

50376
1991
206

68431

50376
1991
206

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Année universitaire 1991

N° d'ordre : 791

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

présentée par

Isabelle VAN SEUNINGEN

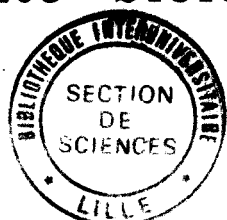
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

L'INHIBITEUR BRONCHIQUE HUMAIN

**Interaction avec les mucines respiratoires :
intérêt physiopathologique**

**Etude structurale et relation avec
l'activité biologique**



Soutenue le 16 octobre 1991 devant le Jury composé de :

Président : Professeur A. VERBERT

Rapporteurs : Professeur B. FOURNET
: Docteur E. PUCHELLE

Examineurs : Professeur P. DEGAND
: Docteur M. DAVRIL

A mes Parents,

A ma Famille,

A mes Amis.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Unité de Recherche n°16 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, dirigée par Monsieur le Professeur Pierre DEGAND, sous la direction scientifique de Madame le Docteur Monique DAVRIL.

Qu'il me soit permis d'adresser ici, mes remerciements à Monsieur le Professeur André VERBERT, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce Jury. La clarté de son enseignement, la tenue de soirée annonçant le premier cours de chaque année nouvelle et la question subsidiaire personnalisée posée à la fin de sa question de cours ont rendu mes études en Biochimie beaucoup plus agréables. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier très sincèrement pour l'honneur qu'ils me font :

Monsieur le Professeur Bernard FOURNET
Madame le Docteur Edith PUCHELLE

en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse ;

Monsieur le Professeur Pierre DEGAND
Madame le Docteur Monique DAVRIL

qui ont bien voulu juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à :

Monsieur le Professeur Pierre DEGAND, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour m'avoir orientée vers la spectrométrie de masse.

Monsieur le Professeur Philippe ROUSSEL, pour m'avoir accueillie à l'Unité 16 il y a quatre ans, ainsi que pour les discussions que nous avons eues et pour les remarques constructives qu'il m'a faites sur le travail concernant les mucines.

Madame le Docteur Annette HAYEM, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe "antiprotéases" de l'Unité, pour le dynamisme, la disponibilité et la culture scientifique dont elle a fait montre tout au long de ce travail.

Madame le Docteur Monique DAVRIL, pour m'avoir dirigée et encouragée dans mes travaux. Je voudrais lui témoigner toute ma reconnaissance pour avoir guidé mes premiers pas dans la Recherche, pour m'avoir inculqué son esprit de rigueur et pour la confiance qu'elle m'a témoignée pendant la réalisation de ce travail.

Madame Anne LAINE, Madame Dominique MARKO ou VERCAIGNE-MARKO, Mademoiselle Marie-Paule DUCOUROUBLE et Monsieur Eric HACHULLA, membres actifs du groupe "antiprotéases", pour le soutien moral et l'intérêt qu'ils ont portés à ce travail et pour l'aide efficace qu'ils ne m'ont jamais refusée.

Je tiens également à remercier :

Monsieur le Docteur Pierre SAUTIERE, Directeur de L'URA 409-CNRS et son équipe (plus particulièrement, Denise, Odile et Marie-Joëlle), pour les séquences peptidiques et les compositions en acides aminés, toujours effectuées avec rapidité et efficacité.

Monsieur le Docteur Jean-Pierre AUBERT pour m'avoir initiée aux joies du dichroïsme circulaire.

Monsieur le Docteur Robert Conrad THOMPSON, pour les dons d'inhibiteur recombinant.

Monsieur le Docteur Gilbert BRIAND et Mostafa KOUACH, pour m'avoir initiée à la spectrométrie de masse et Michel JAQUINOD (URA 31-CNRS, Strasbourg, Docteur Alain VAN DORSSELAER) pour avoir effectué les spectres de masse dans un temps plus que limité.

Monsieur le Docteur Jean-Marie TOURNIER (U314 INSERM, Reims) pour le don d'immunoglobulines anti-MPI.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de l'Unité 16 que j'ai pu côtoyer pendant ces quatre années, pour la sympathie et les encouragements qu'ils m'ont prodigués durant tout ce temps. Je voudrais plus particulièrement remercier Monsieur Claude VANDEPERRE qui a assuré la documentation photographique présentée dans ce mémoire et dans les publications.

SOMMAIRE

B. ROLES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES PROTEASES ET DES ANTIPROTEASES AU NIVEAU PULMONAIRE.....	25
B. I. PHYSIOLOGIE.....	25
B. II. PATHOLOGIE PULMONAIRE.....	28
B. II. 1. L'emphysème d'origine génétique.....	28
B. II. 2. Emphysèmes dus au tabagisme et aux aérocontaminants.....	28
B. II. 2. 1. Sensibilité de l' α_1 -PI aux oxydants.....	29
B. II. 2. 2. Sensibilité du MPI aux oxydants.....	29
B. II. 2. 3. Rôle spécifique de l'inhibiteur bronchique dans l'emphysème.....	30
B. II. 3. Maladies chroniques obstructives.....	30
TRAVAUX PERSONNELS.....	32

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE HUMAIN

A. PREPARATION DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE.....	32
A. I. L'ULTRAFILTRATION.....	32
A. II. L'ULTRACENTRIFUGATION.....	41
A. III. PROTOCOLE INCLUANT UNE ETAPE D'EXTRACTION EN MILIEU ACIDE.....	53
A. III. 1. Extraction par l'acide trichloracétique.....	53
A. III. 2. Purification sur colonne de CM-Trisacryl M.....	53
A. III. 3. Gel-filtration sur colonne de Sephadex G75 Superfine.....	56

B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE.....	58
B. I. CRITERES DE PURETE.....	58
B. I. 1. Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).....	58
B. I. 2. Electrophorèse en gel d'acrylamide à pH 4,3.....	58
B. I. 3. Electrophorèse dans un gradient de pH 4-11.....	58
B. II. COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES.....	60
B. II. 1. Compositions du MPI et du rSLPI natifs.....	60
B. II. 2. Compositions du MPI et du rSLPI après oxydation performique.....	60
B. III. SEQUENCE N-TERMINALE.....	62
B. IV. MASSE MOLECULAIRE.....	62

CHAPITRE II

INTERACTION DU MPI AVEC LES MUCINES

A. PREPARATION DES MUCINES BRONCHIQUES.....	65
B. PREPARATION ET CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDES DE MUCINES.....	65
B. I. CRITERE DE PURETE : SDS-PAGE.....	65
B. II. CARACTERISATION.....	66
B. II. 1. Détermination de la masse moléculaire.....	66
B. II. 2. Détermination du point isoélectrique.....	66
B. II. 3. Compositions chimiques.....	66
C. ETUDE CONFORMATIONNELLE DE L'INTERACTION.....	66
D. CONSEQUENCES DE L'INTERACTION SUR L'ACTIVITE DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE.....	68

CHAPITRE III

INTERACTION DU MPI AVEC LES SERINE-PROTEASES

A. INTERACTION AVEC LES ENZYMES HUMAINS.....	76
A. I. ELASTASE GRANULOCYTAIRE.....	77
A. II. CATHEPSINE G GRANULOCYTAIRE.....	77
B. INTERACTION AVEC UN ENZYME D'ORIGINE ANIMALE : LA TRYPSINE BOVINE.....	80

CHAPITRE IV

ETUDE STRUCTURALE DU MPI

A. SEQUENCE N-TERMINALE ET MASSE DE LA MOLECULE ENTIERE.....	83
B. SEPARATION DES DEUX DOMAINES.....	85
B. I. COUPURE CHIMIQUE DE LA LIAISON ASP-PRO.....	85
B. II. SEQUENCES DES FRAGMENTS OBTENUS APRES TRAITEMENT DU MPI PAR L'ACIDE FORMIQUE.....	85
B. III. PURIFICATION DES FRAGMENTS DE MPI ET DE rSLPI PAR HPLC EN PHASE INVERSE.....	87
B. III. 1. Colonne C8 Synchronapak.....	87
B. III. 2. Colonne C18 μ Bondapak.....	89
B. III. 2. 1. Purification des Fractions 1.....	89
B. III. 2. 2. Purification des Fractions 2.....	89

C. CARACTERISATION DES DEUX DOMAINES.....	92
C. I. COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES.....	92
C. I. 1. Compositions des Fractions 1.....	92
C. I. 2. Compositions des Fractions 2.....	92
C. II. SEQUENCES PEPTIDIQUES.....	94
C. II. 1. Séquences N-terminales de MPI-1 et rSLPI-1.....	94
C. II. 2. Séquences N-terminales de MPI-2 et rSLPI-2.....	94
C. III. MASSES MOLECULAIRES.....	94
C. III. 1. Masses moléculaires de MPI-1 et rSLPI-1.....	97
C. III. 2. Masses moléculaires de MPI-2 et rSLPI-2.....	100
D. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES DOMAINES.....	103
D. I. ETUDE DE L'ACTIVITE DE MPI-1.....	104
D. II. ETUDE DE L'ACTIVITE DE MPI-2.....	104
DISCUSSION GENERALE ET	
CONCLUSIONS.....	106
ANNEXE TECHNIQUE.....	110
BIBLIOGRAPHIE.....	135

Ce travail a fait l'objet des publications et des communications suivantes :

PUBLICATIONS

- 1) Evidence for the Tight Binding of Human Mucus Proteinase Inhibitor to Highly Glycosylated Macromolecules in Sputum.
I. VAN-SEUNINGEN, M. DAVRIL and A. HAYEM (1989)
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 370, 749-755.

- 2) Electrotransfer of Basic Proteins from Nondenaturing Polyacrylamide Acid Gels to Nitrocellulose : Detection of Enzymatic and Inhibitory Activities and Retention of Protein Antigenicity.
I. VAN-SEUNINGEN and M. DAVRIL (1990)
Anal. Biochem., 186, 306-311.

- 3) Separation of the Two Domains of Human Mucus Proteinase Inhibitor : Inhibitory Activity is only Located in the Carboxy-Terminal Domain.
I. VAN-SEUNINGEN and M. DAVRIL (1991)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 1587-1592.

- 4) Strong Interactions between Mucins and two Basic Proteins, Mucus Proteinase Inhibitor and Lysozyme, in Human Bronchial Secretions.
I. VAN-SEUNINGEN, N. HOUDRET, A. HAYEM and M. DAVRIL
Int. J. Biochem., sous presse.

- 5) Interaction between Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor and Bronchial Mucins or Glycopeptides. Physiopathological Implications for the Protection of Mucins against Proteolysis by Human Leukocyte Elastase.
I. VAN-SEUNINGEN, J.-P. AUBERT and M. DAVRIL
Biochem. J., sous presse.

- 6) A Rapid Periodic Acid-Schiff Staining Procedure for the Detection of Glycoproteins Using the PhastSystem.
I. VAN-SEUNINGEN and M. DAVRIL
Electrophoresis, sous presse.

COMMUNICATIONS

- 1) Interaction de type ionique entre l'inhibiteur bronchique et les mucines. Conséquences possibles sur les propriétés rhéologiques du mucus bronchique.
I. VAN-SEUNINGEN, A. HAYEM, M.-P. DUCOUROUBLE et M. DAVRIL
XVII^e Forum des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Biologique, 3-6 Juillet 1990, Villeneuve d'Ascq, France.
Regard sur la Biochimie, 3, 124-A, p. 62.
- 2) Close association of mucus proteinase inhibitor with mucins in bronchial secretions.
I. VAN-SEUNINGEN, M. DAVRIL and A. HAYEM
International Symposium on Peptide Inhibitors of Proteolytic Enzymes, 21-23 Septembre 1990, Montpellier, France.
- 3) Etude de l'interaction entre l'inhibiteur bronchique et les mucines par dichroïsme circulaire. Conséquences sur l'activité inhibitrice envers l'élastase leucocytaire.
I. VAN-SEUNINGEN et M. DAVRIL
XVIII^e Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, 3-6 Septembre 1991, Tours, France.
Regard sur la Biochimie, 5, 42-A, p. 35.
- 4) Interaction between recombinant secretory leukocyte proteinase inhibitor and bronchial mucins : a circular dichroism study.
M. DAVRIL and I. VAN-SEUNINGEN
1st Annual Congress of the European Respiratory Society, 21-26 Septembre 1991, Bruxelles, Belgique.
Eur. Respir. J., 4, (suppl. 14), P 549s, p. 1283.

Abréviations utilisées

MPI : inhibiteur bronchique

HUSI-I : inhibiteur I du plasma séminal

CUSI : inhibiteur du mucus cervical

SLPI : secretory leukocyte proteinase inhibitor

rSLPI : SLPI recombinant

ESI : inhibiteur spécifique de l'élastase granulocytaire

α_1 -PI : α_1 -antiprotéase

α_2 -M : α_2 -macroglobuline

ITI : inter- α -trypsine inhibiteur

ELH : élastase granulocytaire humaine

Cat G : cathepsine G granulocytaire humaine

PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide

IEF : isoélectrofocalisation

HPLC : chromatographie liquide de haute performance

ESMS : spectrométrie de masse "électrospray"

M_r : masse moléculaire relative

pH_i : point isoélectrique

Tris : amino-2 hydroxyméthylpropane-2 diol-1,3

SDS : dodécyl sulfate de sodium

ATCA : acide trichloracétique

ATFA : acide trifluoroacétique

**INTRODUCTION
GENERALE**

L'inhibiteur bronchique (MPI), sécrété par les cellules séreuses des glandes sous-muqueuses au niveau trachéobronchique et par les cellules non ciliées de l'épithélium bronchiolaire, est considéré comme un acteur essentiel dans la défense antiprotéasique de l'arbre respiratoire : il aurait pour rôle l'inhibition des sérine-protéases granulocytaires, élastase (ELH) et cathepsine G (Cat G), libérées au cours de phénomènes inflammatoires (1). La molécule de MPI s'organise en deux domaines homologues, le domaine C-terminal portant le site d'inhibition envers l'ELH et la Cat G (1). Le rôle du domaine N-terminal est quant à lui inconnu. Un autre inhibiteur, transsudé du plasma, est l' α_1 -antiprotéase (α_1 -PI) qui intervient essentiellement au niveau alvéolaire. L'homéostasie pulmonaire est assurée quand il existe un équilibre entre antiprotéases et protéases cibles (2).

Cependant, le rôle physiopathologique exact du MPI n'est pas encore connu. Des travaux très récents montrent que, lors d'une réaction inflammatoire, le MPI viendrait s'insérer entre l'ELH libérée par les neutrophiles et la matrice extracellulaire. Cette capacité à interagir avec la matrice serait en relation avec deux caractéristiques de la molécule de MPI (faible masse moléculaire facilitant sa diffusion, point isoélectrique basique favorisant son interaction avec l'élastine). Comme le MPI diminue le potentiel destructeur de l'ELH, il pourrait constituer la base d'une nouvelle classe de molécules à but thérapeutique capables d'agir dans les états inflammatoires et dans les pathologies associées à une destruction de l'élastine pulmonaire (3).

Dans le tractus respiratoire, le MPI est surtout présent et actif au niveau bronchique. Il est concentré dans la phase gélatineuse de l'expectoration, essentiellement composée de mucines (4). Dans ces conditions, l'ELH peut-elle exercer son activité protéolytique sur les mucines respiratoires ? Le MPI est-il un "protecteur" des mucines ?

Notre hypothèse de travail, basée sur ces différentes données, est développée en quatre points :

1) Le MPI, protéine basique, interagit-il avec les mucines, glycoprotéines acides ? Quels sont les types de liaisons envisageables et ces liaisons impliquent-elles des résidus spécifiques d'acides aminés ou de sucres ?

2) l'ELH, libérée par les neutrophiles lors d'une réaction inflammatoire, protéolyse-t-elle les mucines en l'absence de MPI ? Y-a-t-il une influence sur les propriétés rhéologiques du mucus ?

3) L'ELH est-elle complètement inhibée par le MPI lorsqu'il est associé aux mucines ? Y-a-t-il une influence sur la balance "protéase-antiprotéase" au niveau bronchique ?

4) Le domaine N-terminal a-t-il un rôle spécifique ?

La première partie du mémoire est consacrée à une revue des connaissances sur la composition des sécrétions bronchiques, sur les antiprotéases et les protéases impliquées dans la physiopathologie pulmonaire.

La deuxième partie relate les travaux personnels qui s'organisent en quatre chapitres dans lesquels nous essaierons de répondre aux questions posées précédemment. Nous décrirons successivement :

I. la purification et la caractérisation du MPI à partir de sécrétions bronchiques.

II. la purification des mucines et la préparation des glycopeptides de mucines. L'étude comparative des interactions entre MPI et mucines et entre MPI et glycopeptides, à l'aide du dichroïsme circulaire et les conséquences de cette interaction sur l'activité biologique du MPI envers l'ELH.

III. l'étude des stoechiométries de réaction entre le MPI et ses enzymes cibles. Les protéases étudiées sont d'origine humaine (ELH, Cat G) et d'origine animale (trypsine bovine).

IV. la préparation et l'étude structurale des deux domaines du MPI ainsi que l'étude de leur activité envers les enzymes cibles connus. Une étude comparative est effectuée sur la protéine recombinante (rSLPI) qui nous a été donnée par le laboratoire Synergen (Dr. R. C. Thompson).

CONNAISSANCES
ACTUELLES

A. COMPOSITION DE LA SECRETION BRONCHIQUE

Le mucus bronchique est un milieu hétérogène constitué d'eau (95%), de sels minéraux, de protéines et glycoprotéines, de lipides et dans certains cas d'acides nucléiques (5).

On distingue généralement dans l'expectoration une phase géliforme contenant les mucines et une phase soluble dans laquelle se trouvent les protéines.

Les protéines se répartissent en trois groupes :

1. les protéines transsudées, présentes en quantités plus ou moins importantes selon les stades inflammatoires. On y distingue l'albumine, les immunoglobulines, les inhibiteurs de sérine-protéases (enzymes ayant un résidu de sérine actif dans leur site catalytique) dont les principaux sont l' α_1 -PI et l' α_1 -antichymotrypsine (α_1 -Achy), les dérivés de l'inter- α -trypsine inhibiteur (ITI) et l' α_2 -macroglobuline (α_2 -M).

2. les protéines sécrétées localement par la muqueuse bronchique parmi lesquelles on identifie les immunoglobulines A sécrétoires, la lactotransferrine bronchique, le lysozyme et l'inhibiteur bronchique.

3. les protéines libérées par les cellules inflammatoires, parmi lesquelles on distingue l'élastase (ELH), la cathepsine G (Cat G), la collagénase...

A. I. LES MUCINES BRONCHIQUES

Celles-ci représentent le constituant macromoléculaire majeur du mucus ; elles lui confèrent ses principales propriétés rhéologiques que sont la viscosité et l'élasticité (6). Le maintien de ces deux propriétés est indispensable au bon fonctionnement du système d'épuration mucociliaire, première barrière de défense du système respiratoire (7).

Les mucines sont des glycoprotéines de très haute masse moléculaire ($M_r > 10^6$). Les multiples chaînes glycaniques sont reliées à l'axe peptidique par des liaisons de type O-glycosidique entre un résidu de N-acétylgalactosamine et un résidu de sérine ou de thréonine. La partie glycanique représente 60 à 80% de la masse de la molécule ; elle est

constituée de galactose, de fucose, de N-acétylglucosamine, de N-acétylgalactosamine et d'acide N-acétylneuraminique ; on peut aussi y trouver des résidus de sulfate. L'axe peptidique se caractérise par sa richesse en sérine, thréonine, proline, glycolle et alanine (8) (Fig. 1).

En microscopie électronique, les molécules de mucines apparaissent comme de longs filaments flexibles et de taille variable (500 à 1500 nm) (9).

L'étude de l'action des enzymes protéolytiques sur les mucines a abouti au concept de deux types de régions dans ces molécules : des régions hautement glycosylées peu sensibles aux protéases et des régions "nues" facilement dégradées par les protéases (10). Les régions glycosylées obtenues après protéolyse des régions "nues" correspondent à des glycopeptides ayant une M_r comprise entre 200 000 et 500 000. Le fractionnement de ces glycopeptides par chromatographie d'échange d'anions révèle une hétérogénéité de charge permettant de les classer en trois groupes : un premier groupe constitué de glycopeptides contenant très peu d'acide sialique et de sulfate, appelés glycopeptides "neutres" ; un deuxième groupe composé de glycopeptides plus acides, plus riches en acide sialique qu'en sulfate, appelés glycopeptides "sialylés" et enfin un troisième groupe constitué de glycopeptides encore plus acides qui sont plus riches en sulfate qu'en acide sialique et appelés glycopeptides "sulfatés" (11).

Modèle de structure des mucines bronchiques

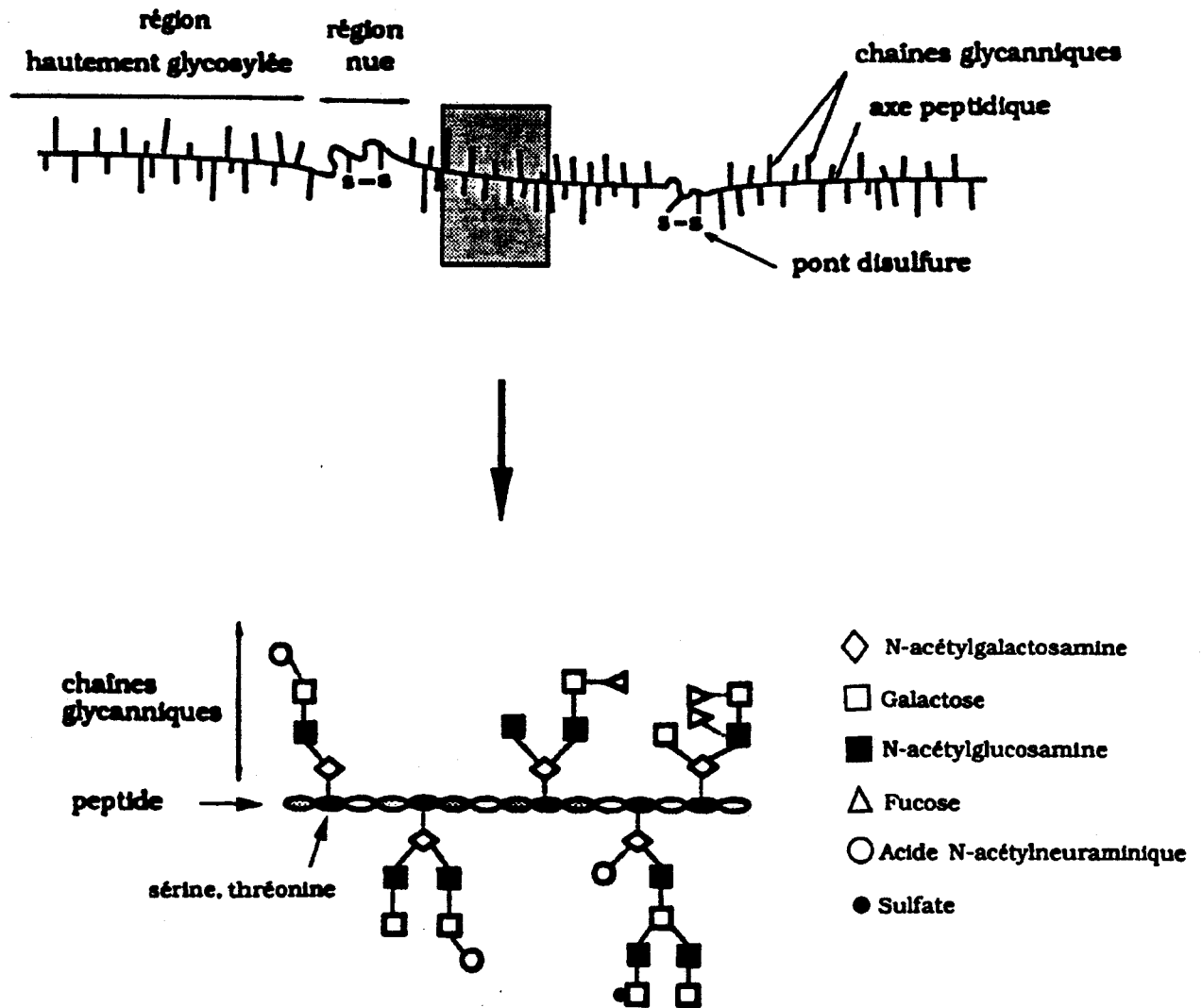


Figure 1 : Schématisation de la structure des mucines bronchiques.

A. II. LES INHIBITEURS DE PROTEASES

Nous nous limiterons, dans cette revue, à la description des inhibiteurs de sérine-protéases qui sont les inhibiteurs les plus représentés dans la sécrétion bronchique. Ils sont soit d'origine sérique (α_1 -PI, α_1 -Achy, dérivés de l'ITI et α_2 -M), soit sécrétés localement (MPI) (Fig. 2).

A. II. 1. Les inhibiteurs d'origine sérique

A. II. 1. 1. L' α_1 -antiprotéase (α_1 -PI)

L' α_1 -PI est une glycoprotéine de M_r 52 000 qui entre dans le poumon par diffusion du plasma (13, 14) et qui peut être synthétisée localement par les macrophages (15). Cette protéine est essentiellement active au niveau alvéolaire (80% de la capacité inhibitrice totale des liquides de lavages bronchoalvéolaires) (16). L' α_1 -PI est considéré comme l'inhibiteur le plus efficace de l'ELH (2). Son implication en physiopathologie pulmonaire sera envisagée ultérieurement (§ B. II.). L' α_1 -PI fait partie de la superfamille des serpins (Serine Proteinase Inhibitors) ; l'inhibition des enzymes comme l'ELH et la Cat G est irréversible et aboutit à la formation d'un complexe covalent dans lequel l'inhibiteur est clivé entre les résidus Met358 et Ser359 (17, 18).

A. II. 1. 2. L' α_1 -antichymotrypsine (α_1 -Achy)

L' α_1 -Achy est une glycoprotéine sérique de M_r 58 000 (19) appartenant comme l' α_1 -PI à la famille des serpins (17). C'est un inhibiteur de protéases de type chymotrypsine dont fait partie la Cat G (17). Les sécrétions bronchiques contiennent des concentrations en α_1 -Achy supérieures à ce que l'on peut attendre d'une simple diffusion du plasma, ceci suggérant une synthèse locale (20). Bien que selon Burnett et coll. (21) cet inhibiteur soit aussi synthétisé par les macrophages alvéolaires, il n'est pas actif vis-à-vis des enzymes de type chymotrypsine telle que la Cat G lorsqu'il est isolé à partir des sécrétions bronchiques (22).

A. II. 1. 3. Les inhibiteurs dérivés de l'ITI

Des inhibiteurs dérivés de l'ITI ont été mis en évidence dans les sécrétions bronchiques purulentes de malades atteints de bronchite chronique (23-25). Ces inhibiteurs dériveraient de la circulation sanguine ; toutefois, ces résultats n'ont jamais été confirmés par d'autres auteurs. De par leur faible quantité même lors d'un état infectieux, ces inhibiteurs n'ont probablement qu'un rôle mineur dans la défense assurée par les antiprotéases au niveau pulmonaire. L'ITI est une glycoprotéine sérique de M_r 180 000 à 240 000 composée de deux chaînes lourdes et d'une chaîne légère qui porte l'activité inhibitrice (26). Cette molécule est rattachée à la famille des inhibiteurs de type Kunitz (18). Son rôle physiologique exact ainsi que l'origine des dérivés ne sont pas encore connus (26).

A. II. 1. 4. L' α_2 -macroglobuline (α_2 -M)

L' α_2 -M est une glycoprotéine plasmatique de M_r 725 000 (27). La molécule est constituée par l'assemblage de quatre sous-unités. L' α_2 -M se distingue des autres inhibiteurs de protéases par sa large spécificité et le mécanisme selon lequel elle réagit avec les protéases. L' α_2 -M est capable d'inhiber les quatre classes d'enzymes : sérine-, cystéine-, métallo- et aspartyl-protéases (18) ; une fois le complexe formé avec l'un de ces enzymes, la réaction est irréversible. Il est intéressant de noter par ailleurs que des transferts sur l' α_2 -M d'enzymes complexés à d'autres inhibiteurs sont possibles (28). D'autre part, l'enzyme une fois fixé à l' α_2 -M est encore capable d'hydrolyser des substrats de petite taille mais non des substrats macromoléculaires. L' α_2 -M est essentiellement retrouvée au niveau alvéolaire mais en faible quantité car sa diffusion est rendue difficile à cause de sa taille. Le macrophage alvéolaire synthétise de l' α_2 -M mais sous une forme inactive vis-à-vis de l'ELH (29) ; sa contribution dans la défense envers cet enzyme dans la sécrétion bronchique est donc réduite (13, 30).

LUMIERE BRONCHIQUE

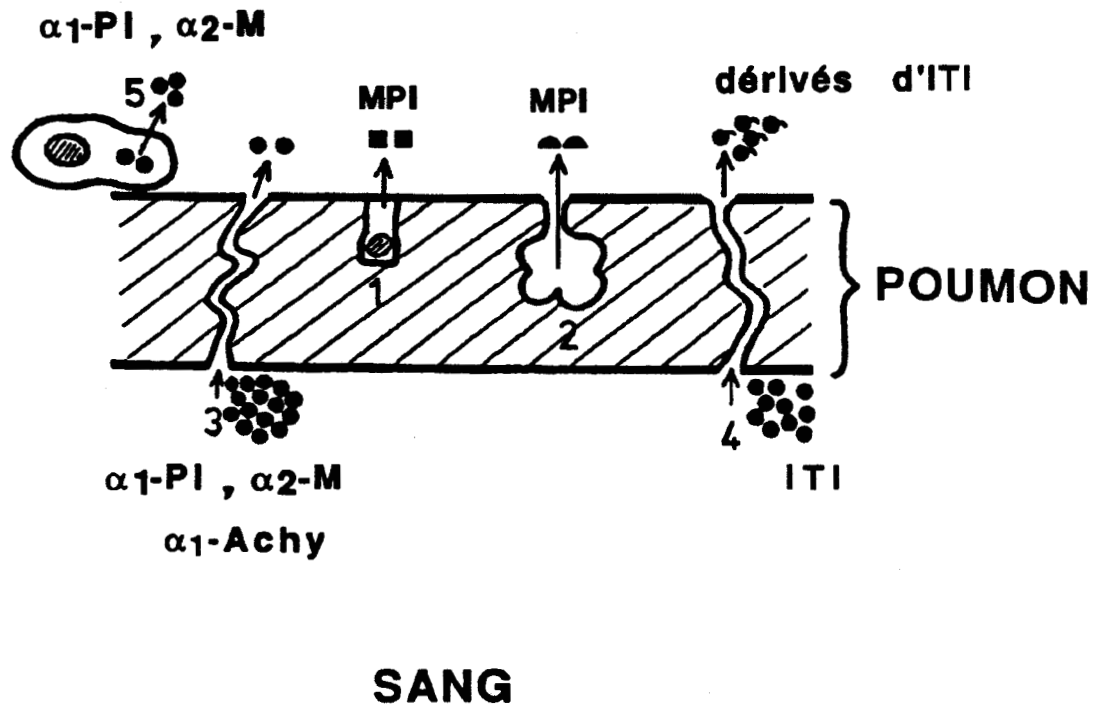


Figure 2 : Les différentes sources d'inhibiteurs de sérine-protéases présents dans la sécrétion bronchique (selon 12).

1. Cellules épithéliales de surface,
2. Cellules séreuses de la glande sous-muqueuse,
3. Diffusion plasmatique des inhibiteurs natifs,
4. Diffusion plasmatique des dérivés d'inhibiteurs,
5. Synthèse par les macrophages.

A. II. 2. Les inhibiteurs d'origine bronchique

A. II. 2. 1. L'inhibiteur bronchique (MPI)

A. II. 2. 1. 1. Mise en évidence d'inhibiteurs acido-stables

La présence d'inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine pancréatiques bovines, ayant un caractère acido-stable, a tout d'abord été mise en évidence en 1965 par Haendle et coll. (31) au niveau du plasma séminal humain. Peu de temps après, le même groupe découvre la présence d'une même entité au sein des sécrétions nasales (32) et bronchiques (33).

A. II. 2. 1. 2. Les inhibiteurs acido-stables des sécrétions humaines : une seule ou plusieurs molécules apparentées ?

A partir de 1971, le même groupe caractérise ces inhibiteurs dans différentes sécrétions, chacun d'entre eux ayant une dénomination particulière en fonction de son origine. Dans le plasma séminal, l'inhibiteur est appelé Human Seminal Proteinase Inhibitor I (HUSI-I) (34). Il existe plusieurs formes composées de 100 à 105 résidus d'acides aminés, ayant la tyrosine comme résidu N-terminal, un point isoélectrique (pH_i) égal à 9,6 et une M_r de 11 000 ± 500 (35). Dans le même temps, un inhibiteur très semblable mis en évidence dans le mucus cervical humain est appelé Cervical Uteri Secretion Inhibitor (CUSI) (36, 37) ; il est antigéniquement proche de HUSI-I. De plus, ces deux molécules sont des inhibiteurs puissants de l'ELH et de la Cat G (38) (Tableau I).

Peu de temps après, Ohlsson et coll. (39) montrent que l'inhibiteur bronchique alors appelé Bronchial Mucus Inhibitor s'avère aussi apparenté immunologiquement à HUSI-I ; en outre, plusieurs caractéristiques lient les deux protéines : la composition en acides aminés, la masse moléculaire et le résidu N-terminal (Tyr) (40). A cette époque, Schiessler, Hochstrasser et Ohlsson suggèrent d'employer le nom d'"antileukoproteases" pour ces inhibiteurs particuliers des sécrétions muqueuses humaines. On attribue alors à ces molécules un rôle de défense locale contre les agressions protéolytiques générées par les enzymes libérés par les neutrophiles lors d'un état inflammatoire (41).

TABLEAU I

Constantes d'inhibition (K_i) de HUSI-I et de CUSI envers différentes sérine-protéases (38)

Inhibiteur	Enzyme	K_i (nM)
HUSI-I	ELH	2,5
CUSI	ELH	1,3
HUSI-I	Cat G	70,0
CUSI	Cat G	12,3
HUSI-I	Try	2,2
CUSI	Try	n.d.
HUSI-I	Chy	0,9
CUSI	Chy	n.d.

ELH : élastase granulocytaire ; Cat G : cathepsine G granulocytaire ; Try : trypsine bovine ; Chy : chymotrypsine bovine ; K_i : constante d'inhibition ; n.d. : non déterminé.

A. II. 2. 1. 3. Isolement et caractérisation de l'inhibiteur bronchique : les divergences (1972-1987)

La présence d'un inhibiteur de protéases de faible masse moléculaire, ayant un caractère acido-stable, dans les sécrétions bronchiques est mise en évidence en 1972 par Hochstrasser et coll. (33). Les auteurs isolent ce "lysyl-inhibiteur" après extraction en milieu acide et purification sur une colonne de trypsine immobilisée : il a une M_r de 14 800, est composé de 125 résidus d'acides aminés, inhibe la trypsine, la chymotrypsine, la pronase et un homogénat granulocytaire. Il semble que cet inhibiteur soit présent dans la sécrétion à la fois sous forme libre et sous forme complexée aux protéases granulocytaires ; **70% de l'activité inhibitrice des sécrétions bronchiques sont dus au MPI, le reste étant attribué à l' α_1 -PI.** Par la

suite, la plupart des auteurs mettent à profit la propriété que possède le MPI de se lier réversiblement aux enzymes pour le purifier (Tableau II). Deux types de supports d'affinité sont utilisés, par immobilisation soit de trypsine bovine (25, 33, 40, 42-45) soit de chymotrypsine bovine (46). Dans tous les cas, ces protocoles aboutissent à l'obtention de plusieurs formes d'inhibiteur résultant de son clivage partiel par l'enzyme immobilisé. C'est ainsi que pendant longtemps on a décrit la tyrosine comme étant l'acide aminé en position N-terminale (25, 40, 45) au lieu de la sérine et que l'éventail des masses moléculaires, calculées soit par gel-filtration ou après SDS-PAGE, s'échelonnait de 6 500 à 19 200 (Tableau II). Un support d'affinité sur lequel sont greffés des anticorps dirigés contre le MPI a été utilisé par Klasen et Kramps (47) : l'obtention de la tyrosine comme résidu N-terminal de la préparation montre qu'elle est aussi composée en majorité de la forme clivée. En 1987, Boudier et coll. (48), tenant compte du caractère basique du MPI, utilisent pour son isolement une étape de chromatographie d'échange de cations. Le MPI est alors purifié sous sa forme native bien que la forme clivée soit aussi retrouvée en faible quantité. Ce procédé avait été précédemment utilisé pour l'isolement de l'inhibiteur salivaire dénommé Secretary Leukocyte Proteinase Inhibitor (SLPI) (49).

L'importance de l'extraction en milieu acide a été soulevée pour la quantification de l'inhibiteur dans les sécrétions et les liquides de lavages bronchoalvéolaires. Tournier et coll. (50) ont évalué par une méthode ELISA sa concentration entre 37 et 151 mg/l (valeur moyenne : 73 mg/l). Ces auteurs ont montré que l'extraction en milieu acide était indispensable à la récupération quasi totale du MPI (93%). Par la suite, Kramps et coll. (4), utilisant aussi une technique ELISA, ont obtenu des résultats similaires, les concentrations variant de 4 à 405 mg/l avec une moyenne de 66 mg/l. Ils ont pu montrer que, **dans le mucus, le MPI était présent dans la phase géliforme contenant les mucines, en concentration quinze fois supérieure à celle trouvée dans la phase soluble.**

Ces auteurs ont suggéré l'existence d'interactions ioniques entre le MPI et les mucines au sein du gel. Ils ont aussi souligné l'importance de l'extraction en milieu acide afin de libérer le MPI des mucines (4).

TABLEAU II**Inhibiteurs acido-stables isolés des sécrétions humaines**

Inhibiteur isolé	Origine du matériel	Protocole de purification	Nt	M _r	Enzymes inhibés	Réf.
BSI-TE	Sécrétions bronchiques	APC 5% trypsine-Biogel	Asp Ser	14 800	Try, Chy, Pronase, Enz. granulocyt.	33
HUSI-I	Plasma séminal	CM-Sephadex trypsine-Cellulose	-	12 700	Try, Chy.	34
HUSI-I	Plasma séminal	SP-Sephadex trypsine-Cellulose	Tyr	11 000	Try, Chy, Try humaine, Enz. granulocyt.	35
CUSI	Mucus cervical	APC 6% Sephadex G50	-	11 500	Try, Chy, Enz. granulocyt.	37
BMI	Sécrétions bronchiques purulentes	APC 5% trypsine-Affigel 10	Tyr	10 322	Try, Chy, E L H.	40
BMI, LMI, ALP	Sécrétions bronchiques purulentes	APC 5% trypsine-Affigel 10	-	15 000 à 13 000	Try, E L H.	42
Girard et coll.	Sécrétions bronchiques purulentes	APC 5% trypsine-Sepharose	Ala	19 200	Try.	43
Kueppers et Bromke	Sécrétions trachéo-bronchiques	APC 3% trypsine-Sepharose	Tyr	15 850 12 600 6 500	Try, Chy, E L H.	25
BMPI	Sécrétions bronchiques purulentes	APC 5% trypsine-Affigel 10	-	18 500	Try, E L H.	44
BMPI	Sécrétions bronchiques	APC 5% trypsine-Sepharose	Tyr	18 700	Try, Chy, E L H, Cat G.	45
BLPI	Sécrétions bronchiques	ATCA 3% chymotrypsine-Sepharose	-	11 273	Try, Chy, E L H, Cat G.	46
ALP	Sécrétions bronchiques	APC 3% anti-ALP-Affigel 10	Tyr	14 000	Try.	47
BrI	Sécrétions bronchiques non purulentes	ATCA 4% CM-Trisacryl M	Ser	16 000	Try, E L H.	48
SLPI	Sécrétions parotidiennes	SP-Sephadex C50	Ser	11 726	Try. humaine, E L H, Cat G.	49

APC : acide perchlorique ; ATCA : acide trichloracétique ; Nt : acide aminé N-terminal.

BSI-TE, LMI et BrI : bronchial inhibitor ; ALP : antileukoprotease ; BMI et BMPI : bronchial mucus proteinase inhibitor ; BLPI : bronchial leukoprotease inhibitor ; SLPI : secretory leukocyte proteinase inhibitor.

Try et Chy : trypsine et chymotrypsine pancréatiques bovines.

A. II. 2. 1. 4. Localisation cellulaire de l'inhibiteur bronchique

Le MPI est mis en évidence pour la première fois par Tegner et Ohlsson (51), par immunomarquage, dans des muqueuses trachéales humaines normales au niveau des cellules ciliées de l'épithélium et dans les glandes séro-muqueuses ainsi que dans la muqueuse des sinus maxillaires. Ce premier travail met donc en évidence la synthèse locale du MPI.

Par la suite, Franken et coll. (42) montrent qu'au **niveau bronchique**, le MPI est seulement présent dans les **cellules séreuses des glandes sous-muqueuses** et plus précisément dans les granules sécrétoires (52, 53). Il est aussi présent dans les granules des cellules séreuses des glandes sublinguales et des glandes sous-maxillaires (53, 54). Des résultats récents montrent que le MPI est présent dans la glande parotide (54) alors que les mêmes auteurs avaient précédemment dit qu'il était absent dans ce type de glande (55). Dans la publication la plus récente, les auteurs expliquent le précédent résultat par un temps trop long de fixation des coupes de tissus.

Au **niveau bronchiolaire** où les glandes sont absentes, le **MPI est présent dans les cellules sécrétrices non ciliées de l'épithélium de surface** supposées être les cellules de Clara (42, 55) et plus précisément dans leurs granules sécrétoires, ainsi que dans les **cellules caliciformes** (56). Toutes les cellules n'étant pas marquées, les auteurs suggèrent qu'il existe plusieurs types de cellules non ciliées ou que les cellules non marquées sont des cellules précurseurs ou ayant déjà dégranulé (56). La localisation du MPI et des inhibiteurs apparentés dans les autres tissus et leur présence dans les liquides biologiques (54) sont indiquées dans le tableau III.

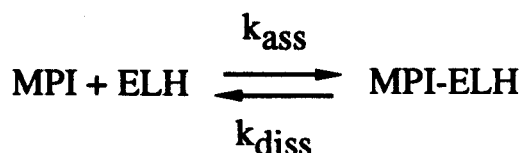
TABLEAU III

Distribution tissulaire et présence dans les liquides biologiques du MPI et de ses analogues (54)

Cellules sécrétrices	Liquides biologiques
lacrimales	lait
respiratoires	larmes
digestives proximales	salive
glandes génitales	mucus bronchique
	sperme
	mucus cervical

A. II. 2. 1. 5. Paramètres cinétiques de l'inhibiteur bronchique

Le MPI est un inhibiteur puissant de l'ELH (46, 57, 58) et de la Cat G (46). La réaction conduit à une inhibition pseudo-irréversible, suivant le schéma ci-dessous, où le MPI et l'enzyme recouvrent leur activité une fois dissociés. Par exemple, le complexe est dissocié en milieu acide (33).



k_{ass} : constante d'association ; k_{diss} : constante de dissociation.

Le MPI semble être le deuxième inhibiteur de l'ELH puisque la constante de vitesse d'association de l' α_1 -PI avec l'ELH ($6,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) est 6,5 fois plus forte que celle du MPI ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) (57) ; de plus, l' α_1 -PI est capable de dissocier le complexe MPI-ELH avec une constante de vitesse de $1,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (57). Le MPI est aussi inhibiteur de trypsine et de chymotrypsine bovines (46). Les constantes d'inhibition (K_i), d'association (k_{ass}) et de dissociation (k_{diss}) sont indiquées dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Constantes cinétiques du MPI envers différentes sérine-protéases

Enzymes	K_i (nM)	k_{ass} ($\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)	k_{diss} (s^{-1})	1/2 vie des complexes (h)	Réf.
ELH	0,01	$1,10 \times 10^7$	-	-	57
ELH	0,19	$0,11 \times 10^6$	$1,99 \times 10^{-5}$	10,07	46
ELH	0,30	$6,40 \times 10^6$	$2,30 \times 10^{-3}$	-	58
Cat G	4,18	$2,48 \times 10^4$	$1,04 \times 10^{-4}$	2,25	46
Try	8,28	$2,24 \times 10^4$	$1,85 \times 10^{-4}$	6,30	46
Chy	26,30	$1,16 \times 10^3$	$3,05 \times 10^{-5}$	-	46
EPH-2	92,0	$> 10^7$	$> 0,6$	-	60

EPH-2 : élastase pancréatique humaine 2.

A partir de ces paramètres, Gauthier et coll. (57) émettent l'hypothèse qu'au niveau bronchique, où le rapport molaire MPI/ α_1 -PI est de 14, 70% de l'ELH libérée par les neutrophiles sont complexés au MPI et les 30% restants à l' α_1 -PI. Par contre, le transfert de l'ELH du MPI vers l' α_1 -PI doit avoir lieu au niveau alvéolaire où l' α_1 -PI est en quantité majeure. Le MPI existe dans le plasma sous forme libre, mais dans des quantités infimes (126 $\mu\text{g/l}$) (59) : les auteurs expliquent le fait qu'il soit sous forme libre par la quantité impressionnante d' α_1 -PI (2,5 g/l) ; de plus, comme l' α_1 -PI se complexe plus rapidement à l'ELH, l'enzyme lui est totalement associé.

Fryksmark et coll. (28) montrent que le complexe MPI-ELH est stable durant 24 h. Lorsque ce complexe est incubé avec du sérum et l'ensemble immédiatement séparé sur une colonne de gel-filtration, 90% de l'ELH sont complexés à l' α_1 -PI et 10% à l' α_2 -M ; si l'incubation est de 24 h avant l'étape de chromatographie, les pourcentages évoluent vers 75% de complexe ELH- α_1 -PI et 25% de complexe ELH- α_2 -M. Dans ces mêmes conditions, une faible quantité de MPI est retrouvée dans la fraction contenant l' α_2 -M. Ces résultats montrent que :

1) en présence d' α_1 -PI et d' α_2 -M, l'ELH complexée au MPI est prise en charge par l' α_1 -PI puis par l' α_2 -M ;

2) le MPI est capable de se fixer à l'ELH liée à l' α_2 -M.

D'autres protéases d'origines différentes peuvent être inhibées par le MPI. Ainsi, celui-ci est capable d'inhiber l'élastase pancréatique humaine libre et liée à l'élastine (60) par formation d'un complexe enzymologiquement inactif. Il pourrait donc être utilisé comme un agent protecteur dans les pancréatites hémorragiques aiguës et comme anti-inflammatoire (Tableau IV).

Le MPI peut aussi inactiver la chymase des mastocytes de Porc (61). La réaction est rapide puisqu'après 1 min d'incubation l'équilibre est atteint. On peut penser qu'il s'agit d'une inhibition pseudo-irréversible car, en présence d'un excès de MPI, il subsiste 20% d'enzyme actif.

L'inhibiteur salivaire (SLPI) est aussi un inhibiteur puissant d'ELH et de Cat G ainsi que de la trypsine anionique humaine avec lesquelles il forme des complexes équimolaires (49) (Tableau V).

TABLEAU VK_i du SLPI envers différentes sérine-protéases (49)

Enzyme	K _i (nM)
ELH	0,2
Cat G	5,0
Try. an. hum.	4,0

Try. an. hum. : trypsine anionique humaine.

Les constantes d'inhibition obtenues avec le SLPI sont très proches de celles du MPI, ce qui montre que les deux molécules ont la même affinité pour les protéases granulocytaires (Tableaux IV et V).

A. II. 2. 1. 6. Structures primaire et secondaire

Tous les travaux de détermination de la structure connus actuellement ont été effectués sur HUSI-I, CUSI et SLPI.

Seemüller et coll. (62) décrivent pour la première fois en 1986 la séquence peptidique de HUSI-I. Heinzel et coll. (63) déduisent celle de CUSI de la séquence de l'ADNc préparé à partir de tissu cervical. Peu après, Thompson et Ohlsson (49) isolent l'inhibiteur à partir de sécrétions parotidiennes et séquencent entièrement la protéine. Dans les trois cas, les séquences des protéines décrites sont identiques. La molécule s'organise en deux domaines distincts. Les auteurs attribuent alors l'activité anti-trypsique au domaine N-terminal qui possède un site actif potentiel au niveau de la liaison Arg20-Tyr21 et l'activité anti-élastasique au domaine C-terminal au niveau de la liaison Leu72-Met73 (Fig. 3).

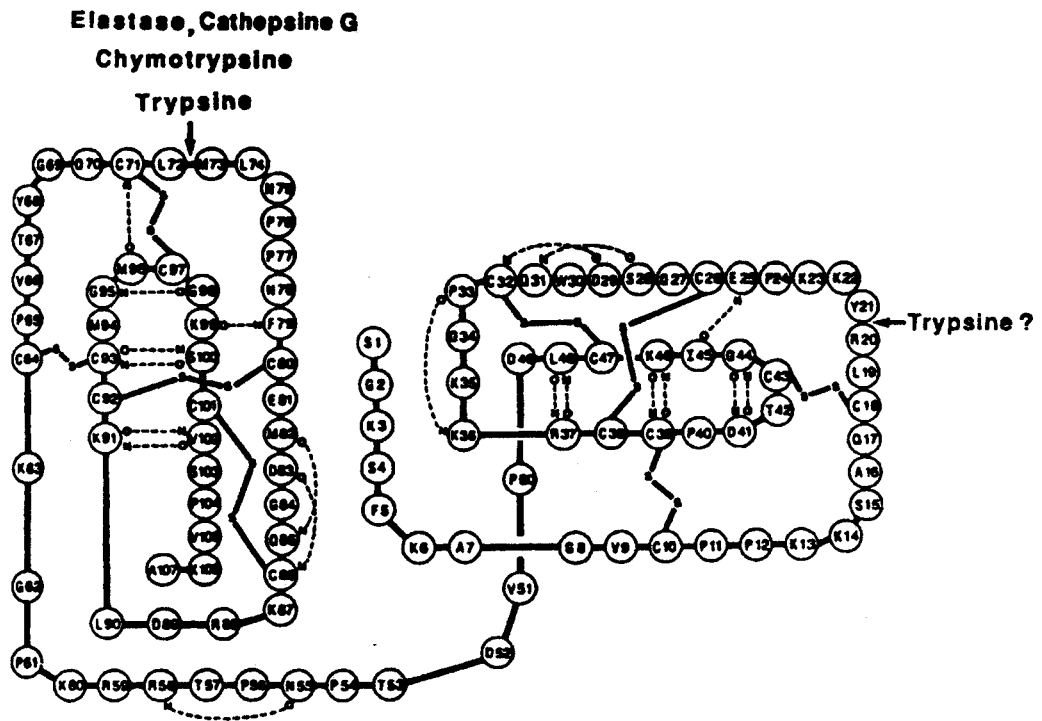
La comparaison avec d'autres inhibiteurs bien connus de types Kunitz et Kazal ne permet de classer cette protéine dans aucune de ces deux familles (18).

