

50376  
1991  
260

66840

50376  
1991  
260

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Année universitaire 1991

N° d'ordre: 810

**THESE DE DOCTORAT**  
**de l'Université de Lille I**

présentée par

**CHRISTOPHE CARNOY**

pour l'obtention du grade de **DOCTEUR EN BIOCHIMIE**



**INTERACTIONS**  
**MUCINES - *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***  
**DANS LA MUCOVISCIDOSE**

**Mise en évidence de sites de reconnaissance  
glycanniques et d'adhésines bactériennes**

Soutenue le 26 novembre 1991 devant un Jury composé de :

<b>Président</b>	<b>: Professeur A. VERBERT</b>
<b>Rapporteurs</b>	<b>: Professeur P. BOURLIOUX</b>
	<b>: Professeur B. FOURNET</b>
<b>Examineurs</b>	<b>: Professeur R. RAMPHAL</b>
	<b>: Professeur P. ROUSSEL</b>

***A MES PARENTS***

Ce travail a été réalisé à l'unité INSERM n°16 dirigée par le Professeur Pierre Degand, sous la direction scientifique du Professeur Philippe Roussel.

Je tiens à remercier:

Monsieur le Professeur André Verbert qui a accepté de présider le jury de thèse;

Messieurs les Professeurs Pierre Bourlioux et Bernard Fournet qui ont bien voulu juger ce mémoire;

Messieurs les Professeurs Reuben Ramphal et Philippe Roussel qui ont accepté d'examiner ce travail.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec:

le groupe de Gérard Strecker du laboratoire de Chimie Biologique de l'USTL Flandres Artois pour les études en RMN (J.-M. Wieruszeski) et pour la préparation des néoglycolipides (J.-C. Michalski).

Reuben Ramphal de l'Université de Floride à Gainesville pour les études d'adhésion.

Claude Galabert de l'hôpital Renée Sabran de Giens (Hyères) pour l'approvisionnement en salive de patients atteints de mucoviscidose.

Je voudrais exprimer ma gratitude à :

Monsieur le Professeur Philippe Roussel. Je vous remercie tout d'abord de m'avoir accueilli dans votre laboratoire il y a 4 ans. Je tiens aussi à rendre hommage à votre compétence et à votre rigueur. Vous avez su me donner la motivation nécessaire à l'accomplissement de ce travail.

Madame Geneviève Lamblin. Vous m'avez dirigé lors de ces années et j'ai pu apprécier vos qualités scientifiques et humaines.

Monsieur le professeur Reuben Ramphal. J'ai eu la chance de passer près de six mois dans votre laboratoire à Gainesville. J'ai pu y apprécier votre vivacité d'esprit et votre connaissance des problèmes d'adhésion. Vous avez su dynamiser le sujet.

Madame Nicole Houdret. Vous m'avez enseigné les techniques d'adhésion et vous avez toujours été présente lors des moments difficiles. Je vous en remercie.

Monsieur André Klein. Tu m'as enseigné les techniques HPLC et j'ai pu apprécier à de nombreuses reprises ta culture scientifique.

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe:

Madame Scharfman pour ses qualités humaines et son aide bibliographique, Edwige Van-Brussel pour son aide technique lors de cette dernière année, Jean-Marc Perini pour les discussions scientifiques (et autres) que nous avons eues, Mesdames Pascale Humbert, Monique Luyckx, et Marie-Christine Houvenaghel pour leur aide technique, Monsieur Claude Vandeperre pour la réalisation des documents photographiques.

Je tiens enfin à remercier tous les donneurs de salive qui ont rendu possible cette étude.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
<b>CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE MECANISME MOLECULAIRE D'ADHESION PROBLEME POSE PAR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> DANS LA MUCOVISCIDOSE.....</b>	<b>6</b>
<b>A. Mécanisme général des interactions adhésine-récepteur.....</b>	<b>9</b>
A.I. Les adhésines bactériennes .....	9
A. I. 1. Adhésines de nature protéique .....	9
A. I. 2. Adhésines non protéiques .....	10
a. L'acide lipotéichoïque.....	10
b. La capsule exopolysaccharidique .....	10
A. I. 3. Expression des adhésines .....	11
A. II. Les récepteurs .....	11
A. II. 1. Les récepteurs glycaniques.....	12
a. Les glycolipides.....	12
b. Les glycoprotéines.....	12
A. II. 2. Les récepteurs protéiques.....	13
<b>B. Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....</b>	<b>15</b>
B. I. Microbiologie des infections dans la mucoviscidose .....	15
B. I. 1. Flore bactérienne observée dans la mucoviscidose.....	15
B. I. 2. <i>P. aeruginosa</i> et mucoviscidose.....	16
B. II. Les modèles d'étude de l'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> .....	17
B. II. 1. Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> sur les cellules .....	17
a. Adhésion sur les cellules buccales humaines .....	17
b. Adhésion sur des cellules trachéales humaines .....	19
c. Adhésion sur des cellules épithéliales humaines en culture .....	20
d. Adhésion sur les épithéliums respiratoires d'animaux .....	22

B. II. 2. Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> sur les mucines .....	25
B. II. 3. Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> dans le cas d'infections non-respiratoires .....	27
B. III. Les adhésines de <i>P. aeruginosa</i> et leurs récepteurs. ....	27
B. III. 1. Les adhésines .....	28
a. Pili .....	28
b. Alginate .....	29
c. Hémagglutinine .....	29
d. Exotoxine S .....	29
e. Autres adhésines .....	30
B. III. 2. Les récepteurs .....	30
B. IV. Adhésion de <i>P. aeruginosa in vivo</i> .....	32
C. Conclusion de la revue générale sur l'adhésion .....	34

## LES MUCINES SALIVAIRES HUMAINES .....

35

## TRAVAUX PERSONNELS .....

39

<b>I<sup>ère</sup> PARTIE : ETUDE COMPARATIVE DE L'ADHESION DE <i>P. AERUGINOSA</i> AUX GLYCOPEPTIDES DE MUCINES SALIVAIRES DE SUJETS NORMAUX OU ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE .....</b>	<b>40</b>
--	-----------

<u>Premier article</u> : Altered carbohydrate chains in salivary mucins from patients with cystic fibrosis .....	43
--	----

<u>Troisième article</u> : Arylneuraminidase activity of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> does not degrade natural substrates such as human respiratory mucins .....	74
---	----

<u>Deuxième article</u> : The binding of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to salivary glycopeptides from patients with cystic fibrosis .....	77
---	----

**IIème PARTIE : ETUDE DES CHAINES GLYCANNIQUES DE MUCINES  
SALIVAIRES HUMAINES..... 101**

Article : The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins..... 103

**Particularités structurales des mucines salivaires de patients atteints de mucoviscidose..... 145**

**IIIème PARTIE : IDENTIFICATION DE SITES RECEPTEURS DE  
*P. AERUGINOSA*..... 150**

Article : *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide units..... 154

**IVème PARTIE : RECHERCHE D'ADHESINE(S) DE *P. AERUGINOSA*  
RECONNAISSANT LES MUCINES ..... 159**

**IV. A. Conditions expérimentales ..... 161**

IV. A. 1. Mise en évidence d'une fraction membranaire de  
*P. aeruginosa* ayant une affinité pour les mucines..... 161

IV. A. 1. a. Extraction des protéines de la membrane externe  
de *P. aeruginosa* ..... 161

IV. A. 1. b. Marquage des mucines à l'iode <sup>125</sup>..... 161

IV. A. 1. c. Révélation des protéines membranaires par  
les mucines I<sup>125</sup>..... 163

IV. A. 2. Essais de purification des adhésines de *P. aeruginosa* ..... 164

IV. A. 2. a. Chromatographie d'affinité ..... 164

IV. A. 2. b. Electroélution de la protéine de 50 kDa..... 165

**IV. B. Résultats..... 166**

IV. B. 1. Caractérisation d'une adhésine de 50 kDa ..... 166

IV. B. 2. Chromatographies d'affinité..... 166

IV. B. 2. a. Chromatographies sur Fractogel ..... 166

IV. B. 2. b. Chromatographies sur Sepharose et Sepharose-  
mucines..... 168

IV. B. 3. Electroélution .....	169
IV. C. Discussion.....	176
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>187</b>



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

### PUBLICATIONS

*Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing Type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or Type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide units.

RAMPHAL R., CARNOY C., FIEVRE S., MICHALSKI J-C., HOUDRET N., LAMBLIN G., STRECKER G., ROUSSEL P.

Infect. Immun., 1991, 59, 700-704.

Arylneuraminidase activity of *Pseudomonas aeruginosa* does not degrade natural substrates such as human respiratory mucins.

SCHARFMAN A., RAMPHAL R., NEUT C., CARNOY C., LAMBLIN G., ROUSSEL P.

Infect. Immun., 1991, 59, 4283-4285.

Altered carbohydrate chains in salivary mucins from patients with cystic fibrosis.

CARNOY C., LO-GUIDICE J.-M., KLEIN A., GALABERT C., RAMPHAL R., LAMBLIN G., ROUSSEL P.

J. Clin. Invest., soumis.

The binding of *Pseudomonas aeruginosa* to salivary glycopeptides from patients with cystic fibrosis.

CARNOY C., RAMPHAL R., HOUDRET N., KLEIN A., SCHARFMAN A., ROUSSEL P., LAMBLIN G.

Infect. Immun., soumis.

The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins.

KLEIN A., CARNOY C., WIERUSZESKI J.-M., STRECKER G., STRANG A.-M., VAN HALBEEK H., ROUSSEL P., LAMBLIN G.

Biochemistry, soumis.

## COMMUNICATIONS

Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to mucin glycopeptides from cystic fibrosis saliva.

HOUDRET N., CARNOY C., KLEIN A., LAMBLIN G., RAMPHAL R., ROUSSEL P.

X<sup>th</sup> International Symposium on Glycoconjugates, Jerusalem, Israël, 10-19 Septembre 1989.

*Pseudomonas aeruginosa* recognizes lactosamine chains.

RAMPHAL R., CARNOY C., FIEVRE S., MICHALSKI J-C., KOO L., LAMBLIN G., STRECKER G., ROUSSEL P.

American Society of Microbiology, Annual Meeting, Anaheim, California, USA, 13-17 Mai 1990.

Comparative study of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to salivary mucins glycopeptides from normal and cystic fibrosis subjects.

CARNOY C., RAMPHAL R., HOUDRET N., LAMBLIN G., ROUSSEL P.

XI<sup>th</sup> International Symposium on Glycoconjugates, Toronto, Canada, 30 Juin - 5 Juillet 1991.

Normal and cystic fibrosis salivary mucin glycopeptides : comparison of the chemical composition and affinity for *Pseudomonas aeruginosa*.

CARNOY C., RAMPHAL R., HOUDRET N., KLEIN A., LAMBLIN G., ROUSSEL P.

Joint Meeting, Villeneuve d'ascq, France, 26-27 Septembre 1991.

## COMMUNICATION ORALE

Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to mucin glycopeptides from cystic fibrosis and normal saliva.

CARNOY C., HOUDRET N., KLEIN A., LAMBLIN G., RAMPHAL R., ROUSSEL P.

XVII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Villeneuve d'Ascq, France, 3-6 juillet 1990.

## ***ABREVIATIONS***

Cer	Céramide
CF	Cystic Fibrosis (Mucoviscidose)
CFU	Colony Forming Unit
Gal	Galactose
EDTA	Acide Ethylènedinitrilotétraacétique
Fuc	L-Fucose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
LTA	Acide lipotéichoïque
Man	Mannose
ManNAc	N-acétylmannosamine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phénylméthylsulfonyl Fluoride
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
PAGE-SDS	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
TLC	Thin Layer Chromatography (Chromatographie en couche mince)

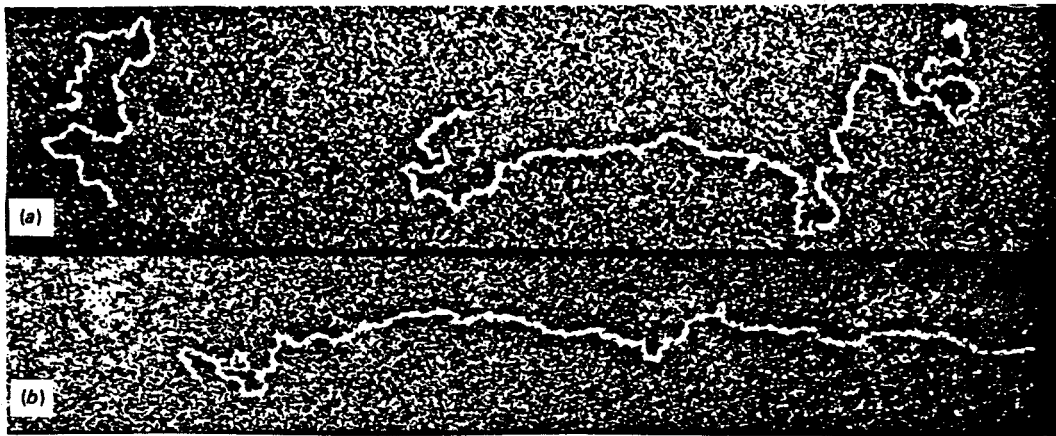
# **INTRODUCTION**

La mucoviscidose, maladie génétique la plus fréquente dans la race caucasienne (1 cas sur 2000 naissances), se caractérise par une exocrinopathie généralisée. Elle évolue dans la plupart des cas vers une surinfection bronchique très spécifique, qui est la cause principale de la morbidité et de la mortalité dans cette affection. Des études électrophysiologiques ont permis de montrer qu'il existait des anomalies dans les mouvements ioniques de l'épithélium respiratoire où l'on observe une imperméabilité aux ions chlorure ainsi qu'une hyperabsorption des ions sodium (74, 172). Ces anomalies s'accompagnent de l'hypersecretion d'un mucus déshydraté, très visqueux et difficilement éliminable par le système mucociliaire.

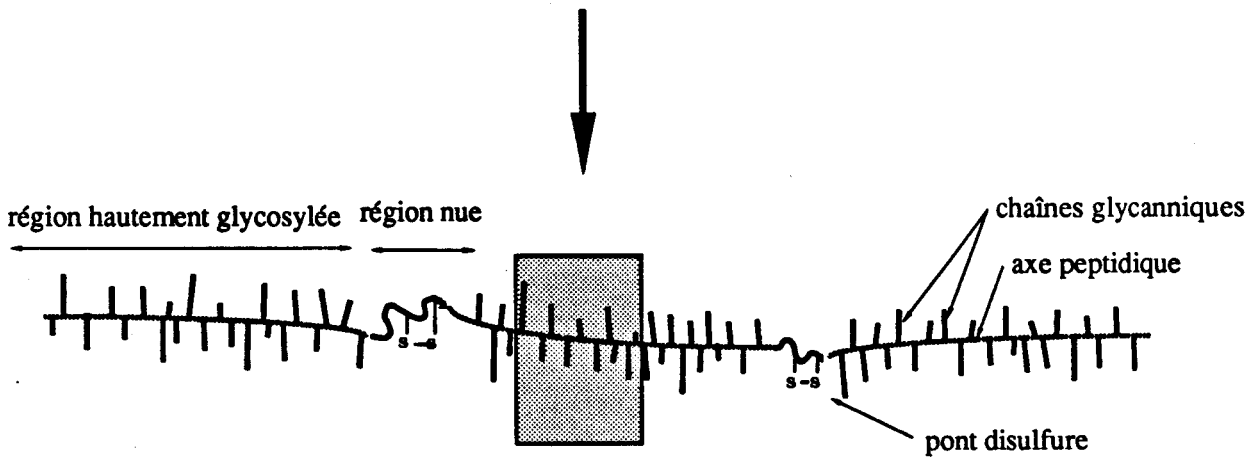
Récemment, l'anomalie génique responsable de la mucoviscidose a été découverte : le gène impliqué, situé sur le chromosome 7, code pour une glycoprotéine apparentée à la vaste famille des "P-glycoprotéines" transmembranaires intervenant dans les transports d'ions, de sucres ou de nucléotides (143). Cette protéine a été appelée CFTR pour "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator". Des travaux récents ont suggéré que cette protéine pourrait être un canal chlorure ou une protéine de régulation du transport des ions chlorure (1, 70).

La surinfection bronchique rencontrée dans la mucoviscidose est très particulière. Elle est due à un nombre limité d'espèces bactériennes dont les deux principales sont *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus* est habituellement présent à l'état initial de l'infection tandis que *P. aeruginosa*, ou bacille pyocyanique, apparaît plus tard. Cette infection entraîne, après plusieurs années, une insuffisance respiratoire qui est responsable de 90 % des décès des sujets atteints de mucoviscidose (42, 46, 58). Le mécanisme de la colonisation bactérienne n'est pas totalement élucidé mais quelques données suggèrent un rôle possible des mucines dans la pathogénie.

Les mucines, qui constituent les macromolécules les plus caractéristiques des sécrétions muqueuses, sont des glycoprotéines de haute masse moléculaire composées de 70 à 80 % de sucres. Elles comportent des régions hautement glycosylées et des régions nues ou faiblement glycosylées sensibles à l'action des protéases (fig. 1). Les chaînes glycaniques des mucines sont composées de L-fucose, D-galactose, N-acétylgalactosamine (GalNAc), N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide sialique et peuvent être sulfatées. Elles sont liées à l'axe peptidique par des liaisons O-glycosidiques alcali-labiles entre un résidu de GalNAc et un résidu de sérine ou de thréonine (146) (fig. 1).



Aspect des mucines bronchiques en microscopie electronique



Modèle de structure des mucines bronchiques

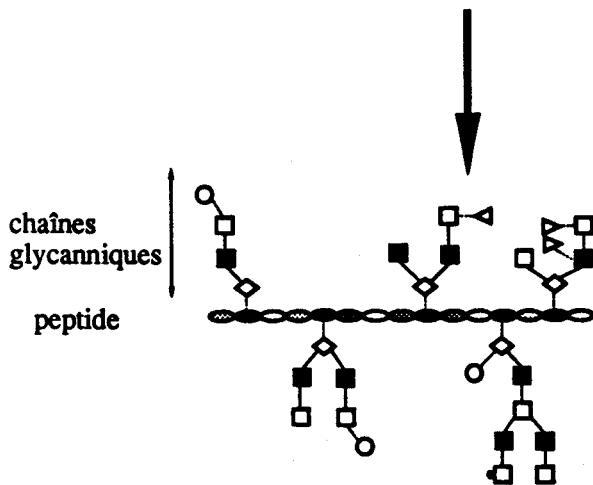


Figure 1 : Représentation schématique des mucines.

*Chose.com*

Par protéolyse des mucines, on peut préparer les régions hautement glycosylées, ou glycopeptides, qui peuvent être séparées en plusieurs fractions en fonction de leurs caractères d'acidité ("neutres", principalement sialylées ou principalement sulfatées) (87).

Récemment, Barash et coll. (6) ont montré que les anomalies des mouvements ioniques rencontrées dans la mucoviscidose, n'intéressaient non seulement les membranes plasmiques mais aussi les membranes de certains compartiments intracellulaires. De telles anomalies pourraient alors perturber les réactions post-traductionnelles qui se déroulent dans ces compartiments, par exemple les réactions de glycosylation ou de sulfatation. Dès lors on peut se demander s'il n'existerait pas au niveau des mucines bronchiques d'enfants atteints de mucoviscidose, des anomalies faisant apparaître des structures responsables de la colonisation par *P. aeruginosa*.

Ramphal et coll. ont observé par microscopie électronique que *P. aeruginosa* adhère au mucus recouvrant l'épithélium respiratoire de Souris (130) et que les mucines pouvaient jouer un rôle dans l'adhésion du bacille pyocyanique (131). Plus récemment, il a été montré que *P. aeruginosa* adhère aux glycopeptides "neutres" ou principalement sialylés des mucines bronchiques humaines et non aux glycopeptides principalement sulfatés (136).

Une étude précise de l'interaction des mucines bronchiques avec *P. aeruginosa* a donc été entreprise afin de tenter d'expliquer la prédominance de cette bactérie dans la mucoviscidose. Cependant, au niveau bronchique, cette recherche s'est avérée délicate en raison de possibles phénomènes de dégradation des mucines. En effet, Houdret et coll. (60) ont montré que les mucines purifiées à partir d'expectorations présentaient une certaine dégradation due à l'infection par *P. aeruginosa*. De même, Rose et coll. (145) ont observé que les mucines respiratoires de patients atteints de mucoviscidose étaient, en raison de leur dégradation, de plus petite taille que celles provenant d'individus normaux.

Dans le but de définir le tropisme de *P. aeruginosa* pour les parties glycaniques des mucines, il aurait été intéressant d'étudier des sécrétions bronchiques non infectées. Malheureusement, les cas de mucoviscidose s'accompagnant d'une hypersécrétion bronchique non infectée sont rares.

Une autre approche a été imaginée, en se fondant sur la réflexion suivante : si une anomalie de la glycosylation des mucines est la cause de la prédominance de *P. aeruginosa* dans les sécrétions bronchiques, cette anomalie devrait être générale

et toucher toutes les mucines sécrétées. C'est ainsi que nous avons choisi d'étudier les mucines salivaires de malades atteints de mucoviscidose puisque les sécrétions salivaires semblent, contrairement au mucus bronchique de ces malades, peu infectées.

Le travail que nous avons réalisé comprend quatre parties.

(i) Dans un premier temps, nous avons comparé les **compositions chimiques des glycopeptides de mucines salivaires** isolés chez des patients atteints de mucoviscidose et chez des sujets témoins et étudié **l'affinité de ces glycopeptides pour *P. aeruginosa***.

(ii) Etant donné le peu de renseignements existant sur la structure des mucines salivaires, nous avons entrepris **une caractérisation des chaînes glycaniques de mucines salivaires** de patients atteints de mucoviscidose et d'individus normaux.

(iii) La grande hétérogénéité des chaînes glycaniques de mucines salivaires et les faibles rendements en oligosaccharides représentant un obstacle considérable à l'étude directe de l'interaction des chaînes glycaniques de mucines avec *P. aeruginosa*, nous avons modifié notre approche. **L'utilisation de néoglycolipides**, fabriqués à partir d'oligosaccharides de lait et présentant des grandes analogies structurales avec les chaînes glycaniques de mucines déjà connues, nous a permis de définir des sites glycaniques reconnus par *P. aeruginosa*.

(iv) En fonction de ces données, nous avons entrepris la mise en évidence et la **caractérisation de la (ou des) adhésine(s) de *P. aeruginosa*** impliquée(s) dans la reconnaissance des mucines.

La présentation des travaux personnels sera précédée tout d'abord d'une revue traitant des phénomènes d'adhésion bactérienne et en particulier du problème de l'adhésion de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose et ensuite d'un bref résumé des connaissances actuelles sur les mucines salivaires humaines.



**CONNAISSANCES ACTUELLES SUR  
LE MECANISME MOLECULAIRE  
D'ADHESION**

**PROBLEME POSE PAR *PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA* DANS LA MUCOVISCIDOSE**

A l'état physiologique, la muqueuse bronchique humaine, qui se situe à l'interface entre le milieu extérieur et les tissus sous-jacents, est protégée des agressions bactériennes par un mécanisme de défense complexe composé d'éléments cellulaires et d'une barrière de mucus comprenant des molécules sécrétées ou transsudées (fig. 2). Outre la défense immunitaire (lymphocytes, IgA de sécrétion) et cellulaire (macrophages, neutrophiles), des protéines à effets bactéricides (lysozyme) ou ferriprives (bronchotransferrine) peuvent aussi intervenir (140). Des inhibiteurs de protéases tel que le Mucus Proteinase Inhibitor (MPI), et l' $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) pourraient aussi jouer un rôle dans la défense antibactérienne, mais leur fonction exacte reste à déterminer. Cette défense locale est complétée par l'action du système mucociliaire (27) dans lequel interviennent les mucines et qui élimine mécaniquement les particules et bactéries inhalées en les faisant remonter jusqu'au pharynx où elles sont normalement dégluties. Lorsqu'une infection se développe, elle est le plus souvent le fait d'une anomalie de ces systèmes locaux de défense.

Un certain nombre d'études ont tenté d'expliquer le mécanisme moléculaire de l'infection d'une muqueuse et un concept général s'est peu à peu dégagé (3, 40). Quatre événements successifs seraient nécessaires à l'infection de l'hôte :

- (i) Une **association** entre l'agent infectieux et l'hôte : c'est une interaction non spécifique et réversible traduisant la proximité du germe et de la muqueuse ;
- (ii) une **adhésion** correspondant à un attachement spécifique et irréversible de la bactérie à l'hôte ;
- (iii) une **colonisation**, c'est-à-dire une multiplication du germe, dans la mesure où la bactérie trouve les nutriments nécessaires à sa croissance ;
- (iv) une **invasion** et une dissémination de l'agent infectieux qui traverse la muqueuse pour atteindre la circulation sanguine.

L'étape d'adhésion du micro-organisme aux structures de l'hôte représente une étape clef pour l'installation de l'infection (8, 9, 117, 141). Comment le germe pathogène adhère-t-il à la muqueuse de son hôte? Quelles sont les structures bactériennes impliquées et les sites reconnus? Ce sont les questions auxquelles il faut répondre pour comprendre cette étape importante de la pathogénie.

Quel que soit le type d'infection étudié, il est maintenant établi que le mécanisme moléculaire de l'adhésion fait toujours intervenir les mêmes protagonistes : d'une part des **adhésines** bactériennes de surface et d'autre part des **récepteurs** de l'hôte, reconnus par ces adhésines.

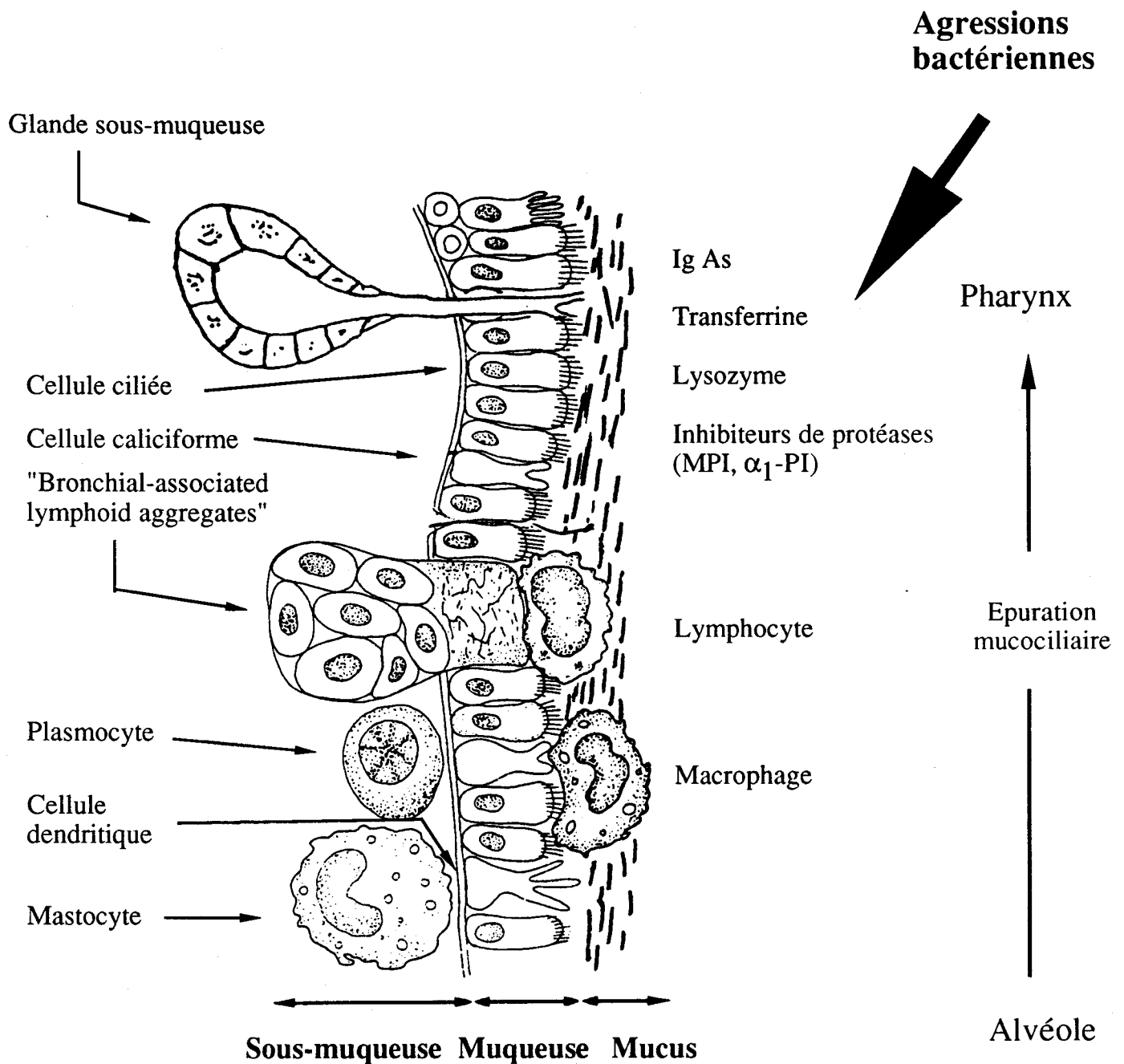


Figure 2 : Représentation schématique de la muqueuse bronchique et de son système de défense (d'après H. Y. Reynolds (140)).

## A. MECANISME GENERAL DES INTERACTIONS ADHESINE-RECEPTEUR

### A. I. Les adhésines bactériennes

Les adhésines représentent une vaste famille regroupant toutes les structures de surface bactérienne (protéines, glycoprotéines, lipides, polysaccharides...) permettant à la bactérie d'adhérer à la surface de l'hôte.

#### A. I. 1. Adhésines de nature protéique

Un certain nombre d'adhésines sont organisées en filaments protéiques hérissant la surface bactérienne. Ces adhésines appelées fimbriae ou pili sont surtout présentes chez les bactéries Gram négatif. Elles sont formées de sous-unités protéiques (piline ou fimbrine) de 15 à 26 kDa suivant les espèces. Ces adhésines fibrillaires semblent posséder des activités de type lectine (124). Les plus étudiées sont les fimbriae de *Escherichia coli*. Pour ce germe il est décrit, suivant les souches, au moins trois types de pili ayant chacun une spécificité particulière. Les pili de type 1 reconnaissent le D-mannose appartenant à des glycoprotéines, les fimbriae de type Pap (ou P) reconnaissent le disaccharide Gal  $\alpha$ 1,4 Gal de certains glycolipides, et les fimbriae X sont spécifiques de structures sialylées (NeuAc  $\alpha$ 2,3 Gal) (9, 92). Cette énumération, non exhaustive, souligne bien les diverses spécificités rencontrées chez ces protéines fibrillaires. Pour les autres germes pathogènes Gram négatif, une telle spécificité n'a pu encore être déterminée.

Des adhésines protéiques non fibrillaires de la membrane bactérienne peuvent aussi interagir avec l'hôte. C'est le cas notamment d'une protéine membranaire de *Staphylococcus aureus* de 210 kDa qui reconnaît la partie N-terminale de la fibronectine (43). Par ailleurs, l'adhésion de *Streptococcus sanguis* à des glycopeptides salivaires de type mucine se fait grâce à une protéine membranaire (SSP5) de 210 kDa (31). Contrairement aux adhésines fibrillaires, il n'a pas été mis en évidence de communautés structurales entre toutes les adhésines membranaires décrites jusqu'à présent dans la littérature.

Des protéines bactériennes sécrétées sont aussi décrites comme adhésines. Ainsi chez *Bordetella pertussis*, agent responsable de la coqueluche, deux protéines sécrétées, l'hémagglutinine filamenteuse et une toxine, interviennent

dans l'adhésion du germe aux cellules respiratoires ciliées humaines. Le complexe formé par ces deux protéines s'associe d'une part aux cellules ciliées et d'autre part à la bactérie, formant ainsi un pont entre la bactérie pathogène et son hôte (167).

#### A. I. 2. Adhésines non protéiques

##### a. L'acide lipotéichoïque

L'acide lipotéichoïque (LTA) est un composant membranaire de la plupart des germes Gram positif. La molécule est composée d'une part de l'acide téichoïque qui est un polymère composé de résidus de glycérol reliés par des liaisons phosphodiesters et d'autre part d'une "queue" lipidique. Le glycérol peut être substitué par des acides aminés ou par des chaînes glycaniques comprenant du glucose, de la N-acétylglucosamine ou de la N-acétylgalactosamine. La nature et l'étendue des substitutions dépendent des espèces bactériennes. Le LTA est le plus souvent ancré dans la membrane bactérienne par sa partie lipidique mais c'est la forme libre qui présente les propriétés d'adhésine. En effet, chez les streptocoques de groupe A, notamment *Streptococcus pyogenes*, le LTA forme un complexe avec une protéine membranaire de la bactérie (protéine M) et interagit grâce à sa partie hydrophobe avec la fibronectine qui elle-même adhère à l'épithélium. Le LTA crée ainsi un pontage entre la bactérie et son hôte (8, 39).

##### b. La capsule exopolysaccharidique

De nombreuses eubactéries Gram positif ou Gram négatif possèdent à leur surface une capsule polysaccharidique composée d'unités saccharidiques répétitives et le plus souvent chargées négativement. Cette capsule représente une gangue protectrice contre les anticorps, la phagocytose ou les antibiotiques (30). L'intervention de l'exopolysaccharide comme adhésine a été plusieurs fois discutée mais n'a jamais été démontrée. En 1982, Christensen et coll. (26) observent que la capsule de *Staphylococcus epidermis* module l'adhérence du germe à des surfaces inertes. De leur côté, Costerton et coll. (30) montrent que l'exopolysaccharide permet non seulement l'adhésion de la bactérie à l'hôte mais aussi l'agrégation des bactéries entre elles pour former des microcolonies.

L'exopolysaccharide peut être considéré comme une adhésine interagissant avec son hôte de manière non spécifique et faisant intervenir des liaisons ioniques ou hydrophobes. On voit que le terme adhésine a une signification très vaste et

n'est pas limité aux structures bactériennes reconnaissant spécifiquement un site récepteur.

### A. I. 3. Expression des adhésines

L'expression des adhésines peut être modulée par les conditions de croissance *in vivo* et *in vitro*. Ainsi les adhésines des souches entérotoxiques de *E. coli* K99 et K88 s'expriment *in vivo* dans l'intestin et *in vitro* à 37°C ; elles sont produites en moins grand nombre à 18°C (62). De même, l'expression des fimbriae de type 1 de *E. coli* diminue lorsque la bactérie est cultivée sur milieu solide, par rapport à la culture en milieu liquide (3). Il est aussi montré que les bactéries invasives perdent l'expression de leurs fimbriae lorsqu'elles se retrouvent dans le sang (3). On voit donc que l'expression des adhésines de surface est modulée par l'environnement dans lequel se trouve la bactérie.

L'apport récent de la biologie moléculaire a permis de définir un modèle complexe de régulation susceptible d'expliquer ces phénomènes d'adaptation. Le modèle présenté par Ronson et coll. fait intervenir une protéine sensible aux stimuli de l'environnement ("sensor component") qui relaie les informations à une protéine régulatrice ("regulatory component") activant les gènes nécessaires à la croissance dans un environnement donné (144). Ce système permet de relier la présence ou l'absence de certaines protéines membranaires à des conditions de culture particulières (32). Le schéma proposé par Ronson et coll. (144) semble une hypothèse intéressante pour expliquer l'expression des adhésines en fonction de l'environnement.

## A. II. Les récepteurs

Les cellules épithéliales, le glycocalyx et les sécrétions qui représentent la barrière de protection des tissus sous-jacents, sont autant de sites de fixation potentiels pour les germes pathogènes. La nature moléculaire des récepteurs reconnus par les adhésines bactériennes est très variée. Grâce à leur abondance au sein des muqueuses, les structures glycaniques appartenant à des glycolipides ou à des glycoprotéines, sont préférentiellement reconnues par les adhésines bactériennes, mais des protéines peuvent aussi jouer un rôle de récepteur.

## A. II. 1. Les récepteurs glycaniques

### a. Les glycolipides

Les glycolipides sont des molécules amphipathiques formées d'une partie lipidique (céramide) ancrée dans la membrane plasmique et d'une partie glycanique orientée vers l'extérieur de la cellule et accessible aux toxines ou aux adhésines bactériennes.

Le développement de protocoles de purification efficaces (68) et de techniques d'adhésion directe performantes (53,69), a permis de caractériser très précisément les sites récepteurs glycaniques d'un certain nombre de germes. Krivan et coll. ont montré, par une étude très complète effectuée sur 14 espèces bactériennes responsables de pneumonies (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*...) que le site minimum reconnu par la majorité de ces germes était le disaccharide GalNAc  $\beta$ 1,4 Gal (83). De leur côté, Bock et coll. ont étudié l'adhésion d'une souche d'*E. coli* sur plus de 30 glycolipides d'origines diverses (15). Cette étude leur a permis de présenter la séquence Gal  $\alpha$ 1,4 Gal comme récepteur de la souche d'*E. coli* responsable des infections du tractus urinaire.

Les techniques d'adhésion proposées par Karlsson et coll. (53, 69) permettent d'étudier l'adhésion sur des glycolipides purs ne présentant qu'un seul type de chaîne glycanique. Par conséquent, la caractérisation du site récepteur est très rapide.

### b. Les glycoprotéines

Lorsque l'adhésion bactérienne se produit sur une glycoprotéine, il est toujours difficile d'établir si c'est la partie glycosylée ou la partie protéique qui est reconnue. De plus, la plupart des glycoprotéines possèdent plusieurs chaînes glycaniques différentes et, si le site récepteur est glycanique, il devient difficile de le caractériser par des techniques d'adhésion directe. La caractérisation du récepteur glycanique des glycoprotéines a surtout été établie de manière indirecte par des expériences d'inhibition d'adhésion par des sucres simples et complexes ou par action d'enzymes. Roberts et coll. (142) ont réussi à déterminer le site récepteur de *Mycoplasma pneumoniae* au sein des glycoprotéines par une succession de techniques d'adhésion directe et d'inhibition d'adhésion. Malheureusement, ces techniques ne suffisent pas toujours à déterminer la structure précise du site récepteur.

Il serait techniquement possible de libérer les chaînes glycaniques, de les purifier et de les tester en inhibition mais ce genre d'expérience nécessite de travailler avec une grande quantité de glycoprotéines. Cette approche est donc très peu utilisée.

Il y a beaucoup à espérer des techniques récentes qui tentent de reproduire les méthodes utilisées pour les glycolipides. Stoll et coll. (160) ont développé une méthode de couplage des oligosaccharides à une structure lipidique, de manière à obtenir des néoglycolipides. La technique développée par Magnani et coll. (101, 102) consiste à immobiliser des chaînes glycaniques sur plaque de silice après chromatographie. Lorsque les oligosaccharides sont immobilisés, il est alors possible d'étudier l'adhésion bactérienne. Il faut noter que ces techniques nécessitent des chaînes glycaniques ayant leur fonction réductrice libre. Cela limite donc leur utilisation aux N-glycannes puisque pour l'instant il est difficile de purifier les O-glycannes sans réduction.

#### A. II. 2. Les récepteurs protéiques

Il est de plus en plus évident que les protéines extracellulaires responsables de l'adhésion cellulaire jouent un rôle majeur dans l'interaction entre l'hôte et la bactérie.

Dans le cas de la fibronectine, au moins trois mécanismes distincts d'adhésion de germes Gram positif ont été décrits (21) : *Streptococcus pyogenes* se fixe à la fibronectine par l'intermédiaire de l'acide lipotéichoïque, *S. aureus* adhère à la partie N-terminale de cette protéine par l'intermédiaire d'une adhésine de surface, et enfin une association de type lectine-sucre a été décrite entre *S. aureus* et la partie glycanique de la fibronectine. L'adhésion des germes Gram négatif est beaucoup moins connue mais il faut quand même noter que *E. coli* et des souches de *Salmonella* sont capables d'adhérer à la région N-terminale de la fibronectine. On peut aussi citer le cas de *Treponema pallidum*, l'agent responsable de la syphilis, qui semble se fixer sur la séquence RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) connue comme site d'adhésion cellulaire (163).

