - INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il n'a été possible d'obtenir par la biochimie classique que des séquences très courtes de mucines, quelques acides aminés. Une nouvelle approche a donc été envisagée qui fait appel aux techniques de biologie moléculaire. Pour pouvoir les utiliser, le point de départ indispensable est la préparation d'une sonde spécifique de mucine.

Les glycopeptides de mucines obtenus par protéolyse de sécrétions bronchiques puis déglycosylation par voie chimique permettaient d'envisager deux stratégies :

- la fabrication d'une sonde oligonucléotidique en fonction des quelques éléments de séquence peptidique déterminés par dégradation de Edman
- la fabrication d'une sonde immunologique par injection à des lapins d'un mélange le plus hétérogène possible de glycopeptides déglycosylés de mucines.

Les travaux relatant l'utilisation de sondes immunologiques reconnaissant les mucines concernent leur étude biochimique ou leur étude par la biologie moléculaire.

A - Dans le cadre biochimique, les principaux objectifs étaient les suivants :

- isolement, caractérisation de mucines ou de glycoprotéines de haut poids moléculaire "mucin-like" provenant de lignées cellulaires de tumeurs diverses (sein, pancréas, poumon...).
- immunoprécipitation des précurseurs peptidiques potentiels des mucines.
- étude de l'amorce de la glycosylation de ces précurseurs.
- localisation immunohistochimique de ces précurseurs.

Deux approches sont envisagées :

- celle utilisant des anticorps monoclonaux, la plus fréquemment décrite.
- celle utilisant un immunosérum polyclonal.

1 - Anticorps monoclonaux

. à utilisation diagnostique

Des glycoprotéines de type "mucine" ont souvent été retrouvées dans des tumeurs du sein (HILKENS, 1984) (71), apparentées immunologiquement aux

mucines normalement présentes dans le lait humain et dont la caractérisation chimique a été faite en 1982 par SHIMIZU et YAMAUCHI (166). Ainsi des anticorps monoclonaux dirigés contre les mucines de lait ou les glycoprotéines "mucin-like" d'origine tumorale sont déjà utilisés à des fins de diagnostic de cancer mammaire (GRIFFITHS et coll, 1987) (54). Nous citerons, par exemple, les anticorps monoclonaux dénommés HMFG-1 et HMFG-2 (TAYLOR-PAPADIMITRIOU et coll, 1981) (183), SM-3 (BURCHELL et coll, 1987) (20) et W1 (LINSLEY et coll, 1988a) (110).

De même, la parenté immunologique existant entre mucines urinaires dites "PUM" (KARLSSON et coll, 1983) (89) et certaines glycoprotéines "mucin-like" d'origine cancéreuse permet l'utilisation d'un anticorps révélant les mucines (par exemple ca1) et capable de caractériser diverses sécrétions de tumeurs d'origine épithéliale (SWALLOW et coll, 1987) (180).

Une autre approche a aussi été utilisée à savoir partir d'anticorps spécifiques de mucines de kyste ovarien (BARA et coll, 1988 (10)) pour reconnaître des mucines gastriques de sujets sains (anticorps monoclonaux de la série M1).

Pour la majorité des anticorps monoclonaux décrits, la nature exacte des épitopes qu'ils reconnaissent est encore à préciser. Dans certains cas l'élément de sélectivité est le nombre et la qualité des lignées tumorales qu'ils reconnaissent (KIM et coll, 1988 ; HO et coll, 1988) (91,76).

La sensibilité et la spécificité peuvent être améliorées en combinant l'association de deux anticorps monoclonaux pour le diagnostic du cancer du sein (LINSLEY et coll, 1988b) (111).

. à utilisation en recherche fondamentale

Les anticorps monoclonaux ont aussi permis l'isolement de précurseurs peptidiques des mucines :

- l'anticorps monoclonal W1 de LINSLEY et coll (1988a) (110) a mené à l'immunoprécipitation de 2 types de précurseurs de mucines synthétisés par une lignée cellulaire MCF7, cellules à l'origine prélevées dans une effusion pleurale.

- l'anticorps 139H2 de HILKENS et coll (1984) (71) a permis de reconnaître l'axe peptidique de MAM-6 une sialomucine produite par les cellules alvéolaires et de nombreuses lignées cellulaires à l'origine tumorale et de caractériser la masse moléculaire de 3 précurseurs.

Toutefois, et selon les anticorps monoclonaux, certaines préparations reconnaissent la partie glycanique (HILKENS et coll, 1986 ; LAN et coll, 1987) (72,103).

La déglycosylation chimique préalable par l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique des mucines vis-à-vis desquelles est ensuite élaboré l'anticorps, augmente la sélectivité vis-à-vis d'épitopes peptidiques et, dans ces conditions, les anticorps monoclonaux ont pu permettre l'isolement d'entités peptidiques : l'anticorps monoclonal SM3 de BURCHELL et coll (1987) (20) permet de visualiser au niveau du lait humain un polypeptide majeur de 68000 daltons.

2 - Les anticorps polyclonaux

La deuxième approche de l'étude des mucines à l'aide de sondes immunologiques utilise comme antigène une préparation de mucines déglycosylées par l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluorométhane sulfonique et comme anticorps un immunosérum polyclonal.

De cette façon, MARIANNE et coll (1987b) (119) ont, à partir d'explants de bronches macroscopiquement saines, visualisé en gel de polyacrylamide des précurseurs de mucines respiratoires de 200 à 400 KDa.

De même, BHAVANANDAN et HEGARTY (1987) (14) ont immunoprécipité un produit de traduction "in vitro" de glande sous-maxillaire bovine, d'une masse moléculaire de 60000 Da.

GUM et coll (1989) (56) ont immunoprécipité un produit de traduction de muqueuse jéjunale humaine d'une masse moléculaire de 162000 Da.

Enfin, PERINI et coll (1989) (136) ont localisé par méthode immunohistochimique des précurseurs peptidiques des mucines respiratoires humaines.

B - Dans le cadre de la biologie moléculaire

Depuis 1987, des sondes immunologiques nécessairement spécifiques de l'axe peptidique ont été les outils de criblage de banques d'ADNc construites en vecteurs d'expression λ gt11, à partir de tissus sécrétant des mucines.

Là encore, deux stratégies existent selon l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou celle d'un immunosérum polyclonal.

1 - Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont permis de cribler avec succès une banque d'ADNc de tumeurs du sein MCF7 : dans les travaux de SIDDIQUI et coll (1988) (168) l'anticorps monoclonal était DF3 (carcinome mammaire), dans ceux de GENDLER et coll (1988) (45), les anticorps HMFG-1 et -2 ont été retenus.

2 - Anticorps polyclonaux

Sur tissus sains, l'immunsérum polyclonal a permis à TIMPTE et coll (1988) (186) d'isoler 5 phages à partir d'une banque d'ADNc de glande sous-maxillaire porcine. Celui préparé par BYRD et coll (1989) (21) à partir de mucine colique humaine cancéreuse a permis à GUM et coll (1989) (56) d'obtenir 3 fragments de séquence d'apomucine d'intestin grêle.

Enfin, GENDLER et coll en 1987 (45) ont comparé, sur une banque d'ADNc de lignée tumorale mammaire MCF7, l'efficacité d'un anticorps monoclonal (HMFG-1 et -2 ; SM-3 et -4) à celle d'un immunsérum polyclonal.

Dans cette revue non exhaustive de la littérature, nous avons retenu que l'immunsérum polyclonal, à condition qu'il soit dirigé contre une apomucine correctement déglycosylée constituait un outil efficace.

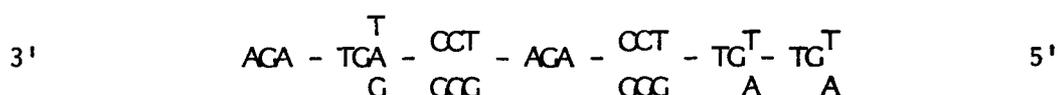
Sur notre matériel, une banque d'ADNc de trachée humaine saine, le criblage à l'aide d'anticorps monoclonaux nous est apparu une approche trop sélective par rapport à la diversité plus que probable des peptides de mucines et nous avons donc retenu l'utilisation de notre immunsérum de lapin polyclonal.

II - STRATEGIES

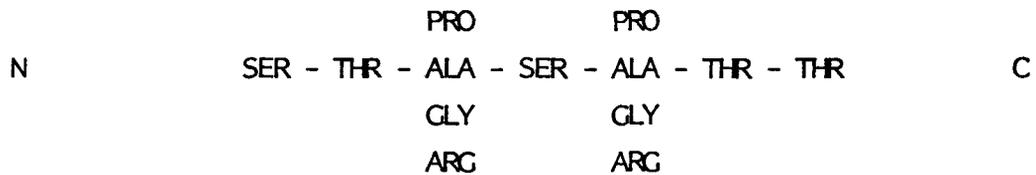
A - Préparation des sondes nucléotidiques

L'oligonucléotide correspondant à une séquence en acides aminés la plus représentative au regard des résultats de séquence obtenue sur glycopeptides déglycosylés (cf. chapitre II) est préparé par voie chimique (BALLAND et coll, 1985) (9). Il est ensuite marqué selon un protocole décrit dans l'appendice technique, pour donner une sonde radioactive (WALLACE et coll, 1985) (190). Les séquences de la sonde ainsi obtenue sont, quand il est possible, choisies en fonction d'acides aminés codés par un nombre restreint de codons. Cependant, pour couvrir toutes les possibilités de codons, il faut souvent préparer un mélange de sondes (LATHE, 1985) (104).

A partir des résultats de séquence en acides aminés de glycopeptides de mucus bronchique humain, nous avons fait synthétiser un mélange d'oligonucléotides (voisin de 800) de 21 bases du type :



complémentaire de la séquence en acides aminés :



La synthèse de ce mélange d'oligonucléotides a été réalisée par Melle F. DENHEZ (Unité INSERM N°186, Directeur : D. STEHELIN).

B - Préparation de sondes immunologiques

Les glycopeptides déglycosylés de mucines trachéobronchiques ont été injectés à deux lapins selon un protocole d'immunisation proche de celui décrit par VAITUKAITIS (1981) (187) (voir appendice technique). Le sérum recueilli à partir de la troisième saignée a pu être utilisé comme sonde immunologique, dilué au 1/50^è.

C - Préparation d'ARN messagers

1 - Homogénéisation du matériel biologique

Le matériel biologique (muqueuses trachéales porcine, humaine et muqueuse colique humaine), prélevé rapidement, est tout de suite congelé dans l'azote liquide, pesé et conservé à -80°C. Il est rapidement pulvérisé au mortier-pilon toujours sur azote liquide et repris en tampon inhibiteur de ribonucléases.

2 - Isolement des ARN cellulaires totaux

La centrifugation en gradient de sel de césium (GLISIN et coll, 1974) (49) a été utilisée pour l'isolement des ARN totaux (appendice technique). Le gradient de densité est établi de telle sorte que les ARN forment un culot au fond du tube de par leur densité plus élevée que celle des autres macromolécules cellulaires. Après une étape terminale d'extraction et de purification, ces ARN sont quantifiés spectrophotométriquement. Le protocole définitif avant que d'être appliqué à la muqueuse trachéobronchique humaine a été testé sur différentes muqueuses d'obtention plus aisée.

3 - Purification des ARN poly A⁺

Deux techniques basées sur l'affinité peuvent être utilisées pour isoler des ARN messagers.

La première technique utilise la chromatographie sur colonne d'oligo dT cellulose (AVIV et LEDER, 1972) (7). Elle repose sur le fait que la grande majorité des ARN messagers possède une extrémité 3'OH polyadénylée. Les ARN polyA⁺ sont élués par un tampon dépourvu du NaCl. L'éluion de chacune des populations d'ARN est suivie par spectrophotométrie ultraviolette à 260nm (appendice technique).

L'autre technique de purification peut être réalisée sur papier activé au diazonium et couvert de polyU lié par covalence (WERNER et coll, 1984) (192). Cette technique, que nous avons testée, bien que plus rapide et moins délicate, permet une moins bonne purification des ARNm. Ceci peut s'expliquer par des fixations non spécifiques.

4 - Problèmes posés par l'intégrité des ARN poly A⁺

Avant que de poursuivre le travail, il est essentiel de s'assurer de l'intégrité des ARNm poly A⁺ purifiés.

- Critères physico-chimiques

L'intégrité de longueur a été contrôlée à l'aide de l'électrophorèse en milieu dénaturant (LEHRACH et coll, 1977) (105). Le bromure d'éthidium permet la révélation des bandes ribosomales et leur taille est vérifiée par rapport à un standard de poids moléculaire (appendice technique).

- Critères biologiques

Les ARN messagers contenus dans la préparation sont traduits "in vitro" en présence d'un acide aminé marqué (PELHAM et JACKSON, 1976) (135). L'aspect technologique est donné dans l'appendice : la traduction "in vitro" réalisée sur des muqueuses trachéales de rat et de porc a permis de visualiser en électrophorèse, un "continuum" constitué de masses moléculaires inférieures à 15000 Da jusqu'à des masses moléculaires supérieures à 100000 Da. Ces masses moléculaires objectivent une bonne conservation de l'intégrité des différents ARNm étudiés.

Cette technique n'a pu être reproduite dans le cas de muqueuse trachéale humaine faute de matériel suffisant. De plus, l'expérience acquise dans le laboratoire pour la réalisation d'autres banques d'ADNc à partir de

diverses muqueuses, nous a montré que les meilleurs rendements ont toujours été obtenus sur des ARNm fraîchement préparés et conservés moins d'une semaine à -80°C . Ceci est absolument incompatible avec la visualisation de produits de traduction en autoradiographie. La traduction "in vitro" réalisée sur les ARN de muqueuses non humaines n'a été utilisée qu'en tant qu'indicateur de qualité des ARN messagers et n'a pas servi à immunoprécipiter des produits de traduction.

La composition particulière en acides aminés des mucines (peu de leucine et de méthionine) rend le choix de l'acide aminé difficile et nous oblige à utiliser des méthodes autres que l'approche classique.

Quant à l'intégrité des ARNm de la muqueuse trachéale humaine, nous n'avons pu l'appréhender qu'au travers d'une autre préparation d'ARNm réalisée simultanément sur une lignée cellulaire de tumeur du sein VHB₁ (VANDEWALLE et coll, 1987) (188). L'intégrité des ARNm a été vérifiée par "Northern blot" (Figure n°14) en utilisant des sondes de l'oncogène C-Myc qui a donné une bande à 2,3 kb et de l'oncogène C-Abelson qui a donné deux bandes : l'une à 6kb et l'autre à 7kb. Nous pouvons indirectement considérer que, si la préparation d'ARNm de la lignée VHB₁ donne des fragments de taille aussi conséquente que 7kb, il en est de même pour celle de la muqueuse trachéale humaine sauf si les ARNm de mucines sont très instables.

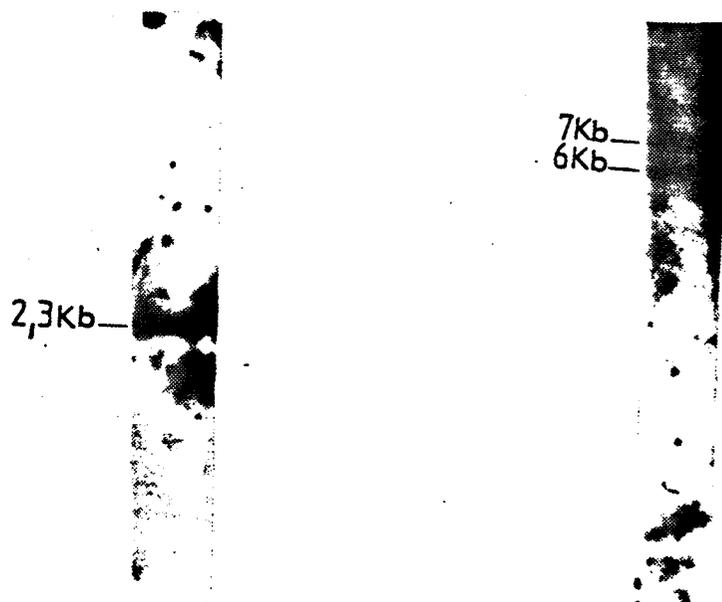
D - Obtention d'une banque d'ADNc

1 - Synthèse des ADNc

a) Principe

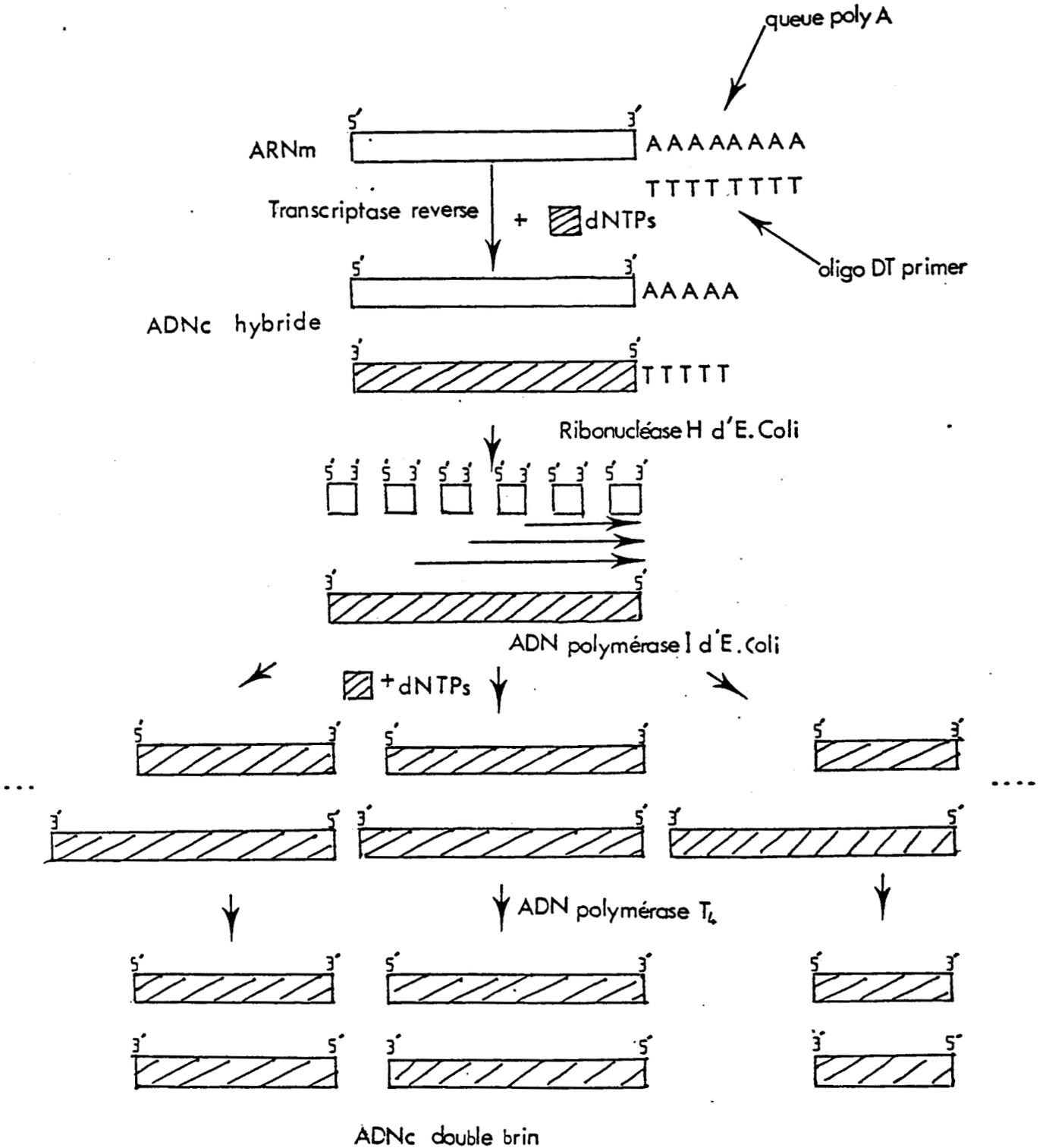
La synthèse des ADNc a été effectuée selon la technique de GUBLER et coll (1983) (55) qui dérive de la méthodologie décrite par OKAYAMA et BERG (1982) (127). Le premier brin d'ADNc est synthétisé par la transcriptase reverse de RAV-2. Cet enzyme se sert de l'ARN messager comme matrice pour catalyser la polymérisation de l'ADN dans le sens 5'-3' (Figure n°15). Elle nécessite la présence d'une amorce en 3'OH pour initier la synthèse (oligo dT). Le traitement de l'hybride ARN/ADN par la ribonucléase H d'E. coli entraîne la formation de coupures spécifiques au niveau du brin d'ARN. La synthèse du deuxième brin d'ADNc est réalisée par l'ADN polymérase I d'E. Coli qui, en raison de son activité exonucléasique 3'-5' à partir d'un 3'OH libre, permet de

Figure n°14 : Analyse par Northern blot des ARN messagers d'une culture de la lignée cellulaire VHB₁. Utilisation des sondes de l'oncogène C-MYC (colonne n°1) et de l'oncogène C-ABELSON (colonne n°2) *



* Nous remercions le Dr. M. COLLYN D'HOOGHE (U.124 INSERM) pour la réalisation de ces "Northern blots".

Figure n°15 : Synthèse d'ADNc d'après GUBLER et coll (1983) (55)



dégrader le brin d'ARN et, simultanément, par son activité polymérisique, de synthétiser un ADN complémentaire du premier brin. L'ADN polymérase T_4 est ensuite utilisée pour son activité exonucléasique 3'-5' nettement plus importante sur un ADN simple brin que sur un double brin, afin d'obtenir un ADNc double brin aux extrémités franches.

b) Aspects méthodologiques

La transcriptase reverse n'est pas totalement exempte de ribonucléases et un inhibiteur (Human Placental Ribonuclease Inhibitor ou HPRI) est ajouté. Les conditions optimales d'action de la transcriptase reverse peuvent varier d'une préparation d'ARNm à une autre. La stabilité du pH et la concentration optimale en cations monovalents sont des notions très importantes. La synthèse est réalisée en présence d'un nucléotide tri-phosphate radioactif (ici le dCTP ^{32}P), qui permet, d'une part, de calculer la quantité d'ADNc obtenue et, d'autre part, de vérifier la qualité de celui-ci. Les marquages du premier brin ou du deuxième brin sont réalisés séparément. Lorsque la synthèse du premier brin est effectuée, un aliquot du milieu réactionnel radioactif est prélevé et le pourcentage d'incorporation est calculé. Pour la synthèse du deuxième brin, les enzymes nécessaires sont ajoutés successivement (appendice technique).

Un aliquot du milieu réactionnel du deuxième brin est prélevé pour calculer le pourcentage d'incorporation. Ce calcul du pourcentage d'incorporation est décrit dans l'appendice technique.

2 - Analyse électrophorétique des ADNc synthétisés

La taille moléculaire de chaque brin d'ADNc a été appréciée par une électrophorèse en gel d'agarose alcalin. La figure n°16 montre une grande polydispersion des masses moléculaires de ces ADNc, allant de quelques centaines de bases à 10 kilobases. Ce "continuum" constitue une bonne représentativité des multiples ARNm synthétisés au niveau cellulaire. La majorité du "continuum" est centrée sur des masses moléculaires de 2 à 4Kb. La synthèse du premier et du deuxième brin s'est effectuée avec des rendements qualitatifs et quantitatifs approximativement équivalents. Une autre technique de synthèse d'ADNc a pu être testée (Figure n°17). Elle dérive de celle d'HAYMERLE et coll (1986) (66) et utilise une combinaison d'amorces hexanucléotidiques représentatives de toutes les possibilités de synthèse de ces amorces ou "Random Hexanucleotide Primers". Cette technique permet la

Figure n°16 : Autoradiographie du gel d'agarose alcalin de la migration des ADNc marqués sur le premier brin (colonnes n°1 et 2) et des ADNc marqués sur le deuxième brin (colonnes n°2 et 4)

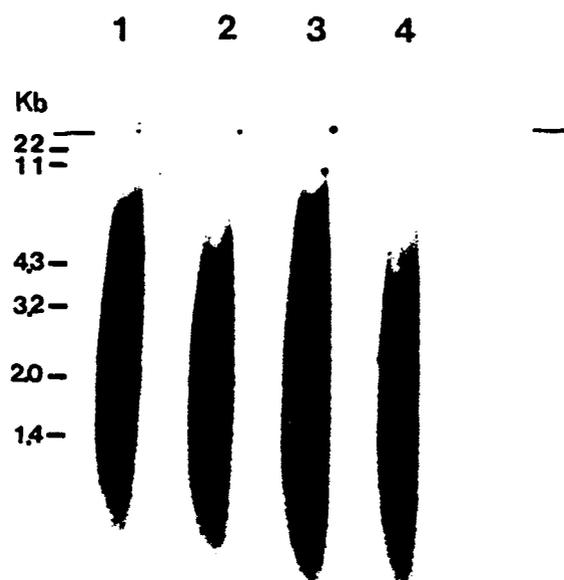
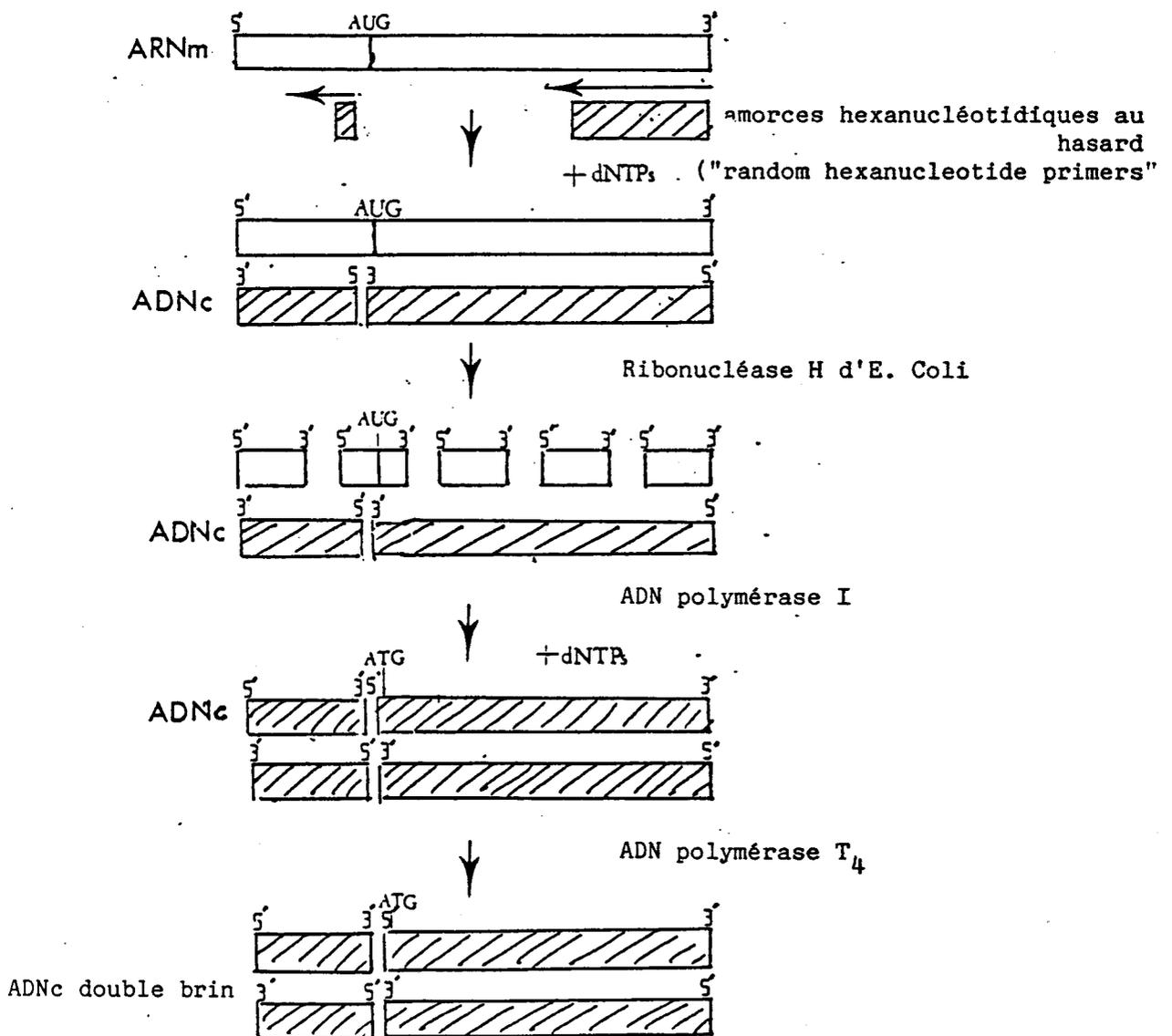


Figure n°17 : Synthèse d'ADNc, technique des "random hexanucléotides"
d'après HAYMERLE et coll (1986) (66)



synthèse d'ADNc au hasard à partir d'amorces situées dans des positions internes de la molécule d'ARNm. Elle autorise la synthèse de l'extrémité 5' d'ARNm longs difficilement synthétisés par la technique classique. De plus, dans le cas d'ARNm poly A- ou à extrémité polyadénylée courte, c'est la seule technique utilisable.

Nous l'avons testée lors de la préparation d'ADNc de muqueuse trachéale de porc et de muqueuse colique humaine. Nous ne l'avons pas retenue car les rendements de synthèse sont faibles (dix fois inférieurs à ceux de la technique standard) et ne nous ont pas permis d'aller plus avant dans l'étude des ADNc synthétisés.

Si l'on considère que la mucine native a une masse moléculaire d'environ 10^6 Daltons, la fraction protéique représente 2 à 300000 Daltons et est en accord avec les travaux de HILKENS et BUIJS (1988) (73). La masse moléculaire moyenne d'un résidu d'acide aminé étant de 111, on estime donc le nombre de résidus entre 1800 et 2700. Ceci nous donnerait une taille minimum de l'ARNm comprise entre 5,4 et 8,1Kb.