Trois publications récentes, dans lesquelles les auteurs ont cloné séparément les deux domaines, montrent que le domaine N-terminal est faiblement anti-trypsique alors que le domaine C-terminal est anti-élastasique, anti-chymotrypsique et anti-trypsique. Ces auteurs suggèrent que dans le domaine C-terminal, les sites actifs anti-trypsique et anti-élastasique sont très proches (64-66). De plus, les résidus Met impliqués dans le(s) site(s) actif(s) sont sensibles aux oxydants, ce qui engendre une perte partielle de l'activité de la molécule.

Il est important de noter que les activités anti-trypsique et anti-élastasique sont perturbées de la même manière, ce qui tendrait à montrer que les sites actifs pour ces deux types d'enzymes sont situés au même endroit dans la molécule d'inhibiteur. Ce résultat remet en question l'hypothèse initiale supposant l'activité anti-trypsique localisée dans le premier domaine (liaison Arg20-Tyr21) et l'activité anti-élastasique dans le deuxième domaine (liaison Leu72-Met73).

Une étude par diffraction des rayons X de la structure du SLPI recombinant (rSLPI) montre que la molécule a une forme de boomerang dont les deux ailes, nettement séparées et d'architecture semblable, correspondent aux deux domaines (67). Dans chaque domaine, la chaîne polypeptidique adopte une forme de spirale étirée. Quatre brins internes peuvent être déterminés dans chaque domaine, les deux plus enfouis formant un feuillet plissé β et une boucle en épingle à cheveux de type β . Les quatre ponts disulfure permettent l'interconnexion des segments polypeptidiques dans chaque domaine et confèrent une grande résistance à la molécule (Fig. 3). Dans le même travail, l'étude de l'interaction du domaine C-terminal avec la chymotrypsine bovine montre que celle-ci ne provoque pas de grands changements de conformation dans la molécule d'inhibiteur. Les acides aminés en contact direct avec l'enzyme sont Thr67---Leu74, Met96-Cys97, Val102 et Trp30. On peut noter que deux Met sont en contact direct avec l'enzyme ; le groupement carbonyle de la liaison Leu72-Met73 interagit avec Ser195, acide aminé essentiel de la triade constituant le site actif de la chymotrypsine.

Structure de la protéine



Organisation du gène

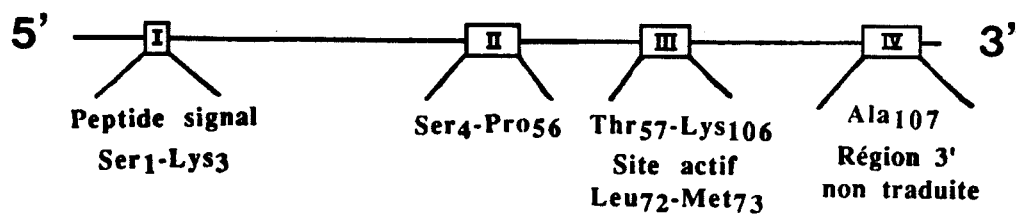


Figure 3 : Structure de la protéine (67) et organisation du gène du SLPI (68).

A. II. 2. 1. 7. Organisation et expression du gène

L'organisation du gène codant pour le SLPI établie par Stetler et coll. (68) montre que le gène est constitué de quatre exons et de trois introns (Fig. 3). Les exons II et III correspondent respectivement aux résidus d'acides aminés 4-56 et 57-106. Le transcrit primaire code pour 132 résidus d'acides aminés dont les 25 premiers forment la séquence signal de sécrétion de la protéine mature. Les auteurs suggèrent deux hypothèses pour expliquer le degré d'homologie relativement faible entre les deux domaines (35%) :

1) les deux exons proviennent d'un seul gène ancestral qui s'est dupliqué il y a très longtemps ; des modifications dans la séquence seraient intervenues au cours de l'évolution, tout en gardant l'organisation des ponts disulfure intacte dans les deux domaines.

2) les deux exons proviennent de deux gènes ancestraux ayant évolué de la même manière au cours du temps.

Abe et coll. (69) ont récemment montré une spécificité tissulaire pour l'expression du gène du SLPI, précédemment suggérée par Appelhans et coll. (70). Celui-ci est transcrit activement par les cellules épithéliales du tractus respiratoire, par des lignées cellulaires tumorales dérivées de surfaces muqueuses (HS-24 et HeLa) mais non par les fibroblastes. L'étude de 228 allèles, chez 114 individus, n'a pas mis en évidence de polymorphisme génétique au niveau des exons II à IV dans le gène du SLPI (Fig. 3).

En ce qui concerne la régulation de l'expression du gène, rien n'est encore connu.

Par conséquent, nous pouvons dire que, tout au moins au niveau des produits de traduction, la même entité moléculaire est présente dans différentes sécrétions et non une famille d'inhibiteurs de protéases dénommés initialement "antileukoproteases" (voir § A.II.2.1.2.).

Ainsi Fritz (71) a proposé le nom de Mucus Proteinase Inhibitor (MPI) pour désigner ces inhibiteurs. C'est le terme que nous avons retenu dans les différents articles présentés dans ce mémoire. Nous l'avons transcrit en français par inhibiteur bronchique puisque nous l'avons isolé des expectorations bronchiques.

Les principales propriétés physico-chimiques et inhibitrices de cette protéine sont rassemblées dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Propriétés communes aux inhibiteurs acido-stables de faible masse moléculaire des sécrétions humaines

Nombre de résidus d'acides aminés	107
M_r	11 726
pH _i	9,6
Chaînes glycaniques	aucune
Structure tertiaire	2 domaines distincts (35% d'homologie)
Spécificité d'inhibition	sérine-protéases

A. II. 2. 2. L'inhibiteur bronchique spécifique de l'élastase granulocytaire (ESI)

Cet inhibiteur a été initialement mis en évidence par Hochstrasser et coll. (72) et dénommé Elastase specific Inhibitor from Bronchial Secretions (BSI-E). Il possède plusieurs caractéristiques communes avec le MPI mais ne lui est pas antigéniquement relié : il est acido-stable, a une M_r de 11 000, une composition en acides aminés similaire et possède en position N-terminale un résidu de tyrosine. Les différences fondamentales se situent au niveau des spectres d'inhibition car BSI-E n'inhibe ni la Cat G, ni la trypsine et la chymotrypsine bovines ; par contre il inhibe l'ELH et l'élastase pancréatique porcine. Cet inhibiteur une fois réduit a une M_r égale à 5 000 (73). Récemment, Sallenave et Ryle (74) ont séquencé la partie N-terminale d'un inhibiteur isolé des sécrétions bronchiques appelé Elastase Specific Inhibitor (ESI) et l'ont comparée à celle du MPI. Les résultats montrent que le résidu Leu72 présent dans le site actif du domaine C-terminal du MPI est remplacé par Ala dans la molécule d'ESI (Fig. 4). Les auteurs interprètent cette modification comme étant responsable de la différence de spécificité envers les enzymes testés. Les constantes cinétiques de BSI-E et ESI comparées à celles du MPI sont rassemblées dans le tableau VII.

On ne connaît pas actuellement le lieu de synthèse de ESI au niveau bronchique.

	1													14
ESI	Ser	Thr	Lys	Pro	Gly	Ser	Cys	Pro	Ile	Ile	Leu	Ile	Arg	Cys
MPI	Arg	Arg	Lys	Pro	Gly	Lys	Cys	Pro	Val	Thr	Tyr	Gly	Glu	Cys
	58													71
	15↓													25
ESI	Ala	Met	Leu	Asn	Pro	Pro	Asn	Cys	Pro	Leu	Lys	-		
MPI	Leu	Met	Leu	Asn	Pro	Pro	Asn	Phe	Cys	Glu	Met	-		
	72↑													82

Figure 4 : Homologies de séquences entre ESI et MPI (74). Les flèches indiquent les positions des sites actifs.

TABLEAU VII**Constantes cinétiques de BSI-E, de ESI et du MPI envers l'ELH et l'EPP**

Complexes I/E	K _i (nM)	k _{ass} (μM ⁻¹ x s ⁻¹)	Réf.
BSI-E/ELH	0,50	-	72
BSI-E/ELH	1,00	-	73
ESI/ELH	0,15	16,70	74
MPI/ELH	0,19	0,11	46
MPI/ELH	0,30	6,40	58
BSI-E/EPP	9,00	-	72
ESI/EPP	3,30	3,41	74

EPP : élastase pancréatique porcine.

A. III. LES PROTEASES

Les protéases identifiées dans la sécrétion bronchique ont essentiellement pour origine les granulocytes (75) et les bactéries (76).

Nous nous limiterons à une brève description des protéases élastolytiques.

A. III. 1. Les protéases granulocytaires

L'ELH, la Cat G (sérine-protéases neutres) sont présentes dans les granules azurophiles (ou primaires) des polynucléaires neutrophiles. Récemment une troisième sérine-protéase neutre à propriétés élastolytiques, la Protéinase 3 (PR3), a été mise en évidence dans ces mêmes granules (77, 78). Une collagénase non spécifique (métallo-protéase) est quant à elle présente dans les granules spécifiques (ou secondaires) des polynucléaires. Les principales propriétés physico-chimiques de ces protéases sont rassemblées dans le tableau VIII. La cathepsine B qui est une cystéine-protéase (enzyme ayant un résidu Cys dans son site actif) est aussi présente dans les granules azurophiles et est capable de dégrader la matrice extracellulaire (80).

Une des fonctions des neutrophiles est la phagocytose qui s'effectue à l'intérieur de phagolysosomes : cependant, une partie des enzymes peut être libérée dans le milieu extérieur et dès lors dégrader les principaux éléments de la trame conjonctive pulmonaire (élastine, collagènes, protéoglycannes) (81, 82) et la fibronectine (83).

A. III. 2. Les protéases bactériennes

Ces enzymes sont sécrétés par les bactéries lors de processus infectieux. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* présent chez la plupart des patients atteints de mucoviscidose sécrète une élastase (84, 85) qui est un métallo-enzyme à Zn^{2+} capable de dégrader l'élastine (86, 87), d'autres protéines de la matrice extracellulaire (88) et l'épithélium respiratoire (89). Celle-ci peut aussi provoquer une hypersécrétion de mucines par les cellules caliciformes du tractus respiratoire (90, 91). Cette élastase est capable d'inactiver le MPI *in vitro* mais dans des rapports molaires I/E = 16/1 qui ne sont pas représentatifs de leurs concentrations respectives *in vivo* ; elle peut aussi dissocier l'inhibiteur de son complexe avec l'ELH et dégrader ensuite

l'élastine (92). Toutefois, des résultats contradictoires montrent qu'en présence d'ELH, l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* ne joue qu'un rôle mineur dans l'inactivation du MPI (93). Elle inactive aussi l' α_1 -PI *in vitro* par clivage d'une liaison proche du site actif (94) mais perd de son efficacité en présence d'ELH (95). *Staphylococcus aureus*, autre bactérie présente dans la mucoviscidose, sécrète aussi une élastase possédant une activité élastolytique (96).

TABLEAU VIII

Propriétés des protéases neutres granulocytaires élastolytiques (79)

	ELH	Cat G	PR3	collagénase
Contenu cellulaire (pg/cell.)	3	1,5	n.d.	4
M _r	29 000	30 000	27 000	75 000
Isoenzymes	5	4	3	2
pH _i	9,4	13	9,1	8-10
pH optimum	7,5-9,0	7,0-8,0	7,0	8,0-9,0
Sites de coupure	Val-X, Ala-X	Phe-X, Tyr-X Ile-X, Leu-X, Met-X	Ala-X, Ser-X, Val-X, Met-X	n. d.
Fraction glucidique (%)	20	0	n.d.	n.d.

pg/cell. : picogramme/cellule ; n.d. : non déterminé.

A. III. 3. Les protéases tissulaires

Récemment, plusieurs auteurs ont mis en évidence la sécrétion de protéases par différents types de cellules en culture d'origine bronchique, ces enzymes ayant la propriété de dégrader la gélatine et les collagènes des membranes basales (97-99). Ces premiers travaux laissent donc entrevoir la possibilité d'une synthèse locale de protéases au niveau du tractus respiratoire.

B. ROLES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES PROTEASES ET DES ANTIPROTEASES AU NIVEAU PULMONAIRE

B. I. PHYSIOLOGIE

La matrice extracellulaire du poumon sain est une structure dynamique qui est formée de constituants continuellement néosynthétisés, ce qui implique une élimination simultanée de ces mêmes composants ; l'équilibre entre les deux processus est assuré normalement par un turn-over lent (100). Il existe vraisemblablement un ensemble de protéases tissulaires possédant cette fonction d'élimination et des antiprotéases qui servent à réduire leur potentiel de destruction (101).

D'autre part, on trouve au sein du poumon normal des cellules inflammatoires (neutrophiles) pouvant libérer des protéases (ELH, Cat G, PR3, collagénase) au cours de la phagocytose (102). Il semble évident que les inhibiteurs de protéases présents en excès exercent une protection efficace contre les protéases dérivées de ces cellules alors en petit nombre. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la défense envers l'ELH, assurée par différents inhibiteurs que nous avons déjà décrits précédemment (voir § A. II.) : α_1 -PI, dérivés d'ITI, α_2 -M, MPI et ESI. Il est généralement admis que le MPI assure l'essentiel de la protection au niveau trachéobronchique (103) (Fig. 5).

Chez le sujet sain, il s'établit un équilibre entre protéases et antiprotéases que l'on désigne par "balance protéase-antiprotéase". La perturbation de cet équilibre en faveur des protéases aboutit alors au développement de diverses pathologies.

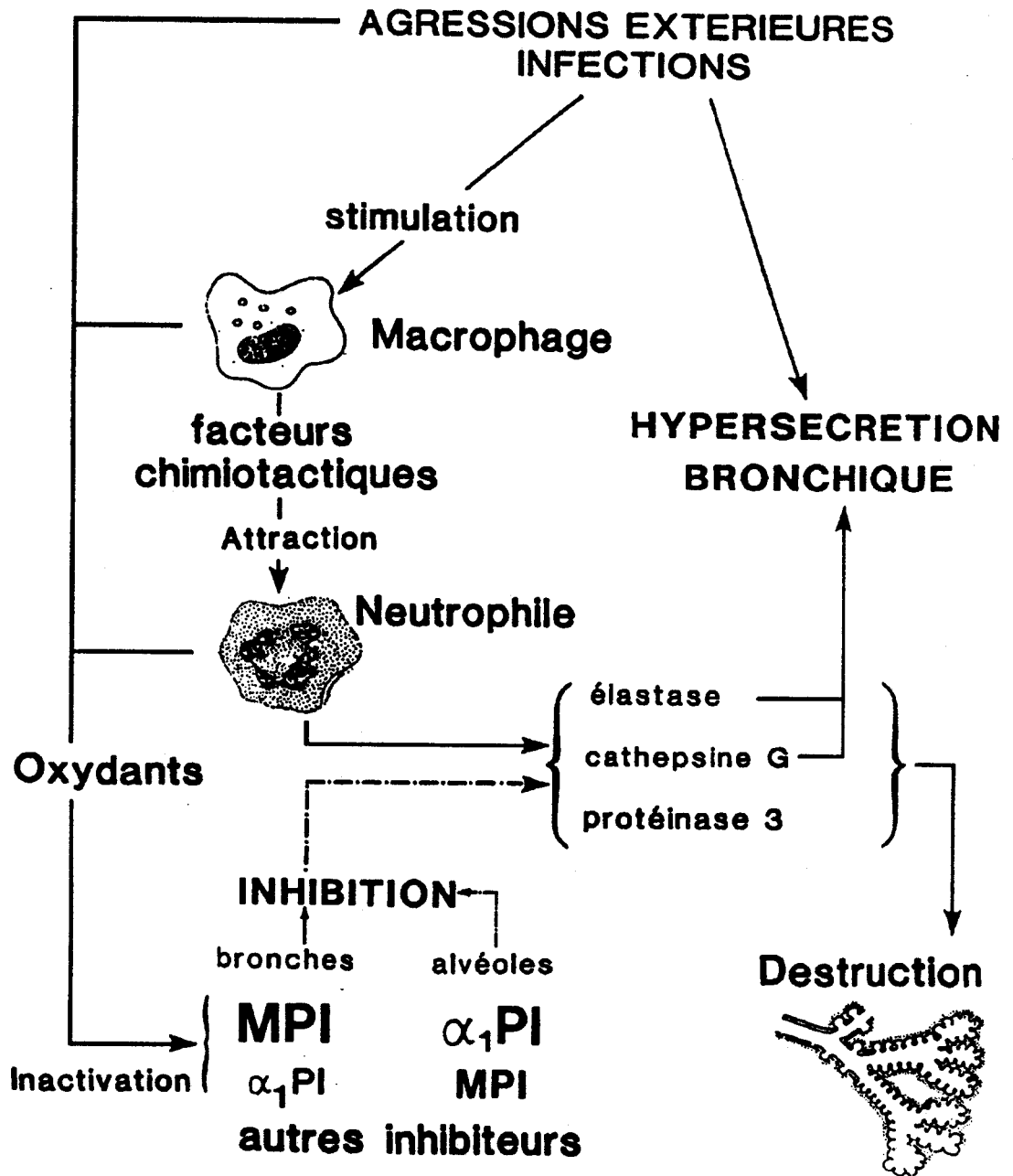


Figure 5: Schéma de l'action des différents protagonistes de la "balance protéase-antiprotéase" au niveau pulmonaire.

D'après des travaux récents (104), il semblerait que le rôle du MPI dans le maintien de la balance protéase-antiprotéase, s'exerce non seulement dans la lumière bronchique mais aussi au niveau de la matrice extracellulaire. Deux faits sont à signaler :

1) la mise en évidence de la sécrétion du MPI par des cellules de glandes trachéales humaines en culture, à la fois vers le pôle apical en direction de la lumière bronchique et vers le pôle basolatéral en direction de la matrice extracellulaire (104).

2) l'interaction du MPI avec l'élastine pulmonaire : plusieurs études immunohistochimiques ont permis de montrer la présence du MPI le long des fibres élastiques dans les septa alvéolaires (105, 106), les bronches, les bronchioles et les vaisseaux sanguins (106). Cette capacité à se fixer à l'élastine est due à une propriété commune du MPI et de l'ELH qui est d'avoir un pHi très basique (respectivement 9,6 et 9,4) (3).

L'influence de l'interaction du MPI avec l'élastine sur la capacité à inhiber l'ELH a été étudiée *in vitro* par Bruch et Bieth (107). L'élastine ajoutée aux complexes MPI-ELH ou α_1 -PI-ELH n'est pas capable de les dissocier ; au contraire, lorsque l'ELH est ajoutée à des mélanges MPI-élastine ou α_1 -PI-élastine, on observe immédiatement une fixation de l'enzyme sur les inhibiteurs. D'autre part, le MPI est capable d'inhiber complètement l'ELH liée à l'élastine tandis que dans le cas de l' α_1 -PI, les 25% d'activité enzymatique qui subsistent peuvent être inhibés par l'addition de MPI. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le MPI pourrait inhiber *in vivo* l'ELH liée à l'élastine tandis que l' α_1 -PI se lierait à l'ELH libre (57, 107). En accord avec les travaux de Bruch et Bieth (107), Morrisson et coll. (108) ont décrit deux mécanismes d'inhibition en fonction de l'inhibiteur mis en jeu :

1) l' α_1 -PI et l'églisine-C (peptide de 70 résidus, isolé de la sangsue (109)) seraient des inhibiteurs compétitifs de l'ELH ; ils la dissocieraient de son complexe avec l'élastine puis l'inhiberaient ;

2) le MPI et la méthoxy-succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhylcétone (inhibiteur spécifique de l'ELH se fixant irréversiblement sur le résidu His du site actif) se fixeraient sur l'ELH déjà liée à l'élastine et l'inhiberaient *in situ*.

B. II. PATHOLOGIE PULMONAIRE

Le poumon peut être le lieu de processus inflammatoires aigus et chroniques, ces événements étant associés à l'afflux de différents types de protéases. Dans certains cas, le potentiel en antiprotéases est suffisant mais, lorsqu'il est dépassé par déséquilibre de la balance en faveur des protéases, un processus de protéolyse peut se développer. La quantité, la localisation et la spécificité des protéases déterminent l'étendue, le lieu et le type de dommage subi par la matrice extracellulaire. Nous nous limiterons à la description des dommages causés par l'ELH et la Cat G, l'ELH jouant un rôle majeur dans la pathogénèse de nombreuses maladies pulmonaires (110, 111).

Des études *in vitro* montrent que l'ELH et la Cat G dégradent rapidement et efficacement l'élastine pulmonaire en peptides (82, 112). D'autre part, des études *in vivo* montrent que l'instillation d'ELH (113, 114) ou de PR3 (77) chez l'animal provoque le développement d'un emphysème.

De même qu'il existe plusieurs mécanismes responsables de l'augmentation de la teneur en protéases *in vivo*, une grande variété de processus mènent à une baisse de la protection par les antiprotéases. Cette baisse peut être de caractère génétique (emphysème associé à un déficit en α_1 -PI) (115) ou la résultante d'une modification de la structure et/ou de la fonction des antiprotéases (pollution, tabagisme, oxydants) (Fig. 5).

B. II. 1. L'emphysème d'origine génétique

L'association entre déficit en α_1 -PI et emphysème pulmonaire panlobulaire, mise en évidence par Laurell et Eriksson en 1963 (116), a été confirmée par l'étude de centaines de cas. La destruction du tissu pulmonaire est causée par des protéases qui ne peuvent être inhibées par l' α_1 -PI présente en trop faible quantité.

B. II. 2. Emphysèmes dus au tabagisme et aux aérocontaminants

Ils peuvent être d'origines variées, et ne sont pas provoqués par un déficit en α_1 -PI : ils pourraient s'expliquer par une diminution du potentiel d'activité antiprotéasique. Dans la majorité des cas, ces emphysèmes se développent chez des sujets fumeurs ou exposés régulièrement à des polluants

(fumées, poussières), ce qui engendre un état inflammatoire permanent avec production d'oxydants par les cellules inflammatoires (Fig. 5). Une altération de la qualité des inhibiteurs (α_1 -PI et MPI) tous deux sensibles à ces composés en est la conséquence (117).

B. II. 2. 1. Sensibilité de l' α_1 -PI aux oxydants

Des études *in vitro* montrent que l'oxydation du résidu Met358 en position P1 du site actif de l' α_1 -PI conduit à une molécule ayant perdu de son activité fonctionnelle puisque sa constante d'association à l'ELH diminue d'un facteur de 2 000 (118). L' α_1 -PI oxydée *in vivo* par des métabolites oxygénés a aussi un potentiel d'activité antiprotéasique diminué.

B. II. 2. 2. Sensibilité du MPI aux oxydants

La première étude *in vitro* a été effectuée par Carp et Janoff (119) sur le MPI et HUSI-I. Les deux inhibiteurs sont inactivés par la fumée de cigarette, par des oxydants chimiques (N-chlorosuccinimide et chloramine-T) et par le système oxydatif dérivé des phagocytes représenté par la myéloperoxydase en présence de H₂O₂, de glucose-oxydase et d'ions Cl⁻. Leur capacité inhibitrice envers l'ELH est préservée en présence d'antioxydants phénoliques tels que le thymol et l'hydroquinone. Ce résultat suggère que des réactions d'oxydation sont impliquées et que les résidus Met (Met73 est en position P'1 dans le site actif) présents dans la molécule sont modifiés.

Cette réaction peut avoir une incidence importante en pathologie respiratoire chez les fumeurs et chez les malades atteints de bronchite chronique obstructive au cours de laquelle on observe un état inflammatoire. L'inhibiteur oxydé, qui est alors rendu inactif, ne permettrait plus à la muqueuse bronchique de se défendre vis-à-vis des enzymes granulocytaires.

Les résultats de Carp et Janoff (119) obtenus avec la myéloperoxydase de Chien ont ensuite été confirmés par Kramps et coll. (120) avec la myéloperoxydase humaine. La capacité inhibitrice du MPI envers l'ELH et la trypsine bovine est rapidement détruite en présence de myéloperoxydase libérée par des neutrophiles stimulés par des esters de phorbol. La capacité inhibitrice n'est pas modifiée lorsque les neutrophiles ne sont pas stimulés, ce qui exclut les réactions d'oxydation engendrées par les radicaux de type O₂[•] ou OH[•]. L'addition d'azide de sodium, de catalase ou de méthionine protège complètement l'activité de l'inhibiteur. Cela montre que les

oxydants produits par la myéloperoxydase sont responsables de l'inactivation et que des résidus Met sont présents dans le site actif du MPI.

En conséquence, l'ELH qui est aussi libérée par les neutrophiles stimulés, peut détruire les structures tissulaires adjacentes au site inflammatoire, en l'absence d'inhibiteur fonctionnel (121).

B. II. 2. 3. Rôle spécifique de l'inhibiteur bronchique dans l'emphysème

Actuellement, seuls Lucey et coll. (122) ont montré le rôle protecteur du rSLPI dans l'évolution de l'emphysème expérimental induit chez le Hamster ; l'inhibiteur est en effet capable de diminuer le taux de dégradation de l'élastine lorsqu'il est instillé avant l'ELH. Willems et coll. (123) ont par ailleurs montré une augmentation du nombre de cellules synthétisant le MPI au niveau bronchiolaire au cours de l'emphysème, suggérant un rôle de défense important du MPI dans cette pathologie.

Dans tous les cas d'emphysèmes d'origine non génétique, le mécanisme précis par lequel le déséquilibre protéase-antiprotéase conduit à la constitution d'un emphysème pulmonaire est inconnu.

B. II. 3. Maladies chroniques obstructives

L'implication des protéases dans d'autres phénomènes, notamment dans l'induction d'hypersécrétion de mucus, est importante dans les pathologies telles que la bronchite chronique obstructive et la mucoviscidose (Fig. 5). L'instillation d'ELH à l'animal provoque une métaplasie de type apocrine des cellules épithéliales sécrétrices de l'arbre trachéobronchique (124-126). L'augmentation de la quantité de mucus sécrété provoque une obstruction des voies aériennes supérieures et peut perturber le système d'épuration mucociliaire (127). D'autre part, l'ELH peut aussi léser l'épithélium respiratoire cilié (89) et en conséquence diminuer la fréquence de battements des cils (128, 129). Il s'ensuit une stagnation du mucus, ce qui peut entretenir et aggraver des pathologies associées à une hypersécrétion de mucus.

Une étude récente montre que l'instillation intratrachéale de rSLPI à l'animal permet de diminuer l'effet de l'ELH, instillée dans un deuxième temps, sur l'induction de la métaplasie (122).

CONCLUSION

Quelles que soient les circonstances, un potentiel important de protéases est présent dans les sécrétions bronchiques, **le contrôle de l'action de ces enzymes étant assuré par diverses antiprotéases**. Certaines pathologies sont bien comprises quant à leur origine (emphysème génétique) mais la plupart restent à élucider dans leurs mécanismes moléculaires. Par exemple, on ne s'explique pas pourquoi les malades atteints de mucoviscidose ou de dilatation de bronches, affections dans lesquelles on observe une augmentation spectaculaire d'activités protéasiques, ne développent pas d'emphysème.

En ce qui concerne le rôle exact du MPI au niveau bronchique et alvéolaire, rien n'est encore bien défini. Actuellement des essais d'injection ou de traitement par aérosol à l'aide du rSLPI sont effectués chez l'homme et chez l'animal dans le but d'augmenter le potentiel inhibiteur envers l'ELH. Les premiers résultats montrent que le rSLPI administré par aérosol augmente sensiblement ce potentiel, tout au moins au niveau des surfaces épithéliales (130, 131) alors que par voie intraveineuse il est rapidement éliminé (132). Des travaux sont actuellement en cours dans le but de développer la synthèse de SLPI par génie génétique afin de l'administrer à des patients atteints de mucoviscidose et/ou dans les cas de déficit en α_1 -PI (133). Travis et Fritz (134) ont toutefois soulevé des problèmes quant à la conception d'inhibiteurs d'ELH dans un but thérapeutique. Dans le cas du MPI, sa petite taille est un avantage mais aussi un inconvénient car une diffusion rapide ne lui permettra pas d'agir efficacement. D'autre part, il faudra envisager de fabriquer des molécules de MPI mutantes rendues insensibles aux oxydants de manière à rendre optimal son potentiel inhibiteur.

TRAVAUX
PERSONNELS

CHAPITRE I

**ISOLEMENT ET
CARACTERISATION DE
L'INHIBITEUR
BRONCHIQUE HUMAIN**

A. PREPARATION DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE

Le but de notre travail était d'obtenir le MPI sous sa forme native à l'aide d'une méthode non dénaturante. D'emblée nous avons écarté la chromatographie d'affinité sur enzyme immobilisé qui conduit à un faible rendement en inhibiteur natif (33, 40, 42-46). Trois méthodes ont été essayées, deux étant considérées comme non dénaturantes : l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation. L'ultracentrifugation, basée sur la densité des produits à séparer, est un procédé couramment utilisé pour purifier les mucines bronchiques (135-138). La troisième méthode est celle décrite par Boudier et coll. (48) qui comporte une étape d'extraction en milieu fortement acide.

A. I. L'ULTRAFILTRATION

Le mucus bronchique a été dilué dans 12 volumes d'eau Millipore selon Feldhoff et coll. (136). Le surnageant obtenu après centrifugation a été ultrafiltré sur différentes membranes ayant des seuils d'exclusion de $M_r = 100\ 000$ puis $30\ 000$; ce procédé a été utilisé afin de séparer les constituants de M_r élevée dont font partie les mucines des protéines de plus faible M_r : MPI, lysozyme, lactotransferrine. De plus, cette méthode devait nous permettre d'évaluer les quantités de MPI sous forme libre et sous forme complexée à des enzymes (139) ou d'autres constituants du mucus.

La fraction de $M_r > 100\ 000$ a été soumise à un procédé dénaturant en milieu fortement acide afin de libérer le MPI complexé aux macromolécules au sein du mucus (33). En comparaison, une partie du même mucus a subi directement le traitement acide suivi d'une chromatographie d'échange de cations selon Boudier et coll. (48). Les résultats des différents protocoles ont ensuite été comparés. Ceux-ci sont présentés dans l'article suivant :

"Evidence for the tight binding of human mucus proteinase inhibitor to highly glycosylated macromolecules in sputum"

Evidence for the Tight Binding of Human Mucus Proteinase Inhibitor to Highly Glycosylated Macromolecules in Sputum

Isabelle VAN-SEUNINGEN, Monique DAVRIL and Annette HAYEM

Unité INSERM N° 16, Lille, France

(Received 2 March 1989)

Summary: Two extraction procedures of non-purulent sputum for the isolation of human mucus proteinase inhibitor (MPI) in its free and bound forms have been assayed. The dissociating procedure involved sputum homogenization in 1M NaCl and 4% (w/v) trichloroacetic treatment. When the soluble material was applied to a CM-Trisacryl column, a non-negligible, MPI-related inhibitory activity was recovered with the highly glycosylated constituents not retained on the column; the amount of MPI released in a free form was retained and eluted from the column according to the basic character of this inhibitor.

The non-dissociating procedure consisted in a high water dilution (1:12) of sputum, known to bring into solution the macromolecular, fibrillar constituents, which was followed by ultrafiltration on selected M_r

cut-off membranes. All the inhibitory activity was recovered with the high M_r (> 100000) fraction which was shown on SDS-PAGE to be essentially composed of strongly glycosylated material; on electrophoretic analysis under non-reducing conditions, the MPI activity was visualized as three bands which corresponded to the inhibitor released from this high M_r fraction in the presence of SDS. As mucin-type molecules are the major, highly glycosylated constituents of bronchial secretions, it is suggested that they are responsible for the entrapping of MPI within their macromolecular network; it would appear that, as well as for lysozyme, electrostatic interactions occur between the acid charges of mucins and the basic charges of MPI. The possible in vivo consequences of these interactions on MPI activity are discussed.

Nachweis einer festen Bindung zwischen menschlichem Mucus-Proteinaseinhibitor und hochglycosylierten Makromolekülen im Sputum

Zusammenfassung: Es wurden zwei Methoden für die Isolation menschlichen Mucus-Proteinaseinhibitors (MPI) in freier und gebundener Form aus nicht-eitrigem Sputum untersucht. Bei der dissozierenden Methode wurde das Sputum in 1M NaCl homogenisiert und mit 4proz. (w/v) Trichloressigsäure behandelt. Nach Aufbringen des löslichen Anteils auf eine CM-Trisacryl-Säule wurde ein deutlicher Anteil MPI-artiger Hemmwirkung in der Fraktion der hochglycosylierten, von der Säule nicht zurückgehaltenen

Bestandteile gefunden. Der Anteil des freigesetzten Inhibitors dagegen eluierte entsprechend seinen basischen Eigenschaften von der Säule.

Bei der nicht dissoziierenden Methode wurde das Sputum zunächst stark mit Wasser verdünnt (1:12), wodurch bekanntlich die makromolekularen, fibrillären Bestandteile in Lösung gehen. Darauf folgte eine Ultrafiltration durch Membranen, die für bestimmte Molekularmassen selektiv sind. Die gesamte Hemmaktivität befand sich in der Fraktion mit M_r -Werten

Enzymes:

Bovine chymotrypsin (EC 3.4.21.1);
bovine trypsin (EC 3.4.21.4).

Abbreviations:

MPI: mucus proteinase inhibitor; SDS: sodium dodecyl sulfate; PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis; PAS: periodic acid - Schiff; CM: carboxymethyl; Bz-Arg-Nan: N^{ϵ} -benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide; TCA: trichloroacetic acid.

über 100000. Sie bestand überwiegend aus hochglycosyliertem Material, wie mittels SDS-PAGE gezeigt werden konnte. Durch Elektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde die MPI-Aktivität in 3 Banden aufgetrennt, die dem durch SDS aus der hochmolekularen Fraktion freigesetzten Inhibitor entsprachen. Da die hochglycosylierten Bestandteile von Bronchialsekreten hauptsächlich mucinartige Moleküle sind, wird vermutet, daß sie

für das Abfangen des MPI innerhalb ihres makromolekularen Netzwerks verantwortlich sind. Möglicherweise treten, ähnlich wie beim Lysozym, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Säuregruppen des Mucins und den basischen des MPI auf. Die möglichen Auswirkungen dieser Wechselwirkungen auf die MPI-Aktivität *in vivo* werden diskutiert.

Key words: Human mucus proteinase inhibitor, highly glycosylated macromolecules, binding, sputum.

Human mucus proteinase inhibitor, named MPI as suggested by Fritz^[1], is present in various secretions and has been shown to be produced locally in the respiratory tract^[2]. Although its isolation has been carried out from different sources^[3-5], it is now well established that this protein originates from a single gene^[6]. Its structure has recently been determined^[4,5,7] and its inhibitory activity against serine proteinases has been extensively described^[8,9]. Human MPI is a potent inhibitor of polymorphonuclear leukocyte proteinases, elastase and cathepsin G, which is thought to play an efficient role in the defence of different tissues against these enzymes. Its inhibitory capacity against bovine pancreas trypsin and chymotrypsin has been useful for its isolation on affinity columns^[3,9]. Human MPI has been isolated from sputum by several groups^[3,9-12]. All authors used in the initial step a dissociating agent which was shown necessary to release free inhibitor from other sputum constituents. Moreover, the acid-stable character of MPI rendered possible the use of perchloric acid^[10] or trichloroacetic acid^[9,12] in order to dissociate the proteinase-inhibitor complexes: this acid treatment had the advantage to bring MPI into solution and to remove the major part of proteins by precipitation. The recovery of free MPI was thus dependent on the efficiency of the dissociating procedure.

In the present work, our aim was an investigation of the free and bound forms of MPI under dissociating and under non-dissociating conditions, with special attention to the molecular species responsible for entrapping this inhibitor in sputum.

Materials and Methods

Non purulent sputum was obtained from one patient suffering from bronchiectasis. Bacteriological screening indicated the presence of a few *Serratia* as the unique strain. Specimens were collected daily and stored at -20°C until use. After thawing, the pooled material (1000 ml) was submitted to different extraction procedures as described below.

All chemicals were of analytical grade. CM-Trisacryl M was supplied by IBF, France. Rabbit IgG against human MPI from bronchial origin were kindly provided by Dr. J.M. Tournier (Unité INSERM N° 14, Nancy, France). Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG were from Nordic.

The preparation procedures are summarized in Fig. 1.

Dissociating procedure

Sputum (600 ml) was blended at $+4^{\circ}\text{C}$ in an equal volume of 2M NaCl for small periods (10 s) until all viscous material was dispersed; solid trichloroacetic acid (TCA) was then added, under vigorous stirring, to a concentration of 4% (w/v) and the mixture was further gently stirred for 18 h at $+4^{\circ}\text{C}$. The acid-precipitated material was removed by centrifugation at $30000 \times g$ for 30 min at $+4^{\circ}\text{C}$ and the supernatant was neutralized with 1M NaOH. The solution was then dialysed (Spectrapor membrane, molecular mass cut-off 3500), first against water and further against 0.05M sodium acetate buffer, pH 5.5 and stored at -20°C until use.

Non-dissociating procedure

An aliquot (200 ml) of sputum was diluted 1 to 12 with deionized water and left at $+4^{\circ}\text{C}$ overnight under gentle stirring. The suspension (2600 ml) was centrifuged at $3000 \times g$ for 30 min and the supernatant was filtered on a Minitan ultrafiltration system (Millipore). First, a membrane assembly with a 100000 molecular mass cut-off resulted in the obtention of a retentate referred to as fraction $> 100000_{nd}$ (nd: non-dissociating); the filtrate was then passed through a 30000 cut-off membrane assembly which retained fraction 100000–30000. The unretained material was finally filtered through a YM5 membrane (Amicon) which resulted in fraction 30000–5000. Each retentate was brought to 100 ml final volume before storage at -20°C . Two 200-ml aliquots were processed as above.

Dissociating treatment of the $M_r > 100000_{nd}$ fraction

This fraction was subjected to treatment with NaCl (1M final concentration) followed by TCA addition (4% w/v). After neutralization and dialysis, the supernatant was divided into two halves (Fig. 1): the first one was processed as the TCA extract directly obtained in the dissociating procedure, i.e. cation-exchange chromatography, as described below; the other one was subjected to ultrafiltration on the 100000-membrane assembly which allowed the separation of a retentate referred to as fraction $> 100000_d$ (d: dissociating) and of an unretained fraction ($M_r < 100000_d$).

Ion-exchange chromatography on CM-Trisacryl

After dialysis against 0.05M sodium acetate buffer, pH 5.5 the material was applied to a CM-Trisacryl column (25×200 mm) equilibrated in the same buffer. After washing until all unretained material was recovered, elution was performed by a 0–0.5M NaCl gradient

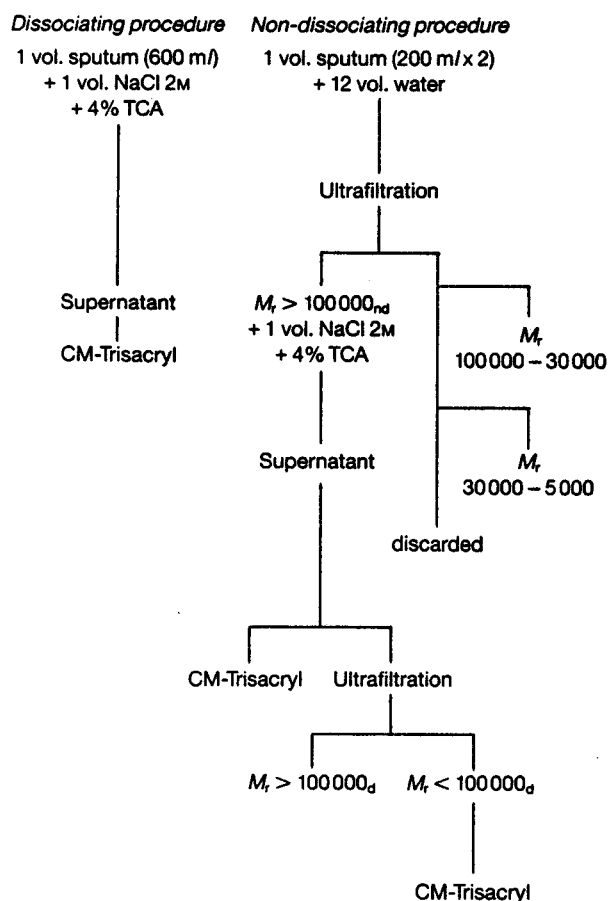


Fig. 1. Dissociating and non-dissociating procedures for the isolation of MPI-containing material from non purulent sputum.

in the above buffer, at room temperature. The collected fractions were analysed for protein absorbance at 278 nm and for neutral sugar content by an automated orcinol assay^[13]. Inhibitory activity was measured in microtitration plates: aliquots (5 μ l) were mixed with 200 μ l of 0.05M Tris/HCl buffer, pH 8.0 in the wells; a stock solution of active-site titrated bovine trypsin^[14] (6 mg/ml in HCl 1mM) was diluted 400-fold just before use in 0.5M Tris/HCl buffer, pH 7.8 containing 0.02M CaCl₂ and 0.1% (w/v) gelatin as in^[15] and 20 μ l were added: after a 15 min incubation period at room temperature, 20 μ l of a 10mM solution of Bz-Arg-Nan (from Merck) in dimethyl-formamide were finally added; absorbance at 405 nm was measured on a Uniskan II (Titertek) reader after varying periods.

Electrophoretic analysis

SDS-PAGE was performed according to Laemmli^[16] without pretreatment of the samples by 2-mercaptoethanol. Part of the gel was submitted to electric transfer^[17] on a nitrocellulose sheet (0.2 μ m porosity, Schleicher & Schüll) in a Novablot unit (LKB), according to the manufacturer instructions. M_r markers (Pharmacia) were stained on the nitrocellulose sheet with Amidoschwarz. Immunochemical revelation was performed according to the method of Towbin et al.^[17] with one modification: saturation was carried out with Tris buffer, containing 4% (w/v) defatted milk instead of bovine albumin. Peroxidase was developed as described by Hawkes et al.^[18]. Protein bands on the gel were stained with Coomassie blue R-250. Inhibitory activity on bovine chymotrypsin was visualized, after removal of SDS from the gel with Triton X-

100^[19], by the method of Uriel and Berges^[20]. Carbohydrate-containing material was stained by the PAS reagent^[21].

Results and Discussion

Fractions recovered from the dissociating procedure

The procedure comprising homogenization of non-purulent sputum with 1M NaCl followed by TCA extraction and fractionation on the cation-exchange resin CM-Trisacryl was previously described by Boudier et al.^[12]. It was chosen in this work as the reference method for the isolation of MPI: although the column equilibration buffer used was different (0.05M sodium acetate, pH 5.5, instead of 0.015M sodium phosphate, pH 6.5 in ref.^[12]), a similar profile was obtained with the NaCl gradient. As shown in Fig. 2A, the major, unretained fraction exhibits extensive reaction with orcinol, which indicates its high carbohydrate content; among the retained fractions, only that eluted at the beginning of the NaCl gradient is weakly orcinol reactive. Trypsin inhibitory activity is recovered partly in the unretained fraction and also localized in two retained, uncompletely resolved fractions (delimited by a bar on the diagram). Starting from 600 ml sputum, 2.76 g orcinol-reactive, unretained fraction and 5.2 mg free MPI were finally recovered after dialysis and lyophilisation. Analysis on SDS-PAGE in non-reducing conditions (not shown) allowed the visualization of inhibitory activity in the above fractions as three bands with M_r values of 26000, 20000 and 15000, the double-peak fraction eluted at the end of the gradient being identified as lysozyme. Immunochemical staining on nitrocellulose using antibodies against human bronchial MPI also showed positive reaction for the inhibitory bands contained in the unretained and retained fractions. These results clearly indicate that the salt/acid-extracted material obtained by the dissociating procedure contains:

- 1) part of MPI which is associated with carbohydrate-rich components not retained on the CM-Trisacryl column;
- 2) free MPI which, owing to its basic character, is retained on the column and only elutes with increasing ionic strength.

As their aim was to set up a rapid procedure for the isolation of free MPI for further characterization and extensive structural studies, Boudier et al.^[12] did not analyse the unretained fraction; our results show that MPI was uncompletely released in a free form by the NaCl/TCA extraction procedure or, if completely released, part of it reassociated with the carbohydrate-rich components during the dialysis step before column fractionation.

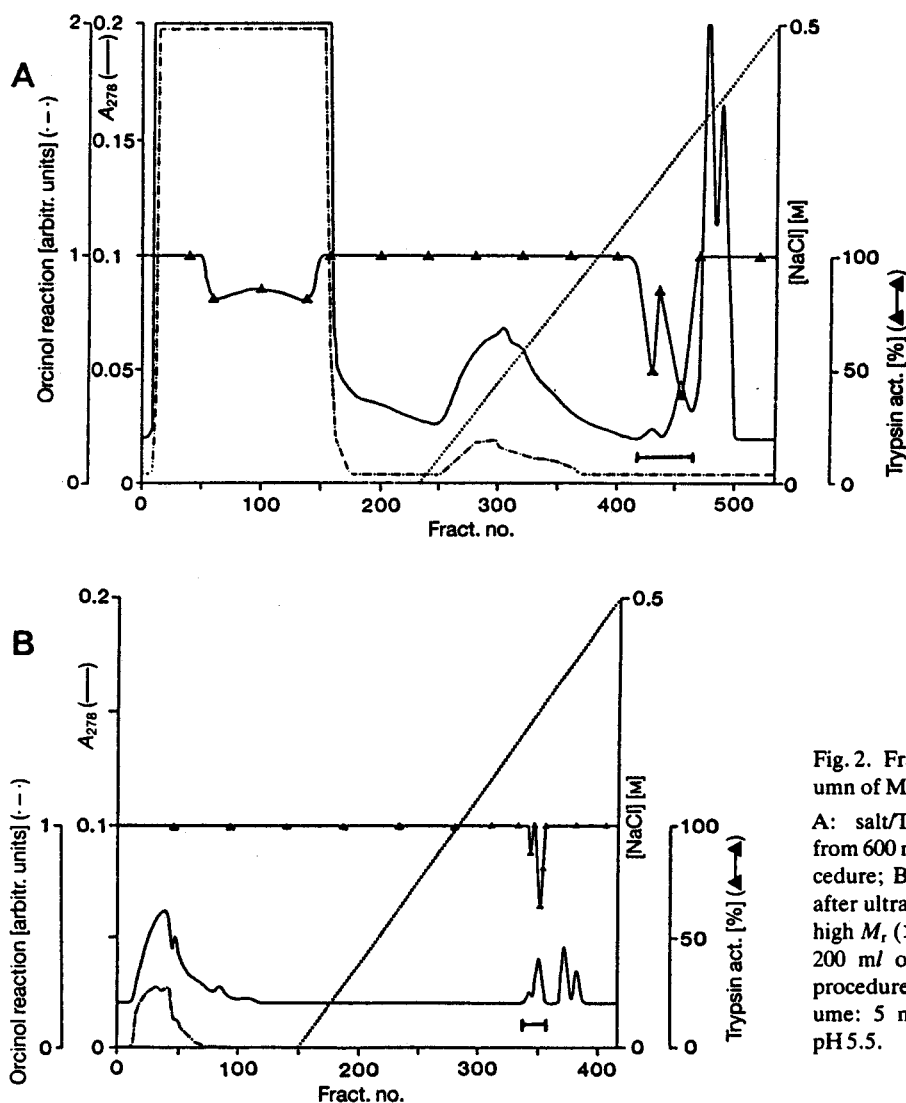


Fig. 2. Fractionation on CM-Trisacryl column of MPI-containing material.

A: salt/TCA-extracted material obtained from 600 ml of sputum by the dissociating procedure; B: $M_r < 100000_d$ fraction recovered after ultrafiltration of the salt/TCA-extracted high $M_r (> 100000_{nd})$ fraction obtained from 200 ml of sputum by the non-dissociating procedure. Flow rate: 40 ml/h; fraction volume: 5 ml; buffer: 0.05M sodium acetate, pH 5.5.

Fractions recovered from the non-dissociating procedure

We then attempted to isolate the different (bound and free) forms of MPI under which it would naturally be present in bronchial secretions. Extensive dilution of sputum with water which has already been described for the solubilisation of mucus glycoproteins^[22], was used; it was followed by ultrafiltration on a series of membranes with selected M_r cut-off (Fig. 1). This allowed to obtain fractions with different M_r values which were analysed on SDS-PAGE (Fig. 3). Inhibitory activity visualized as three bands (part B) and specific immunochemical staining (part C) show that MPI initially present in the sputum sample (slots 4, 8) is recovered only in a fraction with $M_r > 100000$ (slots 5, 9). No inhibitory activity is visible in fractions of M_r 100000 – 30000 (slot 6) and 30000 – 5000 (slot 7) neither is immunoreactive inhibitor present in frac-

tions of M_r 100000 – 30000 (slot 10). Thus, all inhibitory activity is associated with high $M_r (> 100000)$ components which are shown after protein staining (part A, slot 2) to remain at the top of the separation gel and to be carbohydrate-rich, as indicated by their high PAS reactivity (part D, slot 12). It is noticeable that lysozyme is also recovered in this fraction (part A, slot 2). M_r fraction 100000 – 30000 was expected to contain at least the complexes formed between MPI and its target serine proteinases from polymorphonuclear leukocytes, i.e. elastase and cathepsin G; these complexes, if present, would have released free, active MPI by the denaturing effect of SDS in the course of the electrophoretic procedure. Thus, sputum dilution 1:12 with water, by lowering the ionic strength of the sputum sample, might favour the close association of MPI with carbohydrate-rich, high M_r constituents.