Certaines glycoprotéines de la membrane basale se trouvent anormalement exposées lors de l'altération des cellules épithéliales. Une de ces glycoprotéines, la laminine, est capable de fixer *E. coli* (158), *S. aureus* (97) et divers streptocoques (21). Pour l'instant deux sites d'adhésion distincts sont déterminés sur la partie protéique (21, 158).



Des glycoprotéines de la matrice extracellulaire peuvent aussi jouer un rôle de récepteur bactérien. C'est le cas des collagènes de types I à IV qui présentent des séquences peptidiques reconnues par *S. aureus* (159).

Cette énumération non exhaustive d'adhésines bactériennes et de récepteurs eucaryotes a permis d'illustrer la grande variété de molécules impliquées dans la relation hôte-bactérie. Dans la suite de cette revue, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au mécanisme d'adhésion de *P. aeruginosa*.

## B. ADHESION DE *P. AERUGINOSA* DANS LA MUCOVISCIDOSE

Dans le cas de la mucoviscidose, peut-on expliquer la particularité des infections, et notamment l'infection à *P. aeruginosa*, par un mécanisme d'adhésion spécifique du germe chez le malade ?

### B. I. Microbiologie des infections dans la mucoviscidose

#### B. I. 1. Flore bactérienne observée dans la mucoviscidose

L'infection bronchopulmonaire est un problème majeur chez les patients atteints de mucoviscidose. Comme il a déjà été précisé dans l'introduction, on observe au cours de cette maladie une évolution des germes présents (42, 46). *Staphylococcus aureus*, même s'il était beaucoup plus répandu avant l'ère des antibiotiques, est très souvent le pathogène initial chez la plupart des patients (58). *Haemophilus influenzae* est aussi isolé très tôt dans les expectorations de malades, mais toujours associé à d'autres germes. Il s'installe très rarement de manière chronique. En quelques mois, voire quelques années, la proportion des malades infectés par *S. aureus* diminue tandis que simultanément apparaissent *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas cepacia*. Malgré la faible proportion de malades infectés actuellement par *P. cepacia*, un intérêt grandissant est porté à ce germe. En effet, les infections à *P. cepacia*, de plus en plus répandues dans certains pays comme les Etats-Unis, s'accompagnent d'un déclin rapide des fonctions respiratoires des malades infectés (49). La présence de virus (RSV, influenza virus, adenovirus), de *Chlamydia* et de *Mycoplasma* est observée dans 19% des épisodes infectieux aigus touchant les malades souffrant de mucoviscidose et on a suggéré une relation entre ces infections non bactériennes et la présence de *P. aeruginosa* (126). Enfin, des souches particulières de *E. coli*, présentant un phénotype mucoïde, sont identifiées chez 11,8% des malades (100).

### B. I. 2. *Pseudomonas aeruginosa* et mucoviscidose

*P. aeruginosa* est très rarement isolé à l'état initial de l'infection. L'apparition de *P. aeruginosa* pourrait être attribuée à l'efficacité de l'antibiothérapie dirigée contre *S. aureus* (46, 52), à une dégradation causée par *S. aureus* qui prédisposerait l'arbre respiratoire à une colonisation par *P. aeruginosa* (52) ou encore à la libération par *P. aeruginosa* de substances anti-*S. aureus* (99).

Les souches de *P. aeruginosa* isolées de malades atteints de mucoviscidose infectés chroniquement, présentent en culture un phénotype particulier, très rare dans l'environnement et dans les autres infections à *P. aeruginosa* (57). Ce phénotype, décrit pour la première fois par Dogget et coll. en 1964 (33), est appelé "mucoïde" par Wabha et coll. (171). Linker et Jones montrent alors que le caractère mucoïde est dû à un polymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique, rencontré fréquemment chez les algues (96). Cet exopolysaccharide anionique, l'alginate, forme une gangue muqueuse autour des bactéries qui s'associent les unes aux autres pour former des microcolonies au niveau de l'arbre respiratoire (85). Ce phénotype est très instable *in vitro* et souvent une souche mucoïde isolée chez un malade peut perdre son caractère mucoïde après plusieurs repiquages et devenir rugueuse ou non-mucoïde (11, 107).

Il est maintenant reconnu que c'est d'abord une souche non-mucoïde de *P. aeruginosa* qui colonise les patients atteints de mucoviscidose (11, 57). Après avoir infecté les malades, certaines de ces souches acquièrent le phénotype mucoïde puis deviennent prédominantes dans le tractus respiratoire. Un certain nombre d'études suggèrent que ce phénotype mucoïde est sélectionné par l'environnement existant dans la bronche des malades (80, 81, 107, 157, 162). Il est par exemple montré *in vitro* qu'une limitation en phosphate ou nitrate du milieu de culture (32) ou encore une forte osmolarité (12) permettent de sélectionner le phénotype mucoïde. Par ailleurs, l'intervention d'un phage comme activateur de la synthèse de l'alginate a aussi été envisagée (106).

Le mécanisme moléculaire responsable de ce changement de phénotype est sur le point d'être élucidé. En effet, DeVault et coll. (32) ont découvert que les gènes de synthèse de l'alginate sont régulés, suivant le modèle présenté par Ronson et coll. (144), par une classe de protéines sensibles aux stimuli de l'environnement. Les sécrétions bronchiques des malades atteints de mucoviscidose activeraient des protéines de surface qui stimulent des protéines de régulation activant le gène de la GDP-mannose déshydrogénase, enzyme clef de la

synthèse de l'alginate. Il reste maintenant à déterminer ce qui, *in vivo*, dans les sécrétions de malades atteints de mucoviscidose, est capable de sélectionner le phénotype mucoïde.

Lorsque *P. aeruginosa* a colonisé l'arbre respiratoire, son éradication est presque impossible et on observe une détérioration progressive des fonctions pulmonaires. L'infection à *P. aeruginosa* est donc très étroitement liée à la gravité de la maladie. Il est par conséquent primordial d'élucider le mécanisme d'adhésion et de colonisation de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose, pour imaginer de nouveaux protocoles thérapeutiques permettant l'augmentation de l'espérance de vie des malades.

## **B. II. Les modèles d'étude de l'adhésion de *P. aeruginosa***

Pour étudier le mécanisme moléculaire de l'adhésion de *P. aeruginosa*, deux approches techniques ont été développées. La première consiste à étudier l'adhésion sur des modèles cellulaires et la seconde à étudier l'adhésion sur les mucines respiratoires.

### **B. II. 1. Adhésion de *P. aeruginosa* sur les cellules**

Un certain nombre d'auteurs ont entrepris l'étude de l'adhésion sur les cellules de la muqueuse respiratoire, l'hypothèse étant que l'adhésion à l'épithélium respiratoire est l'étape préalable à toute colonisation.

#### **a. Adhésion sur les cellules buccales humaines (Tableau 1)**

Pourquoi étudier l'adhésion aux cellules buccales pour élucider le mécanisme infectieux ayant lieu au niveau du tractus respiratoire ?

L'idée couramment développée est qu'il faut une colonisation préliminaire de la cavité orale pour qu'il y ait infection des bronches : après adhésion au sein de la cavité orale, les bactéries seraient aspirées vers les voies respiratoires inférieures pour coloniser le tractus. Cette hypothèse est confortée par les travaux préliminaires de Johanson et coll.(65) qui montrent qu'une colonisation des voies aériennes supérieures par des bactéries Gram négatif est très souvent liée, *in vitro*, à une augmentation de l'adhésion des bactéries aux cellules buccales de ces sujets. De plus, Lindemann et coll. (94), ainsi que Komiyama et coll. (76) ont observé la

Tableau 1 : Adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules buccales et trachéales humaines

Modèle cellulaire	Observations	Références
Cellules buccales humaines	L'adhésion de <i>P. aeruginosa in vitro</i> aux cellules buccales est corrélée à une colonisation du tractus respiratoire.	(65)
	L'augmentation d'adhésion est liée à une diminution de la fibronectine de la surface cellulaire.	(161)
	L'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> est plus importante sur les cellules de patients atteints de mucoviscidose que sur les cellules témoins.	(174)
	Les pili interviennent dans l'adhésion aux cellules.	(175)
	Il existe deux types de récepteurs cellulaires pour <i>P. aeruginosa</i> au niveau des cellules buccales.	(109)
	Des glycoprotéines de la surface cellulaire sont reconnues par les pili de <i>P. aeruginosa</i> .	(36)
Cellules buccales et trachéales humaines	L'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> est plus importante sur les cellules ciliées que sur les cellules buccales.	(116)
	La région C-terminale des pilines intervient dans la reconnaissance cellulaire.	(35, 37, 61, 91)
	Le pH intervient dans l'adhésion.	(120)
	L'alginate se fixe sur un récepteur cellulaire sensible à la trypsine.	(34)
Cellules trachéales humaines	<i>P. aeruginosa</i> se fixe sur les cils des cellules trachéales.	(4, 41)

présence de *P. aeruginosa* à différents endroits de la cavité buccale de patients atteints de mucoviscidose mais non chez les sujets témoins. Ces résultats, même s'il sont discutables, démontrent l'affinité de *P. aeruginosa* pour la cavité orale. Ces arguments en faveur d'un rôle des cellules buccales dans l'infection respiratoire, associés à la facilité d'obtention de ces cellules, ont suscité un large développement des expériences d'adhésion sur ce type de cellules (Tableau 1).

La technique consiste à collecter les cellules par raclage de la cavité buccale puis, après plusieurs lavages, à les incuber avec des bactéries radiomarquées. Le mélange est filtré pour séparer les bactéries non fixées des cellules associées ou non aux bactéries.

Une grande partie des études d'adhésion aux cellules buccales a été menée par l'équipe de Woods. Dès 1980, ils observent que *P. aeruginosa* adhère significativement plus sur les cellules buccales d'individus atteints de mucoviscidose que sur celles de sujets témoins (174). Cette augmentation d'adhésion est corrélée à une diminution de fibronectine à la surface cellulaire, elle-même liée à une augmentation des protéases salivaires. La corrélation entre une forte adhésion de *P. aeruginosa* et une activité protéasique importante a été rapportée à plusieurs reprises (127,148).

D'importantes indications sur le mécanisme moléculaire de l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les cellules ont pu être obtenues :

- la partie C-terminale de la sous-unité des fimbriae est impliquée dans la reconnaissance cellulaire (36, 37, 61, 91),
- les récepteurs de *P. aeruginosa* à la surface des cellules sont de nature glycoprotéique (36,109).

#### b. Adhésion sur des cellules trachéales humaines (Tableau 1)

Les expériences d'adhésion sur cellules trachéales humaines sont beaucoup moins nombreuses. Cela est en grande partie dû à la difficulté de prélèvement de ces cellules, qui nécessite une bronchoscopie sous anesthésie locale (35) ou générale (41, 116).

Néanmoins, Niederman et coll. montrent une adhésion plus forte sur les cellules trachéales que sur les cellules buccales et suggèrent un mécanisme d'adhésion différent suivant ces deux types de cellule (116). Cette distinction entre les deux types de cellules n'est pas retrouvée par Doig et coll. qui ont examiné l'adhésion de l'alginate (34) et des pili (35). Par conséquent, la différence d'adhésion observée par Niederman ne semble pas s'expliquer par un mécanisme faisant intervenir les fimbriae ou l'alginate. Franklin et coll. (41) quant à eux, ont

observé par microscopie électronique, que le site d'adhésion de *P. aeruginosa* se situait au niveau des cils de la cellule trachéale.

Le principal inconvénient des techniques employant les cellules buccales ou trachéales est qu'elles ne tiennent pas compte de la polarité des cellules. En effet, le contact bactéries - cellules se fait en suspension et par conséquent l'adhésion peut se faire aussi bien sur la face apicale que sur les faces latérales ou basales. Les résultats obtenus *in vitro* sont donc difficilement transposables *in vivo*.

### c. Adhésion sur des cellules épithéliales humaines en culture (Tableau 2)

L'essor des techniques de culture cellulaire a permis le développement de modèles d'adhésion de *P. aeruginosa* sur des cellules en culture. L'intérêt de tels modèles est d'étudier l'adhésion sur des cellules métaboliquement actives.

Saiman et coll. ont développé une culture de cellules de polypes nasaux d'enfants atteints de mucoviscidose (148). Des critères morphologiques, immunologiques et électrophysiologiques ont permis de caractériser la muqueuse épithéliale. Les bactéries radiomarquées sont ajoutées aux cellules respiratoires confluentes. Après un très léger lavage, la monocouche cellulaire ainsi que les bactéries fixées sont solubilisées par un détergent et la radioactivité du mélange, correspondant aux bactéries adhérentes, est mesurée. Saiman et coll. ont montré que l'adhésion de *P. aeruginosa* et de *P. cepacia* sur les cellules en monocouche pouvait être en partie inhibée par un anticorps monoclonal anti-fimbriae. Ces résultats ont permis de proposer l'emploi des sous-unités de pili comme immunogènes dans un vaccin anti-*P. aeruginosa*.

Récemment, Plotkowski et coll. ont mis au point une technique de culture d'explants de polypes nasaux (128). Ce modèle leur a permis d'examiner l'adhésion de *P. aeruginosa* sur des cellules respiratoires à différentes étapes de différenciation. Ils ont observé, par microscopie électronique, que l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les cellules migratrices, c'est-à-dire non encore différenciées, était significativement plus importante que sur les cellules ciliées ou non ciliées. Ils ont présenté leur culture d'explants comme un modèle d'épithélium respiratoire altéré en voie de régénération où apparaissent des cellules migratrices. Ce modèle se rapprocherait de l'état de l'épithélium respiratoire au moment de l'infection.

Tableau 2 : Adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules humaines en culture

Modèle cellulaire	Observations	Références
Cellules de polype nasal en culture	Un anticorps anti-pili est capable d'inhiber l'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. cepacia</i> aux cellules de patients atteints de mucoviscidose.	Saiman et coll. (147)
Explants de polype nasal en culture	L'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> est plus importante sur les cellules indifférenciées que sur les cellules ciliées de l'épithélium.	Plotkowski et coll. (128)
Lignée de pneumocytes de type II (A 549)	Il existe une classe d'adhésines non-piliées chez <i>P. aeruginosa</i> . <i>P. aeruginosa</i> est capable de survivre dans le compartiment intracellulaire.	Chi et coll. (25)



Chi et coll. ont étudié l'adhésion de *P. aeruginosa* sur la lignée cellulaire A 549 issue d'un carcinome pulmonaire humain et présentant des caractéristiques de pneumocytes de type II (25). Ils ont observé qu'un certain nombre de *P. aeruginosa*, ayant adhéré à la surface cellulaire, sont internalisés et survivent à l'intérieur de la cellule sans être détruits par les enzymes intracellulaires. Cette découverte originale leur a permis de proposer une hypothèse expliquant la chronicité de l'infection à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose. Ils ont aussi décrit l'intervention d'une adhésine non piliée dans la reconnaissance cellulaire. Cela fut possible grâce à une stratégie nouvelle faisant appel à la biologie moléculaire, qui consiste à éliminer l'expression des gènes responsables de la synthèse des adhésines et à étudier ensuite l'adhésion de la souche mutante. Ils ont ainsi montré qu'un mutant non pilié de *P. aeruginosa* était capable d'adhérer aux cellules.

#### d. Adhésion sur les épithéliums respiratoires d'animaux (Tableau 3)

Les modèles d'adhésion sur épithélium respiratoire d'animaux ont été proposés comme alternative aux techniques d'adhésion sur cellules buccales. L'intérêt de ces modèles est de permettre l'adhésion sur un épithélium entier et non plus sur des cellules individuelles.

Les modèles employés diffèrent suivant les auteurs par l'origine animale de l'épithélium et par la méthode d'adhésion utilisée. Ramphal et coll. ont travaillé exclusivement avec des **épithéliums de trachée de Souris**. Par ailleurs, ils sont partis de l'observation clinique que *P. aeruginosa* colonise préférentiellement le tractus respiratoire de patients présentant une altération de l'épithélium. Ils ont donc utilisé comme modèle l'épithélium de trachée de Souris altéré par de l'acide dilué (130). La mesure d'adhésion consiste à incuber des pièces de tissus trachéaux avec les bactéries, à les fixer au glutaraldéhyde puis à les traiter à l'or palladium pour les observer en microscopie électronique à balayage.

Comme pour les cellules buccales, les fimbriae et l'alginate interviennent dans l'adhésion de *P. aeruginosa* (132, 134). De plus, Ramphal et coll. ont observé une inhibition de l'adhésion par des gangliosides de cerveau de Boeuf et suggéré que les gangliosides de la surface cellulaire pouvaient jouer un rôle de récepteur de *P. aeruginosa* (133).

L'altération de l'épithélium préconisée par Ramphal avant toute mesure d'adhésion a été discutée par Marcus et coll. (104). Ces derniers considèrent que l'épithélium respiratoire des patients atteints de mucoviscidose n'est pas endommagé avant l'infection. Par conséquent, l'altération de la muqueuse avant

Tableau 3 : Adhésion de *P. aeruginosa* aux épithéliums respiratoires animaux

Modèle animal	Observations	Références
Epithélium trachéal de Souris	<i>P. aeruginosa</i> adhère à l'épithélium traité par de l'acide dilué.	Ramphal et coll. (130)
	<i>P. aeruginosa</i> adhère à l'épithélium par l'intermédiaire de pili.	Ramphal et coll. (132)
	L'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> est inhibée par des gangliosides.	Ramphal et coll. (133)
	Des anticorps anti-alginate inhibent l'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> .	Ramphal et coll. (134)
Epithélium trachéal de Hamster	L'adhésion des souches mucoïdes sur les cils de l'épithélium est supérieure à celle des souches non-mucoïdes.	Marcus et coll. (104)
Epithélium trachéal de Hamster, de Cobaye et de Souris	Une lectine associée à l'alginate pourrait expliquer l'adhésion de la souche mucoïde de <i>P. aeruginosa</i> .	Marcus et coll. (105)
Epithélium respiratoire de Grenouille	L'action de l'élastase leucocytaire sur l'épithélium augmente l'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> et provoque une hypersécrétion de mucus.	Plotkowski et coll. (127)
Cellules trachéales bovines en culture	L'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> est modulée par les pili mais aussi par d'autres adhésines. Les souches productrices de protéases sont les plus adhérentes.	Saiman et coll. (147, 148)

l'étude de l'adhésion ne leur semble pas nécessaire. Ils ont donc développé une technique d'adhésion sur épithélium intact.

Le modèle utilisé est celui des **explants trachéaux perfusés** adapté aux trachées de Hamster. La technique consiste à enrober l'épithélium trachéal d'un gel d'agarose en conservant intact l'intérieur de la trachée. La suspension bactérienne est alors introduite à l'intérieur de la trachée. Après quelques lavages, des fragments de trachée sont fixés puis préparés pour la microscopie électronique alors que d'autres sont homogénéisés et étalés sur boîtes de Petri pour quantifier les bactéries adhérentes. Marcus et coll. ont observé l'adhésion sur des épithéliums de trachée de Hamster (104), mais aussi de Cobaye et de Souris (105) et souligné le rôle de l'alginate dans le mécanisme d'adhésion : ils ont tout d'abord observé que les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* adhéraient 10 à 100 fois plus que les souches non mucoïdes et que l'adhésion des souches mucoïdes pouvait être inhibée par des sucres simples (GalNAc, Gal ou acide sialique). Ils ont ainsi suggéré l'intervention d'une lectine associée à l'alginate (105).

Plus récemment, un modèle d'adhésion sur **muqueuse de palais de Grenouille** a été développé par Plotkowski et coll. (127). Pour ce modèle, les auteurs ont tenté de recréer la situation de la muqueuse *in vivo* en la plaçant à l'interface entre l'air et le liquide. Brièvement, la muqueuse étalée sur filtre est placée de manière à ce que la face basale de la muqueuse soit en contact avec le milieu de culture et la partie apicale accessible aux bactéries. La détection de l'adhésion se fait classiquement par microscopie électronique à balayage.

Ce modèle a permis de montrer que l'action de l'élastase leucocytaire sur l'épithélium favorisait l'adhésion de *P. aeruginosa* et que cette adhésion n'était liée ni au pili, ni à l'alginate mais à une activité hémagglutinante interne importante. Plotkowski et coll. ont donc suggéré un nouveau mécanisme d'adhésion faisant intervenir les lectines internes de *P. aeruginosa* (117).

Saiman et coll. ont mis au point une technique d'adhésion sur **culture de cellules respiratoires bovines** (essentiellement trachéales) en **monocouche** (147, 148). L'intérêt d'un tel modèle est que les cellules sont métaboliquement actives et possèdent les caractéristiques des cellules épithéliales. Les principaux travaux sont effectués sur des cellules cultivées à partir de trachée bovine (la technique d'adhésion a été détaillée précédemment pour les cultures de cellules de polypes nasaux (B. II. 1. c.)). Il apparaît qu'une forte adhésion de *P. aeruginosa* nécessite la présence de pili mais aussi d'autres facteurs : Saiman et coll. ont

montré que des mutants isogéniques non piliés pouvaient aussi adhérer. Cette observation les a conduit à suggérer la présence d'une autre adhésine (148).

#### B. II. 2. Adhésion de *P. aeruginosa* sur les mucines (Tableau 4)

Toutes les techniques précédentes décrivent l'adhésion de *P. aeruginosa* à des modèles cellulaires. Or, *in vivo*, avant d'accéder à l'épithélium respiratoire, les bactéries doivent franchir la barrière mucociliaire, et plus particulièrement le mucus bronchique. Par conséquent, il est très important de connaître la relation de *P. aeruginosa* avec le mucus et les mucines bronchiques, afin de déterminer si la spécificité d'infection par *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose, n'est pas due à son interaction avec les mucines bronchiques.

Les principaux travaux concernant l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les mucines respiratoires ont été effectués par Ramphal et coll. En 1983, au cours de l'étude de l'adhésion de *P. aeruginosa* sur l'épithélium trachéal de Souris, Ramphal et coll. observent pour la première fois une adhésion de *P. aeruginosa* sur le mucus respiratoire (130). Quelques années plus tard, Marcus et coll. font la même observation sur l'épithélium de trachée de Hamster (104).

Par la suite, le développement d'une technique d'adhésion *in vitro* en plaque de microtitration (168) permet de confirmer l'affinité de *P. aeruginosa* pour les mucines et de caractériser les adhésines intervenant dans cette adhésion.

- Le rôle des fimbriae (pili) est établi par des expériences d'inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* par la forme purifiée des fimbriae et par des anticorps anti-pili (135). Il n'est pas possible pour l'heure de dire quelle(s) structure(s) est (sont) reconnue(s) au sein des mucines.

- Un rôle potentiel de l'alginate dans le mécanisme d'adhésion de *P. aeruginosa* est aussi suggéré : l'exopolysaccharide purifié augmente l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les mucines alors que les anticorps anti-alginate inhibent la fixation. L'alginate formerait donc un pontage entre les mucines et la bactérie mucoïde mais le mécanisme moléculaire en est pour l'instant inconnu (135).

- Plus récemment, la présence à la surface de *P. aeruginosa* d'autres adhésines capables de reconnaître les mucines respiratoires est envisagée : Ramphal et coll. montrent qu'une souche non-mucoïde n'exprimant pas le gène de structure des pilines adhère aussi bien que la souche sauvage sur les mucines respiratoires (137).

Tableau 4 : Historique de l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines

Date	Observations	Auteurs
1983	<i>P. aeruginosa</i> adhère aux filaments de mucus recouvrant l'épithélium de trachée de Souris.	Ramphal et coll. (130)
1983	L'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> à l'épithélium de trachée de Souris est inhibée par l'acide N-acétylneuraminique et des mucines trachéales de Rat.	Ramphal et coll. (131)
1984	<i>P. aeruginosa</i> se fixe sur les mucines trachéobronchiques.	Vishwanath et coll. (168)
1985	<i>P. aeruginosa</i> adhère aux filaments de mucus recouvrant l'épithélium de trachée de Hamster.	Marcus et coll. (104)
1985	Les récepteurs de <i>P. aeruginosa</i> au sein des mucines semblent être glycosylés.	Vishwanath et coll. (169)
1987	L'alginate et les pili sont décrits comme adhésines de <i>P. aeruginosa</i> pour les mucines.	Ramphal et coll. (135)
1989	Les glycopeptides de mucines respiratoires de patients atteints de bronchite chronique présentent une plus forte affinité pour <i>P. aeruginosa</i> que ceux de mucoviscidose.	Ramphal et coll. (136)
1990	Les mucines sont des facteurs chimiotactiques pour <i>P. aeruginosa</i> .	Nelson et coll. (115)
1991	Il existe une adhésine de <i>P. aeruginosa</i> différente des pili, capable de reconnaître les mucines respiratoires.	Ramphal et coll. (137)

L'affinité de *P. aeruginosa* pour les mucines est confirmée par Nelson et coll., qui, par l'utilisation de techniques de microscopie électronique, observent l'adhésion spécifique de *P. aeruginosa* sur des agrégats de mucines d'enfants atteints de mucoviscidose (115). La véritable originalité de leur démarche est de montrer le chimiotactisme de *P. aeruginosa* induit par les mucines, et par les sucres et les acides aminés qui les composent. Ils proposent ainsi un schéma de colonisation du tractus respiratoire où les mucines serviraient de "chimio-attractant" et de site d'adhésion à *P. aeruginosa*.

### B. II. 3. Adhésion de *P. aeruginosa* dans le cas d'infections non-respiratoires

*P. aeruginosa* est aussi responsable d'infections oculaires ou cutanées, pour lesquelles le mécanisme de colonisation reste inconnu. Les études d'adhésion menées dans le cas de ces infections apportent des renseignements utiles à la connaissance du mécanisme général d'adhésion de *P. aeruginosa*.

*P. aeruginosa* est la principale cause d'infections oculaires, notamment chez les porteurs de lentilles de contact. Des approches expérimentales variées ont permis une meilleure compréhension de ce problème infectieux. Hazlett et coll. (54), grâce à une technique d'adhésion sur cornée de Souris, ont observé que l'adhésion est modulée par l'acide sialique alors que Miller et coll. ont démontré l'affinité de *P. aeruginosa* pour les lentilles de contact (112,113) et que des glycosphingolipides neutres ont été décrits comme récepteurs potentiels de *P. aeruginosa* au sein de la cornée de Lapin (122).

Les infections cutanées et les septicémies chez les patients gravement brûlés sont principalement causées par *P. aeruginosa* (110). Le mécanisme d'adhésion de *P. aeruginosa* chez ces malades a surtout été étudié par Sato et coll. (142). En utilisant un modèle de Souris soumise à des brûlures (151) et une technique d'adhésion sur cellules épidermiques (150), ils ont défini l'importance des pili dans la pathogénie et l'adhésion de *P. aeruginosa*.

### **B. III. Les adhésines de *P. aeruginosa* et leurs récepteurs**

Toutes les techniques d'adhésion précédemment citées, ont permis de mieux connaître le mécanisme d'adhésion et de caractériser un certain nombre d'adhésines de *P. aeruginosa* et de récepteurs chez l'hôte.

### B. III. 1. Les adhésines

#### a. Pili

Les fimbriae de *P. aeruginosa*, composés de sous-unités identiques (piline) de 15 kDa, sont localisés aux pôles de la bactérie et font partie de la famille des NMePhe pili puisque la phénylalanine N-terminale est méthylée (124). La séquence en acides aminés (149), ainsi que la structure du génome (66), sont maintenant connues pour les souches les plus étudiées.

La comparaison des séquences en acides aminés des pilines de quatre souches de *P. aeruginosa* a permis d'établir les caractéristiques structurales communes à ces souches (126). La région N-terminale (acides aminés 1 à 55) est très conservée et interviendrait dans l'interaction entre sous-unités. La région centrale (acides aminés de 56 à 110) est très variable et contient la majorité des déterminants antigéniques. Enfin, la région C-terminale (acides aminés 111 à 147) est relativement bien conservée et possède une boucle, constituée par les deux résidus de cystéine. Ce domaine apparaît comme le site responsable de l'adhésion (33, 83).

*P. aeruginosa* possède une seule copie du gène des pili. Ce gène est contrôlé par le promoteur *rpoN* (63) qui contrôle aussi la synthèse des flagelles (164) et certainement la synthèse d'autres adhésines non encore caractérisées (137).

Les pili interviennent dans la reconnaissance des cellules buccales (175) et trachéales humaines (35), des cellules de polype nasal en culture (147), des cellules épidermiques de Souris (150), des épithéliums de trachée de Souris (132) des cellules trachéales bovines en culture (148), ou encore des mucines respiratoires humaines (135).

Ces différentes approches techniques ont établi l'importance des pili dans l'adhésion de *P. aeruginosa* mais n'ont pas permis de caractériser précisément le site récepteur de ces pili. Quelques résultats préliminaires ont néanmoins été obtenus : Paranchych et coll. (123) ont émis l'hypothèse que le site récepteur des pili était un domaine polypeptidique, mais sans préciser la séquence reconnue ; de leur côté, Doig et coll. (36) ont montré que les pili de *P. aeruginosa* reconnaissaient des glycoprotéines de surface de cellules buccales humaines, que cette adhésion était sensible à l'oxydation périodique et qu'elle pouvait être inhibée par le L-fucose ou l'acide sialique.

### b. Alginate

L'intervention de l'alginate dans le mécanisme général d'adhésion de *P. aeruginosa* a été abondamment décrite (34, 104, 105, 134). Par contre, le mécanisme moléculaire par lequel cet exopolysaccharide intervient est encore inconnu et la question qui se pose est de savoir comment une structure exopolysaccharidique peut présenter des propriétés d'adhésine. Il semblerait que l'association avec des éléments extracellulaires procure à l'alginate l'activité d'adhésine. L'hypothèse la plus élégante et la plus couramment émise est que l'alginate interagit avec des lectines de l'hôte qui créent ainsi un pont entre l'hôte et la bactérie (34, 105). Des données expérimentales récentes sont venues conforter cette hypothèse : il a été montré qu'une lectine isolée du poumon de Rat était capable de s'associer à l'alginate purifié de *P. aeruginosa* (20, 108) et récemment Ceri et coll. (22, 23) ont observé, dans les bronches de patients atteints de mucoviscidose, une hypersécrétion de lectines bronchiques ayant une affinité pour l'alginate et semblant affecter le système immunitaire.

L'alginate, polymère d'acides mannuronique et guluronique (107), peut aussi interagir grâce à son caractère anionique. Des ions bivalents comme le calcium pourraient créer le lien entre l'alginate et d'autres structures chargées négativement comme par exemple le glycocalyx (105).

### c. Hémagglutinine

Garber et coll. (44) puis Glick et coll. (47) ont noté que *P. aeruginosa* était capable d'agglutiner les globules rouges et que cette hémagglutination n'était corrélée ni à l'existence de lectines internes, ni à la présence de fimbriae et n'était pas inhibée par des sucres simples. Seul des agents intervenant sur les liaisons hydrophobes inhibaient l'agglutination. Les auteurs ont donc déduit que l'hémagglutination se faisait par l'intermédiaire d'une protéine de surface et de liaisons hydrophobes. La protéine en question n'a pas encore été caractérisée.

### d. Exoenzyme S

L'exoenzyme S est un facteur de virulence qui possède une activité d'ADP-ribosyltransférase. Cette toxine possède aussi une activité d'adhésine puisqu'elle reconnaît les glycolipides GM1 et GM2 désialylés (95). Récemment Baker et coll. (5) ont établi une corrélation entre l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les glycolipides et la fixation de l'exotoxine S sur ces mêmes récepteurs. Cette protéine,



habituellement libérée dans le milieu de culture, est aussi exprimée à la surface de *P. aeruginosa*. Il semble donc que l'exotoxine S soit l'adhésine intervenant dans la reconnaissance des glycolipides membranaires (82).

#### e. Autres adhésines

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire a permis de démontrer l'existence d'une ou plusieurs **adhésines non piliées**. Ces adhésines interviendraient dans la reconnaissance des mucines (137), des cellules trachéales bovines (147, 148) ou de la lignée cellulaire A549 (25). Nul ne peut dire si les activités d'adhésines décrites correspondent à une même protéine mais il est maintenant évident que ces adhésines sont régulées par le même promoteur, le gène *rpoN*, qui régule aussi le gène des pili (63) et celui des flagelles (164). Deux approches sont actuellement utilisées pour caractériser ces adhésines : la première consiste à localiser sur le génome de *P. aeruginosa* la zone codant pour ces adhésines et la seconde, plus traditionnelle à purifier ces protéines à partir d'extraits membranaires.

On peut s'interroger sur le lien entre ces activités d'adhésine et les activités lectiniques intracellulaires. *P. aeruginosa* possède deux lectines intracellulaires, PAI, galactose-spécifique et PAII ayant une affinité pour le L-fucose et le mannose (45). Glick et Garber (47) ont localisé des activités similaires à celles des lectines internes au niveau de la membrane externe de *P. aeruginosa* mais aucune étude n'a, pour l'instant, établi le lien entre ces lectines et les propriétés d'adhésion de *P. aeruginosa*.

### B. III. 2. Les récepteurs (Tableau 5)

Un certain nombre d'adhésines ou d'activités d'adhésine ont été répertoriées mais pour aucune d'entre elles le site récepteur au sein de l'hôte n'a été caractérisé. Les sites récepteurs, résumés dans le tableau 5, ont pour la plupart été déterminés pour la bactérie entière et il est actuellement impossible d'associer une adhésine définie à un récepteur.

Tous les récepteurs décrits pour *P. aeruginosa* correspondent à des structures glycosylées. Le rôle de l'acide sialique comme récepteur de *P. aeruginosa* est maintenant bien établi. La première caractérisation date de 1983. Lors de cette étude, Ramphal et coll. ont montré, par inhibition d'adhésion et par action de la neuraminidase, que l'acide sialique modulait l'adhésion de

Tableau 5 : Sites récepteurs glycaniques décrits pour *P. aeruginosa*

Récepteurs	Localisation	Technique de mise en évidence	Références
Acide sialique	Epithélium de trachée de Souris	Inhibition d'adhésion	Ramphal et coll. (131)
	Mucines trachéobronchiques	Inhibition d'adhésion Action de neuraminidase	Vishwanath et coll. (169)
	Salive humaine	Inhibition d'adhésion Action de neuraminidase	Komiyama et coll. (77)
	Cellules buccales humaines	Inhibition d'adhésion	McEachran et coll. (109)
	Cornée de Souris	Inhibition d'adhésion	Hazlett et coll. (54)
D-Man	Neutrophiles	Inhibition d'adhésion	Speert et coll. (156)
ManNAc	Cornée de Souris	Inhibition d'adhésion	Hazlett et coll. (55)
GlcNAc	Mucines trachéobronchiques	Inhibition d'adhésion	Vishwanath et coll. (169)
<u>Gal<math>\beta</math>1,3GalNAc<math>\beta</math>1,4Gal<math>\beta</math>1,4Glc<math>\beta</math>1Cer</u> <u>GalNAc<math>\beta</math>1,4Gal<math>\beta</math>1,4Glc<math>\beta</math>1Cer</u>	Glycosphingolipides de poumon	TLC*	Krivan et coll. (82, 83)
Glycosphingolipides neutres	Cornée de Lapin	TLC*	Panjwani et coll. (122)
Gangliosides	Epithélium de trachée de Souris	Inhibition d'adhésion	Ramphal et coll. (133)
Gangliosides GM1 et GM3 Sialylparaglobosides	Glycosphingolipides	TLC*	Baker et coll. (4)

\*TLC: Révélation par des bactéries radiomarquées des glycolipides séparés par chromatographie sur couche mince

*P. aeruginosa* (131). Ce récepteur a ensuite été décrit au sein des mucines bronchiques (169), des cellules buccales humaines (109) et de la salive d'enfants atteints de mucoviscidose (77).

D'autres récepteurs ont été caractérisés par inhibition d'adhésion. C'est le cas de la N-acétylglucosamine pour les mucines (169), de la N-acétylmannosamine pour la cornée de Souris (55) et du D-mannose pour les polynucléaires neutrophiles (156). Tous ces résultats obtenus par inhibition d'adhésion par des sucres simples sont en fait incomplets. En effet, ces études permettent de déterminer le sucre minimum reconnu par *P. aeruginosa* et non la structure glycanique complexe au sein de l'hôte.

Dès 1980, Woods et coll. (175) suggèrent l'intervention de glycolipides membranaires lors de l'adhésion de *P. aeruginosa* sur des cellules buccales. Il faut attendre le développement de techniques d'adhésion performantes (69) pour confirmer et préciser le rôle des glycolipides dans l'adhésion. La technique utilisée consiste à faire adhérer *P. aeruginosa* sur des glycolipides séparés par chromatographie sur couche mince. L'intérêt majeur de cette méthode d'adhésion directe est d'étudier la fixation sur des glycolipides purifiés ne présentant qu'un seul type de chaîne glycanique. Krivan et coll. (82, 83) puis Panjwani et coll. (122) ont noté l'adhésion de *P. aeruginosa* sur la structure GalNAc  $\beta$ 1,4 Gal non sialylée. Baker et coll. (4), en utilisant la même technique ont montré que *P. aeruginosa* reconnaissait des glycolipides, mais seulement lorsqu'ils étaient sialylés. Les divergences concernant le rôle de l'acide sialique au sein des récepteurs glycolipidiques ont été discutées par Baker et coll. (4): les conditions utilisées pour la saturation des chromatogrammes avant l'étape d'adhésion sont différentes d'un travail à l'autre et des différences dans la partie lipidique des glycolipides pourraient aussi intervenir.

Il est possible de classer les récepteurs décrits jusqu'à aujourd'hui (Tableau 5) en trois grandes familles : les récepteurs sialylés, les structures GalNAc  $\beta$ 1,4 Gal et les structures mannosylées. Cela suggère l'existence d'au moins trois types d'adhésines chez *P. aeruginosa*, un pour chaque famille de récepteurs.

#### **B. IV. Adhésion de *P. aeruginosa* in vivo**

Pourquoi *P. aeruginosa* est-il le germe principal rencontré dans la mucoviscidose alors qu'il n'infecte que très rarement les individus sains ? La caractérisation des adhésines et récepteurs de *P. aeruginosa* est essentielle à la

connaissance du mécanisme d'adhésion mais il faut aussi s'interroger sur les conditions *in vivo* qui, chez les patients atteints de mucoviscidose, permettent l'adhésion de *P. aeruginosa*.

Il est maintenant établi que *P. aeruginosa* reconnaît des structures glycaniques (Tableau 5). Dans le cas de la mucoviscidose, la question se pose de savoir si l'adhésion de *P. aeruginosa* est liée à **une glycosylation particulière**. Un élément de réponse est apporté par l'étude de Barash et coll. (6) qui montre que les anomalies de perméabilité aux ions chlorure observées dans la mucoviscidose peuvent créer des modifications de l'acidité à l'intérieur du *trans*-Golgi. Or, les glycosyltransférases présentes dans ce compartiment sont sensibles aux variations de pH et par conséquent la glycosylation des protéines pourrait s'en trouver modifiée. Cette découverte pose à nouveau le problème des anomalies de sialylation (173), de sulfatation des mucines (14, 86) ou des glycoprotéines de surface cellulaire (24) et de fucosylation (13, 152) précédemment observées dans la mucoviscidose. Il reste maintenant à établir si ces anomalies de glycosylation sont responsables de l'adhésion spécifique de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose.

On peut aussi s'interroger sur le rôle de l'**hypersécrétion bronchique**, caractéristique de la mucoviscidose, dans le mécanisme d'adhésion. L'hypersécrétion de macromolécules pourrait permettre la multiplication de sites potentiels d'adhésion et ainsi faciliter le développement de l'infection.