E - Réalisation de banques d'ADNc en bactériophage

1 - Aspects généraux

La possibilité de synthétiser et de cloner des copies d'ADN à partir d'ARNm a permis des progrès rapides dans l'étude de la structure, de l'organisation et de l'expression génique. L'étape ultérieure à celle de la synthèse des ADNc est la fabrication de banques. Il existe plusieurs méthodes de clonage de ces ADNc. Elles sont divisées en deux catégories principales :

- les méthodes utilisant les plasmides
- les méthodes basées sur l'utilisation des bactériophages .

Une banque d'ADNc contient, dans les conditions idéales, des copies de toutes les espèces d'ARNm de la population originelle. Elle peut être de plus conservée et étudiée pour une ou plusieurs séquences particulières.

Le clonage en plasmide ou "tailing" a été utilisé pour la première fois par WENSINK et coll (1974) (191). Il n'a pas retenu notre attention car nous avons subi de nombreux échecs lors d'essais de réalisation de banques d'ADNc de glande parotidienne humaine.

Nous avons donc choisi de réaliser simultanément deux banques en vecteur λ gt10 et λ gt11, la stratégie étant la suivante :

* criblage de la banque en λ gt11 à l'aide de sondes immunologiques en vue de l'obtention de clones positifs et séquençage de ces clones positifs.

* choix de l'un ou de plusieurs de ces clones pour la préparation d'une sonde nucléique en vue du criblage de la banque en vecteur λ gt10.

Le vecteur

Le choix de bactériophage dépend donc, comme nous venons de le voir, de la méthode de criblage appliquée ultérieurement à la banque d'ADNc.

* Le bactériophage λ gt10 (HUYNH et coll, 1985) (81) accepte le clonage de fragments d'ADNc jusque des tailles voisines de 7,6kb. Le site de clonage correspond à l'unique site de coupure par Eco RI, localisé sur le gène répresseur "cl". Ce gène est indispensable à l'établissement d'un cycle lysogénique lors de la transformation des bactéries hôtes. La souche parentale de λ gt10 a une voie lysogénique préférentielle car le gène "cl" est actif. Elle donne des plages de lyse troubles sur les boîtes de petri lorsqu'elle infecte des souches d'E. coli L87. L'infection réalisée par des bactériophages recombinants (cl⁻) produit des plages au centre clair. Cette caractéristique permet de distinguer les bactériophages recombinants. Enfin, lorsque des souches bactériennes telles que NM514, possédant la mutation "hfi" (high frequency lysogeny), sont infectées, seuls les bactériophages recombinants forment des plages sur la boîte.

* Le bactériophage λ gt11 contient un site de clonage unique Eco RI situé en amont de l'extrémité 3' du gène LacZ codant pour la galactosidase. L'ADNc inséré peut être traduit par la bactérie-hôte sous forme d'une protéine de fusion. L'expression protéique est sous le contrôle d'un promoteur et le contrôle de cette expression est une propriété importante minimisant les effets toxiques éventuels du produit du gène vis-à-vis des cellules hôtes. Les souches bactériennes utilisées contiennent le plasmide pMC9 qui exprime de grandes quantités d'un répresseur inhibant le promoteur. L'addition d'IPTG (isopropyl- β -D-thio galactopyranoside) empêche l'action de ce répresseur et permet d'initier la transcription du gène fusionné LacZ-ADNc et sa traduction en protéine. Les bactériophages recombinants n'ont pas ou peu d'activité galactosidase et donnent des plages blanches en milieu solide. Les bactériophages non recombinants conservent leur activité et donnent des plages bleues en présence du substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl -D-galactopyranoside ou X-Gal (YOUNG et DAVIES, 1983a et b) (201,202).

Les bactéries hôtes

Pour le clonage en λ gt10 :

E. Coli NM514 : souche hfl+

E. Coli L87 : souche hfl - utilisée pour le contrôle du degré de sélection biologique de la souche hfl +.

Pour le clonage en λ gt11 :

E. Coli Y1088 utilisée pour le criblage de l'ADN recombinant à l'aide de sondes nucléiques

E. Coli Y1089 utilisée pour la production en grandes quantités de la protéine de fusion

E. Coli Y1090 utilisée pour l'immunodétection en raison de la production de protéines et de l'absence de fabrication de protéases (lon-).

2 - Aspects technologiques : Modification des ADNc pour l'insertion dans le bactériophage

a) Méthylation des ADNc

Le but est d'obtenir des sites Eco RI à chaque extrémité des ADNc pour les insérer dans les bras d'un bactériophage. Une étape de protection des sites potentiels Eco RI au niveau des ADNc est nécessaire. Les résidus d'adénine au niveau de ces sites de restriction sont ainsi méthylés par l'Eco RI méthylase (Figure n°18).

b) Ligation d'oligonucléotides de liaison Eco RI aux ADNc

Ces adaptateurs de type (GGAATTCC) sont phosphorylés à l'extrémité 5' et prêts à l'emploi. Ils sont ajoutés aux deux extrémités des ADNc. L'adjonction de ces adaptateurs est réalisée par l'ADN ligase T_4 . Les ADNc obtenus possèdent alors une multitude "d'adaptateurs" à chacune de leurs extrémités.

c) Préparation des ADNc possédant un seul site Eco RI à chaque extrémité

La protection, par la méthylation, des sites potentiels de restriction Eco RI internes aux ADNc permet le maintien de leur intégrité. Lors de l'hydrolyse par Eco RI, nous obtenons des ADNc possédant un seul adaptateur Eco RI à chaque extrémité.

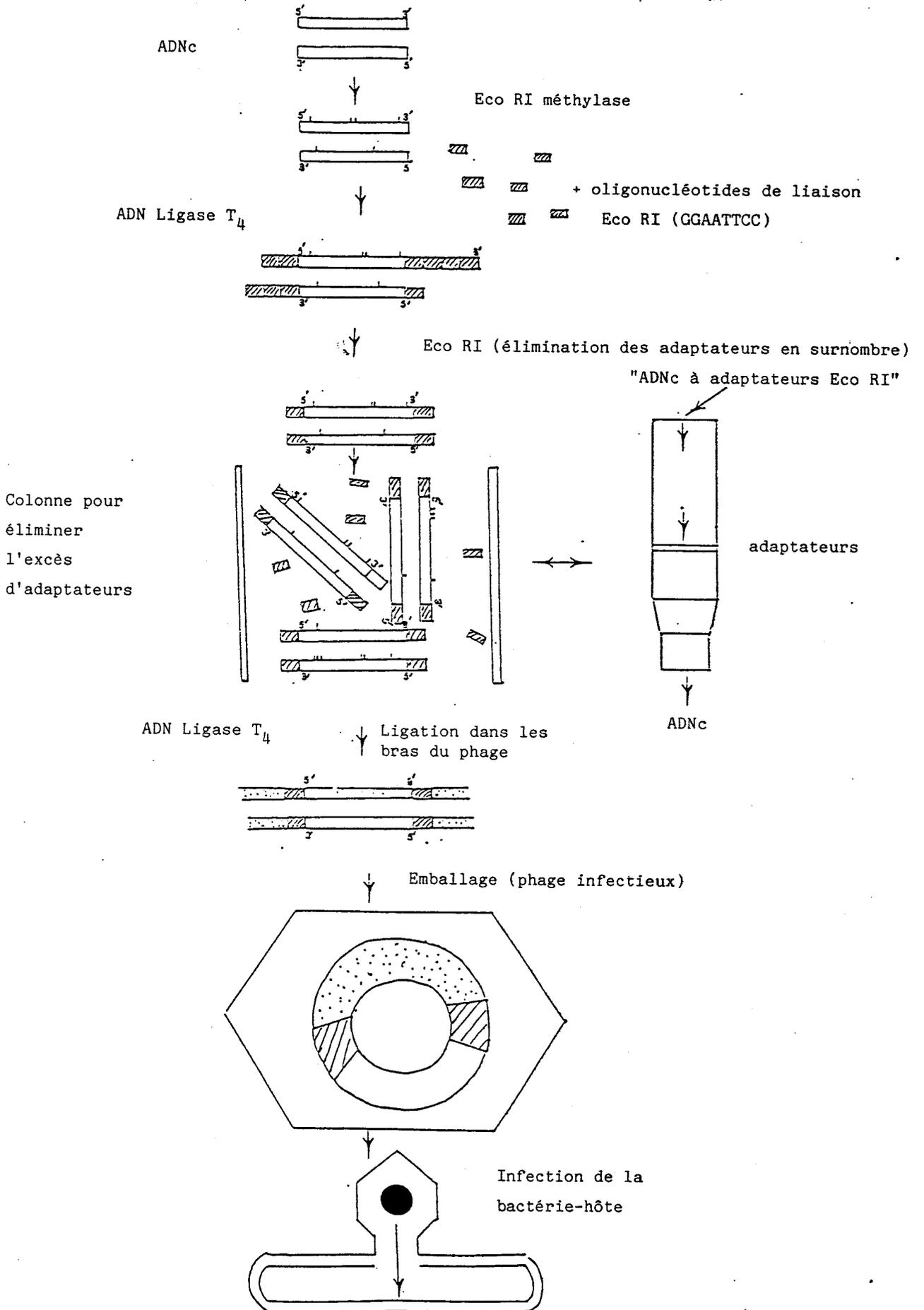
d) Séparation des ADNc de l'excès d'adaptateurs

L'excès d'adaptateurs hydrolysés est susceptible d'interférer lors du clonage. La séparation entre ADNc et adaptateurs est réalisée sur colonne de gel filtration.

e) Insertion des ADNc dans le bactériophage λ gt10 ou λ gt11

Les ADNc sont insérés dans les bras du vecteur λ gt10 ou λ gt11 digérés par Eco RI. Ils donnent naissance à des ADN recombinants. Les conditions de ligation permettent la formation de concatémères linéaires de molécules d'ADN.

Figure n°18 : Modification des ADNc pour l'insertion dans les bactériophages





f) Encapsulation des recombinants ADNc- λ gt10 et ADNc- λ gt11

Les concatémères linéaires formés lors de la ligation sont les meilleurs substrats pour la réaction d'encapsulation "in vitro". Cette réaction donne naissance à des vecteurs infectieux qui vont croître chez les bactéries hôtes. L'élaboration des banques est décrite dans l'appendice technique.

g) Etalement sur milieu de culture solide

Les milieux réactionnels d'encapsulation de bactériophages λ gt10 sont mis en contact avec des bactéries hôtes L87 ou NM514, tandis que les bactériophages λ gt11 sont mis en contact avec la souche Y1088.

Les différents tubes bactériophages λ -bactéries hôtes sont repris en agarose liquide et coulés sur un milieu solide LB Agar.

III - RESULTATS

A - Banque d'ADNc en bactériophages λ gt10 ou λ gt11

Nous ne développons ici que les résultats obtenus avec la muqueuse trachéale humaine.

Les rendements obtenus sont décrits dans le tableau n°22.

Le tube n°1 correspond au contrôle "ADN λ gt10" et permet de tester, sur la bactérie hôte L87, l'efficacité de la réaction d'encapsulation. Le titre doit être supérieur à $2 \cdot 10^8$ p.f.u./ μ g, il est de $6,1 \cdot 10^8$ p.f.u./ μ g.

Le tube n°2 est en fait un témoin "bras phosphorylé de λ gt10 seul" et il permet de tester l'efficacité de la ligation (ADN ligase T_4) et la qualité des bras du phage. Il doit être voisin de 10^7 p.f.u./ μ g, il est de $3,6 \cdot 10^7$ p.f.u./ μ g.

Le rapport entre le titre obtenu en L87 (bactérie non sélective) et NM514 (bactérie sélective) doit être supérieur à 100. Il est de 3050.

Le rapport des titres de L87:NM514 (appelé rapport sélectif des bras) dans le cas du tube n°2, doit être supérieur à 100, il est de 680.

- Le bruit de fond est calculé en divisant le titre en L87 des différents tubes par le rapport sélectif des bras (680).

- Le nombre de recombinants totaux en NM514 est donné en soustrayant le bruit de fond précédemment calculé du titre obtenu en NM514.

Tableau n°22 : Construction de la banque d'ADNc en λ gt10

ADN vecteur	quantité d'insert d'ADNc	dilution	nombre de colonies (L87)	titre (L87)/ml de phage	titre sur L87 /530µl "bras"	dilution	nombre de colonies NM514	titre sur NM514 /ml de phage	titre sur NM514 /530µl	rapport L87/NM514	bruit de fond	nombre réel de recombinants	% de recombinaisons	nombre de recombinants par µg d'ADNc
Tube 1	λ gt10	-	10^{-7}	115	$11,5 \cdot 10^8$	10^{-3}	377	$3,77 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	3050	-	-	-	-
Tube 2	bras λ gt10	-	10^{-6}	68	$6,8 \cdot 10^7$	10^{-3}	100	$10 \cdot 10^4$	$5,310^4$	680	-	-	-	-
Tube 3	bras λ gt10	50ng	10^{-6}	378	$3,78 \cdot 10^7$	10^{-3}	283	$2,83 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	133	$2,9 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	80	$2,4 \cdot 10^6$
Tube 4	bras λ gt10	75ng	10^{-6}	47	$4,7 \cdot 10^7$	10^{-4}	81	$8,1 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$	58	$3,6 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^5$	91	$5,2 \cdot 10^6$
Tube 5	bras λ gt10	100ng	10^{-5}	321	$3,21 \cdot 10^7$	10^{-4}	122	$12,2 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^5$	26	$2,5 \cdot 10^4$	$6,3 \cdot 10^5$	97	$6,3 \cdot 10^6$

Tableau n°23 : Construction de la banque d'ADNc en λ gt11

ADN vecteur	quantité d'insert d'ADNc	dilution	nombre de colonies Y1088	titre Y1088/ml de phage	titre Y1088/pfu/µg "bras"	moyenne	dilution	nombre de colonies Y1090	titre Y1090/ml de phage	titre Y1090/pfu/µg "bras"	moyenne pfu/µg	% de recombinaisons Y1088	% de recombinaisons Y1090	nombre de recombinants par µg d'ADNc	
Tube 1	bras λ gt11	60ng	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	1800 193 17	$18 \cdot 10^5$ $19,3 \cdot 10^5$ $17 \cdot 10^5$	951.000 1.022.900 910.000	10^6	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	950 168 14	$9,5 \cdot 10^5$ $16,8 \cdot 10^5$ $14 \cdot 10^5$	503500 890400 742000	$7,1 \cdot 10^5$	90	84	$1,7 \cdot 10^7$ $(>10^6)$
Tube 2	bras λ gt11	120ng	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	1920 202 18	$19,2 \cdot 10^5$ $20,2 \cdot 10^5$ $18 \cdot 10^5$	1.017.600 1.070.600 954.000	10^6	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	1020 122 14	$10,2 \cdot 10^5$ $12,2 \cdot 10^5$ $14 \cdot 10^5$	540600 646600 742000	$6,4 \cdot 10^5$	88	77	$0,8 \cdot 10^7$ $(>10^6)$

- les valeurs chiffrées entre parenthèses indiquent les résultats théoriques attendus

L'efficacité du kit de clonage par μg de fragment d'ADNc est obtenue en multipliant le nombre de recombinants par 1000 et en divisant par le nombre de ng d'ADNc utilisés.

Le taux doit être supérieur à 10^6 p.f.u./ μg , il varie de 2,4 à $6,3 \cdot 10^6$ p.f.u./ μg .

Les rapports L87:NM514 sont plus faibles dans les tubes contenant les recombinants (tubes n°3,4,5) que dans le tube n°2 (bras $\lambda\text{gt}10$). Ces rapports ont tendance à diminuer avec l'augmentation du taux d'ADNc lorsque le clonage est réussi. Ils passent ici de 133 à 26 lorsque nous augmentons le taux d'ADNc de 50 à 100ng. Le pourcentage de recombinants sur NM514 varie de 80 à 97%. L'efficacité de clonage est correcte puisqu'elle est supérieure à 10^6 recombinants par μg d'ADNc et ceci représente un nombre de $1,14 \cdot 10^6$ clones disponibles pour le criblage à l'aide de sondes nucléiques.

Dans le tableau n°23 sont reportés les résultats du clonage en bactériophage $\lambda\text{gt}11$. Le pourcentage de recombinants obtenus est supérieur à 80% et l'efficacité de clonage est de 10^7 clones/ μg d'ADNc. En conclusion, dans le cas de la banque d'ADNc en bactériophage $\lambda\text{gt}11$, environ $2 \cdot 10^6$ clones sont disponibles pour le criblage par sondes immunologiques.

B - Criblage d'une banque d'ADNc de trachée de porc à l'aide de la sonde oligonucléotidique

Dans les conditions adéquates de nature de tampon de dénaturation, de force ionique, de pH, de température et de temps de contact, les sondes oligonucléotidiques de synthèse font montre d'une spécificité absolue d'hybridation. Elles sont utilisées pour détecter la séquence code cible dans une banque de clones appropriés. La température optimale d'hybridation dépend de la longueur et de la nature de l'oligonucléotide. Une équation mathématique permet le calcul approximatif de cette température (HANAHAN et MESELSON, 1983 ; MASON et WILLIAMS, 1985) (58,121).

$$T_H = T_D - (3^\circ\text{C}) \text{ où } T_D = 2^\circ\text{C} \times (\text{nombre de A-T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{nombre de G-C}).$$

Nous avons utilisé notre mélange d'oligonucléotides pour cribler une banque d'ADNc de trachée de porc. En effet nous ne disposions pas alors de

muqueuse trachéale humaine et nous espérons une homologie suffisante entre les muqueuses humaine et porcine pour obtenir des clones positifs. L'aspect technologique est décrit dans l'appendice technique. Nous avons fait varier la nature du tampon de préhybridation (tampon SSC 6X avec Denhardt 5X ou 10X, avec ou sans SDS). Le temps de préhybridation est de 24 heures à 42°C. L'hybridation est réalisée 24 heures de 37°C à 55°C. Les lavages sont réalisés entre 40°C et 70°C. Nous avons augmenté les températures de 5°C en 5°C. La molarité du tampon SSC a été changée (6X vers 4 puis 2X...). Le criblage de cette banque d'ADNc s'est révélé infructueux. Les conditions physicochimiques de force ionique, de température et de temps de contact sont très difficiles à évaluer. L'oligonucléotide correspondant à une séquence de "type mucine" est très dégénéré et il représente en fait un mélange de différents nucléotides. Il est très difficile de discriminer les clones positifs des autres. Cet oligonucléotide de synthèse est en fait une modélisation extrême du matériel étudié et, de ce fait, ne peut ressembler que de très loin à ce matériel. Nous n'avons donc jamais été capables de déterminer les conditions idéales si elles existaient.

C - Criblage de la banque d'ADNc de muqueuse trachéale humaine en bactériophage λ gt11 par les sondes immunologiques

1 - Principe

Les détails techniques sont donnés dans l'appendice. Les clones provenant d'aliqots de la banque sont étalés sur des boîtes de Pétri. Les conditions d'étalement permettent la production d'une protéine de fusion par chacun de ces clones. Ces protéines de fusion se fixent sur un disque de nitrocellulose. Ce disque est mis à incuber avec les anticorps précédemment décrits. Après lavage des disques, un second anticorps marqué soit à la peroxydase (WILSON et NAKANE, 1981) (196), soit à la biotine (BAYER et coll, 1979) (11), permet de visualiser l'éventuel clone positif galactosidase-mucine.

Trois difficultés sont rencontrées :

- trouver la bonne dilution permettant un nombre correct de clones sur chaque boîte (environ 5000)
- trouver la bonne dilution d'anticorps primaires et secondaires afin d'obtenir une réponse nette. Nous avons utilisé une dilution au 1/50^è d'anticorps primaires provenant de chaque lapin et une dilution au 1/200^è pour l'anticorps secondaire.

- standardiser la coloration pour différencier le plus nettement possible les clones positifs des clones négatifs.

2 - Résultats

Un clone n'a été considéré comme positif que lorsqu'un deuxième tour de criblage s'est révélé être positif avec une très nette augmentation du rendement (voir appendice technique).

Environ $1,2 \cdot 10^6$ clones ont été criblés, 55 ont donné une réponse positive au premier tour et seuls 12 clones ont été conservés en fonction de la réponse du deuxième tour de criblage. Ces clones, dénommés "TH", ont tout d'abord été caractérisés pour leur masse moléculaire après coupure de l'ADN par l'enzyme Eco RI (Tableau n°24). Les tailles obtenues varient de 0,18Kb à 1,5Kb.

D - Etude immunohistochimique

Avant d'entreprendre l'étude de la séquence nucléotidique des différents clones, il nous est apparu nécessaire de vérifier, par immunohisto- chimie, la qualité de nos anticorps ainsi que leur spécificité au niveau tissulaire et cellulaire. Les immunoglobulines spécifiquement impliquées dans la reconnaissance de chacun des clones positifs ont été extraites de l'immunsérum total par affinité vis-à-vis du clone correspondant selon une méthode dérivée de celle de TIMPTE et coll (1988) (186) (appendice technique). Ces anticorps "monoclonale" ont été testés sur coupes histologiques. Ils reconnaissent soit les cellules caliciformes et les glandes muqueuses de la muqueuse trachéale humaine, soit uniquement les cellules caliciformes (Tableau n°25). En aucun cas les cellules séreuses ne sont marquées. Ceci a constitué pour nous une vérification de la positivité des clones sélectionnés. A noter que aucun d'eux n'est capable de reconnaître les cellules caliciformes d'origine colique.

Ceci laisserait penser que :

- ou les mucines coliques sont différentes des mucines trachéales tout au moins en ce qui concerne les 12 clones étudiés.

- ou le niveau d'expression de ces mucines coliques est beaucoup plus faible que celui de la trachée.

De plus, l'utilisation d'anticorps "monoclonale" nous permet de mettre en évidence une différence cellulaire d'expression de certains types de mucines.

Tableau n°24 : Caractérisation des "inserts" des clones positifs
de la banque de muqueuse trachéale humaine en vecteur λ gt11

Dénomination du clone	Taille en Kb
TH 11	0.25
TH 17	0.70
TH 29	0.60
TH 30	0.60
TH 36	0.26
TH 37	0.25
TH 42	0.70*
TH 46	0.60
TH 47	1.50
TH 51	0.43
TH 54	0.20
TH 55	0.18

* le fragment TH42 n'a pas été séquencé

Tableau n°25 : Résultats immunohistochimiques
obtenus à l'aide des anticorps "purifiés"

Anti corps anti	Muqueuse trachéale humaine		Muqueuse colique humaine
	cellules "caliciformes"	cellules sécrétantes des glandes	cellules "caliciformes"
TH11	++	-	-
TH37	++	+	-
TH29	+	+	-
TH30	+	+	-
TH46	+	-	-
TH47	+++	-	-
TH36	+	-	-
TH51	++	-	-
TH54	++	-	-
TH55	+	-	-
Immun sérum total	+++	+++	+++

E - Séquence nucléotidique

1 - Principe

La séquence s'effectue par l'intermédiaire du bactériophage M13 qui se multiplie au niveau de colonies d'E. Coli infestées en produisant d'abord une forme répliquative d'ADN circulaire double brin. Cette forme d'ADN peut être introduite au niveau d'une bactérie compétente TG₁ par une étape de transformation. Lorsque la concentration de la forme double brin atteint 200 copies par cellule, une forme monobrin continue d'être synthétisée à partir de la forme répliquative. Cet ADN monobrin peut être récupéré et utilisé pour le séquencage selon la technique de SANGER et coll (1977) (160). Le principe consiste à synthétiser un fragment d'ADN complémentaire d'un ADN simple brin à séquencer à partir d'une origine connue (Figure n°19).

C'est l'ADN polymérase I ou fragment de Klenow qui a été utilisée car elle n'a pas d'activité exonucléasique. Elle synthétise un brin complémentaire si on lui fournit une matrice d'ADN monobrin et une amorce avec un groupement hydroxylé en 3'. La synthèse est arrêtée par l'addition d'analogues dideoxynucléotides qui ne possèdent pas d'hydroxyle en 3' mais qui peuvent être incorporés au hasard. L'ADN synthétisé est marqué à l'aide d'un desoxynucléotide radioactif. Il est analysé sur un grand gel de polyacrylamide parallèlement mais séparément avec les autres fragments dont la synthèse est arrêtée par l'un des autres dideoxynucléotides.

2 - Résultats de séquence

Les compositions en acides aminés déduites des séquences nucléotidiques sont caractéristiques des mucines (Tableau n°26). Comme dans le deuxième chapitre, les compositions en acides aminés sont interprétées en distinguant trois populations de résidus acides aminés :

- les acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine) dont le pourcentage varie de 18% (7 résidus sur 39 pour TH47) à 64% (43 résidus sur 67 pour TH54) et où on note presque toujours deux résidus de thréonine pour un résidu de sérine. Le rapport sérine sur thréonine varie en effet de 0,59 (TH36, TH54) à 0,75 (TH47). Les fragments TH11 et TH37 sont différents, leur cadre de lecture n'est ouvert que sur 22 résidus d'acides aminés.

- les acides aminés hydrophobes tels que la leucine atteignent 13% pour les clones TH46 et TH47. Au niveau de ces deux fragments, la valine est

Figure n°19 : Principe de la méthode de terminaison de chaîne par les didéoxynucléotides (d'après SANGER et coll, 1977)(160)

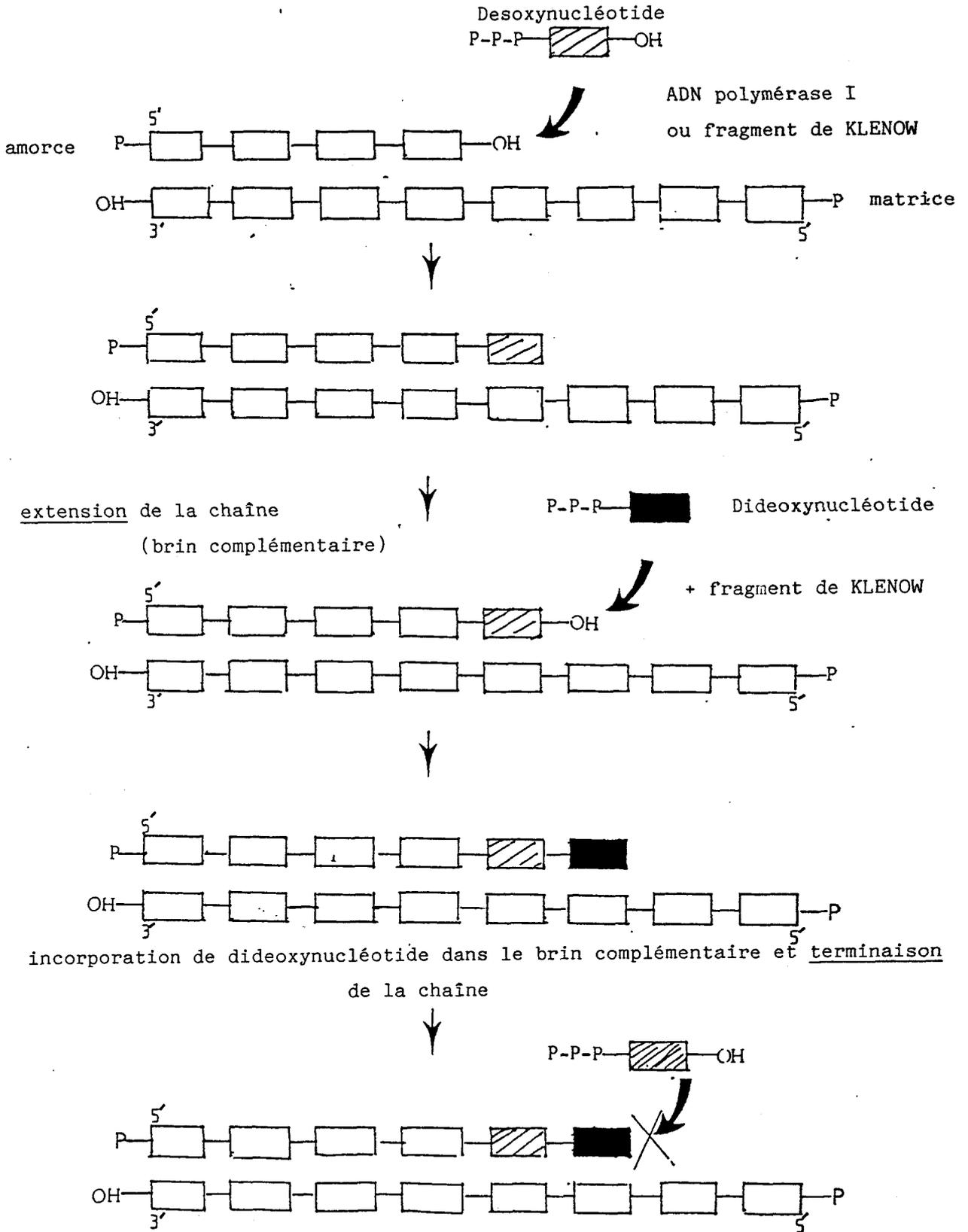


Tableau n°26 : Composition en acides aminés des fragments séquencés contenus dans les clones positifs

fragment	TH36	TH51	TH54	TH55	TH11	TH37	TH29	TH30	TH46*	TH47*											
nombre de :	88	54	67	60	22	22	82	87	56	55	39										
résidusAA :	res: %	du: res: %	res: %	res: %	res: %	res: %	res: %	res: %	res: %	res: %	res: %										
total :	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3	3										
ASP	32	36,3:19	35,1:27	40,2:21	35	3	13,6:21	25,6:15	17,2	11:19,6	5	9,4	9	16,3	4	10,2					
THR	19	21,5:12	22,2:16	23,8:13	21,6	4	18,1	5	22,7:14	17	10	11,4	8	14,2	3	5,6	6	10,9	3	7,6	
SER	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GLU	11	12,5:11	20,3:10	14,9:11	18,3	4	18,1	3	13,6	6	7,3	22	22,9	7	12,5	5	9,4	5	9	9	23
PRO	2	4	7,4	0	4	6,6	2	9	2	9	4	5	5,7	4	7,1	3	5,6	3	5,4	3	7,6
GLY	8	9	2	6	8,9	4	6,6	0	0	6	7,3	3	0	0	0	3	5,6	0	0	3	7,6
ALA	0	1	1,8	4	1,4	0	0	0	0	1	2,2	2	2,2	2	3,5	1	1,8	2	3,6	0	0
CYS	2	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	7,1	3	5,6	3	0	3	7,6
VAL	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MET	2	1	1	1	2	9	2	9	2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	3	5,4	0
ILE	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LEU	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TYR	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HIS	1	0	0	0	2	9	2	9	2	8	9,7	7	8	8	4	4	9,4	4	7,2	0	0
LYS	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	3	1	0	0	3	5	2	9	2	2	2	2	5,7	3	5,3	1	4	4	7,2	3	7,6
ASN	1	0	1	0	1	0	1	2	1	1	1	2	2	0	0	3	5,6	2	1	1	1
GLN	3	0	2	0	1	0	5	3	1	6	3	3	3	1	4	7,5	1	1	3	7,6	0
SER/THR	0,59	0,63	0,59	0,62	1,33	1,67	0,67	0,67	0,73	0,60	0,67	0,67	0,67	0,75	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,75	0,75

* Les séquences des fragments TH46 et TH47 ne sont que partielles

bien représentée. La proline varie sensiblement en fonction du fragment considéré (7% pour TH29 à 23% pour TH30).