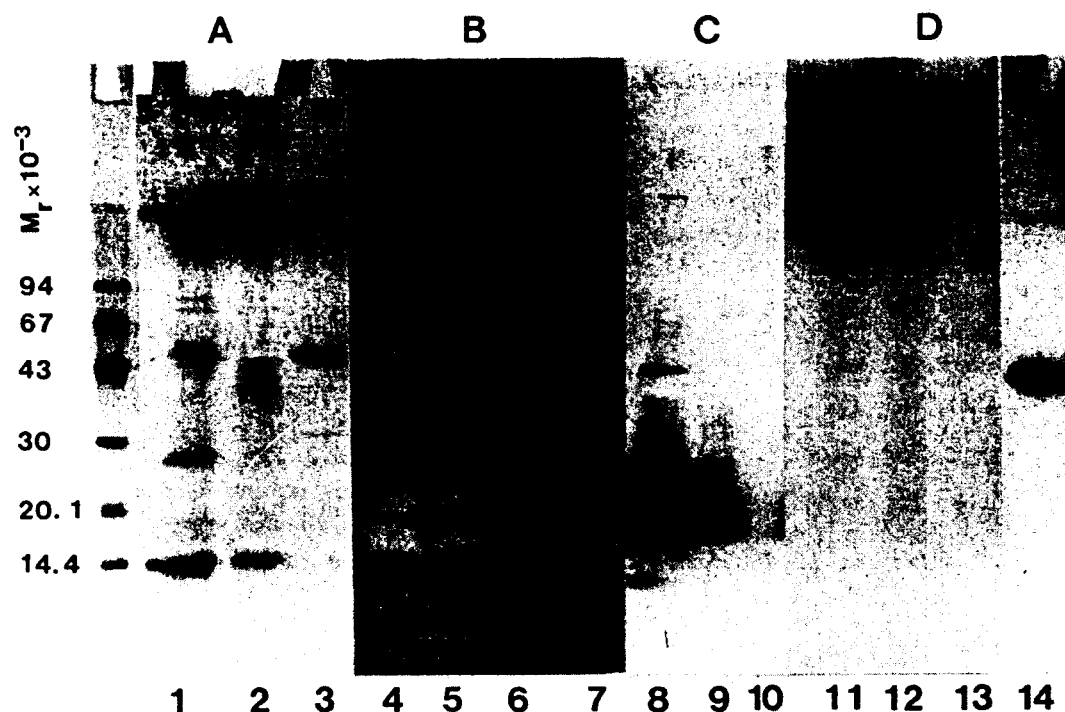


Fig. 3. Analysis on SDS-PAGE (10–25% gradient) of the different fractions obtained by the non-dissociating procedure upon ultrafiltration on selected membranes.

A: protein staining with Coomassie blue; B: inhibitory activity upon bovine chymotrypsin; C: immunochemical revelation on nitrocellulose with anti-human MPI IgG; D: PAS reaction of carbohydrate-containing material. Slots: 1,4,8,11, whole sputum sample; 2,5,9,12, $M_r > 100000_{nd}$ fraction; 3,6,10,13, fraction 100000 – 30000; 7, fraction 30000 – 5000; 14, human α_1 -acid glycoprotein. Only the M_r markers were reduced. The band at M_r 15000 is lysozyme.

Recovery of inhibitor from the $M_r > 100000_{nd}$ fraction

As no free inhibitor could be characterized in the low M_r fractions by the non-dissociating procedure, the MPI-containing $M_r > 100000_{nd}$ fraction was further subjected to the dissociating procedure, including salt and acid treatments (Fig. 1).

When directly applied to the CM-Trisacryl column, half of the salt/acid-treated material gave, as expected, a separation profile (not shown) quite similar to that obtained in Fig. 2A, starting from whole sputum. MPI was present:

- 1) in bound form with the unretained carbohydrate-rich fraction;
- 2) in free form retained on the column, as in the case of whole sputum.

From the retained inhibitory fraction, 1.8 mg free MPI was finally recovered starting from the material applied to the column which corresponded to 200 ml of sputum.

Half of the salt/acid dissociated material was submitted again to ultrafiltration on a M_r 100000 cut-off membrane (Fig. 1). SDS-PAGE analysis shown in Fig. 4 brings evidence that the inhibitory activity ini-

tially present in the $M_r > 100000_{nd}$ starting material (slots 1, 4) is recovered both in fraction with $M_r > 100000$ (slots 2, 5) and in fraction with $M_r < 100000$ (slots 3, 6). Noticeable again is the presence of lysozyme in the fractions containing the inhibitory activity (part A, slots 1–3). The $M_r < 100000_d$ fraction which contained inhibitor dissociated from high M_r (> 100000) components was finally applied to the CM-Trisacryl column in the same conditions as given above. As shown in Fig. 2B, this material contains a low amount of orcinol-reactive, unretained components; two small inhibitory peaks are separated with the NaCl gradient. Less than 0.2 mg free MPI was recovered, corresponding to 200 ml of sputum in the starting material.

From these results it was obvious that most of the inhibitor remained associated to the $M_r > 100000_d$ fraction, which explained why only a low amount of free MPI could be recovered from the cation-exchange column. In fact, MPI released in a free form following the dissociation step tends to reassociate with the high M_r components when the salts originally present in the MPI-containing material are removed from the retentate by sieving through the ultrafiltration mem-

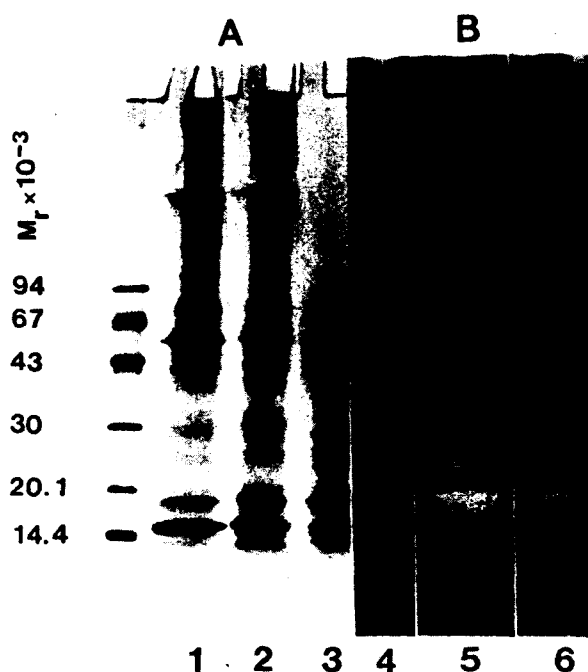


Fig. 4. Analysis on SDS-PAGE (10–25% gradient) of the $M_r > 100000_d$ fraction after being submitted to the dissociating procedure.

A: protein staining with Coomassie blue; B: inhibitory activity upon bovine chymotrypsin. Slots: 1,4,TCA soluble material before ultrafiltration; 2,5, $M_r > 100000_d$ fraction; 3,6: $M_r < 100000_d$ fraction. The band at M_r 15000 is lysozyme.

brane. This result brings another evidence that the ionic strength of the solvents greatly influences the behaviour of MPI when in presence of high M_r sputum constituents.

Physiological considerations

Mucin-type glycoproteins represent the major constituents of bronchial secretions^[22]. They are known to play a significant role in determining the rheological properties of the sputum, both in the normal and pathological states. Their carbohydrate content is about 70% of total mass, the composition including neutral sugars, hexosamines, sialic acid and sulfate^[23]. Interactions between basic proteins and mucins have already been investigated. The existence of complexes between lysozyme and mucus glycoproteins rich in sialic acid was previously described^[24]; this interaction which was shown to diminish with the increase of ionic strength was primarily but probably not exclusively of electrostatic origin^[24]. Binding of basic, although not identified low M_r proteins to glycoproteins was shown to occur when mucins were extracted under non-denaturing conditions from human tracheal aspirates^[25]; the authors suggested

that non-covalent interactions involved the amino groups of the basic proteins and the negatively charged residues of the glycoproteins. Another work reported that lysozyme and the acid mucins of sputum from patients with chronic obstructive lung disease formed aggregates at low ionic strength, probably as the result of electrostatic interactions between the two^[26].

In the present work, such in vitro interactions were shown to occur also between another basic protein, MPI, and mucin-type glycoproteins. Although they are reasonably thought to be of electrostatic origin, their exact nature remains to be precised as well as their occurrence in vivo. Assuming that salt concentration normally present in bronchial secretions is identical to physiological molarity (0.16M NaCl), conditions are in favour of in vivo interactions of MPI with mucins. We can therefore suggest a role for MPI in protecting the mucin layer on the surface of the bronchial epithelium from the hydrolytic attack by neutrophil proteinases. Alternatively, the consequence of this interaction might be a lack of accessibility of bound MPI to the sites where its target proteinases, elastase and cathepsin G, are released. It must be recalled that mucins are synthesized mainly in the mucous cells of the submucosal glands in the bronchial epithelium and that MPI is produced with lysozyme and lactoferrin in the serous cells of the same glands^[2]. Therefore, it cannot be excluded that interactions between these components might occur at the sites of secretion. Alterations of the electric charges of mucins by bound MPI might also lead to modifications of the viscoelastic properties of sputum. Whether mucin-bound MPI can efficiently participate to the mucosal defence of the respiratory tract against proteolytic enzymes remains to be investigated.

This work was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (GDR n° 147).

References

- 1 Fritz, H. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, suppl., 79–82.
- 2 Kramps, J.A., Franken, C., Meijer, C.J.L.M. & Dijkman, J.H. (1981) *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 712–719.
- 3 Hochstrasser, K., Reichert, R., Schwarz, S. & Werle, E. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 221–226.
- 4 Thompson, R.C. & Ohlsson, K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6692–6696.
- 5 Seemüller, U., Arnhold, M., Fritz, H., Wiedenmann, K., Machleidt, W., Heinzl, R., Appelhans, H., Gassen, H.-G. & Lottspeich, F. (1986) *FEBS Lett.* **199**, 43–48.
- 6 Stetler, G., Brewer, M.T. & Thompson, R.C. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 7883–7896.
- 7 Grutter, M.G., Fendrich, G., Huber, R. & Bode, W. (1988) *EMBO J.* **7**, 345–351.

- 8 Gauthier, F., Fryksmark, U., Ohlsson, K. & Bieth, J.G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **700**, 178-183.
- 9 Smith, C.E. & Johnson, D.A. (1985) *Biochem. J.* **225**, 463-472.
- 10 Ohlsson, K., Tegner, H. & Akesson, U. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 583-589.
- 11 Stockley, R.A., Morrison, H.M., Smith, S. & Tetley, T. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 587-595.
- 12 Boudier, C., Carvallo, D., Roitsch, C., Bieth, J.G. & Courtney, M. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 439-445.
- 13 Demaille, J., Dautrevaux, M., Havez, R. & Biserte, G. (1965) *Bull. Soc. Chim. France* **12**, 3506-3511.
- 14 Chase, T., Jr. & Shaw, E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 508-514.
- 15 Kramps, J.A., van Twisk, C., Klasen, E.C. & Dijkman, J.H. (1988) *Clin. Sci.* **75**, 53-62.
- 16 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.
- 17 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- 18 Hawkes, R., Niday, E. & Gordon, J. (1982) *Anal. Biochem.* **119**, 142-147.
- 19 Granelli-Piperno, A. & Reich, E. (1978) *J. Exp. Med.* **148**, 223-234.
- 20 Uriel, J. & Berges, J. (1968) *Nature (London)* **218**, 578-580.
- 21 Zaccharius, R.M., Teu, T.E., Morrison, J.H. & Woodlock, J.J. (1969) *Anal. Biochem.* **30**, 148-152.
- 22 Slayter, H.S., Lamblin, G., Le Treut, A., Galabert, C., Houdret, N., Degand, P. & Roussel, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* **142**, 209-218.
- 23 Houdret, N., Le Treut, A., Lhermitte, M., Lamblin, G., Degand, P. & Roussel, P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **668**, 413-419.
- 24 Creeth, J.M., Bridge, J.L. & Horton, J.R. (1979) *Biochem. J.* **181**, 717-724.
- 25 Harbitz, O., Jenssen, A.O. & Smidsrod, O. (1984) *Eur. J. Respir. Dis.* **65**, 515-520.
- 26 Snyder, C.E., Nadziejko, C.E. & Herp, A. (1982) *Int. J. Biochem.* **14**, 895-898.

Isabelle Van-Seuningen, Monique Davril* and Annette Hayem, Unité INSERM N° 16, Place de Verdun, F-59045 Lille Cedex, France.

* To whom correspondence should be sent.

CONCLUSIONS

1. La méthode d'ultrafiltration effectuée dans des conditions de faible force ionique pour favoriser la dispersion des mucines, n'a pas permis la séparation du MPI sous forme libre ou sous forme de complexes avec des enzymes : la totalité de l'inhibiteur présent dans le mucus est restée associée aux mucines.

2. Le MPI n'a pu être séparé partiellement des mucines qu'à la suite du traitement par l'acide trichloracétique.

3. Cette méthode n'est donc pas adaptée à notre problème : la purification du MPI en grande quantité devra s'effectuer dans des conditions plus dissociantes, notamment en présence d'une force ionique élevée.

4. Ce travail nous a cependant permis de mettre en évidence des interactions de type ionique entre MPI et mucines. On peut penser que *in vivo* où la concentration en NaCl est environ de 0,15M, l'interaction entre le MPI et les mucines est favorisée.

On peut donc envisager que le MPI, une fois associé aux mucines, a un rôle protecteur contre leur protéolyse par les enzymes libérés par les neutrophiles. De ce fait, l'inhibiteur participerait au maintien des propriétés rhéologiques du mucus.

D'autre part, comme le MPI est synthétisé par les cellules séreuses des glandes sous-muqueuses (52) et comme la majeure partie des mucines sont synthétisées par les cellules muqueuses de ces mêmes glandes (140), on peut supposer que les deux molécules interagissent dès qu'elles sont sécrétées. Il serait donc intéressant de pouvoir caractériser plus précisément les zones d'interaction du MPI au sein des molécules de mucines.

A. II. L'ULTRACENTRIFUGATION

A la suite des résultats précédents, nous avons choisi d'essayer de purifier le MPI en utilisant des conditions dissociantes mais non dénaturantes par l'utilisation de l'ultracentrifugation en gradient de bromure de césium (CsBr) selon la méthode de Woodward et coll. (137). Cette première étape est suivie soit d'une seconde ultracentrifugation effectuée dans les mêmes conditions soit d'une étape de chromatographie de gel-filtration en présence de NaCl 0,5M.

Nous avons ainsi pu étudier l'effet de la force ionique sur l'interaction entre MPI et mucines décrite dans le paragraphe précédent.

Dans ce travail, nous avons aussi étudié le comportement du lysozyme envers les mucines. Le lysozyme est une autre protéine basique présente dans la sécrétion bronchique qui joue un rôle dans la défense de l'arbre respiratoire en lysant la paroi des bactéries Gram +. Il est donc intéressant de pouvoir comparer les comportements de ces deux protéines qui présentent des propriétés physico-chimiques communes et qui sont synthétisées localement par les mêmes types de cellules (54).

Les compositions chimiques en sucres et en acides aminés des mucines purifiées dans les différents protocoles ont été comparées afin de mettre en évidence un effet possible du traitement acide. Ces mêmes mucines seront utilisées dans la suite de notre travail lors des études d'interaction à l'aide du dichroïsme circulaire (voir Chapitre II, § A.).

Les résultats sont présentés dans la publication suivante :

"Strong ionic interactions between mucins and two basic proteins, mucus proteinase inhibitor and lysozyme, in human bronchial secretions"

STRONG IONIC INTERACTIONS BETWEEN MUCINS AND TWO BASIC PROTEINS, MUCUS PROTEINASE INHIBITOR AND LYSOZYME, IN HUMAN BRONCHIAL SECRETIONS

ISABELLE VAN-SEUNINGEN, NICOLE HOUDRET, ANNETTE HAYEM and MONIQUE DAVRIL*
Unité INSERM No. 16, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, (France) [Tel. (0033) 2052-9484;
Fax (0033) 2052-7083]

(Received 31 January 1991)

Abstract—1. Mucins were isolated from sputum from a patient with chronic bronchitis and subjected to two different preparation procedures.

2. In the first procedure, CsBr density-gradient centrifugation gave rise to two well-separated fractions. Mucins recovered in the high-density fraction still contained mucus proteinase inhibitor (MPI) and lysozyme (LSZ).

3. Mucins were purified after a second step of CsBr density-gradient centrifugation or after gel-filtration chromatography with a buffer of high ionic strength, containing 0.5 M NaCl.

4. In the second procedure, trichloroacetic acid treatment of whole sputum followed by cation-exchange chromatography allowed the obtention of a non-retained fraction composed of mucins.

5. Gel-filtration in buffer containing 0.5 M NaCl, allowed the release of MPI and LSZ from mucins, thus confirming that interactions still occurred between those components.

7. These data support the hypothesis of the existence of ionic interactions between basic amino acid residues of MPI and LSZ and acid residues of the carbohydrate chains of mucins in the secretions of the large airways.

8. These interactions could play a role in the protection of mucins against proteolysis and consequently in the maintenance of rheological properties of the mucus gel in disease.

INTRODUCTION

Mucins, the main components of human bronchial secretions, are high-molecular mass polydisperse glycoproteins containing about 80% carbohydrate of complex structure, mostly linked *O*-glycosidically to their peptide backbone, with the presence of sialic acid and sulphate on the carbohydrate side chains (Slayter *et al.*, 1984; Roussel *et al.*, 1988). They are secreted in the submucosal glands of the large airways by the mucous and the goblet cells of the bronchial epithelium (Basbaum and Finkbeiner, 1989). In the mucus layer that protects the human respiratory mucosa, the mucins are associated with various components such as lipids (Houdret *et al.*, 1986), nucleic acids (Lethem *et al.*, 1990) and proteins (Snyder *et al.*, 1982; Harbitz *et al.*, 1984). It was shown that a strong ionic interaction occurred between mucins and a basic protein, lysozyme (LSZ) (Creeth *et al.*, 1979). Recently, evidence has been brought for the association of another basic protein from bronchial secretions, mucus proteinase inhibitor (MPI), with high-molecular mass, carbohydrate-rich components assumed to be mucins (Van-Seuningen *et al.*, 1989).

Mucus proteinase inhibitor is the common name given to the low-molecular mass (12 kDa) inhibitors

present in several mucous secretions (Fritz, 1988), which are encoded by a single gene (Stetler *et al.*, 1986). This molecule is synthesized in the respiratory tract mainly in the serous cells of the submucosal glands of the bronchial epithelium, together with lactoferrin (Bowes *et al.*, 1981) and LSZ (Franken *et al.*, 1989). The physiological role of bronchial MPI as a serine proteinase inhibitor is to protect the larger airways from proteolytic degradation by elastase and cathepsin G released by polymorphonuclear neutrophils at sites of inflammation (Kramps *et al.*, 1988).

Procedures for the isolation of MPI from bronchial secretions take advantage of its acid-stable character and involve a denaturing agent such as perchloric acid in order to release the inhibitor from its proteinase complexes (Ohlsson *et al.*, 1977). In our previous work (Van-Seuningen *et al.*, 1989), a close association of MPI with mucin-containing fractions was observed when using a non-denaturing sputum extraction procedure by water dilution, this result suggesting low ionic strength to be an important factor in the association process.

The present work was undertaken to characterize more precisely the type of linkage that occurred between mucins and MPI within the sputum. For the isolation of those components, we chose as first procedure CsBr density-gradient centrifugation, known to separate the bulk of proteins from mucins. The effect of the ionic strength for further mucin purification was studied by gel-filtration. The second procedure, which was previously used to purify MPI, included trichloroacetic acid extraction of sputum.

*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations MPI, mucus proteinase inhibitor; LSZ, lysozyme; M_r , relative molecular mass; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; TCA, trichloroacetic acid; CM, carboxymethyl; PAS, periodic acid-Schiff.

Finally, the purified mucins obtained were compared for their apparent molecular masses and their chemical compositions. Moreover, an hypothesis about the groups involved in the interactions is proposed and a role for these interactions *in vivo* is suggested.

MATERIALS AND METHODS

Collection of mucus

Non-purulent sputum was obtained from one patient suffering from chronic bronchitis. Specimens were collected daily and stored at -20°C until use. After thawing, the pooled material was subjected to two different preparation procedures as described below.

Materials

All chemicals were of analytical grade; cesium bromide was purchased from Merck. CM-Trisacryl M was supplied from Industrie Biologique Française. Sepharose 4B and the molecular mass standards were from Pharmacia Fine Chemicals. Rabbit IgG against human MPI from bronchial origin were kindly provided by Dr J. Tournier (Unité INSERM No. 314, Reims, France). Rabbit IgG against human LSZ were from Dako and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG were from Nordic.

Non-denaturing mucin preparation procedure

Solubilization of mucus. The material was diluted 1:12 with deionized water and left at 4°C overnight under gentle stirring, according to Slayter *et al.* (1984). Then the suspension (2600 ml) was centrifuged at 3000 *g* for 30 min; the supernatant was dialyzed for 72 hr at 4°C and lyophilized.

Cesium bromide (CsBr) density-gradient centrifugation. Aliquots (400 mg) of the above lyophilized supernatant were processed as previously described by Woodward *et al.* (1982). After centrifugation at 10°C for 48 hr at 42,000 rpm in a Beckman 60 Ti rotor, 0.8 ml fractions were collected from the bottom of each tube. Densities were measured by weighing 100 μl aliquots and fractions were assayed for hexose content by an automatic orcinol assay (Suzuki *et al.*, 1978) and for protein content by absorbance at 278 nm. The materials obtained from the two individualized peaks (Fig. 2a, top) were then dialyzed and lyophilized. One part of peak I (65 mg) was subjected to a second CsBr density-gradient centrifugation (Fig. 2a bottom) under the same conditions, in order to release the contaminant proteins from mucins.

Mucin preparation procedure including TCA treatment

Salt-acid extraction of mucus. The acid-soluble material was extracted from sputum as previously described by us. Briefly, sputum (1000 ml) was homogenized at 4°C in an equal volume of 2 M NaCl and 4% (w/v) trichloroacetic acid was added under stirring; the suspension was stirred overnight, centrifuged and the supernatant was brought to pH 5.5 with 2 M NaOH.

Cation-exchange chromatography on CM-Trisacryl M of the acid-soluble material. After dialysis against 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.5 the material was subjected to chromatography on a CM-Trisacryl M column as previously described (Van Seuningen *et al.*, 1989). The non-retained fraction was then dialyzed and lyophilized.

Gel-filtration chromatography in the presence of 0.5 M NaCl of mucin-containing fractions

The fractions to be studied were dissolved in 10 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.5 M NaCl and loaded on a Sepharose 4B column (98.0×2.5 cm) previously equilibrated in the same buffer.

Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Analytical electrophoresis was performed according to Laemmli (1970). A 10–25% acrylamide gradient under non-reducing conditions was used to detect the inhibitory activity of MPI. In order to study the mucins, SDS-PAGE was carried out on a 5–15% acrylamide gradient. Following electrophoresis, proteins were stained with Coomassie blue R-250 and carbohydrate with the periodic acid-Schiff method of Zaccharius *et al.* (1969). Visualization of inhibitory activity upon bovine chymotrypsin and immunostaining were performed as previously described (Van Seuningen *et al.*, 1989). Electrotransfer was carried out on the Phastsystem unit (Pharmacia) according to the manufacturer. For lipid staining, mucin samples were prestained for 30 min in the dark by mixing with an equal volume of a Sudan black solution prior to electrophoresis. Mucin samples (200 μg) were analysed on 15% SDS-PAGE. All the fractions of interest were free of lipids.

Chemical composition of mucins

The amino acid analyses were performed on a Beckman autoanalyser (119 CL) after hydrolysis of the samples in 5.6 M HCl for 24 hr at 110°C in tubes sealed under vacuum.

Quantitative gas-liquid chromatography of carbohydrate was performed by the method of Reinhold (1972), slightly modified according to Roussel *et al.* (1975).

The sialic acid content was measured by the thiobarbituric acid method of Aminoff (1961) after hydrolysis at 80°C with 0.05 M H_2SO_4 for 30 min. The sulphate group content was measured by the barium chloranilate method of Spencer (1960) after hydrolysis with 1 M HCl for 5 hr at 100°C .

RESULTS

The scheme of purification used to separate the mucins from other sputum components is shown in Fig. 1.

Non-denaturing procedure

After 1:12 water dilution of sputum, CsBr density-gradient centrifugation was used as a non-denaturing procedure known to isolate the mucin glycoproteins. Two fractions were obtained (Fig. 2a, top): peak I (high-density fraction), which was strongly orcinol reactive, essentially contained highly glycosylated macromolecules and peak II (low-density fraction) was composed of the bulk of proteins among which MPI and LSZ were detected by immunospecific staining (insert). As shown in Fig. 2b, the presence of mucins of high-molecular mass in peak I was confirmed on SDS-PAGE by a strong reaction in the stacking gel after PAS staining (slot 4). After Coomassie blue staining, low-molecular mass protein contaminants were visualized (slot 2). A well-defined band which corresponded to LSZ was located above the marker of M_r 14,400. Moreover, the shadowed area between the markers of M_r 30,000 and 15,000 was indicative of the presence of MPI.

In order to eliminate MPI and LSZ, peak I (65 mg) was purified by a second CsBr density-gradient centrifugation from which three fractions were recovered as indicated in Fig. 2a (bottom). Analysis of these fractions by electrophoresis showed that proteins of low-molecular mass were released in fractions I-2 and I-3 (Fig. 2b, slots 7 and 8); they were identified as MPI and LSZ by immunoblotting (Fig. 2a, insert). Mucins were free of these contaminants as no bands

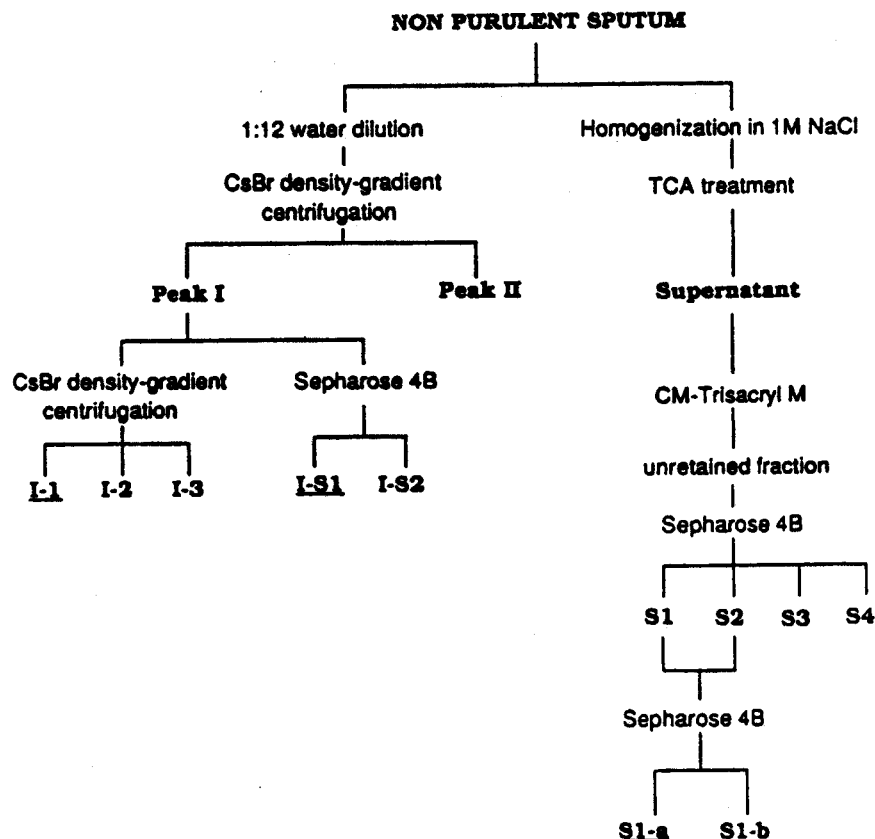


Fig. 1. Scheme of the two fractionation procedures of non purulent sputum from an individual with chronic bronchitis. Fractions of interest were dialyzed and lyophilized before study on SDS-PAGE; those underlined were analyzed for chemical composition.

corresponding to these proteins were visualized in fraction I-1 (Fig. 2b, Slot 6).

Another part of peak I (100 mg) was subjected to gel-filtration chromatography on Sepharose 4B in the presence of 0.5 M NaCl. The elution profile obtained (Fig. 3a) showed two fractions: the first one (I-S1) was orcinol positive and eluted at the void volume of the column. On SDS-PAGE (Fig. 3b), this high-molecular mass fraction remained at the top of the stacking gel and was strongly stained with the PAS reagent (slot 5); moreover, it was free of any contaminating protein, as no band was seen by Coomassie blue staining in slot 1 (100 μ g were loaded). The low-molecular mass fraction (I-S2) contained several protein bands (slot 2) which were PAS negative (Slot 6). The presence of a component of low molecular mass with inhibitory activity against bovine chymotrypsin was easily detected (slot 4). This inhibitor was identified as MPI by immunoblotting; the presence of LSZ in the same area of M_r 14,000 was also confirmed by this method (not shown). However, MPI and LSZ were minor components, since fraction I-S2 accounted for only 4% (by weight) of peak I.

Denaturing procedure

The procedure of extraction of sputum and fractionation on the cation-exchange resin CM-Trisacryl M was already described (Van-Seuningen *et al.*,

1989); the unretained fraction highly reactive with orcinol was assumed to be composed of mucins. It was then purified by gel-filtration on Sepharose 4B in the presence of 0.5 M NaCl under the same conditions as peak I isolated from ultracentrifugation (Fig. 1). The pattern obtained (Fig. 4a, top) was composed of four fractions. Detection of neutral sugars by the orcinol method showed a strong reaction in S1 and S2, indicating the presence of mucin components. One can notice that fraction S1 was not eluted at the void volume but was slightly included. Two other fractions, S3 and S4, corresponded to components of low molecular mass dissociated from mucins. On SDS-PAGE (not shown), S1 gave a highly positive reaction with PAS while in S2, mucins of lower molecular mass were found to penetrate completely the stacking gel, contrarily to those in S1; S3 was composed in majority of albumin and S4 of MPI and LSZ.

As some contaminating proteins were still present in the mucin-containing fractions, S1 and S2 were combined for further purification and were then applied to the same gel filtration column. The pattern obtained on Fig. 4a (bottom) showed two fractions: one of high molecular mass (S1-a) corresponding to the orcinol positive peak, the other being largely included (S1-b). The strong positive reaction with PAS in S1-a (Fig. 4b, slot 5) indicated the presence of purified mucins which were shown to penetrate the

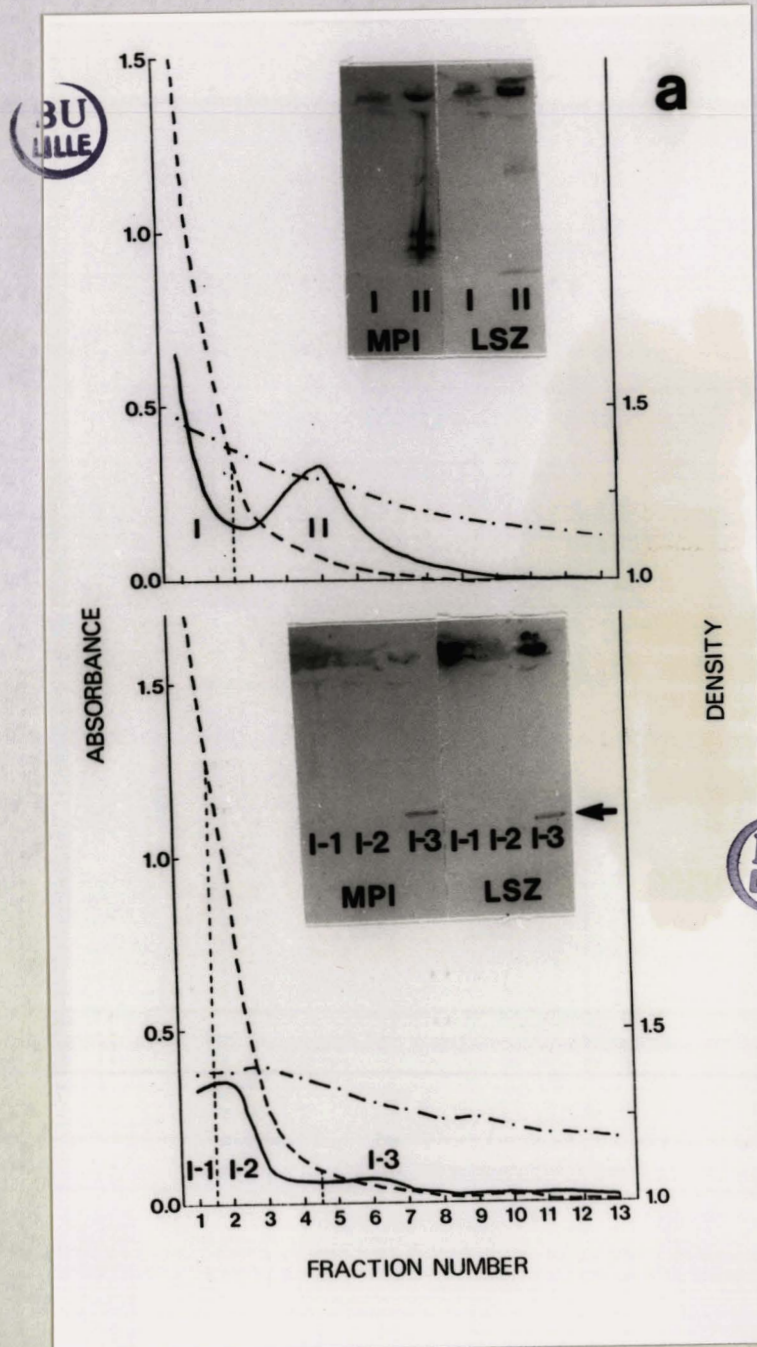


Fig. 2 (a). *Top*: ultracentrifugation in a CsBr density-gradient of the soluble material recovered from sputum by 1:12 water dilution, after dialysis and lyophilization an aliquot of 400 mg was processed; only the strongly orcinol reactive fraction (peak I) was investigated in this paper. *Insert*: separation on SDS-PAGE (Phastsystem) of 10 μ g each of both fractions and immunostaining with specific antisera against MPI (left) and LSZ (right), respectively. *Bottom*: ultracentrifugation under the same conditions as above of peak I (65 mg), *Insert*: immunospecific staining of the subfractions obtained, the arrow indicates the positions of MPI and LSZ. Fractions were analysed for absorbance at 278 nm (—) and for neutral hexose (---). Density was measured by weighing an aliquot (----).

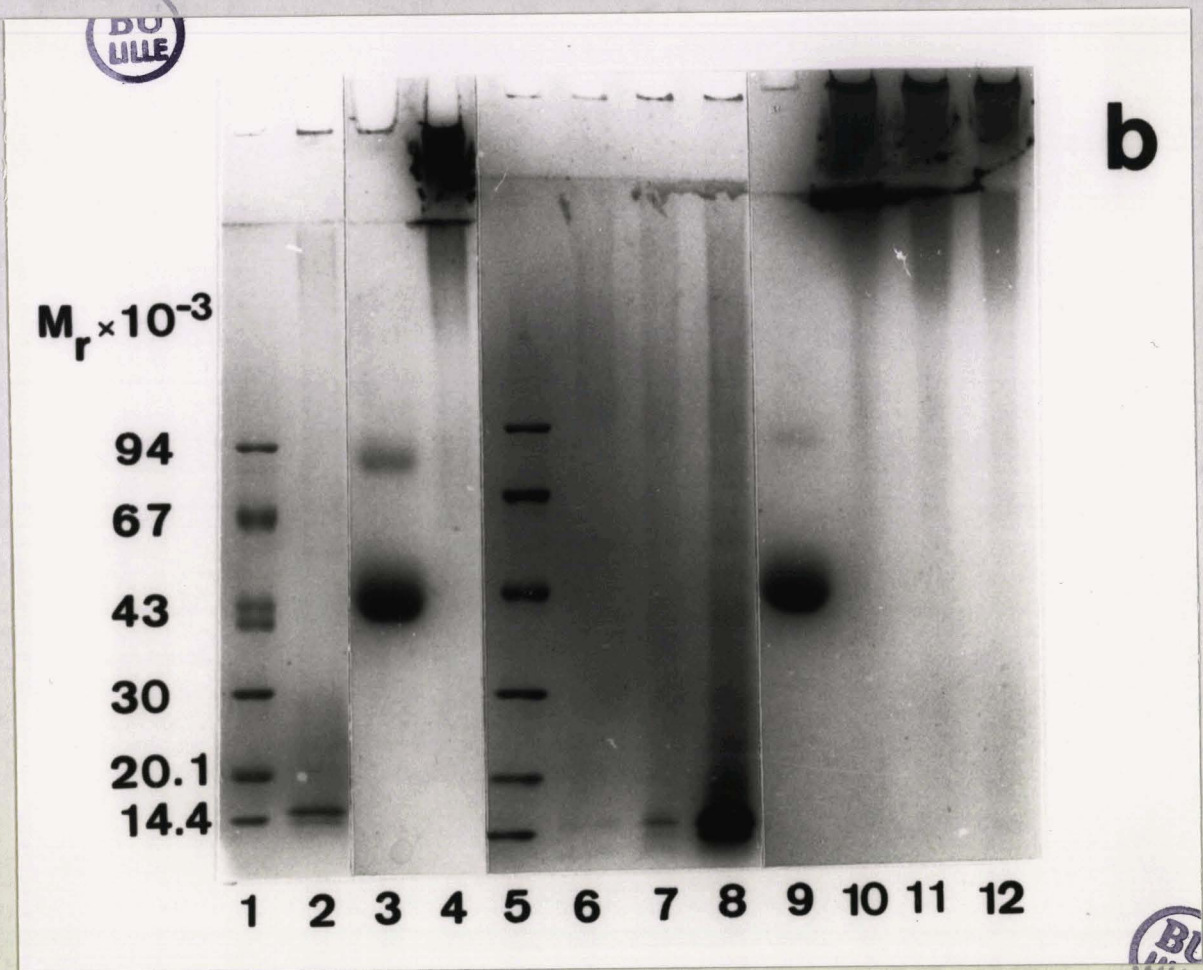


Fig. 2 (b). 5-15% SDS-PAGE of the fractions recovered following the two CsBr density-gradient centrifugations. Gel was stained with Coomassie blue (slots 1, 2, 5-8) and with PAS reagent (slots 3, 4, 9-12). Peak I: slots 2 and 4; fractions I-1, I-2 and I-3; slots 6, 7, 8 and 10, 11, 12, respectively. Molecular mass markers in slots 1 and 5 and marker for PAS reagent; slots 3 and 9: α_1 -acid glycoprotein.

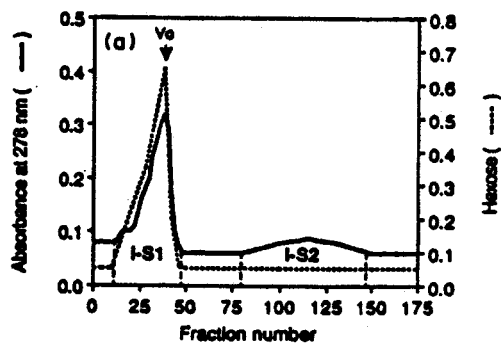


Fig. 3 (a). Sepharose 4B chromatography of Peak I from ultracentrifugation (100 mg) on a column (98.0 x 2.5 cm) equilibrated in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 containing 0.5 M NaCl. Flow rate 20 ml/hr, fraction volume 5 ml.

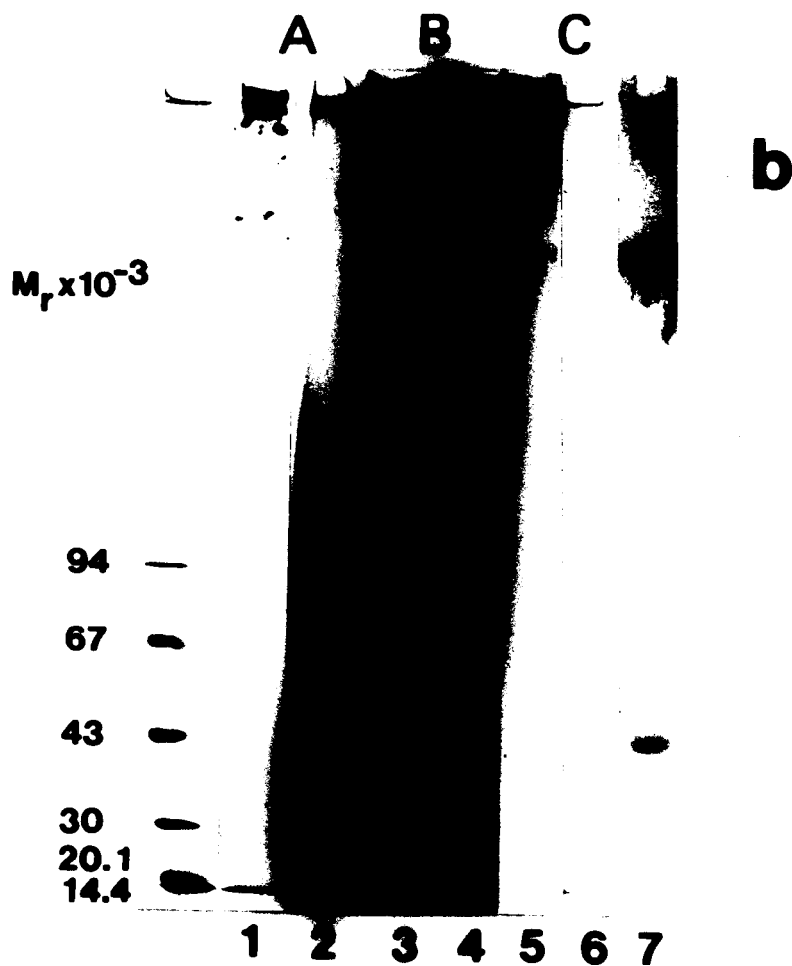


Fig. 3 (b). SDS-PAGE analysis of the two fractions obtained in part (a) on a slab gel with a 5-15% acrylamide gradient. A: protein staining with Coomassie blue; B: inhibitory activity against bovine chymotrypsin; C: PAS reaction. Slots 1, 3 and 5: fraction I-S1; slots 2, 4 and 6: fraction I-S2; slot 7: α -acid glycoprotein. Molecular markers on the left.

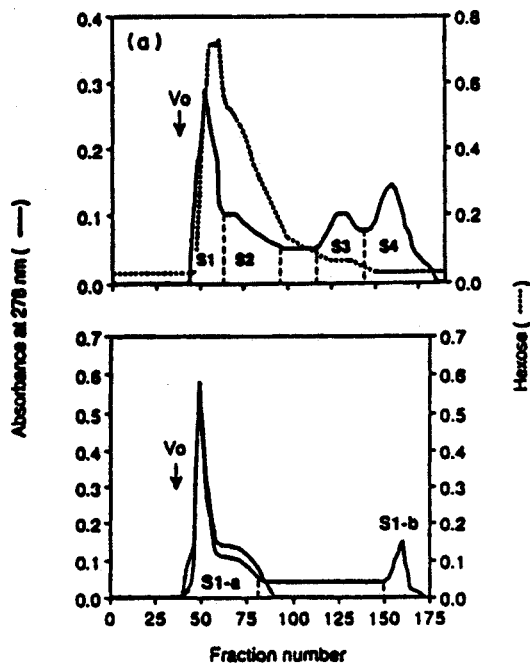


Fig. 4 (a). *Top*: Sepharose 4B chromatography of the mucin-containing fraction obtained from sputum by homogenization in the presence of 1 M NaCl, treatment with 4% TCA and fractionation of the acid-soluble material on CM-Trisacryl (see Fig. 1). The unretained fraction from the ion-exchange column (not shown) was subjected to gel filtration (100 mg) under the same conditions as in Fig. 3(a); four fractions were recovered. *Bottom*: Sepharose 4B chromatography of fractions S1 and S2 which were pooled together (50 mg) and applied on the column under the same conditions as above.

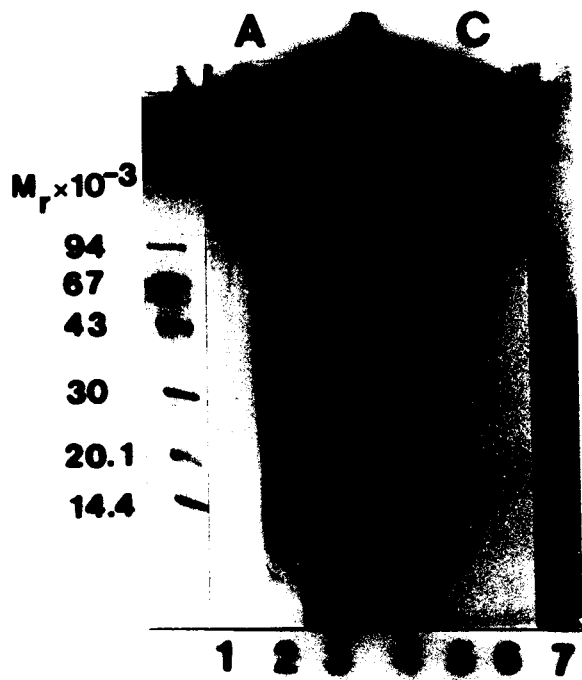


Fig. 4 (b). SDS-PAGE analysis on a 10-25% gradient of the two fractions recovered. Staining was as in Fig. 3b. Slots 1, 2 and 5: fraction S1-a; slots 3, 4 and 6: fraction S1-b; slot 7: α_1 -acid glycoprotein.

separation gel; they were free of contaminating proteins as no bands appeared in slot 1 by Coomassie blue staining and no inhibitory activity was found in slot 3. Inhibitory activity upon bovine chymotrypsin (slot 4) was only visualized in S1-b which also contained LSZ (slot 2).

Chemical composition of the purified mucins obtained in both procedures

The analyses were carried out on the purified mucin fractions I-1, I-S1 and S1-a. The results are shown in Table 1. Similar carbohydrate compositions were obtained for the three mucin preparations. The TCA treatment carried out on whole sputum had no dramatic effect on the carbohydrate content of the acid-soluble mucins purified subsequently (S1-a) when compared to that of native mucins purified following ultracentrifugation (I-1). The amino acid compositions of the three fractions were very similar; they were characterized by their high contents of serine, threonine and proline which accounted for 37.6% in I-1, 36.3% in I-S1 and 35.9% in S1-a.

DISCUSSION

In a previous work (Van-Seuningen *et al.*, 1989), we brought evidence that two strongly basic proteins, MPI and lysozyme, were tightly bound to the carbohydrate-rich components assumed to be mucins in sputum at low ionic strength. Preparation of native mucins previously described by others (Woodward

et al., 1982) included extensive dilution of sputum by water for dispersion of the fibrillar material before CsBr density-gradient centrifugation. However, the mucins isolated following ultracentrifugation by different groups (Snyder *et al.*, 1982; Creeth *et al.*, 1977) still contained some tightly but non-covalently bound unidentified low-molecular mass contaminating proteins. The authors had to perform two or three successive steps of ultracentrifugation to obtain pure mucins, thus detracting from the convenience of the method.

In this work, by using this procedure the mucins isolated in the high-density fraction after a first step of CsBr density-gradient centrifugation still contained some low-molecular mass components. In order to achieve the mucin purification and to study the effect of the ionic strength on the release of the low-molecular mass components from mucins, two different procedures were used. First, a second step of CsBr density-gradient centrifugation was performed. It led to a complete separation of the contaminants. As the milieu was very rich in salts, 42% (w/v) of CsBr, it can be assumed that a high ionic strength was suited to separate mucins from these tightly bound proteins. The other method chosen was gel-filtration chromatography carried out in a buffer containing 0.5 M NaCl. Once again, the low-molecular mass components were released from mucins. Thus, direct evidence was provided in these two experiments for the dissociating effect of the high ionic strength on the bonds involved between mucins and other low-molecular mass components in sputum.

Such an effect on the ionic interaction between LSZ and mucins was already described (Harbitz *et al.*, 1984; Creeth *et al.*, 1977). Our results implicate that not only bronchial LSZ interacts with mucins, but also a second basic protein, secreted by the serous cells of the bronchial tree, i.e. MPI; the latter was shown to have the same behaviour as LSZ towards mucins. A previous study (Snyder *et al.*, 1982) pointed out that interaction between amino groups of unidentified basic proteins and negatively charged residues of mucins might be important in determining the rheological behaviour of mucociliary secretions. MPI is an inhibitor of human leukocyte elastase; a recent *in vitro* study demonstrated that this enzyme was able to cleave hog gastric mucins in physiological conditions (Poncz *et al.*, 1988). Experiments tending to prove that human leukocyte elastase also hydrolyzes bronchial mucins are now in progress in our laboratory. The interaction of MPI with mucins allowing protection of these mucins from elastase degradation might be of great interest in maintaining the rheological properties of mucins (viscosity and elasticity). In conclusion, the purified non-denatured mucins obtained on gel-filtration in the presence of 0.5 M NaCl could be considered as representative of the whole native mucins in the bronchial secretion investigated.

In our previous work (Van-Seuningen *et al.*, 1989), it was shown that the TCA-soluble mucins recovered in the non-retained fraction from a CM-Trisacryl column still contained some MPI and LSZ. They were purified here by two consecutive gel-filtration steps in the presence of 0.5 M NaCl. However, as in this procedure the part of mucins which were TCA-

Table 1. Chemical compositions of the mucins isolated from sputum.