Le taux important de **protéases** (élastase et cathepsine G leucocytaires) dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose (50) peut aussi influencer l'adhésion de *P. aeruginosa*. En effet, Woods et coll. (176) et Plotkowski et coll. (127) ont observé que l'adhésion de *P. aeruginosa* était corrélée à une augmentation de l'activité protéolytique : les protéases hydrolysent la fibronectine recouvrant la surface cellulaire et laissent ainsi apparaître les sites glycaniques sous-jacents qui deviendraient accessibles aux adhésines de *P. aeruginosa*.

L'adhésion de *P. aeruginosa* nécessite non seulement la présence d'adhésines et de récepteurs spécifiques, mais aussi des conditions environnementales particulières pour que le mécanisme d'adhésion se produise.

## C. CONCLUSION DE LA REVUE GENERALE SUR L'ADHESION

Ces quelques pages ont permis d'analyser le mécanisme d'adhésion d'un germe pathogène qui est l'étape essentielle du développement du processus infectieux. Le principal intérêt de la connaissance d'un mécanisme moléculaire d'adhésion est de pouvoir ensuite utiliser ces connaissances pour élaborer de nouveaux protocoles thérapeutiques. Tout le problème est alors d'extrapoler *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*.

Quelques résultats encourageants ont été obtenus. Les malades atteints de pyélonéphrite sont habituellement infectés par des souches d'*E. coli* possédant à leur surface des pili mannose-spécifiques. Aronso et coll. (2) ont infecté des souris par des souches d'*E. coli* préalablement mélangées à du méthyl-mannoside. Ils ont observé une diminution sensible du nombre de souris contaminées lorsque les bactéries sont en contact avec le méthyl-mannoside par rapport aux souris témoins infectées par cette même bactérie non préincubée avec le méthyl-mannoside. Des tentatives de vaccination par des adhésines ont aussi été menées. Récemment, des souris, vaccinées par une préparation de P-pili purifiés d'*E. coli*, ont été protégées d'une infection par les souches d'*E. coli* présentant à leur surface ce type de pili (125).

Ces études préliminaires montrent l'importance de la connaissance du mécanisme d'adhésion dans la lutte contre l'infection. Le but est maintenant de tenter de prévenir les infections chez l'Homme, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose pour lesquels le premier contact avec *P. aeruginosa* a souvent des conséquences fatales.

**LES MUCINES SALIVAIRES  
HUMAINES**

La salive résulte du mélange des sécrétions de glandes salivaires majeures (parotide, sous-maxillaire et sublinguale) et de glandes mineures (palatine et labiale). Quotidiennement, 0,75 à 1 litre de salive est produit. C'est un fluide aqueux et complexe, comportant des électrolytes, des lipides, des glycolipides, des protéines et glycoprotéines parmi lesquelles figurent l' $\alpha$ -amylase, la lipase, des protéines et des glycoprotéines riches en proline (PRP et GPRP) ainsi que des mucines.

Dès 1971, Schragger et Oates (153) caractérisent, à partir de la salive totale, des glycoprotéines exclues d'une colonne de Bio-Gel P-150. La partie protéique représente de 15 à 30% de leur composition, et un acide aminé sur deux est une sérine ou une thréonine. La partie glucidique comporte des résidus de galactose, glucosamine, galactosamine, dans un rapport de 4/3/1 ainsi que des résidus de fucose, d'acide sialique et de sulfate. Des variations dans la composition chimique en sucres selon les groupes sanguins A, B, O et selon les phénotypes sécréteur ou non-sécréteur du donneur de salive sont aussi observées.

Oemrawsingh et Roukema (119) montrent, à partir de glandes sous-maxillaires humaines obtenues par biopsie, que les glycoprotéines exclues en chromatographie de gel filtration sur Bio-Gel PCP-300 (masse moléculaire > 300 kDa) comportent 60 à 80% de sucres. La N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine, le galactose, le fucose et l'acide N-acétylneuraminique composent la partie glycosylée. Ces mêmes auteurs observent des variations interindividuelles dans la composition chimique en sucres.

En 1982, Prakobphol et coll. (129) isolent de la salive sous-maxillaire et sublinguale une mucine de faible masse moléculaire (200-250 kDa) qu'ils appellent MG2. Loomis et coll. (98) caractérisent, toujours dans la salive sous-maxillaire et sublinguale, une mucine de masse moléculaire plus élevée (> 1000 kDa) (MG1) qui est formée de sous-unités réunies par des ponts disulfure et composée de 78% de sucres, 15% d'acides aminés et 7% de sulfate. Ils montrent aussi que MG2 est un monomère moins riche en sucres (68%) qui contient 30% d'acides aminés et 1,6% de sulfate. Murray et coll. (114) attribuent à la mucine MG2 un rôle de protection non-immune dans lequel elle interagirait avec certaines bactéries buccales telles *Streptococcus mitis* et *Streptococcus sanguis*. Par contre, MG1 aurait un rôle dans la formation de la pellicule d'émail (161).

Quelques années plus tard, Veerman et coll. (170) purifient, par ultracentrifugation de salive totale, des mucines salivaires de masse moléculaire supérieure à 1000 kDa, contenant 12,8% d'acides aminés, 85,3% de sucres, 1,7% de sulfate et présentant des similitudes avec la mucine MG1.

Plus récemment, Kawagishi et coll. (71) montrent que la mucine MG1, purifiée de la salive sous-maxillaire et sublinguale, possède une sous-unité de faible masse moléculaire liée par des ponts disulfure à la mucine et présentant des analogies avec la protéine de liaison décrite dans les mucines digestives.

Les mucines salivaires sont synthétisées principalement par les glandes sous-maxillaires, sublinguales et par les glandes mineures (labiales et palatines). La contribution respective des différentes glandes salivaires dans la production de mucines est étudiée par Milne et Dawes en 1973 qui montrent que 70% de l'activité de groupe sanguin proviennent des sécrétions des glandes sublinguales et mineures alors que celles-ci ne sécrètent respectivement que 5 et 8% du volume de la salive (111). Cohen et coll. (28, 29) utilisent des méthodes immunohistochimiques pour localiser le site de synthèse des mucines MG1 et MG2. MG1 est localisée avec une répartition homogène dans les glandes labiales et, avec une répartition hétérogène, dans les glandes palatines et sous-maxillaires où certains acini muqueux ne réagissent pas avec les anticorps anti-MG1 (28). L'immunsérum anti-MG2 révèle cette mucine au niveau des glandes labiales avec une coloration homogène et au niveau des glandes sous-maxillaires avec une distribution granuleuse. La présence de MG2 n'est pas révélée dans les glandes palatines et parotidiennes (29).

En conclusion, il existerait deux groupes de mucines.

(i) **Des mucines de masse moléculaire élevée (> 1000 kDa) et caractérisées par leur richesse en sucres (78-85%) sont présentes dans la salive sous-maxillaire mais sont aussi synthétisées dans les glandes labiales et palatines.** Quelques différences dans la composition chimique en sucres apparaissent suivant les auteurs. Veerman et coll. (170) ainsi que Kawagishi et coll. (71) ont observé une longueur moyenne des chaînes glycaniques de 7-8 résidus. Les compositions chimiques révèlent que pour un résidu de GalNAc correspondent 2 résidus de galactose, 1.4 à 3 résidus de GlcNAc, 1 à 2 résidus de fucose. D'après ces auteurs, une chaîne glycanique sur deux serait sialylée ou sulfatée. La composition rapportée par Loomis et coll. (98) est différente des précédentes puisque les chaînes glycaniques sont plus longues (11 résidus), plus riches en galactose (le donneur de salive était de groupe sanguin B), mais surtout beaucoup plus acides avec deux résidus de sulfate par chaîne.

Les compositions chimiques en acides aminés rapportées par tous les auteurs sont similaires, et caractéristiques des mucines. La sérine et la thréonine



représentent approximativement 30% des acides aminés et la proline, l'alanine et le glycolle sont présents en grande quantité.

(ii) **Des mucines de masse moléculaire plus faible (200-250 kDa)** ont une composition chimique moins riche en sucres et des chaînes glycaniques plus courtes (4 résidus en moyenne) (98). Ces mucines sont synthétisées par les glandes sous-maxillaires et labiales.

Aucune étude histochimique n'a permis de déterminer en quoi les mucines sublinguales se distinguent des mucines sous-maxillaires.

## **TRAVAUX PERSONNELS**

## I<sup>ère</sup> PARTIE

### ETUDE COMPARATIVE DE L'ADHESION DE *P. AERUGINOSA* AUX GLYCOPEPTIDES DE MUCINES SALIVAIRES DE SUJETS NORMAUX OU DE PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

La recherche des sites d'adhésion de *P. aeruginosa* sur les mucines bronchiques d'enfants atteints de mucoviscidose se heurte à un certain nombre de difficultés : (i) l'infection bronchique que présentent très souvent les malades semble avoir un effet direct sur la dégradation des mucines (60) et (ii) les difficultés d'obtention de sécrétions témoins empêchent une comparaison des cas pathologiques avec la situation physiologique. Dans ces conditions, il est actuellement difficile de déterminer si une anomalie de glycosylation des mucines bronchiques est responsable de la colonisation de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose.

La mucoviscidose est une exocrinopathie généralisée et par conséquent, si elle s'accompagne d'une anomalie de la glycosylation, celle-ci devrait se retrouver au niveau de différentes sécrétions et notamment au niveau des sécrétions salivaires. Les mucines salivaires nous ont donc semblé un bon modèle pour l'étude de l'adhésion de *P. aeruginosa*, d'autant que l'obtention de sécrétions salivaires témoins est aisée et que le flux continu de salive semble atténuer les éventuels problèmes de dégradation bactérienne que l'on observe dans les sécrétions bronchiques infectées.

Il existe très peu d'informations sur les mucines salivaires d'enfants atteints de mucoviscidose. Les données de la littérature se limitent à l'article de Reddy et coll. (139) qui décrit la caractérisation de 7 oligosaccharides de mucines salivaires.

Dans l'article intitulé "*Altered carbohydrate chains in salivary mucins from patients with cystic fibrosis*" (p 43 à 73), nous avons entrepris de préparer des glycopeptides de mucines salivaires de sujets normaux et de patients atteints de mucoviscidose et de comparer leur composition chimique. Les glycopeptides ont été préparés, après protéolyse de la salive totale, par un double fractionnement en chromatographie de gel-filtration. Cette étude nous a permis de faire plusieurs observations :

- (i) il y aurait une déshydratation des sécrétions salivaires et une hypersécrétion de mucines chez les sujets atteints de mucoviscidose;
- (ii) les mucines salivaires semblent plus sulfatées que sialylées;
- (iii) un excès de résidus de N-acétylgalactosamine a été noté pour les glycopeptides de mucines de masse moléculaire élevée;
- (iv) les glycopeptides salivaires de patients souffrant de mucoviscidose sont plus sialylés que les glycopeptides normaux;
- (v) les glycopeptides salivaires de haute masse moléculaire sont plus sulfatés et plus fucosylés dans la mucoviscidose.

L'"hypersialylation" relative des glycopeptides de patients atteints de mucoviscidose va à l'encontre des idées habituellement émises. En effet, l'existence d'une activité de neuraminidase extracellulaire chez *P. aeruginosa* a été signalée par Leprat et coll. (93). Calcano et coll. (18) ont également décrit une neuraminidase active sur substrat synthétique et ont suggéré que l'activité de neuraminidase pouvait être un facteur de virulence de *P. aeruginosa* en faisant apparaître des sites d'adhésion. Il est par conséquent surprenant de trouver chez des patients souffrant de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa* des glycopeptides salivaires hypersialylés.

Nous avons donc recherché si la neuraminidase de *P. aeruginosa* précédemment décrite (93) était capable de dégrader les chaînes glycaniques des mucines. Ce travail a fait l'objet du deuxième article intitulé "*Arylneuraminidase activity of Pseudomonas aeruginosa does not degrade natural substrates such as human respiratory mucins*" (p 74 à 76). Les résultats obtenus mettent en évidence une activité arylneuraminidase, capable de dégrader des substrats synthétiques mais ne libérant pas d'acide sialique à partir de substrats naturels comme les glycopeptides de mucines bronchiques. Il semble donc que *P. aeruginosa* ne soit pas en mesure de produire une neuraminidase active sur les mucines.

L'adhésion de *P. aeruginosa* aux différents types de glycopeptides est analysée dans le troisième article intitulé "*The binding of Pseudomonas aeruginosa to salivary glycopeptides from patients with cystic fibrosis*" (p 77 à 100).

Lors de cette étude nous avons mis en évidence une plus forte adhésion de *P. aeruginosa* aux glycopeptides provenant de salives d'enfants atteints de mucoviscidose. Lorsque les glycopeptides sont dégradés par la neuraminidase de *Clostridium perfringens*, l'adhésion de *P. aeruginosa* diminue significativement mais n'est pas totalement éliminée. Cela sous-entend l'intervention de l'acide sialique et d'un autre site de reconnaissance dans le mécanisme d'adhésion. Ces

résultats amènent donc à penser que *P. aeruginosa* pourrait exprimer au moins deux adhésines capables de reconnaître les mucines: l'une pour les structures sialylées, l'autre pour des chaînes non sialylées.

L'adhésion de plusieurs souches de *P. aeruginosa* a été testée, notamment celle d'un mutant isogénique de *P. aeruginosa* (1244NP) qui n'exprime plus le gène des pili. L'adhésion de cette souche mutante s'est révélée très similaire à l'adhésion de la souche sauvage, ce qui laisse suggérer l'intervention d'adhésines non piliées dans le mécanisme de reconnaissance des mucines salivaires d'enfants atteints de mucoviscidose.

## **Altered Carbohydrate Chains in Salivary Mucins from Patients with Cystic Fibrosis**

**Christophe Carnoy\*, Jean-Marc Lo-Guidice\*, André Klein\*,  
Claude Galabert#, Reuben Ramphal§, Geneviève Lamblin\* and  
Philippe Roussel\***

*\*Unité INSERM n°16, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France; # Hopital  
Renée Sabran, Giens, 83400 Hyères, France; § Department of Medicine,  
University of Florida, Gainesville, Florida 32610, USA.*

*Running title : CF salivary mucins*

*Address correspondence to : P. Roussel, Unité INSERM n°16, Place de Verdun,  
F-59045 Lille Cedex, France.*

## ABSTRACT

Some studies have suggested that mucins may play a role in the colonization of CF patients by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, implicating a glycosylation difference. However, since it is difficult to collect normal bronchial secretion as opposed to saliva, salivary mucins seemed to be a more suitable candidate to search for such a difference. A comparison of the chemical composition of CF and non-CF salivary glycopeptides was therefore performed in order to look for a possible glycosylation difference in CF mucins. Three pools of CF saliva, four pools of non-CF saliva, one individual CF saliva and one individual non-CF saliva were studied. A greater amount of non-dialyzable material was obtained in CF saliva compared to non-CF saliva. This suggested a lower hydration level of the CF saliva. The soluble fraction of the saliva was treated with pronase and gel filtration was performed to obtain high and low molecular mass salivary glycopeptides. The yield of total glycopeptides, which was significantly higher in CF than in non-CF, indicated an over-secretion of salivary mucins in CF. The CF and non-CF glycopeptides were more sulfated than sialylated.

The chemical composition also revealed a significantly higher sialic acid content in CF than in non-CF mucin glycopeptides, and higher sulfate and fucose content in CF than in non-CF high molecular mass glycopeptides. Thus, this study of salivary mucin glycopeptides suggests that there are differences in the quantity and composition of salivary materials secreted in CF.

## INTRODUCTION

Lung infection is a major problem in patients suffering from Cystic Fibrosis (CF). Although mucus dehydration impairing muco-ciliary clearance is the most advocated hypothesis to explain respiratory colonization and lung infection in Cystic Fibrosis, this hypothesis does not account for the specificity of lung colonization by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

An alteration in glycosylation of respiratory mucins or epithelial glycoproteins has been suspected for a long time (1). An increased sulfation has been observed in glycoproteins secreted by respiratory cells (2,3) and in CF respiratory mucins as compared to mucins secreted in other chronic bronchial diseases (4-7). Recently, Barasch et al. have reported a defective acidification of intracellular organelles in immortalized CF epithelial cells leading to alterations in glycosylation of secreted proteins (8). This abnormal glycosylation phenotype may contribute to the specificity of lung colonization by microorganisms.

In order to pursue this hypothesis it would be interesting to characterize the CF and the non-CF bronchial mucins. Unfortunately, the collection of normal respiratory mucus is difficult and there always has been some difficulties in comparing CF respiratory mucins with physiological mucin controls. Moreover, respiratory mucins may undergo some degradation in the bronchial tree of infected CF patients (9).

If a glycosylation abnormality is generalized to all mucus secretions, saliva may represent a good model. Saliva is easy to collect and is not as infected as respiratory secretions in CF, although some authors have suggested that the oral cavity is important in the colonization of the lower respiratory tract (10-12). Little is known about the chemical features of salivary mucins from CF patients. Menguy et al. have reported differences in the susceptibility of salivary mucins from CF patients to degradation by salivary glycosidases (13). Dische et al. have described an increase in the fucose content (14) and so far, seven oligosaccharides



alditols have been identified in the low molecular weight CF and non-CF salivary mucins (15).

Therefore, we felt that carbohydrate and sulfate analyses of glycopeptides from CF and non-CF salivary mucins might be useful to check the hypothesis of alterations in post-translational phenomena in CF and to look for some specificity of CF salivary mucins. For this purpose, whole saliva from controls and CF patients was proteolyzed and then protease-resistant glycopeptides were compared.

The present report demonstrates (i) a higher mucin glycopeptide content in CF than in non-CF saliva (ii) a higher sialic acid content in CF than in non-CF salivary mucin glycopeptides and (iii) higher sulfation and fucosylation levels in the high molecular mass mucin glycopeptides from the saliva of CF patients than in that from control saliva.

## MATERIALS AND METHODS

### Saliva

Before collection of CF saliva, the oral cavity of the patients was carefully rinsed with saline to eliminate possible contaminations by sputum. Saliva was collected from ten CF patients : the saliva was pooled to form three groups of three patients each while the last saliva from a patient with a mild form of CF was analyzed separately. The saliva from 32 non-CF individuals were gathered in four pools corresponding to 20, 7, 2, and 3 individuals, respectively. The saliva from one non-CF individual saliva was also studied. All the saliva was obtained from individuals with blood group O.

The saliva was collected without stimulation and stored at -20°C. The saliva was centrifuged at 3,000 g for 20 min at +4°C. The supernatant (soluble phase) was dialyzed, lyophilized and treated by pronase whereas the pellet (insoluble phase) was dialyzed and lyophilized.

### Preparation of salivary glycopeptides

The soluble phase of saliva was treated with pronase (Calbiochem, San Diego, Ca.) in 0.01M calcium acetate at pH 7.0 for 48 h at 37°C with an enzyme / substrate ratio of 1/40 (w / w) followed by a second treatment after 24 h. Then, the mixture was centrifuged at 3,000 g for 30 min. The supernatant was lyophilized and submitted to gel-filtration chromatography on a Sepharose CL-2B column (49 x 2.5 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated in 6M guanidinium hydrochloride (Fluka, Buchs, Switzerland). The retained fractions from the above column were submitted to a second gel-filtration on a Sepharose CL-6B column (49 x 2.5 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) eluted under the same conditions.

Absorbance at 278 nm was measured and the neutral sugars were detected by an automated orcinol assay (4). The different fractions were dialyzed exhaustively to remove guanidinium hydrochloride, and lyophilized.

### Chemical composition

The carbohydrate composition of the glycopeptide fractions was performed by gas liquid chromatography as previously described (16). N-acetylneuraminic acid was measured by the thiobarbituric acid assay of Aminoff (17). The sulfate content was measured by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) (Lo Guidice *et al.*, manuscript in preparation). The amino acid analysis was performed as previously described (18). For statistical evaluation of the results, the non-parametric test of Mann and Whitney was used with  $p = 0.05$  as the limit of significance.

### Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was carried out following the PhastSystem™ separation technique file n° 130. The gels were stained with Schiff reagent after periodic oxidation (PAS) and with Coomassie brilliant blue (19).

### Enzymatic digestion of the salivary glycopeptides

#### - Chondroitinase ABC digestion

Salivary glycopeptides were dissolved in physiological saline at a concentration of 1 mg / 100  $\mu$ l; 0.25 unit of chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4) purified from Proteus vulgaris (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo) was dissolved in 10  $\mu$ l of 0.1 M Tris-acetate pH 7.3 and added to the sample (20). The mixture was incubated at 37°C for 18 h and then studied by agarose gel electrophoresis. Chondroitin sulfate (Calbiochem, San Diego, Ca.) was used as positive control.

#### - Heparinase digestion

Salivary glycopeptides (1mg / ml of physiological saline) were treated with 0.25 unit of heparinase from Flavobacterium heparinum (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) dissolved in 5  $\mu$ l of 0.1 M potassium phosphate pH 7.0 and incubated at 37°C for 18 h (21). The mixture was studied by agarose gel electrophoresis.

- Neuraminidase digestion

Neuraminidase from Clostridium perfringens (EC 3.2.1.18) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) (1 unit in 20  $\mu$ l of 0.1 M sodium acetate, pH 5.0) was added to salivary glycopeptides dissolved in physiological saline (1 mg / ml). The incubation was performed at 37°C for 18h and then the mixture was studied by agarose gel electrophoresis.

Agarose gel electrophoresis

Agarose gel electrophoresis was performed in veronal buffer at pH 8.2 and the slides were stained with toluidine blue (4).

## RESULTS

### Comparison of the yields of non-dialyzable material and glycopeptides from CF and non-CF saliva

The centrifugation of whole saliva gave a supernatant corresponding to the soluble phase and a pellet corresponding to the insoluble phase. The recovery (mg / ml) of these two dialyzed phases were quite similar for each pool of a given type of saliva and it appeared that on average, CF saliva contained 1.5 times more non-dialyzable material than non-CF (Table 1).

The fractionation of the salivary glycopeptides obtained after proteolysis of the soluble phases is presented in figure 1. After gel-filtration chromatography on Sepharose CL-2B, the salivary glycopeptides were divided in two families (fig.1, A1, B1). The high molecular mass glycopeptides were designated S3 (for non-CF glycopeptides) and MS3 (for CF glycopeptides), whereas the corresponding lower molecular mass glycopeptides were called S4 and MS4. Table 1 presents the yields of these salivary glycopeptides. Considering the glycopeptide recovery from 100 mg of soluble phase treated by pronase, it appears that CF saliva contains significantly more ( $p < 0.05$ ) glycopeptides than non-CF saliva ( $23 \pm 3.5$  versus  $12.8 \pm 4$ ).

Fractions S4 and MS4 were further fractionated by gel filtration on a Sepharose CL-6B column into four subfractions (S4a, S4b, S4c and S4d for non-CF saliva, and MS4a, MS4b, MS4c and MS4d for CF saliva) (fig. 1, A2,B2).

### Polyacrylamide gel electrophoresis

The 5-15% SDS-PAGE of the CF and non-CF glycopeptides were stained with Schiff reagent (PAS) and Coomassie blue (CB) (fig. 2). The staining of fractions S3 and MS3 with PAS was stronger than the staining of the lower molecular mass fractions. Fractions S4c and MS4c were weakly stained with Coomassie blue (fig. 2). No major differences were apparent between CF and non-CF salivary glycopeptides on SDS-PAGE.

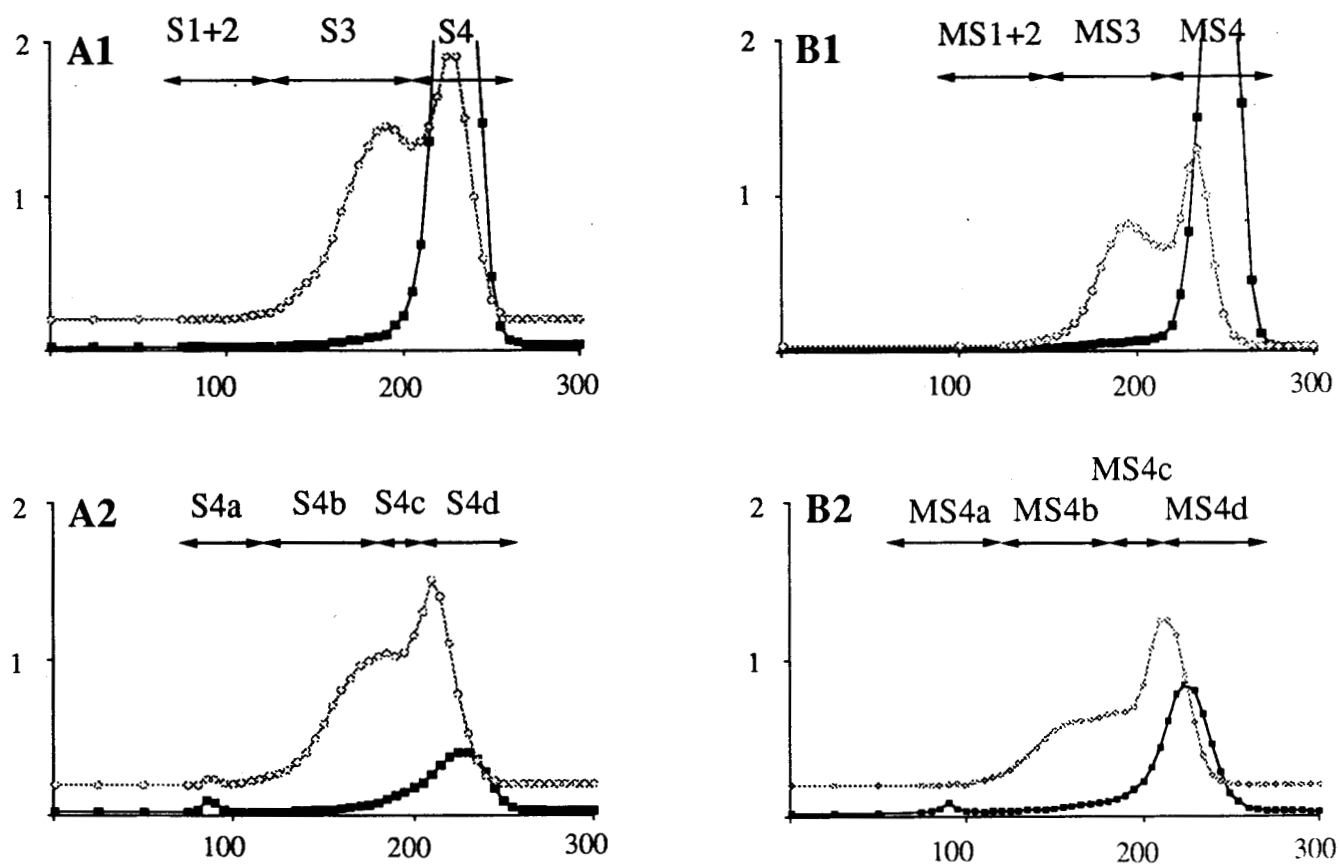
TABLE 1 : Yield of CF and non-CF salivary fractions

Saliva (number of individuals)	Volume of sampling (ml)	Soluble phase (mg/ml)	Insoluble phase (mg/ml)	Total saliva (mg/ml)	(M)S3 (mg)	(M)S4 (mg)	(M)S3+(M)S4 (%)*
<b>non-CF</b>							
Pool I (20)	500	nd	nd	1.9	77	65	13.4
Pool II (7)	720	1.14	1.05	2.2	92	45	16.7
Pool III (2)	400	0.7	0.8	1.5	10	36	14.8
Pool IV (3)	600	1.45	1.58	2.93	53	74	14.5
Indiv. (1)	535	1.30	1.22	2.52	13.3	22.7	5
<i>mean values</i>				$2.20 \pm 0.49$			$12.8 \pm 4$
<b>CF</b>							
Pool I (3)	410	1.86	1.95	3.91	105	106	28.3
Pool II (3)	235	2.36	1.82	4.18	68.7	58.5	23.5
Pool III (3)	440	2.1	2.5	4.6	92.5	57	21.3
Indiv. (1)	368	1.4	0.78	2.18	57	45	18.8
<i>mean values</i>				$3.71 \pm 0.91$			$23 \pm 3.5$
Test of significance of Mann and Whitney				NS	p < 0.05		

\* mg / 100 mg of soluble phase

nd = not determined

NS = Non Significant



**Figure 1** : Sepharose CL-2B chromatography of pronase treated saliva from non-CF subjects (A1) and from CF patients (B1). S4 and MS4 have been fractionated on Sepharose CL-6B (A2, B2). The eluting solution was 6M guanidinium hydrochloride. 5 ml fractions were analyzed for neutral sugars (solid line) and for absorbance at 278 nm (broken line).

**Figure 2** : 5-15% SDS PAGE of the salivary glycopeptides obtained from chromatography on Sepharose CL-2B of proteolyzed saliva (S3 for non-CF saliva and MS3 for CF saliva), and of the fractions obtained from chromatography on Sepharose CL-6B (S4b, S4c, S4d for non-CF saliva and MS4b, MS4c, MS4d for CF saliva). The gel were stained with Schiff reagent after periodic oxydation (PAS) and with Coomassie brilliant blue (CB).



### Chemical composition of the salivary glycopeptides

The carbohydrate and amino acid compositions of S3, S4b, S4c and S4d on one hand, and MS3, MS4b, MS4c and MS4d on the other hand are presented in Table 2 and 3, respectively.

For all the glycopeptides the main sugars were galactose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and fucose. There is a progressive decrease in carbohydrate content from S3 to S4d and from MS3 to MS4d. The high molecular weight glycopeptides, S3 and MS3, were the most glycosylated since they contain  $291.9 \pm 33$  and  $312 \pm 38$  residues of carbohydrate / 100 amino acids, respectively. In contrast, for S4d and MS4d, the lowest molecular weight glycopeptides, the carbohydrate content only represented  $93.7 \pm 10$  and  $110.7 \pm 11$  residues / 100 amino acids, respectively. Fractions S3 and MS3 had more N-acetylgalactosamine residues than hydroxyamino acid residues. This is especially surprising since saliva was collected from blood group O donors. The N-acetylglucosamine / N-acetylgalactosamine ratio increased progressively from S3 and MS3 to S4d and MS4d. All the glycopeptides contained mannose. S3, MS3, S4b and MS4b possessed less mannose residues than S4c, MS4c, S4d and MS4d (Table 2 and 3). The salivary glycopeptides were characterized by a higher sulfate than sialic acid content (Table 2 and 3).

The amino acid content varied also with the size of the glycopeptides. For the highly glycosylated molecules (S3, S4b, MS3 and MS4b), the hydroxyamino acids (serine + threonine) represent one third of the total amino acid. The proportion of hydroxyamino acids of S4c and MS4c is a little less than one third of the total amino acid, while these amino acids represent less than one fifth of the total amino acid in S4d and MS4d. In contrast, the proportions of proline, glycine and alanine residues are relatively constant in all the glycopeptides. With regard to acidic amino acids, it appears that the aspartic acid and glutamic acid content increases while the size of the glycopeptides decreases : these amino acids represent about 15 residues for 100 amino acids in S3 and MS3 whereas they represent about 33 residues for 100 amino acids in S4d and MS4d (Table 2 and 3).

TABLE 2: Chemical composition of the non-CF salivary glycopeptides

	S3	S4b	S4c	S4d
<u>Amino acids</u>	100	100	100	100
Serine	14.2 ± 0.8	14.2 ± 2	11.6 ± 2.4	8.6 ± 2.6
Threonine	22.9 ± 1.7	18 ± 0.2	15 ± 1.5	9.3 ± 4.2
Proline	13.5 ± 2.1	15.5 ± 2.6	16.0 ± 0.3	15.1 ± 1.9
Glycine	8.6 ± 1.1	8.3 ± 2.2	8.2 ± 0.3	10.2 ± 1.0
Alanine	11.2 ± 1.2	13.2 ± 1.4	12.2 ± 0.9	8.7 ± 0.9
Aspartic acid	3.8 ± 0.6	4.4 ± 0.1	8.3 ± 1.1	16.9 ± 1.9
Glutamic acid	6.5 ± 0.8	8.5 ± 0.7	9.7 ± 0.9	17.2 ± 2.7
Cystine/2	0.8 ± 0.6	0.3 ± 0.2	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.6
Valine	3.9 ± 0.9	3.4 ± 0.2	3.9 ± 0.1	3.4 ± 0.4
Methionine	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Isoleucine	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.6
Leucine	4.1 ± 0.3	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.4	2.1 ± 0.3
Tyrosine	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.1
Phenylalanine	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Histidine	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Lysine	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.2
Arginine	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1
<u>Carbohydrates</u>	291.9 ± 33	159.4 ± 41	106.9 ± 30	93.7 ± 10
Fucose	53.2 ± 6.4	23.3 ± 4.4	15.4 ± 5.2	17.4 ± 2.2
Mannose	2.6 ± 1.1	1.9 ± 0.6	7.2 ± 2.8	11.8 ± 3.1
Galactose	99.2 ± 18	59 ± 9.8	34.5 ± 11	25 ± 2.8
Glucose	9.1 ± 3.9	6.9 ± 2.2	6.1 ± 3.3	3.5 ± 0.3
N-Acetylgalactosamine	48.1 ± 4	24.7 ± 8.8	15 ± 5	10.5 ± 2.6
N-Acetylglucosamine	75 ± 15	41.1 ± 17	27.2 ± 10	27.1 ± 4.2
N-Acetylneuraminic acid	4.5 ± 1.2	1.9 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1
Sulfate	20 ± 2.6	28.8 ± 11	12.7 ± 4.1	10.6 ± 3.2

The results are expressed in residues / 100 amino acids and correspond to the mean value ± standard deviation (n = 5).

TABLE 3 : Chemical composition of the CF salivary glycopeptides

	MS3	MS4b	MS4c	MS4d
<u>Amino acids</u>	100	100	100	100
Serine	14.3 ± 0.4	14.1 ± 1.8	13.4 ± 2.5	9.4 ± 1.3
Threonine	25.5 ± 1.6	22.2 ± 4.5	16.2 ± 3.1	10.2 ± 2
Proline	12.0 ± 0.6	12.0 ± 1.9	14.6 ± 0.7	15.5 ± 1.0
Glycine	8.6 ± 0.4	8.7 ± 1.9	7.2 ± 0.5	13.2 ± 1.9
Alanine	10.5 ± 0.4	12.9 ± 1.4	11.4 ± 1.1	6.8 ± 1.4
Aspartic acid	3.3 ± 0.5	3.9 ± 1.3	7.1 ± 1.7	14.9 ± 0.7
Glutamic acid	6.1 ± 0.8	7.5 ± 1.3	9.2 ± 1.5	13.4 ± 1.5
Cystine/2	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.9	1.8 ± 0.3	2.5 ± 0.8
Valine	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.4	4.4 ± 0.5	3.1 ± 0.3
Methionine	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Isoleucine	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Leucine	4.4 ± 0.1	3.8 ± 0.5	3.9 ± 0.4	2.4 ± 0.4
Tyrosine	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.2
Phenylalanine	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.3
Histidine	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Lysine	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.4
Arginine	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2
<u>Carbohydrates</u>	312 ± 38	202.3 ± 53	141.1 ± 18	110.7 ± 11
Fucose	67 ± 5.9	35.8 ± 4.9	23.7 ± 8.4	20 ± 2.6
Mannose	2.6 ± 1	2.4 ± 1.1	6.5 ± 0.6	18.4 ± 4.9
Galactose	111.3 ± 19.5	75.7 ± 20.8	48.8 ± 8.9	27.8 ± 3.3
Glucose	5.8 ± 2.4	4.4 ± 1.8	4.1 ± 1.3	2.7 ± 0.8
N-Acetylgalactosamine	50.4 ± 7.3	30.1 ± 7.6	20.8 ± 1.8	11.7 ± 2.1
N-Acetylglucosamine	81 ± 11.6	48.5 ± 1 6.6	33.3 ± 5.7	27.4 ± 3.4
N-Acetylneuraminic acid	9 ± 1.9	6.7 ± 2	4.9 ± 1.6	3.5 ± 0.7
Sulfate	31.4 ± 5	34.8 ± 8.5	21 ± 6.9	16.6 ± 5.6

The results are expressed in residues / 100 amino acids and correspond to the mean value ± standard deviation (n = 4).

TABLE 4 : Comparison of sulfate, sialic acid and fucose content between CF and non-CF salivary mucin glycopeptides (test of Mann and Whitney)

	MS3 <u>vs</u> S3	MS4b <u>vs</u> S4b	MS4c <u>vs</u> S4c
Sialic acid content	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Sulfate content	$p < 0.05$	NS	NS
Fucose content	$p < 0.05$	$p < 0.05$	NS

n = 5 for non-CF glycopeptides and n = 4 for CF glycopeptides

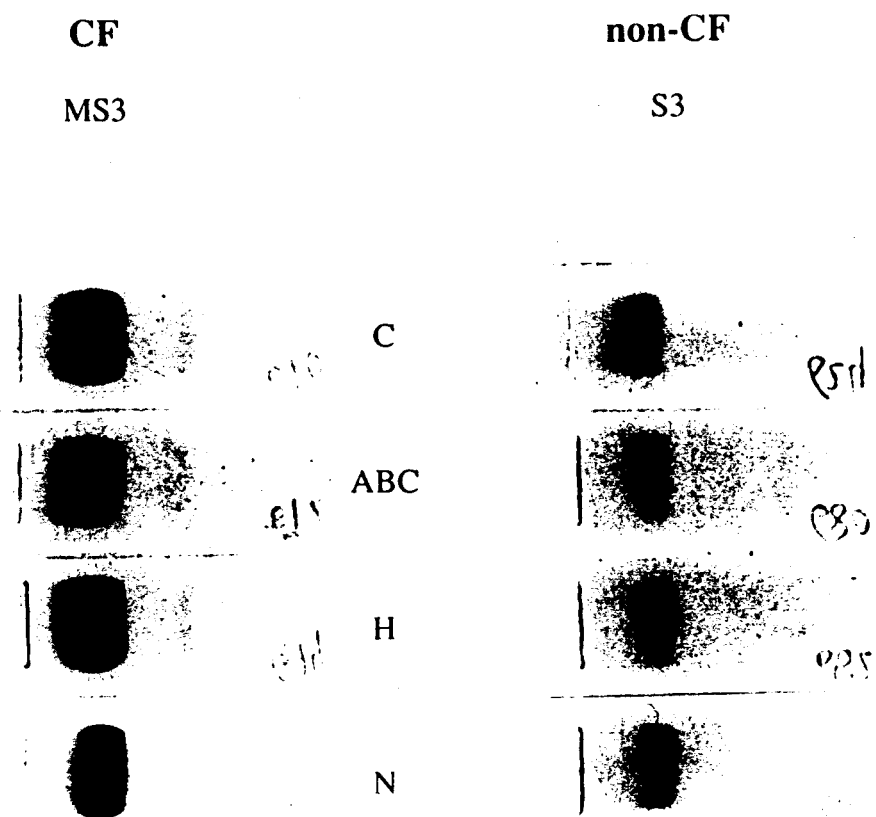
NS = Non Significant

Fractions S3, S4b, S4c, MS3, MS4b and MS4c with a hydroxyamino acid content almost equal or superior to 30 residues for 100 amino acids correspond mainly to salivary mucin glycopeptides.

The sulfate, sialic acid and fucose contents of CF and non-CF mucin glycopeptides were compared. The sulfate content of fraction MS3 was significantly higher than that of fraction S3. No significant differences between the CF and non-CF sulfate content of the lower molecular mass fractions have been observed (Table 4). There were significant differences in the sialic acid content : the CF mucin glycopeptides contain significantly more N-acetylneuraminic acid residues than the corresponding non-CF glycopeptides (Table 4). Furthermore, the fucose content of the CF fractions MS3 and MS4b was significantly higher than that of the corresponding non-CF fractions (S3 and S4b).