- les autres résidus tels que les acides aminés dicarboxyliques sont peu représentés (sauf pour TH46 et TH47). Les acides aminés basiques sont également minoritaires bien que 7 résidus d'arginine soient trouvés pour TH47. L'histidine peut être bien représentée (TH29,30,46).

En ce qui concerne la cystéine, les résultats obtenus (hormis TH46 et TH47) montrent un taux intermédiaire entre les valeurs proposées par ROUSSEL et coll (1975) (154) pour les mucines bronchiques humaines (moins de 0,7 moles/100 moles d'acides aminés) et les valeurs rapportées par SACHDEV et coll (1980) (156), 2,3% de cystéine.

Certains fragments présentent un ou plusieurs résidus de tryptophane.

Les séquences en acides aminés, totales ou partielles déduites de ces ADNc, permettent de les répartir en trois familles différentes.

* La première famille correspond aux clones TH36,51,54 et 55 et elle montre des séquences répétitives (Figure n°20). La séquence de 8 résidus Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Ser-Ala-Pro est celle qui apparaît le plus fréquemment. D'autres auteurs (GENDLER et coll, 1988 ; TIMPTE et coll, 1988 ; GUM et coll, 1989) (46,186,56) ont séquencé des ADNc provenant de mucine épithéliale polymorphe humaine (P.E.M.), de mucine sous-maxillaire de porc et de mucines intestinales humaines. Les séquences obtenues montrent l'existence d'unités répétitives en tandem de 20, 81 et 23 résidus respectivement. Le motif octapeptidique décrit précédemment peut subir de nombreuses mutations. De l'isoleucine, de l'arginine ou de la thréonine peuvent ponctuellement modifier la séquence TH36 (Figure n°21). Au niveau de TH51, de la glycine, de la cystéine ou de la leucine peuvent également remplacer un ou plusieurs résidus acides aminés du motif. Au niveau de la séquence nucléotidique du motif répétitif, AGC code toujours pour le premier résidu de sérine et TCT code pour le deuxième, ACA et ACC codent pour les troisième et quatrième résidus de thréonine.

* La deuxième famille de clones contient les deux fragments TH46 et TH47, leurs masses moléculaires respectives sont estimées à 0,6 et 1,5Kb (Figure n°22). Ils ont été séquencés partiellement et présentent une certaine homologie au niveau des extrémités N- et C-terminales. En effet, les 47 résidus amino terminaux sont identiques de même que les 22 acides aminés dans la partie C-terminale. L'extrémité carboxy-terminale de TH47 (39AA) se caractérise par

Figure n°20 : Séquences en acides aminés et en nucléotides
des fragments à) TH36, b) TH51, c) TH54 et d) TH55.
Les séquences répétitives Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Ser-Ala-Pro sont soulignées

a

60 120

CCTCAGAGCACCTCCTCTGGCAGAAATCCAGGACAACCACTTTGGTGACAACCAGCACAACCTCCACTCCACAGACCAGTACAACCTATGCCCATACAACCAGCACAACCTCTGCTCCT
ProGlnSerThrSerSerTrpGlnLysSerArgThrThrThrLeuValThrThrSerThrThrSerThrProGlnThrSerThrThrTyrAlaHisThrThrSerThrThrSerAlaPro

180 240

ACAGCCAGAACAACCTCTGCTCTACAACCAGAAACAACCTCTGCTCTCCAGCCAGCACAACCTCTGGTCTGGAATACTCCAGCCCTGTTCTACCACCAGCACAATCTCTGCTCCT
ThrAlaArgThrThrSerAlaProThrThrArgThrThrSerAlaSerProAlaSerThrThrSerGlyProGlyAsnThrProSerProValProThrThrSerThrIleSerAlaPro

254

ACAACTAGCATAACCTCTGCCCCG
ThrThrSerIleThrSerAlaPro

b

60 120

CGCCCAACCTCTGGTCTGGAACCTCTCCAGCCCTGTTCCACCACCAGCACAACCTCTGCTCTATAACCAGCACAACCTCTGGTCTGGAAGTACTCCAGCCCTGTTCCACCACC
ArgProThrSerGlyProGlyThrThrProSerProValProThrThrSerThrThrSerAlaProIleThrSerThrThrSerGlyProGlySerThrProSerProValProThrThr

180 240

AGCACAACCTCTGCTCTACAACCAGCACAACCTCATGCCGTGAATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAAGTGCATCACTTGAGGCCAGGAGTATGAGACCAGCCTGGGCAATGTGGT
SerThrThrSerAlaProThrThrSerThrThrSerCysLeu***

300 350

AAATTGCATCTTTACTAAAAATACAAAACTAGCCAGGCATGGTGACATGCCTGTAATACCAGTACTTGGGAAGTGAGGCATAAGAATCACTTGAACCCGGAGGTGGAGGTTTC

420 437

AGAGTGAGCCAAAGTCCGAGCACTGCACTCTAGTCTGGGTGACAGAGCAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAG

c

60 120

CCTAGCACAACCCCTGCTTCTATACCCAGCACAACCTCTGCCCCAACCAACAGCACAACCTCTGCTCCCAACAGCACAACCTCTGCCCCATAACCAGCACAACCTCCACTCCACAG
ProSerThrThrProAlaSerIleProSerThrThrSerAlaProThrThrSerThrThrSerAlaProThrThrSerThrThrSerAlaProThrThrSerThrThrProGln

180 201

ACCACCACATCCTCTGCCCTACAAGCAGCACAACCTCGGCTCCTACCACCAGCACAACCTCTGCCCCATAACCAGGTG
ThrThrThrSerSerAlaProThrSerSerThrThrSerAlaProThrThrSerThrThrLeuCysProTyrAsnGlnVal

d

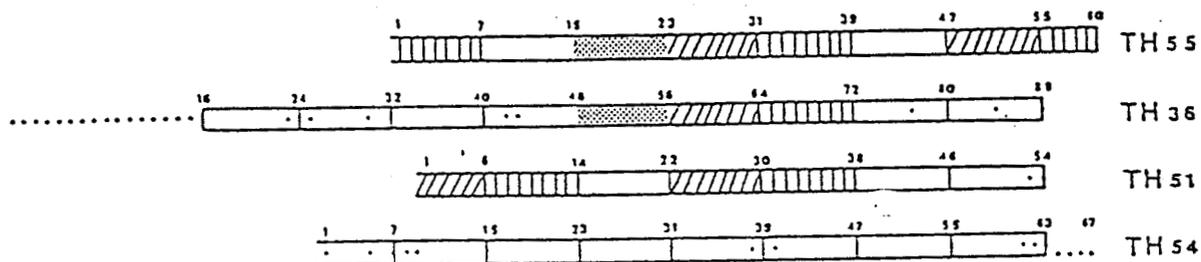
60 120

CGTACTCCAGCCCTGTTCCACCACCAGCACAACCTCTGCTCTACAACCAGAAACAACCTCTGCTCTACAGCCAGCACAACCTCTGTTCTGGAAGTACTCCAGCCCTGTTCCACC
ArgThrProSerProValProThrThrSerThrThrSerAlaProThrThrArgThrThrSerAlaSerThrAlaSerThrThrSerGlyProGlySerThrProSerProValProThr

180

ACCAGCACAACCTCTGCTCTATAACCAGCATGACCTCTGGTCTGGAATACTCCAGG
ThrSerThrThrSerAlaProIleThrSerMetThrSerGlyProGlyThrThrProArg

Figure-n°21 : Représentation schématique de la famille répétitive
(séquences en acides aminés)



-  THR-THR-SER-THR-THR-SER-ALA-PRO
-  GLY SER THR PRO SER PRO VAL PRO
-  THR THR ARG THR THR SER ALA PRO
-  THR ALA SER THR THR SER GLY PRO

Les points représentent les mutations ponctuelles

Figure n°22 : Séquences nucléotidiques et en acides aminés des fragments
a) TH46 et b) TH47. Les homologies parfaites sont soulignées.

a

60 120
 CCAAGACCAGCACAAGCCATGTTTCCATATCCAAGCAACCCACTCCCAACCAGTCACCAGAGACTGTCATCCCGGTGCACCTGGACCAAAATGGTTTGATGTGGACTTTCATCCCT
 ProLysThrSerThrSerHisValSerIleSerLysThrThrHisSerGlnProValThrArgAspCysHisProArgCysThrTrpThrLysTrpPheAspValAspPheProSerPro

170 39
 GGACCCACGGTGGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGGAGTGGG-----CCCGTGACCTCCACATCTGTGACAGCTCTAGCACCCCTA
 GlyProHisGlyGlyThrArgLysProThrThrThrSerSerGlyVal ProValThrSerThrSerValThrAlaProSerThrLeu

100 159
 GTGGGAGGCCACCAGCCCAACTCAGAGGTCACCTCTCTGGCAGAAATCCAGGACAACCACCTTGGTGACAAGCACCATAACCTCCACTACACAGACCAGCACAACCTCTGCCCTAC
 ValGlyGluProProAlaGlnLeuArgGlyHisLeuLeuLeuAlaGluIleGlnAspAsnHisPheGlyAspLysGlnHisAsnLeuHisTyrThrAspGlnHisAsnLeuCysProTyr

b

60 120
 CCAAGACCAGCACAAGCCATGTTTCCATATCCAAGCAACCCACTCCCAACCAGTCACCAGAGACTGTCATCCCGGTGCACCTGGACCAAAATGGTTTGACGTAGACTCCCATCCCT
 ProLysThrSerThrSerHisValSerIleSerLysThrThrHisSerGlnProValThrArgAspCysHisLeuArgCysThrTrpThrLysTrpPheAspValAspPheProSerPro

165 30
 GGACCCACGGCGGGACAAGGAAACCTACAACAACATCATCAGG-----CCCCAAAGGCTGCCCGTGACCTCCACATCT
 GlyProHisGlyGlyThrArgGluThrTyrAsnAsnIleIleArg ProGlnArgLeuProValThrSerThrSer

90 150
 GTGACAGCTCCTAGCACCCCTAGTGGGAGAGCCACCAGCCCAACTCAGAGCACCTCCTCTTGGCAGAAATCCAGGACAACCACCTTGGTGACAAGCAGCATAACCTCCACTACACAGCCA
 ValThrAlaProSerThrLeuValGlyGluProProAlaGlnLeuArgAlaProProLeuGlyArgAsnProGlyGlnProLeuTrp***

172
 GCACAACCTCTGCCCTACAAG

une plus grande richesse en résidus de proline (23%). La richesse en leucine atteint respectivement 13,2% et 12,8% pour les extrémités carboxy-terminales de TH46 et TH47. Les compositions en acides aminés obtenues pour ces deux fragments se démarquent de celles des autres clones positifs. Cette différence pourrait être due au fait que TH46 et TH 47 ne sont que partiellement séquencés. Il reste à compléter les informations concernant ces deux clones car respectivement 60 et 400 résidus n'ont pas encore été séquencés.

* La troisième famille renferme les clones TH11,29,30 et 37 (Figure n°23). Leur composition est typiquement celle des mucines car le pourcentage d'acides aminés hydroxylés est élevé. Les clones TH11 et TH37 présentent tous les deux un cadre de lecture ouvert très court (22 résidus). Ils ne diffèrent que par la nature de leur acide aminé en position carboxy-terminale (proline ou sérine). L'organisation des clones TH29 et surtout TH30 est particulière avec une moitié amino-terminale pauvre en acides aminés hydroxylés (6 sur 24) mais présentant une richesse en résidus de proline (16 sur 20) avec notamment des enchaînements (Pro)₃. Cette région pourrait être considérée comme étant une région nue. Au niveau de la région carboxy-terminale de ce même clone TH30, une séquence signal ASN-SER-SER est potentiellement glycosylable si nous considérons la présence d'une conformation en coude β (AUBERT et coll, 1976) (6). Les fragments séquencés ont une structure secondaire qui ne donne ni organisation en hélice α , ni en feuillets β , mais plutôt une conformation étendue et en coude β (CHOU et FASMAN, 1978) (26). Si nous considérons que les chaînes glycaniques sont attachées au niveau d'acides aminés hydroxylés situés dans des coudes β , la moitié de ces résidus est alors substituée par un résidu de N-acétylgalactosamine.

Nous avons analysé ces séquences et recherché des homologues avec les données apportées par les structures peptidiques de mucines publiées et aussi avec notre mélange d'oligonucléotides pour expliquer peut-être l'échec lors de notre utilisation.

* Séquences et sonde oligonucléotidique

Les différentes séquences sont comparées à celles correspondant au mélange d'oligonucléotides de synthèse. Parmi les nombreuses possibilités offertes aucune séquence n'est cependant retrouvée à l'exception du fragment TH29 qui en position amino-terminale présente une séquence SER-THR-PRO-GLY-THR-THR qui est partiellement retrouvée dans le mélange d'heptapeptide théoriques :

Figure n°23 : Séquences en acides aminés et en nucléotides des fragments.
a) TH11, b) TH37, c) TH29, d) TH30

a

60 120
ACCCAGGACCATCCAAGGGGCCACCGCAGCATTGGCCCATCACCACGTCCTCACCCAACCTCTCCCTGATGAATAGAATATACACACTGTGCTAGGTGTATATACATATATATATATA
ThrGlnAspHisProArgGlyHisArgSerIleGlyProIleThrThrSerSerProAsnSerPro***

180 240
TAAATATATATATAATATATAAAATATAGATATGGAAATGACTGTCTCGTGTTAAGATAATGTATACTCTTTTATTTTCTCCCTTCATGGTTAAGATTTTTTTTTTAAGAAAAGTTAA

251
ATATCCAAAAG

b

60 120
ACCCAGGACCATCCAAGGGGCCACCGCAGCATTGGCCCATCACCACGTCCTCACCCAACCTCTCTGATGAATAGAATATACACACTGTGCTAGGTGTATATACATATATATATATA
ThrGlnAspHisProArgGlyHisArgSerIleGlyProIleThrThrSerSerProAsnSerSer***

180 240
TAAATATATATATAATATATAAAATATAGATATGGAAATGACTGTCTCGTGTTAAGATAATGTATACTCTTTTATTTTCTCCCTTCATGGTTAAGATTTTTTTTTTAAGAAAAGTCAA

251
ATATCCTTTCC

c

60 120
CCCTCCACCCACGGGACCACCTGGATCCTCACAGAGCCGAGCACTACAGCCACCGTCACGGGTCCACCGGATCCACGGCCACCGCTCTCCACCCAGGCAACTGCTGGCACCACAT
ProSerThrProGlyThrThrTrpIleLeuThrGluProSerThrThrAlaThrValThrGlyProThrGlySerThrAlaThrAlaSerSerThrGlnAlaThrAlaGlyThrProHis

180 240
GTGAGCACCAGGCCACGACGACCCACAGTCACCACTCCAAAGCCACTCCCTTCTCCAGTCCAGGGACTGCAACCGCCCTTCCAGCACTGAGAAGCACAGCCACCCACACAGCTAC
ValSerThrThrAlaThrThrThrHisSerHisGlnLeuGlnSerHisSerLeuLeuGlnSerArgAspCysAsnArgProSerSerThrGluLysHisSerHisHisThrHisSerTyr

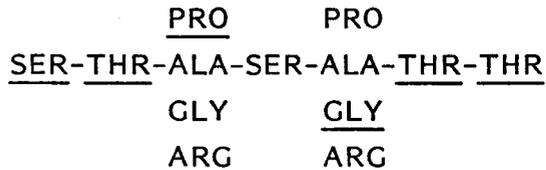
254
CAGCTTTAGCAGCC
GlnLeu***

d

60 120
CCACGGCCACCATGTCCACAGCCACACCTCTCCACTCCAGAGACTGTCCACACTCCACCACTCCACCACTGCTTACCACCAACCCACCAACCCGGGCACCGGCTCTGTGGCCACCCCTCCTC
ProArgProProCysProGlnProHisProProProLeuGlnArgLeuSerThrProProProValLeuThrThrThrProProProThrGlyHisArgLeuCysGlyHisProLeuLeu

180 240
CACCCAGCAGCAGCTCACACTACCAAGTGTGACTACCAACCCAGGCTTCAACCCACCCCTCTCCAGCCAGGGCAGGCAACCCAGCTCCAGTGTGGATCAGCACAACCCAC
HisProSerAsnSerSerHisTyrGlnSerAlaAspTyrHisAsnHisGlyPheThrAlaThrProSerSerSerProGlyThrAlaArgThrLeuProValTrpIleSerThrThrThr

261
ACACCCACAACCCAGAGGTCC
ThrProThrThrArgGlySer



Ajoutons que, toujours dans ce même fragment, la sérine est codée par les triplets TCC, AGC ou AGT. Or ces codons ne sont pas retrouvés au niveau du mélange d'oligonucléotides par lequel la sérine est arbitrairement codée par TCT. Est donc explicité entièrement l'échec de notre approche par sonde oligonucléotidique.

Ajoutons que le criblage de la banque λ gt10 de muqueuse trachéale de porc a été aussi un échec avec les sondes nucléotidiques. Nous devons cependant préciser que le criblage d'une banque de ce même tissu avec les anticorps précédemment décrits nous a permis d'obtenir un clone (M55) dont la séquence partielle est typique de mucines. La purification de l'anticorps "monoclonal" a permis la révélation par immunohistochimie des cellules caliciformes de muqueuse trachéale humaine. Ces éléments permettent de constater que l'approche primitive tentée à l'aide du matériel animal n'était pas forcément une erreur pour repasser ensuite sur du tissu humain. Seuls les oligonucléotides étaient en cause.

* Séquences nucléotidiques et séquences peptidiques

Lorsque nous comparons les séquences peptidiques obtenues après deux cycles d'oxydation périodique et protéolyse des glycopeptides de mucines bronchiques LER... et DAU... et celles obtenues à partir de nos séquences nucléotidiques (TH29,30,36,51...) ou celle décrite par le groupe de TIMPTE et coll (1988) (186) des homologies parfaites ou importantes apparaissent notamment chez LER... pour des séquences octo-, hepta- ou hexapeptidiques (Tableaux n°27,28 et 29). Elles pouvaient laisser envisager un succès lors de l'utilisation d'oligonucléotides de synthèse découlant de ces séquences. Lorsque nous regardons le tableau n°29, les homologies au niveau peptidique n'atteignent que 71% et la probabilité du nombre de misappariements nucléotidiques est plus importante encore.

Récemment ROSE et coll (1989) (152) ont publié les séquences en acides aminés de mucines trachéales humaines. Ces séquences, au nombre de 4, sont très partielles (de 10 acides aminés à 22 acides aminés). Nous notons que les clones TH46 et TH47 présentent une homologie parfaite sur 14 résidus acides aminés (Trp-Phe-Asp-Val-Asp-Phe-Pro-Ser-Pro-Gly-Pro-His-Gly-Gly-). Les séquences en acides aminés obtenues à partir du cadre de lecture ouvert de λ gt11 sont en accord avec des compositions en acides aminés déjà publiées (HOUDRET et coll, 1981) (77).

Tableau n°28 : Comparaison de séquences en acides aminés de glycopeptides DAU,,,
et de séquences connues obtenues par la biologie moléculaire

◆ Glycopeptides DAU...+ 2 o,p, + papaine:pronase 48h/8j	::	::	Références	Homologie: %
$\overset{\circ}{8}$ -SER-THR-SER*-THR-SER-	::	$\overset{\circ}{36}$	TIMPTE et coll (1988): (186)	60
$\overset{\circ}{1}$ -THR-THR-ALÄ*-SER-PRO-THR*-PRO-SER*-THR-SER-THR- $\overset{\circ}{11}$ $\overset{2}{}$ -THR-ALÄ*-SER-PRO-THR*-PRO-SER*-THR-SER-THR- $\overset{11}{}$ $\overset{5}{}$ -PRO-THR-PRO*-SER-THR-SER*-THR- $\overset{11}{}$ $\overset{7}{}$ -PRO-SER*-THR-SER*- $\overset{10}{}$::	$\overset{\circ}{8}$ $\overset{67}{}$ $\overset{22}{}$ $\overset{28}{}$ $\overset{28}{}$	$\overset{\circ}{18}$ TH51 TH36 TH29 TH30	73 70 71 50
$\overset{\circ}{12}$::	$\overset{\circ}{40}$	$\overset{\circ}{8}$ $\overset{67}{}$ $\overset{22}{}$ $\overset{28}{}$ $\overset{28}{}$	$\overset{\circ}{18}$ TH51 TH36 TH29 TH30

◆ Les séquences indiquées représentent les différentes possibilités de séquences en acides aminés des glycopeptides DAU... après oxydation periodique

○: numérotation de la position de l'acide aminé dans la séquence

* acides aminés discordants

Tableau n°29 : Comparaison de séquences amino acides et nucléotidiques de mucines d'origines sous-maxillaires et trachéobronchiques

Unité répétitive de TIMPTE et coll (1988)(186)	Clones positifs de la banque d'ADNC	Fragment	% homologie
71 -GLY-PRO-GLY -THR -THR-ALA -SER-SER -VAL-	63 -GLY-PRO-ARG -ASN -THR-PRO -SER-PRO -VAL-	TH36	55,5
CGC CCG CGA ACA ACT CCC TCA TCC GTC	GGT CCT ACA AAT ACT CCC AGC CCT GTT		55
94 -THR-THR-GLY -THR-VAL-SER - GLY-	15 -THR-THR-ALA -THR-VAL-THR -GLY-	TH29	71,5
ACA ACC GGA ACA GTG TCT GGA	ACT ACA GCC ACC GTC ACC GGT		57
82 -THR-GLU-THR-ALA -ARG -PRO-SER-	81 -THR-PRO -THR-THR -ARG-GLY -SER-	TH30	57
ACG GAA ACT CCT ACA CCC TCT	ACA CCC ACA ACC ACA ACC TCC		43

o: position des acides aminés dans la séquence
 ..: acides aminés ou nucléotides discordants

F - Hétérogénéité peptidique

L'analyse des séquences nous a permis de classer les structures en 3 familles. Il n'est pas évident que les 12 clones soient représentatifs de tous les agencements des mucines. Il est probable que même en se limitant aux mucines trachéobronchiques il y existe d'autres structurations.

Les clones séquencés permettent aussi d'établir l'existence d'au moins 5 extrémités carboxy-terminales différentes pour les mucines trachéobronchiques humaines. Ceci laisse envisager la présence de protéines "différentes" qui pourraient être "processées" de façon post transcriptionnelle pour donner naissance à des glycoprotéines de haute masse moléculaire.

Ainsi, le classement en familles des axes peptidiques en fonction des séquences nucléotidiques et la présence de nombreux acides aminés carboxy-terminaux différents nous ont fait envisager l'existence d'une grande hétérogénéité peptidique. Pour visualiser cette hétérogénéité, nous avons utilisé l'électrophorèse des ARN en milieu dénaturant puis hybridation avec les différentes sondes nucléotidiques après transfert ou "Northern blot". L'aspect technologique est décrit dans l'appendice technique. Ce travail a été réalisé sur la muqueuse trachéale humaine et sur d'autres muqueuses humaines (colon, estomac, intestin grêle) ainsi que sur deux lignées cellulaires de tumeur du sein, sécrétrices de mucines ou de "mucin-like" (VHB₁ et MCF₇). Les résultats de cette étude sont détaillés dans l'article ci-joint (CREPIN et coll, 1989). Les points essentiels à dégager de ce travail sont les suivants :

- quelle que soit la sonde utilisée, on observe une très grande hétérogénéité de masses moléculaires d'environ 1Kb à 18-20Kb.

- tous les types de sondes ne sont pas capables de reconnaître les ARN d'autres sources que la trachée humaine. Cependant, lorsqu'il existe une homologie, il existe également une très grande hétérogénéité.

- l'utilisation des anticorps "monoclonale" nous a permis une localisation cellulaire de sécrétion des mucines trachéales humaines. L'utilisation des sondes nous permet une localisation tissulaire des différentes familles précédemment décrites.

°00°

A R T I C L E

°00°

DIVERSITY OF THE PEPTIDE MOIETY OF HUMAN AIRWAY MUCINS

CREPIN, M., PORCHET, N., AUBERT, J.P.* and DEGAND P.
Unité 16*INSERM, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France
To whom correspondence should be addressed

ABSTRACT. A λ gt11 cDNA library constructed from human tracheal mucosa was screened with rabbit antibodies raised to chemically deglycosylated pronase glycopeptides from bronchial mucins. This library allowed us to select 20 positive clones. The total or partial nucleotide sequences of 14 of them were classified in three different types of organization or families.

Antibodies purified from total immunoserum on each positive clone were specific either of goblet cells or goblet cells and mucous cells, showing a differential cellular expression of the peptide axis of mucins. The use of each type of nucleic probe in Northern blot analysis confirmed the existence of a great heterogeneity of the RNAs contributing to a great peptide heterogeneity.

INTRODUCTION

Mucins consist of a family of high molecular weight glycoproteins which are elaborated by many secretory tissues, particularly by the respiratory tract. The oligosaccharides that account for most of the mass of mucins are attached by O and perhaps some N-glycosidic linkages (1).

Knowledge of mucins protein backbone is practically impossible to get by usual biochemical techniques.

In fact, purifying perfectly all these molecules or, at least, purifying all of them is almost impossible : their high molecular weight (2) brings about solubility problems. The structural organi-

KEYWORDS : Mucins, cDNA library, peptide organization, Northern blot analysis.

zation, in some cases, seems to be made of alternation of highly glycosylated hydrophilic zones and hydrophobic zones which may interact with other mucus components such as proteins or lipids. The presence of highly dense, highly heterogeneous, and numerous glycan chains (3) still increase those difficulties : enzyme digestion of the protein backbone and enzymatic or chemical deglycosylation prove to be highly difficult. Another problem is due to unusual aminoacid composition : mucins contain twenty per cent up to forty percent of hydroxy aminoacid residues and about ten percent of proline residues (4). Besides, these aminoacids, serine , threonine and proline may form more or less repetitive sequences (5,6,7). Under these conditions, interpretation of Edman's degradation cycles is very difficult. However, the knowledge of the mucin protein backbone is of great importance to understand mucin physical properties and glycosylation process which may certainly not occur at random.

In this paper, first we show the different peptide families deduced from the cDNAs sequences and different cellular and tissue specificities linked to these different mucin types.

Two techniques were used : immunohistochemistry and RNA Northern blot analysis from different origins. The first one allowed us to confirm a cellular localization of the bronchial mucins biosynthesis and the second one to confirm a tissular specificity.

METHODS

+ Preparation of pronase glycopeptides from human airway mucins.

Human bronchial sputum was collected from a single patient LER... suffering from chronic bronchitis. Collection, dilution and pronase digestion of the sputum were carried out according to (8) and (9). Glycopeptides were purified on a DEAE-Sephadex A-25 column equilibrated in 0.01M NaCl. A stepwise gradient elution was performed using rising NaCl molarities in 0.01N HCl : 0.01, 0.1, 0.3, 0.5 and 0.7 M NaCl (10). According to orcinol reaction, fraction 0.5 M was divided into two subfractions 0.5 Ma et 0.5 Mb. Aminoacid (11) and carbohydrate (12) compositions of each glycopeptide fraction were analyzed. The 0.01 M fraction was discarded because it was contaminated by other components (high percentage of mannose residues and low percentage of hydroxy aminoacid residues).

+ TFMS treatment :

Chemical deglycosylation of each glycopeptide fraction was performed as follows : 100 mg of glycopeptides were previously solubilized in 5 ml Triton X 100 ten percent aqueous solution, lyophilized and finally dried for a week under a partial vacuum at 56°C in a P₂O₅ containing reactor. Presence of Triton X 100 allowed to increase carbohydrate removal. The reaction mixture was composed of 10 g trifluoromethane sulfonic acid (ALDRICH Chemical Company) as chemical agent for deglycosylation (13) and 600 mg phenylalanine (NBC) as scavenger. Using phenylalanine instead of anisole as scavenger allowed to obtain a better solubility of the deglycosylated materials. Contact between the reaction mixture previously cooled to -50°C and the glycopeptides was achieved for 3h at 25°C. Neutralization was performed by gentle addition of 22 ml of an aqueous 50 per cent pyridine solution. The excess of pyridine is evaporated under N₂ stream and the solution is then twice dialysed against desionized water. After lyophilization, removal of residual salts is obtained by

a triple precipitation of the peptides by -20°C cooled acetone.

+ Preparation of polyclonal rabbit antiserum to deglycosylated mucin glycopeptides.