	I-1	I-S1	S1-a
Fucose	13.3	14.5	12.0
Mannose	0.5	0.6	0.6
Galactose	21.9	19.1	19.0
N-Acetylglucosamine	20.5	16.6	17.6
N-Acetylgalactosamine	13.2	8.3	8.0
Sialic acid	3.9	4.2	4.0
Glucose	0.9	0.7	0.7
Total carbohydrate	73.6	64.0	61.9
Sulphate	n.d.	3.0	3.0
Aspartic acid	6.8	6.2	6.3
Threonine	17.5	17.1	16.9
Serine	10.0	10.4	9.8
Glutamic acid	8.7	8.5	7.8
Proline	10.1	8.8	9.2
Glycine	8.5	9.5	8.0
Alanine	8.0	8.8	8.7
Valine	4.7	5.4	5.5
1/2 Cystine	3.5	2.6	2.5
Methionine	0.4	1.3	1.2
Isoleucine	2.5	2.9	2.9
Leucine	6.3	6.4	6.9
Tyrosine	1.8	1.7	2.2
Phenylalanine	2.9	2.5	2.7
Lysine	2.3	2.3	2.6
Histidine	2.3	2.1	2.2
Arginine	3.7	3.6	3.9
Total amino acid	14.9	17.2	20.2

Mucins were isolated from sputum either by density-gradient centrifugation followed by a second CsBr density-gradient centrifugation (fraction I-1), by Sepharose 4B gel-filtration (fraction I-S1) or by TCA treatment followed by ion-exchange and gel-filtration chromatography (fraction S1-a). Carbohydrate, sulphate and total amino acid are expressed in percentage of dry weight and amino acids in residues per 100 residues. n.d.: not determined.

precipitable was not recovered, the TCA-denatured soluble mucins investigated here did not account for the whole mucin amount of the bronchial secretion; the TCA-soluble mucins appeared to be of a lower molecular mass (not excluded by gel-filtration and of higher mobility in SDS-PAGE) when compared to the non-denatured mucins purified in the first procedure. One can hypothesize that the lower molecular mass observed is a characteristic inherent to the TCA-soluble mucins or that some hydrolytic cleavage of the mucin peptide backbone might have occurred following TCA treatment.

Finally, The mucins isolated in this work will serve further investigations designed to isolate glycopeptides of different charges, in order to determine whether specific acid groups are involved in the interactions of mucins with the two basic proteins MPI and LSZ. It will be interesting to determine the importance of these ionic interactions in pathological situations where the salt concentration of bronchial secretions is decreased and/or where the acid group content of mucins is increased, such as in cystic fibrosis (Chace *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1989).

REFERENCES

- Aminoff D. (1961) Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 81, 384-392.
- Basbaum C. B. and Finkbeiner W. E. (1989) In *Lung Cell Biology*, Vol. 41 (Edited by Massaro D.), pp. 37-79. *Marcel Dekker, New York.
- Bowes D., Clark A. E. and Corrin B. (1981) Ultrastructural localization of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. *Thorax* 36, 108-115.
- Chace K. V., Naziruddin B., Desai V. C., Flux M. and Sachdev G. P. (1989) Physical properties of purified human respiratory mucus glycoproteins: effects of sodium chloride concentration on the aggregation properties and shape. *Exp. Lung Res.* 15, 721-737.
- Cheng P.-W., Boat T. F., Cranfill K., Yankaskas J. R. and Boucher R. C. (1989) Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J. clin. Invest.* 84, 68-72.
- Creeth J. M., Bhaskar K. R., Horton J. R., Das I., Lopez-Vidriero M.-T. and Reid L. (1977) The separation and characterization of bronchial glycoproteins by density-gradient methods. *Biochem. J.* 167, 557-569.
- Creeth J. M., Bridge J. L. and Horton J. R. (1979) An interaction between lysozyme and mucus glycoproteins. *Biochem. J.* 181, 717-724.
- Franken C., Meijer C. J. L. M. and Dijkman J. H. (1989) Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 493-498.
- Fritz H. (1988) Human mucus proteinase inhibitor (human MPI). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369 (Suppl.), 79-82.
- Harbitz O., Jenssen A. O. and Smidsrød O. (1984) Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients with chronic obstructive lung disease. *Eur. J. Respir. Dis.* 65, 512-520.
- Houdret N., Perini J. M., Galabert C., Scharfman A., Humbert P., Lamblin G. and Roussel P. (1986) The high lipid content of respiratory mucins in cystic fibrosis is related to infection. *Biochim. biophys. Acta* 880, 54-61.
- Kramps J. A., Willems L. N. A., Franken C. and Dijkman J. H. (1988) Antileukoprotease, its role in the human lung. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369 (Suppl.), 83-87.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lethem M. I., James S. L., Marriott C. and Burke J. F. (1990) The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur. Respir. J.* 3, 19-23.
- Ohlsson K., Tegner H. and Akesson U. (1977) Isolation and partial characterization of a low molecular weight acid stable protease inhibitor from human bronchial secretion. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 583-589.
- Poncz L., Jentoft N., Ho M.-C. D. and Dearborn D. G. (1988) Kinetics of proteolysis of hog gastric mucin by human neutrophil elastase and by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.* 56, 703-704.
- Reinhold V. N. (1972) Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrate in glycoproteins. *Meth. Enzymol.* 25, 244-249.
- Roussel P., Lamblin G., Degand P., Walker-Nasir E. and 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.
- Roussel P., Lamblin G., Lhermitte M., Houdret N., Lafitte J. J., Perini J. M., Klein A. and Scharfman A. (1988) The complexity of mucins. *Biochimie* 70, 1471-1482.
- Slyter H. S., Lamblin G., Le Treut A., Galabert C., Houdret N., Degand P. and Roussel P. (1984) Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 142, 209-218.
- Snyder C. E., Nadziejko C. E. and Herp A. (1982) Binding of basic proteins to glycoproteins in human bronchial secretions. *Int. J. Biochem.* 14, 895-898.
- Spencer B. (1960) The ultramicrodetermination of inorganic sulphate. *Biochem. J.* 75, 435-440.
- Stetler G., Brewer M. T. and Thompson R. C. (1986) Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. *Nucleic Acids Res.* 14, 7883-7896.
- Suzuki M., Boersma A., Degand P. and Biserte G. (1978) Etude biochimique comparative des glycosaminoglycannes peptides du cartilage articulaire de la tête femorale humaine normale et arthrosique. *Clin. chim. Acta* 87, 229-238.
- Van-Seuningen I., Davril M. and Hayem A. (1989) Evidence for the tight binding of human mucus proteinase inhibitor to highly glycosylated macromolecules in sputum. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 749-755.
- Woodward H., Horsey B., Bhavanandan V. P. and Davidson E. A. (1982) Isolation, purification, and properties of respiratory mucus glycoproteins. *Biochemistry* 21, 694-701.
- Zaccharius R. M., Teu T. E., Morrison J. H. and Woodlock J. J. (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 30, 148-152.

CONCLUSIONS

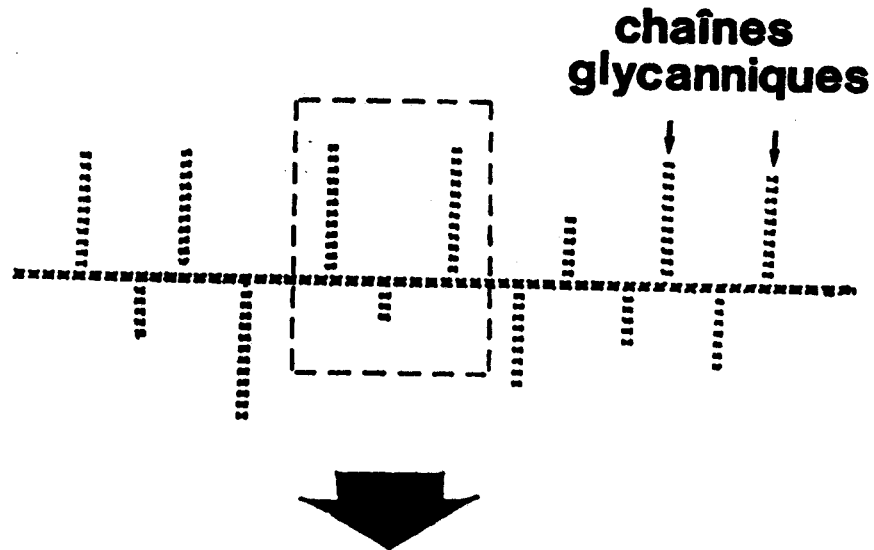
1. L'ultracentrifugation effectuée en présence d'une force ionique très élevée (42% de CsBr) suivie soit d'une deuxième ultracentrifugation, soit d'une étape de chromatographie de gel-filtration en présence de NaCl 0,5M a permis de séparer les petites molécules basiques des mucines. Ce résultat confirme l'hypothèse que ces différents composants interagissent par l'intermédiaire de liaisons ioniques.

2. Dans les sécrétions bronchiques, nous avons identifié l'inhibiteur bronchique et le lysozyme comme étant les deux protéines basiques fortement associées aux mucines par des liaisons de type ionique.

3. Les mucines obtenues dans les différents protocoles montrent des compositions chimiques semblables ; toutefois, après le traitement acide, il semble que leur masse moléculaire soit plus faible.

4. A la suite de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une interaction par l'intermédiaire des groupements basiques du MPI avec les résidus acides (acide sialique et sulfate) présents sur les chaînes glycaniques des mucines. D'autre part, on peut aussi envisager une interaction de type peptide-peptide au niveau de l'axe peptidique des mucines (Fig. 6).

schématisation des mucines



Hypothèses d'interaction MPI-mucines

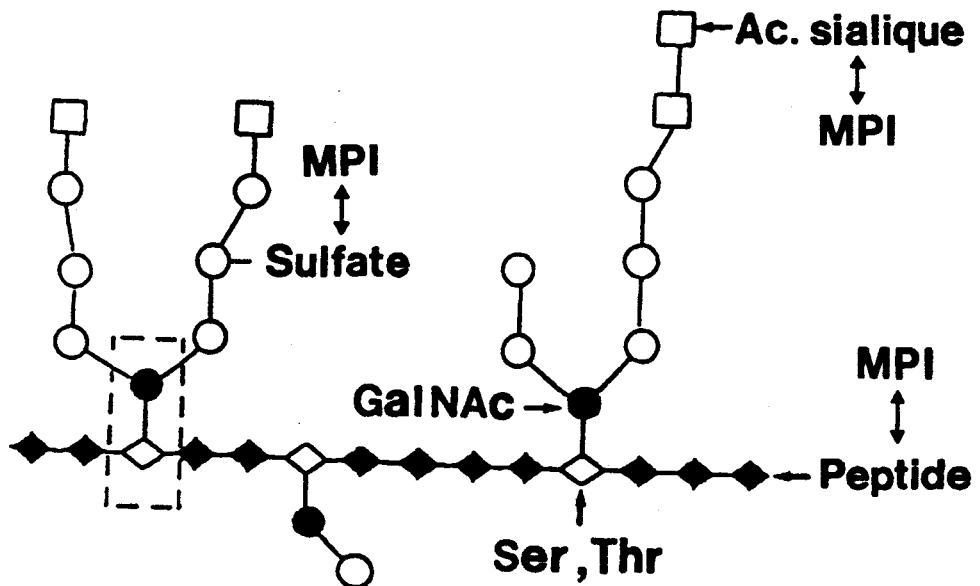


Figure 6 : Schéma présentant les hypothèses d'interaction entre l'inhibiteur bronchique et les mucines.

A. III. PROTOCOLE INCLUANT UNE ETAPE D'EXTRACTION EN MILIEU ACIDE

La méthode utilisée est celle décrite par Boudier et coll. (48), légèrement modifiée (Tableau IX).

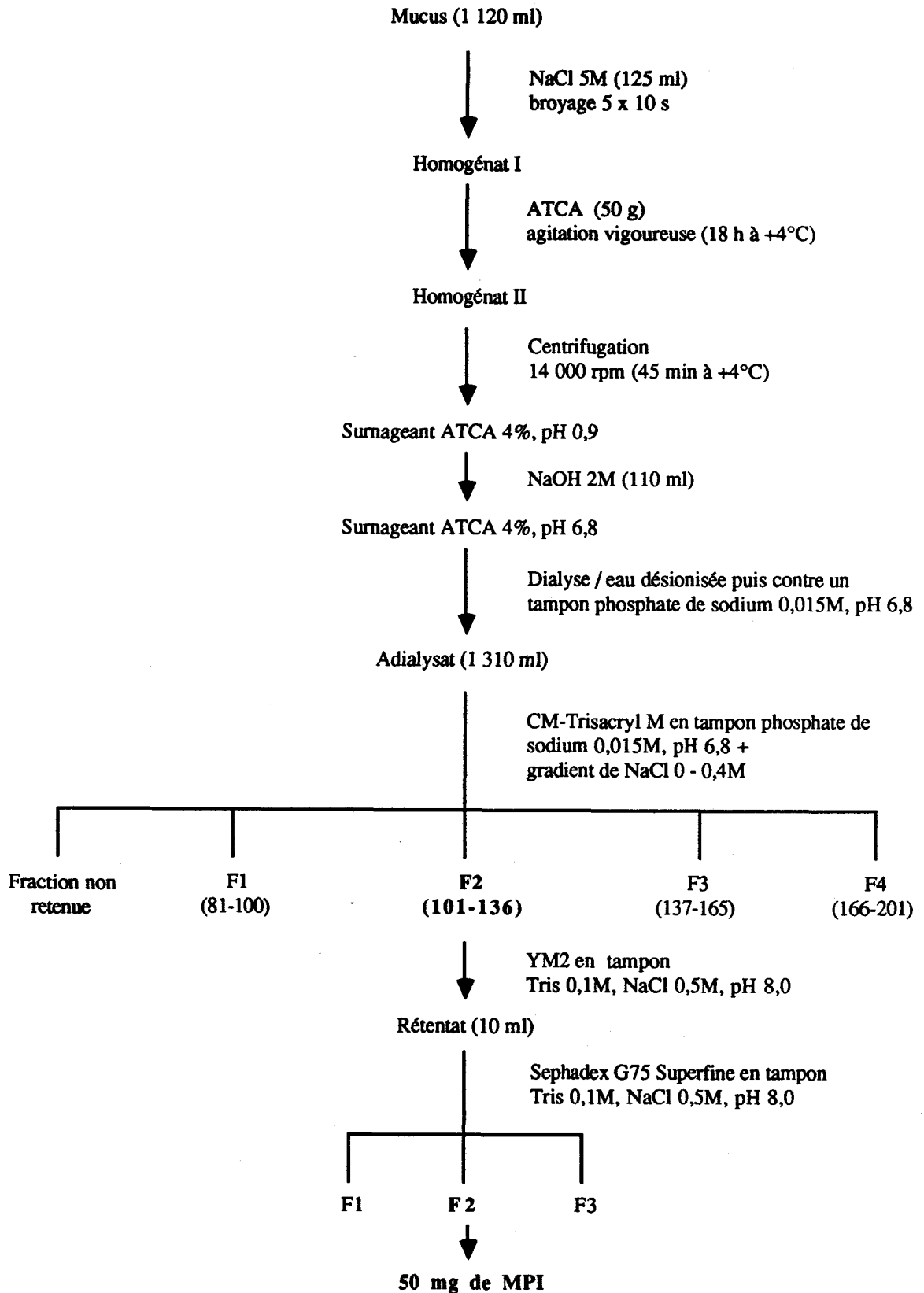
A. III. 1. Extraction par l'acide trichloracétique

L'expectoration traitée provient d'un malade âgé de 68 ans hospitalisé pour une bronchite chronique non infectée. Le liquide apparaît légèrement jaunâtre.

A 120 ml de mucus dont 100 ml de phase soluble, sont ajoutés 125 ml de NaCl 5M et le milieu est homogénéisé 5 x 10 s avec un broyeur (Polytron). A l'homogénat obtenu, 50 g d'acide trichloracétique (ATCA) sont ajoutés sous une agitation vigoureuse, celle-ci étant maintenue pendant 18 h à +4°C. Le mélange est ensuite centrifugé à 14 000 rpm à +4°C pendant 45 min. Le pH du surnageant égal à 0,9 est amené à 6,8 par NaOH 2M (environ 110 ml), puis cet extrait est dialysé contre de l'eau désionisée (3 x 10 l), dans des tubes (Spectrapor) ayant une limite d'exclusion de M_r 3 500. Une deuxième série de dialyses (4 x 10 l) contre du tampon phosphate de sodium 0,015M, pH 6,8 est ensuite effectuée.

A. III. 2. Purification sur colonne de CM-Trisacryl M

L'extrait obtenu (1 310 ml) est déposé sur une colonne échangeuse de cations de CM-Trisacryl M (15 x 2,5 cm) (IBF) équilibrée dans le tampon phosphate de sodium 0,015M, pH 6,8. Le dépôt est effectué à 60 ml/h puis la colonne est lavée avec le même tampon jusqu'à ce que l'absorption à 278 nm soit revenue au niveau de la ligne de base. Un gradient de NaCl (0-0,4M NaCl dans le tampon ci-dessus) est ensuite mis en oeuvre afin de séparer les différentes protéines basiques retenues sur l'échangeur (Fig. 7). La densité optique à 278 nm reste relativement faible sauf pour la dernière fraction (tubes 175-201) qui est constituée exclusivement de lysozyme. L'activité inhibitrice envers la trypsine bovine mesurée en plaques de microtitration (voir Annexe technique, § F.) a été repérée dans les tubes 101 à 165. Nous avons séparé cette fraction en deux sous-fractions (tubes 101-136 et 137-165) afin d'éviter la contamination de la première par le lysozyme : celles-ci ont ensuite été concentrées à 10 ml par ultrafiltration sur une membrane YM2 (Amicon).

TABLEAU IX**Protocole de purification de l'inhibiteur bronchique**

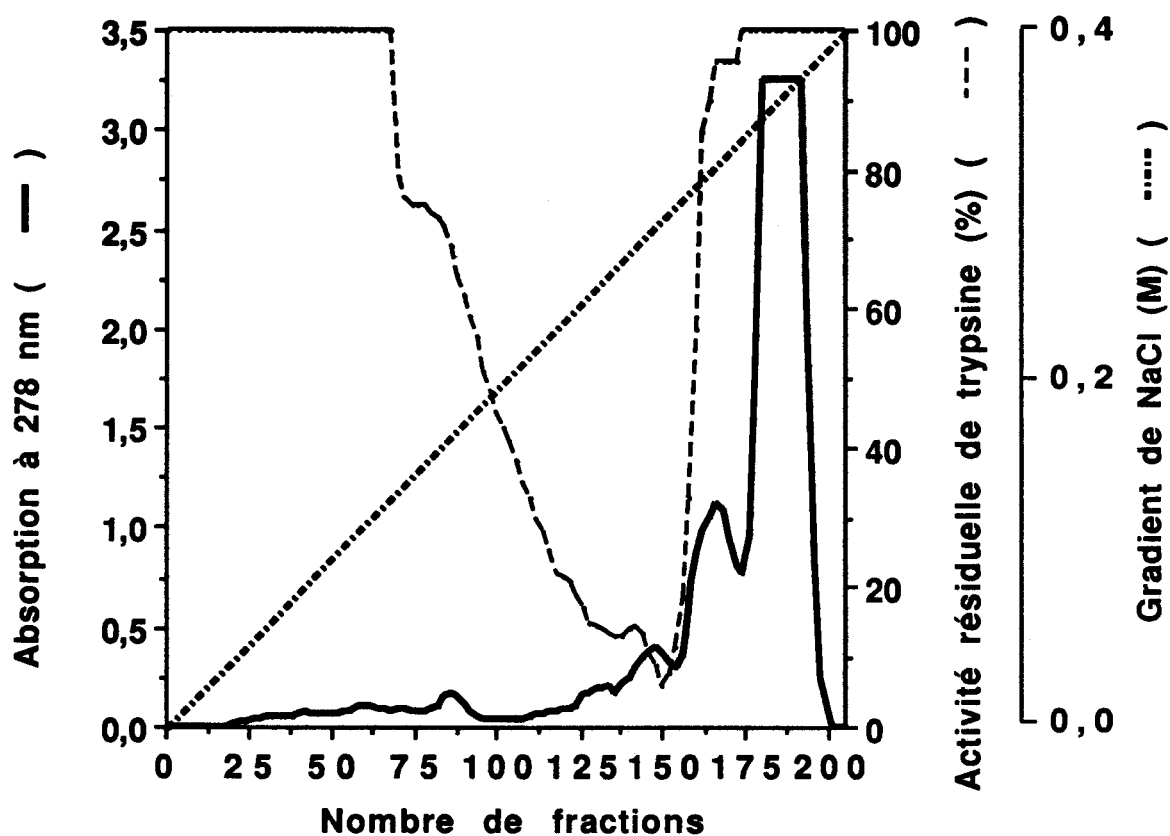


Figure 7 : Chromatographie sur colonne de CM-Trisacryl M (15 x 2,5 cm) de l'adialysat (1 310 ml). Après le dépôt, la colonne est lavée par le tampon d'équilibre phosphate de sodium 0,015M, pH 6,8, puis un gradient de NaCl de 0 à 0,4M est mis en oeuvre. Le débit est de 40 ml/h et le volume des fractions recueillies est de 5 ml.

A. III. 3. Gel-filtration sur colonne de Sephadex G75 Superfine

Après avoir été concentrée à 10 ml, la fraction 101-136 est équilibrée dans du tampon Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,0 contenant 0,02% d'azide de sodium. Le rétentat obtenu est déposé sur une colonne de Sephadex G75 Superfine (98 x 2,5 cm) (Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La fraction contenant l'activité anti-trypsique (tubes 46-57) est rassemblée, dialysée et lyophilisée (Fig. 8). Nous n'avons pas récupéré les tubes 58 à 61, afin d'éviter toute contamination par le reste de lysozyme contenu dans la fraction 62-73.

50 mg de MPI ont été purifiés à partir de 1 120 ml de mucus (Tableau IX). Le rendement est meilleur que celui obtenu dans la littérature pour une expectoration provenant d'un malade atteint de bronchite chronique non infectée (48). Mais il est bien connu que les concentrations en MPI dans les expectorations sont variables d'un individu à l'autre : 4 à 405 mg/l pour Kramps et coll. (4) et 37 à 151 mg/l pour Tournier et coll. (50).

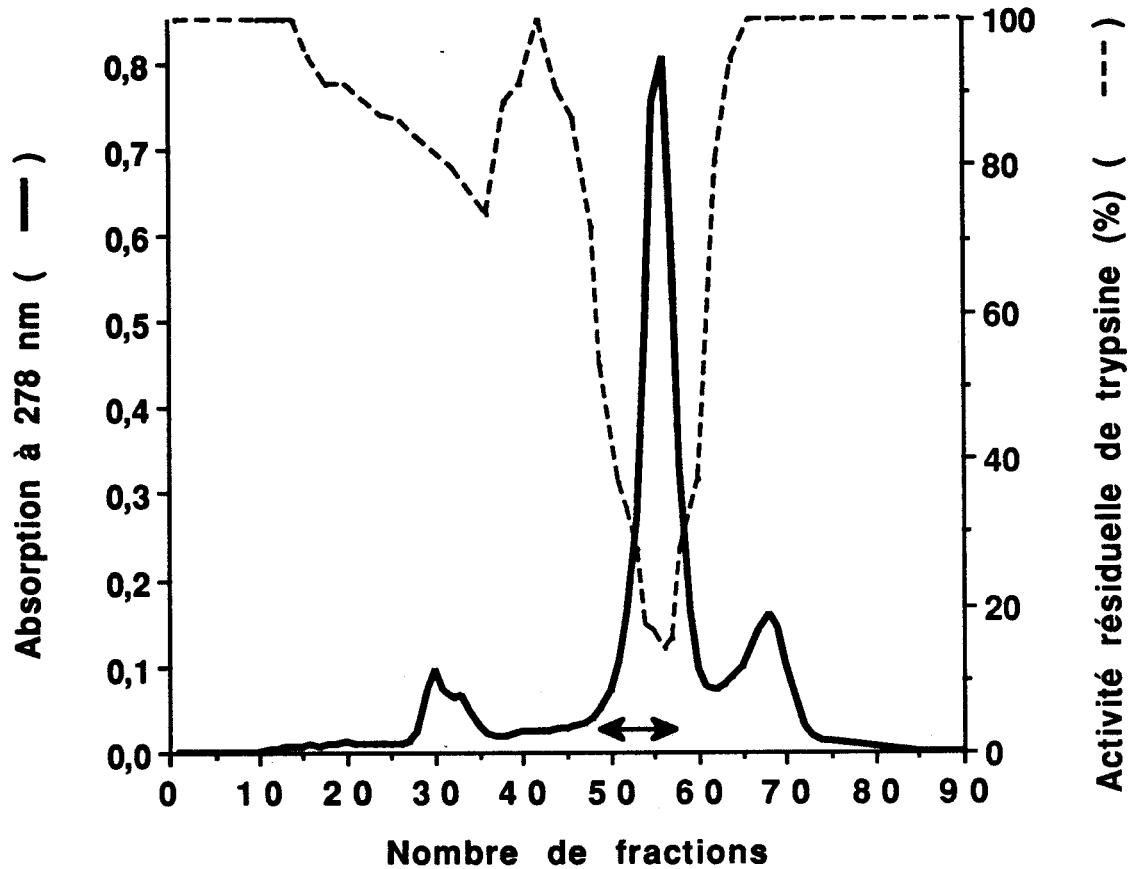


Figure 8 : Chromatographie sur colonne de Sephadex G75 Superfine (98 x 2,5 cm) de la fraction 101 à 136 obtenue précédemment (Fig. 7). Le tampon d'élution est du Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,0. Le débit est de 20 ml/h et le volume des fractions recueillies de 5 ml. La fraction indiquée par la double flèche (fractions 46-57) a été récupérée de manière à éviter toute contamination par le lysozyme (fractions 62-73).

B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE

B. I. CRITERES DE PURETE

B. I. 1. Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

La pureté de la préparation de MPI a été vérifiée par SDS-PAGE sur PhastGel 8-25% (Fig. 9). Quand l'échantillon à déposer est dénaturé par le SDS (2%) en présence de réducteur, une seule bande de $M_r = 15\ 000$ est visualisée (partie A, ligne 1). En absence de réducteur, la migration du MPI est différente ; plusieurs bandes sont en effet visualisées (partie B, ligne 1). Ce phénomène s'explique facilement par le fait que la molécule de MPI contient huit ponts disulfure et que par conséquent la fixation de SDS n'est ni optimale, ni homogène. En théorie, les protéines globulaires fixent 1,4 g de SDS par g de protéine tandis que cette quantité se situe entre 0,7 et 0,9 g pour des molécules riches en ponts disulfure (141). Nous avons vérifié ce phénomène en dénaturant l'inhibiteur en présence de 20% de SDS : dans ce cas, une bande homogène est obtenue, de migration identique en présence (partie A, ligne 2) ou en absence (partie B, ligne 2) de réducteur, correspondant à une M_r proche de 19 000. Dans tous les cas, les masses apparentes obtenues sont nettement supérieures à la masse théorique de 11 726 (49).

B. I. 2. Electrophorèse en gel d'acrylamide à pH 4,3

Le MPI étant une protéine basique, nous pouvons vérifier sa pureté dans le système de gel acide décrit par Reisfeld et coll. (142) légèrement modifié (voir Annexe technique, § A. II.). Le MPI est détecté sous la forme d'une seule bande moins fine qu'en SDS-PAGE (voir Annexe technique, § D. II., manuscrit) qui est le système d'électrophorèse le plus résolutif.

B. I. 3. Electrophorèse dans un gradient de pH 4-11

Ce système mis au point au laboratoire permet de déterminer le pH_i de protéines basiques (voir Annexe technique, § A. III.) : le MPI a un $pH_i > 10,5$.

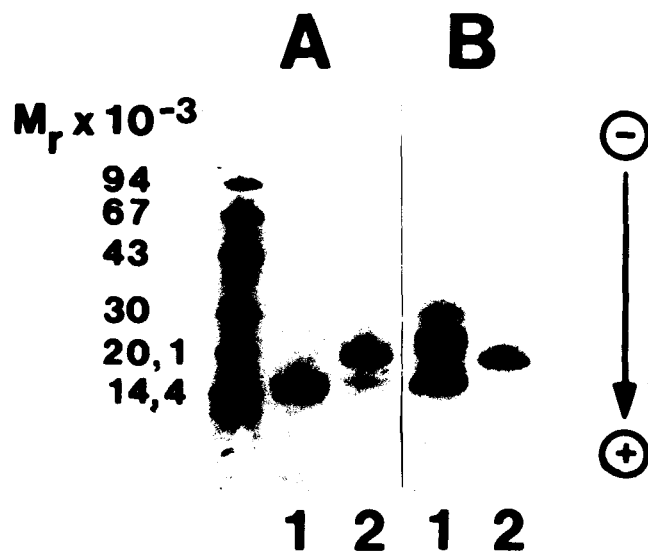


Figure 9 : SDS-PAGE sur PhastGel (gradient 8-25%) du MPI (0,2 μ g) purifié selon la méthode décrite dans le Chapitre I, § A. III. Le gel est coloré au bleu de Coomassie R-250. (voir Annexe technique, § A. I. 5. et B. I.).

Partie A : échantillons réduits par le β -mercaptoéthanol

Partie B : échantillons non réduits

1 : MPI traité par 2% de SDS

2 : MPI traité par 20% de SDS

B. II. COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES

La composition chimique de la préparation de MPI a été déterminée puis comparée à la composition réalisée sur la molécule recombinante (rSLPI) qui nous a été donnée et qui est fabriquée par Synergen (143).

B. II. 1. Compositions du MPI et du rSLPI natifs

La composition en acides aminés a été réalisée à l'U.R.A 409 CNRS (Dr. P. Sautière). L'échantillon (1 nmole) est préalablement hydrolysé par HCl 5,6N à 110°C en tube scellé sous vide, pendant 24 h et sous atmosphère inerte. Il est ensuite déposé sur un autoanalyseur Beckman 6300 couplé à un ordinateur qui effectue l'acquisition et le traitement des données (Tableau X).

B. II. 2. Compositions du MPI et du rSLPI après oxydation performique

Cette méthode permet de quantifier exactement le nombre de résidus de cystéine. Ils sont dosés sous forme d'acide cystéique (144).

Pour préparer le réactif, on ajoute 0,1 ml d'H₂O₂ à 30% à 0,9 ml d'HCOOH 100% (Merck). Le mélange est incubé pendant 1 h à température ambiante puis refroidi dans la glace pendant 15 min.

10 µl de MPI à 1 mg/ml ont préalablement été déposés au fond d'un tube à hydrolyse puis lyophilisés ; 100 µl du réactif décrit ci-dessus sont ajoutés et le tout est laissé 16 h à 0°C. L'ensemble est dilué par 1 ml d'eau Millipore et lyophilisé, puis l'hydrolyse par HCl 5,6N est effectuée comme précédemment.

L'analyse effectuée sur les protéines entières conduit à une quantité très proche de **16 résidus de cystéine par mole d'inhibiteur aussi bien pour le MPI que pour le rSLPI** (Tableau X). La quantification de ces résidus après oxydation performique donne des résultats identiques.

TABLEAU X**Compositions en acides aminés de la préparation de MPI, du rSLPI et du SLPI (49)**

Résidus d'acides aminés	MPI	rSLPI	SLPI
Asp/Asn	9,2	9,0	9
Thr	4,0	4,0	4
Ser	5,0	5,1	6
Glu/Gln	8,1	8,0	8
Pro	13,3	13,1	13
Gly	8,1	7,8	9
Ala	3,4	3,1	3
Cys/2	15,3	16,2	16
Val	5,0	4,8	5
Met	3,3	3,7	4
Ile	1,6	1,2	1
Leu	5,4	5,2	5
Tyr	1,6	1,9	2
Phe	2,1	2,1	2
His	0,1	0,1	0
Lys	15,1	15,6	15
Arg	5,0	4,8	5
Trp	n.d.	n.d.	1
Total	106	106	107

Les calculs sont effectués à partir des valeurs en résidus pour 100 résidus obtenues pour MPI et rSLPI de manière à comparer les résultats aux valeurs théoriques déterminées d'après la séquence du SLPI (49). Nous avons tenu compte du fait que le tryptophane n'est pas dosé par cette méthode.

n.d. : non déterminé.

B. III. SEQUENCE N-TERMINALE

Les séquences ont été réalisées dans le service commun de séquence des unités U16-U409. L'appareil utilisé est un Applied Biosystems 470A couplé à un analyseur de phénylthiohydantoïne-amino-acides (PTH-AA) (Applied Biosystems 120A). Le programme utilisé est le 03RPTH selon la méthode de Hewick et coll. (145). Les séquences ont été effectuées sur la protéine naturelle et sur le rSLPI.

	1							9	
MPI	Ser	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Ala	Gly	Val-
rSLPI	Ser	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Ala	Gly	Val-

La cystéine en position 10 étant engagée dans un pont disulfure (67), aucun résidu n'est identifié sous forme de PTH-dérivé.

B. IV. MASSE MOLECULAIRE

La masse chimique de la préparation de MPI a pu être calculée très précisément à l'aide de la spectrométrie de masse par la technique d'électrospray (ESMS) (voir Annexe technique, § I.).

Protéine	Masse chimique calculée	Masse chimique obtenue
MPI	11 709,80	11 711,30 ± 2,55
rSLPI	11 709,80	11 709,27 ± 0,19

Le spectre de masse du MPI (Fig. 10) montre trois séries majeures (A, B et C) d'ions multichargés de 7 à 9 charges et une série D mineure. La série A correspond à une $M_r = 11\ 711,30 \pm 2,55$ qui est en accord avec la masse calculée d'après la séquence peptidique ($M_{cal} = 11\ 709,80$). La série B présente en quantité égale à la série A correspond à un peptide dont la M_r est augmentée de 14 et la série C de 28, par rapport à la série A. La série D qui est mineure a une $M_r = 11\ 866 \pm 1,47$, ce qui est largement supérieur à la masse calculée. Nous n'avons pas d'explication à cette augmentation. La stratégie employée pour localiser les augmentations de masse de 14 et 28 unités sur la molécule de MPI est détaillée dans le Chapitre IV. Le spectre de masse du rSLPI (Fig. 10) montre une seule série de $M_r = 11\ 709,27 \pm 0,19$ ce qui est en parfait accord avec la masse théorique calculée.

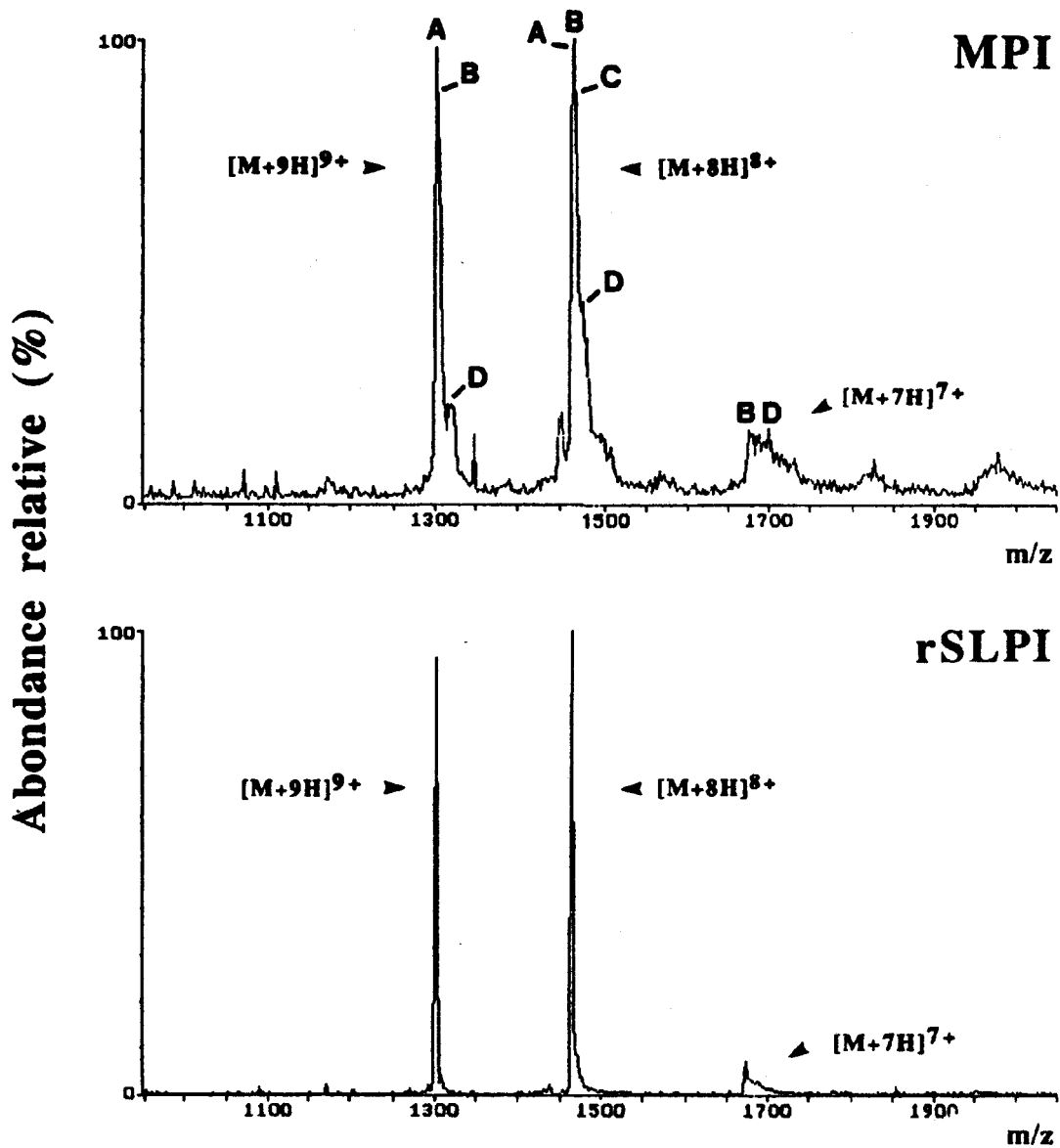


Figure 10 : Spectres de masse obtenus par ESMS du MPI et du rSLPI. La série majeure dans les deux cas (série A pour le MPI) correspond à la masse théorique de la protéine étudiée.

CONCLUSIONS

Les résultats de l'étude des propriétés physico-chimiques de la préparation de MPI montrent que :

1. le MPI a été obtenu sous sa forme non dégradée

- * une seule bande en SDS-PAGE
- * $pH_i > 10,5$
- * Composition en acides aminés identique à celle du SLPI
- * Acide aminé N-terminal : sérine
- * Masse chimique mesurée de 11 711,30

2. le MPI est semblable aux inhibiteurs acido-stables des autres sécrétions déjà décrits dans la littérature (40, 49, 62) ainsi qu'à la protéine recombinante en ce qui concerne la composition en acides aminés, la séquence N-terminale et la masse chimique.

3. il existe cependant dans la préparation de MPI des molécules d'inhibiteur ayant une masse augmentée de 14 et 28 unités. Ce résultat peut laisser penser à des formes mono- et diméthylées de MPI.

CHAPITRE II

INTERACTION DU MPI AVEC LES MUCINES

Dans le but d'étudier l'interaction MPI-mucines à l'aide du dichroïsme circulaire, il nous a fallu préparer les mucines et les glycopeptides de mucines. Notre hypothèse étant basée sur des interactions de type ionique, deux types de glycopeptides ont été choisis en fonction de leur contenu en charges acides (sulfate, acide sialique).

Les travaux concernant l'étude en dichroïsme circulaire et les effets sur l'activité inhibitrice du MPI envers l'ELH sont rassemblés dans un manuscrit. Celui-ci est précédé d'un paragraphe détaillant la préparation et la caractérisation des mucines et des glycopeptides de mucines.

A. PREPARATION DES MUCINES BRONCHIQUES

Les mucines ont été obtenues après ultracentrifugation ou après traitement acide du mucus suivi d'une étape de gel-filtration en présence d'une force ionique élevée (voir Chapitre I, § A. II.).

B. PREPARATION ET CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDES DE MUCINES

Nous avons utilisé une méthode utilisée au laboratoire dans le groupe de G. Lamblin. Les mucines subissent une digestion par la pronase puis les glycopeptides obtenus sont séparés selon leur charge sur un échangeur d'anions. Trois fractions sont individualisées en fonction de leur élution sur la colonne échangeuse d'anions : la première est dénommée fraction "neutre", la seconde fraction "sialylée" et la troisième fraction "sulfatée". Les glycopeptides sont ensuite purifiés par gel-filtration selon Lamblin et coll. (11). Le protocole de purification est détaillé dans le manuscrit.

B. I. CRITERE DE PURETE : SDS-PAGE

La pureté des préparations a été déterminée en SDS-PAGE sur PhastGels dans un gradient 4-15% (Pharmacia). Le gel coloré par le réactif de Schiff après oxydation periodique (PAS) montre une seule bande assez large pour les fractions de glycopeptides (Fig. 11, lignes 2-4), tandis que le gel coloré par le bleu de Coomassie est dépourvu de bande protéique contaminante

(non montré). Les mucines obtenues après ultracentrifugation (ligne 1) restent au point de dépôt du fait de leur M_r élevée ($> 10^6$).

B. II. CARACTERISATION

B. II. 1. Détermination de la masse moléculaire

La M_r des glycopeptides obtenus a été déterminée par gel-filtration sur une colonne de Superose 6 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,01M, NaCl 0,15M, pH 7,0. La M_r calculée est de 440 000 pour tous les glycopeptides (voir manuscrit, Fig. 3).

B. II. 2. Détermination du point isoélectrique

La détermination des pH_i par IEF dans un gradient de pH 3-6 (Precote Serva) a montré que : les glycopeptides dits "neutres" ont un caractère acide et un pH_i compris entre 3,50 et 4,15 ; les glycopeptides "sialylés" ont un pH_i compris entre 2,80 et 4,15 ; les glycopeptides "sulfatés" ont un $pH_i < 2,80$ (voir manuscrit, Fig. 1). A la vue de ce résultat, cette nomenclature apparaît erronée et devrait être corrigée en nuanciant la dénomination de glycopeptides "neutres".

B. II. 3. Compositions chimiques

Les glycopeptides préparés montrent tous des compositions en acides aminés et en sucres caractéristiques de glycopeptides de mucines. On peut remarquer que la partie peptidique représente 9 à 11% tandis que la partie glucidique compte pour 70 à 80% du poids des glycopeptides (voir manuscrit, Tableau I).

C. ETUDE CONFORMATIONNELLE DE L'INTERACTION

Ce travail, qui a été effectué en dichroïsme circulaire, avait pour but de montrer un changement de conformation après que le MPI ait interagi avec les mucines ou les glycopeptides de mucines (voir Annexe technique, § H.)

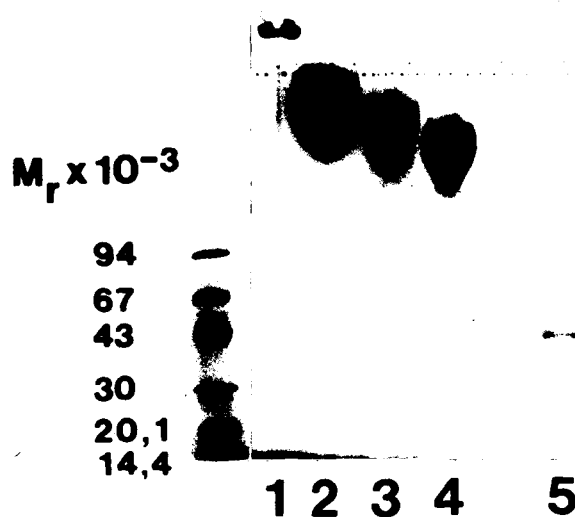


Figure 11 : SDS-PAGE sur PhastGel (gradient 4-15%) des mucines et des glycopeptides purifiés (10 μg). Le gel est coloré au réactif de Schiff après oxydation periodique (voir Annexe technique, § B. III.). Les témoins de M_r (Pharmacia) sont colorés au Bleu de Coomassie.

- 1 :** mucines totales
- 2 :** glycopeptides "neutres"
- 3 :** glycopeptides "sialylés"
- 4 :** glycopeptides "sulfatés"
- 5 :** α_1 -glycoprotéine acide

L'étude a porté sur les mucines mais aussi sur les glycopeptides riches en groupements acides (acide sialique, sulfate) ou dépourvus de ces groupements afin d'étudier le rôle des résidus acides dans l'interaction avec l'inhibiteur.

Des mélanges comportant des quantités croissantes de MPI (0,1 ; 0,5 et 1 mg) et une quantité constante de mucines ou de glycopeptides (1 mg) ont été effectués dans un tampon phosphate de sodium 0,01M, NaCl 0,15M, pH 7,0. L'ensemble a été incubé pendant 15 min à 20°C avant d'effectuer le spectre dichroïque entre 190 et 250 nm. Les spectres présentés correspondent à la différence entre le spectre théorique et le spectre expérimental (voir manuscrit, Fig. 2).

D. CONSEQUENCES DE L'INTERACTION SUR L'ACTIVITE DE L'INHIBITEUR BRONCHIQUE

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'interaction sur la capacité inhibitrice du MPI envers l'ELH. L'expérience a consisté à :

- 1) montrer que l'ELH seule était capable de cliver les mucines (voir manuscrit, Fig. 3 et Fig. 4).
- 2) montrer un effet protecteur du MPI associé aux mucines contre la protéolyse par l'ELH (voir manuscrit, Fig. 4).

Les résultats de ce travail sont présentés dans la publication suivante :

"Interaction between secretory leukocyte proteinase inhibitor and bronchial mucins or glycopeptides.
Physiopathological implications for the protection of mucins against proteolysis by human leukocyte elastase"

Le terme SLPI a été utilisé dans cet article car nous avons travaillé en partie avec la protéine recombinante (rSLPI) qui est fabriquée sous cette dénomination par Synergen.

Interaction between secretory leucocyte proteinase inhibitor and bronchial mucins or glycopeptides

Physiopathological implications for the protection of mucins against proteolysis by human leucocyte elastase

Isabelle VAN-SEUNINGEN, Jean-Pierre AUBERT and Monique DAVRIL*

Unité INSERM N° 16, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

The interaction of secretory leucocyte proteinase inhibitor with bronchial mucins and glycopeptides was studied by means of c.d. spectroscopy. The interaction with mucins was characterized by an increase in organized structure of α -helical type, as evidenced by the appearance in the difference spectra of two positive bands at 208 and 218 nm. This phenomenon was correlated with the amount of inhibitor present in the mixtures, suggesting that the change was inherent to the inhibitor. Surprisingly, when the inhibitor was mixed with acid glycopeptides, difference c.d. spectra showed a decrease in organized structure, characterized by a negative minimum at 196 nm. Glycopeptides treated with neuraminidase gave similar profiles of difference spectra in three different mixtures, indicating that the interaction was smaller. The interaction between the inhibitor and mucins was also studied for its ability to modify *in vitro* the proteolytic activity of human leucocyte elastase. Mucins alone were degraded by that proteinase into glycopeptides of M_r 400 000–500 000, whereas mucins mixed with inhibitor before adding elastase were proteolysed to a lesser extent. These data demonstrate that the secretory leucocyte proteinase inhibitor interacts with mucins and consequently is capable of protecting the mucins against proteolysis by elastase.

INTRODUCTION

Secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI), also called 'mucus proteinase inhibitor', is the major inhibitor of human leucocyte elastase (HLE; EC 3.4.21.37) and cathepsin G (EC 3.4.21.20) [1] in the upper respiratory tract, where it is produced by the serous cells of the bronchial glands [2]. It is a strongly basic protein with M_r 11 726 and $pI > 10.5$ (I. Van-Seuningen & M. Davril, unpublished work), organized in two separate domains of similar amino acid sequence, each of which contains four disulphide bridges [3].

Mucins are high- M_r polydisperse glycoproteins containing about 60–80% carbohydrate, mostly linked *O*-glycosidically to their peptide backbone via residues of threonine and serine. Sialic acid residues and sulphate are present on their carbohydrate side chains, conferring them an acid character. Molecules of mucins appear to be linear and flexible threads with alternant highly glycosylated regions resistant to proteinases and 'naked' regions devoid of carbohydrate chain and sensitive to proteinases [4].

In diseases such as chronic bronchitis and cystic fibrosis, one can observe a hypersecretion and an increase of the mucus viscosity. Rheological properties of the mucus gel due primarily to the presence of mucins may be influenced by locally produced proteins, including lysozyme [5] and lactoferrin [6], this binding occurring via electrostatic forces. Recently, another locally produced protein, i.e. mucus proteinase inhibitor, has been shown to interact with mucins, this interaction having been demonstrated to be ionic [7,8]. In such diseases, the hypersecretion of mucus, due to the increase of the number of mucous cells which secrete mucins, can also be influenced by HLE, which was shown to be responsible for a bronchial-

secretory-cell metaplasia when given intratracheally to hamsters [9,10]. Thus this enzyme could be considered as an agent of hypersecretion of mucus. HLE was also shown capable of proteolysing pig gastric mucins, thereby suggesting a role for it in the mechanisms of damage during chronic infection and inflammation of the respiratory tract [11].

C.d. spectroscopy is a very useful method to monitor structural transitions of proteins. C.d. bands of compounds occurring in the far-u.v. or amide region are dominated by contributions of the peptide bonds. Thus information about secondary structure are obtained from these c.d. spectra.

In the present work, mixtures of SLPI and bronchial mucins or glycopeptides were analysed by c.d. spectroscopy in order to reveal the existence of an interaction between these two components in solution. In order to study the influence, on the one hand, of entire molecules of mucins and, on the other hand, of their carbohydrate side chains on the interaction, SLPI was mixed with mucins, but also with two kinds of glycopeptides. The first one contained sialic acid and sulphate residues, whereas the second one had no sulphate and was partially desialylated. We also studied the influence of the interaction on the proteolytic activity of HLE towards mucins. The implication of sialic acid and/or sulphate residues in the binding, and the consequences of such an interaction on the activity of SLPI in pulmonary diseases where a hypersecretion is observed, are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Pronase from *Streptomyces griseus* was purchased from Calbiochem. Neuraminidase (type VI) from *Clostridium perfringens* (EC 3.2.1.18) was from Sigma. Cellex E cellulose was

Abbreviations used: (r)SLPI, (recombinant) secretory leucocyte proteinase inhibitor; HLE, human leucocyte elastase; i.e.f., isoelectric focusing; PAS, periodic acid-Schiff.

* To whom correspondence should be sent.

Table 1. Chemical compositions of mucins (column 1), acid glycopeptides (column 2) and desialylated glycopeptides (column 3)

Carbohydrate, sulphate and total amino acids are expressed as percentages of dry weight, and individual amino acid compositions are expressed as residues/100 residues.