#### Agarose gel electrophoresis

The mucin glycopeptides (S3 and MS3) were studied by agarose gel electrophoresis and the toluidine blue method was used to characterize the acidic fractions (fig. 3). The agarose gel electrophoresis patterns showed a stronger staining with toluidine blue of the CF glycopeptides compared to the non-CF fractions. Chondroitinase ABC and heparinase treatment of these glycopeptides had no effect on the staining ; therefore glycosaminoglycans are not responsible for the acidic properties of the salivary glycopeptides. Neuraminidase treatment slightly affected the staining of MS3 whereas it was impossible to detect a decrease of the staining of S3 after treatment by this enzyme. Furthermore, since chondroitinase ABC treatment did not affect the toluidine blue staining of MS3 and S3, the high N-acetylgalactosamine content in these fractions cannot be explained by chondroitin sulfate contamination. Therefore, the ratio N-acetylgalactosamine / serine + threonine being superior to one is an intrinsic feature of high molecular mass salivary mucin glycopeptides.



**Figure 3** : Agarose gel electrophoresis of salivary glycopeptides S3 and MS3 before (C) and after treatment with chondroitinase ABC (ABC), heparinase (H) and neuraminidase (N). The slides were stained with toluidine blue.

## DISCUSSION

The present study demonstrates that there is a higher proportion of non-dialyzable material and of glycopeptides in saliva from patients with CF than in saliva from control subjects when results are expressed per volume of saliva. The reasons for the larger amount of non-dialyzable material and of mucin glycopeptides in CF saliva are unclear.

This observation is in agreement with previous studies on salivary secretion in CF. It was shown that submaxillary gland which frequently appears enlarged in CF (22), produces more organic compounds than the non-CF gland (23, 24). Similarly a higher mucus secretion from labial minor salivary gland was observed in CF when compared to normal (25). Therefore, the oversecretion of salivary mucin, observed in our study, is most likely related to the modification of these different salivary secretions.

Although the sampling of saliva was performed carefully to avoid contamination by respiratory secretions, minor contamination of CF saliva by sputum is possible. However a molar ratio N-acetylgalactosamine / serine + threonine superior to one has never been found in any CF respiratory glycopeptides from patients with blood group O (18, 26) but is observed in both salivary glycopeptides S3 and MS3. Since the average content of non dialyzable material in sputum is ten-fold greater than that of saliva (23), a small contamination of saliva by sputum would decrease the N-acetylgalactosamine / serine + threonine ratio. Therefore this ratio, which is the same in CF and control saliva, indicates that there is minimal contamination of the collected saliva by respiratory secretions.

The glycopeptides, purified after proteolysis of whole saliva, correspond to a mixture of salivary glycoproteins of different origins. High and low molecular weight mucins (MG1 and MG2, respectively) have been observed in submandibular and sublingual saliva (28-30) but mucins can be also secreted by

minor glands such as labial, palatal, and lingual glands (31). The lower molecular weight glycopeptides obtained from these mucins are probably mixed with glycopeptides from N-glycosylated proteins such as salivary amylase, lactoferrin, immunoglobulins, or proline-rich glycoproteins.

Gel-filtration of the glycopeptide mixture on Sepharose CL-2B separates different families of glycopeptides in CF and non-CF saliva. The higher molecular weight fractions (S3 and MS3) correspond to true mucin glycopeptides since serine and threonine residues represent about 40% of the total amino acids and since 75 % of the carbohydrate moiety is composed of the typical mucin sugars. A striking feature of these glycopeptides is the N-acetylgalactosamine / serine + threonine ratio which is superior to one although the donors were blood group O. This cannot be explained by the presence of proteoglycans since chondroitinase ABC had no effect on the glycopeptides. This high content in N-acetylgalactosamine, not observed in the other salivary glycopeptides, suggests that some N-acetylgalactosamine residues, which are not part of the carbohydrate-peptide linkage, are probably present in some uncommon structures such as the GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc core structure (32) or the Cad or Sd<sup>a</sup> antigen (33) which is expressed in saliva (34). This ratio has not been found previously in high and low molecular weight mucins purified from submandibular and sublingual saliva (28, 29), except in one case when the authors used saliva from a blood group A donor (35). Since the submandibular and sublingual mucins are not likely to be responsible for this ratio, it may be due to the mucins secreted by the minor glands.

In glycopeptides MS3 and S3 some mannose residues were detected, suggesting the presence of few N-linked carbohydrate (less than 1 out of 10 carbohydrate chains, on an average). This is in accordance with the present knowledge of mucins since small amounts of N-linked glycans have been detected on mucin-type molecules (36). Moreover, the presence of an N-glycosylated link component covalently associated with high molecular weight mucins has also been suggested (37).



The low molecular weight fractions (S4 and MS4) were subfractionated on Sepharose CL-6B. S4b, S4c, MS4b and MS4c are less glycosylated than S3 and MS3 but have a chemical composition close to mucin glycopeptides, whereas S4d and MS4d, the lowest molecular weight glycopeptides, contain 50% of carbohydrate and a larger amount of acidic amino acids and mannose, suggesting that these have a higher N-glycan content.

The chemical composition showed evidence that both CF and non-CF salivary glycopeptides were more sulfated than sialylated. High sulfation has already been described for high molecular weight salivary mucin MG1 (28) which contains 7.0% sulfate. For the lower molecular weight mucin (MG2), the sulfate content represent only 1.6% (28). Consequently, the high sulfate content described in our study can be attributed to the presence of glycopeptides from high molecular weight salivary mucins (MG1). Therefore, high molecular weight glycopeptides from human salivary mucins are more sulfated than sialylated on a molar basis, in contrast to several animal submaxillary mucins which are solely sialylated (38-40).

A main difference in the chemical composition between CF and non-CF salivary mucin glycopeptides concerns the sialic acid content, which is always higher in CF. These results are confirmed by the agarose gel electrophoresis where the toluidine blue staining of the CF glycopeptides was less intense after neuraminidase while the staining of the non-CF glycopeptides was not affected. Komiyama et al. (41) has suggested that there is a greater sialic content in CF saliva than in non-CF saliva, since they observed a higher release of sialic acid by endogenous neuraminidase in CF saliva. Nevertheless, these results are somehow conflicting with those of Menguy et al. (13) who observed a lower sialic acid release by endogenous neuraminidase in CF than in non-CF saliva. On the other hand, influenza viruses are known to bind to sialylated glycoconjugates and it has been shown that CF salivary mucins possess a larger capacity than control mucins to interact with *influenza B* virus, a property which is lost after neuraminidase

treatment (42). In contrast, lower sialylation has been described for CF intestinal mucin (43) and for proteins secreted by immortalized CF respiratory cell lines (8).

The sulfate and the fucose content of the higher-molecular-mass salivary glycopeptides (MS3) are also higher in CF. Increased sulfation of CF respiratory mucins (4-7) and of glycoconjugates secreted by CF epithelial cells in culture (2,3) have been reported. Increased fucosylation has also been observed in intestinal mucins (43), in mucoprotein from duodenal fluid of CF patients (14) and in plasma membranes of CF fibroblasts (44, 45).

Two types of explanations can be proposed to explain why CF salivary mucins are different from those of normal individuals.

First, salivary mucins are secreted by different salivary glands and it may be possible that, in CF, some glands are obstructed, therefore modifying the mucin distribution of whole CF saliva.

The other hypothesis is that cystic fibrosis somehow affects the biosynthesis of epithelial glycoproteins and mucins either at the glycosylation and / or at the sulfation level.

Human mucins comprise hundreds of carbohydrate chains, and the carbohydrate chains that have been isolated so far from respiratory (46), gastric (47, 48) or colonic origin (49, 50) have proved to be extremely diverse. In the case of human salivary mucins, 7 oligosaccharides have already been reported (15) but the diversity of carbohydrate chains is probably of the same order of magnitude as the respiratory mucins (manuscript in preparation). For respiratory mucins, the large-size carbohydrate chains contain several branches that have differences in terminal glycosylation due to variations in fucose, sialic acid or sulfate. Fucosylation and sialylation, or both fucosylation and sulfation may occur on the same carbohydrate chain, sometimes on the same branch (46); this is also true for sialylation and sulfation (unpublished results). Thus, these different

processes (fucosylation, sialylation, sulfation) are not necessarily competitive and may occur on one branch or on different branches of a given carbohydrate chain.

Normally, the structure of mucin carbohydrate chains differs from one mucin-synthesizing tissue to another depending on the glycosyltransferases expressed by these tissues. The addition of a "peripheral" element (fucose, sialic acid or sulfate) to a carbohydrate chain is due to the expression of a transferase, sulfo-, sialyl- or fucosyl-transferase and there are several fucosyl- and sialyl-transferases which are probably not equally expressed in every cell type and which act on different carbohydrate substrates (51). Evidence for tissue specific expression of glycosyltransferases has been shown for sialyltransferases and fucosyltransferases (52, 53).

The differences in fucosylation, sialylation or sulfation between CF mucins isolated from different secretions (salivary, intestinal or respiratory) may originate either from modifications of expression or activity of some of these sulfo-, sialyl- or fucosyltransferase involved in the periphery of the carbohydrate chain or / and from a modification of some of these glycosyltransferase(s) acting on the addition of internal sugar(s). In this regard, the increase in size of carbohydrate chains, observed in CF respiratory and intestinal mucins (4, 5, 43), may suggest the presence of more highly branched carbohydrate chains, each branch being differently substituted according to the level of expression of the different sulfo-, sialyl- or fucosyl-transferases in the respiratory and intestinal mucosae (in the salivary mucins from whole saliva, the N-acetylgalactosamine excess does not allow the calculation of the average size of the carbohydrate chains). Unfortunately, the knowledge concerning the biosynthesis of complex carbohydrate chains of mucins is still too limited to rapidly verify this hypothesis.

Cellular pH regulation may be an important factor in the regulation of glycosylation. A shift in the biosynthesis from "a" series to "b" series gangliosides of neuronal cell culture can be produced by lowering the pH of the culture medium from 7.4 to 6.2 : at this pH, the sialyltransferase II, the first enzyme to be involved

in the synthesis of "b" series gangliosides, is more active than the GalNAc-transferase, the first enzyme for the synthesis of "a" series gangliosides (54). A relationship has been observed between the decreased sialylation of glycoproteins secreted by CF respiratory immortalized cells and a defective acidification of the *trans*-Golgi network (8). If this abnormality is observed in different CF tissues, it might affect the relative activities of the different sialyl-, sulfo- or glycosyltransferases involved in the biosynthesis of mucins and other glycoconjugates.

In conclusion, the elucidation of the structural differences of the carbohydrate chains of salivary mucins in controls and CF saliva may lead to understanding the modifications in glycosylation occurring in CF. These modifications may have a biologic significance related to *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus* colonization.

**ACKNOWLEDGMENTS :** This work was supported by a grant from l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose. Thanks are due to M.C. Houvenaghel for her technical assistance and to Dr A. Herscovics for beneficial discussion.

## REFERENCES

1. Boat, T. F., M. J. Welsh, and A. L. Beaudet. 1989. Cystic Fibrosis. *In* The Metabolic basis of Inherited disease. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle editors. McGraw-Hill, New York. 6th edition. 2649-2680.
2. Cheng, P.-W., T. F. Boat, K. Cranfill, J. R. Yankaskas, and R. C. Boucher. 1989. Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 84:68-72.
3. Frates, R. C. Jr, T. K. Kaizu, and J. E. Last. 1983. Mucus glycoproteins secreted by respiratory epithelial tissue from cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.* 17:30-34.
4. Roussel, P., G. Lamblin, P. Degand, E. Walker-Nasir, and R. W. Jeanloz. 1975. Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* 250:2214-2222.
5. Lamblin, G., J.-J. Lafitte, M. Lhermitte, P. Degand, and P. Roussel. 1977. Mucins from cystic fibrosis sputum. *Mod. Probl. Paediat.* 19:153-164.
6. Boat, T. F., P. W. Cheng, and R. E. Wood. 1977. Tracheobronchial mucus secretion in vivo and in vitro by epithelial tissues from cystic fibrosis and control subjects. *Mod. Probl. Paediat.* 19:141-152
7. Chace, K. V., M. Flux, and G. P. Sachdev. 1985. Comparison of physicochemical properties of purified mucus glycoproteins isolated from

respiratory secretions of cystic fibrosis and asthmatic patients. *Biochemistry* 24:7334-7341.

8. Barasch, J., B. Kiss, A. Prince, L. Saiman, D. Gruenert, and Q. Al-Awqati. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352:70-73.
9. Houdret, N., R. Ramphal, A. Scharfman, J.-M. Perini, M. Filliat, G. Lamblin, and P. Roussel. 1989. Evidence for the in vivo degradation of human respiratory mucins during infection. *Biochim. Biophys. Acta* 992:96-105.
10. Lindemann, R. A., M. G. Newman, A. K. Kaufman, and T. V. Le. 1985. Oral colonization and susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* oral isolates from cystic fibrosis patients. *J. Dent. Res.* 64:54-57.
11. Komiyama, K., J. J. Tynan, B. F. Habbick, D. E. Duncan, and D. J. Liepert. 1985. *Pseudomonas aeruginosa* in the oral cavity and sputum of patients with cystic fibrosis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 59:590-594.
12. Woods, D. E., J. A. Bass, W. G. Johanson Jr., and D. C. Straus. 1980. Role of adherence in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 30:694-699.
13. Menguy, R., Y. F. Masters, and L. Desbaillets. 1970. Salivary mucins of patients with cystic fibrosis. Composition and susceptibility to degradation by salivary glycosidases. *Gastroenterology* 59:257-264.

14. Dische, Z., P. A. Di Sant'Agnes, C. Pallavicini, and Y. Youlos. 1959. Composition of mucoprotein fractions from duodenal fluid of patients with cystic fibrosis of the pancreas and from controls. *Pediatrics* 24:74-91.
15. Reddy, M. S., M. J. Levine, and A. Prakobphol. 1985. Oligosaccharide structures of the low-molecular-weight salivary mucin from a normal individual and one with cystic fibrosis. *J. Dent. Res.* 64:33-36.
16. Lamblin, G., A. Boersma, A. Klein, P. Roussel, H. Van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart. 1984. Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* 259:9051-9058.
17. Aminoff, D. 1961. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 81:384-392.
18. Lamblin, G., M. Lhermitte, P. Degand, P. Roussel, and H. S. Slayter. 1979. Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins. *Biochimie* 61:23-43.
19. Van-Seuning, I., and M. Davril. 1992. A rapid periodic acid-Schiff staining procedure for the detection of glycoproteins using the PhastSystem. *Electrophoresis*, in press.
20. Kim, K. C., H. Opsakar-Hincman, and K. R. Bhaskar. 1989. Secretions from primary hamster tracheal cells in culture : mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.* 15:299-314.

21. Paulsson, M., M. Dziadek, C. Suchanek, W. B. Huttner, and R. Timpl. 1985. Nature of sulphated macromolecules in mouse Reichert's membrane. *Biochem. J.* 231:571-579.
22. Barbero, G. J., and M. S. Sibinga. 1962. Enlargement of the submaxillary salivary glands in cystic fibrosis. *Pediatrics* 29:788-793.
23. Mandel, I. D., A. Kutscher, C. R. Denning, R. H. Thompson, and E. V. Zegarelli. 1967. Salivary studies in cystic fibrosis. *Amer. J. Dis. Child* 113:431-438.
24. Mayo, J. W., W. M. Wallace, L. W. Matthews, and D. M. Carlson. 1976. Quantitation of submandibular proteins resolved from normal individuals and children with cystic fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 175:507-513.
25. Doggett, R. G., B. Bentinck, and G. M. Harrison 1971. Structure and ultrastructure of the labial salivary glands in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 24:270-282.
26. Slayter, H. S., G. Lamblin, A. Le Treut, C. Galabert, N. Houdret, P. Degand, and P. Roussel. 1984. Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 142:209-218.
27. Lhermitte, M., J.-J. Lafitte, J.-M. Perini, C. Galabert, M. Filliat, G. Lamblin and P. Roussel. 1986. Concentration and distribution of soluble and insoluble macromolecules from sputum : a possible estimation of the hydration of sputum macromolecules. *Lung* 164:217-231.
28. Loomis, R. E., A. Prakobphol, M. J. Levine, M. S. Reddy, and P. C. Jones. 1987. Biochemical and biophysical comparison of two mucins



- from human submandibular and sublingual saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* 258:452-464.
29. Prakobphol, A., M. J. Levine, L. A. Tabak, and M. S. Reddy. 1982. Purification of low-molecular weight, mucin type glycoprotein from human submandibular and sublingual saliva. *Carbohydr. Res.* 108:111-122.
  30. Ramasubbu, N., M. S. Reddy, E. J. Bergey, G. G. Haraszthy, S. D. Soni, and M. J. Levine. 1991. Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem. J.* 280:341-352.
  31. Milne, R. W., and C. Dawes. 1973. The relative contributions of different salivary glands to the blood group activity of whole saliva in humans. *Vox Sang.* 25:298-307.
  32. Hounsell, E. F., A. M. Lawson, J. Feeney, H. C. Gooi, N. J. Pickering, M. S. Stoll, S. C. Lui, and T. Feizi. 1985. Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens. *Eur. J. Biochem.* 148:367-377.
  33. Blanchard, D., J.-P. Cartron, B. Fournet, J. Montreuil, H. Van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart. 1983. Primary structure of the oligosaccharide determinant of blood group Cad specificity. *J. Biol. Chem.* 258:7691-7695.
  34. Morton, J. A., M. M. Pickles, and A. M. Terry. 1970. The Sd<sup>a</sup> blood group antigen in tissues and body fluids. *Vox Sang.* 19:472-482

35. Veerman, E. C .I., M. Valentijn-Benz, R. A. Bank, and A .V. Nieuw Amerongen. 1989. Isolation of high molecular weight mucins from human whole saliva by ultracentrifugation. *J. Biol. Buccale* 17:307-312.
36. Hilkens, J., and F. Buijs. 1988. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263:4215-4222.
37. Kawagishi, S., R. E. F. Fahim, K. H. Wong, and A. Bennick. 1990. Purification and characterization of subunits of a high molecular weight human salivary mucin. *Arch. Oral Biol.* 35:265-272.
38. Gottschalk, A., and A. S. Bhargava. 1972. *Glycoproteins. Their composition, structure and function* (Edited by Gottschalk A.) 2nd edition, Chap. 7, section 4, p.810, B.B.A. Library, vol. 5, Elsevier, Amsterdam.
39. Carlson, D. M. 1968. Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* 243:616-626.
40. Tsuji, T., and O. Toshiaki. 1986. Carbohydrates structures of bovine submaxillary mucin. *Carbohydr. Res.* 151:391-402.
41. Komiyama, K., B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1987. Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 55:2364-2369.
42. Boat, T. F., J. Davis, R. C. Stern, and P. W. Cheng. 1979. Effect of blood group determinants on binding of human salivary mucous glycoproteins to

- influenza virus. *In Glycocojugate Research*. J.D. Gregory, and R.W. Jeanloz, editors. Academic Press, New York, 503-505.
43. Wesley, A., J. Forstner, R. Qureshi, M. Mantle, and G. Forstner. 1983. Human intestinal mucin in cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* 17:65-69.
  44. Scanlin, T. F., Y. M. Wang, and M. C. Glick. 1985. Altered fucosylation of membrane glycoproteins from cystic fibrosis fibroblasts. *Pediatr. Res.* 19:368-374.
  45. Bertrand, F., B. Hermelin, A. Paul and J. Picard. 1991. Pericellular glycoconjugates of cultured fibroblasts from control and cystic fibrosis patients. *Int. J. Biochem.* 23:51-57
  46. Lamblin, G., M. Lhermitte, A. Klein, N. Houdret, A. Scharfman, R. Ramphal, and P. Roussel. 1991. The carbohydrate diversity of human respiratory mucins : a protection of the underlying mucosa. *Am. Rev. Resp. Dis.* 144:s19-s24.
  47. Slomiany, B. L., E. Zdebska, and A. Slomiany. 1984. Structural characterization of neutral oligosaccharides of human H<sup>+</sup>Le<sup>b+</sup> gastric mucin. *J. Biol. Chem.* 259: 2863-2869.
  48. Slomiany, A., E. Zdebska, and B. L. Slomiany. 1984. Structures of the neutral oligosaccharides isolated from A-active human gastric mucin. *J. Biol. Chem.* 259: 14743-14749.
  49. Podolski, D. K. 1985. Oligosaccharide structures of human colonic mucin. *J. Biol. Chem.* 260:8262-8271.

50. Podolski, D. K. 1985. Oligosaccharide structures of isolated human colonic mucin species. *J. Biol. Chem.* 260:15510-15515.
51. Schachter, H., and I. Brockhausen. 1989. The biosynthesis of branched O-glycans. In *Mucus and related topics*. E. Chantler, and N.A. Ratcliffe, editors. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. XLIII: 1-26.
52. Paulson, J. C., J. Weinstein, and A. Schauer. 1989. Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J. Biol. Chem.* 264:10931-10934
53. Mollicone, R., A. Gibaud, A. François, M. Ratcliffe, and R. Oriol. 1990. Acceptor specificity and tissue distribution of three human  $\alpha$ -3-fucosyltransferases. *Eur. J. Biochem.* 191:169-176
54. Iber, H., G. van Echten, R. A. Klein, and K. Sandhoff. 1990. pH-dependent changes of gangliosides biosynthesis in neuronal cell culture. *Eur. J. Cell Biol.* 52:236-240.

## Arylneuraminidase Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Does Not Degrade Natural Substrates Such as Human Respiratory Mucins

ANDREE SCHARFMAN,<sup>1</sup> REUBEN RAMPHAL,<sup>2\*</sup> CHRISTEL NEUT,<sup>3</sup> CHRISTOPHE CARNOY,<sup>1</sup>  
GENEVIEVE LAMBLIN,<sup>1</sup> AND PHILIPPE ROUSSEL<sup>1</sup>

Unité Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, 59045 Lille,<sup>1</sup> and Laboratoire de Microbiologie,  
Faculté de Pharmacie Université de Lille, Lille,<sup>3</sup> France, and Department of Medicine, University of Florida  
College of Medicine, JHMHC Box J-277, Gainesville, Florida 32610<sup>2</sup>

Received 15 April 1991/Accepted 3 September 1991

The culture supernatant from a single *Pseudomonas aeruginosa* strain has been reported to show neuraminidase activity, leading to the speculation that this bacterium may use this enzyme as a virulence factor to act on host macromolecules. In order to extend this finding, we have examined the activity of concentrated *P. aeruginosa* culture supernatants and cells on synthetic and natural substrates containing sialic acid, such as human respiratory mucins. Four *P. aeruginosa* strains showed some activity on the synthetic substrate 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid but failed to liberate N-acetylneuraminic acid from six different natural substrates. Attempts to induce enzyme production by use of human respiratory mucins in the culture medium were also unsuccessful. The supernatants also showed N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase-like activity on a synthetic substrate but did not liberate N-acetylhexosamines from natural substrates. We conclude that the neuraminidase-like activity observed in *P. aeruginosa* can be defined as an arylneuraminidase and that the possession of a neuraminidase active on natural substrates is not a common attribute of *P. aeruginosa* strains.

Microbial neuraminidases are considered to be virulence factors which assist in the invasion and the spread of organisms within the host (14). Therefore, any evidence that a bacterium possesses this enzyme would suggest that it plays a role in pathogenesis. For organisms that colonize mucosal surfaces, such an enzyme would be useful to digest mucus to allow closer approximation of the organism to cells and/or to modify cellular surfaces to create receptors. Thus, this would certainly be an important attribute of mucosal pathogens.

*Pseudomonas aeruginosa*, the major mucosal colonizer in cystic fibrosis (5), has been reported to produce a neuraminidase, but little has been learned about the characteristics of this enzyme since the initial report (8). It has recently been suggested that the neuraminidase activity of *P. aeruginosa* that was shown for a synthetic substrate (3) could play a role in the virulence of this organism by degrading gangliosides to produce their asialo derivatives, which have been shown to be receptors on cells (6). If this neuraminidase activity were capable of degrading natural substrates such as glycoproteins or glycolipids, such a role could then be supported, but the data in this regard are scant (8). Additionally, such an enzyme could not only create binding sites as suggested but also modify the carbohydrate chains of mucins whose structures are now partially known in cystic fibrosis (2) and thus modify the mucin barrier to bacterial adhesion to cells (10, 11). It is therefore extremely important to confirm and characterize the substrate specificity of this activity which has so far been reported for 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MU-Neu5Ac) (3) and bronchial mucins (8).

The aim of the present work was therefore to look for the production of neuraminidase in *P. aeruginosa* strains and to determine whether sialic acid is liberated from different natural substrates.

Four *P. aeruginosa* strains were used in this study. Two mucoid strains (M2192 and M35) and two nonmucoid strains (PAK and 1244) were grown to late logarithmic phase at 37°C in M-9 medium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 33 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22 mM; NaCl, 88 mM; NH<sub>4</sub>Cl, 18 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1 mM; 1 mg of thiamine per liter) containing 0.2% glucose as a carbon source. In some cases FeCl<sub>2</sub> was added at a concentration of 10 mM. After centrifugation the supernatants were concentrated 10-fold on a YM5 Amicon membrane (cutoff, 5 kDa [Amicon S.A.R.L., Paris, France]) and then washed with 10 volumes of phosphate-buffered saline to remove low-molecular-weight substances. Some cultures also contained mucin glycopeptides (2 mg/ml) to act as an inducer of neuraminidase (8). The cell pellet was washed twice in 33 mM phosphate buffer, pH 6 (8). Enzymatic activity was determined with the supernatants and cell suspensions (10<sup>8</sup> cells per ml). To determine intracellular activity, bacteria were disrupted by ultrasonic treatment as described by Leprat and Michel-Briand (8).

The protein content of the supernatants was determined by the Coomassie blue method of Spector (15). The results were expressed as milligrams per milliliter.

Neuraminidase activity from the cultures was assayed by the method of Potier et al. (9) with the synthetic substrate MU-Neu5Ac (Sigma, St. Louis, Mo.): 100  $\mu$ l of 50 mM MU-Neu5Ac was mixed with 50  $\mu$ l of 33 mM phosphate buffer at different pHs (from 5 to 7, in increments) and 50  $\mu$ l of the concentrated supernatant. Incubation was carried out for 4 and 24 h. The reaction was stopped by the addition of 2.8 ml of 0.2 M glycine buffer, pH 10.7 (13). The fluorescence of released 4-methylumbelliferone was measured at a 365-nm excitation wavelength and 448-nm emission wavelength with a spectrofluorometer. The instrument was calibrated with 4-methylumbelliferone standard solution, and 1 U of enzyme activity was defined as 1 nmol of substrate hydrolyzed per min per mg of protein of the supernatant.

Neuraminidase activity on different natural substrates was also studied (Table 1). In this case the incubation mixture contained 200  $\mu$ l of substrate, 100  $\mu$ l of buffer at the optimum

\* Corresponding author.

TABLE 1. Natural substrates for neuraminidase assay

Substrate <sup>a</sup>	Type of linkage of sialic acid	Type of oligosaccharide
$\alpha_1$ acid glycoprotein	$\alpha$ -2-6-Gal, $\alpha$ -2-3-Gal	N linked
Bovine submandibular mucin	$\alpha$ -2-6-GalNAc	O linked
Neuraminyl-lactose from bovine colostrum	$\alpha$ -2-3-Gal (85%), $\alpha$ -2-6-Gal (15%)	Free
Neuraminyl-lactose from human milk	$\alpha$ -2-6-Gal (85%), $\alpha$ -2-3-Gal (15%)	Free
Brain ganglioside (type III)	$\alpha$ -2-8-Neu5Ac, $\alpha$ -2-3-Gal	Ganglioside
Glycoproteins from respiratory mucin	$\alpha$ -2-3-Gal, $\alpha$ -2-6-GalNAc	O linked

<sup>a</sup> All substrates except the human respiratory mucin glycopeptides were provided by Sigma. Glycopeptides from human respiratory mucin were prepared according to the method of Lamblin et al. (7).

pH, and 200  $\mu$ l of culture supernatant, and free sialic acid was measured by a modification of the thiobarbituric acid procedure of Aminoff (1) after 24 h of incubation at 37°C. We also looked for the activity of *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase by using 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (Sigma) as previously described (13). One unit of enzymatic activity was defined as 1 nm of substrate hydrolyzed per min per mg of protein of the supernatant. Liberation of free *N*-acetylhexosamines from bronchial and bovine submaxillary mucins was determined by the method of Reissig et al. (12).

The optimal pH determined with MU-Neu5AC was in the range of pH 6.5; this value is similar to that previously obtained (8). However, activity on natural substrates was also tested at pH 5.0, at which bacterial neuraminidases are most active (14).

The values for arylneuraminidase-specific activity obtained for the four strains with MU-Neu5AC are reported in Table 2. These values obtained from concentrated culture supernatants are different from one strain to another. They are close to the values obtained for the neuraminidase of *Actinomyces viscosus* (16). *N*-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity determined with methylumbelliferyl-*N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide as a substrate is also shown in Table 2.

While there was some activity of the synthetic substrate, none of the four *Pseudomonas* strains liberated sialic acid after incubation with the natural substrates (Table 1), despite a variety of different sialic acid linkages and pHs. The same results were obtained for *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, in that we were not able to find any free *N*-acetylglucosamine after incubating bovine submaxillary and bronchial mucins with supernatant, but there was activity with the synthetic substrate. *Clostridium perfringens* neuraminidase (Sigma) was used as a positive control for activity on each substrate in each experiment. In each case sialic acid was liberated. We also tested whether calcium enhanced enzymatic activity, but there was no difference in activity on either natural or synthetic substrates with all four strains of *P. aeruginosa*

in the presence of calcium. Additionally, neither whole nor sonicated *P. aeruginosa* cells liberated sialic acid.

This level of activity on synthetic substrate should liberate sialic acid, as shown with *A. viscosus* (16), if a classic neuraminidase were present. Thus, this activity on synthetic substrates can be defined as an arylneuraminidase, but its significance is not known. Falk et al. (4) have shown that for human intestinal microbiota, *para*-nitrophenyl glycoside degradation was often incompatible with the data on glycolipid degradation. The same assertion may be true for *P. aeruginosa*.

According to some authors (8, 16), neuraminidase is an inducible enzyme. We therefore tried to grow *P. aeruginosa* in medium containing glycopeptides of human respiratory mucin. Even in this situation, we did not observe the liberation of sialic acid after 24 h of incubation with the substrates.

It has been suggested that this neuraminidase-like activity of *P. aeruginosa* on synthetic substrates is able to liberate sialic acid from epithelial cells (3), which would be potentially important in the pathogenesis of *P. aeruginosa* infections since it would create receptor sites for adhesion, but we have not been able to demonstrate the liberation of sialic acid even from gangliosides; therefore, this suggestion cannot be supported.

In summary, the present data do not support the notion that *P. aeruginosa* synthesizes a neuraminidase which acts on natural substrates. It should be noted that in the original communication, Leprat and Michel-Briand found this activity in 1 of 50 strains tested (8). Therefore, this activity cannot be a common property of *P. aeruginosa* strains and hence is not a general virulence determinant of this organism.

This work was supported by grants from the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (France), the Cystic Fibrosis Foundation (United States), and a joint project between INSERM (France) and NHLBI (United States).

## REFERENCES

- Aminoff, D. 1961. Methods for quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysate of sialomucins. *Biochem. J.* 81:384-391.
- Breg, J., H. Van Halbeek, J. F. G. Vliegthart, G. Lamblin, M. C. Houvenaghel, and P. Roussel. 1987. Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis. *Eur. J. Biochem.* 168:57-68.
- Calcano, G., L. Saiman, and A. Prince. 1990. *Pseudomonas aeruginosa* receptors on cultivated cystic fibrosis epithelial cells can be exposed by *P. aeruginosa* neuraminidase. Program Papers 4th Annu. North Am. 1990 Int. Cystic Fibrosis Conf., abstr. 194.
- Falk, P., L. C. Hoskins, and G. Larson. 1990. Bacteria of the human intestinal microbiota produce glycosidases specific for lacto-series glycosphingolipids. *J. Biochem.* 108:466-474.

TABLE 2. Extracellular neuraminidase and *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activities of four strains of *P. aeruginosa*

Strain	Activity <sup>a</sup>	
	Neuraminidase-like	<i>N</i> -acetyl- $\alpha$ -D-glucosaminidase-like
PAK	0.20	0.80
1244	0.06	0.60
M35	0.65	0
M2192	0.30	0.80

<sup>a</sup> In nanomoles of substrate hydrolyzed by the supernatant per minute per milligram of protein. Activities were determined using methylumbelliferyl derivatives as described in the text.

5. Gillian, P. H. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:35-51.
6. Krivan, C. H., D. D. Robertsand, and W. Ginsburg. 1988. Many pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc  $\beta$ 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6147-6161.
7. Lamblin, G., M. Lhermitte, P. Degand, P. Roussel, and H. S. Slayter. 1979. Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoprotein. *Biochimie* 61:23-43.
8. Leprat, R., and Y. Michel-Briand. 1980. Extracellular production of neuraminidase by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis. *Ann. Microbiol.* 131B:211-227.
9. Potier, L., B. Mamelin, L. Belisle, L. Dallaire, and S. B. Melancon. 1979. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuramininate) substrate. *Anal. Biochem.* 94:287-296.
10. Ramphal, R., C. Guay, and G. B. Pier. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* adhesins for tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.* 55:600-603.
11. Ramphal, R., and M. Pyle. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* 41:339-344.
12. Reissig, J. E., J. L. Strominger, and L. F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl-amino sugars. *J. Biol. Chem.* 217:959-966.
13. Sablonniere, B., A. Scharfman, J. J. Lafitte, A. Laine, C. Aerst, and A. Hayem. 1983. Enzymatic activities of bronchoalveolar lavages in coal workers pneumoconiosis. *Lung* 161:219-228.
14. Schauer, R. 1982. Chemistry metabolism and biological functions of sialic acid. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40:131-134.
15. Spector, T. 1979. Refinement of Coomassie blue method of protein quantitation. A simple linear spectrophotometric assay for 0.5 to 50  $\mu$ g of protein. *Anal. Biochem.* 86:142-150.
16. Teufel, M., P. Roggentin, and R. Schauer. 1989. Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM.43798. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370:435-443.

**THE BINDING OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA TO SALIVARY  
GLYCOPEPTIDES FROM PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS**

**CHRISTOPHE CARNOY, REUBEN RAMPHAL\*, NICOLE HOUDRET, ANDRE KLEIN,  
ANDREE SCHARFMAN, PHILIPPE ROUSSEL, AND GENEVIEVE LAMBLIN**

Unité INSERM n°16, Place de Verdun, 59045 Lille, France, and \* Department of  
Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida 32610, USA

*Running title:* P. aeruginosa adhesion to CF salivary mucins

*Address correspondence to :* G. LAMBLIN, Unité INSERM n°16, Place de Verdun,  
F-59045 Lille Cedex, France.



## ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is the most common pathogen involved in respiratory infection of patients with cystic fibrosis (CF) and it has been established that this bacterium recognizes respiratory mucins. Since respiratory tract secretions from CF patients may be modified because of infection, and since CF salivary secretions appear non infected, we investigated the adhesion of P. aeruginosa to salivary mucin glycopeptides from patients with CF and from non-CF subjects in order to ascertain whether there are differences in the recognition of these mucins by this organism. The glycopeptides were prepared by proteolysis of whole saliva from two groups of CF patients, one CF individual, two groups of non-CF subjects and one non-CF individual. The adhesion of a non-mucoid strain of P. aeruginosa (1244), of the non-piliated isogenic mutant of 1244, and of a mucoid strain (M35) was studied. The three strains bound significantly more to the CF salivary glycopeptides than to the corresponding non-CF salivary glycopeptides. The non-piliated isogenic mutant of P. aeruginosa 1244 bound as well as the wild type strain, suggesting that the adhesion of P. aeruginosa to CF salivary glycopeptides was mediated mainly by non-pilus adhesins. Chemical analyses showed that CF glycopeptides had a higher proportion of sialic acid than the non-CF glycopeptides. Furthermore, neuraminidase treatment of CF glycopeptides decreased the adhesion of P. aeruginosa. Altogether these results suggested that differences in mucins may in part explain the specificity of P. aeruginosa for CF and this specificity may be related to the sialic acid content of CF mucins.

## INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is the major pathogen in pulmonary infections of patients with cystic fibrosis (CF) and frequently leads to fatal pulmonary insufficiency (5). The reasons for this specificity of colonization are not yet fully elucidated but existing data may shed some light on this. This organism has a marked affinity for mucins (18, 20) possibly implicating this substance in colonization. Since the possibility that abnormal glycosylation in CF is in some way responsible for this infection has not been discounted (3), a detailed knowledge of the interaction of this pathogen with these glycoproteins may provide the clues to this specificity.

In order to pursue such studies, it would be necessary to compare adhesion to both CF and non-CF respiratory mucins, but recently, Houdret et al. have suggested that there is degradation of respiratory mucins during the P. aeruginosa infection in CF (6) and Rose et al. (19) have observed that CF respiratory mucins were shorter in length than non-CF mucins also suggesting degradation. Ramphal et al. have observed differences in the binding of P. aeruginosa to mucin glycopeptides from patients with CF and with chronic bronchitis (17), and also suggested that CF mucins may be degraded. Thus, it would be better to study mucins from non-infected secretions in order to pursue the possibility of an abnormality of mucin glycosylation as a factor responsible for the initial stage of P. aeruginosa infection in CF. Non-infected bronchial secretions are however uncommon in this disease, thus another approach may have to be used. We have therefore reasoned that if a glycosylation abnormality of respiratory mucins was the cause for the predominance of P. aeruginosa in this disease, this might be a more general abnormality existing in other mucus secretions. In this regard, the study of CF saliva, which can be obtained fresh, with a minimum of bacterial contamination, could be used as a substitute for respiratory secretion.

In the present investigation, we compared the binding of different strains of P. aeruginosa to salivary glycopeptides prepared from the whole saliva of (i) one individual and 2 groups of patients with CF and (ii) one individual and 2 groups of normal subjects.

We report that P. aeruginosa has a higher affinity for certain salivary glycopeptides from CF patients than for salivary glycopeptides with similar molecular size obtained from normal subjects. Moreover, we show that the adhesion to these CF salivary glycopeptides seems to be mediated by sialic acid and by non-pilus adhesins.

## MATERIALS AND METHODS

### Saliva

Whole saliva was collected from two groups of three CF patients (pool I and II) and from one patient suffering from a mild form of CF. Salivas from non-CF individuals were gathered in two pools with seven persons in pool I and three in pool II. Saliva from one non-CF individual was also studied. Thus, altogether, seven CF and eleven non-CF salivas were studied. All the sample were obtained from individuals with blood group O.

The saliva was collected without stimulation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Before use for experimentation, the saliva was clarified by centrifugation at  $3000 \times g$  for 20 min at  $+4^{\circ}\text{C}$  dialyzed and lyophilized.

### Preparation of salivary glycopeptides

The clarified dialyzed saliva was digested with pronase (Calbiochem, San Diego, Ca.) in 0.01M calcium acetate at pH 7 for 48 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with an enzyme / substrate ratio of 1/40 followed by a second digestion after 24 h. The mixture was then centrifuged at  $3000 \times g$  for 30 min. The supernatant was lyophilized and submitted to gel-filtration on a Sepharose CL-2B column (49 x 2.5 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated in 6M guanidinium hydrochloride (Fluka, Buchs, Switzerland). The retained fractions from the above column were submitted to a second gel-filtration on a Sepharose CL-6B column (49 x 2.5 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) eluted under the same conditions.

Protein was detected by absorbance at 278 nm and the neutral sugars by an automated orcinol assay (4). The fractions obtained were dialyzed exhaustively to remove guanidinium hydrochloride, and lyophilized.

### Chemical composition

The carbohydrate composition of the glycopeptides fractions was performed by gas liquid chromatography as previously described (11).

N-acetylneuraminic acid was measured by the thiobarbituric acid assay of Aminoff (1). The sulfate content was measured by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) (Lo Guidice *et al.*, manuscript in preparation). The amino acid analysis was performed as previously described (12).