Two New Zealand white rabbits were immunized with 500 µg of a peptide mixture containing equal amounts of 0.1 M, 0.3 M, 0.5 Ma, 0.5 Mb, 0.7 M purified deglycosylated pronase glycopeptides in complete Freund's adjuvant (GIBCO). Booster injections of 200 µg were administered every month during six months. The rabbits were bled 1 week after each booster injection. The antisera were tested on immunoblots after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

+ Preparation of the purified antibodies

The purified antibodies were prepared by fixation on the specific fusion protein produced by each positive clone as described (5).

+ Immunohistochemistry

Biopsies of human bronchial and colonic mucosae were obtained from macroscopically healthy areas. They were immediately immersed into the following different fixatives :

- Carnoy's solution : ethanol-chloroform-acetic acid (6 ; 3 ; 1 ; vol/vol/vol) for 2h.

- Modified alcoholic Bouin's solution

After fixation, the tissue fragments were dehydrated, embedded in paraffin and cut. Serial sections (4µm) were deparaffinized and left for 12h in 0.01M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.3). An indirect immunohistochemical technique was used. After rinsing in phosphate buffered saline solution, slides were blotted and incubated with phosphate buffered saline solution containing 1% sheep serum. After rinsing they were incubated for 2 or 4h at room temperature with the immunoserum against deglycosylated mucin glycopeptides at a dilution of 1:100. They were washed again and subjected to peroxidase labeled sheep antirabbit globulin diluted 1:50 for 1h and then rinsed. The peroxidase was revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride and fresh hydrogen peroxide according to (14). Finally the sections were washed, dehydrated and accounted.

To check the specificity of the reaction three controls were used :

a) preimmunoserum was substituted to specific serum, b) immunoserum step was omitted and c) the immunoserum was saturated with the deglycosylated mucin peptides before the immunohistochemical procedure.

+ Preparation of RNA

Human mucosae or cells were stored at -80°C after freezing in liquid nitrogen. Total RNA from human tracheal mucosa, colonic mucosa and human breast tumor cell lines were prepared as described in (15) by the guanidinium/cesium chloride method. Polyadenylated RNA were selected by chromatography on oligo(DT)-cellulose (16).

+ Construction and screening of the library

We used the cDNA synthesis system plus and the cDNA cloning system λgt 11 manufactured by Amersham. No important technical modifications were done. The library contained $2.5 \cdot 10^6$ recombinants before amplification and was screened with whole antiserum obtained from the two rabbits. Before use the serum was purified with a crude lysate as described (17).

The secondary antibodies were peroxidase labeled goat antirabbit γ -globulins and the revelation was done by 4-chloro-1-naphthol coloration.

+ Northern blot analysis

Gel electrophoresis and transfer to membranes was conducted as in (18). The filters (Hybond C Amersham) had been prehybridized at 42°C in equal volume of formamide and the following mixture 3 x SSC, Hepes buffer (50mM, pH 7), 1 x Denhardt's solution, 0,25 g salmon sperm, 12 percent dextran sulfate. Hybridization was performed in the same solution to which the radiolabeled probe had been added to give 10^6 cpm per milliliter. The filter was washed in 2 x SSC, 0,1% SDS twice at room temperature and in 2 x SSC, 0,1% twice at 60°C. Samples were autoradiographed with an intensifying screen at -70°C for 1 to 24 hours.

RESULTS

+ Deglycosylation of the pronase glycopeptides from respiratory mucins and preparation of polyclonal antisera.

Degree of purification of the pronase glycopeptides was estimated by analyzing their aminoacid and carbohydrate compositions and their PAGE patterns. After deglycosylation, extent of carbohydrate removal as whereas integrity of the peptide backbone were controlled (data submitted for publication). The antisera obtained from two rabbits were tested against these human deglycosylated mucin glycopeptides by immunoblotting (Fig. 1). A wide staining occurred between 10 KDa and 200 KDa with each antiserum (fig. 1.1 and 1.3), nevertheless antiserum from rabbit P.. allowed to stain higher molecular weight peptides (fig. 1.1) than antiserum from rabbit C.. (fig. 1.3). In the two cases, preimmunesera were negative.

+ Immunohistological results

The peroxidase labeling is situated around the goblet cell nucleus in both tracheal and colonic mucosae. The secretion granules containing the glycosylated mucins are not labeled. The mucous cells show a cup-shaped peripheral labeling. No serous cell labeling has been noticed. These results confirmed that our antibodies were specific for mucin secretory cells and for mucin protein backbone or, at least, specific for the mucin precursors (data submitted for publication).

+ Immunoscreening of the human tracheal mucosa cDNA library

The immunoscreening of the human tracheal mucosa cDNA library in the λ gt 11 expression vector enables us to get a β galactosidase fusion protein. There is one chance out of six that the screening scope of the fusion protein is suited and therefore able to be identified by the antibodies. That is perhaps why we only found twenty positive clones out of the two millions screened clones.

TABLE 1

Lab's Name	size in Kb
TH 11	0.25
TH 17	0.70
TH 29	0.60
TH 36	0.26
TH 37	0.25
TH 42	0.70
TH 46	0.60
TH 47	1.50
TH 51	0.43
TH 54	0.20
TH 55	0.18
TH 57	1.95
TH 58	0.80
TH 61	0.40
TH 62	0.40
TH 63	0.70
TH 64	1.90
TH 70	0.55
TH 71	0.40
TH 72	0.50

Immunoscreening of the cDNA library

A similar library study is at present in process in the λ gt 10 vector. The twenty positive clones listed on table 1 have a variable size from 0.18 to 2 kilobases. The insert of each of these twenty clones has been cloned in plasmid vector to obtain nucleotide probes and in M 13 phage vector to establish its sequence.

+ Cellular localization

As it can be noticed on table 2, purified antibodies are able to label either both goblet cells and mucous cells or only goblet cells. Serous cells are never labeled and unfortunately no purified antibody is able to recognize significantly colonic mucosa at the moment. As the goblet cells are always labeled, we may suppose that they are able to synthesize all the mucin types although a selection seems to occur in the glands. Moreover this selection is not linked to only one mucin family.

The clones TH 58 and TH 57 from the first and third type respectively are able to label goblet cells and mucous cells.

It is possible that the expression levels of the other types in some cells are below the level of detection by this technique.

In any case, the results show different expression levels of the different mucins RNAs.

TABLE 2

Antibodies anti-clone	Type of organisation	Human tracheal mucosa			Human colonic mucosa Goblet cells
		Goblet cells	Mucous cells	Serous cells	
TH 36	1	+	-	-	-
TH 51	1	++	-	-	-
TH 54	1	++	-	-	-
TH 55	1	++	-	-	-
TH 58	1	+++	+++	-	-
TH 61	1	++	-	-	-
TH 46	2	+	-	-	-
TH 47	2	+++	-	-	-
TH 62	2	++	-	-	-
TH 11	3	++	-	-	-
TH 29	3	+	+	-	-
TH 37	3	++	+	-	-
TH 57	3	+++	+++	-	-
TH 64	N.D	++	+ / -	-	-
TH 17	N.D	++	++	-	+ / -
TH 42	N.D	+++	+++	-	+ / -
TH 63	N.D	++	-	-	-
TH 70	N.D	++	-	-	-
TH 71	3	+++	+++	-	-
TH 72	N.D	++	++	-	-
Immuneserum		+++	+++	-	+++

Immunohistological studies of human tracheal and colonic mucosae

+ Tissue localization

Figure 2 displays the results obtained on the Northern blots of human tracheal mucosa using the three different families of probes. The RNA integrity controls were performed : visualizing 28S and 18S ribosomal RNA bands by use of the fluorescent dye ethidium bromide, detection of the β -actine RNA band of 2 kilobases which hybridises to the cDNA probe pA₂ (19) (see fig. 3).

Two remarks should be drawn from this figure :

- At present eleven probes have been tested and results were identical to those presented here using probes TH 47, 57, 58 : a very large smear from about eighteen to one point five kilobases characterizes a great heterogeneity of mucins RNAs. All the RNA integrity controls being performed, it appears that the peptide heterogeneity shown by the many different carboxyl terminal aminoacids deduced from the sequences (20), is confirmed by the great variety of RNAs whatever mucin family is studied.

- The second remark concerns the size of these RNAs. At least two explanations may be put forward : the greatest RNAs are immature RNAs or there is a post-translational mechanism, yet unknown to us.

We carried on this work on various mucosae and on two human breast tumor cell lines.

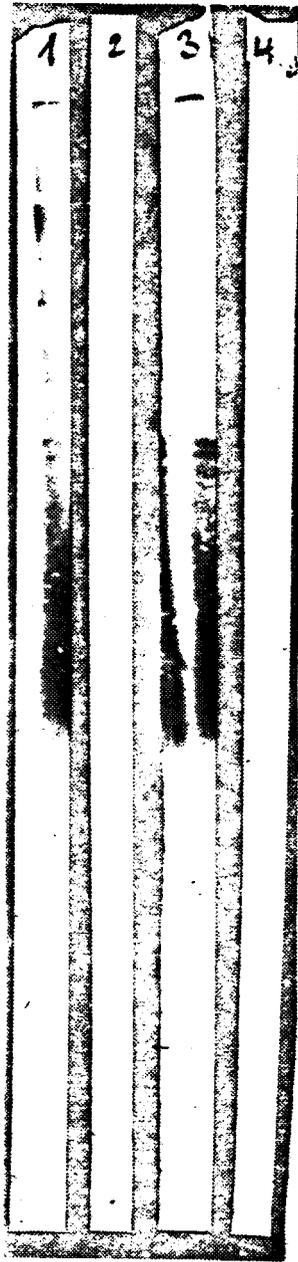


FIG. 1

Staining of purified deglycosylated human airway mucin glycopeptides after PAGE fractionation and immunoblotting :

- 1 : immunoserum from rabbit P..
- 3 : immunoserum from rabbit C..
- 2 and 4 : preimmunesera.

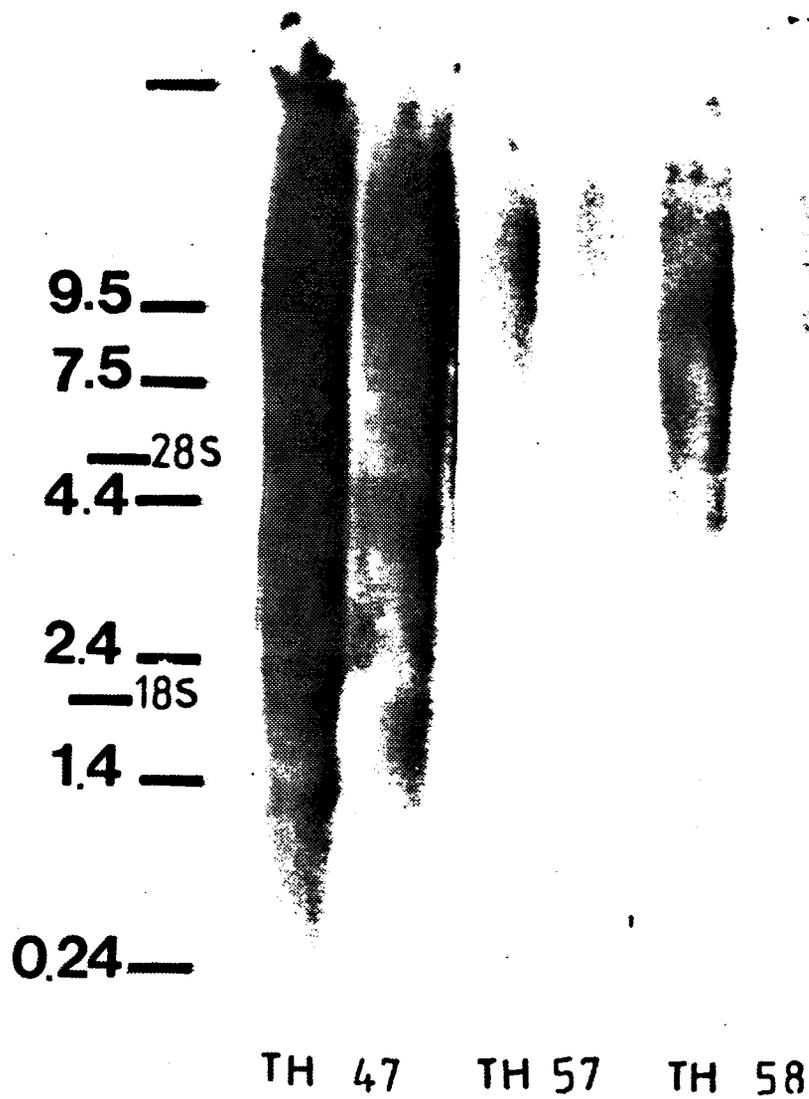


FIG. 2

Northern blot analysis of human tracheal mucosa. For each probe TH 47 (2nd type), TH 57 (3rd type) and TH 58 (1st type), two different concentrations of RNA were tested.



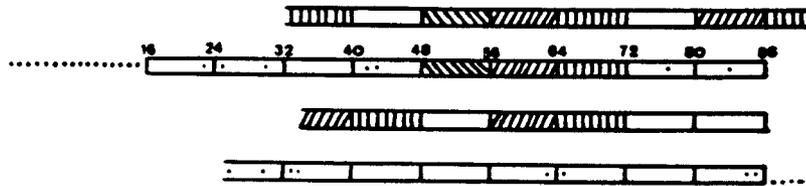
FIG. 3

Controls of Northern blot analysis :

- 3a : β -actin RNA band
- 3b : hybridation of RNAs from lymphocytes as non-mucin secreting cells to probe TH 57. Same results are obtained with the other probes.

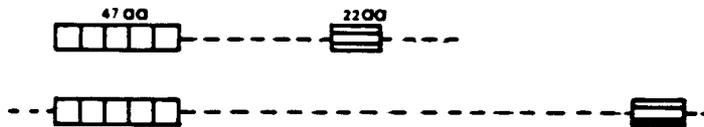
1st TYPE or REPETITIVE FAMILY

6 clones



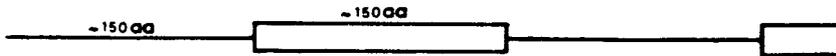
2nd TYPE

3 clones



3rd TYPE

5 clones



6 clones not yet sequenced

FIG. 4

Structural organization of the peptide moiety of human tracheal mucins.

1st type : T.T.S.T.T.S.A.P ; G.S.T.P.S.P.V.P ;
 T.T.R.T.T.S.A.S ; T.A.S.T.T.S.G.P.

Dots showed limited mutations.

2nd type : P.K.T.S.T.S.H.V.S.I.S.K.T.T.H.S.A.P.V.T.R.D.C.
H.L.R.C.T.W.T.K.W.F.D.V.D.F.P.S.P.G.P.H.G.G.T.R ;
 P.V.T.S.T.S.V.T.A.P.S.T.L.V.G.E.P.P.A.Q.L.R.

3rd type : naked region ; region able to be highly glycosylated.

TABLE 3

: Probes :	: Human tracheal :	: Human colonic :	: Cell line :	: Cell line :
:	: mucosa :	: mucosa :	: VHBI :	: MCF7 :
: TH 11 :	: + + + + :	: + :	: - :	: - :
: TH 17 :	: + + + + :	: + :	: - :	: - :
: TH 29 :	: + + + + :	: + + + :	: + :	: + :
: TH 36 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 37 :	: + + + + :	: + :	: - :	: - :
: TH 42 :	: + + + + :	: + :	: + + + :	: + + + :
: TH 46 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 47 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 51 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 54 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 55 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 57 :	: + + + + :	: + + + :	: + + + :	: + + + :
: TH 58 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 61 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 62 :	: + + + + :	: + :	: + :	: + :
: TH 63 :	: + + + + :	: + + + :	: + + + :	: + + + :
: TH 64 :	: + + + + :	: + + + :	: - :	: - :
: TH 70 :	: + + + + :	: + :	: - :	: - :
: TH 71 :	: + + + + :	: + :	: - :	: - :
: TH 72 :	: + + + + :	: + :	: - :	: - :

Northern blot or dot blot analysis of different mucosae and human breast tumor cell lines.

Results are summarized on table 3. Before commenting on this table, we must make clear that whatever mucosa or cell line is studied, the autoradiography outline is always identical to the tracheal mucosa one. Thus the important fact to be drawn from this table is that only one probe type is able to recognize significantly all the mucosae.

This type corresponds to the alternating hydrophobic-hydrophilic peptide sequences.

Which of these two regions is accountable for this recognition or are they both involved ?

DISCUSSION

The aminoacid sequences deduced from the nucleotide sequences (20) allowed us to classify, at present, perhaps in an arbitrary way, the human tracheal mucins in three organization types or may be in three distinct families.

On figure 4 are schematized the three different organization types.

- The first type which we have called a repetitive type is composed of tandems of an eight aminoacid sequence or box but we must add that no perfect repetitive sequence has yet been found. In fact, we have found many limited mutations unlike the results obtained by others (5,6,7).

- The second type presents a different organization but is also typical of mucin aminoacid composition.

In this case, exist some perfect sequence homologies either between the amino terminal part or between the carboxyl terminal part.

The unequal clone lengths suggest either an alternative splicing system or the existence of a gene family which would derive from the duplication of internal sections of an ancestral gene.

- The third type appears the most interesting. In this case is found the alternation of hydrophobic and hydrophilic zones that might be glycosylated and highly glycosylated. This type confirms an often proposed model.

The great heterogeneity shown by the Northern blot results is confirmed by the very different sequences obtained.

Does one peptide sequence correspond to one glycosylation type ?

In two of our sequences was found a coding Asn X Ser sequence able to be N-glycosylated. These potential N-glycosylation sites must probably mean something. These first sequence results open to us a large field of investigation.

At the same time, we were able to prove that a cell specificity exists : all the human tracheal mucin secretory cells are not able to synthesise in the same quantity all the mucin types. We also proved a tissue specificity which may suggest the existence of a "basal mucin" like an housekeeping protein type but we have yet no proof of it.

Only the study of the gene and his promoter will allow to support this hypothesis. At present a human gene library and also other cDNA libraries are in the process of study.

Studying cell and tissue specificities and their regulation enables us to view the use of our probes in some diseases as for instance the Crohn's disease, haemorrhagic rectocolitis and of course colon cancer.

Aknowledgements We are very thankfull to Prof. M. Mazzuca for immunohistochemical studies and Dr M. Duterque-Coquillaud for DNA sequencing and also to D. Petitprez, M. Baheux and C. Denis for their excellent technical assistance. This research was supported by a grant of the Association pour le Recherche sur le Cancer and by the Foundation pour le Recherche Médicale Française.

REFERENCES

1. HILKENS, S.J. and BUIJS, F. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. *J. Biol. Chem.* 263, 4215-4222, 1988.
2. CREETH, J.M., BHASKAR, K.R., HORTON, J.R., DAS, I., LOPEZ-VIDRIERO, M.T. and REID, L. The separation and characterization of bronchial glycoproteins by density-gradient methods. *Biochem. J.* 167, 557-569, 1977.
3. LAFITTE, J.J., LAMBLIN, G., LHERMITTE, M., HUMBERT, P., DEGAND, P. and ROUSSEL, P. Etude des glycoproteines bronchiques obtenues par lavage de bronches macroscopiquement saines. *Carbohydr. Res.* 56, 383-389, 1977.
4. HOUDRET, N., LETREUT, A., LHERMITTE, M., LAMBLIN, G., DEGAND, P. and ROUSSEL, P. Comparative actions of reducing agents on fibrillar human bronchial mucus under dissociating and non-dissociating conditions. *Biochim. Biophys. Acta.* 668, 413-419, 1981.
5. TIMPTE, C.S., ECKHARDT, A.E., ABERNETHY, J.L. and HILL, R.L. Porcin submaxillary gland apomucin contains tandemly repeated identical sequences of 81 residues. *J. Biol. Chem.* 263, 1081-1088, 1988.
6. GENDLER, S., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., DUHIG, T., ROTHBARD, J. and BURCHELL, J. A highly immunogenic region of human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263, 12820-12823, 1988.
7. GUM, J.R., BIRD, J.C., HICKS, J.W., TORIBARA, N.W., LAMPORT, D.T.A. and KIM, Y.S. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. *J. Biol. Chem.* 264, 6480-6487, 1989.
8. LAMBLIN, G., DEGAND, P., ROUSSEL, P., HAVEZ, R., HARTEMANN, E. and FILLIAT, M. Les glycopeptides du mucus bronchique fibrillaire dans la mucoviscidose. *Clin. Chim. Acta* 36, 329-340, 1972.
9. DEGAND, P., ROUSSEL, P. and LAMBLIN, G. Définition des mucines synthétisées au niveau des kystes bronchogéniques. *Clin. Chim. Acta* 50, 223-236, 1974.
10. LAMBLIN, G., DEGAND, P., ROUSSEL, P., HAVEZ, R., HARTEMANN, E., FILLIAT, M.
Les glycopeptides du mucus bronchique fibrillaire dans la mucoviscidose.
Clin. Chim. Acta 36, 329-340, 1972.
11. HOUDRET, N., LETREUT, A., LHERMITTE, M., LAMBLIN, G., DEGAND, P. and ROUSSEL, P.
Comparative action of reducing agents on fibrillar human bronchial mucus under dissociating and non dissociating conditions.

12. LAMBLIN, G., BOERSMA, A., KLEIN, A., ROUSSEL, P., VAN HALBEEK, H., VLIEGNETHART, J.F.G.
Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis.
J. Biol. Chem. 259, 9051-9058, 1984.
13. EDGE, A.S.B., FALTYNEK, C.R., HOF, L., REICHERT, L.E. and WEBER, P. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethane sulfonic acid. Anal. Biochem. 118, 131-137, 1981.
14. GRAHAM, R.C., and KARNOVSKY, M.J. J. Histochem. Cytochem. 14, 291, 1966.
15. GLISIN, V., CRKVENJAKOV, R. and BYUS, C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13, 2633-2637, 1974.
16. AVIV, H. and LEDER, P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412, 1972.
17. HUYNH, T.V., YOUNG, R.A. and DAVIS, R.W. Constructing and screening cDNA libraries in gt 10 and gt 11. In: DNA cloning. A practical approach. Glover, E.D. (ed), I.R.L. Press, Oxford, Vol. 1, pp 49-78, 1985.
18. LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M. and BOEDTKER, H. RNA Molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16, 4743, 1977.
19. CLEVELAND, D.W., LOPATA, M.A., McDONALD, R.J., COWAN, N.J., RUTTER, W.J., KIRSCHNER, M.W.
Number and evolutionary conservation of α - and β -tubulin and cytoplasmic β - and γ -actin genes using specific cloned cDNA probes.
Cell, 20, 95-105, 1986.
20. AUBERT, J.P., PORCHET, N., CREPIN, M., DUTERQUE-COQUILLAUD, M., VERGNES, G., MAZZUCA, M., DEBUIRE, B., PETITPREZ, D., DEGAND P.
cDNAs coding for human tracheal mucins : characterization by immunohistochemistry and DNA sequencing. Submitted for publication, 1989.

IV - CONCLUSION

L'utilisation d'un certain nombre de techniques de biologie moléculaire nous a permis, pour la première fois, d'obtenir des séquences acides aminés déduites des séquences nucléotidiques pour les mucines trachéales humaines.

Ces séquences correspondent tout-à-fait à ce que l'on pouvait attendre, c'est-à-dire un pourcentage élevé en acides aminés hydroxylés et parfois des enchaînements répétitifs de résidus de sérine, thréonine, glycine, alanine et proline. Ces résultats sont donc en parfait accord avec le concept général de la structure des mucines et explique tout-à-fait les difficultés rencontrées lors de l'approche biochimique.

Au cours de la réalisation de ce travail, 3 publications sont parues. Elles concernent la structure primaire de mucines ou de "mucin-like".

C'est ainsi que TIMPTE et coll (1988) (186) ont purifié cinq clones d'ADNc à partir d'une banque de glande sous-maxillaire de porc. Le plus gros d'entre eux (3,7Kb) a été séquencé et une séquence répétitive de 243 nucléotides (81 acides aminés) a été obtenue. Ce motif est répété 8 fois.

GENDLER et coll (1988) (46) ont étudié des composés "mucin-like" provenant d'une lignée tumorale du sein MCF₇. Ils ont obtenu par séquence nucléotidique d'un ADNc des séquences nucléotidiques de 60 paires de bases (20 acides aminés) répétées au moins 23 fois.

Très récemment, GUM et coll (1989) (56) ont criblé une banque d'ADNc d'intestin grêle humain. Les séquences obtenues montrent elles aussi des domaines répétitifs de 23 acides aminés.

Ces travaux, parallèlement aux nôtres, démontrent également que les mucines sont constituées d'éléments répétitifs.

Il est toutefois à noter que :

- les séquences répétitives semblent différentes selon les tissus étudiés. Y a-t-il une spécificité cellulaire de ces répétitions ? Ceci semble probable car nos séquences répétitives sont incapables de reconnaître les ARN d'autres muqueuses.

- l'utilisation d'anticorps à spectre moins large ne permet pas de détecter de séquences autres que répétitives.

Nous avons pu également montrer qu'il existe une certaine homologie structurale et immunologique entre les mucines trachéales humaines et porcines (un clone de porc est reconnu par des anticorps d'origine humaine). Il existe également des homologies chez l'homme entre les mucines trachéales et coliques voire gastrique (Northern blot).

Les résultats des séquences nucléotidiques nous permettent de montrer une grande hétérogénéité peptidique des mucines humaines. Une notion de "familles" de mucines peut être introduite. Ce qui reste à déterminer, c'est si ces familles sont localisées sur une même molécule dans un ordre établi ou au hasard ou si elles sont situées sur des entités moléculaires différentes.

Ce qui apparaît certain, c'est la grande hétérogénéité peptidique en fonction du nombre d'extrémités carboxy-terminales différentes trouvées ainsi qu'en fonction des compositions en acides aminés. Cette très grande hétérogénéité peut elle être rapprochée de celle des glycanes ? Y a-t-il une relation structurale directe entre axes peptidiques et chaînes glycaniques ?

Récemment, SORIMACHI et coll (1988) (177) ont également visualisé, au niveau de l'oeuf de truite arc-en-ciel, une multitude d'ARNm qui codent pour la synthèse d'axes peptidiques de polysialoglycoprotéines (PSGP). Ces ARNm sont aussi structurés avec un nombre variable d'unités répétitives de 39 bases (13 acides aminés dont 4 hydroxylés).

Deux autres points peuvent également être dégagés de cette étude :

- une spécificité cellulaire ou tout au moins un niveau d'expression différent pour certains axes peptidiques selon que l'on observe une cellule caliciforme ou une glande muqueuse dans la trachée humaine.

- une spécificité tissulaire montrée par l'étude en "Northern blot" de différentes muqueuses humaines ou de lignées cellulaires à l'aide de différentes sondes.

°00°

CONCLUSION GENERALE

°00°

Depuis de nombreuses années, l'équipe s'est intéressée à la structure peptidique des mucines bien que ces O-glycoprotéines aient toujours réservé une difficulté technologique majeure dans le domaine de leur composante peptidique en raison du très haut pourcentage en sucres, de l'abondance en acides aminés hydroxylés et ceci malgré l'automatisation et la miniaturisation de la dégradation de Edman.

Nous avons vu que le but poursuivi était avant tout l'approche structurale de l'axe peptidique des mucines trachéobronchiques. Un protocole mis au point au laboratoire a permis la préparation de populations de mucines trachéobronchiques déglycosylées par l'acide trifluorométhane sulfonique.

- Le premier moyen mis en oeuvre a été l'utilisation de la dégradation de Edman des glycopeptides déglycosylés. Il a amené un échec relatif en matière de séquence peptidique. La déglycosylation chimique a cependant permis d'obtenir un immunosérum spécifique de l'axe peptidique des mucines (coupes immunohistochimiques).

- Le deuxième moyen utilisé a été celui de la biologie moléculaire où l'utilisation d'oligonucléotides de synthèse déduits des résultats de séquence peptidique a été un échec. Cependant l'utilisation d'immunosérum préparé à partir des glycopeptides déglycosylés pour le criblage de banques d'ADNc a été un succès et a permis de progresser très sensiblement dans la connaissance de séquences en acides aminés de fragments de mucines trachéobronchiques humaines.

Dans la première partie la grande hétérogénéité de la fraction peptidique des glycopeptides de mucus bronchique n'a pu être appréhendée qu'au travers de résultats difficilement interprétables (mauvaise résolution électrophorétique, colorabilité médiocre, interprétation de résultats de séquence difficile). Nous avons cependant envisagé l'existence d'un modèle peptidique d'environ 55 résidus sur la base d'un résidu d'histidine ou un multiple de ce motif. Nous avons par la biologie moléculaire obtenu un certain nombre de séquences nucléotidiques qui nous permettent de démontrer que l'hétérogénéité existe et qu'elle est très importante. Si les résultats obtenus n'ont pas confirmé le modèle proposé ci-dessus, ceci peut être dû à la multitude de séquences qui restent encore à déterminer.

Nos objectifs ont cependant été atteints puisqu'un nombre important de séquences peptidiques relativement longues a été obtenu, ce qui au regard de la littérature est original.

Ces séquences ont permis d'aller au-delà d'une simple caractérisation d'axes peptidiques puisque nous pouvons introduire pour les mucines trachéo-bronchiques humaines la notion de familles peptidiques et envisager 3 groupes d'ARN messagers en fonction de la richesse en résidus de sérine et de thréonine, de leur agencement et de l'existence de domaines répétitifs dont la taille et l'ordonnement peuvent également être des éléments distinctifs et fonctionnels.

La purification sur les clones positifs obtenus, des immunoglobulines qui les reconnaissent spécifiquement nous permet également d'en préciser le lieu de leur biosynthèse.

Notre travail ouvre de grandes possibilités. Il est possible maintenant :

- de compléter notre connaissance de l'agencement et de la structure des squelettes peptidiques des mucines.
- d'entreprendre le criblage d'une banque de gènes humains de façon à étudier l'organisation génomique de ces mucines
- d'étudier l'expression des mucines par utilisation des sondes vis-à-vis d'ARN provenant de tissus normaux ou pathologiques (CROHN, rectocolite...)
- d'observer l'éventuel polymorphisme interindividuel
- de réaliser la localisation chromosomique du ou des gènes codant pour les mucines.