Column ...	Composition		
	1	2	3
Fucose	16.0	18.7	15.1
Mannose	0.5	0.2	0.2
Galactose	21.5	23.8	22.4
<i>N</i> -Acetylglucosamine	17.9	16.0	19.3
<i>N</i> -Acetylgalactosamine	10.6	11.6	11.3
Sialic acid	1.4	2.1	1.5
Glucose	0.6	0.6	0.7
Total carbohydrate	68.5	73.0	70.5
Sulphate	3.2	5.5	0.0
Total amino acids	19.5	9.9	9.6
Aspartic acid	7.8	1.5	1.8
Threonine	14.4	33.1	31.4
Serine	10.3	15.6	15.2
Glutamic acid	7.7	2.8	3.4
Proline	8.2	11.1	10.3
Glycine	8.8	7.0	7.7
Alanine	7.9	9.8	10.5
Valine	5.8	4.3	4.4
½-Cystine	3.7	0.8	0.9
Methionine	0.7	0.3	0.0
Isoleucine	2.9	2.2	2.4
Leucine	6.8	4.0	4.6
Tyrosine	2.2	0.0	0.0
Phenylalanine	3.5	1.6	1.5
Lysine	3.0	1.1	1.2
Histidine	2.2	2.2	2.4
Arginine	4.0	2.4	2.1

provided from Bio-Rad. Sepharose 2B, 4B, 6B and Supcrose 6, M_r and pI markers were from Pharmacia. Servalyt Precote 3-6 was from Serva. All chemicals were of analytical grade.

Purification of recombinant SLPI (rSLPI), mucins and HLE

rSLPI, a gift from Synergen (Boulder, CO, U.S.A.) was obtained as previously described [12] and was identical with the native protein, which was prepared in our laboratory [7]. Mucins were purified from non-purulent sputum as in [8]. HLE was purified from purulent sputum by the method of Martodam *et al.* [13]. The purity of protein samples was monitored by SDS/PAGE and on acid polyacrylamide gels at pH 4.3 as described in [14].

Preparation of respiratory mucin glycopeptides

A 1 g portion of freeze-dried mucins was submitted to Pronase digestion as previously described [15]. A 650 mg portion of the freeze-dried supernatant of the Pronase digest was dissolved in 20 ml of 0.1 M-NaCl and applied to a Cellex E cellulose column (40 cm × 3 cm) equilibrated in 0.1 M-NaCl; elution was performed as is described in [16]. The so-called 'neutral' glycopeptides were purified by a first gel filtration on a Sepharose 2B column followed by a second gel filtration on a Sepharose 6B column (98.0 cm × 2.5 cm). The so-called 'sulphated' glycopeptides were purified on a Sepharose 4B column (98.0 cm × 2.5 cm). In the present paper they will be referred to

as 'acid glycopeptides'. Fractions were checked for protein content by reading the A_{278} nm and for neutral hexose content by an automatic orcinol assay. Equilibration and elution of columns were performed as described in [16].

Neuraminidase treatment of glycopeptides

A 20.6 mg portion of the so-called 'neutral' glycopeptides, which contain a lower amount of sialic acid, was mixed with 0.6 mg (1 unit) of neuraminidase in 2 ml of 0.1 M-sodium acetate buffer, pH 5.0. Incubation was performed at 37 °C for 18 h with stirring and the solution was dialysed and freeze-dried. Further glycopeptide purification was carried out on the same Sepharose 6B column as that described above. The orcinol-positive peak was considered to be the glycopeptide fraction. In the present paper this fraction will be called 'desialylated glycopeptides'.

Electrophoretic studies

SDS/PAGE was carried out on 4-15% (w/v)-polyacrylamide gradient gels with the PhastSystem (Pharmacia) to check the purity of the glycopeptide fractions (40 µg of each were loaded). The gels were stained with Coomassie Blue for protein detection, with Sudan black for lipid and with the periodic acid-Schiff (PAS) reagent for carbohydrate. No additional bands were detected for protein and lipid, indicating the lack of contaminants in the mucin and glycopeptide preparations. Isoelectric focusing (i.e.f.) of glycopeptides of interest was performed with a Multiphor II LKB apparatus on a pH 3-6 gradient gel which was stained with PAS reagent [17].

Chemical analyses

Determinations of carbohydrate and sulphate contents, and amino acid analyses of mucins and glycopeptides, were performed as previously described [8].

C.d. spectroscopy

C.d. spectra were recorded with a Jobin Yvon R. J. Mark III dichrograph. Measurements were performed in the far-u.v. (250-190 nm) at room temperature in a cell of 0.01 cm path length. The protein concentrations were 0.8-1.0 mg/ml for single proteins and 1.0-2.0 mg/ml for mixtures in 0.01 M-sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.15 M-NaCl. Ellipticities in degrees · cm² · dmol⁻¹ were expressed as $[\theta]$. The mean residue weight, determined from the composition of SLPI, was 109.3. For the mixtures with mucins and glycopeptides, the same weight was chosen. The theoretical spectrum calculated by the instrument corresponded to the sum of individual spectra of the components at their respective concentrations in the reaction mixture. The difference spectrum was calculated by subtracting the experimental spectrum from the theoretical spectrum.

Digestion of mucins by HLE

A 0.12 mg portion of HLE was added to 1.2 mg of mucins dissolved in 120 µl of 0.01 M-sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.15 M-NaCl, and the mixture was incubated at 37 °C for different times (1, 6 and 24 h). The reaction was stopped by removing samples and immediately freezing and freeze-drying them. Samples were dissolved in the same buffer as that described above at a concentration of 4.4 mg/ml. A 10 µl sample was loaded on a Supcrose 6 column equilibrated in the same buffer; the flow rate was 0.4 ml/min and the absorbance was monitored at 210 nm. Another 10 µl was also loaded on a 5-15% acrylamide gradient gel and SDS/PAGE was performed as described by Laemmli [18]. The gel was stained with the PAS reagent [17].

Elastase inhibitory activity of the SLPI/mucin mixtures

SLPI was preincubated for 15 min at 20 °C with mucins

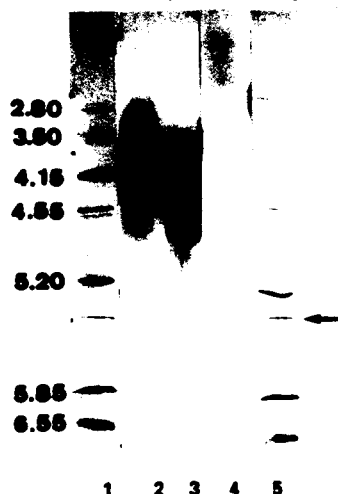


Fig. 1. I.e.f. of glycopeptides over the pH range 3–6

pI markers were stained with Coomassie Blue (slots 1 and 5), and glycopeptides (50 μ g) were stained with PAS reagent. Slots 2 and 3, 'neutral' glycopeptides before (slot 2) and after (slot 3) neuraminidase treatment; (slot 4) acid glycopeptides. Samples were applied at the position indicated by the arrow.

dissolved at the concentration and in the buffer described above. The amount of SLPI was calculated to have a molar excess of 2:1 over the HLE to be added. The same enzyme/mucin ratio (1:10,

w/w) was chosen; the SLPI/mucin mixture was incubated with HLE and processed as described above for SDS/PAGE.

RESULTS

Chemical compositions

Total mucins (Table 1, column 1) are composed of 68.5% (w/w) carbohydrate and 19.5% (w/w) amino acids. Threonine, serine and proline, the most frequent residues in mucins, account for 32.9% of total amino acids. The two glycopeptide fractions obtained after Pronase digestion (columns 2 and 3) are quite similar. There is a noticeable enrichment in threonine (33.1% and 31.4%) and in serine (15.6% and 15.2%) when compared with mucins (14.4% and 10.3% respectively). The sum of these two amino acids accounts for approximately half of the peptide core (48.7% and 46.6% respectively). The content in sulphate is 3.2% for the mucins and 5.5% for the acid glycopeptides. The sialic acid content of glycopeptides is 1.5% after neuraminidase treatment (column 3), instead of 3.0% in the starting material (result not shown).

Purity and pI determinations

Mucins, acid and desialylated glycopeptides were shown to be free of protein and lipid contaminants by performing SDS/4–15%-PAGE (results not shown). pI values for glycopeptides were determined by i.e.f. in a pH 3–6 gradient (Fig. 1). 'Neutral' glycopeptides (slot 2) exhibit before neuraminidase treatment pI

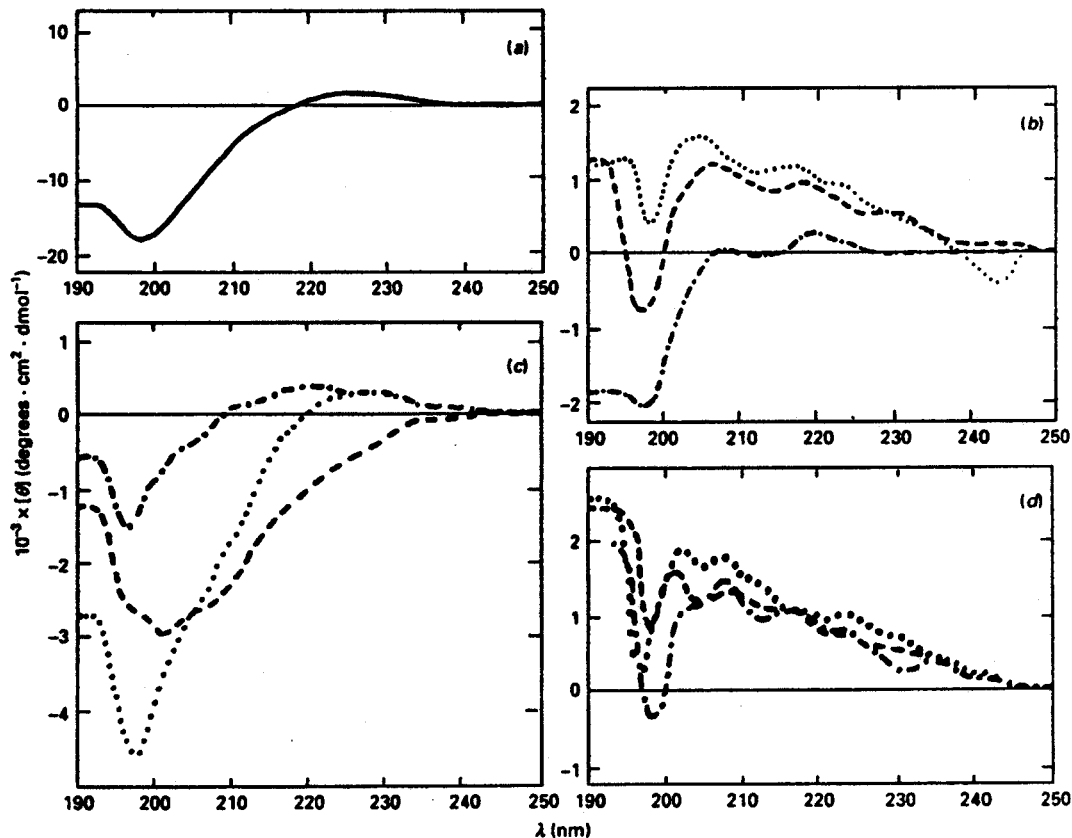


Fig. 2. C.d. spectra between 190 nm and 250 nm

Spectrum of SLPI alone (a); (b)–(d) difference spectra of SLPI/mucin mixtures (b), of SLPI/acid glycopeptide mixtures (c) and of SLPI/desialylated glycopeptide mixtures (d). Ratios (SLPI/mucins or SLPI/glycopeptides, w/w) were: ----, 0.1:1; - · - · - ·, 0.5:1; · · · · ·, 1:1. Conditions are detailed in the Materials and methods section.

values ranging from 3.2 to 4.2, these values increasing to 4.0–5.0 after partial desialylation (slot 3). Acid glycopeptides have a *pI* of less than 2.80 (slot 4), this confirming their strongly acid character.

Far-u.v. c.d. spectra of SLPI, mucins and glycopeptides

The spectrum of SLPI is shown in Fig. 2(a). It is characterized by a positive band at 225 nm and a negative one at 197 nm. The same spectrum was obtained for the native and the recombinant proteins. Spectra of mucins, acid glycopeptides and desialylated glycopeptides were characterized by a negative shoulder between 225 and 230 nm, a minimum between 211 and 214 nm and a maximum between 198 and 201 nm (results not shown).

Far-u.v. c.d. difference spectra of SLPI/mucin mixtures

When calculating the difference between theoretical and experimental spectra, the acquisition of positive values demonstrates the formation of new structures after the interaction, whereas negative bands would indicate the loss of some organized structures.

Three mixtures were prepared in the ratios (SLPI/mucins) of 0.1:1, 0.5:1 and 1:1 (all w/w) in order to correlate the interaction with the amount of SLPI. C.d. spectra were recorded after a 15 min incubation of the mixtures at room temperature. The difference spectra are shown in Fig. 2(b). Three extrema are clearly obtained in all mixtures, at 218, 208 and 196 nm. It can be observed that the values of ellipticities at these three characteristic wavelengths increase with the amount of SLPI present in the mixtures, suggesting the formation of more organized structures in the molecule of inhibitor.

Far-u.v. c.d. difference spectra of SLPI/acid glycopeptide mixtures

Three mixtures were prepared with varying ratios of SLPI/acid glycopeptide (0.1:1, 0.5:1 and 1:1, w/w) as described above. The negative band observed in Fig. 2(c) at 196 nm for the 0.1:1 and the 1:1 mixtures is shifted at 199 nm for the 0.5:1 mixture. The negative value of ellipticity increases with the SLPI/glycopeptides ratio. This result indicates a decrease of some organized structure correlated with the amount of SLPI in the mixtures.

Far-u.v. c.d. difference spectra of SLPI/desialylated glycopeptide mixtures

The three mixtures analysed were prepared in the same ratios as above. As shown in Fig. 2(d), the three difference spectra are very close to one another, indicating that maximum interaction had already been reached by the 0.1:1 ratio. Patterns similar to those obtained for SLPI/mucin mixtures were observed, and three contrast with those of the SLPI/sulphate-containing glycopeptide mixtures shown in Fig. 2(c).

Digestion of mucins by HLE

Degradation of bronchial mucins by HLE was studied by gel-filtration chromatography (Fig. 3) and SDS/PAGE (Fig. 4). Native mucins were eluted at the void volume of the column (17 min retention time), whereas mucins incubated with HLE were shown to be included (Fig. 3). After a 1 h incubation, one can see two unresolved included peaks at 18 and 20 min and a shoulder at 26 min, the last peak at 47 min being HLE. When mucins were incubated for 6 and 24 h with HLE, the same elution pattern was obtained: it showed one major peak at 21 min and a shoulder at 26 min, which was increased when compared with the 1 h-incubation pattern. The retention time of the shoulder corresponded to that of Pronase-digest

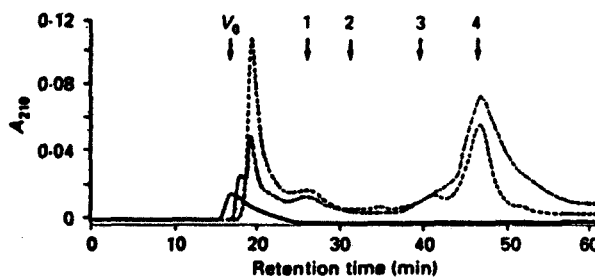


Fig. 3. Separation on Superose 6 of mucins digested by HLE

Mixtures of mucins/HLE in ratios 10:1 (w/w) (40 µg each of mucins) were loaded on the column (for conditions, see the Materials and methods section). —, Mucins alone; ---, mucins/HLE after 1 h incubation time; ·····, after 6 or 24 h incubation time. Markers: 1, Pronase-digest glycopeptides (M_r); 2, thyroglobulin (M_r); 3, BSA (M_r); 4, bronchial lysozyme (M_r).



Fig. 4. SDS/5-15% PAGE of mucins (40 µg) digested by HLE after, or without, preincubation with SLPI as described in the Materials and methods section

Slot 1, mucins alone; 2, SLPI/mucins; 3, SLPI/mucins after 1 h incubation with HLE; 4, after 6 h incubation with HLE; 5, after 24 h incubation with HLE; 6, mucins incubated with HLE for 1 h; 7, for 6 h; 8, for 24 h. The upper arrow indicates the position of Pronase-digest glycopeptides and the lower arrow that of the marker, α_1 -acid glycoprotein (M_r 45000).

glycopeptides, which have M_r values of 400 000–500 000. The same fractions were loaded on a 5–15% acrylamide gel, subjected to SDS/PAGE and stained with PAS reagent (Fig. 4). Native mucins (slot 1) were shown to be located at the top of the gel, in accordance with their high M_r . By contrast, mucins degraded by HLE migrated in the stacking gel, but also in the separating gel as bands more strongly revealed as the incubation time increased (slots 6–8). The staining pattern in this separating gel corresponded to that obtained with Pronase-digest glycopeptides (indicated by the upper arrow).

Effect of the SLPI–mucin interaction on the proteolysis of mucins by HLE

On SDS/PAGE (Fig. 4), the SLPI/mucin mixture (slot 2) was loaded as the reference. After 1 h of incubation with HLE (slot 3), the pattern was similar to the reference, whereas after 6 h of incubation (slot 4) a strong staining in the stacking gel and a faint staining in the separating gel could be observed, indicating that proteolysis of mucins had occurred. After 24 h of incubation, a similar result was obtained (slot 5). In comparison with mucins

incubated with HLE only (slots 6–8), where proteolysis had already occurred after 1 h (slot 6), one can conclude that SLPI efficiently prevents from this proteolysis during 1 h, but seems to lose part of its inhibitory activity at longer incubation times (slots 7 and 8).

DISCUSSION

Individual spectra of SLPI, mucins and glycopeptides show that these molecules adopt an inorganized secondary structure in solution. SLPI structure had already been studied by Grütter *et al.* [3] by the use of X-ray crystallography. Those authors observed, for both domains, an internal double-stranded β -sheet surrounded by a flat structure corresponding to the primary enzyme-binding segment. This small amount of secondary structure in the protein explains the c.d. spectrum that we obtained. The positive band at 225 nm is probably due to the presence of the eight disulphide bonds in the molecule. This phenomenon was already described for other small disulphide-rich proteins such as wheat-germ agglutinin or hevein [19]. Another explanation could be the contribution of β -turns, as described by Woody [20] for polypeptides including a preponderance of β -structures. SLPI, which contains 11% of proline residues, has two proline pairs adopting a polyproline-II-like conformation [3]. C.d. spectra of mucins and glycopeptides are also typical of inorganized structures. They are in total accordance with those described by Feldhoff *et al.* [21]. Those authors also demonstrated a shoulder at 225 nm for intact mucins and a minimum band at 210 nm for their glycopeptides after Pronase digestion. They explained the difference to be dependent on the carbohydrate moiety of the glycopeptides.

Interaction between SLPI and bronchial mucins (or glycopeptides produced therefrom) has been demonstrated to occur in solution in a physiological buffer by the use of c.d. spectroscopy. The best-characterized interaction was obtained when SLPI was mixed with mucins. A change in the secondary structure, with the appearance of α -helical type structure, could be observed. We can hypothesize that SLPI adopts a new conformation when it binds to mucins. An increase in the ellipticity with the amount of inhibitor present in the mixture supports this hypothesis. The interaction may be explained by the presence of positive charges on the surface of the strongly basic inhibitor with the acid residues of sialic acid and sulphate on the glycan chains of mucins. Such an ionic interaction between mucus proteinase inhibitor and mucins has already been demonstrated by us [7,8]. Moreover, two other basic proteins present in bronchial secretions, namely lysozyme [5] and lactoferrin [6], have been shown to interact with mucins by electrostatic forces.

In order to identify the type of linkage and to study the role of acid residues on the glycan chains of mucins in the establishment of their interaction with SLPI, two kinds of glycopeptides, different in charge, were prepared. Acid glycopeptides contained sialic acid residues (2.1%) and sulphate (5.5%). Characteristic difference spectra were obtained: a minimum between 196 and 199 nm was shown, which corresponded to a decrease of some organized structure. This interaction may be of clinical relevance, since mucin-type glycoproteins isolated from cultured epithelial cells from patients with cystic fibrosis have been shown to be oversulphated [22].

The second kind of glycopeptides investigated had no sulphate and contained only a few acid charges after incomplete removing of sialic acid groups. In this case only small differences were observed when varying the ratios in the mixtures with SLPI. From this experiment, it can be concluded that SLPI interacts

weakly with desialylated glycopeptides, this interaction possibly occurring through the remaining sialic acid residues.

Finally, both glycopeptide fractions reacted with SLPI in a different manner when compared with macromolecular mucins, which would suggest that, besides the effect of acid charges discussed above, the conformation of mucins may have an influence on the interaction. Moreover, the major difference between mucins and glycopeptides is the presence on the peptide core of mucins of naked regions which are destroyed by Pronase treatment [4]. The loss of these naked regions did not significantly influence the c.d. spectra of the glycopeptides as compared with that of mucins, these spectra being largely dependent on the carbohydrate moieties (68–73%; Table 1). Binding of SLPI with mucins, which is correlated with the presence of acid charges on the glycan chains, might be increased by peptide-peptide interaction.

SLPI is considered to be the major inhibitor of leucocyte elastase and cathepsin G in the upper respiratory tract where its physiological concentration is sufficient to counteract the action of these proteinases [23]. At this level, mucins are the predominant component of secretions. One role for these secretions in the defence of the respiratory tract is to act as a barrier against proteolytic attacks of enzymes released from neutrophils.

Assuming that the M_r of mucins ranges from 0.5×10^6 to 1.5×10^6 [4], one can calculate that 42 to 128 molecules of SLPI will bind to 1 molecule of mucin in the 1:1 mixture studied. This result is of clinical importance, since it assigns a role for SLPI as a protective agent in the mucus gel against proteolysis of mucins. Enzymes released from leucocytes or from bacteria were shown to be capable of hydrolysing pig gastric mucins [11]. In the human respiratory tract, the presence of the inhibitor bound in large quantity to the mucins may act as protective coat against HLE. Moreover, HLE has been shown to stimulate the release of mucins from primary cultures of hamster tracheal epithelial cells [24]. However, although HLE could degrade these mucins, the incomplete digestion observed by those authors [24] was suggested to be due in part to the presence of an SLPI counterpart, 'antileukoprotease', in the culture medium.

Our results confirm this hypothesis, since (1) HLE was shown to rapidly proteolyse human bronchial mucins into glycopeptides and (2) SLPI bound to mucins was capable of preventing their proteolysis for 1 h at 37 °C.

Concluding remarks

There is direct evidence for an interaction between SLPI and bronchial mucins. This binding leads to a modification of the secondary structure of the inhibitor. The role of sialic acid and sulphate residues has been demonstrated by the use of differently charged glycopeptides, the interaction being almost totally suppressed when desialylated glycopeptides were used. We also demonstrate that SLPI has a protective effect against proteolysis of mucins by HLE, thus allowing them to keep their rheological properties. This would be of clinical relevance in pathological states where qualitative and/or quantitative modifications of the secretions, and especially of mucins, are observed, such as in chronic bronchitis or in cystic fibrosis.

We thank Dr. R. C. Thompson for the gift of rSLPI.

REFERENCES

1. Thompson, R. C. & Ohlsson, K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6692–6696
2. Franken, C., Meijer, C. J. L. M. & Dijkman, J. H. (1989) *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 493–498
3. Grütter, M. G., Fendrich, G., Huber, R. & Bode, W. (1988) *EMBO J.* **7**, 345–351

4. Roussel, P., Lamblin, G., Lhermitte, M., Houdret, N., Lafitte, J.-J., Perini, J.-M., Klein, A. & Scharfman, A. (1988) *Biochimie* **70**, 1471-1482
5. Creeth, J. M., Bridge, J. L. & Horton, J. R. (1979) *Biochem. J.* **181**, 717-724
6. Harbitz, O., Jenssen, A. O. & Smidsrød, O. (1984) *Eur. J. Respir. Dis.* **65**, 512-520
7. Van-Seuningen, I., Davril, M. & Hayem, A. (1989) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **307**, 749-756
8. Van-Seuningen, I., Houdret, N., Hayem, A. & Davril, M. (1991) *Int. J. Biochem.*, in the press
9. Snider, G. L., Lucey, E. C. & Christensen, T. G. (1984) *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 155-160
10. Breuer, R., Christensen, T. G., Lucey, E. C., Stone, P. J. & Snider, G. L. (1985) *J. Lab. Clin. Med.* **105**, 635-640
11. Poncz, L., Jentoft, N., Ho, M.-C. D. & Dearborn, D. G. (1988) *Infect. Immun.* **56**, 703-704
12. Eisenberg, S. P., Hale, K. K., Heimdal, P. & Thompson, R. C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7976-7981
13. Martodam, R. R., Baugh, R. J., Twumasi, D. Y. & Liener, I. E. (1979) *Prep. Biochem.* **9**, 15-31
14. Van-Seuningen, I. & Davril, M. (1990) *Anal. Biochem.* **186**, 306-311
15. Klein, A., Lamblin, G., Lhermitte, M., Roussel, P., Breg, J., Van Halbeck, H. & Vliegthart, J. F. G. (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 631-642
16. Lamblin, G., Lhermitte, M., Degand, P. & Roussel, P. (1979) *Biochimie* **61**, 23-43
17. Zacharius, R. M., Teu, T. E., Morrison, J. H. & Woodlock, J. J. (1969) *Anal. Biochem.* **30**, 148-152
18. Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685
19. Rodriguez-Romero, A., Arreguin, B. & Hernandez-Arana, A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **998**, 21-24
20. Woody, R. W. (1974) in *Peptides, Polypeptides and Proteins* (Blout, E. R., Bovey, F. A., Goodman, M. & Lotan, N., eds.), pp. 338-350, John Wiley and Sons, New York
21. Feldhoff, P. A., Bhavanandan, P. & Davidson, E. A. (1979) *Biochemistry* **18**, 2430-2436
22. Cheng, P.-W., Boat, T. F., Cranfill, K., Yankaskas, J. R. & Boucher, R. C. (1989) *J. Clin. Invest.* **84**, 68-72
23. Vogelmeier, C., Hubbard, R. C., Fells, G. A., Schnebli, H.-P., Thompson, R. C., Fritz, H. & Crystal, R. G. (1991) *J. Clin. Invest.* **87**, 482-488
24. Kim, K. C., Wasano, K., Niles, R. M., Schuster, J. E., Stone, P. J. & Brody, J. S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9304-9308

Received 14 June 1991/7 August 1991; accepted 19 August 1991

CONCLUSIONS

1. L'interaction entre le MPI et les mucines bronchiques modifie la structure du MPI par la formation d'hélice- α , alors que seul il adopte en solution une structure inorganisée. Ce changement de conformation peut avoir des conséquences sur l'activité du MPI envers l'ELH.

2. L'interaction du MPI avec les glycopeptides de mucines "sulfatés" est différente de celle obtenue avec les mucines. Elle est très faible avec les glycopeptides "neutres" désialylés. Cela montre que les résidus de sulfate et d'acide sialique sont largement impliqués dans l'interaction avec le MPI.

3. L'ELH dégrade rapidement les mucines bronchiques en glycopeptides ayant une masse équivalente aux glycopeptides pronasiques ($M_r = 440\ 000$). Ceci a pour conséquence une perte des propriétés rhéologiques de la solution de mucines puisque l'aspect gélifforme que l'on observe au départ disparaît après la protéolyse.

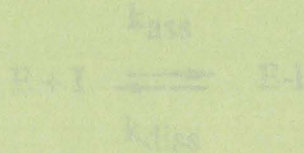
4. Le MPI associé aux mucines est capable de retarder et de diminuer l'effet néfaste de l'ELH sur les mucines.

5. L'interaction MPI-mucines démontrée dans ce travail peut avoir une importance à deux niveaux dans la physiopathologie pulmonaire. Tout d'abord, elle confère au MPI un rôle dans la protection des mucines contre la protéolyse et le maintien de leurs propriétés rhéologiques ; d'autre part elle peut influencer sur l'équilibre "protéase-antiprotéase" au niveau bronchique du fait de la diminution de l'activité inhibitrice du MPI envers l'ELH.

A. INTERACTION AVEC LES ENZYMES HUMAINS

Le MPI a été testé avec l'ELH et la Cat O qui sont ses deux enzymes cibles dans le tractus respiratoire. Ces deux enzymes ont été préparés au laboratoire à partir d'exsudats bronchiques purifiés selon la méthode de Martodan et coll. (146).

Le MPI réagit avec les enzymes par un mécanisme pseudo-irréversible (146, 57, 58) selon :



CHAPITRE III

INTERACTION DU MPI AVEC LES SERINE-PROTEASES

Principe du dosage.

Pour mesurer l'activité inhibitrice du MPI vis-à-vis des différents enzymes, des quantités variables de MPI sont incubées pendant 10 min à 35°C avec une quantité constante d'enzyme dans un temps approprié puis l'activité résiduelle de l'enzyme est déterminée sur un substrat synthétique. Cette activité est exprimée en % de l'activité d'une solution d'enzyme de même concentration en l'absence d'inhibiteur, dosée dans les mêmes conditions (voir Annexe technique, § E). Le pourcentage d'activité inhibitrice des solutions de MPI au point d'équivalence est calculé selon :

$$\% \text{ act. inh.} = (1/I/E) \times 100$$

où I/E est le rapport molaire des deux constituants.

A. I. ELASTASE GRANULOCYTAIRE

Aucun réactif titrant spécifique du site actif de l'ELH n'étant disponible dans le commerce, nous avons mesuré l'activité de la solution utilisée grâce aux constantes cinétiques déterminées par Nakajima et coll. (148) avec le substrat succinyl-(Ala)₃-paranitroanilide (Suc-(Ala)₃-pNA). L'activité a été rapportée à la concentration en protéine déterminée par son absorption à 280 nm et a montré que la préparation avait 94 % de l'activité théorique (voir Annexe technique, § E. I.).

La courbe d'inhibition de l'ELH par le MPI est linéaire (Fig. 12). L'extrapolation pour une activité nulle donne un rapport molaire d'inhibition I/E = 1,32/1. Etant donné que ce rapport est proche de 1/1, on peut admettre qu'une molécule de MPI interagit avec une molécule d'ELH. Nous pouvons en déduire que la préparation de MPI est active à 75,7% sur l'ELH.

A. II. CATHEPSINE G GRANULOCYTAIRE

De même que précédemment, l'activité de la préparation d'enzyme a été mesurée grâce aux constantes cinétiques décrites avec le substrat succinyl-(Ala)₂-Pro-Phe-paranitroanilide (Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA) (148). Cette activité a été rapportée à la concentration en protéine, ce qui a montré que la préparation avait 96 % de l'activité théorique (voir Annexe technique, § E. II.).

La courbe d'inhibition de la Cat G par le MPI est linéaire (Fig. 13). L'extrapolation pour une activité nulle montre un rapport d'inhibition de 1,18/1. Etant donné que le rapport molaire est proche de 1/1, on peut admettre qu'une molécule d'inhibiteur interagit avec une molécule de Cat G. Nous pouvons en déduire que la préparation de MPI est à 84,7% active sur cet enzyme.

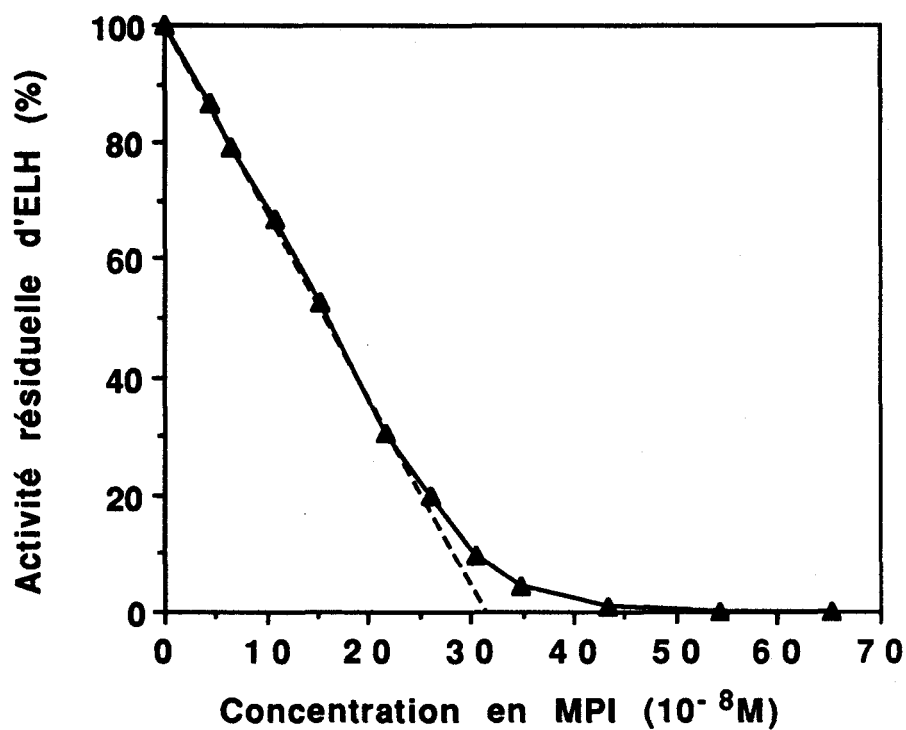


Figure 12 : Titration de la solution de MPI par l'ELH.
Concentration finale en enzyme : $24,6 \times 10^{-8}$ M.
L'incubation est effectuée pendant 10 min à 25°C , puis l'activité amidasique résiduelle de l'enzyme est mesurée après addition du substrat Suc-(Ala)₃-pNA (10^{-3} M).

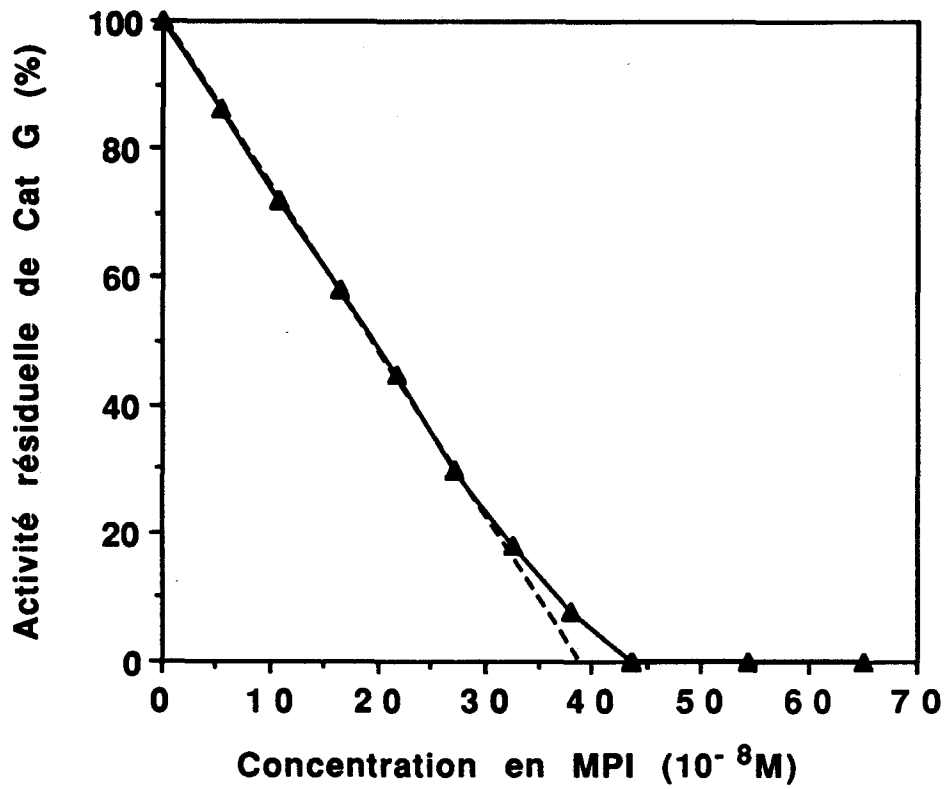


Figure 13 : Titration de la solution de MPI par la Cat G.
Concentration finale en enzyme : $33,4 \times 10^{-8}$ M.
L'incubation est effectuée pendant 10 min à 25°C , puis l'activité amidasique résiduelle de l'enzyme est mesurée après addition du substrat Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA (10^{-3} M).

B. INTERACTION AVEC UN ENZYME D'ORIGINE ANIMALE : LA TRYPSINE BOVINE

L'étude de la stoechiométrie de réaction entre le MPI et la trypsine bovine est importante dans le but de déterminer la position et le nombre de site(s) actif(s) envers cet enzyme. Actuellement, certains auteurs pensent que le site se trouve entre les résidus Arg20-Tyr21 (67) alors que d'autres pensent qu'il est situé dans le second domaine de la molécule près du site actif envers l'ELH (64-66). D'autre part, Boudier et Bieth (147) pensent que le rapport molaire I/E est 1/2.

La trypsine bovine a été titrée selon la méthode décrite par Chase et Shaw par le réactif p-nitrophényl-p'-guanidinobenzoate (149). L'hydrolyse de ce composé par la trypsine passe par la formation instantanée d'un intermédiaire d'acyl-enzyme avec la libération de p-nitrophénol. L'étape de désacylation est très lente et donc non mesurable. La quantité de phénol libéré est exactement équivalente à la concentration en site actif de l'enzyme.

Le calcul de la concentration en site actif dans l'enzyme rapportée à la teneur en protéine permet de conclure que la solution de trypsine contient 64,7% d'enzyme actif (voir Annexe technique, § E. III.).

Après extrapolation de la partie linéaire de la courbe d'inhibition de la trypsine par le MPI pour une activité nulle, on obtient la concentration en MPI au point d'équivalence (Fig. 14). Cette valeur est rapportée à la concentration en site actif de l'enzyme, ce qui permet d'obtenir le rapport I/E de 1,29/1 au point d'équivalence. Sur la base d'une stoechiométrie d'interaction de 1/1, on peut donc calculer que la préparation de MPI est active à 77,5% sur la trypsine bovine.

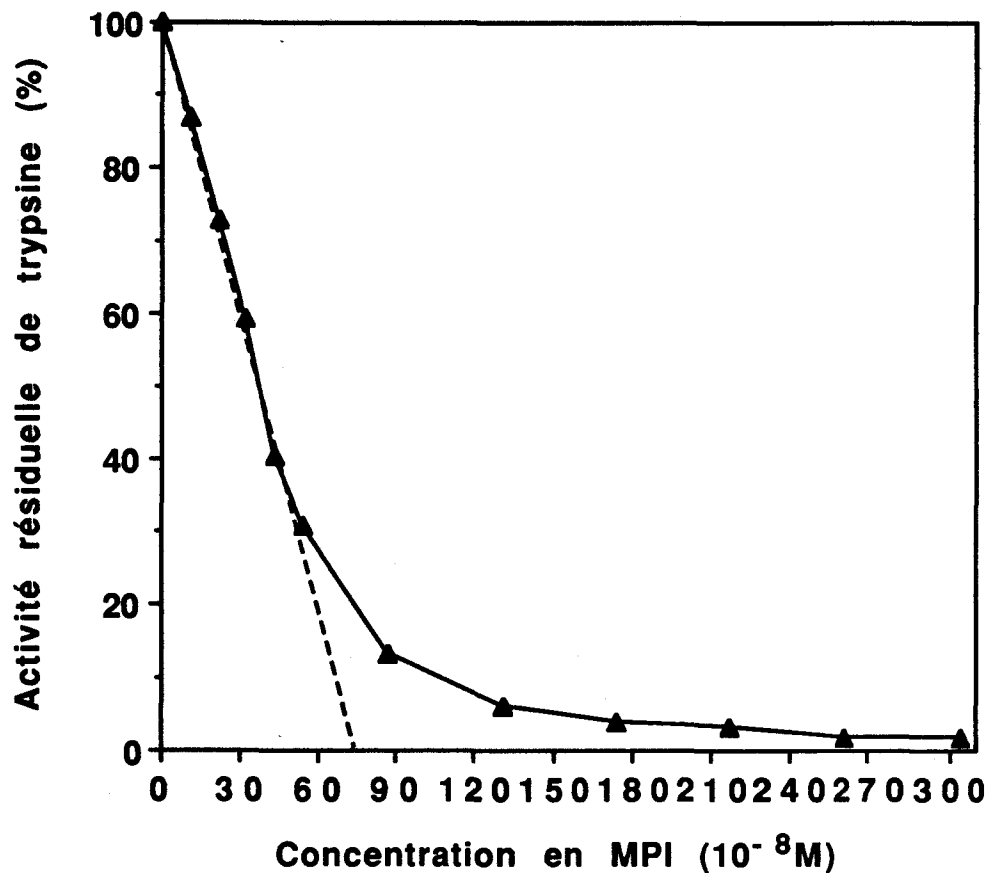


Figure 14 : Titration de la solution de MPI par la trypsine pancréatique bovine.

Concentration finale en enzyme : $57,2 \times 10^{-8}$ M.

L'incubation est effectuée pendant 10 min à 25°C , puis l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée après l'addition du substrat N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide ($0,5 \times 10^{-3}$ M).

CONCLUSIONS

1. L'inhibiteur bronchique réagit selon des réactions équimolaires avec les trois sérine-protéases testées.

Enzyme	Rapport molaire (I/E)
ELH	1,32/1
Cat G	1,18/1
Trypsine bovine	1,29/1

Les rapports molaires obtenus expérimentalement sur des préparations d'enzymes granulocytaires standardisées et sur un enzyme titré directement sont très proches et montrent qu'une faible partie de la préparation de MPI est inactive (environ 20%).

2. Ces résultats montrent aussi qu'un seul site actif réactionnel existe dans la molécule de MPI. Nos résultats sont donc en accord avec ceux déjà décrits dans la littérature (46, 57, 58). Par contre, nous n'avons pas retrouvé des rapports molaires I/E de 1/2 pour la Cat G et la trypsine bovine comme ceux que Boudier et Bieth ont publiés (147).

CHAPITRE IV

ETUDE STRUCTURALE DU MPI

Cette étude a été entreprise dans le but :

1) d'amener de nouvelles connaissances quant à la structure primaire du MPI et notamment des deux domaines en relation avec leur capacité inhibitrice propre et avec leur capacité à interagir avec d'autres constituants du mucus. Les données de la littérature sont limitées à la connaissance des 29 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale (48).

2) de comparer la molécule d'origine bronchique aux inhibiteurs isolés des autres sécrétions beaucoup mieux décrits dans la littérature, notamment l'inhibiteur salivaire (49) et au rSLPI qui nous a été donné par Synergen.

3) de localiser la différence de masse obtenue par ESMS (voir Chapitre I., § B. IV., p. 62).

L'étude de la structure primaire a été effectuée tout d'abord sur la molécule entière afin de vérifier l'intégrité structurale de la préparation de MPI.

Nous avons ensuite entrepris de cliver la molécule au niveau de la zone intermédiaire entre les deux domaines (Fig. 15). Jusqu'à maintenant, les deux domaines du SLPI ont été obtenus par des techniques de biologie moléculaire (64-66). Notre principal problème a été de trouver une méthode permettant une coupure sélective entre les deux domaines tout en préservant l'intégrité de chacun, de manière à conserver leur activité biologique.

A. SEQUENCE N-TERMINALE ET MASSE DE LA MOLECULE ENTIERE

Comme déjà décrit dans le Chapitre I, § B. III. et B. IV., p. 62, la séquence N-terminale correspondant aux 9 premiers résidus d'acides aminés et la masse chimique obtenue par ESMS attestent de l'intégrité de la préparation de MPI.

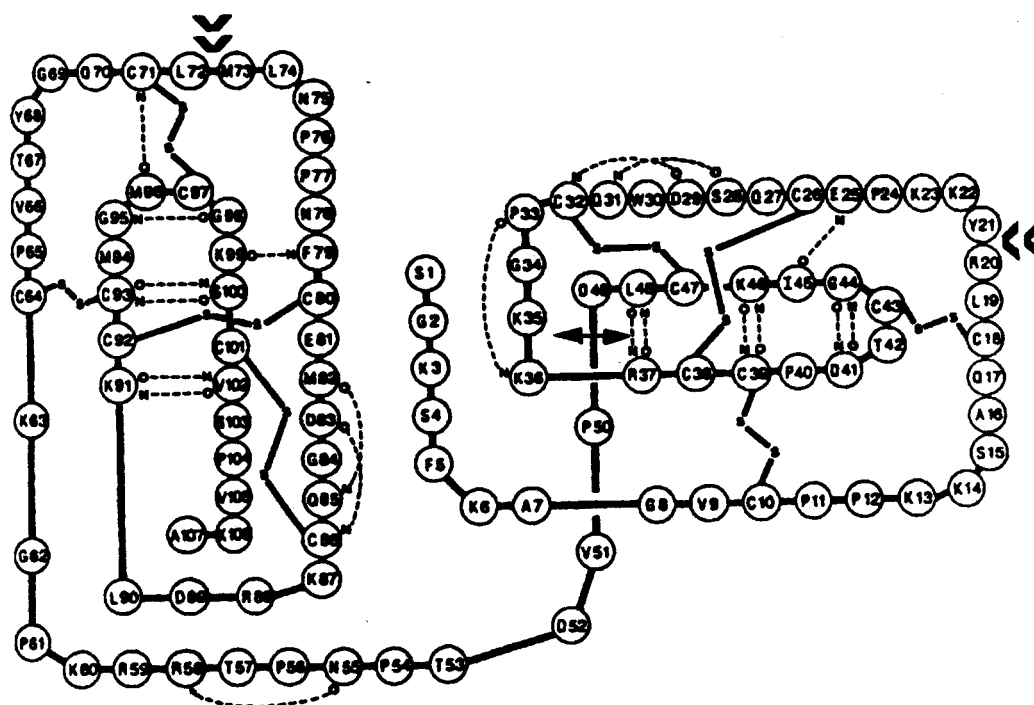


Figure 15 : Structure du rSLPI cristallisé déduite de l'étude par diffraction des rayons X (67). La double flèche indique le lieu de coupure prévu au niveau de la liaison Asp49-Pro50 après traitement par l'acide formique. Les double V indiquent les positions des sites actifs envers les protéases (67).

B. SEPARATION DES DEUX DOMAINES

Dans le but d'obtenir les deux domaines dans leur intégrité, il nous a fallu rechercher une méthode permettant une coupure située dans la zone charnière comprise entre les acides aminés Leu48 et Lys63 si l'on se réfère à la structure primaire du SLPI (67). La présence d'une liaison unique Asp-Pro en position 49-50 a donc été mise à profit pour obtenir un clivage spécifique à ce niveau par l'acide formique (150).

B. I. COUPURE CHIMIQUE DE LA LIAISON ASP-PRO

Le traitement est effectué en parallèle sur le MPI et sur le rSLPI. 5 mg d'inhibiteur sont dissous dans 3,5 ml d'acide formique à 100% (Merck) et 1,5 ml d'eau Millipore puis incubés à 40°C pendant 7 jours. Le mélange est ensuite dilué par un volume d'eau puis lyophilisé ; deux rinçages par l'eau suivis de lyophilisations sont effectués afin d'éliminer les traces d'acide. Etant donné que le MPI est une protéine acido-stable, le traitement par l'acide formique a été allongé à une semaine au lieu de 48 h (150) afin d'augmenter le rendement de coupure.

B. II. SEQUENCES DES FRAGMENTS OBTENUS APRES TRAITEMENT DU MPI PAR L'ACIDE FORMIQUE

Dans un premier temps, afin de contrôler la sélectivité de la méthode de clivage utilisée, la détermination de séquence a été effectuée sans séparation préalable des fragments résultant du traitement du MPI par l'acide formique.

Trois séquences ont pu être identifiées par comparaison avec la structure connue du SLPI (Fig. 15). Celles-ci sont indiquées dans la Fig. 16. La première séquence correspond à celle de l'extrémité N-terminale de la molécule entière ; la deuxième résulte de la coupure spécifique attendue de la liaison Asp49-Pro50 ; la troisième semble être la conséquence d'un clivage partiel de la liaison Asp52-Thr53.

Afin d'identifier de manière précise l'élément responsable de l'augmentation de la masse du MPI et de définir s'il existe un site actif d'inhibition dans chacun des domaines, nous avons entrepris de les purifier.

B. III. PURIFICATION DES FRAGMENTS DE MPI ET DE rSLPI PAR HPLC EN PHASE INVERSE

B. III. 1. Colonne C8 Synchronpak (Synchron)

La colonne utilisée (250 x 4,1 mm) est composée de silice sur laquelle sont greffés des groupements octylsilane (C8). Les conditions d'élution sont décrites dans la légende de la Fig. 17. Le profil obtenu à partir du MPI montre trois fractions (Fig. 17). La première est éluée à 21% de solvant B ; la Fraction 2 est composée d'un pic élué à 32% et d'un autre élué à 34% ; enfin la Fraction 3 est éluée à 40%. Le temps de rétention du dernier pic correspond à celui du MPI lorsqu'il est déposé seul sur la même colonne (flèche verticale). Seules les deux dernières fractions (2 et 3) possèdent des activités anti-élastasique et anti-trypsique détectées en microplaques (voir Annexe technique, § F.).

L'étude de ces trois pics en SDS-PAGE sur PhastGel (encart) montre que la Fraction 1 correspond à un peptide de $M_r = 8\ 200$; la Fraction 2 montre une bande de M_r comprise entre 8 200 et 10 800 et une deuxième bande protéique située à 14 600 ; la Fraction 3 contient quant à elle le MPI non clivé situé entre 19 000 et 20 100.

Les même types de profils chromatographique et électrophorétique sont obtenus avec le rSLPI ; seule la Fraction 3 a disparu, ce qui indique que la totalité de la protéine recombinante a été clivée.

Les Fractions 1 et 2 sont ensuite purifiées sur une colonne C18 afin d'obtenir des produits propres pour les études de caractérisation des domaines.