#### Neuraminidase treatment

CF salivary glycopeptides were dissolved in 0.1 M sodium acetate pH 5.0 at the concentration of 1.5 mg / ml. Neuraminidase (EC 3.2.1.18) (0.0035 unit) purified from *Clostridium perfringens* (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) was dissolved in 0.1 M sodium acetate pH 5.0 and added to the glycopeptides. The mixture was incubated 24 h at 37°C. A second treatment with 0.0035 unit of neuraminidase was performed for 24 h at 37°C. The released sialic acid was measured by the thiobarbituric acid assay (1). The glycopeptides were dialyzed, lyophilized before use in adhesion assay.

#### Bacterial strains

Mucoid strain (M35) and non-mucoid strain (1244) of *P. aeruginosa* were previously described (16). The non-piliated strain of *P. aeruginosa* 1244 NP was provided kindly by Dr S. Lory from the University of Washington (Seattle). *P. aeruginosa* strains were kept on MacConkey agar (Difco laboratories, Detroit, Mi.) at room temperature and were grown up in Trypticase soy broth (Difco Laboratories, Detroit, Mi.) overnight at 37°C before use in the adhesion assay.

#### Bacterial adhesion assay

The bacterial adhesion assay on microtiter plates (Flow, Mc Lean, Va, catalog n° 76-242-05) has been previously described (20). Briefly, the wells of a microtiter plate were coated with salivary glycopeptides. Then, the bacterial suspension was added in each well at a concentration between  $5 \times 10^6$  and  $5 \times 10^7$  bacteria per ml. The unbound bacteria were removed by washing the wells with phosphate-buffered saline (PBS) and the bacteria adherent to the glycopeptides were desorbed by adding

a 0.5 % solution of Triton X 100. After dilution and plating in duplicate on Petri dishes, the bacteria were quantified. A set of uncoated wells was used as negative control. All the experiments were performed at least 3 times with 2 wells per experiment. Results were expressed in colonies forming units (CFU)/well. They represented the average of twelve values corresponding to the number of bacteria for each well. For statistical evaluation of the results, the t-test was used with  $p = 0.05$  as the limit of significance.

## RESULTS

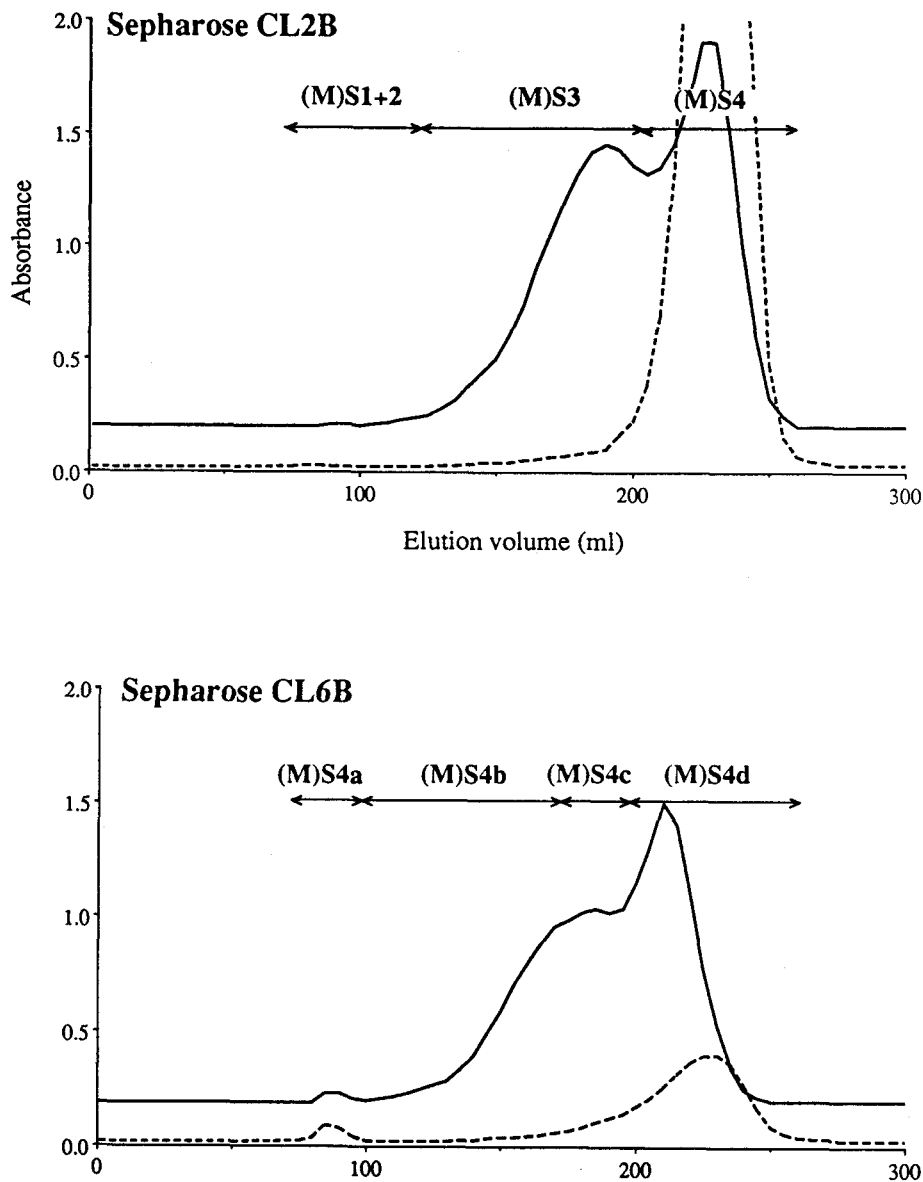
### Characterization of the salivary fractions

The pronase treated supernatants of the clarified saliva were filtered on Sepharose CL-2B. The elution patterns showed 3 fractions called MS1+2, MS3, MS4 for CF saliva and S1+2, S3, S4 for non-CF saliva (Fig.1, top). High (MS3 and S3) and low (MS4 and S4) molecular weight glycopeptides were chosen for their adhesion activity. MS4 and S4 were further fractionated on a column of Sepharose CL-6B into 4 subfractions (MS4a, MS4b, MS4c, MS4d for the CF saliva and S4a, S4b, S4c, and S4d for the non-CF saliva) (Fig.1, bottom). Since MS4d and S4d had no affinity for *P. aeruginosa*, their chemical analysis was not shown.

### Chemical composition

The carbohydrate and amino acid compositions of MS3 and MS4 subfractions from CF saliva and S3 and S4 subfractions from non-CF saliva are presented in Table 1 and more largely developed in Carnoy *et al.* (manuscript submitted). The high molecular weight glycopeptides (MS3 and S3) had the most characteristic mucin composition since they contained around 40% of hydroxyamino acids and the classical mucin sugars as N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, galactose and fucose. The low molecular weight glycopeptides (MS4b, MS4c and S4b, S4c) presented a decrease of the quantity of carbohydrates and hydroxyamino acids but still had a mucin-type composition.

A main difference between the CF and non-CF chemical composition concerned the sialic acid of CF glycopeptides which was at least two fold that of the non-CF.



**Figure 1:** Sepharose CL-2B chromatography of pronase treated saliva (top). (MS) correspond to salivary fractions from CF patients and (S) to the fractions from non-CF subjects. MS4 and S4 have been fractionated on Sepharose CL-6B (bottom). The eluting solution was 6M guanidinium hydrochloride. 5 ml fractions were analyzed for neutral sugars (solid line) and for absorbance at 278 nm (broken line).



TABLE 1: Chemical composition of CF and non-CF salivary glycopeptides

	CF saliva			non-CF saliva		
	MS3	MS4b	MS4c	S3	S4b	S4c
<b><u>Amino Acids</u> *</b>	100	100	100	100	100	100
Serine + Threonine	39.2 ± 1.5	34 ± 3.7	28.5 ± 3.6	35.6 ± 1.5	34.1 ± 3.2	27.2 ± 3.6
<b><u>Carbohydrates</u> *</b>	290.1 ± 2.8	182.2 ± 46.7	141.1 ± 21.8	278.2 ± 15.4	159.4 ± 41	106.9 ± 30
Fucose	69.8 ± 3.8	33.9 ± 4.1	27.8 ± 5.2	53.5 ± 4.9	23.3 ± 4.4	15.4 ± 5.2
Mannose	2.2 ± 1	2.7 ± 1.2	6.5 ± 0.7	3 ± 1.3	1.9 ± 0.6	7.2 ± 2.8
Galactose	100.6 ± 7.1	66.7 ± 16	49.7 ± 10.1	91.2 ± 4	59 ± 9.8	34.5 ± 11
Glucose	4.9 ± 2.1	4.9 ± 1.8	3.6 ± 1.2	8.9 ± 3.1	6.9 ± 2.2	6.1 ± 3.3
N-Acetylgalactosamine	48.5 ± 7.5	27.8 ± 7.5	20.2 ± 1.7	49.6 ± 4.3	24.7 ± 8.8	15 ± 5
N-Acetylglucosamine	75.7 ± 8.2	42 ± 14	30.4 ± 3	67.6 ± 4.2	41.1 ± 17	27.2 ± 10
N-Acetylneuraminic Acid	8.5 ± 2	6.7 ± 2	4.9 ± 1.6	4 ± 0.3	1.9 ± 0.5	1.2 ± 0.2
Sulfate	29.5 ± 4.5	34.8 ± 8.4	21 ± 6.9	21.2 ± 1.8	26.9 ± 13.1	13.5 ± 4.5

\* Results are expressed in residues / 100 residues of amino acids and correspond to the mean of 3 values (pool I, pool II and Indiv.) ± standard deviation

### Adhesion studies

The results of adhesion of non-mucoid (1244), non-piliated (1244NP) and mucoid (M35) strains of P. aeruginosa to mucin glycopeptides from CF and non-CF saliva are presented in Tables 2 to 6. None of the studied strains showed binding to CF fractions MS4a and MS4d and non-CF fractions S4a and S4d (data not shown).

#### - Non-mucoid strain 1244

The non-mucoid strain of P. aeruginosa (1244) bound strongly ( $>100 \times 10^2$  CFU / well) to 7 CF glycopeptide fractions out of 9, but to only 1 non-CF fraction among 9 (Table 2). Table 3 presents the t-test comparisons of the means, expressing the level of adhesion of the strain 1244. Concerning the MS4c and S4c fractions, the adhesion of P. aeruginosa was significantly higher for CF fractions than for non-CF, except for one single fraction (S4c of pool I) (Tables 2 and 3C). Furthermore, the non significant differences of adhesion between CF MS4b pool II and non-CF S4b pool I and II could be explained by the low binding of P. aeruginosa to the former (Table 3B). With regard to fraction 3 (MS3 vs S3), P. aeruginosa 1244 bound about ten time more to the CF glycopeptides than to the non-CF except for the individual MS3 where the binding is surprising low (Tables 2 and 3A).

The binding of a pilin structural gene mutant of P. aeruginosa 1244, called 1244 NP, has been also studied (Table 4). We noticed a striking similarity between the binding of 1244 NP and the binding of 1244 to the mucin glycopeptides, except in a single case (MS3 pool II) where the pilated strain 1244 bound more strongly than the non-piliated 1244 NP. These results suggested that the binding of non-mucoid P. aeruginosa to the mucin glycopeptides is mediated by a non-pilus adhesin.

TABLE 2 : Adhesion of non-mucoid piliated *P. aeruginosa* 1244 to salivary mucin glycopeptides

CFU/well ( $10^2$ )  $\pm$  standard deviation

	CF saliva			non-CF saliva		
	MS3	MS4b	MS4c	S3	S4b	S4c
Pool I	273 $\pm$ 87	270 $\pm$ 68	250 $\pm$ 98	21 $\pm$ 6	55 $\pm$ 38	232 $\pm$ 175
Pool II	140 $\pm$ 85	73 $\pm$ 51	359 $\pm$ 185	14 $\pm$ 10	68 $\pm$ 53	31 $\pm$ 24
Indiv.	1 $\pm$ 1	223 $\pm$ 124	270 $\pm$ 144	10 $\pm$ 7	6 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1

Inoculum =  $2 \times 10^7$  bact./ml

TABLE 3 : t-Test comparison of means representing the adhesion of non-mucoid *P. aeruginosa* 1244 to CF and non-CF salivary mucin glycopeptides (n = 12)

		A			B			C				
		MS3 vs S3			MS4b vs S4b			MS4c vs S4c				
		CF MS3			CF MS4b			CF MS4c				
		<u>Pool I</u>	<u>Pool II</u>	<u>Indiv.</u>	<u>Pool I</u>	<u>Pool II</u>	<u>Indiv.</u>	<u>Pool I</u>	<u>Pool II</u>	<u>Indiv.</u>		
		273±87	140±85	1±1	270±68	73±51	223±124	250±98	359±185	270±144		
non-CF S3	<u>Pool I</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001*	<u>Pool I</u>	p<0.001	NS	p<0.001	<u>Pool I</u>	NS	NS	NS
		21±6			55±38			232±175				
	<u>Pool II</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001*	<u>Pool II</u>	p<0.001	NS	p<0.001	<u>Pool II</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001
		14±10			68±53			31±24				
	<u>Indiv.</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001*	<u>Indiv.</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001	<u>Indiv.</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001
		10±7			6±4			1±1				

\* non-CF > CF

NS = non significant for p>0.05

Adhesion values are expressed in CFU/well (10<sup>2</sup>) ± standard deviation

TABLE 4 : Adhesion of non-mucoid non-piliated *P. aeruginosa* 1244 NP to salivary mucin glycopeptides

CFU/well ( $10^2$ )  $\pm$  standard deviation

	CF saliva			non-CF saliva		
	MS3	MS4b	MS4c	S3	S4b	S4c
Pool I	311 $\pm$ 124	210 $\pm$ 68	185 $\pm$ 55	23 $\pm$ 16	27 $\pm$ 11	280 $\pm$ 55
Pool II	15 $\pm$ 12	75 $\pm$ 23	434 $\pm$ 44	8 $\pm$ 7	54 $\pm$ 25	2 $\pm$ 0.4
Indiv.	5 $\pm$ 4	450 $\pm$ 34	416 $\pm$ 107	7 $\pm$ 3	11 $\pm$ 10	3 $\pm$ 2

Inoculum =  $2 \times 10^7$  bact./ml

### - Mucoid strain M 35

The mucoid strain of *P. aeruginosa* (M35) bound to the CF glycopeptides in significantly higher numbers than to the non-CF glycopeptides (Tables 5 and 6). For 2 cases among 27, the differences in adhesion between CF and non-CF was not significant (MS4b pool II vs S4b pool II and MS4c pool II vs S4c pool I) (Tables 6B and 6C). It is noteworthy that the mucoid *P. aeruginosa* adhered to high and low molecular weight CF glycopeptides in different numbers (Table 5). Indeed, the adhesion to the fractions MS3 was relatively low ( $<100 \times 10^2$  CFU / well) compared to the binding to the other CF glycopeptides MS4b and MS4c ( $>100 \times 10^2$  CFU/well). Furthermore, the adhesion of *P. aeruginosa* (M35) to MS4b and MS4c depends on the studied saliva. In the pool I these glycopeptides showed a strong affinity for *P. aeruginosa* (M35) whereas those from the individual and especially those from the pool II presented less affinity. Thus, the mucoid strain M35 bound largely and significantly more to CF glycopeptides.

### Effect of neuraminidase treatment on adhesion to CF glycopeptides

In order to investigate the relationship between the sialic acid content and the adhesion of *P. aeruginosa*, the binding of *P. aeruginosa* was studied before and after treatment with neuraminidase of the glycopeptides from fractions MS3 pool I, MS4b Indiv. and MS4C Indiv. The quantitation of the released sialic acid revealed that neuraminidase removed 85% to 90% of the sialic acid from the glycopeptides. The binding of the non-mucoid strain 1244 of *P. aeruginosa* to the neuraminidase treated glycopeptides was greatly reduced as compared to the adhesion to the non-treated glycopeptides suggesting a role of sialic acid in adhesion of *P. aeruginosa* (Table 7).

TABLE 5 : Adhesion of mucoid *P. aeruginosa* M35 to salivary mucin glycopeptides

CFU/well ( $10^2$ )  $\pm$  standard deviation

	CF saliva			non-CF saliva		
	MS3	MS4b	MS4c	S3	S4b	S4c
Pool I	89 $\pm$ 61	802 $\pm$ 68	558 $\pm$ 33	13 $\pm$ 8	40 $\pm$ 17	104 $\pm$ 56
Pool II	76 $\pm$ 59	123 $\pm$ 84	100 $\pm$ 70	2 $\pm$ 0.7	150 $\pm$ 64	22 $\pm$ 18
Indiv.	49 $\pm$ 9	242 $\pm$ 138	187 $\pm$ 116	18 $\pm$ 10	2 $\pm$ 0.8	6 $\pm$ 4

Inoculum =  $2 \times 10^7$  bact./ml

TABLE 6 : t-Test comparison of means representing the adhesion of mucoid *P. aeruginosa* M35 to CF and non-CF salivary mucin glycopeptides (n = 12)

A				B				C			
MS3 vs S3				MS4b vs S4b				MS4c vs S4c			
CF MS3				CF MS4b				CF MS4c			
	<u>Pool I</u>	<u>Pool II</u>	<u>Indiv.</u>		<u>Pool I</u>	<u>Pool II</u>	<u>Indiv.</u>		<u>Pool I</u>	<u>Pool II</u>	<u>Indiv.</u>
	89±61	76±59	49±9		802±68	123±84	242±138		558±33	100±70	187±116
<u>Pool I</u>	p<0.001	p<0.005	p<0.001	<u>Pool I</u>	p<0.001	p<0.005	p<0.001	<u>Pool I</u>	p<0.001	NS	p<0.05
13±8				40±17				104±56			
<u>Pool II</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001	<u>Pool II</u>	p<0.001	NS	p<0.05	<u>Pool II</u>	p<0.001	p<0.005	p<0.001
2±0.7				150±64				22±18			
<u>Indiv.</u>	p<0.001	p<0.005	p<0.001	<u>Indiv.</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001	<u>Indiv.</u>	p<0.001	p<0.001	p<0.001
18±10				2±0.8				6±4			

NS= non significant for p>0.05

Adhesion values are expressed in CFU/well (10<sup>2</sup>) ± standard deviation



TABLE 7 : Adhesion of *P. aeruginosa* 1244 CF salivary glycopeptides treated by neuraminidase (CFU/well ( $10^{-2}$ )  $\pm$  standard deviation

	Control	Control + Neuraminidase	Inhibition
MS3 Pool I	97 $\pm$ 9.6	27 $\pm$ 15	72 %
MS4b Individ.	228 $\pm$ 50	108 $\pm$ 10	52 %
MS4c Individ.	127 $\pm$ 17	22 $\pm$ 13	82 %

Inoculum =  $1 \times 10^7$  bact./ml

## DISCUSSION

We investigated the binding of *P. aeruginosa* to mucin glycopeptides prepared by proteolysis of whole CF and non-CF saliva. We found that this bacterium bound significantly more to the CF salivary mucin glycopeptides than to the corresponding non-CF fractions.

Our results complement a study by Komiyama *et al.* who compared the aggregation properties of *P. aeruginosa* by CF and non-CF saliva (9). They observed a higher aggregation of *P. aeruginosa* by the whole and submandibular CF salivas and concluded that molecules secreted by submandibular glands were probably involved in the colonization of *P. aeruginosa* in CF. They were unable to define which compound in these complex sero-mucous secretions was the aggregating factor. The present study showing greater adhesion of *P. aeruginosa* to CF salivary mucin glycopeptides than to non-CF glycopeptides, confirms that salivary mucins are the aggregating factors described by Komiyama *et al.*

These salivary glycopeptides contain the sugars and hydroxyamino acids characteristic of mucins. The chemical composition also revealed a higher sialic acid content in CF than in non-CF glycopeptides, which has been confirmed in larger series of CF and non-CF salivas (manuscript submitted). A high sialylation level of CF salivary fractions has been already suggested by Komiyama *et al.* (8) who showed that the release of sialic acid by endogenous neuraminidase was higher in CF than in non-CF saliva.

The role of sialic acid in *P. aeruginosa* adhesion to glycolipids has been controversial (2, 10) but it appears clear that sialic acid plays a role in adhesion of *P. aeruginosa* to CF salivary glycopeptides. Indeed, neuraminidase treatment of CF glycopeptides decreased the binding of *P. aeruginosa* to these glycopeptides. Sialic acid has already been described as receptor for *P. aeruginosa* on tracheal epithelium (14), tracheo-bronchial mucins (21), and buccal cells (13). Sialic acid was also suggested to modulate adhesion in CF saliva but its location was not defined (8). The decrease in adhesion to neuraminidase treated glycopeptides may however have two

explanations; (i) that sialic acid is part of a receptor for *P. aeruginosa* or (ii) that sialic acid may favor the accessibility of *P. aeruginosa* to mucin receptors.

Nevertheless, neuraminidase treatment did not completely eliminate the adhesion capacity of the CF glycopeptides, implying the presence of other receptors on mucins. A recent study demonstrated that carbohydrate chains containing Gal $\beta$ (1-3)GlcNAc and Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc disaccharides were recognized by *P. aeruginosa* (15) and such structures have been observed in human mucins (7). Consequently, the residual adhesion after neuraminidase treatment of salivary mucin glycopeptides might be due to such disaccharide units. These data therefore suggest that adhesins with different carbohydrate specificities may exist on *P. aeruginosa*.

The adhesion of the pilin structural gene mutant of *P. aeruginosa* 1244 (1244 NP), which is similar to the adhesion of the wild type, provides evidence for the role of non-pilus adhesins in the recognition of CF salivary mucin glycopeptides by *P. aeruginosa*. This complements the recent study by Ramphal *et al.* indicating the existence of non-pilus adhesins on the surface of *P. aeruginosa* and their involvement in adhesion to respiratory mucins (18). Thus, the use of purified non-pilus adhesins would constitute a major tool for the characterization of the specific carbohydrate sites recognized by *P. aeruginosa* in CF salivary mucin. The high binding of the non-piliated strain raises also the question of the role of the pili in adhesion to mucins, a point that has been largely discussed in (18).

The binding of the mucoid *P. aeruginosa* (M35) was also significantly greater for CF glycopeptides, but the adhesion patterns for M35 are distinct from those of the non-mucoid strains. This suggests that the adhesion mechanism of the mucoid strain may be slightly different from that involved in the non-mucoid strains. Thus, the knowledge of the adhesion mechanism of *P. aeruginosa* to mucins may require not only the characterization of non-pilus adhesin receptors but also the elucidation of the role played by alginate.

These studies suggest that there may indeed be a role for mucins in explaining the specificity of *P. aeruginosa* for CF since, there is much greater adhesion to these mucins and at least one possible receptor substance, sialic acid, is increased in CF

salivary mucins. It is however doubtful that this can be the full explanation, since *P. aeruginosa* does also recognize non-CF mucins (17). The use of salivary mucins, does however provide a convenient model to pose question related to mucin receptor characterization since they are easily obtained and are not degraded.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose, the Cystic Fibrosis Foundation (USA) and an INSERM-NIH collaborative project.

## LITTERATURE CITED

1. Aminoff, D. 1961. Methods for the quantitative estimation of N-Acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 81:384-392.
2. Baker, N., G. C. Hansson, H. Leffler, G. Riise, and C. Svanborg-Edén. 1990. Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa* *Infect. Immun.* 58:2361-2366.
3. Barasch, J., B. Kiss, A. Prince, L. Saiman, D. Gruenert and Q. Al-Awqati. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352:70-73.
4. Demaille, J., M. Dautrevaux, R. Havez, and G. Biserte. 1965. Isolement, propriétés physicochimiques et composition de l' $\alpha_2$ -macroglobuline de Porc. *Bull. Soc. Chim. France*, 12:3506-3511.
5. Gilligan, P. H. 1991. Microbiology of airways disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:35-51.
6. Houdret, N., R. Ramphal, A. Scharfman, JM. Perini, M. Filliat, G. Lamblin, and P. Roussel. 1989. Evidence for the in vivo degradation of human respiratory mucins during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Biochim. Biophys. Acta* 992:96-105.
7. Klein, A., G. Lamblin, M. Lhermitte, P. Roussel, J. Breg, H. van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart. 1988. Primary structure of neutral oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by combination of 500-Mhz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and quantitative sugar analysis. 1. Structure of 16 oligosaccharides having the Gal $\beta$ (1-3)GalNAc-ol core (type 1) or the Gal $\beta$ (1-3)[GlcNAc $\beta$ (1-6)]GalNAc-ol core (type 2). *Eur. J. Biochem.* 171:631:642.
8. Komiyama, K., B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1987. Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 55:2364-2369.

9. Komiyama, K., B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1989. Whole, submandibular, and parotid saliva-mediated aggregation of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 57:1299-1304.
10. Krivan, H. C., V. Ginsburg, and D. D. Roberts. 1987. Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas cepacia isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch. Biochem. Biophys.* 260:493-496.
11. Lamblin, G., A. Boersma, A. Klein, P. Roussel, H. Van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart. 1984. Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* 259:9051-9058.
12. Lamblin, G., M. Lhermitte, P. Degand, P. Roussel, and H. S. Slayter. 1979. Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins. *Biochimie* 61:23-43.
13. McEachran, D. W., R. T. Irvin. 1985. Adhesion of Pseudomonas aeruginosa to buccal epithelial cells: evidence for two classes of receptors. *Can. J. Microbiol.* 31:563-569.
14. Ramphal, R., and M. Pyle. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for Pseudomonas aeruginosa in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* 41:339-344.
15. Ramphal, R., C. Carnoy, S. Fievre, J. C. Michalski, N. Houdret, G. Lamblin, G. Strecker, and P. Roussel. 1991. Pseudomonas aeruginosa recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) and type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide units. *Infect. Immun.* 59:700-704.
16. Ramphal, R., C. Guay, and G. B. Pier. 1987. Pseudomonas aeruginosa adhesins for tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.* 55:600-603.
17. Ramphal, R., N. Houdret, L. Koo, G. Lamblin, and P. Roussel. 1989. Differences in adhesion of Pseudomonas aeruginosa to mucin glycopeptides from sputa of patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis. *Infect. Immun.* 57:3066-3071.



18. Ramphal, R., L. Koo, K. S. Ishimoto, P. A. Totten, J. Cano Lara, and S. Lory. 1991. Adhesion of Pseudomonas aeruginosa pilin-deficient mutant to mucin. *Infect. Immun.* 59:1307-1311.
19. Rose, M. C., C. F. Brown, J. Z. III Jacoby, W. S. Lynn, and B. Kaufman. 1987. Biochemical properties of tracheobronchial mucins from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *Pediatr. Res.* 22:545-551.
20. Vishwanath, S., and R. Ramphal. 1984. Adherence of Pseudomonas aeruginosa to human tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.* 45:197-202.
21. Vishwanath, S., and R. Ramphal. 1985. Tracheobronchial mucin receptor for Pseudomonas aeruginosa : predominance of amino sugars in binding sites. *Infect. Immun.* 48:331-335.

## II<sup>ème</sup> PARTIE

### ETUDE DES CHAINES GLYCANNIQUES DE MUCINES SALIVAIRES HUMAINES

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une plus forte affinité de *P. aeruginosa* pour les glycopeptides salivaires d'enfants atteints de mucoviscidose que pour ceux de sujets témoins.

Dans le but de comprendre la raison de cette adhésion spécifique de *P. aeruginosa*, une étude structurale des chaînes glycaniques des glycopeptides salivaires a été entreprise. Reddy et coll. (139) n'ont purifié que sept oligosaccharides de mucines salivaires humaines par une succession de chromatographies en gel-filtration et d'électrophorèses sur papier. De plus, la structure glycanique des mucines sous-maxillaires bovines (166), ovines (51) et porcines (19) est relativement simple. A priori, il n'était pas interdit de penser que l'on pouvait facilement effectuer une comparaison des chaînes glycaniques de sujets témoins et de malades atteints de mucoviscidose afin de déceler une éventuelle anomalie de la glycosylation dans la mucoviscidose. On pouvait ainsi raisonnablement penser que cette simplicité des chaînes glycaniques nous permettrait d'identifier et de préparer les récepteurs de *P. aeruginosa*.

Le protocole de purification des oligosaccharides de mucines salivaires, employé dans notre étude, a été largement décrit pour les mucines respiratoires (72, 73, 89) : la coupure de la liaison O-glycosidique alcali-labile entre les chaînes glycaniques et les acides aminés hydroxylés est effectuée par  $\beta$ -élimination en milieu réducteur. Le mélange d'oligosaccharides-alditols obtenu est fractionné par chromatographie échange d'anions et les fractions obtenues sont ensuite soumises à une étape de gel-filtration. Notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur les oligosaccharides neutres et sialylés les plus courts. Un double fractionnement en HPLC a alors été effectué (16, 88). Le premier sur une colonne de silice greffée par groupements alkylamine (type Lichrosorb-NH<sub>2</sub>) permet une séparation en fonction des groupements hydroxyl et de leur accessibilité. Le second fractionnement, en phase inverse sur une colonne de silice greffée par des groupements octadécylsilane (type Ultrasphere ODS (C18)), sépare les oligosaccharides en fonction des



groupements N-acétyl et méthyl. L'étude structurale des oligosaccharides purifiés a ensuite été effectuée par RMN du proton à 400 MHz et par spectrométrie de masse.

Ce protocole de purification des oligosaccharides de mucines nécessite une quantité suffisante de glycopeptides. Nous avons donc choisi de travailler avec les glycopeptides de haute masse moléculaire qui paraissaient les plus intéressants du point de vue de l'adhésion et pour lesquels la quantité de matériel semblait suffisante.

L'article qui suit détaille la purification et la caractérisation de 37 chaînes glycaniques de mucines salivaires d'individus sains à partir de la fraction S3 (la fraction appelée F3 dans l'article correspond aux glycopeptides S3). Cet article intitulé "*The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins*", révèle la grande hétérogénéité des chaînes glycaniques de mucines salivaires humaines. Ces résultats laissent présager une hétérogénéité similaire à celle qui a déjà été mise en évidence dans les mucines bronchiques (73).

Malheureusement, la caractérisation des oligosaccharides à partir des glycopeptides de salive de mucoviscidose (MS3) n'a pas pu être achevée. En effet, les faibles quantités d'oligosaccharides-alditols, liées aux difficultés d'approvisionnement en salive de sujets atteints de mucoviscidose, n'ont pas permis une identification des structures en RMN. Néanmoins, il a été possible de comparer les profils d'élution en HPLC des oligosaccharides des glycopeptides normaux et de malades souffrant de mucoviscidose. Cette étude comparative se trouve à la suite de l'article (pages 145 à 149). Compte tenu du caractère incomplet de cette étude, il est trop tôt pour conclure à l'existence ou à l'absence de structures glycaniques anormales dans la mucoviscidose.

En tout état de cause, les quantités d'oligosaccharides purifiés sont tout à fait insuffisantes pour permettre l'identification du récepteurs de *P. aeruginosa*.

## THE BROAD DIVERSITY OF NEUTRAL AND SIALYLATED OLIGOSACCHARIDES DERIVED FROM HUMAN SALIVARY MUCINS.

André Klein<sup>§</sup>, Christophe Carnoy<sup>§</sup>, Jean-Michel Wieruszeski<sup>//</sup>, Gérard Strecker<sup>//</sup>, Anne-Marie Strang<sup>‡</sup>, Herman van Halbeek<sup>‡</sup>, Philippe Roussel<sup>§</sup> and Geneviève Lamblin<sup>\*§</sup>.

*§Unité des Protéines, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale N°16, 59045 Lille, France.*

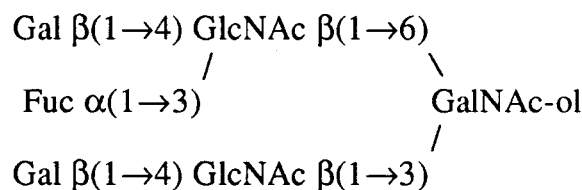
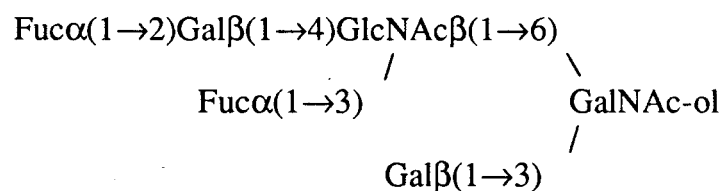
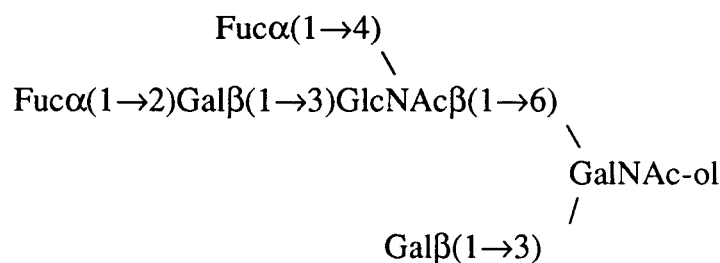
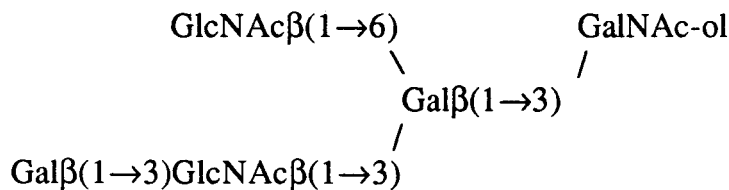
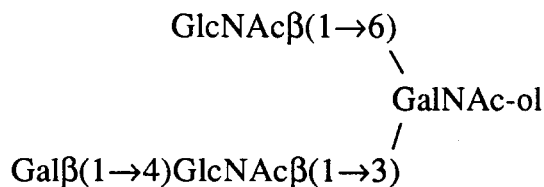
*//Laboratoire de Chimie Biologique et U.M.R. n°111 du C.N.R.S., Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, 59650 Villeneuve d'Ascq, France.*

*‡Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, Georgia, 30602, USA.*

Running title = Human salivary mucin oligosaccharides

### ABSTRACT

Mucin glycopeptides were prepared from the salivary mucins of 20 healthy donors with blood group O. The carbohydrate chains of the high-molecular-weight mucins were released by alkaline borohydride treatment. Neutral and monosialylated oligosaccharide-alditols were purified by ion exchange chromatography, gel filtration and HPLC<sup>1</sup>. The structures of the oligosaccharide-alditols were determined by high-resolution <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy in combination with fast-atom-bombardment mass spectrometry and methylation analysis. 37 oligosaccharide-alditols were characterized and illustrate the extreme diversity of the salivary mucins carbohydrate chains. This diversity might represent a mosaic of bacterial adhesion sites and be involved in the early events of the non-immune defence of the oral cavity. Among these 37 oligosaccharide-alditols, 31 have not been previously described in human saliva and five of these are novel structures :



<sup>1</sup>Abbreviations : HPLC, high performance liquid chromatography; FAB-MS, fast atom bombardment mass spectrometry; GalNAc-ol, N-acetyl-D-galactosaminitol; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; Gal, D-galactose; Fuc, L-fucose; NAc, N-acetyl; NeuAc, N-acetyl-neuraminic acid.

<sup>2</sup>A superscript at the name of a monosaccharide residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked. Two superscripts map out the pathway from the residue toward the GalNAc-ol residue.

## INTRODUCTION

Saliva has a wide array of biological functions, including digestion, mineralization, microbial attachment and anti-microbial activity. Human saliva is a mixture of secretions produced by different glands including the major (parotid, submandibular, sublingual) and minor (palatal and labial) salivary glands. The salivary glands comprise mucous or serous acini, or both. Besides amylases, cystatins, proline-rich proteins and statherin (Ramasubbu et al., 1991), saliva contains highly glycosylated glycoproteins known as mucins. These mucins are the main glycoproteins synthesized and secreted by glands containing mucous cells (submandibular, sublingual, labial and palatal). Two populations of salivary mucins have been characterized so far : one with molecular weights above  $10^6$  Da, and the other one with molecular weights ranging from 2 to  $2.5 \times 10^5$  Da (Schrager et al., 1971 ; Loomis et al., 1987 ; Veerman et al., 1989 ; Kawagishi et al., 1990). Salivary mucins may be involved in the non-immune protection of the oral cavity and in bacterial recognition mechanisms (Tabak et al., 1982). The carbohydrate moieties may play a role in bacterial aggregation and clearance by mucins (Cisar et al., 1986 ; Brack et al., 1987 ; Levine et al., 1978). Therefore a knowledge of the primary structure of human salivary mucin oligosaccharide chains is important in order to elucidate mucin / bacteria recognition mechanisms.

Not much is known about the carbohydrate chains of human salivary mucins : so far, only six oligosaccharide-alditols have been identified in the low-molecular-weight salivary mucins (Reddy et al., 1985). Thus, one may wonder if the carbohydrate part of human salivary mucins is as simple as in other species or if it is as heterogeneous as the carbohydrate moiety of their bronchial (Lamblin et al., 1984 ; Klein et al., 1988), gastric (Slomiany et al., 1984) or colonic (Podolski et al., 1985) analogs.

In the present report, highly glycosylated regions of high-molecular-weight mucins were isolated from human total saliva and were treated by reductive  $\beta$ -elimination to release the oligosaccharide chains. The

oligosaccharide-alditols were characterized using HPLC<sup>1</sup>, FAB-MS and NMR analysis. Thirty-seven neutral and sialylated, low-molecular mass oligosaccharide-alditols were identified. Among the 37 structures characterized, 32 have not been described previously in human salivary mucins and five of these are novel structures. This is the first demonstration of a broad diversity of carbohydrate chains in human salivary mucins.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Materials.* Pronase was from Calbiochem (Behring Diagnostics, La Jolla, CA, USA) ; Sepharose CL-2B was from Pharmacia (Uppsala, Sweden) ; guanidinium chloride was from Fluka (Buchs, Switzerland) ; AG50WX8 (100-200 mesh) and AG1X2 (100-200 mesh) ion-exchange resins and Bio-Gel P4 (200-400 mesh) were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Secretary IgA was a generous gift from Dr. A. Hayem (INSERM U 16, Lille, France). HPLC was performed with a Spectroflow 400 solvent-delivery system equipped with a Spectroflow 783 detector (Kratos, Ramsey, NY, USA) ; the Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column was from Merck (Darmstadt, FRG) ; the Ultrasphere ODS was from Beckman (Berkeley, CA, USA) ; HPLC solvents were from Carlo Erba (Milano, Italy).

*Collection of saliva.* Human total saliva (500 ml) was collected from 20 healthy donors with blood-group O. It was kept frozen (-20°C) until used. The salivary secretions were centrifuged at 3000 x g for 30 min. The pellet and supernatant were dialyzed extensively against distilled water and lyophilized. The yields were 0.815 g and 1.385 g, respectively.

*Pronase digestion of saliva supernatant and fractionation by chromatography on Sepharose CL-2B.* The lyophilized supernatant (1.385 g) was digested with pronase in 0.01M calcium acetate for 48 h at 37°C using a final enzyme / substrate ratio of 1/40 (w/w) with a fresh addition of enzyme at 24 h. After 48 h the mixture was centrifuged to give a pellet and a supernatant which were dialyzed extensively against distilled water and lyophilized : the yields were 0.297 g and 1.057 g, respectively. Aliquots (250 mg) of freeze-dried supernatant were submitted to gel filtration on a column of Sepharose CL-2B (2.5 x 48 cm) equilibrated and eluted with 6 M guanidinium chloride. Fractions (5 ml) were collected and analyzed for absorbance at 278 nm and for hexose by an automated orcinol assay (Demaille et al., 1965).