A plus long terme les perspectives autorisent :

- de cribler avec les sondes trachéobronchiques les banques d'ADNc d'autres muqueuses (digestives, génitales), de tumeur du sein mucosécrétante de façon à étudier les parentés structurales et immunologiques des mucines selon leur provenance tissulaire
- d'envisager l'étude de la glycosylation des mucines sur les protéines de fusion extraites de nos clones
- d'étudier enfin la régulation de l'expression du ou des gènes de mucines.

Notre espoir est aussi que des retombées intéressantes le domaine clinique puissent apparaître et à ce titre la sélection de sondes de mucines comme marqueurs biologiques dans le domaine du cancer et de la surveillance des états précancéreux est envisagée.

°00°

APPENDICE TECHNIQUE

°00°

TABLE DES MATIERES

°00°

RECUEIL ET TRAITEMENT DES SECRETIONS BRONCHIQUES.....	page T-1
HYDROLYSE DU MUCUS PAR LA MERCURIPAPAINÉ.....	page T-1
HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'HYDROLYSAT PAPAINIQUE.....	page T-1
Fractionnement de glycopeptides de mucus par échange ionique.....	page T-1
L'oxydation périodique.....	page T-2
Composition en acides aminés différentielle.....	page T-4
SEQUENCE AMINO-ACIDE.....	page T-4
Méthodologie.....	page T-4
a) Dégradation manuelle.....	page T-4
b) Dégradation automatique.....	page T-6
1) Etalement de l'échantillon dans la coupelle.....	page T-8
2) Couplage.....	page T-8
3) Elimination de l'excès des réactifs.....	page T-8
4) Clivage par l'acide heptafluorobutyrique.....	page T-8
5) Extraction des thiazolinones.....	page T-8
6) Conversion manuelle.....	page T-8
c) Identification des PTH-amino-acides dérivés.....	page T-8
1) La chromatographie liquide de haute performance.....	page T-8
2) La chromatographie en phase gazeuse.....	page T-9
MARQUAGE D'OLIGONUCLEOTIDES DE SYNTHÈSE.....	page T-9
PREPARATION DE SONDÉS IMMUNOLOGIQUES.....	page T-9
CARACTÉRISATION DES IMMUNISÉRÉS.....	page T-13
Immunohistochimie.....	page T-13
PREPARATION DES ARN MESSAGERS.....	page T-13
a) Homogénéisation du matériel biologique.....	page T-13
b) Isolement des ARN cellulaires totaux.....	page T-14
c) Purification des ARN poly A ⁺	page T-14

ELECTROPHORESE D'ARN EN MILIEU DENATURANT.....	page T-15
"Northern blot".....	page T-16
TRADUCTION "IN VITRO" DES ARN SUR RETICULOCYTES DE LAPIN.....	page T-16
SYNTHESE DES ADNc.....	page T-17
a) Synthèse du premier brin.....	page T-17
b) Synthèse du deuxième brin.....	page T-17
c) Calcul du pourcentage d'incorporation.....	page T-18
ELECTROPHORESE DES ADNc EN MILIEU DENATURANT.....	page T-19
PREPARATION DES BANQUES D'ADNc EN BACTERIOPHAGES.....	page T-20
ETALEMENT SUR MILIEU SOLIDE.....	page T-20
CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADNc DE MUQUEUSE TRACHEALE DE PORC A L'AIDE DE LA SONDE NUCLEOTIDIQUE.....	page T-21
CRIBLAGE DES BANQUES A L'AIDE DE SONDES IMMUNOLOGIQUES.....	page T-22
PURIFICATION, A PARTIR DE L'IMMUNSERUM POLYCLONAL, DES ANTICORPS SPECIFIQUES DE CHAQUE CLONE.....	page T-23
CARACTERISATION DES CLONES SELECTIONNES.....	page T-23
CLONAGE DES FRAGMENTS ETUDIES EN BACTERIOPHAGE M13.....	page T-24
TRANSFORMATION DES INSERTS PLASMIDIQUES EN SONDES RADIOACTIVES.....	page T-25
PURIFICATION DES SONDES.....	page T-26
PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES EN VUE DE LA TRANSFORMATION.....	page T-26
TRANSFORMATION DES BACTERIES COMPETENTES.....	page T-26
AMPLIFICATION ET PURIFICATION DU PLASMIDE pBR322.....	page T-27

RECUEIL ET TRAITEMENT DES SECRETIONS BRONCHIQUES EN VUE DE LA PREPARATION DE GLYCOPEPTIDES DE MUCINES (DEGAND et coll, 1973b, 1974) (32,34)

Les expectorations sont congelées dès leur recueil et laissées à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation. Les sécrétions proviennent de sujets atteints de bronchite chronique non infectée au moment de la collecte. Après décongélation un lavage par 4 volumes de sérum physiologique sous agitation douce 30 minutes permet après centrifugation (3000 trs/mn pendant 10 minutes) de récupérer une phase gélineuse qui après dialyse (48 heures) contre de l'eau désionisée sera soumise à lyophilisation. Le "mucus" ainsi conservé demeure stable dans son état.

HYDROLYSE DU MUCUS PAR LA MERCURIPAPAINNE (DEGAND et coll, 1974) (34)

15g de mucus sont ajoutés à 1,5l de tampon de phosphate de sodium 0,01M pH 6,5. 10 gouttes de BAL (dimercapto-2-3-propanol-1) sont joints de même que la mercuripapaine, pour obtenir un rapport enzyme:substrat de 1/100. Ainsi pour 15g de mucus, 150mg d'enzyme sont ajoutés (soit 15ml). L'ensemble est mis en incubation à 37°C, pendant 24 heures avec recharge et sous agitation magnétique. Le pH de l'hydrolysate papainique est amené à 7,3 à l'aide d'une solution saturée en Tris préparée extemporanément.

HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'HYDROLYSAT PAPAINIQUE

15ml d'acétate de calcium 1M sont ajoutés (0,01M = molarité finale en calcium). Le deuxième enzyme (pronase) est ajouté pour que le rapport enzyme:substrat soit de 1/40 (385mg de pronase sont ajoutés). L'ensemble est incubé 24 heures à 37°C sous agitation. Une centrifugation de 10 minutes à 3000tr/mn est réalisée et le culot est éliminé. Le surnageant contenant les glycopeptides est précipité par 4 volumes d'éthanol absolu. Il est laissé une nuit à 4°C. Il subit une centrifugation de 15 minutes à 6000tr/mn. Le précipité éthanolique est repris par de l'eau et lyophilisé.

* Fractionnement des glycopeptides de mucus par échange ionique

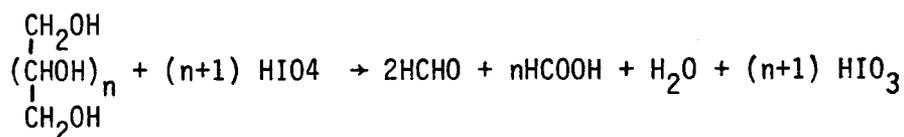
Le mucus (10g) est donc comme précédemment dissous en tampon phosphate de sodium ajusté à pH 7,3. Cependant, il subit directement l'hydrolyse

pronastique en tampon acétate de calcium dans un rapport E/S de 1/40. L'incubation a lieu à 37°C pendant 2 fois 48 heures. L'hydrolysate est centrifugé comme précédemment et le surnageant est précipité par l'éthanol absolu. Le matériel (500mg) est déposé sur DEAE Sephadex-A25 (colonne de 65cm x 3,5cm) après dissolution dans 5ml de NaCl 0,01M. L'élution des différentes fractions de glycopeptides de mucus bronchique est fonction de l'acidité de ces fractions les unes par rapport aux autres. Elle est réalisée à l'aide de NaCl 0,01M puis 0,1M suivie de l'utilisation d'un gradient discontinu associant l'HCl 0,01N à une molarité croissante en NaCl (0,3 à 0,7M). Chacune des populations est éluee par 600ml d'HCl/NaCl. Les fractions les plus neutres (plus riches en fucose) sont éluees avant les fractions les plus sialylées. Les fractions les plus sulfatées sont éluees en dernier. L'élution des différentes fractions du chromatogramme est suivie par le dosage des oses à l'orcinol et la lecture spectrophotométrique à 230nm.

- * Oxydation periodique (ROTHFIS et SMITH, 1963 ; MAKINO et YAMASHINA, 1966) (153,113)

Une molécule, qui renferme des groupements hydroxyles adjacents libres, peut être coupée par de nombreux agents oxydants. L'acide periodique, ou l'un de ses sels, a souvent été utilisé pour la coupure de liaisons carbone-carbone existant au niveau des oses.

Ceci pourrait être représenté par l'équation :



Les groupements hydroxylés secondaires donnent de l'acide formique tandis que les groupements alcools primaires conduisent à la formation de formaldéhyde. La concentration de periodate utilisée est, en général, de 0,005 à 0,1M. Les températures les plus fréquemment décrites sont de l'ordre de 0 à 4°C avec un pH variant de 3,2 à 6,8.

Les oxydations non spécifiques sont alors retardées. Ces dernières sont plus fréquentes dans des conditions plus acides. Certains acides aminés sont susceptibles d'interférer lors d'études d'oxydation periodique. Les résidus de sérine et de thréonine sont oxydés en alcool α aminés. Ils donnent respectivement naissance à de l'acétaldéhyde et à de la formaldéhyde.

L'hydroxyproline et la proline réagissent également avec l'acide periodique à température ambiante. Ceci dépend du pH. Des acides aminés tels que le tryptophane, la cystéine et la méthionine peuvent être oxydés par l'acide periodique.

Dans le cas envisagé, 100mg de glycopeptides sont dissous dans 50ml d'eau distillée sous agitation magnétique. Du periodate de sodium est ajouté pour que la concentration finale soit 0,05M (1,07g/50ml d'eau distillée). Le pH doit se situer entre 4 et 4,5, sinon il est ajusté avec de l'acide sulfurique normal. L'incubation est réalisée à 4°C, à l'obscurité sous agitation.

La lecture est réalisée à 310nm toutes les heures, le pH est vérifié à chaque prise d'essai.

Il faut prévoir :

- 1 témoin periodate de potassium
- 1 témoin eau bidistillée
- 1 témoin solution de glycopeptides + eau bidistillée (v/v)
- 1 témoin temps glycopeptides + periodate

Il faut attendre environ 3 heures pour l'obtention d'un plateau de lecture à 310nm. L'oxydation periodique est arrêtée par addition de 0,5ml d'éthylène glycol, le contact est réalisé à 4°C, à l'obscurité 30 minutes jusqu'à ce que l'absorbance soit nulle.

La réduction est réalisée par adjonction de 40mg de borohydrure de sodium pour 5mg de glycopeptides (soit ici 800mg, molarité finale en borohydrure : 0,21M). Le produit est laissé la nuit à 4°C. Il est dialysé et lyophilisé.

L'hydrolyse est réalisée par de l'acide sulfurique 2N de façon à ce que le pH soit égal à 1. L'ensemble est laissé 20 heures à 20°C. Cette hydrolyse est arrêtée par neutralisation avec de la soude. Le produit est lyophilisé et soumis à un "deuxième tour" d'oxydation periodique, réduction au borohydrure et hydrolyse. Les glycopeptides sont concentrés sous vide, le volume est ramené à 10ml soit une concentration de 10mg/ml.

Les glycopeptides oxydés (20mg/2ml) sont déposés sur Sephadex G-15 en eau distillée. L'élution du matériel est suivie par lecture à 278nm, 310nm, le dosage à l'orcinoï et la ninhydrine. Le glycopeptide exclu de la colonne est soumis à une hydrolyse papaine/pronase (48 heures:8 jours) et le lyophilisat obtenu est déposé sur Biogel P2 en eau désionisée.

* Composition en acides aminés différentielle

20mg de glycopeptides sont dissous dans 1ml d'eau bidistillée et on ajoute 1ml de pyridine et 40µl de phényl-isothiocyanate (formation du PTC-peptide). On laisse agir 1h30 à 45°C sous atmosphère d'azote.

Le PITC en excès est extrait par agitation avec du benzène (2ml de benzène - élimination de la phase benzénique ; 7 fois).

La phase benzénique étant séparée par centrifugation, on congèle la phase aqueuse qui est lyophilisée.

La cyclisation est effectuée en 30 minutes, à 45°C, sous azote, par addition de 1ml d'acide trifluoroacétique anhydre que l'on ajoute au lyophilisat.

Après séchage sous azote puis sous vide, en dessiccateur en présence de soude, le résidu est repris par 1ml d'acide acétique 0,4N. La phényl-thiohydantoïne est alors extraite à trois reprises par le benzène (2ml).

Après la pesée pour la composition en acides aminés, le lyophilisat est repris dans l'eau distillée et un nouveau cycle de dégradation peut commencer.

SEQUENCE AMINO-ACIDE

Méthodologie

a) Dégradation manuelle

Nous suivons le protocole établi par EDMAN (1970) (42) et modifié par DEMAILLE (1979) (36) (Figure n°24).

* Couplage

Les différentes étapes sont les suivantes :

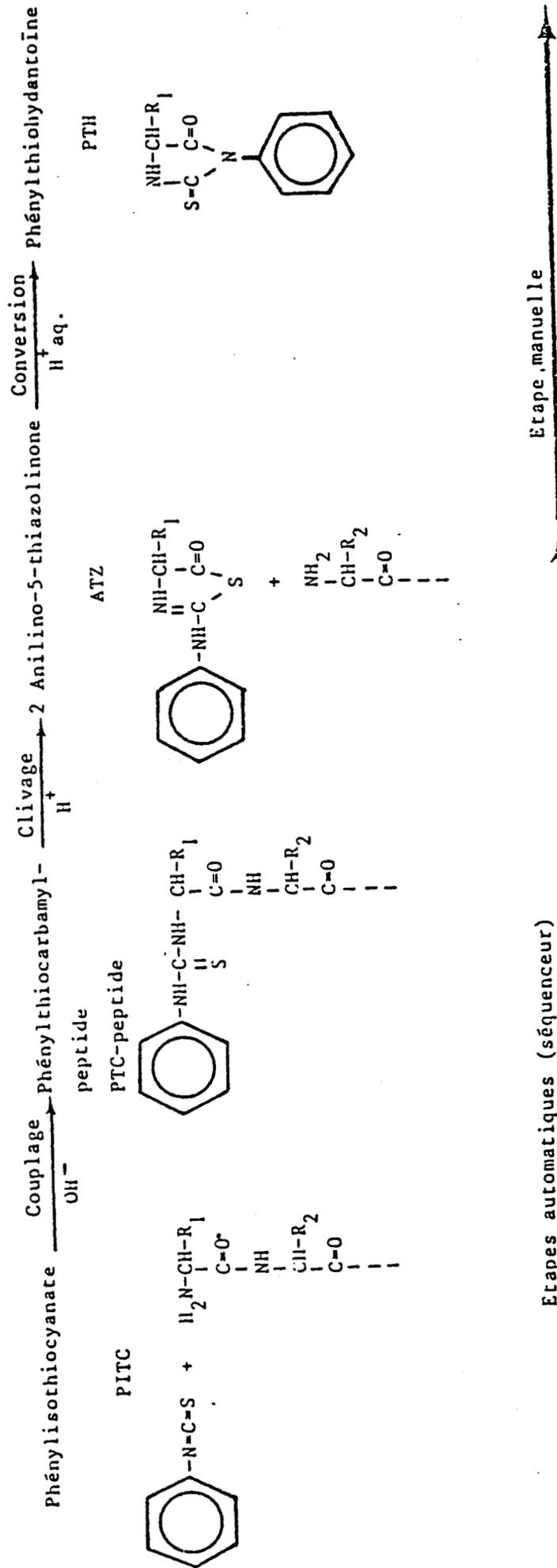
- dissolution d'environ 200 nanomoles d'échantillon dans un tube conique par 100µl d'un tampon diméthylallylamine/propanol/eau (1,2/15/10-v/v/v) fraîchement préparé et ajusté à pH 9,5 par de l'acide trifluoroacétique à 10%.

- addition de 5µl de phénylisothiocyanate et maintien du tube sous courant d'azote pendant 30 secondes.

- agiter au vortex.

- incubation à 50°C pendant 40 minutes, le mélange est ensuite refroidi.

Figure n°24 : Etapes de la dégradation de Edman



- élimination de l'excès de réactif par 3 additions successives de 0,5ml de benzène, suivies de centrifugation à 2000 tours par minute pendant 5 minutes et élimination de la phase benzénique.

- séchage de la phase aqueuse par évaporation sous azote puis dessiccation pendant 30 minutes dans un dessiccateur maintenu à 50°C, sous vide, en présence d'anhydride phosphorique.

* Clivage

- addition de 50µl d'acide trifluoroacétique immédiatement après la dessiccation avec maintien quelques secondes sous courant d'azote.

- agitation à l'aide d'un vortex.

- incubation à 50°C pendant 7 minutes.

- séchage du produit sous azote.

- extraction de la thiazolinone par de l'éther dépourvu de peroxyde et contenant de l'éthylmercaptan comme antioxydant (20µl pour 50ml d'éther). Trois extractions par 0,5ml d'éther suivies de centrifugation à 2000tr/mn pendant 3 minutes sont effectuées. Les phases éthérées réunies dans un nouveau tube conique sont séchées sous azote. Le produit résiduel est alors parfaitement séché en dessiccateur sous vide en présence d'acide sulfurique pendant 30 minutes. Il est ensuite prêt pour le cycle suivant.

* Conversion

Addition de 200µl d'acide chlorhydrique 0,1N contenant de l'éthyl mercaptan comme anti-oxydant et maintien du tube sous courant d'azote pendant 30 secondes.

- agitation à l'aide d'un vortex

- incubation à 80°C pendant 10 minutes

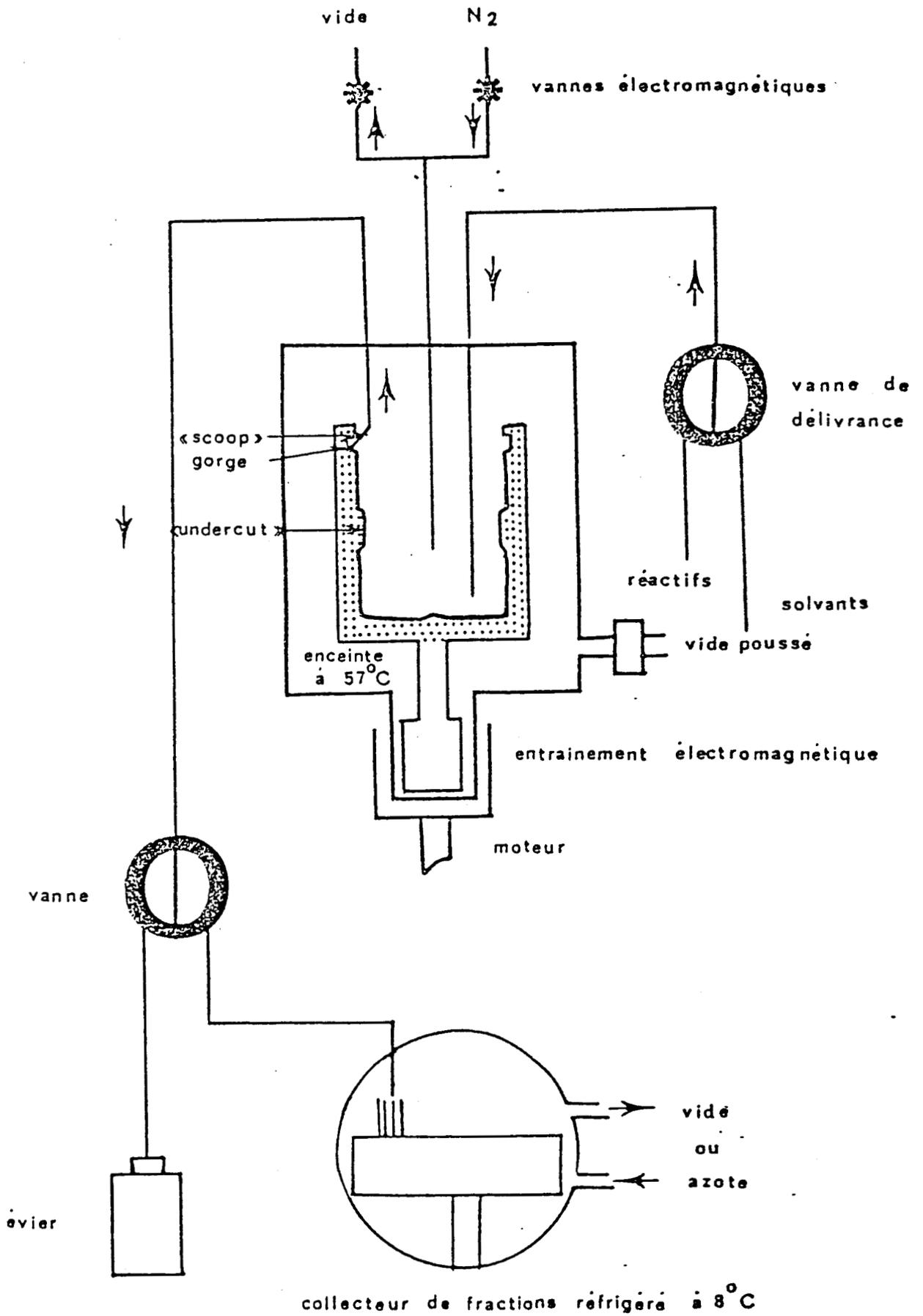
- refroidissement rapide

- extraction de la phényl thiohydantoïne (PTH) par trois fois 0,5ml d'acétate d'éthyle suivie de centrifugation à 2000tr/mn pendant 5mn. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées sous azote. Quant à la phase aqueuse, elle est lyophilisée. En effet, tous les dérivés des acides aminés ne sont pas retrouvés dans la phase acétate d'éthyle, ceux de l'arginine, de l'histidine et de la cystéine restent dans la phase aqueuse. Le PTH amino-acide ainsi préparé est prêt pour son identification.

b) Dégradation automatique

Les dégradations ont été réalisées sur un séquenceur Beckman 890C dont un schéma simplifié est donné dans la Figure n°25. Les différentes étapes sont effectuées à 57°C en atmosphère d'azote.

Figure n°25 : Schéma simplifié du séquenceur Beckman 890C



1- Etallement de l'échantillon sur la coupelle

L'échantillon en quantité de 200 à 500 nanomoles est solubilisé par 400µl d'eau puis déposé près du fond de la coupelle, tandis que celle-ci tourne à 1000tr/mn. L'échantillon, sous l'effet de la force centrifuge, est plaqué contre la paroi. Le séchage est ensuite effectué par une série de balayages à l'azote et de vides progressifs.

2- Couplage

L'échantillon est couplé au phénylthiocyanate (PITC) dans 2 types de tampons selon le programme choisi : soit un tampon quadrol 0,1M (Programme Beckman, 122974) utilisé pour les protéines, glycoprotéines, "gros" peptides ou glycopeptides, soit un tampon diméthylallylamine 0,8M pH 9,4 (DMAA), utilisé pour les "petits" peptides ou glycopeptides.

3- Elimination de l'excès des réactifs

Cette étape est réalisée par succession d'un vide progressif, d'un balayage d'azote sous vide partiel et d'un lavage au benzène.

4- Clivage par l'acide heptafluorobutyrique (HFBA)

Après séchage du film, le clivage est réalisé par addition de HFBA. L'excès d'acide est éliminé par un vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide.

5- Extraction des thiazolinones

Les 2-anilino-5-thiazolinones (ATZ) sont extraites par le chlorobutane et recueillies dans des tubes réfrigérés contenant le milieu de conversion 200µl d'HCl N et quelques gouttes d'éthylmercaptan comme anti-oxydant.

6- Conversion manuelle

Le chlorobutane est évaporé sous azote. Au cours de cette évaporation, la thiazolinone se concentre progressivement dans la phase HCl qui est incubée 10 minutes à 80°C.

c) Identification des PTH amino-acides dérivés

A ce stade, nous avons fait appel essentiellement à la chromatographie liquide de haute performance (HPLC) et dans certains cas à la chromatographie en phase gazeuse.

1- La chromatographie liquide de haute performance

L'appareil utilisé était un Hewlett Packard modèle 1084B équipé d'un détecteur fixe à 254nm et d'un détecteur variable entre 200 et 540nm. La technique employée était celle préconisée par HERMANN et coll (1978) (68), modifiée par BRIAND (1981) (18).

La séparation est réalisée sur une colonne μ -Bondapack C18 (Waters Associates). La PTH-norvaline est utilisée comme témoin interne, le diagramme obtenu ainsi que les conditions opératoires sont représentées dans la figure n°26. Sur cette colonne les PTH-méthionine et PTH-valine d'une part et les PTH-isoleucine et PTH-phénylalanine d'autre part ne sont pas séparées. L'identification définitive est dans ce cas réalisée à l'aide d'une colonne μ -Bondapack CN (Waters Associates) (Figure n°27).

2- La chromatographie en phase gazeuse

Elle a été employée, dans les toutes premières déterminations, pour différencier PTH-méthionine et PTH-valine d'une part, PHT-isoleucine et PTH-phénylalanine d'autre part. Les identifications ont été réalisées sur une colonne WHP 100/120 mesh imprégnée de chlorophényl silicone SP400 à 10% à l'aide d'un appareil Hewlett Packard modèle 5730A. Le diagramme type ainsi que les conditions opératoires sont représentées dans la figure n°28.

MARQUAGE D'OLIGONUCLEOTIDES DE SYNTHÈSE

L'oligonucléotide de synthèse est marqué à l'aide d'ATP [$\gamma^{32}\text{P}$], par l'intermédiaire de la T_4 polynucléotide kinase d'E. Coli et cela, pendant 45 minutes à 37°C ou 10 minutes à 45°C. Ce protocole est dérivé de celui décrit par MANIATIS et coll (1982) (115). Cependant la séparation de l'oligonucléotide marqué de l'ATP non incorporé est réalisée en DEAE Trisacryl. Le rendement de marquage est contrôlé par chromatographie en couche mince.

PREPARATION DE SONDAS IMMUNOLOGIQUES

Le protocole d'immunisation retenu est très proche de celui décrit par VAITUKAITIS (1981) (187) et comporte les étapes suivantes :

- avant toute injection d'antigène, du sang est prélevé à chacun des deux lapins. Le sérum constituera le "témoin de préinoculation".
- la première injection était de 500 μ g de matériel, les injections de rappel à 15 jours d'intervalle étaient de 200 μ g ceci en présence d'un volume d'adjuvant complet de Freund.
- plusieurs saignées de 10 à 15ml ont été réalisées. L'immunsérum est obtenu après centrifugation du sang total pendant 5 minutes à 2500tr/mn, puis il est réparti en aliquots et conservé à -20°C.