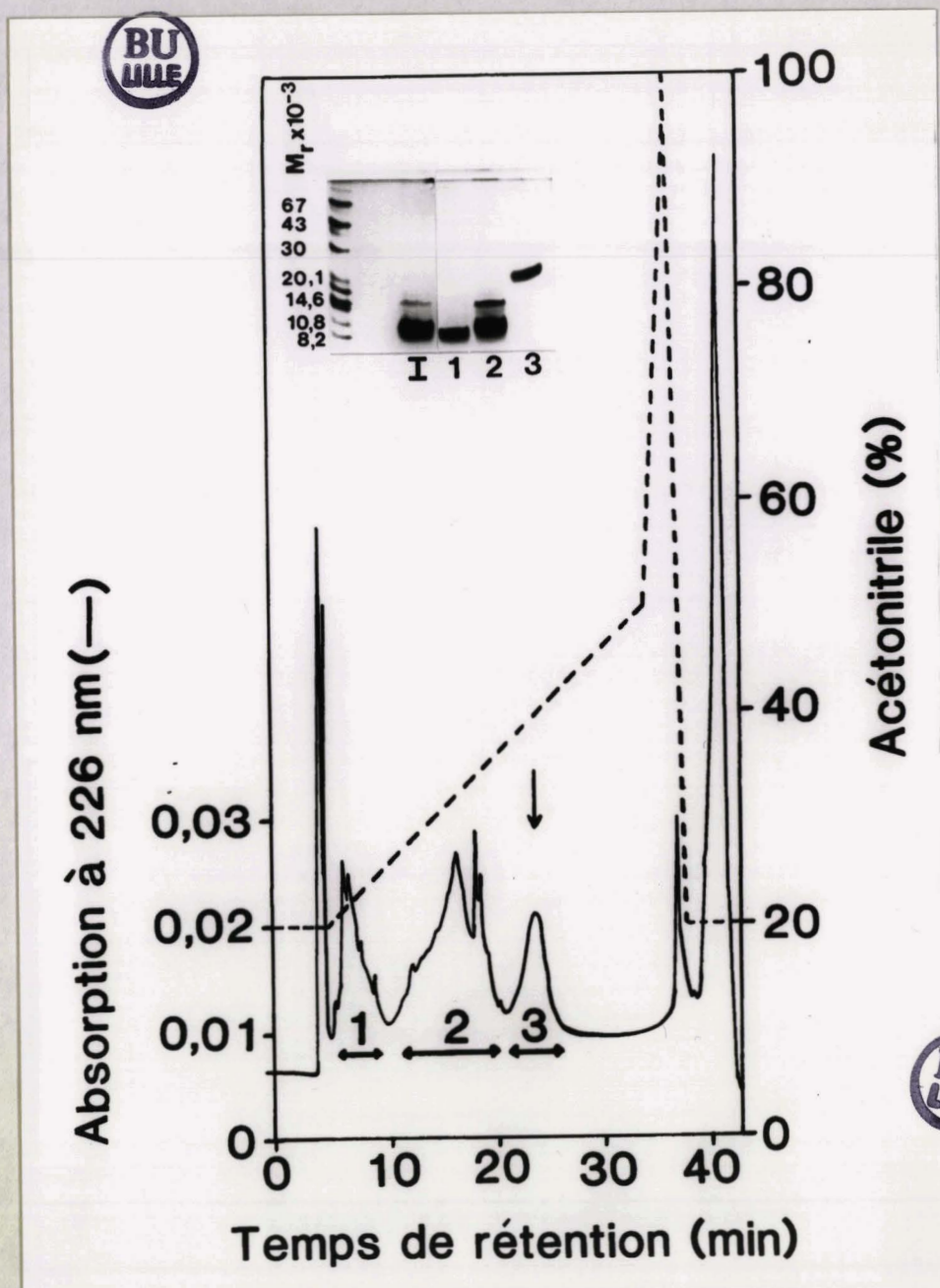


Figure 17 : Profil HPLC des fragments de MPI obtenus après traitement par l'acide formique, sur une colonne de silice greffée (C8). Les Fractions 1, 2 et 3 ont été individualisées comme indiqué par les doubles flèches.

Solvant A : ATFA 0,1% dans eau Millipore

Solvant B : ATFA 0,1% dans acétonitrile

20 μ g de protéines sont déposés sur la colonne. Le débit est de 1 ml/min et le volume des fractions recueillies de 1 ml.

Encart : SDS-PAGE sur PhastGel (20% high-density) des Fractions 1, 2 et 3. I : mélange initial. Le gel est coloré au nitrate d'argent (voir Annexe technique, § A. I. 5. et B. II.).

B. III. 2. Colonne C18 μ Bondapak (Waters-Millipore)

La colonne utilisée (300 x 3,9 mm) est composée de silice greffée par des groupements de type octadécylsilane (C18).

B. III. 2. 1. Purification des Fractions 1

Les profils des Fractions 1 obtenues précédemment pour le MPI et le rSLPI montrent un seul pic homogène élué à 26% de solvant B (Fig. 18, A et C).

Après électrophorèse à pH 4,3 sur PhastGel, nous pouvons observer deux bandes majeures qui migrent à un niveau proche du front de migration, attestant du caractère basique de ces composés (Fig. 19 A, ligne 1). L'obtention de 2 bandes dans ce système de gel peut s'expliquer par une désamidation partielle des résidus Asn et Gln au cours de la préparation. Cette fraction ne montre aucune activité inhibitrice envers la chymotrypsine bovine (Fig. 19 B). Ce résultat confirme ceux obtenus après la séparation sur colonne C8. D'autre part, après avoir effectué un transfert électrique à partir du gel acide (voir Annexe technique, § D. II.), la fraction réagit positivement avec des immunoglobulines dirigées contre la protéine native (Fig. 19 C). Les mêmes résultats sont obtenus avec les Fractions 1 dérivées du MPI et du rSLPI.

B. III. 2. 2. Purification des Fractions 2

Le profil obtenu pour le MPI montre un pic assez large élué à 29% de solvant B avec un épaulement à 30% (Fig. 18 B). Le profil obtenu pour le rSLPI montre un premier pic majeur élué à 31% de solvant B et un second pic élué à 33% (Fig. 18 D).

En gel acide (Fig. 19, lignes 2), une bande majeure et une bande mineure de mobilité plus élevée sont visualisées (partie A). L'étude de l'activité inhibitrice montre que les deux bandes possèdent une activité envers la chymotrypsine bovine (Fig. 19 B). De même que pour les Fractions 1, les deux bandes réagissent positivement avec les anticorps dirigés contre le MPI natif (Fig. 19 C). Le même profil électrophorétique en gel acide est obtenu pour les deux pics correspondant à la Fraction 2 du rSLPI.

Nous pouvons conclure que la méthode de coupure utilisée n'a pas modifié la conformation propre des deux domaines puisqu'ils réagissent positivement avec un immunsérum dirigé contre la molécule entière.

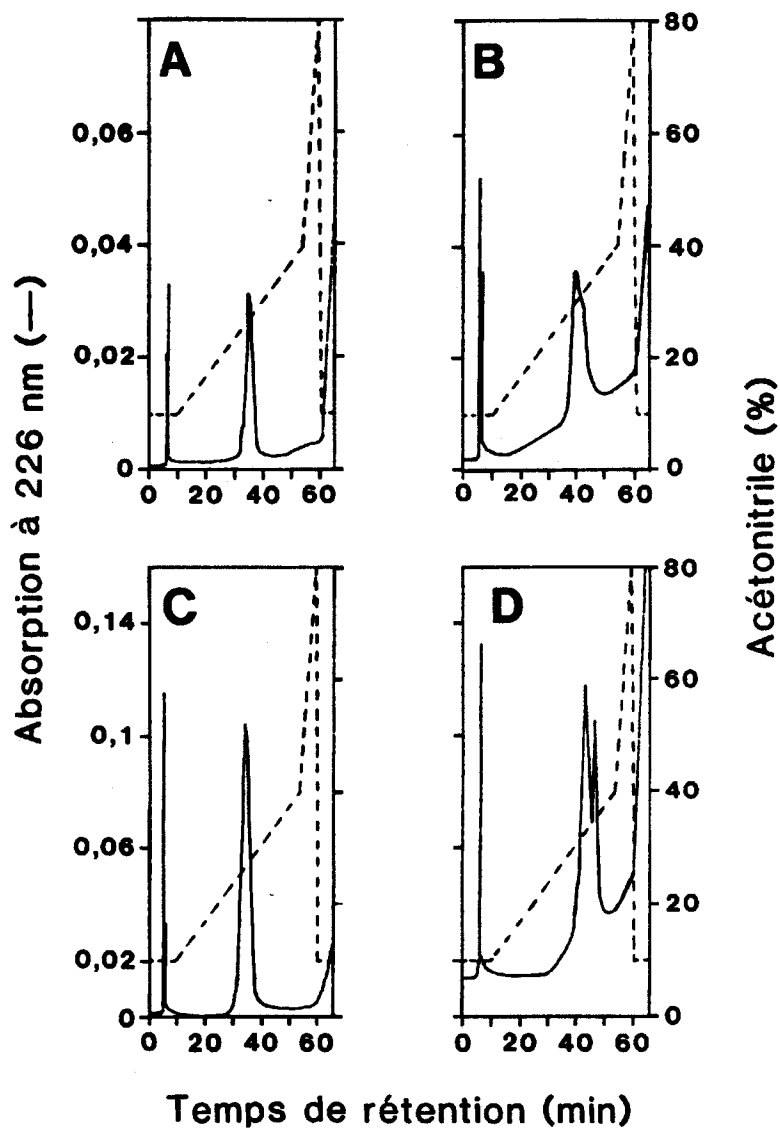


Figure 18 : Chromatographie HPLC sur une colonne C18 des Fractions 1 (A, C) et des Fractions 2 (B, D) obtenues sur la colonne C8 avec le MPI (haut) et le rSLPI (bas).
 Solvant A : ATFA 0,1% dans eau Millipore
 Solvant B : ATFA 0,1% dans acétonitrile
 30 μg sont déposés pour le MPI et 80 μg pour le rSLPI. Le débit est de 1 ml/min et le volume des fractions recueillies est de 1 ml.

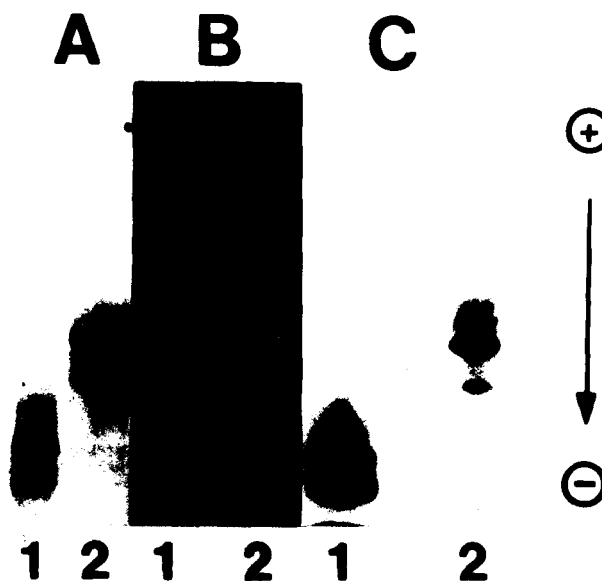


Figure 19 : Etude électrophorétique à pH 4,3 sur PhastGels (20% high-density) de la Fraction 1 (lignes 1) et de la Fraction 2 (lignes 2) de MPI purifiées sur la colonne C18 (voir Annexe technique, § A. II. 5.).

A : coloration au bleu de Coomassie R-250 (180 ng).

B : révélation de l'activité inhibitrice envers la chymotrypsine bovine (90 ng).

C : révélation immunologique, après transfert électrique, à l'aide des immunoglobulines anti-MPI total (60 ng).

C. CARACTERISATION DES DEUX DOMAINES

C. I. COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES

C. I. 1. Compositions des Fractions 1

La composition en acides aminés de la Fraction 1 du MPI élue de la colonne de C18 (voir Fig. 18 A) montre que nous sommes en présence du domaine N-terminal comprenant les résidus d'acides aminés 1 à 49 (Tableau XI). En effet, en accord avec la séquence du SLPI connue dans la littérature (49), aucun résidu Met n'est retrouvé dans cette partie de la molécule. D'autre part, le seul résidu Ile présent dans la molécule est retrouvé dans cette fraction. La composition chimique de la même fraction obtenue à partir du rSLPI (Fig. 18 C) est identique. Dans la suite du travail, ces domaines seront appelés MPI-1 et rSLPI-1.

C. I. 2. Compositions des Fractions 2

La composition en acides aminés des Fractions 2 élues de la colonne de C18 (voir Fig. 18 B et D) montre que nous sommes en présence des domaines C-terminaux du MPI et du rSLPI comprenant les résidus d'acides aminés 50 à 107 (Tableau XI). Aucun résidu Ile n'est dosé, tandis que les résidus Met localisés uniquement dans le deuxième domaine de la molécule (Fig. 15) sont dosés. Les déficits de un résidu Met (Fraction 2 du MPI) et de deux résidus Met (Fraction 2 du rSLPI) peuvent s'expliquer par des réactions d'oxydation au cours du traitement qui auraient conduit à la formation de Met sulfoxyde non quantifié dans l'analyse. Dans la suite du travail, ces domaines seront appelés MPI-2 et rSLPI-2.

TABLEAU XI

Compositions chimiques des domaines N- et C-terminaux obtenus
après traitement du MPI et du rSLPI par l'acide formique

Résidus d' acides aminés	Domaines N-terminaux			Domaines C-terminaux		
	MPI-1	rSLPI-1	SLPI ^a	MPI-2	rSLPI-2	SLPI ^a
Asp/Asn	3,2	2,9	3	6,3	6,0	6
Thr	1,0	1,0	1	3,0	3,0	3
Ser	3,6	3,6	4	2,3	2,0	2
Glu/Gln	4,5	4,5	4	3,9	3,6	3
Pro	5,2	5,3	5	8,4	7,7	8
Gly	4,4	4,1	4	5,6	5,2	5
Ala	2,1	2,1	2	1,4	1,0	1
Cys/2	6,6	7,2	8	6,7	7,0	8
Val	1,1	0,8	1	3,6	3,4	4
Met	0,0	0,0	0	3,1	2,1	4
Ile	1,1	0,8	1	0,2	0,4	0
Leu	2,1	2,0	2	3,2	3,1	3
Tyr	0,8	1,1	1	1,0	1,0	1
Phe	1,0	1,0	1	1,1	1,1	1
His	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0
Lys	9,2	9,8	9	7,4	6,7	6
Arg	2,0	1,7	2	2,9	2,7	3
Trp	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	0
Total	48	48	49	58	58	58

Les valeurs sont calculées pour un total de 48 résidus au lieu de 49 dans les domaines N-terminaux (Trp n'étant pas dosé) et de 58 résidus pour les domaines C-terminaux.

(a) : le calcul de la composition en acides aminés est déduit de la séquence du SLPI (49).

n.d. : non déterminé.

C. II. SEQUENCES PEPTIDIQUES

C. II. 1. Séquences N-terminales de MPI-1 et rSLPI-1

La séquence peptidique effectuée sur les 12 premiers résidus d'acides aminés montre que MPI-1 est pur (Tableau XII). D'autre part, la séquence est identique à la partie N-terminale du MPI natif (Fig. 20). Le même résultat a été obtenu pour le domaine N-terminal préparé à partir du rSLPI.

C. II. 2. Séquences N-terminales de MPI-2 et rSLPI-2

Les résultats de séquence pour MPI-2 (Tableau XII) et rSLPI-2 semblent confirmer, d'après le rendement de chaque cycle de séquençage, l'existence d'une coupure mineure au niveau de la liaison Asp52-Thr53, déjà détectée sur le mélange de départ (voir § B. II., p. 85). Ce résultat pourrait expliquer la présence d'un épaulement dans le profil d'élution de MPI-2 sur la colonne C18 (Fig. 18 B) et la présence des deux pics incomplètement séparés pour rSLPI-2 (Fig. 18 D).

Nous pouvons aussi conclure que la séquence en acides aminés du MPI comprise entre les résidus 50 et 68 est en tous points identique à celle du SLPI décrite dans la littérature (49) (Fig. 20).

C. III. MASSES MOLECULAIRES

Les masses exactes des deux domaines ont été étudiées par ESMS (voir Annexe technique, § I.) dans le but :

- 1) de confirmer l'intégrité des domaines
- 2) de vérifier la présence des séquences mineures
- 3) de localiser la différence de masse obtenue sur la molécule entière (voir Chapitre I, § B. IV., p. 62 et 63)

TABLEAU XII

Rendements en picomoles (pmoles) des cycles de séquençage
pour MPI-1 et MPI-2

MPI-1			MPI-2				
n° cycle	acide aminé	pmoles	n° cycle	acide aminé	pmoles	acide aminé	pmoles
1	Ser	n.q.	1	Pro	103,8	Thr	16,1
2	Gly	19,1	2	Val	100,2	Pro	43,1
3	Lys	25,8	3	Asp	44,4	Asn	43,0
4	Ser	n.q.	4	Thr	18,3	Pro	23,4
5	Phe	27,3	5	Pro	48,0	Thr	n.q.
6	Lys	17,5	6	Asn	51,2	Arg	22,1
7	Ala	22,4	7	Pro	43,2	Arg	7,1
8	Gly	17,9	8	Thr	18,4	Lys	17,8
9	Val	13,9	9	Arg	11,1	Pro	9,1
10	X	-	10	Arg	12,8	Gly	14,3
11	Pro	3,3	11	Lys	20,5	Lys	8,0
12	Pro	1,9	12	Pro	21,4	X	-
			13	Gly	7,9	Pro	n.q.
			14	Lys	6,6	Val	7,0
			15	X	-	Thr	n.q.
			16	Pro	10,9	Tyr	2,6
			17	Val	12,2		
			18	Thr	n.q.		
			19	Tyr	8,1		

n.q. : non quantifié.

X : présence d'une cystéine engagée dans un pont disulfure ; aucun PTH-dérivé n'est identifié dans le cycle correspondant.

	1									10
SLPI	Ser	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Ala	Gly	Val	Cys
MPI-1	Ser	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Ala	Gly	Val	X
rSLPI-1	Ser	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Ala	Gly	Val	-

	12
SLPI	Pro Pro-
MPI-1	Pro Pro-
rSLPI-1	- -

	50									59
SLPI	-Pro	Val	Asp	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Arg
MPI-2	-Pro	Val	Asp	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Arg
rSLPI-2	-Pro	Val	Asp	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Arg

	60									68
SLPI	Lys	Pro	Gly	Lys	Cys	Pro	Val	Thr	Tyr-	
MPI-2	Lys	Pro	Gly	Lys	X	Pro	Val	Thr	Tyr-	
rSLPI-2	Lys	Pro	Gly	-	-	-	-	-	-	

Figure 20 : Comparaison des séquences obtenues pour MPI-1, rSLPI-1, MPI-2 et rSLPI-2 avec celle du SLPI (49).

- : non séquencé.

C. III. 1. Masses moléculaires de MPI-1 et rSLPI-1

Le spectre de masse de MPI-1 (Fig. 21) montre trois séries majeures d'ions multichargés de 5 à 7 charges (A, B et C). La série A a une M_r de $5399,5 \pm 0,6$ (Tableau XIII), ce qui est en accord avec la masse théorique calculée (M_{cal}) à partir de la séquence du SLPI (49) qui est de 5404,5. La différence de masse de 5 unités est imputée à la présence de ponts disulfure. La série B ($M_r = 5428,6 \pm 0,7$) correspond à un peptide ayant une masse augmentée de 29,1 par rapport à la série A ; la M_r de la série C est aussi augmentée de 26,7 par rapport à la série B. Ces deux formes (B et C) pourraient correspondre à MPI-1 ayant subi une modification de sa structure par une réaction de formylation au cours du traitement (151).

Le spectre de masse de rSLPI-1 montre cinq séries d'ions multichargés de 5 à 7 charges (A à E) (Fig. 21). On peut distinguer deux familles : la première est majeure et correspond aux séries A, B et C et la seconde qui est mineure correspond aux séries D et E. Dans la famille majeure, la série B la plus représentée correspond à un peptide de $M_r = 5429,00 \pm 0,7$, la série A à un peptide de $M_r = 5400,44 \pm 0,3$ et la série C à un peptide de $M_r = 5457,7 \pm 1,3$ (Tableau XIII). On peut donc en déduire que la masse de la série A est en accord avec la M_{cal} pour rSLPI-1. Comme précédemment, on retrouve un déficit de 4,1 qui est dû à la présence des ponts disulfure. La série B montre une M_r augmentée de 28,6 par rapport à la série A, de même la M_r de la série C est supérieure de 28,7 par rapport à la série B. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus pour MPI-1 ; dans ce cas, les séries B et C seraient des peptides correspondant à rSLPI-1 ayant subi des réactions de formylation. Les séries D et E mineures correspondent respectivement à des peptides de $M_r = 5285,1 \pm 0,2$ et $5313,2 \pm 0,9$ (Tableau XIII). La différence de masse entre la série D et la série A est égale à 115,3 ; la série D pourrait correspondre à la séquence du rSLPI-1 amputée du résidu Asp49 qui aurait été éliminé par énucléation (152) au cours du traitement par l'acide formique (la masse d'un résidu Asp est de 115,1). La série E serait le même peptide formylé puisque la M_r est augmentée de 28,1.

Nous pouvons conclure que le traitement par l'acide formique effectué sur MPI et sur rSLPI donne le même résultat pour les domaines N-terminaux. Les masses obtenues montrent qu'ils sont intacts après traitement par l'acide formique. Dans le cas de rSLPI-1, une partie mineure (20%) a subi une énucléation du résidu Asp49 en position C-terminale dans le domaine.

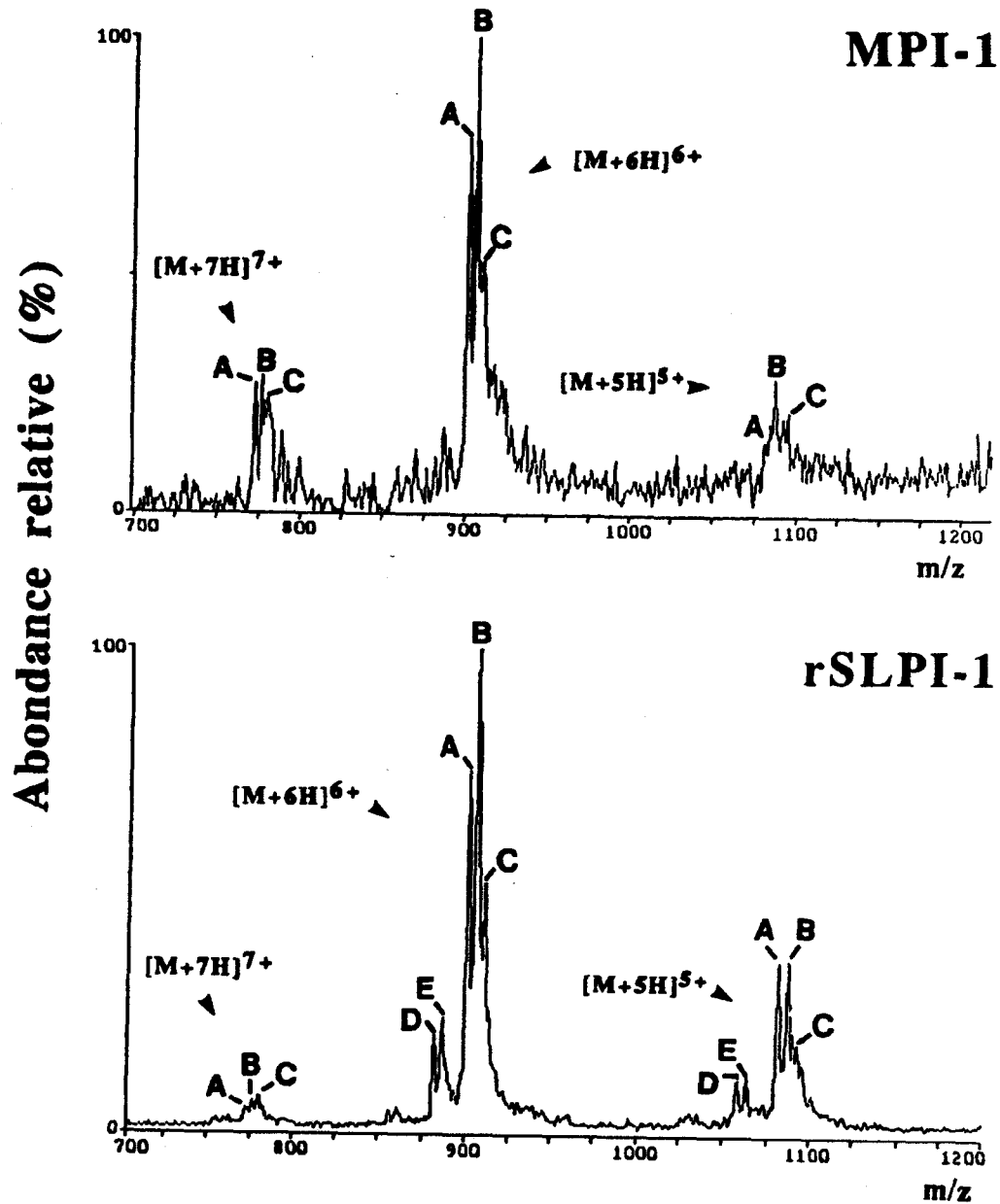


Figure 21 : Spectres de masse obtenus par ESMS de MPI-1 et rSLPI-1. Une famille majeure composée de trois séries (A, B et C) et une famille mineure composée de deux séries (D et E), uniquement détectée dans le cas de rSLPI-1, sont visualisées. Les séries A, B et C correspondent à la masse attendue tandis que les séries D et E présentent une M_r diminuée de 115, attribuée à la perte du résidu Asp49 (voir Fig. 15, p. 84).

TABLEAU XIIIRésumé des résultats des mesures effectuées en ESMS sur MPI-1 et rSLPI-1

Les différences de masses indiquées en **gras** correspondent à celles des peptides les plus proches de la masse théorique calculée d'après la séquence ; celles qui sont soulignées correspondent aux séries présentant une augmentation de masse pouvant correspondre à une formylation.

La différence de masse indiquée *en italique* correspond à celle de *rSLPI-1* ayant subi l'énucléation de Asp49.

M_{cal} : masse moléculaire théorique calculée d'après la séquence du SLPI (49).



Famille majeure :

	M _{cal}	Série A (MA)	MA-M _{cal}	Série B (MB)	MB-MA	Série C (MC)	MC-MB
MPI-1	5404,5	5399,5 ± 0,6	- 5,0	5428,6 ± 0,7	<u>29.1</u>	5455,3 ± 12	<u>26.7</u>
rSLPI-1	5404,5	5400,5 ± 0,3	- 4,1	5429,0 ± 0,7	<u>28.6</u>	5457,7 ± 1,3	<u>28.7</u>

Famille mineure :

	M _{cal}	Série D (MD)	MD-MA	Série E (ME)	ME-MD
rSLPI-1	5404,5	5285,08 ± 0,2	- <i>115,3</i>	5313,2 ± 0,9	<u>28.1</u>

C. III. 2. Masses moléculaires de MPI-2 et rSLPI-2

Le spectre de MPI-2 est composé de nombreux pics, ce qui montre que la fraction est hétérogène (Fig. 22). Toutefois, deux familles d'ions multichargés de 5 à 7 charges peuvent être individualisées. La première famille est mineure et est composée des séries A, B et C. La deuxième famille, majeure, est composée des séries D, D', E, F, G, H et I. Dans cette dernière famille, nous avons pu former deux sous-familles en calculant les différences de masse entre les séries (Tableau XIV).

Ainsi nous avons rassemblé les séries D, E et G, la M_r de D ($6329,7 \pm 3,4$) étant celle attendue, tandis que les séries E et G ont leur M_r augmentée de 29 et 32. Il faut noter que la série D dont la masse chimique est la plus proche ($M_r = 6\ 329,7 \pm 3,4$) de la masse théorique calculée pour MPI-2 ($M_r = 6\ 331,6$) est anormalement retrouvée en très faible quantité. La seconde sous-famille est composée des séries D', F, H et I. La série D' que l'on trouve en quantité importante, a une M_r augmentée de 13,7 par rapport à la série D. Cette série D' pourrait correspondre à la série B majeure visualisée dans le spectre de la protéine entière (Fig. 10, p. 63) qui a aussi une M_r augmentée de 14. Cette modification pourrait être la conséquence de la présence d'une forme mono-méthylée de MPI, cette méthylation se trouvant au niveau du domaine C-terminal. Comme pour MPI-1, la même différence de masse de 28 est ensuite retrouvée entre chaque série (Tableau XIV). De même que dans le paragraphe précédent, nous pouvons attribuer ces différences de masse à des réactions de formylation au cours du traitement par l'acide formique.

Dans la famille mineure, la série A correspond à la M_r de la série D amputée de 297,3 unités pour MPI-2 et de 310,9 unités pour rSLPI-2 (Tableau XIV). Cette série correspond en fait à la coupure mineure entre les résidus Asp52-Thr53 qui diminue le peptide de départ de trois résidus : -Pro50-Val51-Asp52- (voir Fig. 16, p. 86). La M_r de ce tripeptide est en effet de 311,3. A partir de cette série A, nous retrouvons les mêmes augmentations de masse déjà décrites dans les paragraphes précédents qui sont de 31,2 pour la série B et de 27,2 pour la série C.

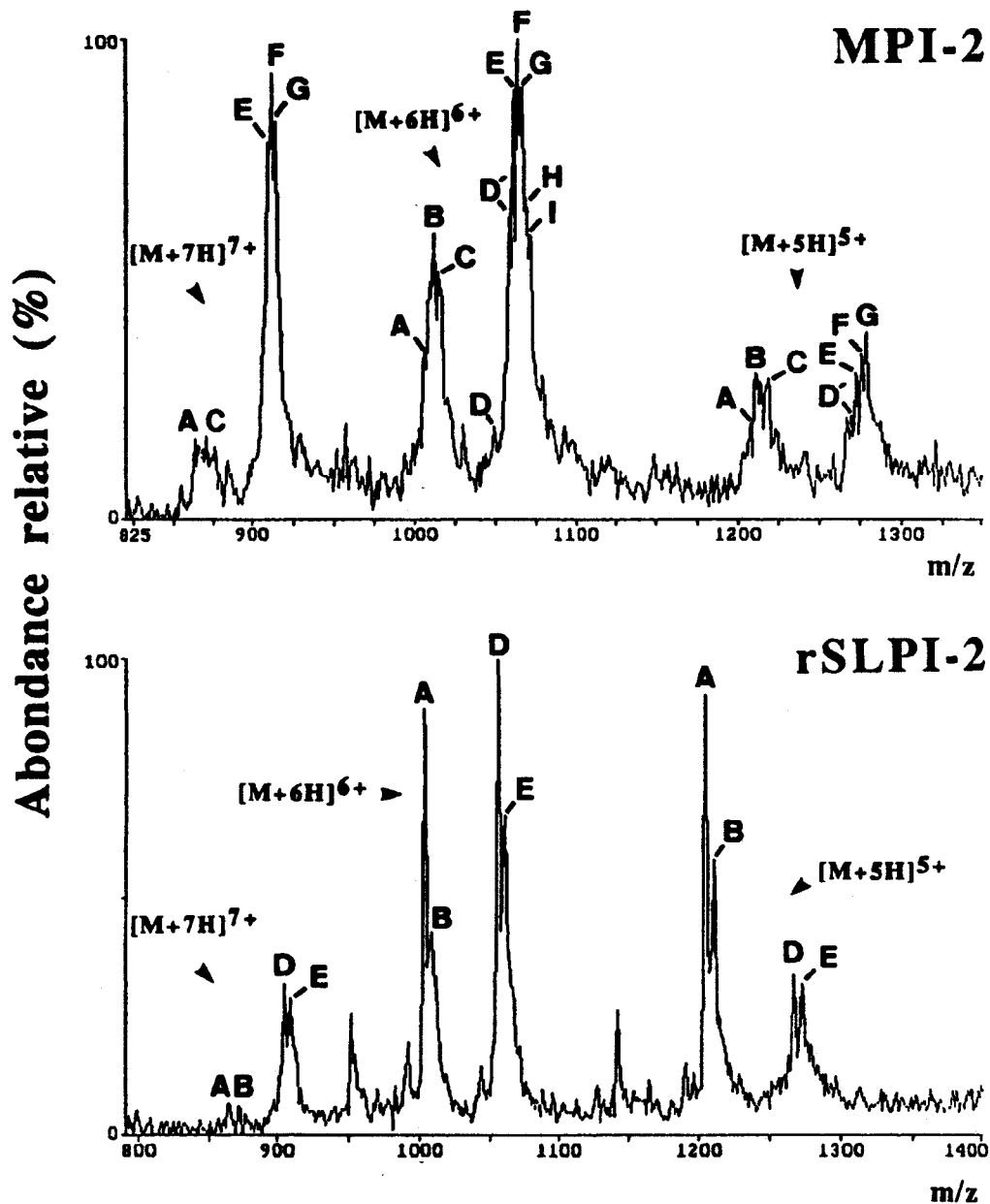


Figure 22 : Spectres de masse obtenus par ESMS de MPI-2 et rSLPI-2. Deux familles (A, B et C) et (D, D', E, F, G, H et I) d'ions multichargés de 5 à 7 charges sont obtenues. La famille A, B, C correspond à la séquence mineure amputée des trois résidus Pro50-Val51-Asp52 (voir Fig. 16, p. 86) tandis que l'autre famille correspond au domaine C-terminal dans son intégralité.

TABLEAU XIVRésumé des résultats des mesures effectuées en ESMS sur MPI-2 et rSLPI-2

Les différences de masses indiquées en **gras** correspondent à celles des **peptides les plus proches de la masse théorique calculée d'après la séquence** ; celles qui sont soulignées correspondent aux séries présentant une augmentation de masse pouvant correspondre à une formylation. Les différences de masse *en italique* correspondent aux *domaines C-terminaux amputés des résidus Pro50-Val51-Asp52*.

M_{cal} : masse moléculaire théorique calculée d'après la séquence du SLPI (49).

Famille majeure :1^{ère} sous-famille

	M _{cal}	Série D	MD-M _{cal}	Série E	ME-MD	Série G	MG-ME
MPI-2	6331,6	6329,7 ± 3,4	- 1,9	6359,1 ± 1,1	<u>29,4</u>	6391 ± 1,1	<u>31,8</u>
rSLPI-2	6331,6	6327,4 ± 0,6	- 4,2	6355,6 ± 0,2	<u>28,1</u>		

2^{ème} sous-famille

	M _{cal}	Série D'	MD'-MD	Série F	MF-MD'	Série H	MH-MF
MPI-2	6331,6	6343,4 ± 0,03	13,7	6376,3 ± 0,6	<u>32,9</u>	6402,5 ± 0,3	<u>26,2</u>
	M _{cal}	Série I	MI-MH				
MPI-2	6331,6	6430,3 ± 2,0	<u>27,8</u>				

Famille mineure :

	M _{cal}	Série A (MA)	MA-MD	Série B (MB)	MB-MA	Série C (MC)	MC-MB
MPI-2	6331,6	6032,4 ± 0,9	- 297,3	6063,6 ± 1,1	<u>31,2</u>	6090,8 ± 3	<u>27,2</u>
rSLPI-2	6331,6	6016,5 ± 0,4	- 310,9	6044,9 ± 0,02	<u>28,4</u>		

Le spectre obtenu pour rSLPI-2 (Fig. 22) est moins hétérogène. Toutefois, nous retrouvons les deux familles qui sont présentes en quantité pratiquement égales. La famille majeure qui comprend les séries D et E, correspond dans le cas de la série D à la masse calculée d'après la séquence (Tableau XIV). La différence de masse de 4,2 imputée à la présence de ponts disulfure est de nouveau visualisée. La série E, quant à elle, doit correspondre au même peptide formylé puisque sa M_r est augmentée de 28. La série A est le peptide amputé du tripeptide Pro50-Val-Asp52 et la série B est le même peptide formylé.

Les deux pics élués de la colonne de C18 (Fig. 18 D, p. 90) ont été étudiés en ESMS, le spectre présenté correspond au second pic. Le spectre obtenu en ESMS pour le premier pic élué en HPLC-C18 comprend les mêmes familles de masses, toutefois nous avons pu remarquer un enrichissement dans ce cas de la forme amputée du tripeptide Pro50-Val51-Asp52. Les profils HPLC sur la colonne de C18 peuvent donc être expliqués par l'étude de la masse de chaque sommet de pic de la manière suivante : le premier pic élué et donc le moins retenu sur la colonne correspond au domaine C-terminal amputé du tripeptide Pro-Val-Asp et le second pic est le domaine C-terminal dans son intégralité.

L'étude comparative du MPI et de ses domaines avec le rSLPI montre qu'il existe dans la molécule naturelle une forme dont la masse est augmentée de 14 unités, cette augmentation étant localisée dans le domaine C-terminal.

D. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES DOMAINES

Cette étude préliminaire a eu pour but de repérer dans chacun des domaines la présence de site(s) actif(s) envers les sérine-protéases déjà étudiées dans le Chapitre III. Ce travail n'a été effectué que sur la trypsine bovine puisque l'intérêt porte sur la détermination de la présence d'un site actif envers cet enzyme au niveau de la liaison Arg20-Tyr21 dans le domaine N-terminal. La solution d'enzyme utilisée et les conditions de dosage spectrophotométrique sont exactement les mêmes que précédemment (voir p. 80 et 81) afin de pouvoir comparer les résultats.

Dans ce travail, nous nous sommes délibérément placés en excès molaire d'inhibiteur afin de comparer l'activité inhibitrice des domaines par rapport à celle de la molécule entière ($I/E = 1,29/1$, p. 82).

En ce qui concerne les autres enzymes, nous reprenons les résultats obtenus sur les fractions éluées de la colonne C18 analysées en plaque de microtitration pour la présence d'activité inhibitrice envers l'ELH et après électrophorèse à pH 4,3 pour la chymotrypsine bovine (Fig. 19, p. 91).

D. I. ETUDE DE L'ACTIVITE DE MPI-1

Aucune activité inhibitrice de MPI-1 envers la trypsine bovine n'est présente dans le rapport MPI-1/trypsine de 1,74/1, conditions dans lesquelles la trypsine est totalement inhibée par la molécule entière (voir ci-dessus). Ce résultat montre donc que le site actif anti-trypsique (49, 67) initialement supposé être en position Arg20-Tyr21 n'existe pas. Ce résultat remet en cause des études récentes dans lesquelles le domaine N-terminal obtenu par clonage montrait une faible activité envers la trypsine bovine (64, 65).

De plus, les repérages d'activité inhibitrice envers l'ELH et la chymotrypsine bovine ont été négatifs. Ce résultat est toutefois normal puisqu'il n'existe pas de site potentiel envers ces deux protéases dans le domaine N-terminal.

D. II. ETUDE DE L'ACTIVITE DE MPI-2

L'étude de l'inhibition de la trypsine montre que MPI-2 est nettement moins actif sur l'enzyme que le MPI entier. En effet, alors que nous nous sommes placés en excès molaire de MPI-2 (MPI-2/trypsine = 1,38/1), nous n'avons observé qu'une diminution de 14% de l'activité enzymatique. Ce résultat préliminaire semble indiquer que le domaine C-terminal isolé a envers cette protéase un comportement différent de celui de la protéine native. De plus, le repérage de l'activité inhibitrice de MPI-2 envers l'ELH et la chymotrypsine bovine confirme la présence de site(s) actif(s) envers ces trois protéases dans le domaine C-terminal.

Nos résultats sont donc en accord avec les travaux effectués sur les domaines C-terminaux obtenus par le biais de la biologie moléculaire (64-66). Cela montre que le ou les site(s) actif(s) envers ces trois sérine-protéases sont bien situés dans le domaine C-terminal du MPI.

CONCLUSIONS

A. Les résultats de composition en acides aminés, de séquence peptidique et de spectrométrie de masse ESMS ont permis de montrer que :

1. Le clivage du MPI par l'acide formique à 70% a résulté non seulement en la coupure de la liaison Asp49-Pro50 mais aussi en une coupure mineure de la liaison Asp52-Thr53.

2. Des modifications chimiques de type formylation semblent avoir eu lieu sur les deux domaines isolés, ce qui expliquerait les formes ayant une M_r augmentée de 28 unités par rapport à la masse attendue.

3. La série majeure augmentée de 14 unités retrouvée dans le spectre de MPI-2 pourrait expliquer la forme de MPI entier ayant la même augmentation de masse et qui n'a pas été trouvée dans le rSLPI. Ce pourrait être une forme méthylée du MPI.

B. Les études d'activité inhibitrice des domaines isolés envers des protéases cibles montrent que :

1. Le domaine N-terminal du MPI n'a aucune activité inhibitrice vis-à-vis des sérine-protéases testées : ELH, trypsine et chymotrypsine bovines.

2. Le domaine C-terminal du MPI est inhibiteur :

d'ELH,

de trypsine,

de chymotrypsine.

Ce résultat montre que les sites actifs vis-à-vis de l'ELH, des enzymes de type chymotrypsine (Cat G et chymotrypsine) et de trypsine sont situés sur le même domaine. Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus par différents auteurs ayant travaillé à partir des deux domaines recombinants en ce qui concerne le domaine C-terminal (64-66). D'autre part, il semble que ce domaine C-terminal isolé soit moins actif sur la trypsine que le MPI entier.

3. Les mêmes spécificités d'inhibition sont trouvées avec les domaines C-terminaux obtenus à partir du MPI et du rSLPI.

**DISCUSSION GENERALE
ET
CONCLUSIONS**

Lorsque ce travail a débuté, des connaissances précises sur la structure et l'activité inhibitrice *in vitro* du MPI étaient déjà acquises. Cependant, son mode d'action au sein des sécrétions n'avait pas été envisagé. Notre but a donc été de contribuer à une meilleure connaissance de ce mode d'action *in vivo*.

Dans le **Chapitre I**, nous démontrons que le MPI ne se trouve pas à l'état libre dans la sécrétion bronchique. La preuve en a été fournie par l'utilisation de l'ultrafiltration après forte dilution du mucus par l'eau, de manière à faciliter la dispersion des mucines. En effet, dans ces conditions de faible force ionique, la totalité de l'inhibiteur présent dans l'expectoration est associée à la fraction contenant les mucines. Une autre protéine basique, le lysozyme, ayant le même comportement, celles-ci pourraient interagir avec les mucines par l'intermédiaire de liaisons ioniques. Auparavant, certains auteurs avaient suggéré une possible association au sein des sécrétions bronchiques entre glycoprotéines et protéines basiques (153) dont seul le lysozyme avait pu être identifié (154).

Ceci nous a amenée à envisager un procédé d'isolement dans des conditions de force ionique élevée. Dans ce but, l'ultracentrifugation en gradient de densité a été choisie. Nous avons effectivement bien séparé le MPI et le lysozyme des mucines. Toutefois, une quantité de MPI que nous n'avons pas pu estimer est restée associée aux mucines puisqu'un deuxième cycle d'ultracentrifugation a abouti d'une part à l'obtention des mucines pures dans la fraction de densité élevée, d'autre part, à l'isolement de MPI et de lysozyme dans la fraction de plus faible densité. Nous pouvons conclure que ce procédé semble convenir à la séparation de ces composés bien qu'il présente un inconvénient majeur : la longueur des différentes étapes préparatives pour le très faible rendement auquel on aboutit. Toutefois, dans cette étude, nous avons pu confirmer l'importance d'une force ionique élevée pour parvenir à dissocier le MPI et le lysozyme des mucines.

Nous avons émis l'hypothèse que le MPI interagissait avec les mucines par des liaisons de type ionique entre les résidus basiques de l'inhibiteur et les résidus acides (acide sialique et sulfate) des chaînes glycaniques des mucines.

Ces deux procédés n'étant pas utilisables à des fins préparatives satisfaisantes pour l'obtention de quantités substantielles de MPI, nous avons

suivi un protocole rapide, récemment décrit dans la littérature (48), permettant l'obtention de MPI sous sa forme native, avec un bon rendement.

Dans le **Chapitre II**, nous avons étudié l'interaction *in vitro* entre le MPI et les mucines en essayant de nous placer dans des conditions les plus proches possibles de la situation *in vivo*. Nous avons choisi l'approche par le dichroïsme circulaire qui permet de visualiser un changement de conformation après interaction entre deux composés. Nous avons montré que l'interaction, dans laquelle les résidus de sulfate et d'acide sialique sont largement impliqués, modifie la structure secondaire du MPI. Cela nous a conduit à étudier l'effet de cette modification sur la capacité du MPI à inhiber l'ELH qui est capable de dégrader les mucines. L'étude a montré que le MPI associé aux mucines retarde et amoindrit l'action protéolytique de l'ELH sur les mucines. Le MPI pourrait donc participer au maintien des propriétés rhéologiques du mucus qui dépend en partie de l'intégrité des mucines. Ce résultat peut avoir une importance dans les pathologies où des modifications de la qualité et de la quantité des sécrétions bronchiques et spécialement des mucines sont observées, par exemple, dans la mucoviscidose où le taux de sulfatation des mucines est augmenté (155-157). D'autre part, le MPI étant l'inhibiteur majeur de l'ELH au niveau bronchique (103) et l'ELH étant capable d'induire une métaplasie des cellules sécrétrices de mucines (126), ce résultat peut avoir une incidence en pathologie pulmonaire, notamment dans la bronchite chronique obstructive où l'on observe une hypersécrétion de mucus.

Si l'on calcule, d'après les masses respectives des deux composés, les rapports molaires MPI/mucines après interaction, nous pouvons estimer que 140 molécules de MPI interagissent avec une seule molécule de mucine. Nous pouvons donc imaginer que, dans le mucus, le MPI sert de manteau protecteur aux mucines ; le lysozyme (présent en quantité 10 fois plus importante que le MPI) pourrait montrer le même comportement. Les mucines seraient alors entourées d'une gaine protectrice constituée par ces deux composés basiques présents dans la sécrétion bronchique et présentant chacun une fonction bien déterminée dans la défense de l'arbre respiratoire. Ils seraient donc en première position pour jouer leur rôle spécifique.

Nous pouvons alors nous demander à quel niveau de la molécule de MPI se fait l'interaction avec les mucines ? Il est connu que des séquences consensus riches en résidus d'acides aminés basiques telles que (-X-B-B-X-B-X) et (X-B-B-B-X-X-B-X) sont des sites de reconnaissance pour les glycosaminoglycannes (158).

Le deuxième type de séquence existe effectivement dans le MPI :

57							64
-Thr	Arg	Arg	Lys	Pro	Gly	Lys	Cys-

ces résidus se situant dans la zone charnière entre les deux domaines. Grâce aux groupements basiques qu'elle contient, cette séquence pourrait donc être un site d'interaction du MPI avec les groupements sulfate et/ou sialylés des mucines. Dans le cas d'une hypersulfatation de celles-ci ou d'une hyperproduction, la fixation d'un plus grand nombre de molécules de MPI leur assurerait une plus grande protection contre l'action des protéases.

Dans le **Chapitre III**, les études de titration du MPI avec différentes protéases, ELH, Cat G et trypsine bovine, nous ont permis de vérifier qu'il réagit effectivement selon une stoechiométrie I/E proche de 1/1. Ceci confirme les résultats déjà décrits dans la littérature (46, 57, 58) mais n'est pas en accord avec les résultats récents de Boudier et Bieth (147) quant à l'interaction avec les deux dernières protéases.

Dans le **Chapitre IV**, l'utilisation de la spectrométrie de masse par électrospray a permis de mettre en évidence pour le MPI, à côté de l'espèce moléculaire majeure de masse identique à celle du rSLPI, deux espèces moléculaires correspondant à des masses augmentées respectivement de 14 et 28 unités.

Ces résultats nous ont incitée à rechercher dans la molécule l'existence de modifications structurales. L'étude de chacun des deux domaines isolés après clivage chimique spécifique a permis de montrer que :

1. l'augmentation de masse de 14 unités est retrouvée dans le domaine C-terminal du MPI et pourrait correspondre à une forme méthylée.

2. le domaine C-terminal est inhibiteur

- . d'ELH
- . de chymotrypsine bovine
- . de trypsine bovine

3. le domaine N-terminal ne possède pas de site inhibiteur en position Arg20-Tyr21 envers la trypsine bovine.

Nos résultats sont donc en faveur de l'existence d' un seul domaine inhibiteur de ces sérine-protéases sur le MPI.

Dans la poursuite de ce travail nous envisageons les perspectives suivantes :

1. déterminer précisément la séquence des résidus d'acides aminés du MPI impliqués dans l'interaction avec les mucines. Le domaine C-terminal que nous avons isolé et qui contient la séquence consensus de site de reconnaissance des protéoglycannes sera utilisé pour la recherche d'interactions avec les mucines. Ce travail pourra être effectué en parallèle avec le lysozyme bronchique.
2. étudier l'influence de l'interaction du MPI avec les mucines sur les propriétés rhéologiques du mucus. Deux constantes pourront être mesurées : élasticité et viscosité. Ensuite, le même travail pourra être effectué en présence d'élastase. Nous pourrions alors conclure sur les conséquences de ce mécanisme en physiopathologie pulmonaire.
3. rechercher et confirmer l'existence de modifications post-traductionnelles (méthylation) et étudier leur impact sur l'activité et la fonction du MPI.
4. rechercher le rôle du domaine N-terminal du MPI. Seul, il n'a aucune fonction d'inhibiteur envers les sérine-protéases testées. D'autre part, le domaine C-terminal isolé perd considérablement de son affinité pour la trypsine bovine. Bien que cette interaction n'ait pas d'intérêt physiologique, elle pourra servir de modèle d'étude, dans le but de montrer un effet du domaine N-terminal sur la conformation et l'activité de la molécule entière.