*Purification of oligosaccharides.* Alkaline borohydride reductive degradation of salivary glycopeptides (fraction F3 from the Sepharose CL2-B column, 80mg) was performed as described (Roussel et al., 1975) and led to a heterogeneous population of glycopeptides and reduced oligosaccharides. The mixture was applied to a column of AG50WX8 and the fraction eluted by water was further separated by ion-exchange chromatography on a Dowex AG1X2 column according to acidity. Four fractions were obtained : fraction I (neutral), fraction II (monosialylated), and fractions III and IV (sialylated and sulfated). Fractions I (22mg) and II (6mg) were subfractionated by gel filtration on Bio-Gel P4 into fractions Ia (4 mg), Ib (5 mg) and Ic (11mg), and IIa (2 mg), IIb (1 mg) and IIc (1mg), respectively. Further fractionation of neutral oligosaccharide-alditol fraction Ic was carried out by HPLC on a Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column (25 x 0.46 cm internal diameter, particle size 5 µm). Elution was performed with a linear gradient of 85 / 15 to 60 / 40 (v / v) acetonitrile / water, during 60 min at room temperature and at a flow rate of 1 ml / min (Boersma et al.,1981). Oligosaccharide peaks were detected by absorbance at 206 nm. Further separation and purification was performed on an Ultrasphere ODS column (25 x 0.46 cm ; particle size 5 µm) eluted isocratically with water at a flow rate of 1ml / min (Klein et al., 1988). Fractionation of monosialylated oligosaccharide-alditol fraction IIc was carried out by HPLC on a Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column (25 x 0.46 cm internal diameter, particle size 5 µm). Elution was performed with a linear gradient of 80 / 20 to 50 / 50 (v / v) acetonitrile / water containing 2.5mM ammonium bicarbonate, during 60 min at room temperature and at a flow rate of 1ml / min (Lamblin et al., 1983). Oligosaccharide peaks were detected by absorbance at 206 nm.

*Analytical methods.* Amino acid analysis was performed as described previously (Houdret et al.,1981). Sulfate and sialic acid were measured as described (Roussel et al., 1975). Quantitative sugar analysis was carried out as

described (Lamblin et al., 1984).

*FAB mass spectrometry.* Purified oligosaccharide-alditols were methylated with methyl iodide, solid base (NaOH) and methylsulfoxide (Ciucanu & Kerek, 1984). The methylated oligosaccharide-alditols were analysed by FAB-MS. A Kratos concept EBEB high resolution mass spectrometer (Kratos Analytical Instruments, Manchester, UK.) equipped with a DS 90 (DGDG/30) data system was used in these studies. The mass spectrometer was operated at 8-KeV accelerating potential. An Ion Tech Model B 11 NF saddle field atom source, energized with the B 50 current regulated power supply, was scanned at 10 s/decade. The methylated oligosaccharide-alditols were dissolved in methanol containing sodium acetate (0.1%) and loaded on the copper tip with thioglycerol as matrix.

*Methylation analysis.* The methylated oligosaccharide-alditols were subjected to methanolysis and acetylation. The methyl derivatives were identified after gas-liquid chromatography by mass spectrometry (GC-MS) (Fournet et al., 1981).

*<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.* Prior to <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic analysis, the HPLC-fractionated oligosaccharide-alditols were repeatedly treated with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at room temperature and pD 6. After each exchange treatment, the materials were lyophilized. Finally each sample was redissolved in 0.4 ml <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.96 atom % <sup>2</sup>H, Aldrich). 400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy was performed on a Bruker AM 400 spectrometer, operating under control of an Aspect-3000 computer (Lille, France). 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy was performed on a Bruker AM 500 spectrometer, interfaced with an Aspect -3000 computer (Athens, GA). Experimental details have been described previously (Van Halbeek et al., 1982; Spellman et al., 1989). The probe temperature was kept at 27.0 (±0.1)°C. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm downfield from



internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured by reference to internal acetone ( $\delta = 2.225$  ppm in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at  $27^\circ\text{C}$ ), with an accuracy of 0.002 ppm. Resolution enhancement of the spectra was achieved by Lorentzian-to-Gaussian transformation.

## RESULTS

*Isolation and purification of human salivary mucin glycopeptides.* A pool of human salivas, collected from 20 donors each with blood group O, was digested by pronase. The supernatant was fractionated by gel filtration on a Sepharose CL-2B column eluted with 6 M guanidinium chloride. The elution profile permitted the distinction of four fractions (Figure 1) ; after dialysis and freeze-drying, the yields amounted to : F1 (1 mg), F2 (5 mg), F3 (80 mg), and F4 (65 mg). The chemical composition of fraction F3 is typical of mucin glycopeptides (Table 1). Polyacrylamide gel electrophoresis of fraction F3 showed a pattern typical of mucin glycopeptides when stained by Schiff / periodate (data not shown). The elution volume of F3 molecules is smaller than that of secretory IgA, used as a chromatography marker, indicating an apparent molecular mass larger than 320,000 daltons.

*Isolation and purification of oligosaccharide-alditols.* Alkaline borohydride treatment of the mucin glycopeptides, followed by ion exchange chromatography (I-IV) and gel filtration over Bio-Gel P4 (a-c) allowed us to separate the pools of small neutral (Ic) and sialylated oligosaccharides (IIc) (Figure 2). Fraction Ic was further purified by HPLC on a normal phase column after which 23 fractions were obtained (Figure 3), subsequently, fractions 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16,17, 18, 19, 20, 21, 22 and 23 were subfractionated on a reverse phase column and gave fractions 7a-d; 8a, 8b ; 9a, 9b ;10a-c ; 11a-c; 13a-e ; 14a-c ; 16a-d, 17a-d, 18 a-f, 19a-d, 20 a-d ; 21 a-c ; 22 a-f and 23 a-c, respectively. The elution patterns of fractions 9, 10, 11, 13, 14 and 17 on this second column are shown in Figure 4.

Fractionation of monosialylated oligosaccharide-alditols (IIc), was carried out by HPLC on a normal phase column after which 10 sialylated fractions were obtained (Figure 5).

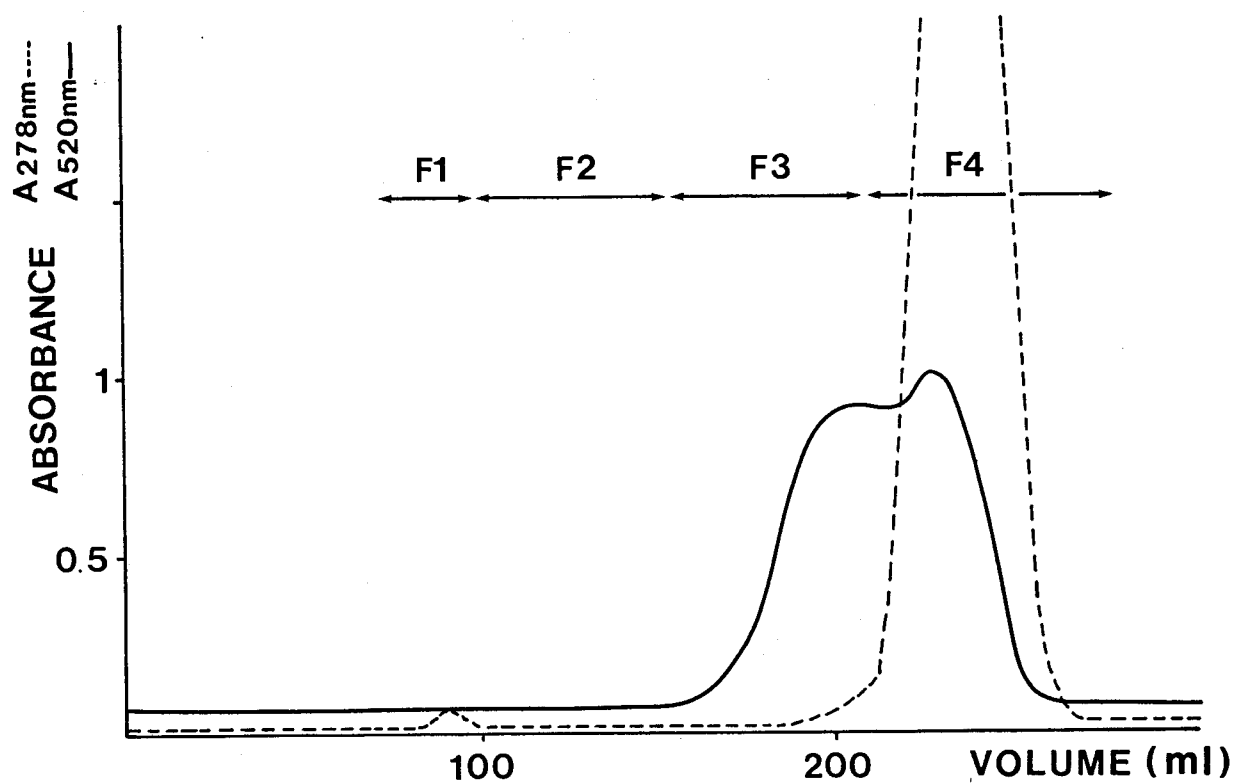


Figure 1. Sepharose CL-2B (2.5 x 48 cm) chromatography of pronase treated saliva supernatant (250mg). The eluting solution was 6 M guanidinium chloride. Representative aliquots were analyzed for neutral sugars at 520 nm (solid line) and for absorbance at 278 nm (dashed line).

Table 1. Chemical composition of salivary glycopeptide fraction F3

Components	Amount	Total
	$\mu\text{mol} / \text{g}$	% (by mass)
Aspartic acid	51	
Threonine	408	
Serine	246	
Glutamic acid	83	
Proline	171	
Glycine	151	
Alanine	159	
Valine	76	
Isoleucine	42	
Leucine	75	
Tyrosine	10	
Phenylalanine	27	
Histidine	36	
Lysine	27	
Arginine	33	
Total amino acids	1595	15.6
N-acetylneuraminic acid	160	
Fucose	475	
Galactose	1445	
N-acetylglucosamine	1120	
N-acetylgalactosamine	510	
Total carbohydrate	3710	75
Sulfate	170	1.5

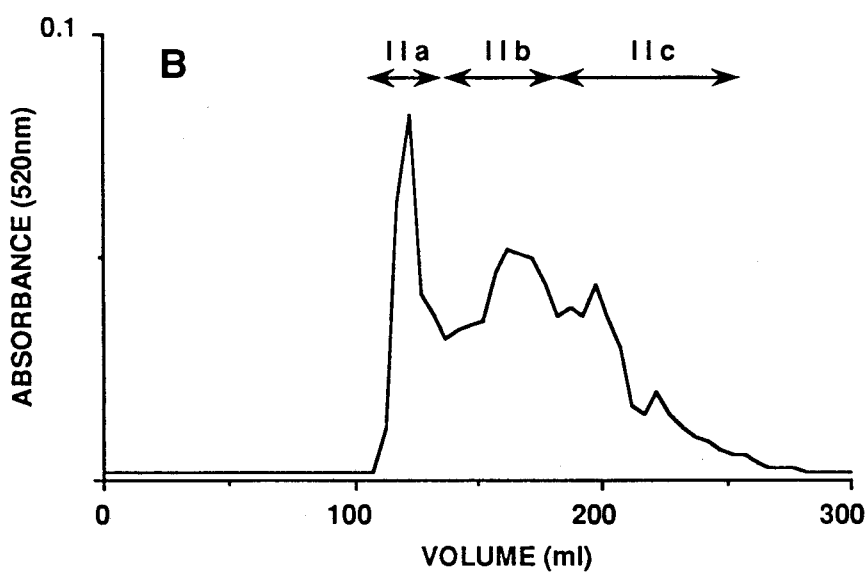
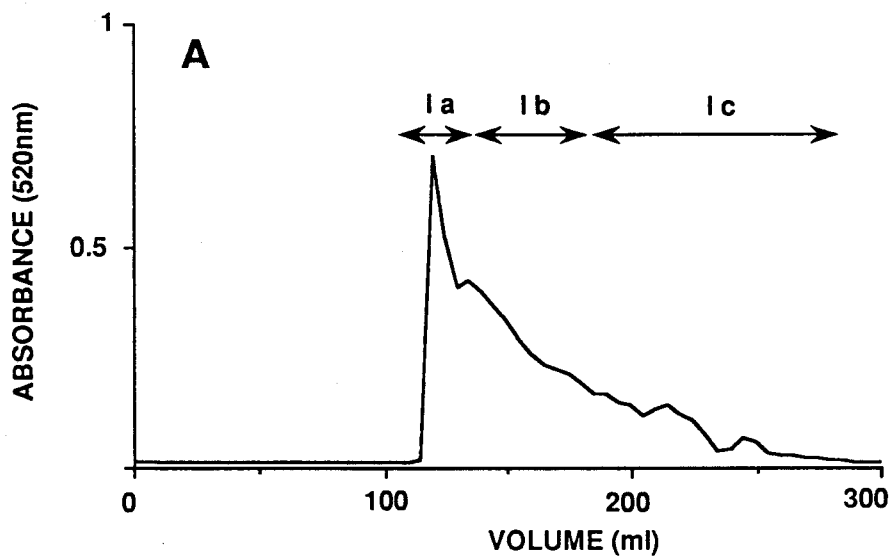


Figure 2. Bio-Gel P-4 (200-400 mesh) elution profile of fraction I (A) and II (B) obtained after alkaline treatment of fraction F3. The column (2 x 98 cm) was eluted with 0.1M acetic acid. Aliquots were analyzed for neutral sugars.

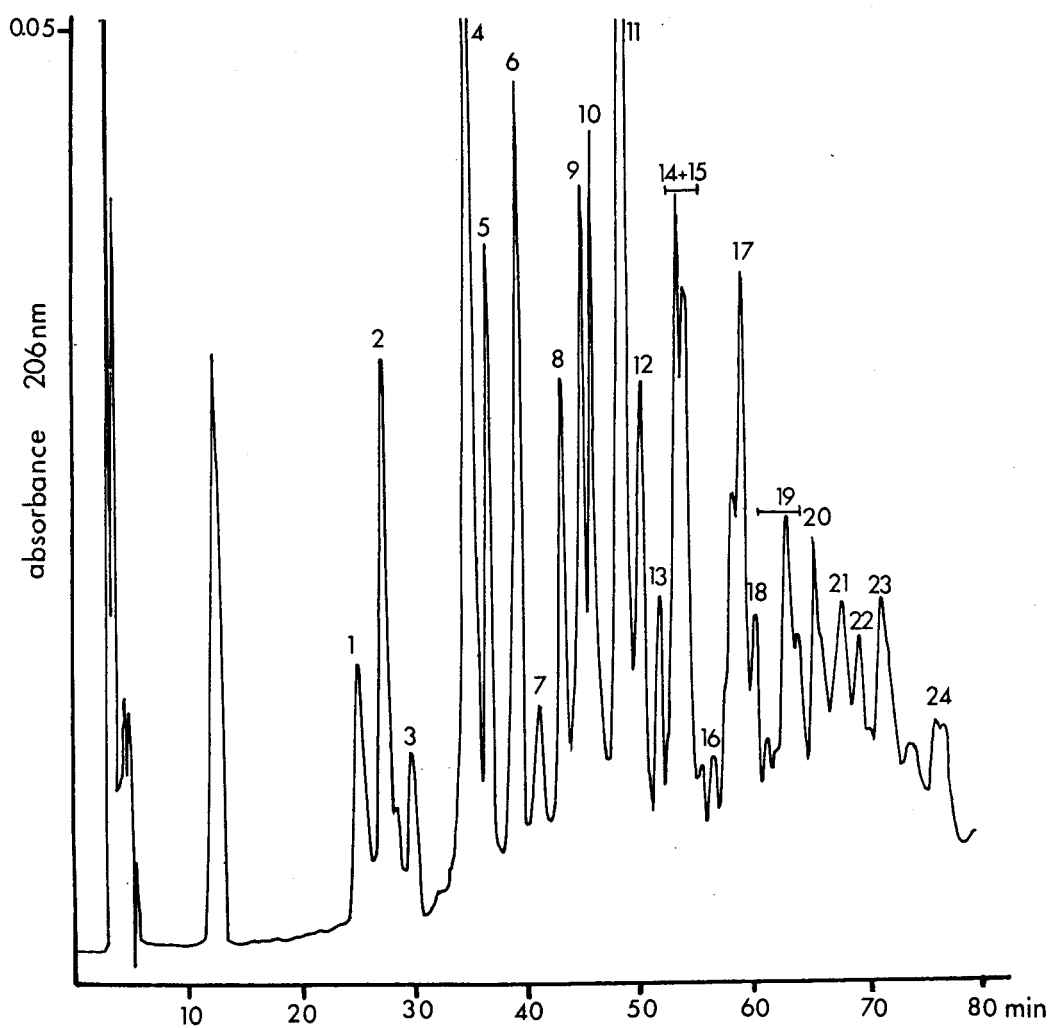


Figure 3. HPLC elution profile of salivary oligosaccharide-alditols of fraction Ic on a 5 mm Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column, eluted with an acetonitrile/water gradient (85/15 to 60/40 v/v). Oligosaccharide peaks were detected by absorbance at 206 nm.

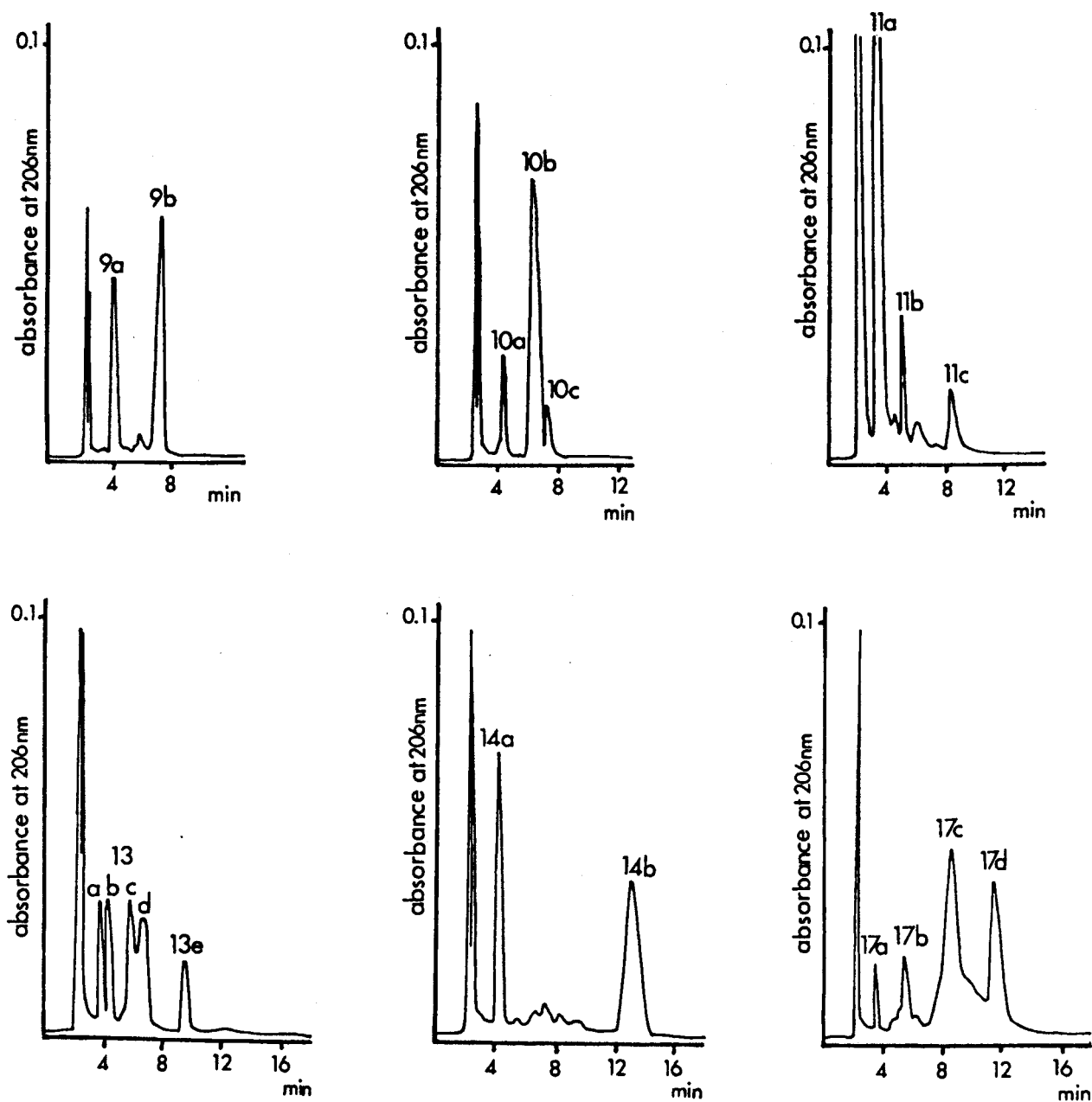


Figure 4. Reverse phase HPLC elution profiles of fractions 9, 10, 11, 13, 14 and 17 from pool Ic on an Ultrasphere ODS column, eluted isocratically with water. Oligosaccharide peaks were detected by absorbance at 206 nm.

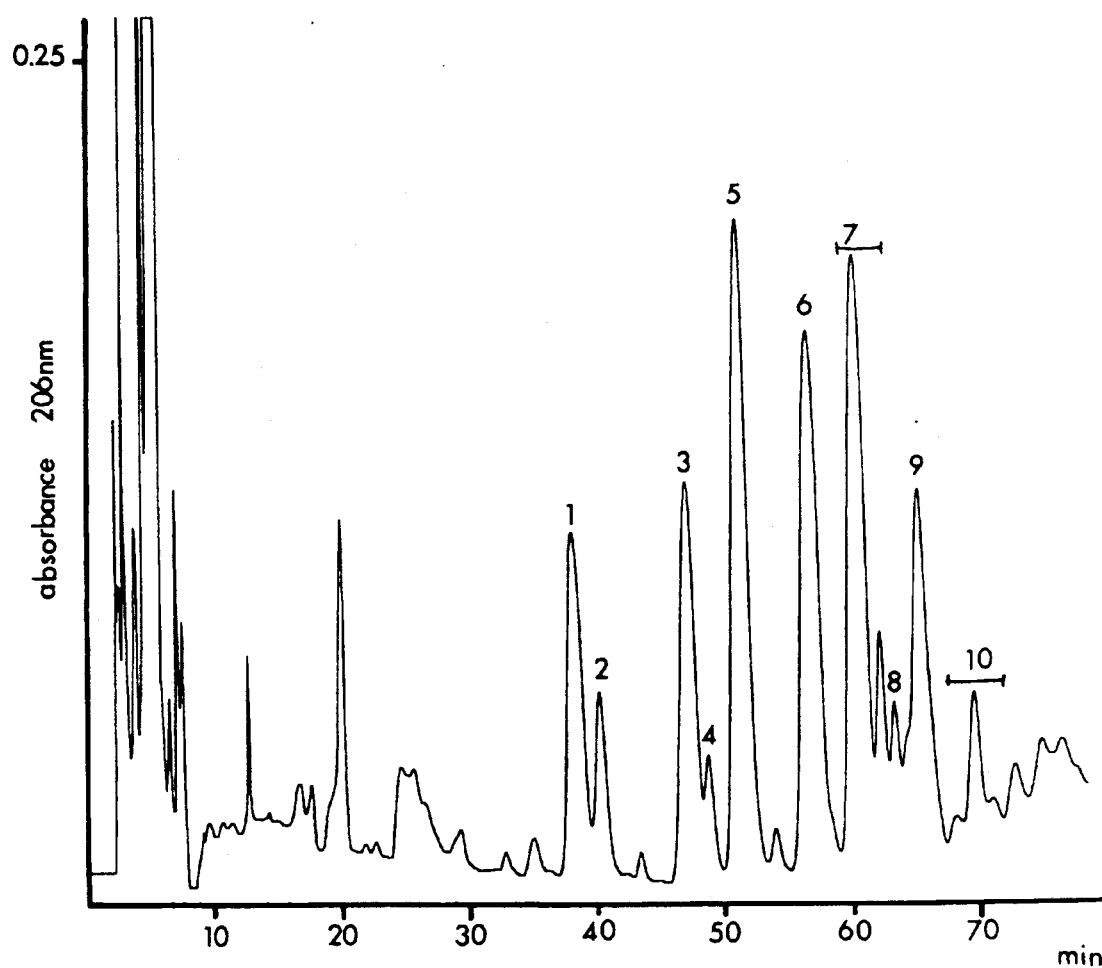


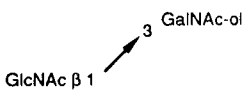
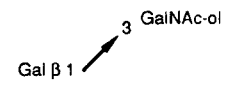
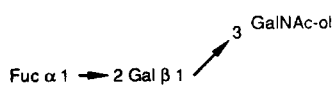
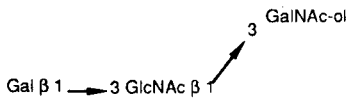
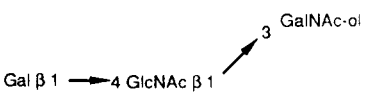
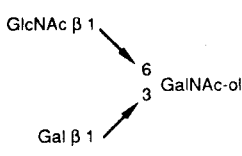
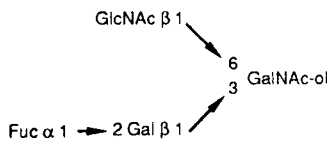
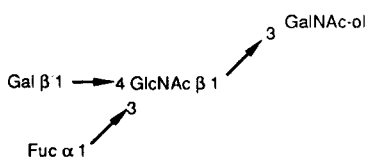
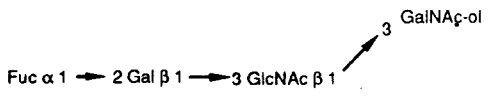
Figure 5. HPLC elution profile of salivary oligosaccharide-alditols of fraction IIc on a 5 mm Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column, eluted with an acetonitrile/water gradient (80/20 to 50/50 v/v), containing 2.5 mM ammonium bicarbonate. Oligosaccharide peaks were detected by absorbance at 206 nm.



*Structure determination of neutral oligosaccharides*

The primary structures of the oligosaccharide-alditols obtained from human salivary mucin, listed in Scheme 1, were established by combining the results of methylation analysis, FAB mass spectrometry and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. The structures of the oligosaccharide-alditols were grouped into four categories on the basis of the core units. The core structure was identified from the set of  $^1\text{H-NMR}$  chemical shifts of the triplet resonances of the GalNAc-ol H-2 and H-5 atoms in the  $4.1 < \delta < 4.4$  region of each spectrum, the position of these signals are known to be highly characteristic of the type of the core unit of the oligosaccharide-alditols (Van Halbeek et al., 1982 ; Van Halbeek, 1984).

The structures in category (i) possess a C-3-monosubstituted GalNAc-ol residue ; the substituent monosaccharide is  $\beta$ -linked Gal. The spectra of these oligosaccharide alditols have in common the presence of the GalNAc-ol H-2 / H-5 signals at  $\delta$  4.39/4.18 respectively. Category (ii) involves structures of the GlcNAc  $\beta$  (1 $\rightarrow$  6) [Gal  $\beta$  (1 $\rightarrow$  3)] GalNAc-ol core type. Typical chemical shifts for GalNAc-ol H-2 and H-5 atoms for compounds in this category are  $\delta$  4.39 and  $\delta$  4.26, respectively. Group (iii) of structures is of the GlcNAc  $\beta$ (1 $\rightarrow$  3)GalNAc-ol core type : the GalNAc-ol H-2 and H-5 signals in the corresponding NMR spectra are found at  $\delta$  4.28 and  $\delta$  4.13 respectively. Set (iv) of oligosaccharide-alditols has the GlcNAc  $\beta$  (1 $\rightarrow$  6) [GlcNAc  $\beta$  (1 $\rightarrow$  3)] GalNAc-ol core structural element ; the GalNAc-ol H-2 and H-5 chemical shifts are  $\delta$  4.27 and  $\delta$  4.22. According to this classification, the chemical shifts of the structural-reporter groups for the oligosaccharide-alditols obtained from human salivary mucins have been compiled in Tables 2 to 5 respectively.

compound	CCSD numbers	FCI	
1	153-160, 3944	0003eb6b	
2	64-77, 2332, 2333, 3029, 3030, 3152, 3945, 3946, 3975-3977, 4753	000287cd	
3	239-243, 3947-33948, 4902-4905	00591dc2	
4	207, 338-341, 3950	000d4193	
5	283-289, 3042, 3951, 4045	000f18b7	
6	401-408, 2440, 3953, 4075-4076, 4816-4819	000afeb7	
7d	573, 574, 4912	0063e8b0	
8a	675, 676	008559a8	
8b	443, 444, 3955	009c7d6a	

Scheme 1. Structures of 37 low-molecular-mass neutral oligosaccharide-alditols isolated from the saliva of 20 healthy donors with blood group O.

compound	CCSD numbers	FCI	
9a	511, 4845	001697bb	
9b	8223	00180c81	
10a	471-473, 2516,3054, 3954, 4087,4855	00193827	
10b	596-598, 3957	001c5519	
10c	novel		
11a	577-579, 581-590, 2532-2534, 3682, 3683, 3956, 4132,4846-4850	001af17b	
11b	904	014ed883	
12	915, 916, 2638, 3719, 3962	007ca604	

Scheme 1. (cont.)

compound	CCSD numbers	FCI	
13a	847-850, 3065, 4956	00dcb41a	
13c	944-946, 3074	00de6d6e	
13d	novel		
14b	954, 955	00dfd10c	
14C1	3959, 4207, 4871	0030c9c5	
14C2	907, 908, 910, 3707, 3960	0032a0f9	

Scheme 1. (cont.)

compound	CCSD numbers	FCI
17a	novel	
17b	novel	
17c1	8227	013de194
17c2	novel	
17c3	8228	00b30fca
17d	1031, 2964, 3790	00ca338c

## Scheme 1. (cont.)

The eight-digit /letter combination is the “full-complexity -index”(FCI) of the structure in the CCSD (complex carbohydrate structure database) (Doublet et al., 1989); it is a unique identifier for the given structure. A particular structure has more than one CCSD accession number when the structure has been determined independently more than once, as reported in different publication.

(i) Structures of the Gal  $\beta(1 \rightarrow 3)$  GalNAc-ol core type

Structures **2**, **3**, **9a**, **10a** and **13a** were identified solely based on their NMR features, summarized in Table 2. The deduction of the primary structure of these oligosaccharide-alditols has been described previously, the compounds being obtained from different sources [namely, compounds **2**, **3**, **10B** and **14** in (Lamblin et al., 1984) and **5**, **10** in (Mutsaers et al., 1986)].

*Structure 13d* : The GC-MS analysis of the methyl glycosides indicated terminal galactose and terminal glucosamine, glucosamine substituted at C3, galactose disubstituted at C3 and C6 and galactosaminitol substituted at C3. The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum indicates the presence of a pentasaccharide-alditol containing Gal, GlcNAc and GalNAc-ol in a molar ratio of 2:2:1. This compound represents the only structure in this serie where the core Gal serves as a branch point in the structure for two GlcNAc residues. The core itself is GalNAc-ol monosubstituted at C3 with  $\beta$ -Gal as indicated by the chemical shifts of H-2 and H-5 of GalNAc-ol at  $\delta = 4.389$  and  $\delta = 4.16$  respectively. The chemical shift of Gal<sup>3</sup> H-1 is  $\delta = 4.469$ . The two GlcNAc residues substituting the core galactose at C3 and C6 have their H-1 at  $\delta = 4.65$  and  $\delta = 4.583$  respectively. The terminal Gal is attached to GlcNAc<sup>3</sup> and has its H-1 at  $\delta = 4.45$ . These assignments are readily verified by comparison to those for structure **2B** (Mutsaers et al., 1986), and structures **9A** and **20** (Lhermitte et al., 1991). The structure of compound 13d is therefore :

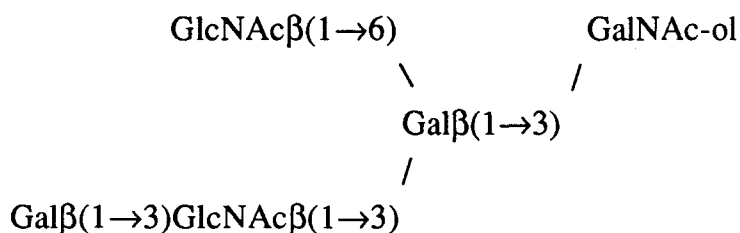


Table 2. <sup>1</sup>H chemical shifts of structural reporter groups of monosaccharides for the HPLC-fractionated, neutral human salivary mucin oligosaccharide-alditols possessing the Gal β 1→3 GalNAc-ol core unit.

A superscript at a monosaccharide residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked.

In the table heading the structures are represented by short-hand symbolic notation ; ◇ = GalNAc-ol, ■ = Gal, ● = GlcNAc, □ = Fuc. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows



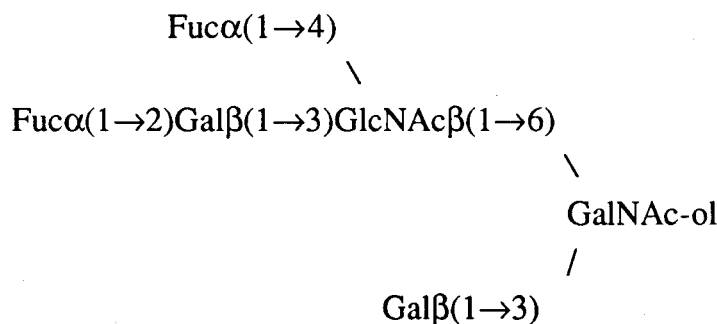
Residue	Reporter Group	Chemical shift in compound					
		2	3	9a	10a	13a	13d
GalNAc-ol	H-2	4.391	4.396	4.394	4.396	4.39	4.389
	H-3	4.064	4.090	4.049	n.d.	n.d.	n.d.
	H-4	3.508	3.521	3.498	n.d.	n.d.	n.d.
	H-5	4.192	4.160	4.180	4.184	4.18	4.16
	NAc	2.050	2.046	2.047	2.048	2.046	2.047
Gal <sup>3</sup>	H-1	4.477	4.582	4.465	4.463	4.464	4.469
	H-4	3.901	3.926	4.126	4.125	4.13	n.d.
GlcNAc <sup>6</sup>	H-1	-	-	-	-	-	4.583
	H-6	-	-	-	-	-	n.d.
	NAc	-	-	-	-	-	2.056
Gal <sup>4</sup>	H-1	-	-	-	4.480	4.460	-
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	-	-	4.711	4.688	n.d.*	4.65
	H-6	-	-	3.897	n.d.	n.d.	n.d.
	NAc	-	-	2.035	2.042	2.031	2.033
Gal <sup>3,3</sup>	H-1	-	-	4.448	-	-	4.45
	H-4	-	-	3.915	-	-	n.d.
Fuc <sup>2</sup>	H-1	-	5.255	-	-	-	-
	H-5	-	4.275	-	-	-	-
	CH <sub>3</sub>	-	1.244	-	-	-	-
Fuc <sup>3</sup>	H1	-	-	-	-	5.139	-
	H5	-	-	-	-	4.83	-
	CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	1.177	-
		#	#	#	##	##	##

\*: obscured by the residual HOD in the solvent  
n.d. : not determined

# analyzed at 400 MHz  
## analyzed at 500 MHz

(ii) Structures of the GlcNAc  $\beta(1 \rightarrow 6)$  [Gal  $\beta(1 \rightarrow 3)$ ] GalNAc-ol core type Structures 6, 7d, 11a, 12 and 14b . The NMR data of these compounds (Table 3) match those of the oligosaccharides-alditols 7, 8d, 11a, 12 and 16a described previously (Klein et al.,1988).

Structure 17a consists of GalNAc-ol, Gal, GlcNAc and Fuc in a ratio of 1 : 2 : 1 : 2 as indicated by ion  $(M+Na)^+$  at  $m/z$  1332 in the FAB-MS analysis of the permethylated fraction 17a. The  $^1H$ -NMR spectrum indicates the presence of core type 2 with the H-2 and H-5 signals of GalNAc-ol at  $\delta = 4.398$  and  $\delta = 4.271$ , respectively. The core Gal is terminal as indicated by its H-1 resonating at  $\delta = 4.464$  (compare 6, 11a, 14b in Table 3). The oligosaccharide 17a contains a Lewis<sup>b</sup> determinant Fuc $\alpha(1 \rightarrow 2)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ [Fuc $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ]GlcNAc $\beta(1 \rightarrow 6)$  with the Fuc<sup>4</sup> H-1 resonating at  $\delta = 5.026$  and the Fuc<sup>2</sup> H-1 and CH<sub>3</sub> at  $\delta = 5.155$  and  $\delta = 1.243$ , respectively (Klein et al., 1991). These results provide for compound 17a the structure :



Structure 17b consists of GalNAc-ol, Gal, GlcNAc and Fucose in a ratio of 1 : 2 : 1 : 2 as indicated by pseudomolecular ion  $(M+Na)^+$  at  $m/z$  1332 in the FAB-MS analysis of the permethylated fraction 17b. The  $^1H$ -NMR spectrum indicates the presence of one compound that can be conceived as an extension of structure 14b ; the core type 2 is defined by the H-2 and H-5 signals of GalNAc-ol resonating at  $\delta = 4.391$  and  $\delta = 4.267$  respectively. The Gal<sup>3</sup> is terminal as indicated by its H-1 signal at 4.463. The GalNAc-ol residue is 6-substituted by the Y determinant as deduced from comparison with



TABLE 3. <sup>1</sup>H chemical shifts of structural reporter( groups of monosaccharides for the HPLC-fractionated, neutral human salivary mucin oligosaccharide-alditols possessing the GlcNAc β1→3) [ Gal β (1→6) ] GaINAc-ol core unit.

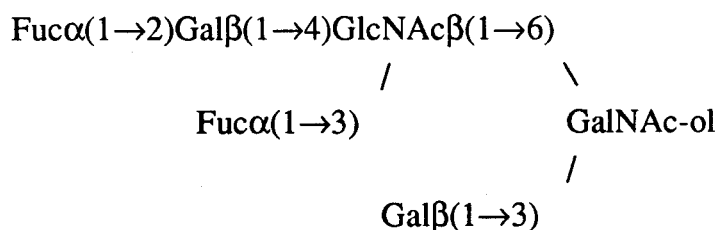
A superscript at a monosaccharide residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked.

In the tableheading the structures are represented by short-hand symbolic notation ;  $\diamond$  = GaINAc-ol,  $\blacksquare$  = Gal,  $\bullet$  = GlcNAc,  $\square$  = Fuc. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows



Residue	Reporter Group	Chemical shift in compound						
		6	7d	11a	12	14b	17a	17b
GaINAc-ol	H-2	4.391	4.401	4.391	4.402	4.390	4.398	4.391
	H-3	4.059	-	4.060	4.084	4.058	-	-
	H-4	3.470	-	3.467	3.498	3.455	-	-
	H-5	4.276	4.25	4.279	4.254	4.267	4.271	4.267
	NAC	2.066	2.055	2.066	2.055	2.068	2.068	2.066
Gal <sup>3</sup>	H-1	4.465	4.574	4.464	4.573	4.463	4.464	4.463
	H-4	3.901	n.d.	3.901	3.926	3.899	n.d.	n.d.
GlcNAc <sup>6</sup>	H-1	4.538	4.553	4.560	4.573	4.561	4.585	4.546
	H-6	3.932	-	3.997	3.999	4.010	-	-
	NAC	2.066	2.058	2.063	2.055	2.055	2.069	2.057
Gal <sup>4</sup>	H-1	-	-	4.469	4.472	4.447	-	4.498
	H-4	-	-	3.926	3.926	3.923	-	-
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	-
	H-6	-	-	-	-	-	-	-
	NAC	-	-	-	-	-	-	-
Gal <sup>3,6</sup>	H-1	-	-	-	-	-	4.448	-
	H-4	-	-	-	-	-	-	-
Fuc <sup>2</sup>	H-1	-	5.224	-	5.222	-	5.155	5.279
	H-5	-	4.27	-	4.275	-	4.353	4.270
	CH3	-	1.246	-	1.246	-	1.243	1.234
Fuc <sup>3</sup>	H1	-	-	-	-	5.107	-	5.098
	H5	-	-	-	-	4.826	-	4.85
	CH3	-	-	-	-	1.174	-	1.166
Fuc <sup>4</sup>	H1	-	-	-	-	-	5.026	-
	H5	-	-	-	-	-	4.82	-
	CH3	-	-	-	-	-	1.243	-

oligosaccharide-alditol **20** (Klein et al., 1988). Thus, the structure proposed for 17b is :



*(iii) Structures of the GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc-ol core type*

*Structures 1, 4, 5, 8a, 8b, 11b.* The chemical shifts of the structural-reporter groups of these compounds (Table 4) are identical to those previously observed for bronchial mucus oligosaccharide-alditols **1, 5, 6, N1, 9** and **11b** (Breg et al., 1988), respectively.