Figure n°26 : Séparation des PHT amino-acides par chromatographie liquide à haute performance sur colonne μ Bondapak C18

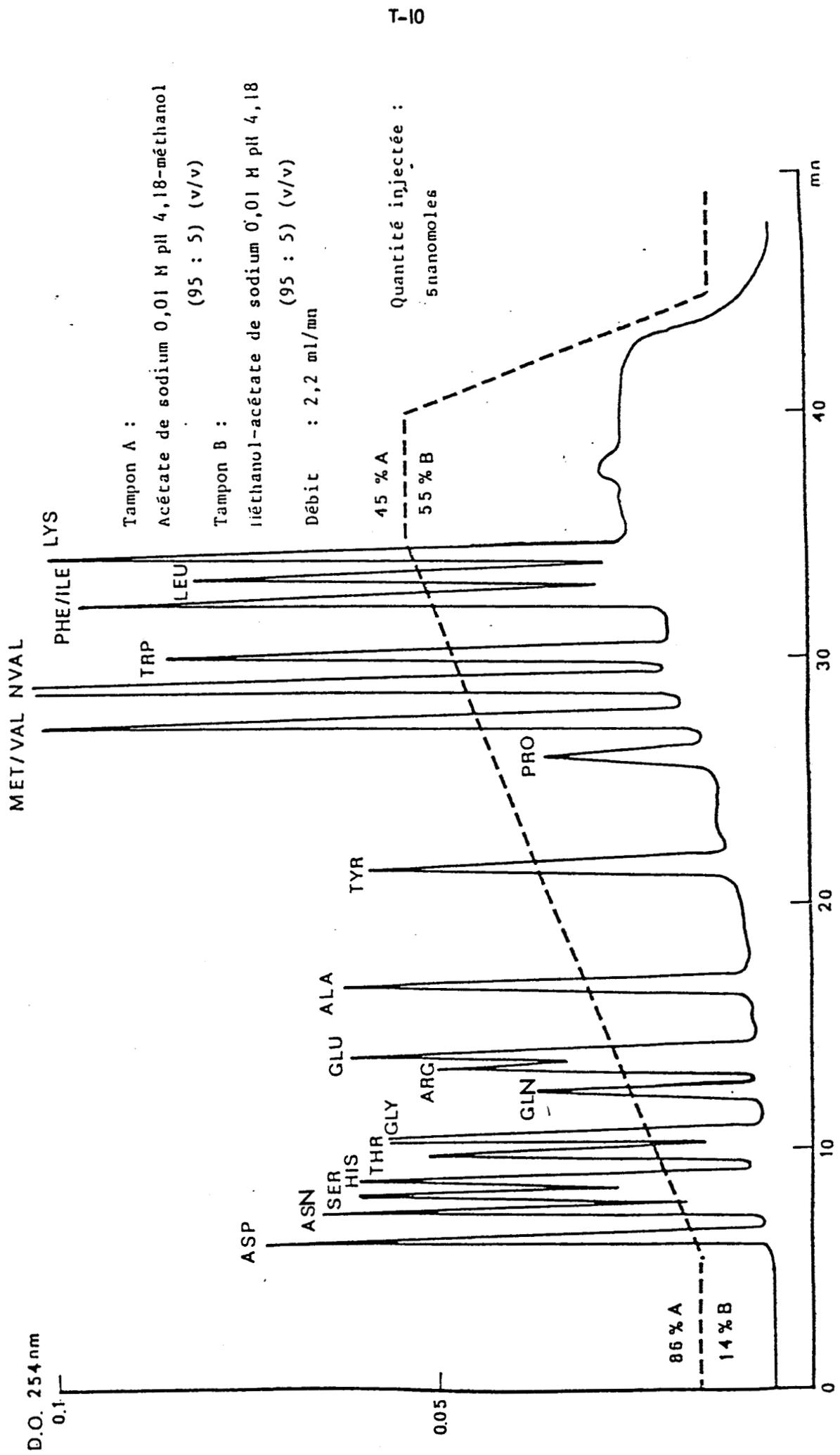


Figure n° 27 : Séparation des PTH amino-acides par chromatographie liquide
à haute performance sur colonne μ Bondapak CN

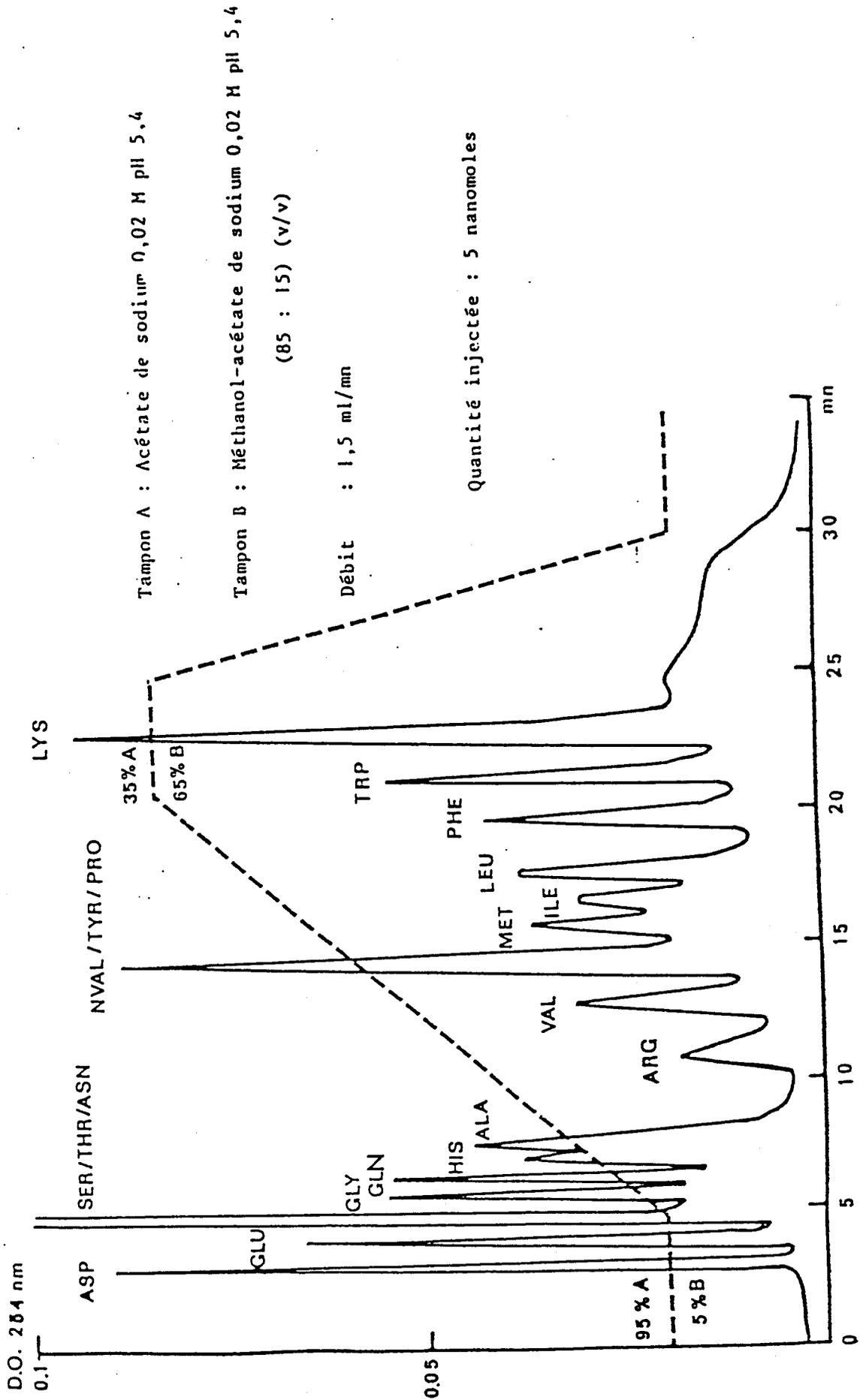
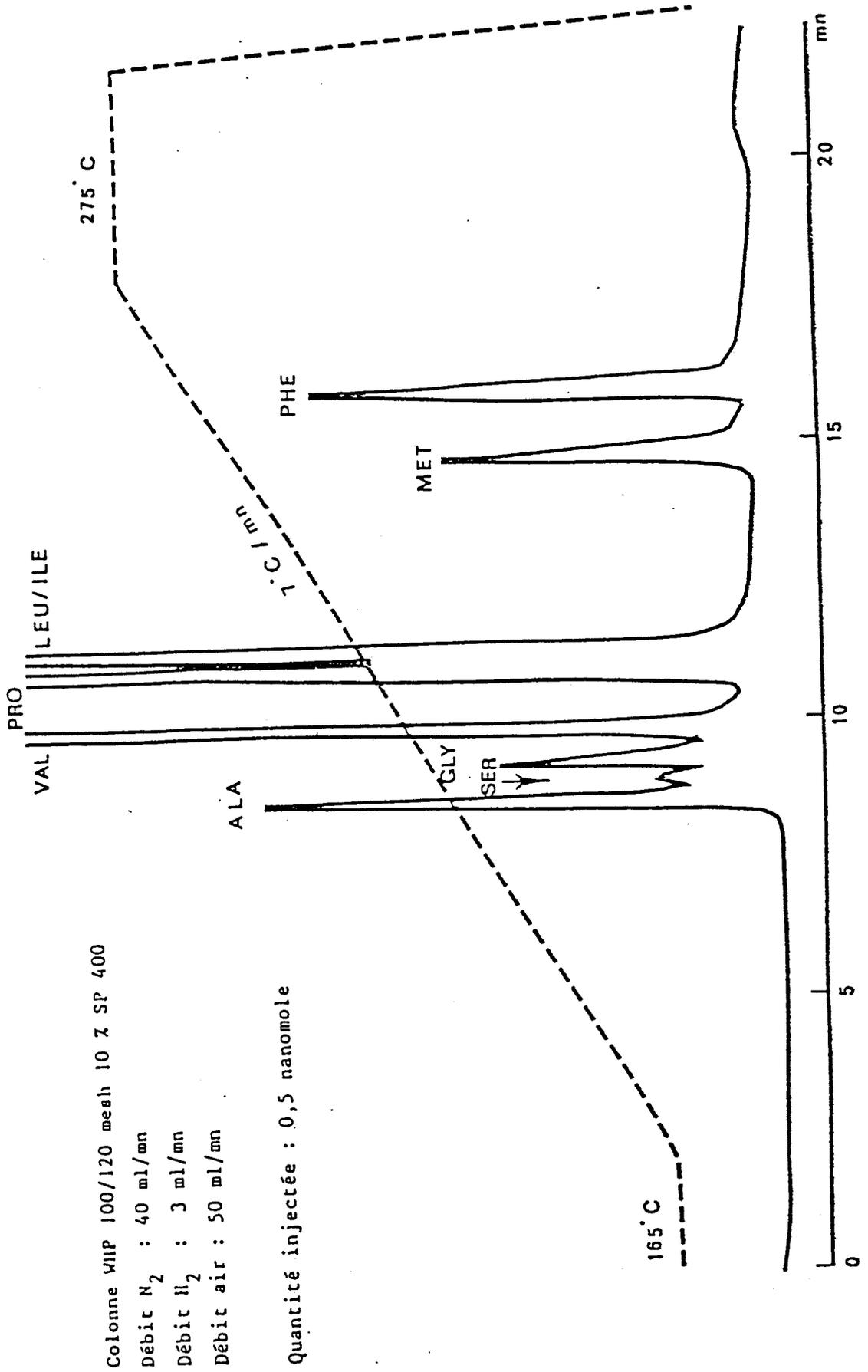


Figure n°28. : Séparation des PTH amino-acides non silylés par chromatographie en phase gazeuse



Colonne WHP 100/120 mesh 10 Z SP 400
Débit N₂ : 40 ml/mn
Débit H₂ : 3 ml/mn
Débit air : 50 ml/mn

Quantité injectée : 0,5 nanomole

CARACTERISATION DES "IMMUNSERA"

* Immunohistochimie

Des biopsies de muqueuses bronchiques et coliques obtenues à partir de tissus macroscopiquement sains ont été immergées dans différents réactifs de fixation :

- une solution de Carnoy : éthanol-chloroforme-acide acétique (6;3;1;v/v/v) l'immersion a lieu pendant 2 heures.
- une solution de Bouin alcoolique modifié.

Après fixation, les fragments de tissus ont été déshydratés, inclus dans la parafine et coupés. Les coupes sériées de 4µm ont été déparafinées et laissées 12 heures en tampon PBS (phosphate 0,01M) à pH 7,3.

Une technique immunohistochimique indirecte a été utilisée. Après rinçage en solution saline de tampon phosphate, les coupes ont été fixées et incubées en tampon salin contenant 1% de sérum de mouton. Après rinçage, les échantillons sont incubés 2 à 4 heures à température du laboratoire avec l'immunsérum dirigé contre les peptides de mucine humaine déglycosylés (HDMP) à la dilution de 1/100^e. Ils sont à nouveau lavés et soumis à un marquage à l'aide de globulines de mouton anti-lapins marqués à la peroxydase et à la dilution de 1/50^e. Ce marquage dure 1 heure et les tissus sont ensuite rincés. La peroxydase est ensuite révélée à l'aide du tétrachlorure 3,3'diaminobenzidine et de l'eau oxygénée fraîche selon GRAHAM et KARNOWSKY (1966) (53). Les coupes sont finalement lavées, déshydratées et comptées.

Trois contrôles ont été utilisés pour vérifier la spécificité de la réaction. Un pré-immunsérum a été substitué au sérum spécifique ; l'étape de l'immunsérum a été volontairement oubliée ; l'immunsérum a été saturé avec les peptides de mucines déglycosylés avant l'étape immunohistochimique.

PREPARATION DES ARN MESSAGERS

a) Homogénéisation du matériel biologique

Au moment de l'utilisation, 4,9g de muqueuse trachéale humaine sont déposés dans un mortier contenant de l'azote liquide et réduits en poudre. Cinq volumes de tampon GT sont alors ajoutés (isothiocyanate de guanidine 6M, citrate de sodium 5mM pH 7,0, β-mercaptoéthanol 0,1M, sarcosyl 0,5%). Afin de diminuer la viscosité, l'ADN est cassé par des passages successifs au travers d'aiguilles de diamètres décroissants.

b) Isolement des ARN cellulaires totaux

L'homogénat reçoit 16g de chlorure de césium solide et son volume est ajusté à 40ml en tampon GT. Il est réparti dans 6 tubes, déposé délicatement au dessus de 3,2ml d'une solution de chlorure de césium 5,7M, EDTA 0,1M (pH 7,5) DEPC 0,1% . Les tubes sont centrifugés dans une ultra-centrifugeuse Beckman L8 (Rotor : SW41) à 29500tr/mn pendant 17 heures à 18°C. Chacun des culots est dissous dans 1ml de TE (Tris-HCl 10mM pH 7,4 EDTA 5mM) ; SDS 1%, après élimination délicate des surnageants. Les fractions sont regroupées par 3.

Les ARN sont alors extraits par 2 volumes de chloroforme n-butanol (4:1). La phase organique est réextraite par 1 volume de TE, SDS 1%. Les 2 phases aqueuses sont ensuite mélangées et réparties en 2 volumes égaux. Les ARN sont précipités par 0,1 volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et 2,2 volumes d'éthanol absolu, puis conservés à -80°C. Les ARN sont récupérés après centrifugation à 10000tr/mn pendant 30mn (Rotor JS13.1).

Les précipités obtenus sont ensuite lavés successivement par 5ml d'éthanol, NaCl 0,2M (70:30) puis trois fois par 5ml d'éthanol 95°C et enfin par 5ml d'éthanol absolu. Chacun des culots est séché sous courant d'azote puis resolubilisé dans 500µl d'eau stérile. Un aliquot de 10µl de chaque échantillon est prélevé et dilué dans 1ml d'eau pour la quantification.

La pureté de chaque échantillon est appréciée par deux critères :

- le rapport D.O. à 260nm sur D.O. à 230nm (la contamination par les solvants). Il doit être supérieur à 2.
- le rapport D.O. à 260nm sur D.O. à 280nm (la contamination par les protéines). Il doit être supérieur à 1,75.

Nous avons ainsi obtenu 270µg d'ARN totaux à partir du fragment de muqueuse trachéale humaine. Les rapports de D.O. obtenus étaient compris, d'une part, entre 2,15 et 2,38 et, d'autre part, entre 1,77 et 1,85.

c) Purification des ARN poly A⁺

100mg de poudre d'oligo d(T) cellulose ont été repris dans 2ml d'eau stérile. La colonne est montée dans une seringue de 5ml et elle est successivement lavée par 3 volumes d'eau, 3 volumes de soude 0,1N et, à nouveau, 3 volumes d'eau en vérifiant que le pH soit inférieur à 8,0. La colonne est équilibrée par 5 volumes de tampon Tris-HCl 20mM pH 7,6, NaCl 0,5M, EDTA 1mM, SDS 0,1%. Après dénaturation des ARN par chauffage à 65°C pendant 5 minutes,

ceux-ci sont repris par un volume de tampon d'équilibrage deux fois concentré et déposés sur la colonne. L'éluat est repassé sur la colonne après un nouveau chauffage à 65°C.

Les ARN poly A- sont élués par le tampon d'équilibrage et recueillis par fraction de 2ml. Les ARN poly A⁺ sont élués par le tampon Tris 10mM pH 7,6, EDTA 1mM et SDS 0,05%) et récupérés par fraction de 1ml. Chacune des populations éluées est lue à 260nm. Les ARNm sont ensuite précipités par 0,1 volume d'acétate de sodium 0,3M pH 5,2 et 2,2 volumes d'éthanol absolu et conservés à -80°C. Les culots sont ensuite lavés par de l'éthanol : NaCl 0,2M (70:30), puis de l'éthanol 95°C et enfin de l'éthanol absolu. Ils sont séchés (azote), repris dans de l'eau et conservés à -80°C. Nous avons ainsi obtenu 19µg d'ARN poly A⁺ qui représentent 6% des ARN totaux.

Dans le but d'obtenir une banque d'ADNc représentative des ARNm de la muqueuse trachéale, il faut posséder une population très large d'ARN non altérés. Toute contamination et toute altération des ARN par les ribonucléases endogènes ou exogènes doit être évitée (stérilité des tampons).

ELECTROPHORESE D'ARN EN MILIEU DENATURANT

L'ARN est dénaturé selon un protocole dérivé de LEHRACH et coll (1977) (105) par chauffage à 68°C en milieu tampon dénaturant dont la composition est la suivante :

- formamide désionisée sur AG 501 X 8	500µl
- formaldéhyde désionisée sur AG 501 X 8	178µl
- MOPS 10 X	100µl
- eau stérile DEPC QSP	1000µl

Des aliquots équivalents à 25µg et 50µg de chaque préparation d'ARN sont déposés sur un gel d'agarose à 0,9% ainsi préparé :

- agarose	1,2g
- MOPS 10X	15ml
- eau stérile DEPC	109ml

La migration est réalisée une nuit à température ambiante, sous agitation magnétique, à 30 V en tampon MOPS X préparé par dilution d'une solution mère de MOPS 10X :

- MOPS (acide-3-(N-morpholino propane sulfonique)	10g
- acétate de sodium 3M	4,2ml
- EDTA 0,5M	5ml
- eau stérile traitée DEPC QSP	250ml
après ajustement à pH 7,0 par la soude 3M	

Après lavage par 6 bains successifs de tampon SSC 10X pendant 10mn, sous agitation douce, destinés à éliminer le formaldéhyde, l'intégrité de l'ARN est contrôlée par visualisation sous lampe UV des bandes d'ARN ribosomales colorées par le bromure d'éthidium (Bet) (solution aqueuse à 10µg/ml) :

ARNr 18 S	2,06Kb
ARNr 28 S	5,30Kb

"Northern blot" et hybridation

La réalisation du "Northern blot" comporte, outre l'étape de fractionnement électrophorétique de l'ARN total en milieu dénaturant précédemment décrit, une étape de transfert et de fixation sur membrane de nitrocellulose.

La masse moléculaire de chacun des ARN ultérieurement révélés par la sonde sera estimée grâce à une courbe de calibration (linéaire sur papier semi-logarithmique) établie par mesure des distances de migration de chacune des bandes colorées au bromure d'éthidium d'un standard de masse moléculaire (BRL 9 bandes s'échelonnant de 0,24 à 9,5Kb).

Le transfert des bandes isolées sur le gel d'agarose est réalisé classiquement (MANIATIS et coll, 1982) (115) par mouvement de capillarité d'un tampon SSC 20X (citrate trisodique $2H_2O$: 441g, NaCl : 876,5g, ajusté à pH 7,0, H_2O QSP 5 litres) au travers d'une membrane de type Hybond C Extra (Amersham) constituée d'une matrice de nylon revêtue de nitrocellulose. La fixation covalente de l'ARN sur le support est assurée par cuisson de la membrane à 80°C pendant 2 heures sous vide partiel.

TRADUCTION "IN VITRO" DES ARN SUR RETICULOCYTES DE LAPIN

Le système de traduction hormis le lysat de réticulocytes, est préparé extemporanément en associant l'acide aminé marqué (ici la leucine), le cocktail d'acides aminés (sans leucine) et les sels de sodium et de potassium.

Remarques :

- la [3H] leucine doit être neutralisée extemporanément
- le lysat de réticulocytes est aliquoté et congelé à -70°C
- les sels de sodium et de potassium ont des molarités optimales d'action
- le lysat de réticulocytes, l'ARN témoin ou à traduire sont ajoutés extemporanément.

- le mélange est agité au vortex, incubé 1h30 à température de laboratoire et centrifugé.

Un aliquot des produits de traduction est précipité par le mélange acide trichloroacétique à 25% et acide phosphotungstique à 2,5%. Il est agité au vortex, filtré (Whatman GF/C). Il est rincé plusieurs fois à l'ATCA 10% et à l'acide phosphotungstique 1%. L'étape ultime de rinçage est réalisée en alcool absolu. Les filtres sont séchés à 80°C (étuve) et comptés.

Les produits de traduction sont déposés en électrophorèse en gradient de polyacrylamide (5 à 30%) en présence de SDS (LAEMMLI, 1970) (96). Après migration, le gel est photographié (témoins de masse moléculaire fluorescents) et mis 30 minutes dans le mélange ATCA 25%, acide phosphotungstique 2,5%, sous agitation. Il est décoloré, mis en contact avec de l'amplificateur pour accélérer le processus de révélation autoradiographique du gel préalablement séché sous vide à 80°C.

SYNTHESE DES ADNc

Le mélange des ARNm a été réparti de façon à avoir environ 3µg d'ARNm par tube. La moitié des tubes a servi à la synthèse des ADNc marqués sur le premier brin, l'autre moitié a permis la synthèse des ADNc marqués sur le deuxième brin.

a) Synthèse du premier brin

La technique utilisée est celle décrite par Amersham. Les réactifs enzymatiques sont maintenus à -20°C jusqu'à l'emploi, tandis que les réactifs non enzymatiques peuvent être laissés à température ambiante. Les ARNm sont décongelés extemporanément et dénaturés par chauffage à 68°C pendant 5 minutes. La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée en ajoutant les différents réactifs (tampon, nucléotides froids, amorce, dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] pour les tubes 1er brin) puis les ARNm et l'enzyme. L'incubation a lieu à 42°C pendant 1 heure.

b) Synthèse du deuxième brin

Au mélange hybride ADNc/ARNm, de la dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] est ajoutée (tubes 2è brin) puis les différents enzymes. Les tubes sont incubés à 12°C puis à 22°C

pendant une heure à chaque température. Les enzymes sont ensuite détruits par chauffage à 70°C pendant 10 minutes. L'ADN polymérase T₄ est enfin ajoutée et incubée à 37°C pendant 10 minutes. La réaction est alors stoppée par addition d'EDTA 0,25M pH 8,0 et SDS 10%.

c) Calcul du pourcentage d'incorporation

Le rendement d'incorporation constitue un critère quantitatif des ADNc préparés. Un aliquot de 1µl est prélevé dans chaque tube puis déposé sur des filtres de papier Whatman DE 81. La radioactivité des filtres est comptée par effet CERENKOV. Elle représente la somme de dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] libre en excès et le dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] incorporé. Les filtres subissent ensuite des séries de lavages en tampon phosphate disodique 0,5M ; eau ; éthanol 95°C. La dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] libre est ainsi éliminée. Les filtres lavés sont alors comptés et la radioactivité obtenue par rapport à celle quantifiée précédemment nous renseigne sur la quantité de dCTP [$\alpha^{32}\text{P}$] incorporée sous forme d'ADNc. Pour la quantification, nous nous basons sur le pourcentage d'incorporation du nucléotide radioactif (qui est calculé à partir de la radioactivité fixée sur filtre lavé). Les concentrations de chacun des nucléotides dans le milieu réactionnel sont connues (10nmoles) et nous considérons que le pourcentage d'incorporation pour chacun des nucléotides est identique ($X\%$ de 10nm = $X/10\text{nm}$). Le taux global de nucléotides incorporés est $4X/10\text{nm}$. Si nous considérons que le poids moléculaire d'une mole de dNMP est 350g, on peut établir la formule donnant la quantité Z d'ADNc double-brin comme : $Z\text{ng} = \% \text{ d'incorporation} \times 140 \times 2$.

Nous avons ainsi obtenu :

		% d'incorporation	Z en ng
* ADNc marqués sur le 1er brin :	tube 1	1,57	440
	tube 2	3,65	1022
	tube 3	1,12	314
* ADNc marqués sur le 2è brin :	tube 1	1,61	451
	tube 2	1,42	398
	tube 3	1,91	535

Soit un total de 3160ng

Après purification, les ADNc sont de nouveau comptés par effet CERENKOV. Nous avons obtenu :

ADNc marqués sur le 1er brin	tube 1	166ng
	tube 2	200ng
ADNc marqués sur le 2è brin	tube 1	184ng
	tube 2	128ng

Soit au total : 678ng

Nous observons une différence importante des deux taux d'ADNc quantifiés après synthèse et lavage et après purification. L'étape de purification entraîne des pertes car elle implique la multiplication d'étapes d'extraction, de purification et de multiples pipettages.

Cette purification, décrite par Amersham, fait intervenir des extractions au phénol-chloroforme, à l'éther éthylique, des lavages à l'acétate d'ammonium 4M et à l'éthanol, des étapes de centrifugation. Les culots secs sont remis en suspension dans du tampon "TE" et conservés à -20°C.

ELECTROPHORESE DES ADNc EN MILIEU DENATURANT

- La cuve à électrophorèse est d'abord lavée à la soude 0,1M puis rincée à l'eau stérile.

- Le tampon d'électrophorèse est constitué de :

NaOH 300mM	150ml
EDTA 20mM	150ml
eau QSP	1,5l

- Un gel d'agarose à 1,4% contenant de l'EDTA 20mM ($1/10^{e_v}$) et de la soude 300mM ($1/10^{e_v}$) est coulé.

- Un aliquot de l'échantillon correspondant à une radioactivité de 4000 à 7000 cpm est repris en tampon NaOH 50mM, EDTA 1mM et déposé en même temps qu'un marqueur de taille moléculaire.

- La migration a lieu une nuit à 15V

- Le gel est ensuite fixé 2 fois 15mn en acide trichloroacétique à 7%. Il est séché et mis en autoradiographie à -80°C.

- Après révélation, ce gel est coloré dans 200ml d'eau, 5ml de Tris-HCl 2M pH 7,0 et 100µl de bromure d'éthidium, pour mettre en évidence les témoins de masse moléculaire.

PREPARATION DES BANQUES D'ADNc EN BACTERIOPHAGES

Les conditions de préparation des banques sont celles préconisées par MANIATIS et coll (1982) (115) et modifiées par Amersham. Le conditionnement du kit de clonage est tel que la réaction se fait dans un seul tube.

Les différents réactifs sont successivement ajoutés :

- la méthylation a lieu à 37°C pendant 1 heure
- la ligation est réalisée à 15°C pendant 20 heures (ADN ligase T₄)
- la digestion Eco RI a lieu à 37°C pendant 5 heures
- les enzymes sont inactivés à 70°C pendant 10 minutes
- la radioactivité permet de suivre les ADNc pourvus d'adaptateurs à bouts cohésifs

- l'excès d'adaptateurs est éliminé sur des colonnes équilibrées en tampon "STE" pH 7,5, l'élution se fait en tampon "STE" et l'éluat est collecté en tubes. Chacun des tubes est compté en radioactivité. Les fractions majeures sont précipitées par 1/10^ev d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5v d'éthanol. Elles sont centrifugées et les culots contenant les ADNc sont redissous en tampon "STE".

- Lors de la ligation 50, 75 et 100ng ou 60 et 120ng d'ADNc ont été utilisés pour le phage λ gt10 ou λ gt11. La ligation est réalisée à 15°C, 20 heures.

- Le contenu des tubes est précipité (acétate de sodium et éthanol) et repris en tampon TE.

- Les vecteurs sont encapsidés par addition d'une solution d'extraits protéiques d'enveloppe de bactériophages (pro-têtes).

- La réaction est arrêtée en tampon "TMG" et chloroforme.

- La radioactivité a été déterminée par effet CERENKOV. Des comptages sont réalisés au cours des différentes étapes (avant méthylation, après élimination de l'excès d'adaptateurs mais avant précipitation éthanolique, après précipitation éthanolique, après ligation mais avant précipitation, après ligation et après précipitation. Ces comptages permettent de suivre le bon déroulement de la réalisation de la banque.

ETALEMENT SUR MILIEU DE CULTURE SOLIDE

- Les souches bactériennes hôtes d'E. Coli L87 et NM514 sont mises à croître en milieu LB maltose 0,4% ; la souche Y1088 croît en LB + ampicilline (50µg/ml) + maltose 0,4%.

Après croissance des bactéries et dilution des milieux réactionnels d'encapsulation (bactériophages) en tampon TMG, le contact est réalisé pendant 15 minutes à 37°C. Ils sont ensuite repris en agarose liquide et coulés sur milieu solide LB-Agar.

La composition et la reconstitution des différents milieux (LB, LB-Agar, Top-Agarose) et tampons (STE, TMG) est décrite par MANIATIS et coll (1982) (115)

LB liquide :

Bacto tryptone DIFCO	10g	eau stérile QSP	1l
Extrait de levure	5g	ajusté à pH voisin de 7 (soude)	
Chlorure de sodium	5g		

LB Agar :

LB liquide stérilisé auquel a été rajouté du Bacto Agar DIFCO à raison de 15g/l.

Tampon STE (Sodium-Tris-EDTA)

NaCl 100mM, Tris/HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM. Le tout est ajusté à pH 7,5 (HCl) et autoclavé.

Tampon TMG (Tampon-Magnésium-Gélatine)

NaCl 5,8g, MgSO₄ 1M pH 7,5 sous 1 volume de 5ml ; de la gélatine à 2% : 5ml, eau QSP 1 litre et autoclavage.

Dans le cas du bactériophage λ gt11 de l'IPTG 1mM et du X-Gal 0,02% sont ajoutés dans le TOP-Agarose.

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)

100mM (23,8mg/ml dans l'eau) préparation extemporanée

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside) à 2% dans le diméthyl formamide, préparation extemporanée.

CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADNc DE MUQUEUDE TRACHEALE DE PORC A L'AIDE DE LA SONDE NUCLEOTIDIQUE

- La souche bactérienne (NM514) est cultivée à 37°C 4 heures et les bactéries sont préparées en MgSO₄ 10mM.

- Bactéries et bactériophages sont mis en contact 15 minutes à 37°C, le mélange est étalé sur boîte. Après incubation une nuit à 37°C, les bactériophages sont transférés sur des nitrocelluloses repérées. Les

nitrocelluloses sont mises en dénaturation puis en tampon de neutralisation. Elle subissent une cuisson à 80°C pendant 2 heures pour permettre la fixation de l'ADN. Les nitrocelluloses sont mises en "préhybridation" à 42°C pendant 24 heures. Le tampon contient du SSC 6X, de l'ADN de sperme de saumon, du "DENHARDT 5 ou 10X". Il y a absence ou présence de 0,2% de SDS. L'oligonucléotide marqué est ajouté à raison de 40µCi. L'hybridation a lieu une nuit de 37°C à 55°C. Les lavages sont réalisés à 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C en présence ou en l'absence de SDS 0,1% en tampon SSC 6X, puis 4X puis 2X, 1X, 0,1X et cela pendant 10 minutes. Ces lavages sont faits manuellement et sous légère agitation.

CRIBLAGE DE BANQUES A L'AIDE DE SONDAS IMMUNOLOGIQUES

- Les boîtes où bactéries (Y1088 et Y1090) et bactériophages ont été mis en contact sont incubées 3 heures à 42°C.

- Des nitrocelluloses saturées par l'IPTG vont servir de support de transfert des protéines synthétisées la nuit à 37°C par la souche bactérienne lors de l'infection par le bactériophage λ gt11 (YOUNG et DAVIS, 1983a, b) (201,202).

- Ces nitrocelluloses subissent ensuite un lavage en tampon TBS (Tris 50mM, pH 8, NaCl 0,15M), SVF 20% pendant 30 minutes.