ANNEXE TECHNIQUE

A. ELECTROPHORESES ANALYTIQUES	110
A. I. Electrophorèse en gradient d'acrylamide ou en concentration homogène, en présence de SDS (SDS-PAGE).....	110
A. I. 1. Solutions mères.....	110
A. I. 2. Composition des solutions pour les différents systèmes de gel.....	111
A. I. 3. Tampon d'électrophorèse à pH 8,5.....	111
A. I. 4. Solutions pour dilution des échantillons	112
A. I. 5. PhastSystem.....	112
A. II. Electrophorèse à pH 4,3, sans agent dénaturant	113
A. II. 1. Solutions mères	113
A. II. 2. Composition des solutions pour le gel	113
A. II. 3. Tampon d'électrophorèse à pH 4,5.....	114
A. II. 4. Solution pour dilution des échantillons	114
A. II. 5. PhastSystem	114
A. III. Isoélectrofocalisation	115
A. III. 1. Composition du gel.....	115
A. III. 2. Tampons des mèches de migration.....	115
A. III. 3. Préparation du gel et préélectrophorèse.....	116
A. III. 4. Dépôt des échantillons et électrophorèse.....	116
B. COLORATION DES PROTEINES.....	116
B. I. Coloration au bleu de Coomassie.....	116
B. II. Coloration au nitrate d'argent.....	116
B. III. Coloration au PAS des glycoprotéines	117
C. REVELATION D'ACTIVITE INHIBITRICE SUR GEL... 118	118
C. I. Révélation des gels SDS.....	118
C. II. Révélation des gels acides.....	118

D. TRANSFERT ELECTRIQUE DE PROTEINES SUR NITROCELLULOSE A PARTIR DE GELS SDS OU DE GELS ACIDES.....	119
D. I. Révélation après transfert de gels SDS.....	119
D. I. 1. Révélation immunochimique	119
D. II. Révélation après transfert de gels acides.....	120
E. DOSAGE DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES PAR SPECTROPHOTOMETRIE.....	128
E. I. Elastase granulocytaire.....	128
E. I. 1. Solution d'ELH utilisée pour les titrations.....	128
E. I. 2. Dosage d'activité d'ELH.....	128
E. II. Cathepsine G granulocytaire.....	128
E. II. 1. Solution de Cat G utilisée pour les titrations.....	128
E. II. 2. Dosage d'activité de Cat G	129
E. III. Trypsine pancréatique bovine.....	129
E. III. 1. Solution de trypsine	129
E. III. 2. Dosage d'activité de trypsine.....	129
F. REPERAGE D'ACTIVITE INHIBITRICE EN PLAQUES DE MICROTITRATION.....	129
G. DOSAGE DE LA TENEUR EN PROTEINES.....	130
H. DICHROISME CIRCULAIRE.....	130
H. I. Principe	130
H. II. Préparation des échantillons et obtention des spectres.....	131

I. SPECTROMETRIE DE MASSE.....	131
I. I. Principe	131
I. II. Definitions	132
I. II. 1. Masse monoisotopique et masse chimique	132
I. II. 2. Principe de l'électrospray	132
I. II. 3. Nature des ions	133
I. III. Préparation des échantillons et obtention des spectres.....	134

A. ELECTROPHORESES ANALYTIQUES

Trois systèmes classiques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide ont été utilisés :

* l'électrophorèse, en présence de SDS, en gradient d'acrylamide de 10 à 25% ou de 5 à 15% et en gel homogène à 15% d'acrylamide (SDS-PAGE).

* l'électrophorèse à pH 4,3, sans agent dénaturant, en gel homogène à 12% d'acrylamide (gel acide).

* l'isoélectrofocalisation en gradient de pH 4-11 à 2% en acrylamide (IEF).

Les électrophorèses, avec ou sans SDS, sont effectuées dans une plaque de gel de 1 mm d'épaisseur, en système vertical, avec un appareillage semblable à celui mis au point par Kerckaert (159). La taille des gels est de 10 x 15 cm.

A. I. ELECTROPHORESE EN GRADIENT D'ACRYLAMIDE OU EN CONCENTRATION HOMOGENE, EN PRESENCE DE SDS (SDS-PAGE)

La technique utilisée est celle de Laemmli (160) légèrement modifiée.

A. I. 1. Solutions mères

1A : tampon Tris-HCl 3M pH 8,9,

1B : tampon Tris-HCl 1M pH 6,8,

2A : solution d'acrylamide (BDH) à 48% et de
N-N'-méthylène bisacrylamide (BDH) à 1,28%,

3A : SDS (BDH) à 10%,

4A : persulfate d'ammonium (Bio-Rad) à 10%.

A. I. 2. Composition des solutions pour les différents systèmes de gel

Solutions	Gel de concentration	Gel de séparation			
		(% d'acrylamide)			
	5	5	15	10	25
H ₂ O (ml)	7,6	7,6	4,5	6,6	2,1
Glycérol (ml)	-	-	1,5*	-	1,5
1A (ml)	-	1,25	1,25	1,25	1,25
1B (ml)	1,25	-	-	-	-
2A (ml)	1	1	3	2	5
3A (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
**TEMED (μl)	5	5	5	5	5
4A (μl)	50	50	50	50	50

Le gradient est réalisé à l'aide d'un appareil à deux réservoirs : 7,5 ml de la solution à 5 ou 10%, selon le gradient utilisé, sont placés dans le compartiment sans agitation et 7,5 ml de la solution à 15 ou 25% sont placés dans le compartiment où s'effectue le mélange.

*Dans le cas de la préparation d'un gel homogène à 15% en acrylamide, les quantités inscrites ci-dessus sont multipliées par deux, le glycérol étant remplacée par de l'eau.

** TEMED : N-N-N'-N'-tétraméthyléthylène-diamine (BDH)

A. I. 3. Tampon d'électrophorèse à pH 8,5

Tris-base (Merck) 25 mM : 4,5 g
 Glycine (Merck) 192 mM : 21,6 g
 SDS 0,1% : 1,5 g
 Eau Millipore qsp 1500 ml

A. I. 4. Solutions pour dilution des échantillons

Solutions	Avec réducteur	Sans réducteur
Bleu de Bromophénol (mg)	4	4
1B (ml)	1	1
3A (ml)	4	4
Glycérol (ml)	2	2
H ₂ O (ml)	2,2	3
β-mercaptoéthanol (ml)	0,8	-

Les dépôts sont effectués après avoir mélangé 1 volume d'échantillon à étudier et 1 volume de "solution de dilution" et chauffé l'ensemble pendant 3 min à 100°C. L'électrophorèse est effectuée sous un ampérage constant de 35 mA jusqu'à ce que le bleu de Bromophénol ait atteint l'extrémité inférieure du gel.

A. I. 5. PhastSystem (Pharmacia)

Par la suite, le laboratoire ayant acquis une unité d'électrophorèse PhastSystem, nous avons abandonné l'emploi des gels décrits précédemment. Les PhastGels utilisés sont soit en concentration homogène (20% high-density), soit en gradient d'acrylamide (4-15%, 8-25%).

Les PhastGels ont une dimension de 4,3 x 5,0 cm, une épaisseur de 0,45 mm et contiennent du tampon Tris-acétate 0,112M leur conférant un pH de 6,8. Le tampon de migration est contenu dans les mèches d'agarose (2,8%) appliquées aux extrémités du gel à l'aide d'un applicateur plastique. Elles sont composées de Tris-base 0,2M, de Tricine (Serva) 0,2M et de 0,55% de SDS, ce qui leur donne un pH de 8,1. Les électrodes sont ensuite mises en contact avec les mèches. Le peigne est placé sur le porte-peigne et permet d'effectuer huit dépôts de 1 µl.

L'électrophorèse est ensuite mise en route et se déroule à 15°C. Les conditions de migration sont celles décrites dans les fiches techniques de Pharmacia n° 111 pour les gels SDS homogènes, n° 110 pour les gels SDS en gradient, n° 130 pour les gels SDS 4-15% et n° 112 pour les gels SDS high-density. Dans tous les cas, l'électrophorèse s'effectue sous ampérage constant

de 10 mA. Le programme étant établi définitivement pour chaque système de gel, une grande reproductibilité est obtenue dans la migration des échantillons.

Avant d'être appliqués automatiquement sur le gel, les échantillons sont préparés de la même manière que pour les grands gels (voir § A. I. 4.). 4 μ l de cette solution sont ensuite déposés sur un "porte-échantillon" puis 1 μ l de ces mélanges est chargé par capillarité dans les dents du peigne.

A. II. ELECTROPHORESE A PH 4,3, SANS AGENT DENATURANT

L'électrophorèse est effectuée en gel homogène à 12% en acrylamide selon la méthode de Reisfeld et coll. (142) légèrement modifiée.

A. II. 1. Solutions mères

* solution 1C : KOH 1M : 48 ml
 TEMED : 0,46 ml
 CH₃COOH : 2,9 ml (pH 6,7)
 Eau Millipore qsp 100 ml

* solution 1D : KOH 1M : 48 ml
 TEMED : 4 ml
 CH₃COOH : 16 ml (pH 4,3)
 Eau Millipore qsp 100 ml

A. II. 2. Composition des solutions pour le gel

Solutions	Gel de concentration	Gel de séparation
	(% en acrylamide)	
	5	12
H ₂ O (ml)	7,7	12,3
1C (ml)	1,25	-
1D (ml)	-	2,5
2A (ml)	1	5
4 A (μ l)	50	140
TEMED (μ l)	5	50

A. II. 3. Tampon d'électrophorèse à pH 4,5

β -alanine 0,35M (Merck) : 31,2 g

CH₃COOH : 7 ml

Eau Millipore qsp 1000 ml

Le tampon est à diluer au 1/10^e juste avant emploi.

A. II. 4. Solution pour dilution des échantillons

1D 2 ml

glycérol 2 ml

pyronine Y (1 mg/ml) 2 ml

Les dépôts sont effectués après avoir mélangé 1 volume d'échantillon à étudier à 1 volume de "solution de dilution". L'électrophorèse est effectuée sous ampérage constant de 30 mA jusqu'à ce que la pyronine Y ait atteint l'extrémité inférieure du gel.

A. II. 5. PhastSystem

A la suite de l'acquisition du PhastSystem, nous avons utilisé des gels homogènes 20% high-density qui ont permis l'obtention de résultats similaires à ceux obtenus avec les gels dits classiques. Les gels high-density ont la même réticulation que les PhastGels 20% homogènes mais contiennent en plus 30% d'éthylène glycol. Ce composant est destiné à augmenter la résolution pour les peptides de $M_r < 10\ 000$, permettant ainsi de séparer des peptides jusqu'à des M_r égales à 1 000. Les PhastGels sont identiques à ceux décrits précédemment (§ A. I. 5.), seul le tampon contenu dans les mèches est différent ; il est constitué de β -alanine 0,5M, CH₃COOH 0,7M, pH 4,1. L'échantillon à étudier est préparé de la même manière que dans le § A. II. 4..

Ce type d'électrophorèse nécessite l'utilisation d'électrodes à polarité inversée afin d'effectuer la migration de l'anode vers la cathode. La migration s'effectue sous ampérage constant de 10 mA. Les conditions de migration ont été mises au point au laboratoire selon le programme suivant :

Application de l'échantillon (position basse) à 1.1 : 1 Vh
 Application de l'échantillon (position haute) à 1.1 : 10 Vh
 Alarme de fin de migration à 1.1 : 230 Vh
 Séparation des échantillons 1.1 : 400 V; 10 mA; 2,5W; 15°C; 300 Vh

A. III. ISOELECTROFOCALISATION

Les gradients de pH existant dans le commerce ne permettant pas une séparation correcte des protéines basiques, un système d'isoélectrofocalisation pour protéines basiques a été mis au point afin de déterminer précisément le point isoélectrique (pH_i) de l'inhibiteur bronchique ainsi que d'autres protéines purifiées à partir du mucus telles le lysozyme et la lactotransferrine bronchiques.

L'électrophorèse est effectuée dans une plaque de gel de 1 mm d'épaisseur, en système horizontal, avec l'appareil Multiphor II (LKB). La taille du gel est de 10 x 15 cm.

A. III. 1. Composition du gel

H ₂ O :	19,4 ml
2A :	4,35 ml
glycérol :	1 ml
Ampholytes 9-11 (Serva):	832 µl
Ampholytes 7-9 (Serva):	102 µl
Ampholytes 4-9 T (Serva):	102 µl
TEMED :	49,4 µl
4 A :	146 µl

A. III. 2. Tampons des mèches de migration

Anode : solution à pH 7,0 (Serva)

Cathode : NaOH 0,1M, pH 12,3

A. III. 3. Préparation du gel et préélectrophorèse

Après démoulage, le gel est placé sur le système de refroidissement du Multiphor II (mis en route 30 min avant les dépôts). Des mèches (Serva) sont découpées à la taille du gel et imbibées des solutions citées dans A. III. 2. puis déposées délicatement aux extrémités du gel. Les électrodes sont posées sur les mèches et le système est mis sous tension. Les conditions de migration sont fixées à : 1600 V (valeur maximale), 20 mA et 4 W (valeur maximale). Une prémigration est ensuite effectuée pendant 30 min.

A. III. 4. Dépôt des échantillons et électrophorèse

L'applicateur en plastique (Serva) est déposé sur le gel au moins à 2 cm des mèches, en fonction du pI_i des protéines étudiées. Les échantillons sont ensuite déposés et l'appareil est mis sous tension. L'électrophorèse est poursuivie jusqu'à ce que l'ampérage devienne stable pendant au moins 5 min, preuve que les protéines sont focalisées.

B. COLORATION DES PROTEINES

B. I. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE

Après l'électrophorèse, les grands gels et les PhastGels sont colorés pendant deux heures dans une solution contenant 2,2 g de bleu de Coomassie R-250 (Serva) dissous dans un mélange MeOH/H₂O/CH₃COOH (200/200/40, v/v/v). Le développement de la coloration des protéines est suivi en effectuant plusieurs bains dans le mélange MeOH/H₂O/CH₃COOH (200/225/25, v/v/v).

B. II. COLORATION AU NITRATE D'ARGENT

Après électrophorèse, les PhastGels SDS ou natifs sont transférés dans l'unité de coloration du PhastSystem et révélés selon les méthodes décrites dans la fiche technique n° 210.

B. III. COLORATION AU PAS DES GLYCOPROTEINES

Après électrophorèse, les grands gels sont colorés par le réactif de Schiff après oxydation periodique des fonctions alcool des sucres. La méthode utilisée est celle de Zacharius et coll. (161). Cette méthode a été adaptée à la coloration des PhastGels ; le programme mis au point est décrit ci-dessous :

N° d'étape	Solutions	Temps (min)	Température (°C)
1	ATCA 20%	5	20
2	Eau Millipore	5	20
3	Acide periodique 0,7% + acide acétique 5%	10	20
4	Eau Millipore	2	20
5	Eau Millipore	3	20
6	Réactif de Schiff	10	20
7	Métabisulfite de potassium 5% + acide acétique 5%	5	50
8	Méthanol 5% + acide acétique 7,5%	10	50
9	Méthanol 5% + acide acétique 7,5%	5	50
10	Méthanol 50% + acide acétique 30%	10	50
11	Méthanol 50% + acide acétique 30%	5	50
12	Méthanol 50% + acide acétique 30%	2	50
13	Glycérol 5% + acide acétique 10%	10	50

Cette méthode mise au point pour la première fois sur l'appareil PhastSystem a fait l'objet d'un article dans *Electrophoresis* intitulé : "A rapid periodic acid-Schiff staining procedure for the detection of glycoproteins using the PhastSystem".

C. REVELATION D'ACTIVITE INHIBITRICE SUR GEL

La méthode utilisée est celle de Uriel et Berges (162) que nous avons légèrement modifiée.

C. I. REVELATION DES GELS SDS

Après l'électrophorèse, le SDS présent dans le gel est éliminé par deux bains de 30 min dans une solution de Triton X-100 à 2,5% (163). Le gel est rincé rapidement dans du tampon phosphate de sodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,01M, pH 7,4) puis est mis en incubation pendant 1 h à 37°C dans 100 ml d'une solution d'enzyme (2,5 mg) dans le même tampon. L'activité estérasique est ensuite révélée en plaçant le gel dans un mélange préparé extemporanément, constitué de 50 mg d'orthodanisidine tétraazotée (Sigma) dissoute dans 96 ml du tampon phosphate et de 10 mg de substrat dissous dans 4 ml de diméthylsulfoxyde (Merck). La réaction est arrêtée en plaçant le gel dans une solution d'acide acétique à 10%.

C. II. REVELATION DES GELS ACIDES

Après électrophorèse sur gel acide le même protocole est suivi, hormis la première étape d'élimination du SDS qui est remplacée par 15 min d'équilibration du gel dans le tampon phosphate.

Les bandes protéiques possédant une activité inhibitrice vis-à-vis des enzymes apparaissent sous la forme de taches incolores sur un fond coloré.

* Substrats utilisés :

Substrat d'ELH : Acétyl-alanine- α -naphtylester (Bachem) qui donne une coloration noire.

Substrat de chymotrypsine bovine : N-acétyl-DL-phénylalanine- β -naphtylester (Sigma) qui donne une coloration rose.

D. TRANSFERT ELECTRIQUE DE PROTEINES SUR NITROCELLULOSE A PARTIR DE GELS SDS OU DE GELS ACIDES

L'appareillage utilisé est l'unité de transfert Nova Blot Multiphor II (LKB). Les protéines sont transférées sur des feuilles de nitrocellulose de porosité 0,2 μm (Schleicher et Schuell). Le transfert est semi-sec et s'effectue avec un système de tampons discontinu selon la méthode de Kyhse-Andersen (164).

Nous avons effectué des révélations :

- * immunochimiques (gel SDS et gel acide)
- * d'activité enzymatique (gel acide)
- * d'activité inhibitrice (gel acide)

D. I. REVELATION APRES TRANSFERT DE GELS SDS

D. I. 1. Révélation immunochimique

La technique utilisée est celle de Towbin et coll. (165) légèrement modifiée : la saturation de la nitrocellulose est effectuée par un bain de deux heures dans une solution de lait écrémé à 4% (au lieu de sérumalbumine bovine) dans du tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4 (TBS). Après réaction avec l'immunsérum spécifique, on ajoute un deuxième immunsérum marqué à la peroxydase dont l'activité est révélée par le chloro-4-naphtol-1 (Sigma) en présence de H_2O_2 selon la méthode de Hawkes et coll. (166). Le protocole de révélation est décrit ci-après :

Etape	Milieux d'incubation	Temps
Saturation	TBS-lait à 4%	2 h
Rinçage	TBS-Tween 20 à 0,2% (TBS-TW)	2 x 15 min
1 ^{er} immunsérum	TBS-TW-lait à 1% + 1 ^{er} immunsérum spécifique	1 h
Rinçage	TBS-TW	2 x 15 min
2 ^e immunsérum	TBS-TW-lait à 1% + 2 ^e immunsérum marqué à la peroxydase	1 h
Rinçage	TBS	2 x 15 min
Révélation	chloro-4-naphtol-1 : 50 mg dans Méthanol : 17 ml TBS : 83 ml H ₂ O ₂ : 2 ml	10-20 min
Arrêt	eau désionisée	30 min

D. II. REVELATIONS APRES TRANSFERT DE GELS ACIDES

Dans le but de rendre la technique plus sensible et de permettre des révélations d'activités enzymatique ou inhibitrice et des immunoempreintes sur nitrocellulose, un système de transfert à partir de gel acide a été mis au point ; il a fait l'objet d'une publication intitulée : "Electrotransfer of basic proteins from nondenaturing polyacrylamide acid gels to nitrocellulose : detection of enzymatic and inhibitory activities and retention of protein antigenicity".

Il y est décrit :

1. la mise en évidence d'activités enzymatiques avec des substrats synthétiques.
2. les révélations d'activité inhibitrice
3. les révélations immunochimiques du MPI et du lysozyme bronchique.

Cette technique de transfert suivie de différentes révélations a ensuite été appliquée aux PhastGels 20% high-density pour l'étude des domaines. Après l'électrophorèse effectuée comme décrit dans le § A. II. 4., les protéines sont transférées sur nitrocellulose dans le système de tampons discontinu décrit dans l'article suivant. Le transfert électrique est effectué dans l'unité de séparation du PhastSystem à l'aide du kit de transfert (Pharmacia). Les conditions de transfert électrique sont celles décrites dans la fiche technique n° 221. La composition des tampons de transfert et les protocoles de révélations (activité inhibitrice, immunoempreinte) sont identiques à ceux décrits dans l'article suivant :

"Electrotransfer of basic proteins from nondenaturing polyacrylamide acid gels to nitrocellulose : detection of enzymatic and inhibitory activities and retention of protein antigenicity"

Principe : les protéines étant chargées positivement dans le gel acide, nous avons ajouté du SDS dans le tampon de transfert du côté cathode afin de charger les protéines négativement et de faciliter ainsi le transfert sur la feuille de nitrocellulose placée du côté anodique. Ensuite, les conditions de transfert sont les mêmes que pour un gel SDS.

Electrotransfer of Basic Proteins from Nondenaturing Polyacrylamide Acid Gels to Nitrocellulose: Detection of Enzymatic and Inhibitory Activities and Retention of Protein Antigenicity

Isabelle Van-Seuningen and Monique Davril

Unité INSERM No. 16, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

Received September 22, 1989

We have developed a method for electrotransfer of strongly basic proteins (lysozyme, pI 11; mucus proteinase inhibitor, $pI > 10$; bovine pancreas trypsin inhibitor, pI 10.5; human leukocyte elastase, $pI > 9$) from nondenaturing acid gels (pH 4.5) to nitrocellulose sheets. Buffers were those used in a discontinuous system for transfer from sodium dodecyl sulfate (SDS)-containing polyacrylamide gels with one modification in the cathode buffer which contained 0.1% SDS. This method was compared to electrotransfer performed in 0.7% acetic acid. The basic proteins studied, which were positively charged in the gel, formed with SDS negative complexes which migrated toward the anode and were efficiently transferred to the nitrocellulose. Moreover, their biological properties were preserved: inhibitory activity, enzyme activity, and antigenicity. This method is advantageous because it is simple, is sensitive, and can be applied to various biological fluids to detect inhibitors, enzymes, and other proteins which have a basic character, after electrophoretic separation under their native forms. © 1990 Academic Press, Inc.

Since the initial description of electrophoretic transfer (electroblotting) of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets by Towbin *et al.* (1), this method has been widely developed and many applications have been proposed (see the extensive reviews by Gershoni and Palade (2) and Beisiegel (3)). Although electroblotting of proteins from SDS¹-containing gels

has been the most currently used, transfer of basic proteins from nondenaturing polyacrylamide systems has received only limited interest. In this field, efficient transfer of ribosomal (1) and polyoma viral (4) proteins from acetic acid-urea gels was described. However, electroblotting from acid gels without urea such as the gel system described by Reisfeld *et al.* (5) for basic proteins has not been performed.

As we were interested in the localization of native proteinase inhibitors which were basic in charge, the latter gel system was chosen for this purpose; unfortunately, large amounts were needed for the inhibitors to be visualized on the gel itself, using the method of Uriel and Berges (6).

Mucus proteinase inhibitor (named MPI, as recommended by Fritz (7)) is a strongly basic protein ($pI > 10$, personal results) which is present in low amounts in sputum. Until now, its visualization has been carried out by immunostaining after SDS-PAGE (8) and by protein staining with Coomassie blue in neutral (9,10) or acid (11) polyacrylamide gels. In all cases, it was necessary to load on the gel at least 5 μ g or more MPI. Human leukocyte elastase (HLE) and cathepsin G which also are basic proteins are the target enzymes of this inhibitor in sputum where lysozyme is also found.

We therefore attempted to set up an efficient electroblotting procedure for basic proteins which would allow the visualization of enzyme and inhibitor activities in sputum crude extracts and in pure protein preparations. The method described in this paper also allows immunological detection on the nitrocellulose. Moreover, this procedure has the advantage of avoiding

¹ Abbreviations used: PBS, phosphate-buffered saline; TBS, Tris-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; NC, nitrocellulose; BPTI, bovine pancreas trypsin inhibitor; MPI, mucus proteinase inhibitor; HLE, human leukocyte elastase; IgG, immunoglobulin G; Ac-Ala-ONaph, *N*-acetyl-L-alanine-

nine- α -naphthyl ester; Ac-Phe-ONaph, *N*-acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester; CBZ-Ala-ONaph, *N*-benzyloxycarbonyl-L-alanine- β -naphthyl ester; DMF, dimethylformamide.

diffusion of the protein bands in the acid gels during staining, thus leading to improved resolution and sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Human MPI and lysozyme were isolated in the laboratory from nonpurulent sputum as previously described (12). HLE and cathepsin G were prepared from purulent sputum (13). Bovine pancreas trypsin inhibitor (BPTI) was obtained from Choay (France). Egg-white lysozyme, bovine albumin, bovine pancreas chymotrypsin (type VII), Ac-Phe-ONaph, and *o*-dianisidine tetrazotized (Fast Blue B salt) were purchased from Sigma. Ac-Ala-ONaph and CBZ-Ala-ONaph were purchased from Bachem. The following reagents were provided: rabbit IgG against MPI, a gift from Dr. J. M. Tournier (Unité 14 INSERM, Nancy, France); IgG against human lysozyme from Dakopatts; peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG from Nordic. All other chemicals were of analytical grade.

Electrophoresis and Transfer

PAGE was performed in the buffer solutions described by Reisfeld *et al.* (5), using a 12% polyacrylamide slab gel.

Electric transfer on nitrocellulose (NC) sheet (0.2 μ m porosity, Schleicher & Schuell) was carried out with a Multiphor II Nova Blot unit (LKB), using different electrode buffers. First, the method described by Towbin *et al.* (1) for acid-urea gels, i.e., transfer with 0.7% (v/v) acetic acid, was assayed; in this procedure, transfer was performed from the anode to the cathode. In a second set of experiments, the discontinuous buffer system proposed in the LKB laboratory manual for the transfer of proteins from SDS-containing gels was modified as follows: the cathode buffer contained 40 mM 6-amino-*n*-hexanoic acid and 20% (v/v) methanol in deionized water, pH 7.6, without SDS added and with 0.1 and 0.5% SDS, respectively; the anode buffer composed of 0.3 M Tris, 20% (v/v) methanol in water, pH 10.4, was unchanged. Following electrophoresis, the gel and the NC sheet were briefly immersed into the anode buffer and transfer was performed toward the anode. The running conditions were as indicated by the manufacturer (0.8 mA/cm² NC for 80 min).

Visualization Procedures

Visualization of proteins remaining on the gel after electroblotting was performed with Coomassie blue R-250; the bands on the blot were stained with amido black. Before all detections of activity, the blots were washed with 0.1 M PBS, pH 7.4, for 10 min.

a. Inhibitory Activity Visualizations

Incubations with enzymes were carried out at 37°C for 30 min. Background stainings were further developed at room temperature.

i. *Bovine pancreas trypsin inhibitor.* Incubation was performed in a solution containing 2.5 mg bovine chymotrypsin in 100 ml PBS, pH 7.4. The background staining was developed, according to the method of Uriel and Berges (6), by the addition of a mixture composed of 10 mg Ac-Phe-ONaph dissolved in 4 ml DMF and of 50 mg *o*-dianisidine tetrazotized in 96 ml PBS, pH 7.4.

ii. *Mucus proteinase inhibitor.* A solution containing 1 mg HLE or cathepsin G in 49 ml PBS, pH 7.4, and 1 ml 2.5% (v/v) Triton X-100 was used for incubation. The background stainings were developed as above, using the following substrates: Ac-Ala-ONaph (14) or CBZ-Ala-ONaph (15) and Ac-Phe-ONaph for visualization of inhibitory activity against HLE and cathepsin G, respectively.

b. Human Leukocyte Elastase Activity Detection

Visualization of the enzyme bands was performed at room temperature by soaking the blot in a mixture containing 5 mg of substrate dissolved in 2 ml DMF and 25 mg *o*-dianisidine tetrazotized in 48 ml PBS, pH 7.4. Two substrates were used: Ac-Ala-ONaph and CBZ-Ala-ONaph.

All staining procedures were stopped with 5% (v/v) acetic acid.

c. Immunochemical Detection

Immunostaining was carried out first according to Towbin *et al.* (1) and second according to Perini *et al.* (16) with saturation of the NC sheet as previously described (12). Dilutions of specific Ig were 1:1000 for anti-MPI and 1:500 for anti-lysozyme. Peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (diluted 1:1000) was revealed with 4-chloro-1-naphthol according to Hawkes *et al.* (17).

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of the Two Electrotransfer Procedures

First, we performed electrotransfer in 0.7% acetic acid according to the procedure described by Towbin *et al.* (1). Staining of the gel with Coomassie blue following transfer showed that major amounts of the proteins applied remained on the gel (Fig. 1A, slots 1-4); only BPTI which was in a large amount on the gel (10 μ g) was partly transferred to the NC sheet and could be detected with amido black as a small band (slot 8). Visualization of the BPTI activity against bovine chymotrypsin was not conclusive (slots 9-12): a positive reaction should have given white bands on a pink background. Immunoblotting was assayed after applying a low amount (1 μ g) of

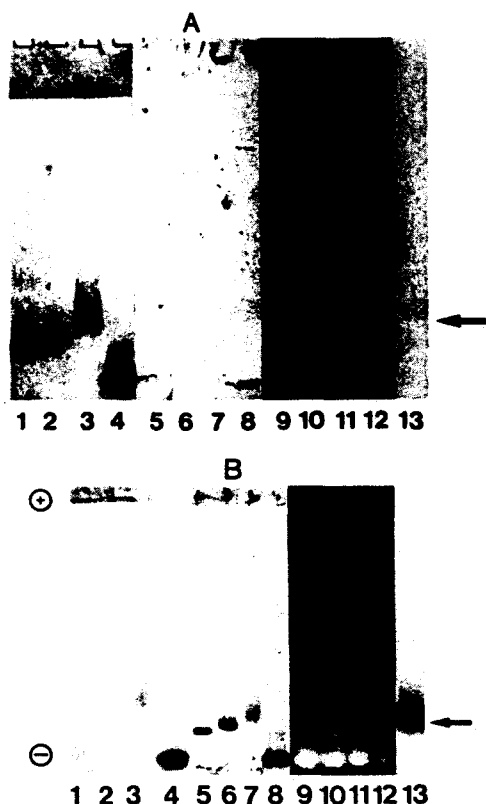


FIG. 1. Comparison of gels and NC sheets stained after two different electroblotting procedures. The basic proteins under study were separated on nondenaturing polyacrylamide acid gels (5). Electrotransfer in 0.7% (v/v) acetic acid, pH 2.8 (A), and electrotransfer with 0.1% (w/v) SDS, 40 mM 6-amino-*n*-hexanoic acid, 20% (v/v) methanol, pH 7.6, in the cathode buffer and 0.3 M Tris, 20% (v/v) methanol, pH 10.4, in the anode buffer (B). Slots 1-4, gel stained with Coomassie blue after transfer; 5-8, NC sheet stained with amido black; 9-12, inhibitory activity of BPTI against bovine chymotrypsin on the NC sheet; 13, immunostaining with anti-human MPI IgG. Slots 1 and 5, bronchial lysozyme (3 μ g); 2 and 6, egg-white lysozyme (3 μ g); 3 and 7, MPI (3 μ g); 4 and 8, BPTI (10 μ g); 9-12, BPTI (5, 4, 2, and 1 μ g); 13, MPI (1 μ g in A and 0.1 μ g in B).

MPI on the gel (slot 13): only a faint positive reaction could be detected (indicated by an arrow).

Second, we attempted to increase the efficiency of the transfer method. We chose a discontinuous buffer system, recommended for electrotransfer of proteins from SDS-containing polyacrylamide gels (see Materials and Methods). A control experiment was done without SDS in the cathode buffer; then, the effect of SDS on the transfer efficiency was studied at two concentrations (0.5 and 0.1%, respectively) in the above buffer. The control experiment showed that, in the absence of SDS, most of the protein samples remained on the gel after transfer (Fig. 2A, slots 1-3). When the same amounts were transferred in the presence of 0.5% SDS (Fig. 2A, slots 4-6), only traces remained on the gel. Thus, the addition of SDS improved the electrotransfer efficiency.

In Fig. 2B, a lower SDS concentration (0.1%) was assayed; the Coomassie blue-stained pattern of the part of the gel not subjected to transfer is shown for comparison (slots 1-3). The same applied amounts of proteins as in Fig. 2A were completely transferred under these conditions (slots 7-9), as no lysozyme (slots 4 and 5) and no BPTI (slot 6) remained on the gel. This result compares well with that obtained in Fig. 2A (slots 4-6) with a higher SDS concentration. Therefore, we chose to work with 0.1% SDS for the further experiments.

This transfer method was then compared with the procedure of Towbin *et al.* (1) (Fig. 1). As shown in Fig. 1B, all the proteins were transferred to the NC sheet (slots 5-8). The contrary was observed for the same samples when transferred in 0.7% acetic acid (Fig. 1A). Efficiency of the method is satisfactory: 3 μ g each of the proteins and probably less are sufficient for their detection with amido black (slots 5-8). Almost all of the lysozyme amounts (slots 1 and 2) were transferred while parts of MPI (slot 3) and BPTI (slot 4) remained on the gel stained with Coomassie blue. When visualization of inhibitory activity against bovine chymotrypsin was performed, decreasing intensities of the bands were observed according to the amounts of BPTI applied (5, 4, 2, and 1 μ g in slots 9-12). Thus, this method is sensitive as one can easily detect 1 μ g of active inhibitor. Immunostaining with anti-human MPI IgG showed a strong reactivity (Fig. 1B) for an amount of MPI (0.1 μ g, slot 13) much lower than that in the first procedure (1 μ g, Fig. 1A). The intense reaction obtained with only 0.1 μ g of MPI can be explained by the very high sensitivity of the method.

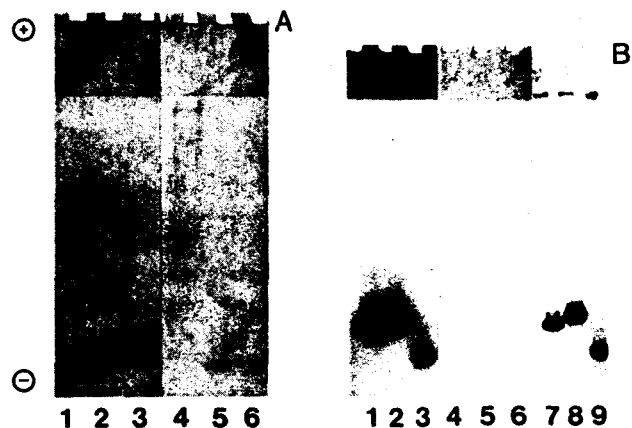


FIG. 2. Influence of SDS on the electrotransfer efficiency. Gels were stained with Coomassie blue. (A) Gel after transfer without SDS (left) and with 0.5% SDS (right) in the cathode buffer. Slots 1 and 6, bronchial lysozyme (5 μ g); 2 and 5, bronchial lysozyme (10 μ g); 3 and 4, egg-white lysozyme (5 μ g). (B) Transfer in the presence of 0.1% SDS. Slots 1-3, control gel not transferred; 4-6, gel after transfer; 7-9, corresponding NC sheet stained with amido black. Slots 1, 4, and 7, bronchial lysozyme; 2, 5, and 8, egg-white lysozyme; 3, 6, and 9, BPTI (5 μ g each).

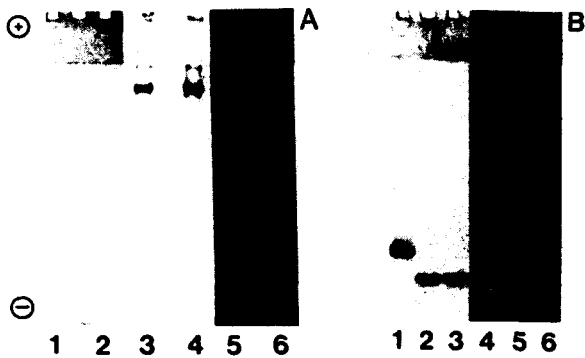


FIG. 3. Control experiments for inhibitory activity detection. (A) Slots 1 and 2, gel after transfer, stained as above; 3 and 4, NC stained with amido black; 5 and 6, inhibitory activity against bovine chymotrypsin on the NC; 1, 3, and 5, bovine albumin (5 μ g); 2, 4, and 6, bovine albumin (10 μ g). (B) Slots 1-3, gel not transferred; 4-6, inhibitory activity against bovine chymotrypsin on the NC; 1 and 4, bronchial lysozyme (10 μ g); 2 and 5, BPTI (5 μ g); 3 and 6, BPTI (4 μ g).

Our results show that, when applying the transfer conditions recommended by Towbin *et al.* (1), i.e., in a strongly acidic solution (pH 2.8), the proteins of interest were not efficiently transferred. Under the conditions described in this paper, all these basic proteins were transferred in the presence of 0.1% SDS, although some of them not completely. By adding SDS which is an anionic detergent, proteins which were positively charged in the gel at pH 4.5 acquired net negative charges when complexed with SDS and migrated toward the anode. Thus, the complexes formed could bind to the NC sheet; moreover, their binding was likely to be increased by the presence of 20% methanol in the buffers (2). Addition of a low SDS concentration to the transfer cathode buffer did not affect the biological properties of the proteins studied in this paper.

Inhibitory Activity Visualization

We first checked the absence of artifacts in the inhibitory activity detection method with two inert proteins, i.e., bovine albumin and bronchial lysozyme. In Fig. 3A, bovine albumin totally transferred to NC is intensively stained with amido black (slots 3 and 4) and does not show any reaction when tested for inhibitory activity against bovine chymotrypsin (slots 5 and 6). In another control (Fig. 3B), bronchial lysozyme (slots 1 and 4) was loaded next to BPTI (slots 2, 3, 5, and 6); the lysozyme band seen by protein staining (slot 1) does not give rise to any artifact in the inhibitory activity visualization (slot 4) when compared to the white bands observed for BPTI (slots 5 and 6). These results clearly bring evidence that the white bands obtained over a pink background really correspond to an inhibitory activity and not to a saturation of the binding sites of the NC by the proteins analyzed, since the enzyme added for the reve-

lation step is able to bind onto unoccupied sites of the membrane. We also checked that no pink or black background color (according to the substrate used) was obtained when the substrate mixture was added to the NC without previous enzyme overlay (data not shown).

Our aim was to visualize the activity of MPI against its target enzymes in sputum (HLE and cathepsin G). As shown in Fig. 4, slot 1, the MPI activity toward HLE was clearly visualized on the NC as a white area over a black background when the substrate Ac-Ala-ONaph was used; with the substrate CBZ-Ala-ONaph (slot 2), the same white area was seen over a pink background. The same amount of MPI (2 μ g) was loaded for the detection of inhibitory activity against cathepsin G (slot 3): a narrower white zone was obtained on a violet-colored background.

A crude preparation containing the basic proteins bronchial lysozyme and MPI with other sputum components, i.e., albumin and mucins (the latter do not migrate in this gel system), was analyzed for inhibitory activity against HLE. As shown in Fig. 4B, MPI activity was well characterized as a narrow white band (slot 5) corresponding to the protein band colored with amido black in the presence of a large amount of lysozyme which has a more cathodic behavior (slot 4).

Until now, inhibitory activity visualization by the method of Uriel and Berges (6) was currently performed on the gel itself, the pH of which was 8.2. Dealing with acid gels (pH 4.5) needed a long time of equilibration with PBS, pH 7.4 (2 \times 30 min), before incubating the gel with the enzyme, so that inhibitory bands tended to diffuse largely. A second drawback was the amount of inhibitor necessary to be detected on the gel (>15 μ g).



FIG. 4. Detection of inhibitory activity of MPI on NC sheet by different procedures. (A) Pure MPI (2 μ g) against HLE with the substrate Ac-Ala-ONaph (slot 1) and with CBZ-Ala-ONaph (slot 2); against cathepsin G with Ac-Phe-ONaph (slot 3). (B) Crude preparation (sputum homogenate diluted 1:3 in water) stained with amido black (slot 4) and assayed for inhibition of HLE with Ac-Ala-ONaph (slot 5).



FIG. 5. Localization on NC of the activity of HLE (10 μ g) with Ac-Ala-ONaph (slot 1) and CBZ-Ala-ONaph (slot 2).

Moreover, the background was faintly colored (data not shown).

Under the transfer conditions described above, MPI was shown to retain its activity against HLE and cathepsin G. This method has several advantages: (i) detection of smaller amounts of active MPI; (ii) no pH equilibration step and consequently no band diffusion; (iii) better contrast obtained, due to an intense staining of the NC background.

Enzyme Activity Visualization

After the inhibitory activity was visualized, it was interesting for us to be able to detect HLE activity which may be present in a purulent sputum. Two synthetic substrates were used to detect HLE after transfer (Fig. 5). Results showed the same pattern with both substrates when 10 μ g HLE were applied on the gel. The five isoenzymes, which appear as well-defined bands on the NC sheet, are more intensively stained with Ac-Ala-ONaph (slot 1): this is explained by the dark color of the bands, which increases the contrast when compared to the pink color obtained with CBZ-Ala-ONaph (slot 2) on a white background.

The activity detection on the NC sheet shows that the immobilized HLE keeps its ability to hydrolyze synthetic substrates. The colored bands do not fade with time, which allows easy storage of the transferred pattern in the dark.

Enzymoblotting on NC has previously been successfully used. Localization of proteinases was performed using *para*-nitroanilide substrates after capillary diffusion from alkaline agarose gels (18). Recently, visualization of acid phosphatase activity was carried out following

electroblotting in a Tris-glycine buffer system from acid polyacrylamide gels (19). The procedure described in this paper, which is simple and rapid, is a new approach for localization of basic enzymes.

Immunological Detection

Bronchial lysozyme transferred to NC was assayed for antigenicity by performing immunostaining. In Fig. 6, the most cathodic band is the lysozyme monomer and the other cathodic one is thought to be a lysozyme dimer: its slower migration can be explained by a sieving effect during electrophoresis in the 12% acrylamide gel. When the method described by Towbin *et al.* (1) was used (Fig. 6a), artifacts were seen as smears. This drawback was avoided by treatment of the NC sheet with a solution containing 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoethanol in 20 ml TBS, pH 7.4, for 16 h before performing the different immunostaining steps, according to Perini *et al.* (16); using this procedure, best defined dark bands of lysozyme were obtained on a white background (Fig. 6b) with, however, a decrease in bands' intensity. Thus, bronchial lysozyme retained its ability to bind antibodies directed against the native protein when assayed by the immunoblotting technique. These results also show that transfer in the presence of 0.1% SDS did not affect the antigenicity of the protein studied.

In conclusion, the electroblotting method and the visualization procedures described in this paper for basic proteins can be used to detect, in sputum or other biolog-

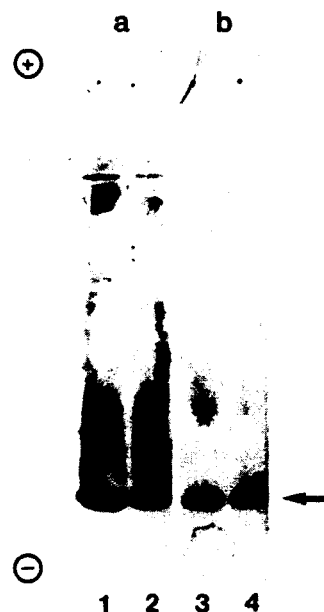


FIG. 6. Immunostaining of bronchial lysozyme on NC by two different procedures with anti-human lysozyme IgG. (a) Without and (b) with SDS plus β -mercaptoethanol treatment. Slots 1 and 3, 7 μ g; slots 2 and 4, 4 μ g. Lysozyme monomer is indicated by an arrow.

ical fluids, inhibitory activity toward commercial enzymes and enzyme activity on chromogenic substrates; antigenicity can also be characterized with specific antibodies. Moreover, this simple and efficient transfer method may be applied to the study of other proteins provided that these proteins separated under their native form in nondenaturing electrophoresis conditions maintain their biological activity when transferred in the presence of 0.1% SDS.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Mr. Claude Vandeperre for the photographs and Mrs. Marie-France Narula for typing the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (GDR No. 139).

REFERENCES

1. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
2. Gershoni, J. M., and Palade, G. E. (1983) *Anal. Biochem.* **131**, 1-15.
3. Beisiegel, U. (1986) *Electrophoresis* **7**, 1-18.
4. Johnson, T. K., Leonard Yuen, K. C., Denell, R. E., and Consigli, R. A. (1983) *Anal. Biochem.* **133**, 126-131.
5. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., and Williams, D. E. (1962) *Nature (London)* **195**, 281-283.
6. Uriel, J., and Berges, J. (1986) *Nature (London)* **218**, 578-580.
7. Fritz, H. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**(Suppl.), 79-82.
8. Kramps, J. A., Van Twisk, C., Klasen, E. C., and Dijkman, J. H. (1988) *Clin. Sci.* **75**, 53-62.
9. Boudier, C., Carvallo, D., Roitsch, C., Bieth, J. G., and Courtney, M. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 439-445.
10. Smith, C. E., and Johnson, D. A. (1985) *Biochem. J.* **225**, 463-472.
11. Ohlsson K., Tegner, H., and Akesson, U. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 583-589.
12. Van-Seuningen, I., Davril, M., and Hayem, A. (1989) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 749-755.
13. Martodam, R. R., Baugh, R. J., Twumasi, D. Y., and Liener, I. E. (1979) *Prep. Biochem.* **9**, 15-31.
14. Sweetman, F., and Ornstein, L. (1974) *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 327-339.
15. Starkey, P. M., and Barrett, A. J. (1976) *Biochem. J.* **155**, 255-263.
16. Perini, J. M., Dehon, B., Marianne, T., Klein, A., and Roussel, P. (1986) *Clin. Chem.* **32**, 811-815.
17. Hawkes, R., Niday, E., and Gordon, J. (1982) *Anal. Biochem.* **119**, 142-147.
18. Ohlsson, B. G., Weström, B. R., and Karlsson, B. W. (1986) *Anal. Biochem.* **152**, 239-244.
19. Kanellis, A. K., Solomos, T., and Mattoo, A. K. (1989) *Anal. Biochem.* **179**, 194-197.

E. DOSAGE DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Le principe du dosage est la libération au cours du temps (2 min) de la paranitroaniline (coloration jaune) à partir d'un substrat chromogénique synthétique hydrolysé par l'enzyme. Le dosage est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon (Kontron) dont le compartiment est thermostaté à 25°C.

E. I. ELASTASE GRANULOCYTAIRE

E. I. 1. Solution d'ELH utilisée pour les titrations

L'enzyme est dissous dans un tampon acétate de sodium 0,05M, NaCl 0,1M, pH 5,5, puis la solution est filtrée (0,2 µm Millipore). Sa concentration en protéine est déterminée d'après une valeur d'absorption à 280 nm égale à 0,985 pour une solution à 1 mg/ml (167) et une M_r de 29 000.

E. I. 2. Dosage d'activité d'ELH

980 µl de tampon Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,5M, pH 8,0 contenant 0,02% d'azide de sodium et 10 µl de solution d'élastase ($2,464 \times 10^{-5}$ M) sont mis à incuber pendant 10 min à 25°C puis 10 µl d'une solution du substrat Suc-(Ala)₃-pNA (Sigma) 100 mM sont ajoutés et la lecture de l'activité est lue à 410 nm pendant 2 min.

E. II. CATHEPSINE G GRANULOCYTAIRE

E. II. 1. Solution de Cat G utilisée pour les titrations

L'enzyme est dissous comme précédemment. Sa concentration est déterminée d'après une valeur d'absorption à 280 nm égale à 0,84 pour une solution à 1 mg/ml et une M_r de 28 500 (167).

E. II. 2. Dosage d'activité de Cat G

Les conditions de dosages sont les mêmes que précédemment, le substrat utilisé étant Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA (Bachem) 100 mM.

E. III. TRYPSINE PANCREATIQUE BOVINE

E. III. 1. Solution de trypsine

La trypsine a été titrée par la méthode de Chase et Shaw (149) avec le p-nitrophényl-p'-guanidinobenzoate (Sigma). Le résultat de la titration a montré que l'enzyme était actif à 64,7%.

E. III. 2. Dosage d'activité de trypsine

980 µl de tampon Tris-HCl 0,05M, CaCl₂ 0,02M, pH 8,0 contenant 0,02% d'azide de sodium et 10 µl de trypsine ($5,72 \times 10^{-5}$ M) sont mis à incuber pendant 10 min à 25°C puis 10 µl de solution de *L-BAPNA (Merck) 50 mM sont ajoutés et l'activité enzymatique est lue à 410 nm pendant 2 min.

*L-BAPNA : N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide

F. REPERAGE D'ACTIVITE INHIBITRICE EN PLAQUES DE MICROTITRATION

200 µl de tampon Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, sont déposés dans chaque puits avant 5 µl de solution de l'échantillon à étudier. Une solution stock de trypsine bovine à 6 mg/ml dans HCl 1 mM est diluée au 1/400^e juste avant l'emploi dans du tampon Tris-HCl 0,5M, pH 7,8, contenant CaCl₂ 0,02M et 0,1% de gélatine selon (73) ; 20 µl sont ensuite ajoutés dans chaque puits. L'ensemble est incubé pendant 15 min à température ambiante, puis 20 µl d'une solution de substrat L-BAPNA 10 mM sont additionnés. Le développement de la coloration est suivi en lisant la densité optique à 405 nm sur un lecteur Uniskan II (Titertek). Les valeurs sont comparées à des témoins "enzyme" de manière à calculer l'activité inhibitrice des échantillons.

G. DOSAGE DE LA TENEUR EN PROTEINES

Il est effectué par la réaction à l'acide bicinchoninique, selon la méthode de Smith et coll. (168).

Le mélange réactif est préparé en ajoutant à 50 volumes du réactif A, 1 volume de réactif B juste avant l'emploi (Pierce).

Réactif A : solution de carbonate de sodium, de bicarbonate de sodium, de bicinchoninate disodique et de tartrate dans NaOH 0,1N.

Réactif B : solution à 4% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Le mélange à doser est constitué de 50 μl de l'échantillon à doser et de 1 ml de réactif précédemment cité. La coloration se développe pendant deux heures à température ambiante, ensuite la lecture est effectuée à 562 nm. Par la suite nous avons miniaturisé le dosage, le mélange étant réalisé dans les puits d'une plaque de microtitration ; le volume final est réduit à 210 μl . Le développement de la coloration s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment tandis que la lecture de la densité optique est effectuée à 540 nm sur un lecteur Uniskan II (Titertek). Les valeurs sont rapportées à une gamme de sérumalbumine bovine. Cette méthode donne des réponses linéaires pour des concentrations protéiques variant de 0 à 500 $\mu\text{g/ml}$.

H. DICHROISME CIRCULAIRE

H. I. PRINCIPE

Le dichroïsme circulaire est une technique qui permet de déterminer la structure secondaire d'une molécule. Le phénomène du dichroïsme circulaire résulte de l'absorption différente de la lumière polarisée circulaire droite et gauche par un chromophore présentant une structure asymétrique ou par un chromophore immobilisé dans un environnement asymétrique. Les propriétés spectrales d'une molécule protéique dépendent toujours de son environnement moléculaire et de la mobilité de ses chromophores (169). Cette méthode possède l'avantage d'être non dénaturante ; les échantillons peuvent donc être récupérés après l'expérience. C'est une méthode de choix pour (i) rechercher les changements de comportement d'une molécule dans différentes conditions

de solubilisation ; (ii) comparer les propriétés de molécules apparentées ; (iii) étudier les interactions entre deux molécules.