*(iv) Structures of the GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) [GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)] GalNAc-ol core type*

*Structures 9b, 10b, 13c, 14c1, 14c2, 17d.* The NMR characteristics of these compounds (Table 5) match those of oligosaccharide-alditols **9Bb** (Lhermitte et al., 1991), **10b, 3a<sub>2</sub>, 15b**, (Breg et al., 1988), compound **15.1B** (Lamblin et al., 1984) and compound **19** (Breg et al., 1988), respectively. As an example, the 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of fraction 9b is shown in figure 6.

*Structure 10c.* FAB-MS analysis of permethylated fraction 10c showed the presence of only one pseudomolecular ion (M+Na)<sup>+</sup> at m/z 1025, indicating a tetrasaccharide constituted of GalNAc-ol, Gal, GlcNAc in a ratio of 1 : 1 : 2. The GC-MS analysis of the methyl glycosides indicated terminal galactose and terminal glucosamine, glucosamine substituted at C4, and galactosaminitol substituted at C3 and C6, confirmed by the presence of trimethyl anhydro galactosaminitol (Wieruszski et al. 1987).

Table 4. <sup>1</sup>H chemical shifts of structural reporter groups of monosaccharides for the HPLC-fractionated, neutral human salivary mucin oligosaccharide-alditols possessing the GlcNAc β (1→3) GalNAc-ol core unit.

A superscript at a monosaccharide residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked.

In the table heading the structures are represented by short-hand symbolic notation; ◇ = GalNAc-ol, ■ = Gal, ● = GlcNAc, □ = Fuc. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows



Residue	Reporter Group	Chemical shift in compound					
		1	4	5	8a	8b	11b
GalNAc-ol	H-2	4.285	4.287	4.286	4.272	4.262	4.270
	H-3	3.994	4.011	4.000	3.998	3.981	n.d.
	H-4	3.547	3.562	3.552	3.510	n.d.	n.d.
	H-5	4.138	4.134	4.139	4.124	4.110	4.132
	NAc	2.037	2.034	2.038	2.031	2.037	2.030
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	4.603	4.653	4.630	4.644	4.654	4.63
	H-6	3.949	3.953	4.020	4.036	3.951	n.d.
	NAc	2.084	2.073	2.083	2.074	2.113	2.075
Gal <sup>3</sup>	H-1	-	4.460	-	-	4.577	-
	H-4	-	3.919	-	-	3.893	-
Gal <sup>4</sup>	H-1	-	-	4.454	4.430	-	4.484
	H-4	-	-	3.926	3.898	-	n.d.
Fuc <sup>2</sup>	H-1	-	-	-	-	5.209	5.285
	H-5	-	-	-	-	4.268	4.270
	CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	1.231	1.28
Fuc <sup>3</sup>	H-1	-	-	-	5.139	-	5.129
	H-5	-	-	-	4.810	-	4.85
	CH <sub>3</sub>	-	-	-	1.178	-	1.24
		#	#	#	#	#	##

# analyzed at 400 MHz  
## analyzed at 500MHz

Table 5. <sup>1</sup>H chemical shifts of structural reporter groups of monosaccharides for the HPLC-fractionated, neutral human salivary mucin oligosaccharide-alditols possessing the GlcNAc β(1→6)[GlcNAc β(1→3)] GalNAc-ol core unit.

A superscript at a monosaccharide residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked.

In the table heading the structures are represented by short-hand symbolic notation: ◊ = GalNAc-ol, ■ = Gal, ● = GlcNAc, □ = Fuc. The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows



Residue	Reporter Group	Chemical shift in compound									
		9b	10b	10c	13c	14c1	14c2	17c1	17c2	17c3	17d
GalNAc-ol	H-2	4.283	4.279	4.284	4.27	4.280	4.280	4.282	4.282	4.282	4.265
	H-3	4.000	3.985	n.d.	n.d.	3.987	3.987	3.982	3.982	3.982	n.d.
	H-4	3.530	3.516	n.d.	n.d.	3.523	3.523	3.512	3.512	3.512	3.560
	H-5	4.223	4.234	4.236	4.23	4.229	4.229	4.220	4.220	4.220	4.212
	NAc	2.044	2.045	2.045	2.047	2.044	2.044	2.044	2.044	2.044	2.043
GlcNAc <sup>3</sup>	H-1	4.648	4.597	4.628	4.57	4.623	4.648	4.646	4.626	4.636	4.653
	H-6	3.958	3.950	n.d.	n.d.	4.024	3.952	3.954	4.019	4.030	3.953
	NAc	2.070	2.082	2.079	2.081	2.079	2.069	2.069	2.079	2.069	2.108
GlcNAc <sup>6</sup>	H-1	4.540	4.564	4.546	4.57	4.562	4.562	4.568	4.568	4.562	4.562
	H-6	3.928	3.998	n.d.	n.d.	3.997	3.997	4.009	4.009	3.998	3.994
	NAc	2.064	2.061	2.064	2.054	2.062	2.062	2.053	2.053	2.065	2.060
Gal <sup>3</sup>	H-1	4.454	-	-	-	-	4.453	4.452	-	-	4.570
	H-4	3.920	-	-	-	-	3.917	3.914	-	-	3.892
Gal <sup>4,3</sup>	H-1	-	-	4.456	-	4.453	-	4.452	4.428	-	-
	H-4	-	-	n.d.	-	3.927	-	3.928	3.890	-	-
Gal <sup>4,6</sup>	H-1	-	4.472	-	4.453	4.473	4.473	4.452	4.452	4.471	4.470
	H-4	-	3.928	-	n.d.	3.927	3.927	3.914	3.914	3.928	3.926
Fuc <sup>2</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.211
	H-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.270
	CH3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.233
Fuc <sup>3,3</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	-	-	5.135	-
	H-5	-	-	-	-	-	-	-	-	4.829	-
	CH3	-	-	-	-	-	-	-	-	1.178	-
Fuc <sup>3,6</sup>	H-1	-	-	-	5.120	-	-	5.115	5.115	-	-
	H-5	-	-	-	4.83	-	-	4.829	4.829	-	-
	CH3	-	-	-	1.179	-	-	1.178	1.178	-	-
		#	#	##	##	#	#	#	#	#	#

# analyzed at 400 MHz

## analyzed at 500MHz

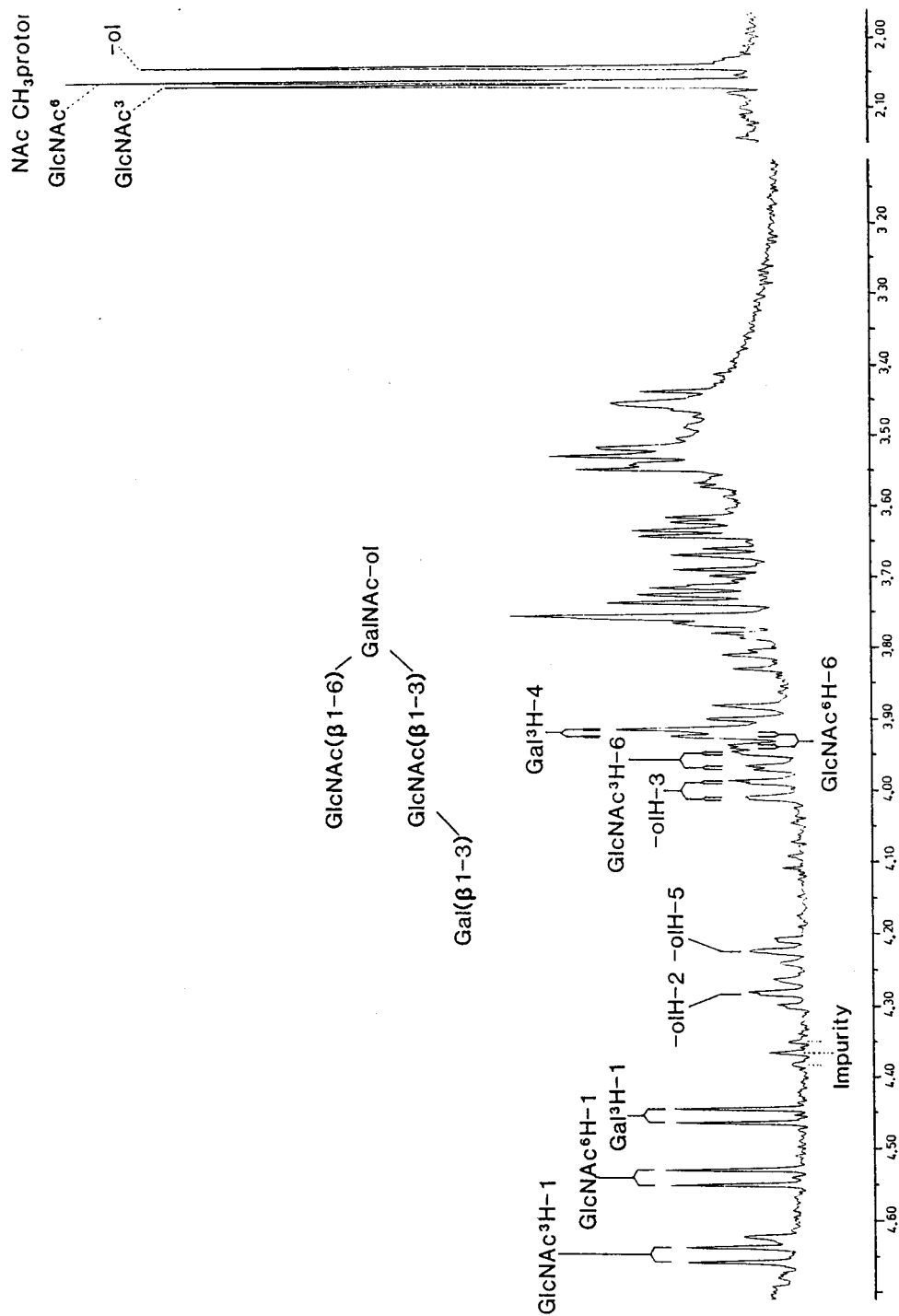
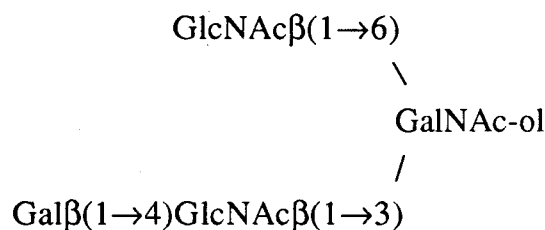


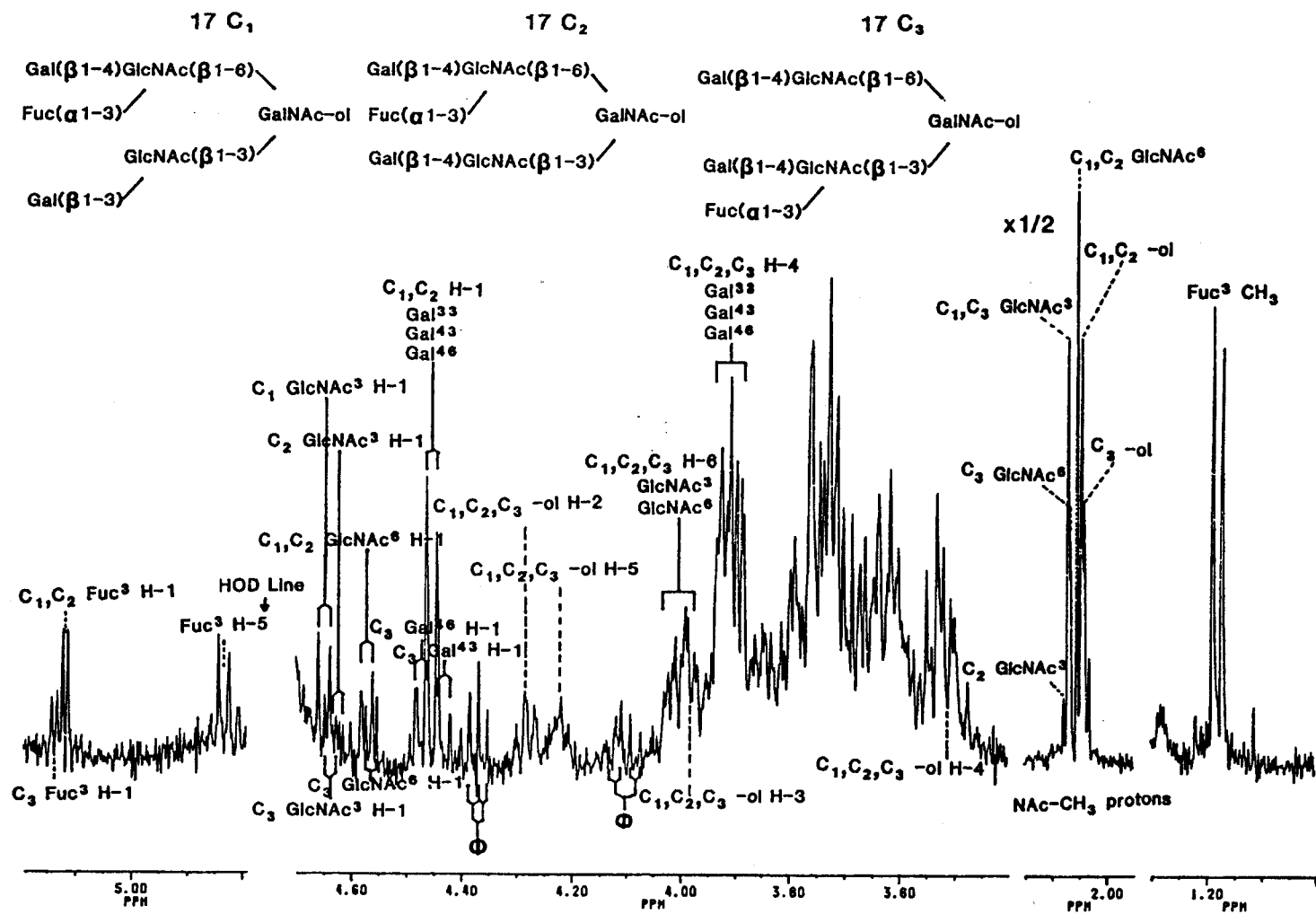
Figure 6. 400-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum (<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, p<sup>2</sup>H 7, 27°C) of neutral salivary oligosaccharide-alditol fraction 9b.

The  $^1\text{H-NMR}$  analysis revealed that structure 10c is an isomer of structure 9b with terminal galactose linked  $\beta 1-4$  to the core  $\text{GlcNAc}^3$ . The core is defined by the  $\text{GalNAc-ol}$  signals at  $\delta = 4.284$  for H-2 and  $\delta = 4.236$  for H-5. The H-1 doublet at  $\delta = 4.546$  is attributed to the  $\text{GlcNAc}^6$  residue in terminal position (compare with 9b). The chemical shifts of the anomeric proton and NAc signals of  $\text{GlcNAc}^3$  at  $\delta = 4.628$  and  $\delta = 2.079$  and the terminal Gal H-1 signal at  $\delta = 4.456$  point the occurrence of a type 1 disaccharide attached to the C-3 of  $\text{GalNAc-ol}$  and compare favorably to structure 14c1. Structure 10c is therefore :

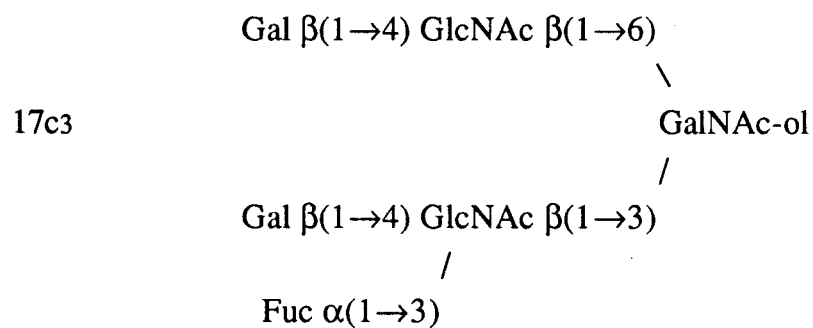
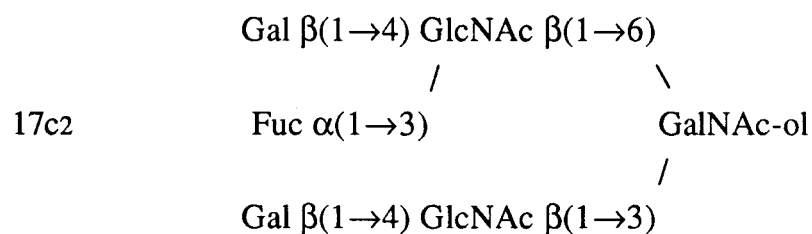
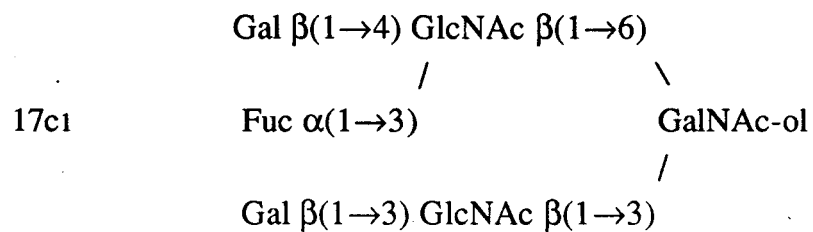


*Structures 17c1, 17c2, 17c3.* FAB-MS analysis of the permethylated fraction 17c showed the presence of a single pseudomolecular ion  $(\text{M}+\text{Na})^+$  at  $m/z$  1403 indicating one or more hexasaccharides with  $\text{GalNAc-ol}$ , Gal,  $\text{GlcNAc}$  and Fuc in a ratio of 1 : 2 : 2 : 1. The GC-MS analysis of the methyl glycosides indicated terminal galactose, and terminal fucose. Glucosamine was found 3, 4-disubstituted, 3-monosubstituted and 4-monosubstituted ; galactosaminitol was found disubstituted at C3 and C6 (confirmed by the presence of trimethyl anhydro galactosaminitol). The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of fraction 17c (Figure 7) shows that this fraction contains several hexasaccharide-alditols all having in common the core element  $\text{GlcNAc } \beta (1\rightarrow 6) [\text{GlcNAc } \beta (1\rightarrow 3)] \text{GalNAc-ol}$ . The spectrum is a reminiscent of that of fraction 19 from non-secretor respiratory mucin oligosaccharides (Lhermitte et al. 1991). The assignments of the structural reporter group protons of three of structures 17c1 and 17c3 match those of 19a and 19b respectively, (see Table 5).

Figure 7. 400-MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $2\text{H}_2\text{O}$ ,  $p^2\text{H}$  7,  $27^\circ\text{C}$ ) of neutral salivary oligosaccharide-alditol fraction 17c. Resonances marked by  $\phi$  stem from non-carbohydrate contaminants.



The remainder of the signals arise from a third compound (17c2), that differs from 17c1 in the presence of a type-2 unit at the GalNAc-ol C3 rather than a type-1. This is evidenced by the H-1 signal of Gal<sup>4</sup> at 4.452 being three times as intense as the other H-1 signals in the spectrum. From all these data, the structures of three oligosaccharide-alditols present in fraction 17c were deduced to be the following :





*Structure determination of sialylated oligosaccharides.*

The primary structures of the monosialylated oligosaccharide-alditols obtained from human salivary mucin (Scheme 2) were established by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. The chemical shifts of H-3ax and of H-3eq atoms of NeuAc  $\alpha 2 \rightarrow 6$  linked to GalNAc-ol are significantly different from those of NeuAc  $\alpha 2 \rightarrow 3$  linked to Gal (Van Halbeek et al., 1988).

NMR characteristics of compounds S1, S2, S3, S4, S6.2, S7, S9 and S6.1 (Table 6) match those described for oligosaccharide-alditols 1, 2, 3, 4, 6a1, 7, 9a1 in reference (Van Halbeek et al., 1988) and F-II-1-6 (Capon et al, 1989), respectively.

Table 6. <sup>1</sup>H chemical shifts of structural reporter groups of monosaccharides for the HPLC-fractionated, human salivary mucin sialylated oligosaccharide-alditols.

A superscript at a monosaccharide residue indicates to which position of the adjacent monosaccharide it is glycosidically linked.

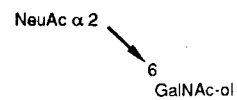
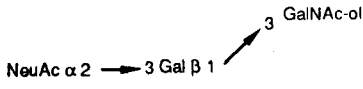
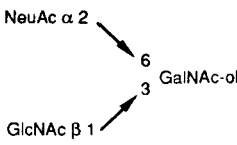
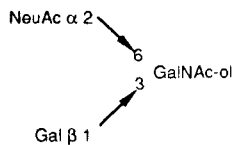
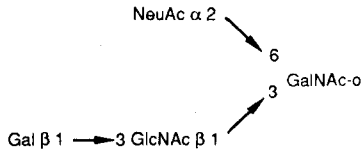
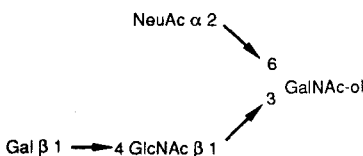
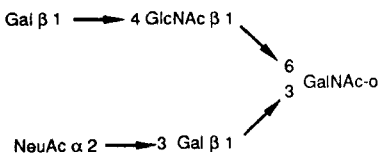
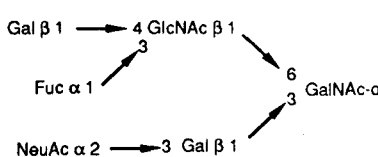
In the table heading the structures are represented by short-hand symbolic notation;  $\diamond$  = GalNAc-ol,  $\blacksquare$  = Gal,  $\bullet$  = GlcNAc,  $\square$  = Fuc,  $\circ$  = NeuAc.

The linkage position is specified by the direction of the connecting bars as follows



Residue	Reporter Group	Chemical shift in compound							
		1	2	3	4	6.1	6.2	7	9
GalNAc-ol	H-2	4.246	4.387	4.259	4.377	4.261	4.261	4.386	4.385
	H-3	n.d.	4.075	3.984	4.057	n.d.	n.d.	4.068	4.068
	H-4	3.413	3.496	n.d.	3.536	3.519	3.519	3.437	3.425
	H-5	4.020	4.184	4.183	4.243	4.180	4.180	4.268	4.262
	H-6'	3.533	n.d.	3.490	3.489	3.490	3.490	n.d.	n.d.
	NAc	2.056	2.045	2.033	2.047	2.035	2.035	2.065	2.066
<sup>3</sup> Gal	H-1	-	4.545	-	4.473	-	-	4.530	4.532
	H-3	-	4.120	-	n.d.	-	-	4.114	4.113
	H-4	-	3.929	-	3.896	-	-	3.930	3.928
<sup>3</sup> GlcNAc	H-1	-	-	4.608	-	4.658	4.634	-	-
	H-6	-	-	3.940	-	3.971	4.005	-	-
	NAc	-	-	2.078	-	2.066	2.076	-	-
Gal <sup>3,3</sup>	H-1	-	-	-	-	4.454	-	-	-
	H-4	-	-	-	-	3.920	-	-	-
Gal <sup>4,3</sup>	H-1	-	-	-	-	-	4.465	-	-
	H-4	-	-	-	-	-	3.926	-	-
GlcNAc <sup>6</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	4.558	4.560
	H-6	-	-	-	-	-	-	3.994	4.005
	NAc	-	-	-	-	-	-	2.065	2.056
Gal <sup>4,6</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	4.468	4.446
	H-4	-	-	-	-	-	-	3.922	3.891
Fuc <sup>3</sup>	H-1	-	-	-	-	-	-	-	5.104
	H-5	-	-	-	-	-	-	-	4.829
	CH3	-	-	-	-	-	-	-	1.174
NeuAc <sup>3</sup>	H-3ax	-	1.800	-	-	-	-	1.800	1.800
	H-3eq	-	2.773	-	-	-	-	2.773	2.773
	NAc	-	2.033	-	-	-	-	2.033	2.033
NeuAc <sup>6</sup>	H-3ax	1.701	-	1.695	1.693	1.697	1.697	-	-
	H-3eq	2.730	-	2.732	2.728	2.734	2.734	-	-
	NAc	2.033	-	2.030	2.033	2.031	2.029	-	-
		#	#	#	#	#	#	#	#

# analyzed at 400 MHz

compound	CCSD numbers	FCI	
S1	186-194, 196, 2338, 3185	066ec379	
S2	219-230, 232, 2400, 3035, 3036, 3371, 4036, 4037, 5119-5126	0bedd939	
S3	393-399, 3569, 5073	06d59267	
S4	411-413, 415-420, 425, 2468, 3468, 3469, 5063, 5064, 5068	06d42ec9	
S6.1	3647	0741d527	
S6.2	618-620, 622, 623, 3648	0743ac46	
S7	867-875, 2629, 3740, 4204, 5135-5137	0c116176	
S9	1237-1241, 2741	0d1e793a	

Scheme 2. Structures of 8 low-molecular-mass monosialylated oligosaccharide-alditols isolated from human salivary mucins.

## DISCUSSION

The chemical composition of the glycopeptides isolated after pronase treatment of the salivary glycoproteins is typical of mucin with a high content in carbohydrate (75%) and with serine and threonine accounting for 40% of the amino acids. The composition is similar to those described for high-molecular-weight human salivary mucins (Loomis et al., 1987 ; Veerman et al., 1989 ; Kawagashi et al., 1990). One of the differences is that the molar ratio of N-acetylgalactosamine to the total hydroxy amino acids for our human salivary mucin glycopeptides is larger than one. This ratio suggests that some N-acetylgalactosamine residues are not involved in carbohydrate-peptide linkages. Since the 20 donors were blood-group O, N-acetylgalactosamine residues in excess might be part of either Cad /Sd<sup>a</sup> antigens like in monkey cervical mucins (Nasir-Ud-Din et al., 1986), or of the core sequence GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc-ol found in oligosaccharides from meconium glycoproteins (Hounsell et al., 1985) or from avian salivary mucins (Wieruszeski et al., 1987). Such structures have not been found among the human salivary oligosaccharides purified so far, but Sd<sup>a</sup> blood group activity has been detected in human saliva before (Morton et al., 1970).

Alkaline borohydride treatment of salivary mucin glycopeptides, that were isolated from total saliva of 20 donors with blood group O, produced a mixture of glycopeptides and oligosaccharide-alditols. Fractionation by ion-exchange chromatography and gel filtration yielded a pool of relatively small neutral oligosaccharide-alditols, designated Ic, and a pool of small monosialylated oligosaccharide-alditols designated Iic. Fraction Ic was fractionated by HPLC using two columns sequentially, one containing an alkylamine-bonded phase, which led to 23 fractions, and another containing an octadecylsilane bonded phase which allowed the subfractionation of 15 of the 23 fractions into 64 subfractions ; fraction Iic was separated into 10 fractions after HPLC. <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy provided the primary structure of 37

mucin-type oligosaccharide-alditols (Schemes 1 and 2).

The amounts of carbohydrates in fractions 7a, 7b, 7c, 11c, 13b, 13e, 14a, 16a, 16b, 16c, 16d, S8, S10 were too low to determine their structures; this was also the case for fraction S5, which gave a high absorption at 206 nm but did not contain much carbohydrate. The occurrence of these minor fractions and also of the more acidic fractions, III and IV, which have not been studied so far, indicates that the heterogeneity of oligosaccharide-alditols in salivary glycoproteins is even larger than detailed in this study.

The 37 oligosaccharide structures which have been determined ranged from di- to hexa-saccharide-alditols. Their cores belonged to one of the four classical types of core : type 1 (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc-ol), type 2 (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3[GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6]GalNAc-ol), type 3 (GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc-ol) or type 4 (GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3[GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6]GalNAc-ol) (Van Halbeek, 1984 ; Brockhausen et al., 1985). Their "backbones" contain either type 1 (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc) disaccharide units. Fucose and sialic acid residues define the "periphery" of the carbohydrate chains : fucose residues give rise to different determinants such as H, X (Gooi et al., 1981), Y (Abe et al., 1983) or Lewis b antigens (Lloyd et al., 1968).

The carbohydrate chains derived from porcine (Carlson et al., 1968 ; Baig et al., 1972 ; Van Halbeek et al., 1981), bovine (Savage et al., 1986; Tsuji et al., 1986), goat (Dutta et al., 1982), rat (Slomiany et al., 1978), canine (Lombart et al., 1974), ovine (Gottschalk et al., 1972) and avian salivary mucins (Wieruszski et al., 1987) have been studied in great detail. The carbohydrate moieties of salivary mucins can be very simple i.e. made up of single *N*-acetylgalactosamine residues or *N*-acetylneuraminyl  $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6) *N*-acetylgalactosamine as in ovine submaxillary mucins (Graham et al., 1960). In porcine submaxillary mucins, four different trisaccharides containing *N*-acetyl- or *N*-glycolyl-neuraminic acid were found (Savage et al., 1986) and, in rat sublingual glycoprotein, five sialyl-oligosaccharides composed of 9 to 15 sugar residues have been isolated (Slomiany et al., 1978). The carbohydrate

chains from these animal sources do not seem to be very diverse.

In contrast, the 37 oligosaccharide-alditols characterized in the present study illustrate the wide heterogeneity of the low-molecular-weight neutral and sialylated carbohydrate chains isolated from the highly glycosylated regions of high molecular mass human salivary mucins. Among these 37 carbohydrate chains, six oligosaccharide-alditols were also partially characterized from the low-molecular-weight salivary mucins (Reddy et al., 1985); five of them correspond to oligosaccharides 2, 3, 17b, S2, and S9 of this study.

The origin of this heterogeneity is probably not related to degradation by glycosidases produced by the bacteria of the oral cavity since the saliva was immediately frozen after sampling. Such a heterogeneity might be due to the superposition of the different glycosylation phenotypes of the twenty salivas that form this pool: however we tried to reduce this type of heterogeneity by collecting only saliva from patients with blood group O. Part of the heterogeneity of the salivary carbohydrate chains might also be related to the different origins of the salivary secretions, with submandibular, sublingual and minor glands producing slightly different mucins as suggested by lectin histochemical studies (Mc Mahon et al., 1989 ; Laden et al., 1984 ; Cohen et al., 1990 ; Cohen et al., 1991).

In the case of human exocrine secretions, a wide heterogeneity of carbohydrate chains has been observed in gastric (Slomiany et al., 1984) and colonic (Podolsky et al., 1985) mucins. For human bronchial mucin oligosaccharides, a similar heterogeneity was found in secretions from a single patient as in the pooled secretions of different patients suffering from cystic fibrosis or chronic bronchitis (Lamblin et al., 1984 ; Klein et al., 1988).

This diversity of carbohydrate chains raises the question of its function. It has been suggested that the wide diversity of carbohydrate chains of human respiratory mucins might represent multiple recognition sites for bacterial adhesins, allowing the adhesion and the removal of inhaled bacteria (Lamblin et al., 1991). Therefore, the diversity of carbohydrate chains from human

salivary mucins might have a protective role. Several bacteria isolated from the oral cavity, or from the tracheo-bronchial tree in pathological conditions, possess adhesins able to recognize carbohydrate structures similar to some of the chains that we have isolated: e.g. Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc for *Actinomyces naeslundii* (Brennan et al., 1987) ; NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc for *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* (Murray et al., 1982) and *E. coli* (Leffler et al., 1986) ; N-acetylneuraminic acid for *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the oral cavity (Komiyama et al., 1987) ; type 1 (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc) disaccharide units for other strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Ramphal et al., 1991) and for *Streptococcus pneumoniae* (Andersson et al., 1983).

Thus, the carbohydrate heterogeneity of the human salivary mucins may represent a mosaic of bacterial adhesion sites and be involved in the early events of the non-immune defence of the oral cavity.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported in part by NIH Grants HL-38213 and P41-RR-05351, by US Cystic Fibrosis Foundation grant G169, and by the *Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose*.

## REFERENCES

- Abe, K., Mc Kibbin, J. M. & Hakomori, S. I. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11793-11797.
- Andersson B., Dahmen, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G., & Svanborg-Edén, C. (1983) *J. Exp. Med.* 158, 559-570.
- Baig, M.M. & Aminoff, D. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6111-6148
- Boersma, A., Lamblin, G., Degand, P. & Roussel, P. (1981) *Carbohydr. Res.* 94, C7-C9.
- Brack, C.M. & Reynolds, E.C. (1987) *Infect. Immun.* 55, 1264-1273
- Breg, J., Van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F.G., Klein, A., Lamblin, G. & Roussel P. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 643-654.
- Brennan, M.J., Joralmon, R.A., Cisar, J.O. & Sandberg, A.L. (1987) *Infect. Immun.* 48, 331-335.
- Brockhausen, I., Matta, K.L., Orr, J. & Schachter, H. (1985) *Biochemistry* 24, 1866-1874.
- Capon, C., Leroy, Y., Wieruszkeski, J.M., Ricart, G., Strecker, G., Montreuil, J. & Fournet, B. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 139-152.
- Carlson, D.M. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 616-626.
- Cisar, J.O., (1986) *Microbial lectins and agglutinins* (Mirelman, D., Ed) pp 183-196
- Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984) *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.
- Cohen, R.E., Aguirre, A., Neiders M.E., Levine, M.J., Jones P.C., Reddy, M.S. & Haar, J.C. (1990) *Arch. Oral Biol.* 35, 127-136
- Cohen, R.E., Aguirre, A., Neiders M.E., Levine, M.J., Jones P.C., Reddy, M.S. & Haar, J.C. (1991) *Arch. Oral Biol.* 36, 347-356
- Demaille, J., Dautrevaux, M., Havez R. & Biserte, G. (1965) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 12, 3506-3511.
- Doublet, S., Bock, K., Smith, D., Darvill, A. & Albersheim, P. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 475-477.



- Dutta, B. & Rao, C.V.N. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 701, 72-85.
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502.
- Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D. & Evans, M.J. (1981) *Nature (Lond)* 292, 156-158.
- Gottschalk, A. & Bhargava, A.S. (1972) in *Glycoproteins. Their composition, structure & function* (Gottschalk, A., Ed) pp 810-829, Elsevier, Amsterdam
- Graham, E.R.B. & Gottschalk, A. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 38, 513-524.
- Houdret, N., Le Treut, A., Lhermitte, M., Lamblin, G., Degand, P. & Roussel P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 668, 413-419.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Feeney, J., Gooi, H.C., Pickering, N.J., Stoll, M.S., Lui, S.C. & Feizi, T. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 367-377
- Kawagishi, S., Fahim, R.E.F., Wong, K.H., & Bennick, A. (1990) *Arch. Oral Biol.* 35, 265-272.
- Klein, A., Lamblin, G., Lhermitte, M., Roussel, P., Breg, J., Van Halbeek H. & Vliegthart, J.F.G. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 631-642.
- Komiyama, K., Habbick, B.F. & Tumber, S.K. (1987) *Infect. Immun.* 55, 2364-2369.
- Laden, S.A., Schulte, B.A. & Spicer, S.S. (1984) *J. Histochem. Cytochem.* 32, 965-972.
- Lamblin, G., Klein, A., Boersma, A., Nasir-Ud-Din & Roussel, P. (1983) *Carbohydr. Res.* 118, C1-C4.
- Lamblin, G., Boersma, A., Lhermitte, M., Roussel, P., Mutsaers, J.H.G.M., Van Halbeek, H. & Vliegthart J.F.G. (1984) *Eur. J. Biochem.* 143, 227-236.
- Lamblin, G., Boersma, A., Klein, A., Roussel, P., Van Halbeek, H. & Vliegthart, J.F.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9051-9058.
- Lamblin, G., Lhermitte, M., Klein, A., Houdret, N., Scharfman, A., Ramphal, R., & Roussel, P. (1991) *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, S19-S24.

- Leffler, H., & Svanborg-Edén, C. (1986) *Microbial lectins and agglutinins* (Mirelman, D., Ed) pp 83-111.
- Levine, M.J., Hertzberg, M.C., Levine, M.S., Ellison, S.A., Stinson, M.W., Li, H.C. & Van Dyke. (1978) *Infect. Immun.* 19, 107-115
- Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G., Roussel, P., Strang, A.M. & Van Halbeek, H. (1991) *Glycobiology*, 1, 277-293.
- Lloyd, K.O., Kabat, E.A., & Licerio, E. (1968) *Biochemistry* 7, 2976-2990.
- Loomis, R.E., Prakobphol A., Levine, M.J., Reddy, M.S. & Jones, P.C. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 258, 452-464.
- Lombart, C.G. & Winzler, R.J. (1974) *Eur. J. Biochem.* 49, 77-86.
- McMahon, R.F.T., Benbow, E.W., Lofthouse, A.K., & Stoddart, R.W. (1989) *Histochem. J.* 21, 663-674.
- Morton, J.A., Pickles, M.M., & Terry, A.M. (1970) *Vox Sang.* 19, 472-482
- Murray, P.A., Levine, M.J., Tabak, L.A. & Reddy, M.S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 390-396.
- Mutsaers, J.H.G.M., Van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G. , Wu, A.M. & Kabat, E.A. (1986) *Eur. J. Biochem.* 157, 139-146.
- Nasir-Ud-Din, Jeanloz, R.W., Lamblin, G., Roussel, P., Van Halbeek, H., Mutsaers J.H.G.M. & Vliegthart, J.F.G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1992-1997.
- Podolski, D.K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 8262-8271.
- Ramasubbu, N., Reddy, M.S., Bergey, E.J. Haraszthy, G.G., Soni, S.D., & Levine M.J. (1991) *Biochem.J.* 280, 341-352.
- Ramphal, R., Carnoy, C., Fievre, S., Michalski, J.C., Houdret, N., Lamblin, G., Strecker, G., & Roussel, P. (1991) *Infect. Immun.* 59, 700-704.
- Reddy, M.S., Levine, M.J. & Prakobphol, A. (1985) *J. Dent. Res.* 64, 33-36
- Roussel, P., Lamblin, G., Degand P., Walker-Nasir, E. & Jeanloz, R.W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2114-2122.
- Savage, A.V., Koppen, P.L., Schiphorst, W.E.C.M., Trippelwitz, L.A.W., Van

- Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G. & Van den Eijnden, D.H. (1986) *Eur. J. Biochem.* 160, 123-129.
- Schrager, J. & Oates, M.D.G. (1971) *Arch. Oral Biol.* 16, 287-303.
- Slomiany, A. & Slomiany, B.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7301-7306.
- Slomiany, B.L., Zdebska, E. & Slomiany, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2863-2869.
- Spellman, M.W., Basa, L.J., Leonard, C.K., Chakel, J., O'Connor, J.V., Wilson, S. & Van Halbeek, H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 14100-14111.
- Tabak, L.A., Levine M.J., Mandel, I.D. & Ellison S.A. (1982) *J. Oral Path.* 11, 1-17.
- Tsuji, T. & Osawa, T. (1986) *Carbohydr. Res.* 151, 391-402.
- Van Halbeek, H. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* 12, 601-605
- Van Halbeek, H., Dorland, L., Haverkamp, J., Veldink G.A., Vliegthart, J.F.G., Fournet, B., Ricart, G., Montreuil, J., Gathmann, W.D. & Aminoff, D. (1981) *Eur. J. Biochem.* 118, 487-495.
- Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J.F.G., Hull, W.E., Lamblin, G., Lhermitte, M., Boersma, A., & Roussel, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 7-20.
- Van Halbeek, H., Breg, J., Vliegthart, J.F.G., Klein, A., Lamblin, G. & Roussel P. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 443-460.
- Veerman, E.C.I., Valantijn-Benz, M., Bank, R.A. & Van Nieuw Amerongen, A. (1989) *J. Biol. Buccale*, 17, 307-319.
- Wieruszkeski, J.M., Michalski, J.C., Montreuil, J., Strecker G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Van Halbeek, H., Mutsaers, J.H.G.M., & Vliegthart, J.F.G. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6650-6657.