- Elles sont mises en contact avec les anticorps primaires (4 heures) puis secondaires (1 heure) dilués en tampon TBS, SVF 20%. Ces anticorps secondaires sont des anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin, ils sont marqués à la peroxydase. Entre chaque contact, ces nitrocelluloses subissent 3 lavages de 7 minutes en tampon TBS, TBS NP40 0,1%, TBS.

- La réaction colorée (chloronaphtol et eau oxygénée) obtenue est bleu-violacée, elle est stoppée par immersion des nitrocelluloses dans l'eau.

- Les populations (clones) positives apparaissent sous forme d'anneaux où la coloration est plus intense à la périphérie. Elles objectivent indirectement une réaction entre l'anticorps primaire et la protéine antigène synthétisée par la souche Y1090 sous le contrôle du bactériophage λ gt11 dans lequel est inséré un fragment susceptible de coder pour la synthèse d'un peptide de "type mucine".

- Grâce aux repères portés sur les nitrocelluloses, les clones réagissant positivement sont repiqués (cure-dents) au niveau des boîtes et conservés (tampon TMG + chloroforme). Une amplification de la réponse est tentée et obtenue lors d'un nouveau tour de criblage.

PURIFICATION, A PARTIR DE L'IMMUNSERUM POLYCLONAL ANTI-MUCINE TRACHEALE HUMAINE
DEGLYCOSYLEE, DES ANTICORPS SPECIFIQUES DE CHAQUE CLONE

La technique se confond, en un premier temps, avec un criblage immunologique en vecteur λ gt11, mais elle en diffère après l'incubation avec l'immunsérum dilué. Les rondelles de nitrocellulose sont traitées comme suit :

- lavage 7 minutes en tampon TBS
- lavage 7 minutes en tampon TBS + NP40 à 0,1%
- lavage 7 minutes en tampon TBS

Les rondelles sont alors mises en présence d'un tampon d'élution (Tris-HCl 10mM pH 7,6 $MgCl_2$ 4M, sérum albumine bovine 1%) comme décrit par TIMPTE et coll (1988) (186). Après rinçage des rondelles pour ce même tampon, le produit de décrochage est dialysé contre du Tris-HCl 10mM pH8, NaCl 0,15M, EDTA 1mM, Triton X100 0,1%. Les anticorps récupérés sont testés sur coupes histologiques de muqueuses trachéales et de muqueuse colique humaine.

CARACTERISATION DES CLONES SELECTIONNES (amplification en milieu liquide)

- La souche bactérienne Y1088 est préparée la veille du contact par deux étapes de croissance en milieu LB + Ampicilline 50 μ g/ml.
- Une fraction de la souche bactérienne est mise en contact avec les bactériophages contenant chacun des fragments.
- Ces populations de phages ont été prélevées directement au niveau du milieu solide.
- Le contact bactéries-bactériophages a lieu à 37°C pendant 15mn.
- L'ensemble est alors dilué de moitié à l'aide de LB + magnésium à 37°C.
- La lyse est réalisée en 4 heures à 37°C.
- Le milieu est centrifugé 10 minutes à 7000tr/mn et un aliquot du surnageant (3ml) est mis en contact avec de la désoxyribonucléase I et de la ribonucléase. Le contact est réalisé 30 minutes à 37°C.
- Du tampon Tris 1M pH 8,0 puis de l'EDTA 500mM sont ajoutés.
- La dégradation des protéines est obtenue à l'aide de la protéinase K à 37°C.
- Le sarcosyl à 5% est ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,5% (destruction des membranes).
- L'ensemble est mis 30 minutes à 37°C.
- Protéines et enzymes sont éliminés par une extraction phénolique puis deux purifications au chloroforme/alcool isoamylique.

- Chacune des phases supérieures est précipitée par de l'acétate de sodium et de l'alcool éthylique à -80°C. Elles sont alors centrifugées à 10000tr/mn pendant 30 minutes.

- Les différents culots de précipitation sont séchés, repris et dialysés en tampon "TE".

- La digestion Eco RI est réalisée à 37°C pendant 1 heure en tampon de forte salinité.

Un gel d'agarose à 1.5% en tampon borate est utilisé pour l'étude des fragments libérés. La nature du gel et celle du tampon borate est celle proposée par MANIATIS et coll (1982) (115)

Gel d'agarose à 1,5% (60ml) : Agarose 900mg, tampon borate 5X 12ml, bromure d'éthidium 6µl, eau 48ml.

Tampon borate 5X : Acide borique 22,5g, Tris 54g, EDTA 4,65g pH 8,3.

Tampon de cuve : tampon borate 5X 20ml, eau distillée 80ml.

Le reste des préparations des bactériophages après purification est digéré par l'enzyme Eco RI, après migration électrophorétique, les fragments sont récupérés au niveau de l'agarose (scalpel). Ils subissent une électro élution (BIOTRAP, Schleicher et Schuell), ils sont alors dosés au spectrophotomètre et aliquotés.

CLONAGE DES FRAGMENTS ETUDIÉS EN BACTERIOPHAGE M13

- Le bactériophage M13 (6,2Kb) est ouvert par l'enzyme Eco RI après digestion 1 heure à 37°C. Après inactivation de l'enzyme (10mn à 100°C) la coupure Eco RI est contrôlée électrophorétiquement par rapport au témoin M13 entier.

- Le reste de M13 "ouvert" est purifié (chloroforme) et précipité par le mélange acétate de sodium:éthanol.

- Les fragments étudiés sont insérés dans le bactériophage selon les rapports fragments-bactériophages de 1 pour 4 et 1 pour 10, ils sont incubés 1 nuit à 12°C en présence de l'ADN ligase.

- La transformation est réalisée en mettant en contact le produit de ligation avec des bactéries compétentes (TGI) 40 minutes dans la glace puis 1 minute 30 à 42°C.

- Après croissance à 37°C 2 à 3 heures, l'ensemble est repris en Top-Agar 2xTy (Top Agar + 1,6% de bactotryptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl, ainsi que du X-Gal et de l'IPTG) puis déposé sur milieu solide.

- Le lendemain, un certain nombre de clones recombinants (6 à 12) correspondant à chaque préparation sont sélectionnés (sonde spécifique) et amplifiés.

- La souche bactérienne TG₁ est mise en culture une nuit à 37°C et une série de dilutions de cette bactérie est mise en contact avec un certain nombre de bactériophages repiqués au cure-dents sur le milieu solide.

- Le contact bactéries-bactériophages a lieu 5 à 7 heures à 37°C et sous agitation douce.

- Le mélange est centrifugé 10 minutes à 4200tr/mn.

- Chacun des surnageants est mélangé à du NaCl 2,5M et du PEG à 20%. Il est mélangé par retournements et laissé 30 minutes à température du laboratoire.

- Il subit une centrifugation de quelques secondes à 12000tr/mn à l'issue de laquelle le surnageant est éliminé (trompe à vide).

- Une alternance de centrifugations de quelques secondes et d'aspirations permet d'éliminer le surnageant.

- L'ultime étape pour enlever toute trace liquide est l'utilisation d'un tube capillaire.

- Chaque culot est dissous en tampon TE. Du phénol est ajouté

- Le mélange est laissé 15 minutes à température du laboratoire.

- Une partie de la phase supérieure phénolique est ajoutée à des tubes contenant de l'acétate de sodium et de l'éthanol absolu.

- L'ensemble est centrifugé 30 minutes à 12000tr/mn.

- Le surnageant est éliminé.

TRANSFORMATION DES INSERTS PLASMIDIQUES EN SONDAS RADIOACTIVES

Les fragments sont transformés en sondes selon la technique de la "nick translation" décrite par DAVIS et coll (1986) (29). Cette technique permet d'intégrer un nucléotide tri-phosphate radioactif au niveau de l'ADN non marqué. La réaction proprement dite dépend de la faculté de l'ADN polymérase I à initier la synthèse de l'ADN à partir d'extrémités 3'OH libres générées lors de la formation de trous ou "nicks" au niveau de l'ADN. Ces trous sont créés au hasard par une digestion limitée de l'ADN à marquer à l'aide de la désoxyribonucléase I. La polymérase synthétise alors un nouvel ADN dans le sens 5' vers 3' en utilisant un nucléotide tri phosphate marqué. Les fragments (300ng dans 3µl) sont mis en contact avec de l'eau (8µl), des désoxynucléotides froids (1/5è du volume final) et d'un dNTP [α -³²P]. L'enzyme est ajoutée (1/10è du volume final) et la réaction est réalisée à 14°C pendant 2 heures.

PURIFICATION DES SONDÉS

- Elle est réalisée par chromatographie en Séphadex G50.
- La phase (G50) puis le tampon d'éluion contenant de l'EDTA, du Tris, du SDS et du NaCl, sont ajoutés.
- La sonde est colorée au rouge de phénol et déposée. La séparation de la sonde et des dNTPs libres est suivie au compteur Geiger. La sonde est progressivement éluee du gel alors que les dNTPs restent dans la partie supérieure de la colonne. Les sondes sont récupérées, dénaturées en présence de soude 300mM, 10 minutes à température du laboratoire. Un volume d'acide chlorhydrique 3M est ajouté de façon à obtenir une molarité finale en soude de 50mM. Un aliquot de la sonde est compté en radioactivité :
tampon d'éluion des sondes : NaCl 3M 50ml, EDTA 500mM 20ml, Tris M pH 7,5 50ml, SDS 10% 10ml, eau QSP 1l.

PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES EN VUE DE LA TRANSFORMATION (HANAHAN, 1983) (57)

- La souche bactérienne Hb101 est relancée en milieu nutritif (SOB : bactotryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 10mM et MgSO₄ 10mM). Elle est ensuite mise 15 minutes dans la glace et un aliquot est centrifugé.
- Le culot est repris très délicatement par du TMN 0,15 (Tris 10mM pH 8,0, MgSO₄ 10mM et NaCl 0,15M) et une série de centrifugations (2300tr/mn, 4°C, et 8 minutes) permet d'éliminer le milieu de culture bactérien.
- Le culot bactérien est mis en contact avec du TFB (RbCl 100mM, MnCl₂ 45mM, CaCl₂ 50mM et THC 3mM) + MES 1M ajouté à pH 6,3, avec de la potasse 5M diluée au 1/100è).
- Au niveau membranaire de la bactérie, les lipides sont solubilisés (DMSO) et des brèches sont provoquées au niveau de la fraction protéique (DTT 2,25M + acétate de potassium 40mM pH 6).
- Ces bactéries sont alors compétentes.

TRANSFORMATION DES BACTERIES COMPETENTES

Les fragments purifiés antérieurement ont été ligués (ADN ligase T₄) au plasmide pBR322 (4,362Kb) à raison de 3 moles pour 1 mole de vecteur et ceci à 14°C pendant une nuit.

Le produit de ligation est mis en contact avec les bactéries compétentes pendant 30 minutes dans la glace puis il subit un choc thermique à 42°C pendant 1 minute 30 secondes très précises.

Les bactéries transformées croissent ensuite en milieu liquide pendant 2 heures à 37°C. Elles sont enfin étalées sur boîtes en milieu LB-Agar-ampicilline 25µg/ml et la croissance a lieu à 37°C la nuit.

AMPLIFICATION ET PURIFICATION DU PLASMIDE pBR322

Après une phase d'amplification 85mg de chloramphénicol sont ajoutés et ceci pour un volume de 500ml de culture bactérienne. Le milieu est incubé 12 heures à 37°C sous agitation forte (blocage de la synthèse des protéines). Ce milieu bactérien est alors centrifugé 10 minutes à 6000tr/mn et à 4°C. Le culot est repris par 10ml de tampon "GTE" (glucose 50mM, tris 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8,0). Après dissolution du culot, 2 ml de lysozyme en solution à 10mg/ml dans le GTE sont ajoutés et laissés 10 minutes dans la glace. 40ml de NaOH 0,2N, SDS 1% sont ajoutés et le milieu est laissé dans la glace puis 20ml d'acétate de potassium sont ajoutés. Après 15 minutes dans la glace le milieu est centrifugé 10 minutes à 10000tr/mn (J21 Beckman). Le surnageant est filtré sur grosse seringue et laine de verre. On lui ajoute 50 ml d'isopropanol. Après une centrifugation de 10 minutes à 5000tr/mn, le culot est repris par 7ml de tampon TE. Le milieu est neutralisé par 300µl de Tris2M, 100µl de BEt et 10g de chlorure de césium sont ajoutés. Ce mélange subit une ultracentrifugation à 63000tr/mn pendant 4 heures à 16°C.

La bande d'ADN plasmidique visible est récupérée à la seringue et le BEt est éliminé dans un volume d'isopropanol alors que la phase inférieure est dialysée 24 heures contre du tampon TE.

L'adialysable est incubé 30 minutes à 37°C en présence de ribonucléase A (0,1mg/ml) qui sera ensuite éliminée par

- 1 volume de phénol(centrifugation 5 minutes à 2000tr/mn)
- 1 volume de phénol/chloroforme (v/v) et une centrifugation identique
- 1 volume de chloroforme et une nouvelle centrifugation.

On trouve alors, dans le surnageant l'ADN plasmidique qui sera précipité par 1/10^è de volume d'acétate de sodium 2M pH5,5 et 2 volumes d'éthanol à -20°C. La centrifugation qui suit est réalisée à 11000tr/mn pendant 30 minutes.

Le culot repris en tampon TE voit sa qualité et sa quantité contrôlées spectrophotométriquement par lecture de 220 à 300nm.

L'extraction du fragment à partir du plasmide est en tous points semblable à une extraction d'un fragment d'origine phagique. Le marquage du fragment a été décrit antérieurement.

°00°

BIBLIOGRAPHIE

°00°

- 1 - ALLEN A., SNARY D. (1972)
The structure and function of gastric mucus.
Gut 13, 666-672. (8)

- 2 - ALLEN A., PAIN R.H., ROBSON T.R. (1976)
Model for the structure of the gastric mucous Gel.
Nature 264, 88-89. (28)

- 3 - ALLEN A. (1978)
Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus.
Brit. Med. Bull. 34, 28-33. (28,29)

- 4 - ALLEN A., BELL A., MANTLE M., PEARSON J.P. (1982)
The structure and physiology of gastrointestinal mucus.
Adv. Exp. Med. Biol. 144, 115-133. (28,31)

- 5 - ALLEN A. (1983)
Mucus - A protective secretion of complexity.
Trend.Biochem. Sci. 8, 169-173. (28)

- 6 - AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. (1976)
Carbohydrate peptide linkage in glycoproteins.
Arch. Biochem. Biophys. 175, 410-418. (113)

- 7 - AVIV H., LEDER P. (1972)
Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412. (88)

- 8 - BAILLEUL V., RICHEL C., HAYEM A., DEGAND P. (1977)
Propriétés rhéologiques des sécrétions bronchiques : mise en évidence et rôle de polypeptides riches en proline (PRP).
Clin.Chim.Acta. 74, 115-123. (5)

- 9 - BALLAND A., COURTNEY M., JALLAT S., TESSIER L.H., SONDERMEYER P., DE LA SALLE H. HARVEY R., DEGRYSE E., TOLSTOSHEV. P. (1985)
Use of synthetic oligonucleotides in gene isolation and manipulation.
Biochimie 67, 725-736. (86)

- 10 - BARA J., GAUTIER R., LE PENDU J., ORIOL R. (1988)
Immunochemical characterization of mucins. Polypeptide (M₁) and polysaccharide (A and Le^b) antigens.
Biochem. J. 254, 185-193. (84)
- 11 - BAYER E.A., SKUTELSKY E., WILCHEK M., (1979)
The avidin-biotine complex in affinity cytochemistry.
Methods Enzymol. 62, 308-315. (102)
- 12 - BEWLEY T.A., SAIRAM M.R. (1985)
Conformation, and dissociation-recombination of chemically deglycosylated ovine lutropin.
Int. J. Peptide Protein Res. 26, 612-620. (40)
- 13 - BHASKAR K.R., REID L. (1981)
Application of density gradient methods for the study of mucus glycoprotein and other macromolecular components of the sol and gel phases of asthmatic sputa.
J. Biol. Chem. 256, 7583-7589. (1,11,17,19)
- 14 - BHAVANANDAN V., HEGARTY J.D. (1987)
Identification of the mucus core protein by cell free translation of messenger RNA from bovine submaxillary glands.
J. Biol. Chem. 262, 5913-5917. (85)
- 15 - BHUSHANA RAO K.S.P., MASSON P.L. (1977)
A tentative model for the structure of bovine oestrus cervical mucin.
In : "Mucus in health and disease "(ELSTEIN M., PARKE D.V., Eds)
Plenum Press, New-York and London, 275-282. (14)
- 16 - BREG J., VAN HALBEEK H., VLIAGENTHART J.F.G., LAMBLIN G., HOUVENAGHEL M.C., ROUSSEL P. (1987)
Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis.
Eur. J. Biochem. 168, 57-68. (24)

17 - BREG J., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G., Klein A., Lamblin G., Roussel P. (1988)

Primary structure of neutral oligosaccharides of a patient suffering from bronchoectasis, determined by combination of 500 MHz ¹H NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis. 2- Structure of the 19 oligosaccharides having the GlcNAc (1 3) GalNAc-ol core (type 3) or the Gal B(1 3) GlcNAc B 1 6 GalNAc-ol core (type 4).

Eur. J. Biochem. 171, 643-654. (24)

18 - Briand G. (1981)

Histone H₅ d'érythrocyte de poulet.

Thèse Doct. Sci., Lille. (T-8)

19 - Brockhausen I., Matta K.L., Orr J., Schachter H. (1985)

Mucin synthesis - UDP-GlcNAc : GalNAc-R 3-N-acetylglucosaminyl transferase and UDP-GlcNAc : GlcNAc 1-3 GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) 6-N-acetylglucosaminyltransferase from pig and rat colon mucosa.

Biochemistry 24, 1866-1874. (19)

20 - Burchell J., Gendler S., Taylor-Papadimitriou J., Girling A., Lewis A., Millis R., Lampton D. (1987)

Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin.

Cancer Res. 47, 5476-5482. (84,85)

21 Byrd J.C., Lampton D.T.A., Siddiqui B., Kuan S. F., Erickson R., Itzkowitz S. H., Kim Y.S. (1989)

Deglycosylation of mucin from LS174T colon cancer cells by hydrogen fluoride treatment.

Biochem.J. 261, 617-625. (86)

22 - Carlson D.M. (1968)

Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins.

J. Biol. Chem. 243, 616-626. (3,22,24)

23 - Carlsson H.E., Sundblad G., Hammarstrom S., Lonngren J. (1978)

Structure of some oligosaccharides derived from rat intestinal glycoproteins.

Carbohydr. Res. 64, 181-188. (22)

24 - CARLSTEDT I., LINDGREN H., SHEEHAN J.K., ULMSTEN U., WINGERUP L. (1983)

Isolation and characterization of human cervical-mucus glycoproteins.
Biochem. J. 211, 13-22. (6,8)

25 - CHANDRASEKARAN E. V., RANA S.S., DAVILA M., MENDICINO J. (1984)

Structures of the oligosaccharide chains in swine trachea mucin glycoproteins.
J. Biol. Chem. 259, 12908-12914. (24)

26 - CHOU P.Y., FASMAN G.D. (1978)

Empirical prediction of protein conformation.
Ann. Rev. Biochem. 47, 251-276. (113)

27 - COUDRON C., ELLIS K., PHILIPSON L., SCHWARTZ N.B. (1980)

Preliminary characterization of a xylose acceptor prepared by hydrogen fluoride treatment of proteoglycan core protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 618-623. (40)

28 - CREETH J.M., BHASKAR K.R., HORTON J.R., DAS I., LOPEZ-VIDRIERO M.T., REID L. (1977)

The separation and characterization of bronchial glycoproteins by density-gradient methods.
Biochem. J. 167, 557-569. (5,6,7,9,11,13,17,19)

29 - DAVIS L.G., DIBNER M.D., BATTEY J.F. (1986)

Basic methods in : Molecular Biology, Elsevier, 80-83. (T-25)

30 - DEGAND P., HAVEZ R., BISERTE G. (1972)

Séquence en acides aminés au voisinage du point d'attache d'un glycopeptide de mucine bronchique humaine.
C.R. Acad. Sci. 275, 491-493. (14,15,41)

31 - DEGAND P., ROUSSEL P., LAMBLIN G., DURAND G., HAVEZ R. (1973a)

Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration.
I - Définition biochimique des mucines dans l'expectoration.
Bull. Physio-Pathol. Resp. 9, 199-216. (4,6,7,9,14,14,41)

- 32 - DEGAND P., ROUSSEL P., LAMBLIN G., HAVEZ R. (1973b)
Purification et étude des mucines de kystes bronchogéniques.
Biochim. Biophys. Acta 320, 318-330. (4,T-1)
- 33 - DEGAND P., RUFFIN P., LAMBLIN G., HAVEZ R. (1973c)
Etude en ultracentrifugation de deux mucines bronchiques humaines.
C.R. Acad. Sci. 276, 113-116. (6,7,9)
- 34 - DEGAND P., ROUSSEL P., LAMBLIN G. (1974)
Définition des mucines synthétisées au niveau des kystes bronchogéniques.
Clin. Chim. Acta 50, 223-236. (4,33,T-1)
- 35 - DE LUCA L., SCHUMACHER M., WOLF G. (1970)
Biosynthesis of a fucose-containing glycopeptide from rat small intestine in normal and vitamin A- deficient conditions.
J. Biol. Chem. 245, 4551-4558. (13)
- 36 - DEMAILLE J. (1979)
Communication personnelle. (T-4)
- 37 - DUA V.K., DUBE V.E., BUSH A. (1984)
The combination of normal-phase and reverse-phase high pressure liquid chromatography with NMR for the isolation and characterization of oligosaccharide-alditols from ovarian cyst mucins.
Biochim. Biophys. Acta 802, 29-40. (24)
- 38 - ECKHARDT A.E., TIMPTE C.S., ABERNETHY J.L., HILL R.L. (1986)
Porcine submaxillary gland apomucin has some unusual structural properties.
Fed. Proc. 45, 1818. (26)
- 39 - ECKHARDT A.E., TIMPTE C.S., ABERNETHY J.L., TOUMADJE A., JOHNSON N.C.Jr, HILL R.L. (1987)
Structural properties of porcine submaxillary gland apomucin.
J. Biol. Chem. 262, 11339-11344. (14,15,16,26)
- 40 - EDGE A.S.B., FALTYNEK C.R., HOF L., REICHERT Jr L.E., WEBER P. (1981)
Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethane sulfonic acid.
Anal. Biochem. 118, 131-137. (4,32,41)

41 - EDMAN P. (1956)

On the mechanism of the phenyl-isothiocyanate degradation of peptides.

Acta. Chem. Scand. 10, 761-768. (71)

42 - EDMAN P. (1970)

In : Molecular Biology Biochemistry and Biophysics (NEEDLEMAN S.B., Ed.), Springer Verlag, New-York, 211-255. (T-4)

43 - FELDHOFF P.A., BHAVANANDAN V.P., DAVIDSON E.A. (1979)

Purification, properties and analysis of human asthmatic bronchial mucin.

Biochemistry 18, 2430-2436. (1,6,7,11,17,26)

44 - FORSTNER J.F. (1978)

Intestinal mucins in health and disease.

Digestion 17, 234-263. (22)

45 - GENDLER S.J., BURCHELL J.M., DUHIG T., LAMPORT D., WHITE R., PARKER M., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. (1987)

Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6060-6064. (85,86)

46 - GENDLER S., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., DUHIG T., ROTHBARD J., BURCHELL J. (1988)

A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats.

J. Biol. Chem. 263, 12820-12823. (109,120)

47 - GINSBURG V., NEUFELD E.F. (1969)

Complex heterosaccharides of animals.

Ann. Rev. Biochem. 38, 371-388. (3)

48 - GLASSMANN J.N.S., TODD C.W., SHIVELY J.E. (1978)

Chemical deglycosylation of carcinoembryonic antigen for amino acid sequence studies.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 209-216. (40)

- 49 - GLISIN V., CRKVENJAKOV R., BYUS C. (1974)
Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation.
Biochemistry 13, 2633-2637. (87)
- 50 - GNIEWEK R.A., MERRYMAN L.S., KUROWSKY A. (1984)
*Reaction of human fibronectin and fibronectin fragments with trifluoro-
methane sulfonic acid.*
Fed. Proc. 43, 3616. (40)
- 51 - GOLD D.V., MILLER F. (1974)
Characterization of human colonic mucoprotein antigen.
Immunochemistry 11, 369-375. (18)
- 52 - GOLD D.V., SHOCHAT D., MILLER F. (1981)
*Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two
immunochemically distinct mucins.*
J. Biol. Chem. 256, 6354-6358. (12,13,19)
- 53 - GRAHAM R.C., KARNOVSKY, M.J. (1966)
J. Histochem. Cytochem. 14, 291. (T-13)
- 54 - GRIFFITHS A.B., BURCHELL J., GENDLER S.J., LEWIS A., BLIGHT
K., TILLY R., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. (1987)
*Immunological analysis of mucin molecules expressed by normal and
malignant mammary epithelial cells.*
Int. J. Cancer. 40, 319-327. (84)
- 55 - GUBLER U., HOFFMAN B.J. (1983)
A simple and very efficient method for generating cDNA libraries.
Gene 25, 263-269. (89,91)
- 56 - GUM J.R., BYRD J.C., HICKS J.W., TORIBARA N.W., LAMPORT
D.T.A., KIM Y.S. (1989)
*Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and
evidence for genetic polymorphism.*
J. Biol. Chem. 264, 6480-6487. (85,86,109,120)
- 57 - HANAHAN D. (1983)
Studies on transformation of Escherischia Coli with plasmids.
J. Mol. Biol. 166, 557-580. (T-26)

58 - HANAHAHAN D., MESELSON M. (1983)

Plasmid screening at high colony density.

Methods Enzymol. 100, part B, 333-342. (101)

59 - HARBITZ O., JENSSEN A.O., SMIDSRØD O. (1980)

Quantitation of proteins in sputum from patients with chronic obstructive lung disease. I- Determination of immunoglobulin A.

Eur. J. Resp. Dis. 61, 84-94. (5)

60 - HARDING S.E., ROWE A.J., CREETH J.M. (1983)

Further evidence for a flexible and highly expanded spheroidal model for mucus glycoproteins in solution.

Biochem. J. 209, 893-896. (9,25)

61 - HASHIMOTO Y., TSUIKI S., NISHIZAWA K., PIGMAN W. (1963)

Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 233. (14)

62 - HATCHER V.B., SCHWARZMANN G.O.H., JEANLOZ R.W., McARTHUR J.W. (1977)

Purification, properties and partial structure elucidation of a high-molecular-weight glycoprotein from cervical mucus of the bonnet monkey (Macaca radiata).

Biochemistry 16, 1518-1524. (14)

63 - HAVÉZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., BISERTE G. (1967)

Etude des structures fibrillaires de la sécrétion bronchique humaine.

Clin. Chim. Acta 17, 281-295. (5)

64 - HAVÉZ R., ROUSSEL P., DEGAND P., LAMBLIN G. (1973)

Eléments de structure et activités biologiques des mucines bronchiques.

In : Exp. Ann. Biochim. Med. 32, 121-148, Masson et Cie, Ed. (7,9,14)

65 - HAYEM A., DEGAND P. (1980)

Some biological components of bronchial mucus in relation to rheological properties.

Eur. J. Resp. Dis. 61 S, 27-31. (5)

66 - HAYMERLE H., HERZ J., BRESSAN G.M., FRANCK R., STANLEY K.K. (1986)

Efficient construction of cDNA libraries in plasmid expression vectors using an adaptor strategy.

Nucleic Acids Res. 14, 8615-8624. (92,94)

67 - HELENIUS A., SIMONS K. (1975)

Solubilisation of membranes by detergents.

Biochim. Biophys. Acta 415, 29-79. (65)

68 - HERMANN J., TITANI K., ERICSSON L.H., WADE R.D., NEURATH H., WALSH K.A. (1978)

Amino-acid sequence of two cyanogen bromide fragments of glycogene phosphorylase.

Biochemistry 17, 5672-5679. (T-8)

69 - HERZBERG M.C., LEVINE M.J., ELLISON S.A., TABAK L.A. (1979)

Purification and characterization of monkey salivary mucin.

J. Biol. Chem. 254, 1487-1494. (8,12,13,26)

70 - HERZBERG V.L., GRIGORESCU F., EDGE A.S.B., SPIRO R.G., KAHN R. (1985)

Characterization of insulin receptor carbohydrate by comparison of chemical and enzymatic deglycosylation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 789-796. (40)

71 - HILKENS J., BUIJS F., HILGERS J., HAGEMAN P., CALAFAT J., SONNENBERG A., VAN DER VALK M. (1984)

Monoclonal antibodies against human milkfat globule membrane detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors.

Int. J. Cancer 34, 197-206. (83,84)

72 - HILKENS J., KROEZEN V., BONFRER J.M.G., DE JONG BAKKER M., BRUNING P.F. (1986)

MAM-6 Antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring.

Cancer Res. 46, 2582-2587. (84)

73 - HILKENS J., BUIJS F. (1988)

Biosynthesis of MAM-6 an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem. 263, 4215-4222. (95)

74 - HILL H.D., REYNOLDS J.A., HILL R.L. (1977a)

Purification, composition, molecular weight and subunit structure of ovine submaxillary mucin.

J. Biol. Chem. 252, 3791-3798. (6,8,9,10,12,26)

75 - HILL H.D., SCHWYZER M., STEINMAN H.M., HILL R.L. (1977b)

Ovine submaxillary mucin primary structure and peptides substrates of UDP-N-Acetylgalactosamine-mucine transferase.

J. Biol. Chem. 252, 3799-3804. (14,15,16,26)

76 - HO J.J.L., CHUNG Y-S., FUJIMOTO Y., BI N., RYAN W., YUAN S-Z., BYRD J.C., KIM Y.S. (1988).

Mucin-like antigens in a human pancreatic cancer cell line identified by mucine monoclonal antibodies SPan-1 and YPan-1.