Dans notre étude, les changements dans la structure secondaire dus à des modifications de l'orientation des liaisons peptidiques seront étudiés dans l'UV lointain entre 190 et 250 nm.

H. II. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET OBTENTION DES SPECTRES

Tous les échantillons sont dilués dans un tampon physiologique phosphate de sodium 0,01M, NaCl 0,15M, pH 7,0. Les enregistrements sont effectués sur un dichrographe (Jobin-Yvon Mark III). Des cellules de 0,01 cm sont utilisées pour les mesures dans l'UV lointain. Toutes les solutions sont filtrées sur Acrodisc 13 (0,2 μm , Gelman) avant d'effectuer les spectres d'absorption et les spectres dichroïques. La concentration en MPI est calculée à partir de la valeur d'absorption de 7,8 à 280 nm pour une solution à 1% (48). La masse moyenne des acides aminés a été déterminée égale à 109,3 à partir de la composition en acides aminés du MPI. Toutes les valeurs d'ellipticités molaires $[\theta]$ sont exprimées en $\text{deg. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

I. SPECTROMETRIE DE MASSE

Toutes les études de masse moléculaire par spectrométrie de masse ont été effectuées au laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles URA 31 CNRS à Strasbourg, (Docteur A. Van Dorsselaer).

I. I. PRINCIPE

La spectrométrie de masse est une technique capable de produire des ions et de mesurer leur masse moléculaire.

Dans un spectromètre de masse, la production des ions est effectuée dans la source (les molécules y sont volatilisées, ionisées et accélérées) et la mesure de la masse moléculaire des ions est assurée par un analyseur (les ions sont filtrés en fonction de leur rapport $m/z = \text{masse moléculaire}/\text{charge}$).

Le couple mode d'ionisation-analyseur utilisé pour notre travail est l'électrospray-quadripôle. Notre but étant de calculer précisément la masse du MPI et celle des domaines obtenus après traitement par l'acide formique, cette

technique nous a semblé la plus appropriée pour des molécules de cette taille ($M_r > 5\ 000$).

Avant de détailler nos conditions opératoires, nous allons rappeler quelques définitions concernant la spectrométrie de masse.

I. II. DEFINITIONS

I. II. 1. Masse monoisotopique et masse chimique

Les produits naturels sont constitués par les mélanges d'isotopes stables des éléments. Ainsi un produit est un mélange de molécules qui ne diffèrent que par leur composition isotopique. La masse chimique (ou masse moyenne), celle que l'on obtient par pesée d'une mole du produit, est en réalité le barycentre de la masse des espèces moléculaires comprenant les différents isotopes des éléments.

En spectrométrie de masse, il est possible, lorsque les mesures sont effectuées à une résolution unitaire, de distinguer les pics isotopiques. Le pic monoisotopique P correspond à la molécule composée des isotopes les plus légers (^{12}C , ^1H , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S ...). Les pics suivants (P+1, P+2, ..., P+n) représentent les combinaisons multiples des autres isotopes. **Pour des peptides de masse élevée ($M_r > 2\ 000$) la quantité de molécules monoisotopiques devient négligeable ($< 1,5\ \%$) ; par conséquent il conviendra de mesurer leur masse chimique, c'est à dire le barycentre des masses de tous les pics isotopiques.**

Les masses chimiques du MPI, du rSLPI et des domaines correspondants ont été calculées à partir de la composition en acides aminés, à l'aide d'un programme informatique.

I. II. 2. Principe de l'électrospray

La solution du polypeptide à analyser est amenée à un débit de $2\ \mu\text{l}/\text{min}$ par un capillaire dans la chambre de nébulisation. Une différence de potentiel élevée (4 000 à 5 000 V) est appliquée entre le capillaire et l'entrée de l'analyseur, provoquant la formation d'un faisceau de gouttelettes (ou spray) très chargées. Le solvant de ces gouttelettes est évaporé par le passage à contre-courant d'un jet d'azote chaud (60°C), et les ions ainsi formés sont introduits par un petit orifice dans l'analyseur. Lorsque le solvant des gouttelettes est évaporé, la taille des gouttelettes diminue ; il en résulte une

augmentation de la densité de charge à leur surface. Une instabilité importante appelée explosion Coulombienne va résulter de la répulsion électrostatique créée entre les charges et va provoquer la formation de gouttelettes filles plus petites, elles aussi sujettes à l'évaporation et à cette explosion. Ce processus se répète jusqu'à ce que la gouttelette ait atteint la taille pour laquelle le champ électrique dû aux charges de la surface est assez important pour désorber les ions (Fig. 23) (170).

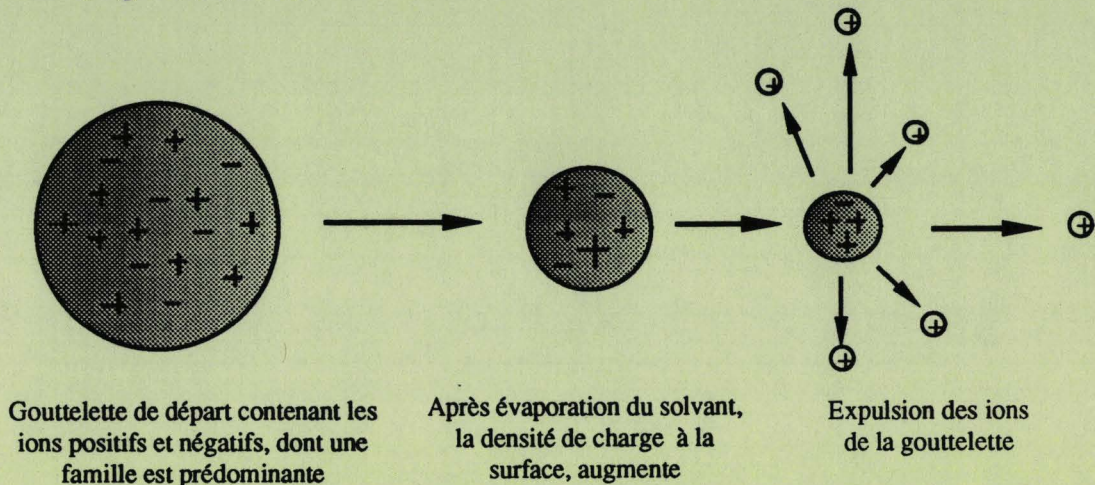


Figure 23 : Schéma du mécanisme de formation des ions par Electro spray (selon 170).

I. II. 3. Nature des ions

Les ions observés en Electro spray sont des ions multichargés du type $[M+nH]^{n+}$ en mode positif. On n'observe pas la formation d'ions fragments avec ce mode d'ionisation dans des conditions optimales d'utilisation.

En pratique, le nombre maximum de charges observé pour les peptides et les petites protéines ne contenant pas de ponts disulfure est en général en accord avec le nombre de résidus basiques (Arg, Lys, His) contenus dans ces polypeptides + 1 (ionisation de l'acide aminé N-terminal). Pour les protéines contenant un ou plusieurs ponts disulfure, le nombre maximum de charges observé est inférieur au nombre maximum de charges possible.

$$\text{Calcul de la masse de l'ion : } m = (M_r + n) / n$$

où m est la masse de l'ion, M_r est la masse moléculaire relative du peptide et n est le nombre de charges.

I. III. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET OBTENTION DES SPECTRES

L'échantillon est dissous dans un mélange H₂O/MeOH (50/50, v/v) contenant 1% d'acide acétique, à la concentration de 20 pmoles/ μ l. 5 à 10 μ l de cette solution sont injectés soit 100 à 200 pmoles par spectre. L'échantillon est ensuite introduit dans la source d'ions à un débit de 2 μ l/min. Le voltage du cône d'extraction des ions est de 55 volts ; il a été augmenté à 130 volts dans l'étude des protéines entières (MPI et rSLPI) afin d'éliminer toutes les interactions non covalentes (présence de tampon phosphate).

Le spectromètre de masse utilisé est un quadripôle VG BIO-Q avec une fourchette de M_r de 4 000. Les spectres ont été effectués dans une zone de m/z de 1 000 à 2 000 pour les protéines entières et de 700 à 1 500 pour les domaines, en 10 s à la résolution 600. La calibration est effectuée à l'aide de la myoglobine.

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION GENERALE

1. OHLSSON, K., ROSENGREN, M., STETLER, G., BREWER, M., HALE, K. K. and THOMPSON, R. C. (1987)
Structure, genomic organization, and tissue distribution of human secretory leukocyte-protease inhibitor (SLPI) : a potent inhibitor of neutrophil elastase.
dans *Pulmonary Emphysema and Proteolysis* : 1986 (J. C. Taylor and C. Mittman, eds.), pp. 307-324, Academic Press Inc., New York.
2. STOCKLEY, R. A. and MORRISON, H. M. (1990)
Elastase inhibitors of the respiratory tract.
Eur. Respir. J., 3, (Suppl. 9), 9s-15s.
3. RICE, W. G. and WEISS, S. J. (1990)
Regulation of proteolysis at the neutrophil-substrate interface by secretory leukoprotease inhibitor.
Science, 249, 178-181.
4. KRAMPS, J. A., FRANKEN, C. and DIJKMAN, J. H. (1984)
ELISA for quantitative measurement of low-molecular-weight bronchial protease inhibitor in human sputum.
Am. Rev. Respir. Dis., 129, 959-963.

CONNAISSANCES ACTUELLES

5. KALINER, M., SHELFHAMER, J. H., BORSON, B., NADEL, J., PATOW, C. and MAROM, Z. (1986)
Human respiratory mucus.
Am. Rev. Respir. Dis., 134, 612-621.
6. YEATES, D. B. (1991)
Mucus rheology.
dans *The Lung : Scientific Foundations* (R. G. Crystal, J. B. West et al., eds.), pp. 197-203, Raven Press, New York.

7. PUCHELLE, E., ZAHM, J. M., GIRARD, F., BERTRAND, A., POLU, J. M., AUG, F. and SADOUL, P. (1980)
Mucociliary transport *in vivo* and *in vitro*. Relations to sputum properties in chronic bronchitis.
Eur. J. Respir. Dis., 61, 254-264.
8. ROUSSEL, P., LAMBLIN, G., LHERMITTE, M., HOUDRET, N., LAFITTE, J.-J., PERINI, J.-M., KLEIN, A. and SCHARFMAN, A. (1988)
The complexity of mucins.
Biochimie, 70, 1471-1482.
9. SLAYTER, H. S., LAMBLIN, G., LE TREUT, A., GALABERT, C., HOUDRET, N., DEGAND, P. and ROUSSEL, P. (1984)
Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein.
Eur. J. Biochem., 142, 209-218.
10. ROBERTS, G. P. (1976)
The role of disulfide bonds in maintaining the gel structure of bronchial mucus.
Arch. Biochem. Biophys., 173, 528-537.
11. LAMBLIN, G., LHERMITTE, M., DEGAND, P. and ROUSSEL, P. (1979)
Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins.
Biochimie, 61, 23-43.
12. BURNETT, D. and STOCKLEY, R. A. (1981)
Serum and sputum alpha-2-macroglobulin in patients with chronic obstructive airways disease.
Thorax, 36, 512-516.
13. STOCKLEY, R. A., MISTRY, M., BRADWELL, A. R. and BURNETT, D. (1979)
A study of plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis.
Thorax, 34, 777-782.

14. TRAVIS, J. and SALVESEN, G. S. (1983)
Human plasma proteinase inhibitors.
Ann. Rev. Biochem., 52, 655-709.
15. MORNEX, J.-F., CHYTIL-WEIR, A., MARTINET, Y.,
COURTNEY, M., LECOCQ, J.-P. and CRYSTAL, R. G. (1986)
Expression of the Alpha-1-Antitrypsin gene in mononuclear phagocytes
of normal and Alpha-1-Antitrypsin-deficient individuals.
J. Clin. Invest., 77, 1952-1961.
16. GADEK, J. E., FELLS, G. A., ZIMMERMAN, R. L., RENNARD, S. I.
and CRYSTAL, R. G. (1981)
Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the
protease-antiprotease theory of emphysema.
J. Clin. Invest., 68, 889-898.
17. CARRELL, R. W. and BOSWELL, D. R. (1986)
Serpins : the superfamily of plasma serine proteinase inhibitors.
dans *Proteinase Inhibitors* (A. J. Barrett and G. Salvesen, eds.), pp. 403-
420, Elsevier Sciences Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
18. LASKOWSKI, M. and KATO, I. (1980)
Protein inhibitors of proteinases.
Ann. Rev. Biochem., 49, 593-626.
19. LAINE, A. and HAYEM, A. (1981)
Purification and characterization of α_1 -antichymotrypsin from human
pleural fluid and human serum.
Biochim. Biophys. Acta, 668, 429-438.
20. STOCKLEY, R. A. and BURNETT, D. (1980)
Alpha₁-antichymotrypsin in infected and noninfected sputum.
Am. Rev. Respir. Dis., 122, 81-88.
21. BURNETT, D., MAC GILLIVRAY, D. H. and STOCKLEY, R. A.
(1984)
Evidence that alveolar macrophages can synthesize and secrete alpha₁-
antichymotrypsin.
Am. Rev. Respir. Dis., 129, 473-476.

22. BERMAN, G., AFFORD, S. C., BURNETT, D. and STOCKLEY, R. A. (1986)
 α 1-antichymotrypsin in lung secretions is not an effective proteinase inhibitor.
J. Biol. Chem., 261, 14095-14099.
23. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R. and HEIMBURGER, N. (1973)
Antigenic relationship between the human bronchial mucus inhibitor and plasma inter- α -trypsin inhibitor.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 587-588.
24. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S. and WERLE, E. (1973)
Detection and isolation of a second acid stable proteinase inhibitor from human bronchial mucus.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 923-926.
25. KUEPPERS, F. and BROMKE, B. J. (1983)
Protease inhibitors in tracheobronchial secretions.
J. Lab. Clin. Med., 101, 747-757.
26. SALIER, J. P. (1990)
Inter- α -trypsin inhibitor : emergence of a family within the Kunitz-type protease inhibitor superfamily.
TIBS, 15, 435-439.
27. LAURELL, C.-B. and JEPPSSON, J.-O. (1975)
Protease inhibitors in plasma.
dans The Plasma Proteins (F. W. Putnam, ed.), pp. 229-264, Academic press, New-York.
28. FRYKSMARK, U., OHLSSON, K., ROSENGREN, M. and TEGNER, H. (1983)
Studies on the interaction between leukocyte elastase, antileukoproteinase and the plasma proteinase inhibitors α 1-proteinase inhibitor and α 2-macroglobulin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 793-800.

29. WHITE, R., HABICHT, G. S., GODFREY, H. P., JANOFF, A., BARTON, E. and FOX, C. (1981)
Secretion of elastase and alpha-2-macroglobulin by cultured murine peritoneal macrophages : studies on their interaction.
J. Lab. Clin. Med., 97, 718-729.
30. STOCKLEY, R. A. (1983)
Proteolytic enzymes, their inhibitors and lung diseases.
Clin. Sci., 64, 119-126.
31. HAENDLE, H., FRITZ, H., TRAUTSCHOLD I. and WERLE, E. (1965)
Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 343, 185-188.
32. HOCHSTRASSER, K., HAENDLE, H., REICHERT, R. and WERLE, E. (1971)
Über vorkommen und eigenschaften eines Proteaseninhibitors in menschlichem Nasensekret.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 954-958.
33. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S. and WERLE, E. (1972)
Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 221-226.
34. FINK, E., JAUMANN, E., FRITZ, H., INGRISCH, H. and WERLE, E. (1971)
Protease-Inhibitoren im menschlichen Spermaplasma. Isolierung durch Affinitätschromatographie und Hemmverhalten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1591-1594.
35. SCHIESSLER, H., FINK, E. and FRITZ, H. (1976)
Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma.
Methods Enzymol., 45, 847-859.

36. HAENDLE, H., INGRISCH, H. and WERLE, E. (1970)
Über einen neuen Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor im Cervixsekret der Frau.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 545-546.
37. WALLNER, O. and FRITZ, H. (1974)
Characterization of an acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 709-715.
38. SCHIESSLER, H., ARNHOLD, M., OHLSSON, K. and FRITZ, H. (1976)
Inhibitors of acrosin and granulocyte proteinases from human genital tract secretions.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1251-1260.
39. OHLSSON, K., TEGNER, H., FRITZ, H. and SCHIESSLER, H. (1976)
Immunological similarity between low molecular weight trypsin-chymotrypsin inhibitors from human bronchial secretion and seminal plasma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1241-1244.Ω
40. OHLSSON, K., TEGNER, H. and ÅKESSON, U. (1977)
Isolation and partial characterization of a low molecular weight acid stable protease inhibitor from human bronchial secretion.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 583-589.
41. SCHIESSLER, H., HOCHSTRASSER, K. and OHLSSON, K. (1978)
Acid-stable inhibitors of granulocyte neutral proteases in human mucous secretions : biochemistry and possible biological function.
dans Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes (K., Havemann and A., Janoff, eds.), pp. 195-207, Urban and Schwarzenberg, Inc., Baltimore-Munich.
42. FRANKEN, C., KRAMPS, J. A., MEYER, C. J. L. M. and DIJKMAN, J. H. (1980)
Localization of a low molecular weight protease inhibitor in the respiratory tract.
Bull. Europ. Physiopath. Resp., 16, 231-236.

43. GIRARD, F., TOURNIER, J. M., POLU, J. M. and SADOUL, P. (1980)
Characterization of a bronchial inhibitor in the sputum of chronic bronchitics.
Bull. Europ. Physiopath. Resp., 16, 237-245.

44. STOCKLEY, R. A., MORRISON, H. M., SMITH, S. and TETLEY, T. (1984)
Low molecular mass bronchial proteinase inhibitor and α_1 -proteinase inhibitor in sputum and bronchoalveolar lavage.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365, 587-595.

45. SMITH, S. F., GUZ, A., BURTON, G. H., COOKE, N. T. and TETLEY, T. D. (1986)
Acid-stable low molecular mass proteinase inhibitors in human lung lavage.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 367, 183-189.

46. SMITH, C. E. and JOHNSON, D. A. (1985)
Human bronchial leucocyte proteinase inhibitor. Rapid isolation and kinetic analysis with human leucocyte proteinases.
Biochem. J., 225, 463-472.

47. KLASSEN, E. C. and KRAMPS, J. A. (1985)
The N-terminal sequence of antileukoprotease isolated from bronchial secretion.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 128, 285-289.

48. BOUDIER, C. , CARVALLO, D., ROITSCH, C., BIETH, J. G. and COURTNEY, M. (1987)
Purification and characterization of human bronchial proteinase inhibitor.
Arch. Biochem. Biophys., 253, 439-445.

49. THOMPSON, R. C. and OHLSSON, K. (1986)
Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6692-6696.

50. TOURNIER, J. M., JACQUOT, J., SADOUL, P. and BIETH, J. G. (1983)
Noncompetitive enzyme immunoassay for the measurement of bronchial inhibitor in biological fluids.
Anal. Biochem., 131, 345-350.
51. TEGNER, H. and OHLSSON, K. (1977)
Localization of a low molecular weight protease inhibitor to tracheal and maxillary sinus mucosa.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 425-429.
52. KRAMPS, J. A., FRANKEN, C., MEIJER, C. J. L. M. and DIJKMAN, J. H. (1981)
Localization of low molecular weight protease inhibitor in serous secretory cells of the respiratory tract.
J. Histochem. Cytochem., 29, 712-719.
53. MOOREN, H. W. D., MEYER, C. J. L. M., KRAMPS, J. A., FRANKEN, C. and DIJKMAN, J. H. (1982)
Ultrastructural localization of the low molecular weight protease inhibitor in human bronchial glands.
J. Histochem. Cytochem., 30, 1130-1134.
54. FRANKEN, C., MEIJER, C. J. L. M. and DIJKMAN, J. H. (1989)
Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans.
J. Histochem. Cytochem., 37, 493-498.
55. MOOREN, H. W. D., KRAMPS, J. A., FRANKEN, C., MEIJER, C. J. L. M. and DIJKMAN, J. A. (1983)
Localisation of a low-molecular-weight bronchial protease inhibitor in the peripheral human lung.
Thorax, 38, 180-183.
56. DE WATER, R., WILLEMS, L. N. A., VAN MUIJEN, G. N. P., FRANKEN, C., FRANSEN, J. A. M., DIJKMAN, J. H. and KRAMPS, J. A. (1986)
Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies.
Am. Rev. Respir. Dis., 133, 882-890.

57. GAUTHIER, F., FRYKSMARK, U., OHLSSON, K. and BIETH, J. G. (1982)
Kinetics of the inhibition of leukocyte elastase by the bronchial inhibitor.
Biochim. Biophys. Acta, 700, 178-183.
58. BOUDIER, C. and BIETH, J. G. (1989)
Mucus proteinase inhibitor : a fast-acting inhibitor of leucocyte elastase.
Biochim. Biophys. Acta, 995, 36-41.
59. FRYKSMARK, U., OHLSSON, K., ROSENGREN, M. and TEGNER, H. (1981)
A radioimmunoassay for measurement and characterization of human antileukoprotease in serum.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1273-1277.
60. LAURENT, P., RABAUD, M. and BIETH, J. G. (1987)
Inhibition of free and elastin-bound human pancreatic elastase by human bronchial inhibitor.
Biochem. Pharmacol., 36, 765-767.
61. FINK, E., NETTELBECK, R. and FRITZ, H. (1986)
Inhibition of mast cell chymase by eglin c and antileukoprotease (HUSI-I). Indications for potential biological functions of these inhibitors.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 367, 567-571.
62. SEEMÜLLER, U., ARNHOLD, M., FRITZ, H., WIEDENMANN, K., MACHLEIDT, W., HEINZEL, R., APPELHANS, H., GASSEN, H.-G. and LOTTSPREICH, F. (1986)
The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease).
FEBS. Lett., 199, 43-48.
63. HEINZEL, R., APPELHANS, H., GASSEN, G., SEEMÜLLER, U., MACHLEIDT, W., FRITZ, H. and STEFFENS, G. (1986)
Molecular cloning and expression of cDNA for human antileukoprotease from cervix uterus.
Eur. J. Biochem., 160, 61-67.

64. MECKELEIN, B., NIKIFOROV, T., CLEMEN, A. and APPELHANS, H. (1990)
The location of inhibitory specificities in human mucus proteinase inhibitor (MPI) : separate expression of the COOH-terminal domain yields an active inhibitor of three different proteinases.
Protein Eng., **3**, 215-220.
65. EISENBERG, S. P., HALE, K. K., HEIMDAL, P. and THOMPSON, R. C. (1990)
Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor.
J. Biol. Chem., **265**, 7976-7981.
66. KRAMPS, J. A., VAN TWISK, C., APPELHANS, H., MECKELEIN, B., NIKIFOROV, T. and DIJKMAN, J. H. (1990)
Proteinase inhibitory activities of antileukoprotease are represented by its second COOH-terminal domain.
Biochim. Biophys. Acta, **1038**, 178-185.
67. GRÜTTER, M. G., FENDRICH, G., HUBER, R. and BODE, W. (1988)
The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine α -chymotrypsin.
EMBO J., **7**, 345-351.
68. STETLER, G., BREWER, M. T. and THOMPSON, R. C. (1986)
Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases.
Nucl. Acids Res., **14**, 7883-7896.
69. ABE, T., KOBAYASHI, N., YOSHIMURA, K., TRAPNELL, B. C., KIM, H., HUBBARD, R. C., BREWER, M. T., THOMPSON, R. C. and CRYSTAL, R. G. (1991)
Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells.
J. Clin. Invest., **87**, 2207-2215.

70. APPELHANS, B., ENDER, B., SACHSE, G., NIKIFOROV, T., APPELHANS, H. and EBERT, W. (1987)
Secretion of antileucoprotease from a human lung tumor cell line.
FEBS Lett., 224, 14-18.
71. FRITZ, H. (1988)
Human mucus proteinase inhibitor (Human MPI). Human seminal inhibitor I (HUSI-I), antileukoprotease (ALP), secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI).
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 369, 79-82.
72. HOCHSTRASSER, K., ALBRECHT, G. J., SCHÖNBERGER, Ö. L., RASCHE, B. and LEMPART, K. (1981)
An elastase-specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1369-1375.
73. KRAMPS, J. A. and KLASSEN, E. C. (1985)
Characterization of a low molecular weight anti-elastase isolated from human bronchial secretion.
Exp. Lung Res., 9, 151-165.
74. SALLENAVE, J.-M. and RYLE, A. P. (1991)
Purification and characterization of Elastase-Specific Inhibitor. Sequence homology with mucus proteinase inhibitor.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 372, 13-21.
75. JANOFF, A. and SCHERER, J. (1968)
Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes.
J. Exp. Med., 128, 1137-1140.
76. MORIHARA, K. and HOMMA, J. Y. (1985)
Pseudomonas proteases.
dans Bacterial Enzymes and Virulence (I. A. Holder, ed.), pp. 41-79,
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

77. KAO, R. C., WEHNER, N. G., SKUBITZ, K. M., GRAY, B. H. and HOIDAL, J. R. (1988)
Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters.
J. Clin. Invest., 82, 1963-1973.
78. RAO, N. V., WEHNER, N. G., MARSHALL, B. C., GRAY, W. R., GRAY, B. H. and HOIDAL, J. R. (1991)
Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties.
J. Biol. Chem., 266, 9540-9548.
79. HUBBARD, R. C., BRANTLY, M. L. and CRYSTAL, R. G. (1991)
Proteases.
dans *The Lung : Scientific Foundations* (R. G. Crystal, J. B. West et al., eds.), pp. 1763-1773, Raven Press, New-York.
80. BUTTLE, D. J., ABRAHAMSON, M., BURNETT, D., MORT, J. S., BARRETT, A. J., DANDO, P. M. and HILL, S. L. (1991)
Human sputum cathepsin B degrades proteoglycan, is inhibited by α 2-macroglobulin and is modulated by neutrophil elastase cleavage of cathepsin B precursor and cystatin C.
Biochem. J., 276, 325-331.
81. OHLSSON, K. and OLSSON, I. (1977)
The extracellular release of granulocyte collagenase and elastase during phagocytosis and inflammatory processes.
Scand. J. Haematol., 19, 145-152.
82. REILLY, C. F. and TRAVIS, J. (1980)
The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases.
Biochim. Biophys. Acta, 621, 147-157.
83. MAC DONALD, J. A. and KELLEY, D. G. (1980)
Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments.
J. Biol. Chem., 255, 8848-8858.

84. MORIHARA, K., TSUZUKI, H., OKA, T., INOUE, H. and EBATA, M. (1965)
Pseudomonas aeruginosa elastase. Isolation, crystallization, and preliminary characterization.
J. Biol. Chem., 240, 3295-3304.
85. WRETLIND, B. and WADSTROM, T. (1977)
Purification and properties of a protease with elastase activity from *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Gen. Microbiol., 103, 319-327.
86. HAMDAOUI, A., WUND-BISSERET, F. and BIETH, J. G. (1987)
Fast solubilization of human lung elastin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase.
Am. Rev. Respir. Dis., 135, 860-863.
87. SAULNIER, J. M., CURTIL, F. M., DUCLOS, M.-C. and WALLACH, J. M. (1989)
Elastolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* elastase.
Biochim. Biophys. Acta, 995, 285-290.
88. BEJARANO, P. A., LANGEVELD, J. P. M., HUDSON, B. G. and NOELKEN, M. E. (1989)
Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase.
Infect. Immun., 57, 3783-3787.
89. AMITANI, R., WILSON, R., RUTMAN, A., READ, R., WARD, C., BURNETT, D., STOCKLEY, R. A. and COLE, P. J. (1991)
Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 4, 26-32.
90. KLINGER, J. D., TANDLER, B., LIEDTKE, C. M. and BOAT, T. F. (1984)
Proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* evoke mucin release by tracheal epithelium.
J. Clin. Invest., 74, 1669-1678.

91. PLOTKOWSKI, M. C., BECK, G., TOURNIER, J. M., BERNARDO-FILHO, M., MARQUES, E. A. and PUCHELLE, E. (1989)
Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelium and the effect of leucocyte elastase.
J. Med. Microbiol., 30, 285-293.
92. JOHNSON, D. A., CARTER-HAMM, B. and DRALLE, W. M. (1982)
Inactivation of human bronchial mucosal proteinase inhibitor by *Pseudomonas aeruginosa* elastase.
Am. Rev. Respir. Dis., 126, 1070-1073.
93. TOURNIER, J.-M., JACQUOT, J., PUCHELLE, E. and BIETH, J. G. (1985)
Evidence that *Pseudomonas aeruginosa* elastase does not inactivate the bronchial inhibitor in the presence of leukocyte elastase. Study with cystic fibrosis sputum and with pure proteins.
Am. Rev. Respir. Dis., 132, 524-528.
94. MORIHARA, K., TSUZUKI, H., HARADA, M. IWATA, T. (1984)
Purification of human plasma α_1 -proteinase inhibitor and its inactivation by *Pseudomonas aeruginosa* elastase.
J. Biochem., 95, 795-804.
95. PADRINES, M. and BIETH, J. G. (1989)
Pseudomonas aeruginosa elastase does not inactivate α_1 -proteinase inhibitor in the presence of leukocyte elastase.
Infect. Immun., 57, 3793-3797.
96. TRAVIS, J., DUBIN, A., POTEPA, J., WATOREK, W. and KURDOWSKA, A. (1991)
Neutrophil proteinases. Caution signs in designing inhibitors against enzymes with possible multiple functions.
dans Pulmonary Emphysema, Annals of the New York Academy of Sciences (G., Weinbaum, R. E., Giles and R. D., Krell, eds.), Vol. 624, pp. 81-86, New York.

97. TOURNIER, J. M. and BASBAUM, C. (1990)
In vitro secretion of gelatin-degrading enzyme by bovine tracheal gland serous cells in culture.
Eur. Respir. J., **3**, (Suppl. 10), A641, 1915.
98. COLLIER, I. E., WILHELM, S. M., EISEN, A. Z., MARMER, B. L., GRANT, G. A., SELTZER, J. L., KRONBERGER, A., HE, C., BAUER, E. A. and GOLDBERG, G. I. (1988)
H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen.
J. Biol. Chem., **263**, 6579-6587.
99. TREFZ, G., ERDEL, M., SPIESS, E., and EBERT, W. (1990)
Detection of cathepsin B, plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor in human non-small lung cancer cell lines.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **371**, 617-624.
100. DAVIDSON, J. M. (1990)
Biochemistry and turnover of lung interstitium.
Eur. Respir. J., **3**, 1048-1068.
101. HUBBARD, R. C. and CRYSTAL, R. G. (1991)
Antiproteases.
dans *The Lung : Scientific Foundations* (R. G. Crystal, J. B. West et al., eds.), pp. 1775-1787, Raven Press, New York.
102. ABRAMSON, S. L., MALECH, H. L. and GALLIN, J. I. (1991)
Neutrophils.
dans *The Lung : Scientific Foundations* (R. G. Crystal, J. B. West et al., eds.), pp. 553-563, Raven Press, New York.
103. VOGELMEIER, C., HUBBARD, R. C., FELLS, G. A., SCHNEBLI, H.-P., THOMPSON, R. C., FRITZ, H. and CRYSTAL, R. G. (1991)
Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor.
J. Clin. Invest., **87**, 482-488.

- 104. DUPUIT, F., JACQUOT, J., BENALI, R., HINNRASKY, J. and PUCHELLE, E. (1991)**
Polarized secretion of proteins by human tracheal gland cells cultured on a permeable substrate.
Am. Rev. Respir. Dis., 143, A147.
- 105. WILLEMS, L. N. A., OTTO-VERBERNE, C. J. M., KRAMPS, J. A., TEN HAVE-OPBROEK, A. A. W. and DIJKMAN, J. H. (1986)**
Detection of antileukoprotease in connective tissue of the lung.
Histochemistry, 86, 165-168.
- 106. KRAMPS, J. A., TE BOEKHORST, A. H. T., FRANSEN, J. A. M., GINSEL, L. A. and DIJKMAN, J. H. (1989)**
Antileukoprotease is associated with elastin fibers in the extracellular matrix of the human lung. An immunoelectron microscopic study.
Am. Rev. Respir. Dis., 140, 471-476.
- 107. BRUCH, M. and BIETH, J. G. (1986)**
Influence of elastin on the inhibition of leucocyte elastase by α 1-proteinase inhibitor and bronchial inhibitor. Potent inhibition of elastin-bound elastase by bronchial inhibitor.
Biochem. J., 238, 269-273.
- 108. MORRISON, H. M., WELGUS, H. G., STOCKLEY, R. A., BURNETT, D. and CAMPBELL, E. J. (1990)**
Inhibition of human leukocyte elastase bound to elastin : relative ineffectiveness and two mechanisms of inhibitory activity.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2, 263-269.
- 109. SCHNEBLI, H. P. (1987)**
Eglin c : an elastase/cathepsin G inhibitor with therapeutic potential in emphysema and ARDS : a review.
dans *Pulmonary Emphysema and Proteolysis : 1986* (J. C., Taylor and C., Mittman, eds.), pp. 73-84, Academic Press, Inc. New York.
- 110. JANOFF, A. (1985)**
Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis.
Am. Rev. Respir. Dis., 132, 417-433.

111. LUCEY, E. C., STONE, P. J. and SNIDER, G. L. (1991)
Consequences of proteolytic injury.
dans *The Lung : Scientific Foundations* (R. G. Crystal, J. B. West et al., eds.), pp. 1789-1801, Raven Press, New York.
112. BOUDIER, C., HOLLE, C. and BIETH, J. G. (1981)
Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G.
J. Biol. Chem., 256, 10256-10258.
113. SNIDER, G. L. (1986)
Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury.
Eur. J. Respir. Dis., 69, (Suppl. 146), 17-35.
114. SNIDER, G. L., LUCEY, E. C., CHRISTENSEN, T. G., STONE, P. J., CALORE, J. D., CATANESE, A. and FRANZBLAU, C. (1984)
Emphysema and bronchial secretory cell metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products.
Am. Rev. Respir. Dis., 129, 155-160.
115. CRYSTAL, R. G. (1990)
 α 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy.
J. Clin. Invest., 85, 1343-1352.
116. LAURELL, C.-B. and ERIKSSON, S. (1963)
The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15, 132-140.
117. JANOFF, A., CARP, H. and LEE, D. K. (1980)
Inactivation of alpha₁-proteinase inhibitor and bronchial mucous proteinase inhibitor by cigarette smoke *in vitro* and *in vivo*.
Bull. Europ. Physiopath. Resp., 16, 321-338.
118. BEATTY, K., BIETH, J. and TRAVIS, J. (1980)
Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized α -1-proteinase inhibitor and α -1-antichymotrypsin.
J. Biol. Chem., 255, 3931-3934.

119. CARP, H. and JANOFF, A. (1980)
Inactivation of bronchial mucous proteinase inhibitor by cigarette smoke and phagocyte-derived oxidants.
Exp. Lung Res., 1, 225-237.
120. KRAMPS, J. A., WILLEMS, L. N. A., FRANKEN, C. and DIJKMAN, J. H. (1988)
Antileukoprotease, its role in the human lung.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 369, 83-87.
121. KRAMPS, J. A., VAN TWISK, C., KLASSEN, E. C. and DIJKMAN, J. H. (1988)
Interactions among stimulated human polymorphonuclear leucocytes, released elastase and bronchial antileukoprotease.
Clin. Sci., 75, 53-62.
122. LUCEY, E. C., STONE, P. J., CICCOLELLA, D. E., BREUER, R., CHRISTENSEN, T. G., THOMPSON, R. C. and SNIDER, G. L. (1990)
Recombinant human secretory leukocyte-protease inhibitor : *in vitro* properties, and amelioration of human neutrophil elastase-induced emphysema and secretory cell metaplasia in the hamster.
J. Lab. Clin. Med., 115, 224-232.
123. WILLEMS, L. N. A., KRAMPS, J. A., STIJNEN, T., STERK, P. J., WEENING, J. J. and DIJKMAN, J. H. (1989)
Antileukoprotease-containing bronchiolar cells. Relationship with morphologic disease of small airways and parenchyma.
Am. Rev. Respir. Dis., 139, 1244-1250.
124. CHRISTENSEN, T. G., KORTHY, A. L., SNIDER, G. L. and HAYES, J. A. (1977)
Irreversible bronchial goblet cell metaplasia in hamsters with elastase-induced panacinar emphysema.
J. Clin. Invest., 59, 397-404.
125. HAYES, J. A. and CHRISTENSEN, T. G. (1978)
Bronchial mucus hypersecretion induced by elastase in hamsters : ultrastructural appearances.
J. Pathol., 125, 25-32.

126. LUCEY, E. C., STONE, P. J., BREUER, R., CHRISTENSEN, T. G., CALORE, J. D., CATANESE, A., FRANZBLAU, C. and SNIDER, G. L. (1985)
Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamsters, with *in vitro* observations on elastolysis by these enzymes.
Am. Rev. Respir. Dis, 132, 362-366.
127. LEE, R. M. K. W. and FORREST, J. B. (1991)
Structure and function of cilia.
dans The Lung : Scientific Foundations (R. G. Crystal, J. B. West et al., eds.), pp. 169-181, Raven Press, New York.
128. SMALLMAN, L. A., HILL, S. L. and STOCKLEY, R. A. (1984)
Reduction of ciliary beat frequency *in vitro* by sputum from patients with bronchiectasis : a serine proteinase effect.
Thorax, 39, 663-667.
129. SLEIGH, M. A., BLAKE, J. R. and LIRON, N. (1988)
The propulsion of mucus by cilia.
Am. Rev. Respir. Dis., 137, 726-741.
130. GAST, A., ANDERSON, W., PROBST, A., NICK, H., THOMPSON, R. C., EISENBERG, S. P. and SCHNEBLI, H. (1990)
Pharmacokinetics and distribution of recombinant secretory leukocyte proteinase inhibitor in rats.
Am. Rev. Respir. Dis., 141, 889-894.
131. VOGELMEIER, C., BUHL, R., HOYT, R. F., WILSON, E., FELS, G. A., HUBBARD, R. C., SCHNEBLI, H.-P., THOMPSON, R. C. and CRYSTAL, R. G. (1990)
Aerosolization of recombinant SLPI to augment antineutrophil elastase protection of pulmonary epithelium.
J. Appl. Physiol., 69, 1843-1848.
132. BERGENFELDT, M., BJÖRK, P. and OHLSSON, K. (1990)
The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) after intravenous injection in dog and man.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 50, 729-737.

- 133. SCHNEBLI, H. P. (1991)**
Recombinant elastase inhibitors for therapy.
dans Pulmonary Emphysema, Annals of the New York Academy of
Sciences (G. Weinbaum, R. E., Giles and R. D. Krell, eds.), Vol. 264,
pp. 212-218, New York.
- 134. TRAVIS, J. and FRITZ, H. (1991)**
Potential problems in designing elastase inhibitors for therapy.
Am. Rev. Respir. Dis., 143, 1412-1415.

TRAVAUX PERSONNELS

- 135. CREETH, J. M., BHASKAR, K. R., HORTON, J. R., DAS, I.,
LOPEZ-VIDRIERO, M.-T. and REID, L. (1977)**
The separation and characterization of bronchial glycoproteins by
density-gradient methods.
Biochem. J., 167, 557-569.
- 136. FELDHOFF, P. A., BHAVANANDAN, V. P. and DAVIDSON, E. A.
(1979)**
Purification, properties, and analysis of human asthmatic bronchial
mucin.
Biochemistry, 18, 2430-2436.
- 137. WOODWARD, H., HORSEY, B., BHAVANANDAN, V. P. and
DAVIDSON, E. A. (1982)**
Isolation, purification, and properties of respiratory mucus
glycoproteins.
Biochemistry, 21, 694-701.
- 138. THORNTON, D. J., DAVIES, J. R., KRAAYENBRINK, M.,
RICHARDSON, P. S., SHEEHAN, J. K. and CARLSTEDT, I. (1990)**
Mucus glycoproteins from "normal" human tracheobronchial secretion.
Biochem. J., 265, 179-186.

139. HOCHSTRASSER, K., SCHORN, K., RASCHE, B., LEMPARTH, K. and RAFFELT, C. (1975)
Characterization of masked specific proteinase inhibitor from bronchial secretions in purulent sputum as complex with leucocytic proteinases.
Pneumologie, 152, 15-24.
140. BASBAUM, C. B. and FINKBEINER, W. E. (1989)
Mucus-producing cells of the airways.
dans *Lung Cell Biology* (D., Massaro, ed.), Vol. 41, pp. 37-79, Marcel Dekker Inc., New-York.
141. PITT-RIVERS, R. and IMPIOMBATO, F. S. A. (1968)
The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins.
Biochem. J., 109, 825-830.
142. REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. and WILLIAMS, D. E. (1962)
Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels.
Nature, 4838, 281-283.
143. MILLER, K. W., EVANS, R. J., EISENBERG, S. P. and THOMPSON, R. C. (1989)
Secretory leukocyte protease inhibitor binding to mRNA and DNA as a possible cause of toxicity to *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 171, 2166-2172.
144. HIRS, C. H. W. (1967)
Performic acid oxidation.
Methods Enzymol., 11, 197-199.
145. HEWICK, R. M., HUNKAPILLER, M. W., HOOD, L. E. and DREYER, W. J. (1981)
A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator.
J. Biol. Chem., 256, 7990-7997.
146. MARTODAM, R. R., BAUGH, R. J., TWUMASI, D. Y. and LIENER, I. E. (1979)
A rapid procedure for the large scale purification of elastase and cathepsin G from human sputum.
Prep. Biochem., 9, 15-31.

147. BOUDIER, C. and BIETH, J. G. (1990)
The bronchial mucus inhibitor : proteinases binding stoichiometry.
Pathol. Biol., 38, 1039.
148. NAKAJIMA, K., POWERS, J. C., ASHE, B. M. and ZIMMERMAN, M. (1979)
Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the α_1 -protease inhibitor reactive site.
J. Biol. Chem., 254, 4027-4032.
149. CHASE, T. and SHAW, E. (1970)
Titration of trypsin, plasmin, and thrombin with p-nitrophenyl p'-guanidinobenzoate HCl.
Methods Enzymol., 19, 20-27.
150. PISZKIEWICZ, D., LANDON, M. and SMITH, E. L. (1970)
Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 1173-1178.
151. RICHARD, C., DEMARLY, A. M., HAN, K.-K. and DAUTREVAUX, M. (1984)
Special problems encountered during the cyanogen bromide cleavage of lobster arginine kinase.
Int. J. Biochem., 16, 727-732.
152. HAN, K.-K., RICHARD, C. and BISERTE, G. (1983)
Current developments in chemical cleavage of proteins.
Int. J. Biochem., 15, 875-884.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

153. SNYDER, C. E., NADZIEJKO, C. E. and HERP, A. (1982)
Binding of basic proteins to glycoproteins in human bronchial secretions.
Int. J. Biochem., 14, 895-898.

- 154. CREETH, J. M., BRIDGE, J. L. and HORTON, J. R. (1979)**
An interaction between lysozyme and mucus glycoproteins. Implications for density-gradient separations.
Biochem. J., 181, 717-724.
- 155. BOAT, T. F., KLEINERMAN, J. I., CARLSON, D. M., MALONEY, W. H. and MATTHEWS, L. W. (1974)**
Human respiratory tract secretions : mucous glycoproteins secreted by cultured nasal polyp epithelium from subjects with allergic rhinitis and cystic fibrosis.
Am. Rev. Respir. Dis., 110, 428-441.
- 156. LAMBLIN, G., LAFITTE, J. J., LHERMITTE, M., DEGAND, P. and ROUSSEL, P. (1977)**
Mucins from cystic fibrosis sputum.
Mod. Probl. Paediat., 19, 153-164.
- 157. FRATES, R. C., KAIZU, T. and LAST, J. A. (1983)**
Mucous glycoproteins secreted by respiratory epithelial tissue from cystic fibrosis patients.
Pediatr. Res., 17, 30-34.
- 158. FLODGAARD, H., ØSTERGAARD, E., BAYNE, S., SVENDSEN, A., THOMSEN, J., ENGELS, M. and WOLLMER, A. (1991)**
Covalent structure of two novel neutrophil leucocyte-derived proteins of porcine and human origin.
Eur. J. Biochem., 197, 535-547.

ANNEXE TECHNIQUE

- 159. KERCKAERT, J. P. (1978)**
Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis.
Anal. Biochem., 84, 354-360.
- 160. LAEMMLI, U. K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685.

161. ZACHARIUS, R. M., ZELL, T. E., MORRISON, J. H. and WOODLOCK, J. J. (1969)
Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels.
Anal. Biochem., 30, 148-152.
162. URIEL, J. and BERGES, J. (1968)
Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels.
Nature, 218, 578-580.
163. GRANELLI-PIPERNO, A. and REICH, E. (1978)
A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids.
J. Exp. Med., 148, 223-234.
164. KYHSE-ANDERSEN, J. (1984)
Electroblotting of multiple gels : a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods, 10, 203-209.
165. TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354.
166. HAWKES, R., NIDAY, E. and GORDON, J. (1982)
A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies.
Anal. Biochem., 119, 142-147.
167. STARKEY, P. M. and BARRETT, A. J. (1976)
Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G.
Biochem. J., 155, 255-263.
168. SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. and KLENK, D. C. (1985)
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem., 150, 76-85.

- 169. SCHMID, F. X. (1990)**
Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes.
dans Protein Structure, a practical approach (T. E. Creighton, ed.),
pp. 251-285, IRL Press, Oxford, England.
- 170. SMITH, R. D., LOO, J. A., EDMONDS, C. G., BARINAGA, C. J. and UDSETH, H. R. (1990)**
New developments in biochemical mass spectrometry : electrospray ionization.
Anal. Chem., 62, 882-899.

RESUME



L'inhibiteur bronchique (MPI) est un des inhibiteurs physiologiques de l'élastase granulocytaire dans les sécrétions bronchiques, avec l' α_1 -antiprotéase. C'est une molécule basique de $M_r = 11\ 726$ organisée en deux domaines homologues. Le domaine C-terminal porte le site actif envers l'élastase. Actuellement, le rôle physiologique exact du MPI dans la défense du tractus respiratoire et la fonction du domaine N-terminal ne sont pas connus.

Afin d'essayer de répondre à ces deux questions, notre travail a consisté à :

☞ isoler l'inhibiteur et étudier l'interaction, mise en évidence au cours des différents protocoles de purification essayés, avec les mucines respiratoires. L'approche par dichroïsme circulaire a abouti à la caractérisation de liaisons de type ionique entre le MPI et les mucines, mettant en avant le rôle des résidus d'acide sialique et de sulfate. D'autre part, l'étude *in vitro* de la capacité inhibitrice du MPI associé aux mucines envers l'élastase granulocytaire montre que :

1. la présence de l'inhibiteur permet de retarder la protéolyse des mucines.
2. la présence de l'inhibiteur permet de diminuer l'activité protéolytique de l'élastase.

Ce résultat laisse entrevoir un rôle *in vivo* du MPI dans le maintien des propriétés rhéologiques du mucus qui sont indispensables à un bon fonctionnement du système d'épuration mucociliaire.

☞ Etudier la structure des deux domaines et leur activité envers les enzymes cibles connus du MPI (élastase granulocytaire humaine, trypsine et chymotrypsine pancréatiques bovines). Nous avons aussi effectué une étude comparative avec la protéine recombinante. Ce travail a permis de montrer que les domaines, préparés de manière à les obtenir dans leur intégralité après un clivage chimique spécifique, ont des comportements différents :

1. le MPI, comparé à la protéine recombinante, semble avoir subi des modifications post-traductionnelles de type méthylation.
2. le domaine N-terminal n'a aucune activité inhibitrice envers les trois sérine-protéases essayées.
3. le domaine C-terminal est inhibiteur de l'élastase granulocytaire humaine, de la chymotrypsine pancréatique bovine et plus faiblement de la trypsine pancréatique bovine.

✍ NOTES ✍

↳ NOTES ↳

RESUME

L'inhibiteur bronchique (MPI) est un des inhibiteurs physiologiques de l'élastase granulocytaire dans les sécrétions bronchiques, avec l' α_1 -antiprotéase. C'est une molécule basique de $M_r = 11\ 726$ organisée en deux domaines homologues. Le domaine C-terminal porte le site actif envers l'élastase. Actuellement, le rôle physiologique exact du MPI dans la défense du tractus respiratoire et la fonction du domaine N-terminal ne sont pas connus.

Afin d'essayer de répondre à ces deux questions, notre travail a consisté à :

☞ isoler l'inhibiteur et étudier l'interaction, mise en évidence au cours des différents protocoles de purification essayés, avec les mucines respiratoires. L'approche par dichroïsme circulaire a abouti à la caractérisation de **liaisons de type ionique entre le MPI et les mucines**, mettant en avant le rôle des résidus d'acide sialique et de sulfate. D'autre part, l'étude *in vitro* de la capacité inhibitrice du MPI associé aux mucines envers l'élastase granulocytaire montre que :

1. la présence de l'inhibiteur permet de **retarder la protéolyse** des mucines.
2. la présence de l'inhibiteur permet de **diminuer l'activité protéolytique** de l'élastase.

Ce résultat laisse entrevoir un **rôle *in vivo* du MPI dans le maintien des propriétés rhéologiques du mucus** qui sont indispensables à un bon fonctionnement du système d'épuration mucociliaire.

☞ Etudier la structure des deux domaines et leur activité envers les enzymes cibles connus du MPI (élastase granulocytaire humaine, trypsine et chymotrypsine pancréatiques bovines). Nous avons aussi effectué une étude comparative avec la protéine recombinante. Ce travail a permis de montrer que les domaines, préparés de manière à les obtenir dans leur intégralité après un clivage chimique spécifique, ont des comportements différents :

1. le MPI, comparé à la protéine recombinante, **semble avoir subi des modifications post-traductionnelles de type méthylation**.
2. le domaine N-terminal n'a aucune activité inhibitrice envers les trois sérine-protéases essayées.
3. le domaine C-terminal est inhibiteur de l'élastase granulocytaire humaine, de la chymotrypsine pancréatique bovine et plus faiblement de la trypsine pancréatique bovine.