Cancer Res. 48, 3924-3931. (84)

77 - HOUDRET N., LE TREUT A., LHERMITTE M., LAMBLIN G., DEGAND P., ROUSSEL P. (1981)

Comparative action of reducing agents on fibrillar human bronchial mucus under dissociating and non-dissociating conditions.

Biochim. Biophys. Acta 668, 413-419. (10,11,17,115)

78 - HOUDRET N., PERINI J.M., GALABERT C., SCHARFMAN A., HUMBERT P., LAMBLIN G., ROUSSEL P. (1986)

The high lipid content of respiratory mucin in cystic fibrosis is related to infection.

Biochim. Biophys. Acta 880, 54-61. (5)

79 - HOUNSELL E.F., FEIZI T. (1982)

Gastrointestinal mucins : structure and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease.

Med. Biol. 60, 227-236. (19)

80 - HOUNSELL E.F., LAWSON A.M., FEENEY J., GOOI H.C., PICKERING N.J., STOLL M.S., LUI S.C., FEIZI T. (1985)

Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens.

Eur. J. Biochem. 148, 367-377. (22)

81 - HUYNH T.V., YOUNG R.A., DAVIS R.W. (1985)

In : DNA cloning, a practical approach, Chapter 2 : Constructing and screening cDNA libraries in gt10 and gt11, 49-78. (96)

82 - IWAI K., ANDO T. (1967)

N O Acyl rearrangement.

Methods. Enzymol. 11, 263-282. (32,40)

83 - JABBAL I., KELLS D.I.C., FORSTNER G., FORSTNER J. (1976)

Human intestinal goblet cell mucin.

Can J. Biochem. 54, 707-716. (18)

84 - JENSSEN A.O., HARBITZ O., SMIDSROD O. (1980)

Electron microscopy of mucin from sputum in chronic obstructive bronchitis.

Eur. J. Respir. Dis. 61, 71-76. (6,7,9,25)

85 - JONES R.A. (1976)

Applications of phase transfert-catalysis in organic synthetis.

Aldrichimica Acta. 9, 35-45. (50)

86 - JONES R., REID L. (1978)

Secretory cells and their glycoproteins in health and disease.

Brit. Med. Bull. 34, 9-16. (6)

87 - KALYAN N.K., BAHL O.P. (1981)

Effect of deglycosylation on the subunit interactions and receptor binding activity of human chorionic gonadotropin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 1246-1253. (40)

88 - KALYAN N.K., BAHL O.P. (1983)

Role of carbohydrate in human chorionic gonadotropin. Effect of deglycosylation on the subunit interaction and on its "in vitro" and "in vivo" biological properties.

J. Biol. Chem. 258, 67-74. (40)

89 - KARLSSON S., SWALLOW D.M., GRIFFITHS B., CORNEY G., HOPKINSON D. (1983)

A genetic polymorphism of a human urinary mucin.

Ann. Hum. Genet. 47, 263-269. (84)

90 - KEUTMAN H.T., Mc ILROY P.J., BERGERT E.R., RYAN R.J. (1983)

Chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin subunits : characterization and biological properties.

Biochemistry 22, 3067-3072. (40)

91 - KIM Y.D., ROBINSON D .Y, TOMITA J.T. (1988).

Monoclonal antibody PR92 with restricted specificity for tumor-associated antigen of prostate and breast carcinoma.

Cancer Res. 48, 4543-4548. (84)

92 - KLEIN A. (1988)

Chaînes glycaniques neutres et sialylées de mucines bronchiques humaines sécrétées aux cours des bronchopathies chroniques.

Thèse Doct. Univ. Lille. (25)

93 - KLEIN A., LAMBLIN G., LHERMITTE M., ROUSSEL P., BREG J., VAN HALBEEK J., VLIAGENTHART J.F.G. (1988)

Primary structure of neutral oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis determined by combination of 500 MHz-¹H-. NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis : 1 Structure of 16 oligosaccharides having the Gal (1 3) GalNAc-ol core (type 1) or the Gal 1 3 (GlcNAc 1 6) GalNAc-ol core (type 2) .

Eur. J. Biochem. 171, 631-642. (24)

94 - KORNFELD R., KORNFELD S. (1976)

Comparative aspects of glycoprotein structure.

Ann. Rev. Biochem. 45, 217-238. (3)

95 - KOTLAR H.K., HARBITZ O., JENSSEN A.O., SMIDSRØD O (1980)
Quantitation of proteins from patients with chronic obstructive lung disease. II - Determination of albumin, transferrin, γ -acid glycoprotein, IgG, IgM, lysozyme and C₃ complement factor.
Eur. J. Resp. Dis. 61, 233-239. (5)

96 - LAEMMLI U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 .
Nature 227, 680-681. (52,T-17)

97 - LAFITTE J.J., LAMBLIN G., LHERMITTE M., HUMBERT P., DEGAND P., ROUSSEL P. (1977)
Etude des glycoprotéines bronchiques humaines de type mucique obtenues par lavage de bronches macroscopiquement saines.
Carbohydr. Res. 56, 383-389. (4,11,17)

98 - LAMBLIN G., HUMBERT P., DEGAND P., ROUSSEL P. (1977)
Hétérogénéité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques acides isolées à partir de deux sujets atteints de bronchite chronique.
Clin. Chim. Acta 79, 425-436. (22)

99 - LAMBLIN G., LHERMITTE M., DEGAND P., ROUSSEL P., SLAYTER H.S. (1979)
Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins.
Biochimie 61, 23-43. (6,7,9,10,11,17,24,25)

100 - LAMBLIN G., LHERMITTE M., BOERSMA A., ROUSSEL P., REINHOLD V. (1980)
Oligosaccharides of human bronchial glycoproteins. Neutral di- and trisaccharides isolated from a patient suffering from chronic bronchitis.
J. Biol. Chem. 255, 4595-4598. (22,24)

101 - LAMBLIN G., LHERMITTE M., BOERSMA A., ROUSSEL P., VAN HALBEEK H., DORLAND L., VLIAGENTHART J.F.G. (1981)
Isolation and characterization of neutral oligosaccharides from bronchial glycoproteins of cystic fibrosis patients.
Monogr. Paediatr. 14, 46-49. (22)

102 - LAMONT J.T., VENTOLA A.S. (1980)

Purification and composition of colonic epithelial mucin.

Biochim. Biophys. Acta 626, 234-243. (12,13)

103 - LAN M.S., KHORRAMI A., KAUFMAN B., METZGAR R.S. (1987)

Molecular characterization of a mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. The DU-PAN-2 antigen.

J. Biol. Chem. 262, 12863-12870. (84)

104 - LATHE R. (1985)

Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino-acid sequence data. Theoretical and practical considerations.

J. Mol. Biol. 183, 1-12. (86)

105 - LEHRACH H., DIAMOND D., WOZNEY J.M., BOEDTKER H. (1977)

RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.

Biochemistry 16, 4743. (88)

106 - LENARD J. (1969)

Reactions of proteins, carbohydrates, and related substances in liquid hydrogen fluoride.

Chem. Rev. 69, 625-638. (4,32,38,40,46)

107 - LE TREUT A., LAMBLIN G., HOUDRET N., DEGAND P., ROUSSEL P. (1981)

Reevaluation of the action of reducing agents on soluble mucus glycoproteins from human bronchial secretion.

Biochimie 63, 425-434. (10)

108 - LE TREUT A. (1983)

Les mucines bronchiques humaines. Approche de leur structure macromoléculaire.

Thèse Doct. Sci, Lille. (2)

109 - LHERMITTE M., LAMBLIN G., LAFITTE J.J., ROUSSEAU J., DEGAND P., ROUSSEL P. (1976)

Properties of human neutral bronchial mucins after modification of the peptide or carbohydrate moieties.

Biochimie 58, 367-372. (6,7)

- 110 - LINSLEY P.S., KALLESTAD C., HORN D. (1988a)
Biosynthesis of high molecular weight breast carcinoma associated mucin glycoproteins.
J. Biol. Chem. 263, 8390-8397. (84)
- 111 - LINSLEY P.S.; BROWN J.P, MAGNANI J.L, HORN D. (1988b)
Monoclonal Antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients.
Cancer Res. 48, 2138-2148. (84)
- 112 - LOMBART C.G., WINZLER R.J. (1974)
Isolation and characterization of oligosaccharides from canine submaxillary mucin.
Eur. J. Biochem. 49, 77-86. (12,13)
- 113 - MAKINO M., YAMASHINA I. (1966)
Periodate oxidation of glycopeptides from ovalbumin.
J. Biochem. 60, 262-267. (T-2)
- 114 - MALINOWSKI C.E., HERP A. (1981)
Purification and partial characterization of rat submaxillary mucin.
Comp. Biochem. Physiol. 69, 605-609. (8,10,12)
- 115 - MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982)
Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory.
Cold Spring Harbor, New-York. (T-9,T-16,T-21)
- 116 - MANTLE M., MANTLE D., ALLEN A. (1981)
Polymeric structure of pig small-intestinal mucus glycoprotein.
Biochem. J. 195, 277-285. (6,8,9)
- 117 - MARIANNE T., PERINI J.M., HOUVENAGHEL M.C., TRAMU G., LAMBLIN G., ROUSSEL P. (1986)
Action of trifluoromethane sulfonic acid on highly glycosylated region of human bronchial mucins.
Carbohydr. Res. 151, 7-19. (41,42)
- 118 - MARIANNE T. (1987a)
Les précurseurs polypeptidiques des mucines bronchiques humaines.
Thèse Doct. Sci., Lille. (20,30)

119 - MARIANNE T., PERINI J.M., LAFITTE J.J., HOUDRET N., PRUVOST F.R., LAMBLIN G., SLAYTER H.S., ROUSSEL P. (1987b)

Peptides of human bronchial mucus glycoproteins size determination by electron microscopy and by biosynthesis experiments.

Biochem. J. 248, 189-195. (25,85)

120 - MARSHALL T., ALLEN A. (1978)

The isolation and characterization of the high-molecular-weight glycoprotein from pig colonic mucus.

Biochem. J. 173, 569-578. (8,9)

121 - MASON P.J., WILLIAMS J.G. (1985)

In : Hybridation in the analysis of recombinant DNA, 113. Ed. : HAMES B.D., HIGGINS S.J., IRL Press. (101)

122 - MIKKELSEN A., STOKKE B.T., CHRISTENSEN B.E., ELGSAETER A. (1985)

Flexibility and length of human bronchial mucin studied using low-shear viscometry, birefringence relaxation analysis and electron microscopy.

Biopolymers 24, 1683-1704. (25)

123 - MORT A.J., LAMPORT D.T.A. (1977)

Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins.

Anal. Biochem. 82, 289-309. (32,38)

124 - MURTY V.L.N., DOWNS F.J., PIGMAN W. (1978)

Rat colonic mucus glycoprotein.

Carbohydr. Res. 61, 139-145. (9,12,13)

125 - NASIR-UD-DIN, JEANLOZ R.W., LAMBLIN G., ROUSSEL P., VAN HALBEEK H., MUTSAERS J.H.G.M., VLIEGENTHART J.F.G. (1986)

Structure of sialyl oligosaccharides isolation from bonnet monkey (Macaca radiata) cervical mucus glycoproteins exhibiting multiple blood group activities.

J. Biol. Chem. 261, 1992-1997. (24)

126 - OEMRAWSINGH I., ROUKEMA P.A. (1974)

Isolation, purification and chemical characterization of mucins from human submandibular glands.

Arch. Oral. Biol. 19, 615-626. (8,18)

- 127 - OKAYAMA H., BERG P. (1982)
High-efficiency cloning of full length cDNA.
Mol. Cell Biol. 2, 161-170. (89)
- 128 - OLSON C.A., KRUEGER R., SCHWARTZ N.B. (1985)
Deglycosylation of chondroitin sulfate proteoglycans by hydrogen fluoride in pyridine.
Anal. Biochem. 146, 232-237. (40)
- 129 - OZEKI T., YOSIZAWA Z. (1971)
Arch. Biochem. Biophys. 142, 177. (15)
- 130 - PAXTON R.J., SHIVELY J.E. (1984)
Structural analysis of carcino-embryonic antigen (CEA) and the preparation of a diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) labelled monoclonal antibody against CEA.
Fed. Proc. 43, 3618. (40)
- 131 - PEARSON J., ALLEN A., VENABLES C. (1980)
Gastric mucus : isolation and polymeric structure of the undegraded glycoprotein : its breakdown by pepsin.
Gastroenterol. 78, 709-715. (8)
- 132 - PEARSON J.P., ALLEN A., PARRY S. (1981)
A 70000-molecular-weight protein isolated from purified pig gastric mucus glycoprotein by reduction of disulphide bridges and its implication in the polymeric structure.
Biochem. J. 197, 155-162. (28)
- 133 - PEARSON J.P., KAURA R., TAYLOR W., ALLEN A. (1982)
The composition and polymeric structure of mucus glycoprotein from human gallbladder bile.
Biochim. Biophys. Acta 706, 221-228. (8,9)
- 134 - PEDERSEN C.J. (1971)
Aldrichimica Acta 4, 1-7. (50)
- 135 - PELHAM H.R.B., JACKSON R.J. (1976)
An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocytes lysates.
Eur. J. Biochem. 67, 247-256. (88)

136 - PERINI J.M., MARIANNE T., LAFITTE J.J., LAMBLIN G., ROUSSEL P., MAZZUCA M. (1989)

Use of an antiserum against deglycosylated human mucins for cellular localization of three peptide precursors : antigenic similarities.

J. Histochem. Cytochem. 37, 869-875. (85)

137 - PICOT R., DAS I., REID L. (1978)

Pus, deoxyribonucleic acid and sputum viscosity.

Thorax 33, 235-242. (5)

138 - PIGMAN W., PAYZA N. (1969)

Protides of biological fluids.

H. PEETERS Ed., Pergamon Press, 241. (14)

139 - PIGMAN W., MOSCHERA J., WEISS M., TETTAMANTI G. (1973)

The occurrence of repetitive glycopeptide sequences in bovine submaxillary glycoproteins.

Eur. J. Biochem. 32, 148-154. (1)

140 - PODOLSKY D.K. (1985a)

Oligosaccharides structures of human colonic mucin.

J. Biol. Chem. 260, 8262-8271. (23,24)

141 - PODOLSKY D.K. (1985b)

Oligosaccharides structures of isolated human colonic mucin species.

J. Biol. Chem. 260, 15510-15515. (23,24)

142 - PRAKOBPHOL A., LEVINE M.J., TABAK L.A., REDDY M.S. (1982)

Purification of a low-molecular-weight, mucin-type glycoprotein from human submandibular-sublingual saliva.

Carbohydr. Res. 108, 111-122. (12)

143 - PRATT, LAMY (1969)

Bull. Soc. Chem. Biol. 51, 1367. (52)

144 - RAMPHAL R., PYLE M. (1983)

Evidence for mucins and sialic acid as receptors for Pseudomonas aeruginosa in the lower respiratory tract.

Infect. Immun. 41, 339-344. (2)

145 - RANA S.S., CHANDRASEKARAN E.V., KENNEDY J., MENDICINO J. (1984)

Purification and structures of oligosaccharides chains in swine trachea and Cowper's gland mucin glycoproteins.

J. Biol. Chem. 259, 12899-12907. (24)

146 - RANA S.S., CHANDRASEKARAN E.V., MENDICINO J. (1987)

Structures of the sialylated oligosaccharide chains in swine trachea mucin glycoproteins.

J. Biol. Chem. 262, 3654-3659. (23)

147 - ROBERTS G.P. (1974)

Isolation and characterization of glycoproteins from sputum.

Eur. J. Biochem. 50, 265-280. (5,6,7,9)

148 - ROBERTS G.P. (1976)

The role of disulphide bonds in maintaining the gel structure of bronchial mucus.

Arch. Biochem. Biophys. 173, 528-537. (4,26,27)

149 - ROBERTS G.P. (1978)

Chemical aspects of respiratory mucus.

Brit. Med. Bull. 34, 39-41. (27)

150 - ROSE M.C., LYNN W.S., KAUFMAN B. (1979)

Resolution of the major components of human lung mucosal gel and their capabilities for reaggregation and gel formation.

Biochemistry 18, 4030-4037. (7,9,10,11,17,19)

151 - ROSE M.C., VOTER W.A., SAGE H., BROWN C.F., KAUFMAN B. (1984)

Effects of deglycosylation on the architecture of ovine submaxillary mucin glycoprotein.

J. Biol. Chem. 259, 3167-3172. (25)

152 - ROSE M.C., KAUFMAN B., MARTIN B. (1989)

Proteolytic fragmentation and peptide mapping of human carboxyamido-methylated tracheobronchial mucin.

J. Biol. Chem. 264, 8193-8199. (15,16,115)

- 153 - ROTHFIS J.A., SMITH E.L. (1963)
Periodate oxidation of glycopeptides from globulin.
J. Biol. Chem. 238, 1402. (T-2)
- 154 - ROUSSEL P., LAMBLIN G., DEGAND P., WALKER-NASIR E.,
JEANLOZ R.W. (1975)
*Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial
glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis.*
J. Biol. Chem. 250, 2114-2122. (9,11,13,17,22,109)
- 155 - ROUSSEL P., LAMBLIN G., LHERMITTE M., LAFITTE J.J., DEGAND
P., BISERTE G. (1976)
Les mucines bronchiques sécrétées au cours de la mucoviscidose.
*VIIè Congrès International de la Mucoviscidose, Paris, 31 Mai - 3 Juin
1976.* (4,6,7)
- 156 - SACHDEV G.P., MYERS F.J., HORTON F.O., FOX O.F., WENG G.,
ROGERS R.M. (1980)
*Isolation, chemical composition and properties of the major mucin component
of normal human tracheobronchial secretions.*
Biochem. Med. 24, 82-94. (4,5,7,11,13,17,109)
- 157 - SAIRAM M.R., SCHILLER P.W. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 197, 294-301. (40)
- 158 - SAIRAM M.R. (1980)
*Deglycosylation of ovine pituitary lutropin subunits : effects on subunit
interaction and hormone activity.*
Arch. Biochem. Biophys. 204, 199-206. (40)
- 159 - SAIRAM M.R., FLESHNER P. (1981)
*Inhibition of hormone-induced cyclic AMP production and steroidogenesis in
interstitial cells by deglycosylated lutropin.*
Mol. Cell. Endocrinol. 22, 41-54. (40)
- 160 - SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467. (106,107)

161 - SAVAGE A.V., KOPPEN P.L., SCHIPHORST W.E.C.M., TRIPPELVITZ L.A.W., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G., VAN DEN EIJNDEN D.H. (1986)

Porcine submaxillary mucin, contains 2 3 and 2 6 linked N-acetyl and N-glycolyl-neuraminic acid.

Eur. J. Biochem. 160, 123-129. (24)

162 - SCAWEN M., ALLEN A. (1977)

The action of proteolytic enzymes on the glycoprotein from pig gastric mucus.

Biochem.J. 163, 363-368. (8,9,26)

163 - SCHRAGER J., OATES M.D.G. (1971)

The isolation and partial characterization of the principal gastric glycoprotein of "visible" mucus.

Digestion 4, 1-12. (18)

164 - SHEEHAN J.K., CARLSTEDT I. (1984)

Hydrodynamic properties of human cervical-mucus glycoproteins in 6M-guanidinium chloride.

Biochem. J. 217, 93-101. (8)

165 - SHEEHAN J.K., OATES K., CARLSTEDT I. (1986)

Electron microscopy of cervical gastric and bronchial mucus glycoproteins.

Biochem. J. 239, 147-153. (25)

166 - SHIMIZU M., YAMAUCHI K. (1982)

Isolation and characterization of mucin-like glycoproteins in human milk fat globule membrane

J. Biochem. 91, 515-524. (84)

167 - SHOGREN R.L., JAMIESON A.M., BLACKWELL J., JENTOFT N. (1984)

The thermal depolymerization of porcine submaxillary mucin.

J. Biol. Chem. 259, 14657-14662. (26)

168 - SIDDIQUI J., ABE M., HAYES D., SHANI E., YUNIS E., KUFE D. (1988)

Isolation and sequencing of a cDNA coding for the DF3 breast carcinoma-associated antigen.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2320-2323. (85)

169 - SLAYTER H.S., LAMBLIN G., LE TREUT A., GALABERT C., HOUDRET N., DEGAND P., ROUSSEL P. (1984)

Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein.

Eur. J. Biochem. 142, 209-218. (10,25)

170 - SLOMIANY A., WITAS H., AONO M., SLOMIANY B.L. (1983)

Covalently linked fatty acids in gastric mucus glycoprotein of cystic fibrosis patients.

J. Biol. Chem. 258, 8535-8538. (28)

171 - SLOMIANY B.L., ZDEBSKA E., SLOMIANY A. (1984a)

Structural characterization of neutral oligosaccharides of human H⁺ Le^{b+} gastric mucin.

J. Biol. Chem. 259, 2863-2869. (23,24)

172 - SLOMIANY A., ZDEBSKA E., SLOMIANY B.L. (1984b)

Structures of the neutral oligosaccharides isolated from A-active human gastric mucin.

J. Biol. Chem. 259, 14743-14749. (24)

173 - SLOMIANY B.L., LIAU Y.H., PIASEK A., SLOMIANY A. (1985)

Effect of ethanol on mucus glycoprotein fatty acyltransferase from gastric mucosa.

Biochemistry 24, 3514-3521. (26)

174 - SNARY D., ALLEN A., PAIN R.H. (1970)

Structural studies on gastric mucoproteins : lowering of molecular weight after reduction with 2-mercaptoethanol.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 844-851. (28)

175 - SNYDER C.E., NADZIEJKO C.E., HERP A. (1982a)

Binding of basic proteins to glycoproteins in human bronchial secretions.

Int. J. Biochem. 14, 895-898. (4)

- 176 - SNYDER C.E., NADZIEJKO C.E., HERP A. (1982b)
Isolation of bronchial mucins from cystic fibrosis sputum by use of citraconic anhydride.
Carbohyd. Res. 105, 87-93. (9,11,17)
- 177 - SORIMACHI H., EMORI Y., KAWASAKI H., KITAJIMA K., INOUE S., SUZUKI K., INOUE Y. (1988)
Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for Apo-polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. Multiple mRNA species transcribed from multiple genes contain diverged numbers of exact 39-base (13 amino-acids) Repeats.
J. Biol. Chem. 263, 17678-17684. (121)
- 178 - STEWART J.R., CHAPLIN M.F., KENNY A.J. (1984)
Deglycosylation by trifluoromethane sulphonic acid of endopeptidase-24.11 purified from pig kidney and intestine.
Biochem. J. 221, 919-922. (40)
- 179 - STOCKLEY R.A., BURNETT D. (1980)
Alpha₁-antichymotrypsin in infected and non-infected sputum.
Am. Rev. Resp. Dis. 122, 81-88. (5)
- 180 - SWALLOW D.M., GENDLER S., GRIFFITHS B., CORNEY G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., BRAMWELL M.E. (1987)
The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM.
Nature 328, 82-84. (84)
- 181 - TABACHNIK N.F., BLACKBURN P., CERAMI A. (1981)
Biochemical and rheological characterization of sputum mucins from a patient with cystis fibrosis.
J. Biol. Chem. 256, 7161-7165. (10,11,17,19)
- 182 - TABAK L.A., LEVINE M.J., MANDEL I.D., ELLISON S.A. (1982)
Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity.
J. Oral. Pathol. 11, 1-17. (5,26)

183 - TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., PETERSON J.A., ARKLIE J., BURCHELL J., CERIANI R.L., BODMER W.F. (1981)

Monoclonal antibodies to epithelium specific components of the human milk fat globule membrane : production and reaction with cells in culture.

Int. J. Cancer 28, 17-21. (84)

184 - TETTAMANTI G., PIGMAN W. (1968)

Purification and characterization of bovine and ovine submaxillary mucins.

Arch. Biochem. Biophys. 124, 41-50. (5,8,10,12)

185 - THOTAKURA N.R., BAHL O.P. (1982)

Role of carbohydrate in human chorionic gonadotropin : deglycosylation uncouples hormone-receptor complex and Adenylate Cyclase system.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 399-405. (40)

186 - TIMPTE C.S., ECKHARDT A.E., ABERNETHY J.L., HILL R.L. (1988)

Porcine submaxillary gland apomucin contains tandemly repeated identical sequences of 81 residus.

J. Biol. Chem. 263, 1081-1088. (1,86,103,109,115,116,117,118,120)

187 - VAITUKAITIS J.L. (1981)

Production of antisera with small doses of immunogen : multiple intradermal injections.

Methods Enzymol. 73, 46-52. (87, T-9)

188 - VANDEWALLE B., COLLYN d'HOOGHE M., SAVARY J.B., VILLAIN M.O., PEYRAT J.P., DEMINATTI M., DELOBELLE-DEROIDADE A., LEFEBVRE J. (1987)

Establishment and characterization of a new cell line (VHB-1) derived from a primary breast carcinoma.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113, 550-558. (89)

189 - VAN HALBEEK, DORLAND L., VLIAGENTHART J.F.G., HULL W.E., LAMBLIN G., ROUSSEL P. (1982)

Primary structure determination of 14 neutral oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis, employing 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy.

Eur. J. Biochem. 127, 7-20. (22,24,59)

- 190 - WALLACE R.B., STUDENCKI A.B., MURASUGI A. (1985)
Application of synthetic oligonucleotides to the diagnosis of human genetic diseases.
Biochimie 67, 755-762. (86)
- 191 - WENSINK P.C., FINNEGAN D.J., DONELSON J.E., HOGNESS D.S. (1974)
A system for mapping DNA sequences in the chromosomes of Drosophila melanogaster.
Cell 3, 315. (95)
- 192 - WERNER D., CHEMLA Y., HERZBERG M. (1984)
Isolation of poly(A)+ RNA by paper affinity chromatography.
Anal. Biochem. 141, 329-336. (88)
- 193 - WHITNEY P.L., MENDE T.J., BREW K. (1978)
Respiratory mucous glycoprotein from individuals with healthy lungs and patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis.
Fed. Proc. 37, 1439. (5,7,9)
- 194 - WIERUSZESKI J.M., MICHALSKI J.C., MONTREUIL J., STRECKER G., PETER-KATALINIC J., EGGE H., VAN HALBEEK H., MUTSAERS J.H.G.M., Vliegenthart J.F.G. (1987)
Structure of the monosialyl oligosaccharide derived from salivary gland mucins glycoproteins of the chinese swiftlet (Genus collocalia).
J. Biol. Chem. 262, 6650-6657. (22)
- 195 - WILLIAMS I.P., HALL R.L., MILLER R.J., RICHARDSON P.S. (1982)
Analyses of human tracheobronchial mucus from healthy subjects.
Eur. J. Resp. Dis. 63, 510-515. (26)
- 196 - WILSON M.B., NAKANE P.K. (1978)
Immuno fluorescence and relating staining technics.
Northern Holland Biomedical Press 215. (102)
- 197 - WOLF D.P., SOKOLOSKI J.E., LITT M. (1980)
Composition and function of human cervical mucus.
Biochim. Biophys. Acta 630, 545-558. (14)

198 - WOODWARD H.D., DAVIDSON E.A. (1983)
Proceedings of the 7th international symposium on glycoconjugates, LUND-RONNEBY, July 17-23, Macrostructure of human lung mucin glycoprotein. (41,42)

199 - WOODWARD H.D., RINGLER N.J., SELVAKUMAR R., SIMET I.M., BHAVANANDAN V.P., DAVIDSON E.A. (1987)
Deglycosylation studies on tracheal mucin glycoproteins. Biochemistry 26, 5315-5322. (41,42)

200 - WU A.M., SLOMIANY A., HERP A., SLOMIANY B.L. (1979)
Structural studies of the carbohydrate units of Armadillo submandibular glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta 578, 297-304. (26)

201 - YOUNG R.A., DAVIS R.W. (1983a)
Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198. (96,T-22)

202 - YOUNG R.A., DAVIS R.W. (1983b)
Yeast RNA polymerase II genes : isolation with antibody probes. Science 222, 778-782. (96,T-22)

203 - YUREWICZ E.C., MOGHISSI K.S. (1981)
Purification of human midcycle cervical mucin and characterization of its oligosaccharides with respect to size composition and microheterogeneity. J. Biol. Chem. 256, 11895-11904. (10,12,18)

204 - YUREWICZ E.C., MATSUURA F., MOGHISSI K.S. (1982)
Structural characterization of neutral oligosaccharides of human midcycle cervical mucin. J. Biol. Chem. 257, 2314-2322. (24)

205 - YUREWICZ E.C., MATSUURA F., MOGHISSI K.S. (1987)
Structural studies of sialylated oligosaccharides of human midcycle cervical mucin. J. Biol. Chem. 262, 4733-4739. (24)



La détermination de la structure peptidique des mucines a toujours représenté une difficulté technologique majeure malgré la miniaturisation et l'automatisation de la dégradation de Edman. Le caractère hautement glycosylé de ces O-glycoprotéines, leur richesse en thréonine en sérine en proline sont les causes essentielles de ces difficultés. Une déglycosylation préalable a donc été envisagée. Nous en avons optimisé les conditions (TFMS). La dégradation de Edman a été peu efficace et rejetée au profit de la biologie moléculaire. Le travail préliminaire à savoir purification de fragments de mucines et leur déglycosylation a alors été fort utile autorisant la préparation d'un immunosérum reconnaissant l'axe peptidique des mucines trachéobronchiques humaines. Grâce à cet immunosérum, le criblage d'une banque d'ADNc en vecteur d'expression lambda gt onze provenant de muqueuse respiratoire humaine nous a permis de sélectionner douze clones positifs. Trois familles de motifs structuraux ont pu être déduits de leurs séquences, se distinguant par l'existence ou non de zones "hyperglycosylables", de domaines répétitifs ou par un agencement alterné de zones nues et de zones glycosylables. L'analyse des ARN a permis de confirmer une très grande hétérogénéité peptidique. Parallèlement nous avons pu également montrer que l'expression des mucines présentait une spécificité cellulaire (immunohistochimie) et tissulaire (analyse des ARN de différentes muqueuses humaines).