## Particularités structurales des mucines salivaires de patients atteints de mucoviscidose

Nous avons réalisé, sur un pool de salive de patients souffrant de mucoviscidose, une étude identique à celle que nous venons de rapporter pour la salive normale

La salive totale de trois patients atteints de mucoviscidose a été recueillie et les oligosaccharides de mucines salivaires ont été purifiés à partir des glycopeptides de haute masse moléculaire (MS3) (pour tous les renseignements techniques se référer à l'article précédent). Même si la caractérisation des chaînes glycaniques n'a pas pu être menée à son terme, il a été possible de tirer quelques renseignements des profils HPLC.

La figure 3 présente les profils d'élution des oligosaccharides neutres obtenus à partir des mucines salivaires de sujets normaux (fig. 3A) et de malades atteints de mucoviscidose (fig. 3B). On note une **hétérogénéité des chaînes glycaniques de mucines salivaires de mucoviscidose très similaire à celle observée pour les mucines salivaires normales**. Chacun des pics a été fractionné sur la colonne greffée par les groupements octadécylsilane (C18). Les profils d'élution de quelques mélanges d'oligosaccharides sont présentés dans la figure 4. Les diagrammes d'élution des fractions 8 et 9 montrent que dans les mucines de salive de mucoviscidose, les oligosaccharides 8a et 9a prédominent, alors que dans la salive normale 8b et 9b sont majoritaires. Des différences plus importantes apparaissent dans les diagrammes d'élution des fractions les plus retenues sur la colonne de type NH<sub>2</sub>. On peut noter par exemple la fraction 17, qui dans la salive normale est sous fractionnée en 4 pics, alors que, dans la salive de mucoviscidose, un seul pic majeur est présent.

Ces résultats montrent donc des différences dans les profils d'élution en C18 pour les oligosaccharides les plus longs. Il faut néanmoins interpréter ces résultats avec précaution. Il est certes possible d'évoquer des anomalies de glycosylation pour expliquer ces différences de profil mais l'absence de données structurales, notamment en RMN, incite à la prudence. Il faut aussi retenir une autre hypothèse : les différences observées pourraient provenir de différences dans l'expression des génotypes de glycosylation tel que le système sécréteur/non-sécréteur ou le système Lewis. On peut aussi envisager l'existence de groupes sanguins non encore décrits. Ainsi, la superposition de différents phénotypes de glycosylation pourrait expliquer qu'il y ait une hétérogénéité des chaînes glycaniques plus grande dans un pool salive

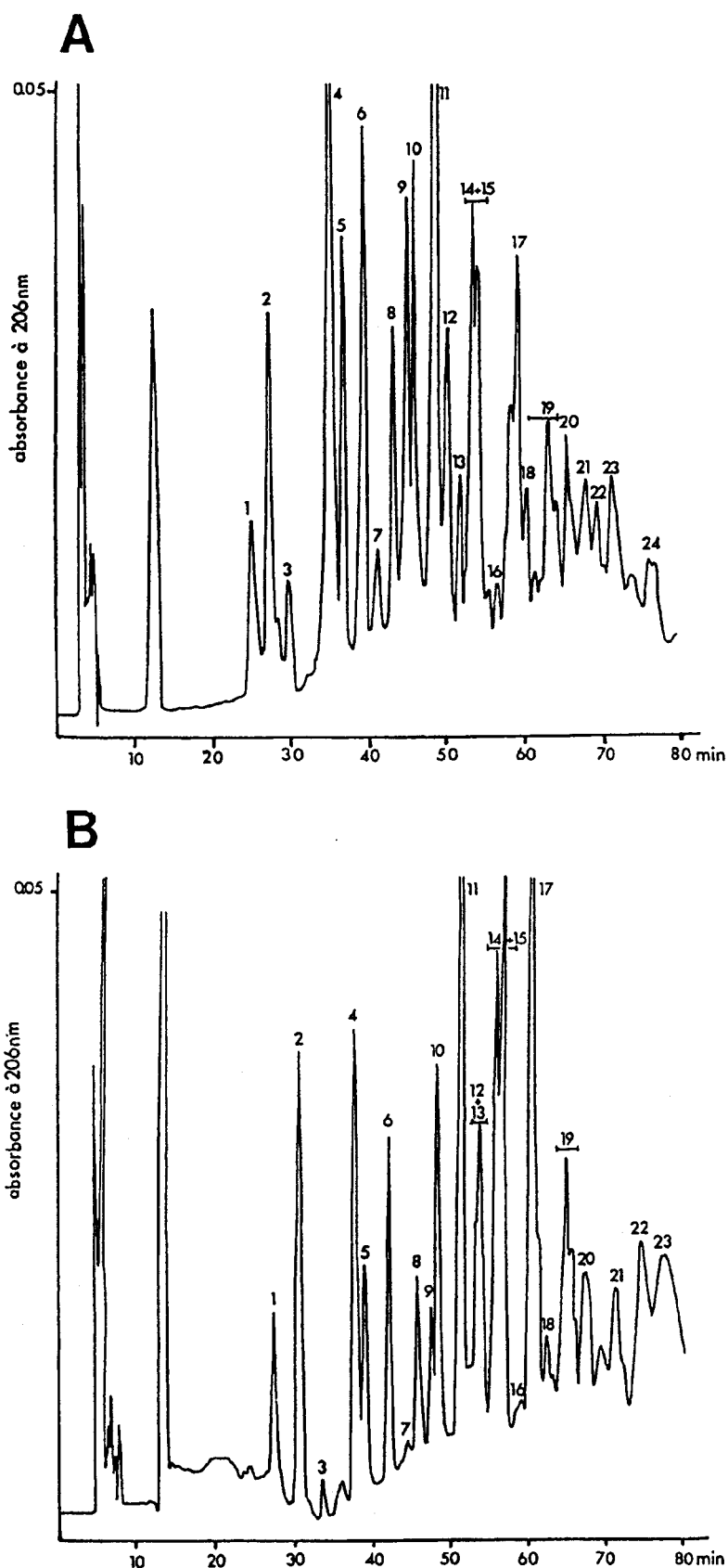


Figure 3 : Profils d'élution en HPLC sur colonne de Lichrosorb-NH2 des oligosaccharides-alditols de la fraction neutre Ic qui a été obtenue après traitement alcalin des glycopeptides salivaires de haute masse moléculaire. La colonne est éluée par un gradient linéaire acétonitrile/eau (v/v) de 85/15 à 60/40 en 1 h. A : salives d'individus normaux ; B : salives de patients atteints de mucoviscidose.

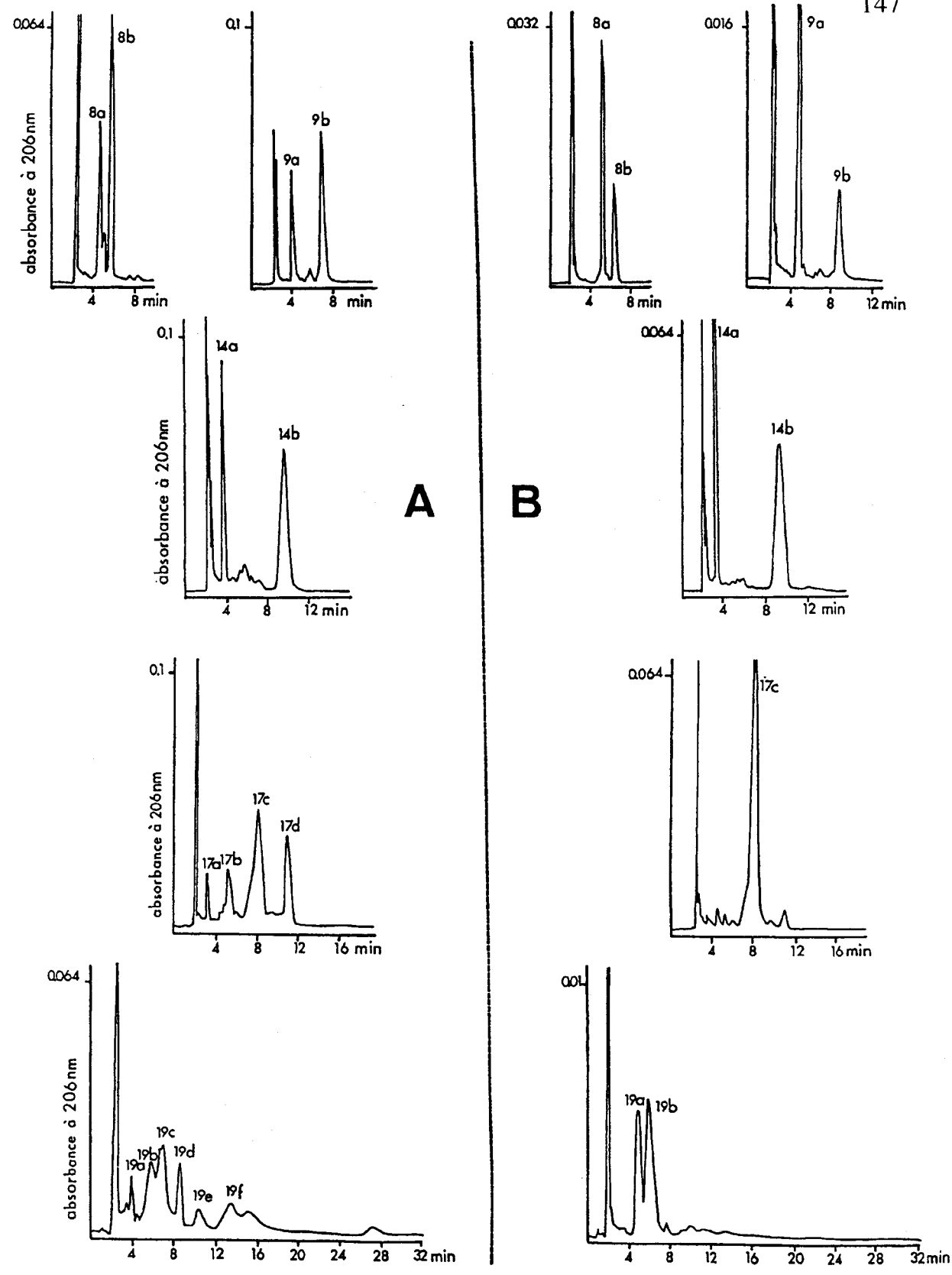


Figure 4 : Profils d'éluéon en HPLC sur colonne de type Ultrasphere ODS (C18) des fractions 8, 9, 14, 17 et 19 obtenues après fractionnement sur Lichrosorb-NH2 de la fraction neutre Ic. La colonne est éluee par de l'eau. A : salives d'individus normaux ; B : salives de patients atteints de mucoviscidose.

### III<sup>ème</sup> PARTIE

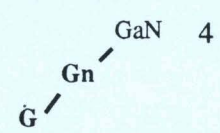
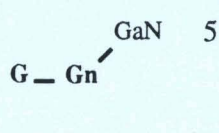
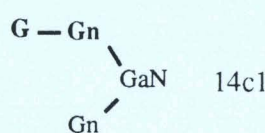
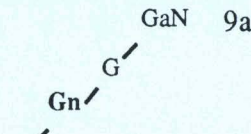
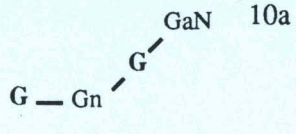
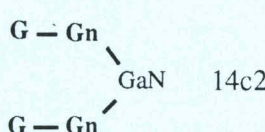
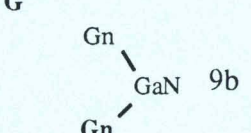
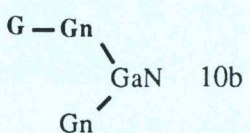
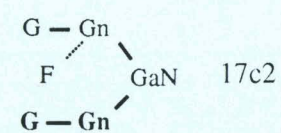
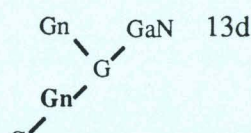
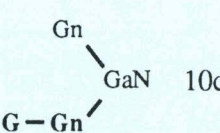
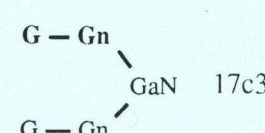
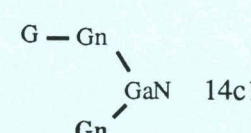
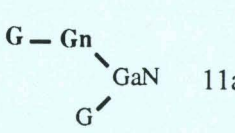
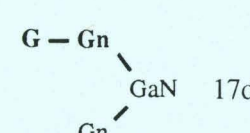
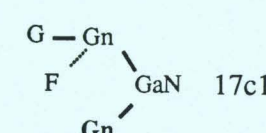
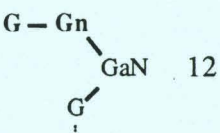
#### IDENTIFICATION DE SITES RECEPTEURS DE *P. AERUGINOSA*

L'hétérogénéité des chaînes glycaniques des mucines salivaires, décrite dans le chapitre précédent, s'est avérée beaucoup plus grande que ce que l'on pouvait imaginer. Pour identifier le ou les site(s) récepteur(s) de *P. aeruginosa*, il aurait été théoriquement envisageable de purifier les oligosaccharides et de tenter d'inhiber l'adhésion de *P. aeruginosa* par les différentes chaînes glycaniques, mais, compte tenu des faibles quantités d'oligosaccharides purifiés, cette approche était techniquement trop longue. De plus, la coupure de la liaison O-glycosidique se faisant en milieu réducteur, la fonction réductrice est bloquée et par conséquent les chaînes glycaniques ne peuvent plus être transformées en néoglycolipides par les techniques actuellement connues (160). Nous avons donc choisi une autre approche pour essayer d'identifier le ou les site(s) récepteur(s) de *P. aeruginosa*.




En examinant les structures des chaînes glycaniques des mucines salivaires (p. 119-122 et Tableau 6) et bronchiques, on remarque que certaines chaînes glycaniques ont une forte analogie structurale avec les oligosaccharides du lait (75). Par exemple, la structure de la chaîne 9a (Tableau 6) est très voisine de la structure du lacto-N-tétraose: elle n'en diffère que par le sucre en position réductrice terminale, glucose dans le cas du lacto-N-tétraose et N-acétylgalactosamine dans le cas de l'oligosaccharide-alditols 9a. Il y a aussi une forte analogie entre la chaîne glycanique 10a (Tableau 6) et le lacto-N-néotétraose.



Lamblin et coll. (90) ont déjà observé *in vitro*, une inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines bronchiques humaines par un mélange d'oligosaccharides de lait maternel. Ces oligosaccharides, que l'on peut obtenir en grande quantité, présentent aussi l'intérêt d'avoir leur fonction réductrice libre et donc de pouvoir être dérivés chimiquement en néoglycolipides.

Tableau 6 : Liste des oligosaccharides de mucines salivaires normales possédant des chaînes N-acétyllactosaminiques de type 1 et de type 2

Chaînes de type 1 Gal $\beta$ 1-3GlcNAc	Chaînes de type 2 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	
 4	 5	 14c1
 9a	 10a	 14c2
 9b	 10b	 17c2
 13d	 10c	 17c3
 14c1	 11a	 17d
 17c1	 12	

- GaN = N-acétylgalactosaminitol ; Gn = N-acétylglucosamine ; G = Galactose ; F = Fucose

Liaisons  $\beta$ 1,6   
 $\beta$ 1,4   
 $\beta$ 1,3 

Liaisons  $\alpha$ 1,3   
 $\alpha$ 1,2 

- La numérotation des chaînes glycaniques est celle employée dans la deuxième partie



Dans l'article intitulé "*Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide units", des néoglycolipides ont été préparés à partir d'oligosaccharides de lait ou encore d'urine de patients souffrant de sialidose ou de mannosidose, et ont été utilisés pour caractériser des sites récepteurs de *P. aeruginosa*.

La purification et le couplage des oligosaccharides ont été assurés par le groupe de G. Strecker à l'USTL Flandres Artois, Villeneuve d'Ascq. Deux techniques d'adhésion directe de *P. aeruginosa* ont été développées. La première en plaque de microtitration est similaire à celle qui est détaillée dans la première partie pour les glycopeptides. La seconde technique consiste à mettre en contact *P. aeruginosa* radiomarké par le sulfate S<sup>35</sup> et les néoglycolipides chromatographiés sur couches minces de silice; le repérage des bactéries ayant adhéré se fait alors par autoradiographie.

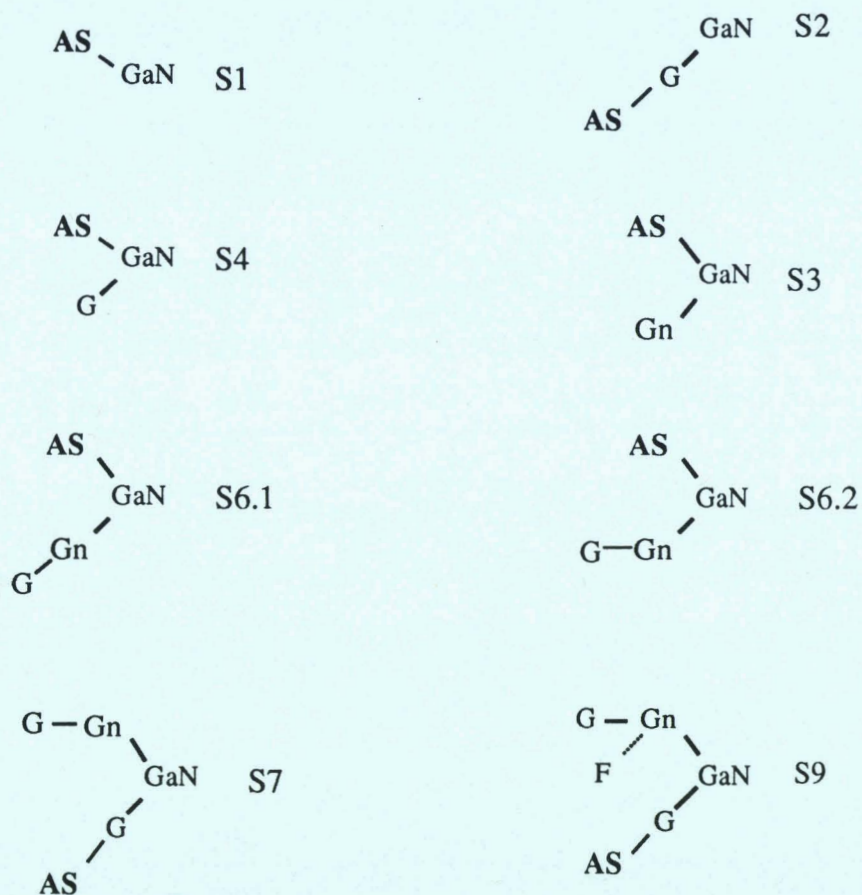
Cette étude a permis de montrer que *P. aeruginosa* reconnaissait les chaînes N-acétyllactosaminiques de type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) et de type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc), que la sialylation en  $\alpha$ 2-6, mais pas en  $\alpha$ 2-3, diminuait l'adhésion, et enfin que la fucosylation de telles structures de type 1 et de type 2 diminuait fortement leur reconnaissance par *P. aeruginosa*.

A la vue de ces résultats, l'adhésion résiduelle de *P. aeruginosa* sur les glycopeptides salivaires désialylés par la neuraminidase de *C. perfringens* (première partie, troisième article) pourrait s'expliquer par la présence de sites N-acétyllactosaminiques de type 1 ou de type 2.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, la reconnaissance des mucines salivaires par *P. aeruginosa* fait surtout intervenir des structures sialylées dont certaines figurent peut-être dans le Tableau 7. Malheureusement, ne disposant pas d'oligosaccharides de lait analogues, il ne nous a pas été possible jusqu'à présent de mener une étude visant à identifier les récepteurs sialylés de *P. aeruginosa*.

L'identification des sites de reconnaissance de *P. aeruginosa* n'est donc que partielle.

Tableau 7 : Liste des oligosaccharides sialylés de mucines salivaires normales identifiés par RMN du proton à 400 MHz (deuxième partie des travaux personnels)



- GaN = N-acétylgalactosaminitol ; Gn = N-acétylglucosamine ; G = Galactose ; F = Fucose ; AS = Acide N-acétylneuraminique

Liaisons  $\beta$ 1,6  $\diagdown$   
 $\beta$ 1,4  $\text{---}$   
 $\beta$ 1,3  $\diagup$

Liaisons  $\alpha$ 2,6  $\text{---}$   
 $\alpha$ 1,3  $\diagup$   
 $\alpha$ 2,3  $\diagdown$

- La numérotation des chaînes glycaniques est celle employée dans la deuxième partie

## *Pseudomonas aeruginosa* Recognizes Carbohydrate Chains Containing Type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or Type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) Disaccharide Units

REUBEN RAMPHAL,<sup>1\*</sup> CHRISTOPHE CARNOY,<sup>2</sup> SOPHIE FIEVRE,<sup>3</sup> JEAN-CLAUDE MICHALSKI,<sup>3</sup> NICOLE HOUDRET,<sup>2</sup> GENEVIEVE LAMBLIN,<sup>2</sup> GERARD STRECKER,<sup>3</sup> AND PHILIPPE ROUSSEL<sup>2</sup>

Department of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida 32610,<sup>1</sup> and Unité 16, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Place de Verdun, 59045 Lille,<sup>2</sup> and Unité 111, Centre National de la Recherche Scientifique, 59650 Villeneuve D'Ascq,<sup>3</sup> France

Received 17 September 1990/Accepted 21 November 1990

The adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) and type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide determinants was studied in a microtiter adhesion assay and a thin-layer chromatography bacterial overlay assay. The oligosaccharides were prepared from human breast milk and human urine and were conjugated to hexadecylamine to form neoglycolipids that were used in the assays. Both the mucoid and the nonmucoid strains that were studied recognized the disaccharide determinants. Sialylation of the oligosaccharides did not suppress binding in the thin-layer chromatography assay, but  $\alpha$ 2-6-linked sialic acid blocked binding in the microtiter assay. The use of bovine serum albumin instead of gelatin as a blocking agent against nonspecific binding completely suppressed binding in the thin-layer chromatography assay. Isogenic nonpiliated mutants of nonmucoid strains constructed by interrupting the pilin gene retained their adhesive capacity for the disaccharide units, indicating that binding to the disaccharides was mediated by a nonpilus adhesin(s). Furthermore, two monoclonal antibodies that recognize the type 2 disaccharide determinant (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) partially inhibited adhesion of a pair of piliated and nonpiliated isogenic strains to mucin. This study suggests that *P. aeruginosa* utilizes a nonpilus adhesin(s) to bind to disaccharide units commonly found in mucins, in addition to pili and alginate, two previously described adhesins.

Receptors for *Pseudomonas aeruginosa* have been found on at least two types of glycoconjugates, namely, glycolipids and mucins. The minimal structure recognized on glycolipids is claimed to be GalNAc $\beta$ 1-4Gal sequence commonly found in the glycosphingolipid of cell surfaces (8). However, using a very similar technique (i.e., thin-layer chromatography [TLC]) with an overlay of radiolabeled bacteria, other workers have suggested that *P. aeruginosa* is a lactose binder and that the Gal $\beta$ 1-4Glc internal sequence of the glycosphingolipid is in effect the receptor (1, 5). Furthermore, studies of glycolipid receptors are conflicting owing to the fact that sialic acid was reported to prevent binding (8) or alternately to play a role in binding (1).

Studies of the other type of glycoconjugate receptors, the mucin glycoproteins, have not reached the oligosaccharide level, mainly because of the tremendous microheterogeneity of the oligosaccharides found in mucins (15). There are probably hundreds of different oligosaccharide structures, and to date, it has not been possible to prepare them in a nonreduced form in quantity. However, the data which have been gathered from oligosaccharide degradation and sugar inhibition studies have implicated sialic acid and *N*-acetylglucosamine as parts of the receptor on mucins (19). It may not be possible to completely reconcile the studies of glycolipids with those of mucins because neither Gal $\beta$ 1-4Glc nor GalNAc $\beta$ 1-4Gal is found in mucins. Mucins do, however, contain large amounts of disaccharide units as part of the oligosaccharide backbone or periphery in either the type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or the type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) forms, and in the peripheral location these chains may be substi-

tuted by sialic acid, fucose, and sulfate, etc. (15). It is therefore conceivable that these structures, which are often the sites of modification of the glycan chains to provide functional properties such as blood group determination (15), may be receptor candidates in mucins.

We recently noted that oligosaccharides from human breast milk and containing type 2 disaccharide units inhibited the adhesion of many *P. aeruginosa* strain to mucins, whereas those with type 1 disaccharide units were much less inhibitory (12). However, since we could not increase inhibition to greater than 50 to 60%, another approach was taken to study these potential receptors. In this study, we synthesized neoglycolipids from oligosaccharides by a recently described method and used these in a direct adhesion assay as well as the TLC overlay assay. We found that both type 1 and type 2 disaccharide units were indeed *P. aeruginosa* receptors and that sialylation was inhibitory only in the  $\alpha$ 2-6 linkage. Furthermore, these determinants appeared to be the receptors for a nonpilus adhesin(s).

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Strain 1244 is a virulent hyperpiliated strain, and strain M35 is a mucoid strain; both strains adhere to mucins (19). Strain PAK is a frequently used standard laboratory strain obtained from S. Lory, University of Washington, Seattle. 1244-NP and PAK-NP are isogenic nonpiliated derivatives of 1244 and PAK, respectively, constructed by inserting a DNA cassette specifying tetracycline resistance into the pilin structural gene and replacing the wild-type pilin genes with this disrupted gene (16). Tetracycline resistance was used to select for the *pil* genotype. The organisms were grown in trypticase soy broth overnight and

\* Corresponding author.

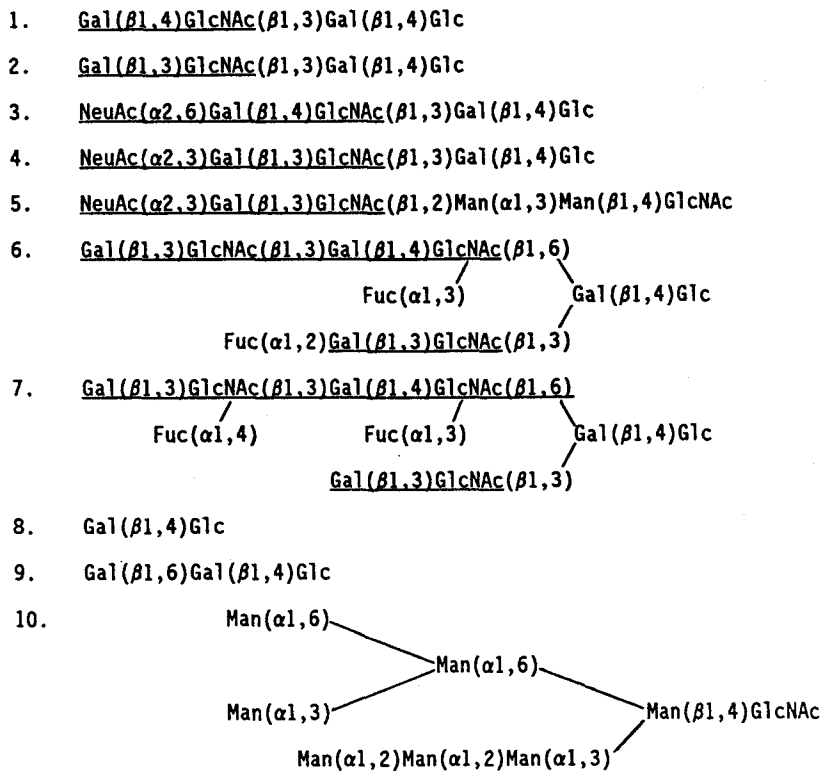


FIG. 1. Oligosaccharides studied after conjugation. Abbreviations: Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Glc, glucose; Fuc, fucose; Man, mannose; Neu Ac, *N*-acetylneuraminic acid.

used at concentrations of about  $10^6$  to  $10^7$  CFU/ml in the microtiter adhesion assay.

**Preparation of neoglycolipids.** Most of the oligosaccharides were isolated from human breast milk as described previously (6). Others were purified from the urine of patients with sialidosis (18) or mannosidosis (2). Sodium cyanoborohydride and 4-hexadecylaniline were purchased from Aldrich Chemicals (Steinholm, Federal Republic of Germany). The neoglycolipids were synthesized by conjugation of the oligosaccharides to 4-hexadecylaniline by reductive amination and a modification of the procedure of Wang et al. (20) as follows. Solution A containing 35 mg of sodium cyanoborohydride, 400  $\mu$ l of glacial acetic acid, and 3.5 ml of methanol was used to make solution B. Solution B was made by making a 1 mM 4-hexadecylaniline solution in 500  $\mu$ l of solution A. One milligram of each oligosaccharide was mixed with 20  $\mu$ l of deionized water and 50  $\mu$ l of solution B and heated for 1 h at  $80^\circ\text{C}$  in a Teflon-lined screw-cap tube. After the mixture was cooled, 2 ml each of water and chloroform was added to the tube and the contents were mixed. Conjugated oligosaccharides (neoglycolipids) partitioned into the upper aqueous phase.

**Microtiter plate adhesion assay.** The neoglycolipids were dissolved in methanol and diluted to a concentration of 25  $\mu\text{g/ml}$ . One hundred microliters of this solution was used to coat the wells of a microtiter plate by allowing the methanol to evaporate overnight. The wells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and the rest of the assay was carried out as described for mucins. The use of higher concentrations of neoglycolipids did not result in increased binding when the adhesion-positive compounds were tested.

Bronchial mucins were prepared by ultracentrifugation as described previously (21) from the sputum of a chronic bronchitis patient. Adhesion to mucin was accomplished as described previously (19). Inhibition of adhesion by monoclonal antibodies was carried out in the mucin adhesion assay by incubating the mucin-coated wells with 1% gelatin for 60 min at  $37^\circ\text{C}$ , washing the wells, and incubating the wells with 100  $\mu$ l of the monoclonal antibodies for 2 h. Monoclonal antibodies against *N*-acetylglucosamine (type 2 determinant) were kindly supplied by Michael Apicella, State University of New York, Buffalo.

**Radiolabeling of bacteria.** The bacteria were grown in M9 medium with  $^{35}\text{S}$ -labeled sodium sulfate (10  $\mu\text{Ci/ml}$  of medium) as the only source of sulfur on the bottoms of petri dishes for 18 h at  $37^\circ\text{C}$ . The cultures were centrifuged, and the pellets were washed three times with PBS. The pellets were resuspended in PBS to obtain a suspension of about  $10^8$  bacteria per ml. Each count per minute was equivalent to 10 to 20 CFU.

**TLC preparation and adhesion assay.** Three micrograms of each neoglycolipid was spotted on thin-layer plates and run in a solvent mixture of chloroform-methanol-water (54:35:9.3). Migration was confirmed by staining parallel TLC plates with orcinol-sulfuric acid and examining the TLC plates to be assayed for adhesion by UV light. In preparation for the adhesion assay, chromatograms were soaked for 1 min in a 0.2% solution of polyisobutylmethacrylate dissolved in diethyl ether. After being dried in air, the chromatograms were immersed in a 1% solution of gelatin or bovine serum albumin (BSA) in PBS for 2 h and dried overnight.

The treated chromatograms were covered with the sus-

TABLE 1. Adhesion of *P. aeruginosa* to neoglycolipids<sup>a</sup>

Oligosaccharide or carrier	CFU of the following strains per well (10 <sup>3</sup> ):	
	1244 (nonmucoid)	M35 (mucoid)
1	381.0 ± 49.8	88.3 ± 64.3
2	156.6 ± 12.2	83.0 ± 53.5
3	4.3 ± 3.7	2.7 ± 2.0
4	143.1 ± 83.8	9.0 ± 3.5
5	39.7 ± 23.5	5.8 ± 5.7
6	75.6 ± 19.7	21.4 ± 15.0
7	0	0
8	0	0
Hexadecylaniline	0	0

<sup>a</sup> The neoglycolipids are numbered according to their carbohydrate parts shown in Fig. 1. Structures 1 to 5 contain type 1 or type 2 disaccharide units substituted where shown. Structures 6 and 7 contain both types of units fucosylated in different locations (Fig. 1).

pension of <sup>35</sup>S-labeled bacteria for 1 h at room temperature. The unbound bacteria were removed by washing of the chromatograms seven times with PBS. The chromatograms were air dried and later exposed to X-Omat film (Kodak) for 15 h at -80°C.

## RESULTS

The oligosaccharides that were tested as neoglycolipids are shown in Fig. 1. They were selected on the basis of preliminary studies which suggested that oligosaccharides containing type 1 or type 2 disaccharide units partially inhibited the adhesion of *P. aeruginosa* to mucins. Neoglycolipids containing sialic acid were also included because of studies implicating this substance as part of a receptor for *P. aeruginosa* (1, 3, 7, 10, 14, 19). The numbers on the left-hand side of Fig. 1 are used in Tables 1 and 2.

**Microtiter plate adhesion studies.** Conjugated oligosaccharides 1 to 8 and the hydrophobic carrier hexadecylaniline were studied (Table 1). Nonmucoid strain 1244 generally showed better adhesion than did the mucoid strain. The two compounds containing unsubstituted disaccharide units, compounds 1 and 2, showed the best adhesion to both strains of *P. aeruginosa*. Sialylation of *N*-acetylglucosamine in the α2-6 position (compound 3) drastically reduced the binding of both strains. The two fucosylated compounds, compounds 6 and 7, showed differences in binding, and neither conjugated lactose (compound 8) nor the carrier showed binding.

TABLE 2. TLC bacterial overlay assay of neoglycolipids<sup>a</sup>

Oligosaccharide	Result for strains 1244 and M35
1	+++
2	+++
3	++
4	++
5	+
6	-
7	-
8 (lactose)	-
9	-
10	-

<sup>a</sup> The blocking agent was 1% gelatin. The oligosaccharide structures are shown in Fig. 1.

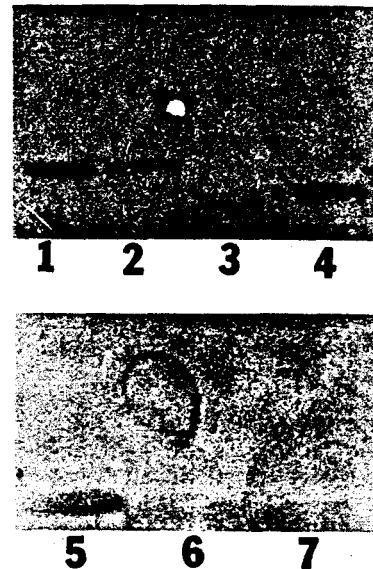


FIG. 2. TLC of compounds 1 to 7. TLC was blocked with 1% gelatin for 2 h. Strains 1244 and M35 gave identical results.

**TLC assay.** Neoglycolipids corresponding to the 10 compounds listed in Fig. 1 as well as the carrier hexadecylaniline were tested for adhesion in the TLC assay (Fig. 2 and Table 2). Conjugated lactose (compound 8) was included to test for lactose binding, and compounds 9 and 10 were additional controls. The strongest binding was noted with the compounds containing unsubstituted disaccharide units and their sialylated derivatives (compounds 1 to 5). Even the compound with α2-6-linked sialic acid showed adhesion. The fucosylated compounds were negative, as were conjugated lactose (compound 8), hexadecylaniline, and the two other control conjugated oligosaccharides, compounds 9 and 10. All of the above-mentioned chromatograms were made with 1% gelatin as a blocking agent; however, when assays were repeated several times with 1% BSA all binding was ablated.

**Adhesion of piliated and nonpiliated strains to type 1 and type 2 disaccharide units.** Since both the nonmucoid and the mucoid strains bound to the neoglycolipids containing type 1 and type 2 disaccharide units, it was possible that a common adhesin was responsible for adhesion. A common adhesin implies that binding was being mediated either by pili which are common to the two types of strains or perhaps by a nonpilus adhesin which is present on both types of strains. This idea was tested by studying the adhesion of the piliated strains 1244 and PAK and their isogenic nonpiliated mutants (Table 3). Nonpiliated strain 1244 bound in significantly higher numbers to neoglycolipids with the type 1 or the type

TABLE 3. Adhesion of nonpiliated *P. aeruginosa* to neoglycolipids

Disaccharide unit (type)	CFU of the following strains per well (10 <sup>3</sup> )			
	1244		PAK	
	Piliated	Nonpiliated	Piliated	Nonpiliated
1	108.0 ± 4.3 <sup>a</sup>	294.7 ± 53.5	2.0 ± 1.0	3.6 ± 1.7
2	163.5 ± 85.8 <sup>a</sup>	331.0 ± 48.1	61.4 ± 21.0 <sup>a</sup>	130.2 ± 55.8

<sup>a</sup> *P* < 0.01 when compared with nonpiliated mutants.

TABLE 4. Effect of monoclonal antibodies against *N*-acetyllactosamine on adhesion to mucins

Strain	CFU adhering to the following per well (10 <sup>2</sup> ):		% Inhibition	CFU adhering to the following per well (10 <sup>2</sup> ):		% Inhibition
	Control	Antibody 06B4-treated mucin		Control	Antibody 3F11-treated mucin	
1244	421 ± 88	76 ± 12	82	169 ± 20.0	77.0 ± 16.0	55
1244-NP	364 ± 42	200 ± 40	45	172 ± 17.0	88.0 ± 13.0	49

2 determinant that did the parent strain, and nonpiliated strain PAK bound better to neoglycolipids with the type 2 determinant. Thus, it would appear that disaccharide binding is mediated by a nonpilus adhesin.

**Adhesion inhibition by anti-*N*-acetyllactosamine antibodies.** Monoclonal antibodies 06B4 and 3F11 recognize terminal Galβ1-4GlcNAc on the surfaces of pathogenic neisseriae and erythrocytes (9). These antibodies showed immunological reactivity at dilutions of 1/1,000 and 1/5,000, respectively, and were used at dilutions of 1/100 and 1/500 in inhibition studies in the microtiter adhesion assay to test whether adhesion to mucin itself would be affected by these antibodies. A monoclonal antibody against *P. aeruginosa* type 6 lipopolysaccharide was used as a control. Both anti-*N*-acetyllactosamine antibodies inhibited the adhesion of strains 1244 and 1244-NP to mucins (Table 4).

#### DISCUSSION

This study identified Galβ1-3GlcNAc and Galβ1-4GlcNAc, the so-called type 1 and 2 disaccharide units, as receptors for *P. aeruginosa* strains with both a microtiter adhesion assay and a TLC assay. These receptors were apparently recognized by two nonmucoid strains and one mucoid strain of *P. aeruginosa* tested. Furthermore, this disaccharide specificity appeared to be conferred by a nonpilus adhesin(s) which may be able to differentiate between the type 1 and the type 2 disaccharide units, as seen with strain PAK.

Our work did not address binding to GalNAcβ1-4Gal or Galβ1-4Glc (lactose), since these are not found in mucins and have been adequately examined (1, 5, 8). However, we examined the effect of substitutions on the disaccharide units, since these are relevant to mucins. Sialic acid did not ablate binding in our TLC assay, corroborating a study recently reported by Baker et al. (1). However, when sialic acid was linked α2-6 to the terminal galactose, there was interference with adhesion in the microtiter assay (Table 1). Also as noted by Baker et al. (1), fucosylation of the basic receptor structure inhibited binding in the TLC assay. The effect in the microtiter assay did not completely parallel that in the TLC assay, since one fucosylated compound (compound 6) with an unsubstituted terminal disaccharide unit showed good adhesion in the microtiter assay (Table 1). Our study did not show lactose binding in either assay. This result does not necessarily mean that our strains did not recognize lactose, because conjugation of hexadecylaniline to the glucose of lactose opens up the ring structure of lactose and could make it nonfunctional.

Certain technical aspects of this work also deserve comment. It appears that the blocking agent used in the TLC assay may significantly affect the specificities revealed. The results reported here were obtained with 1% gelatin; when 1% BSA was used, the chromatograms were blank (data not shown). This result confirms the observation of Baker et al.

(1) in that BSA suppressed binding to all sialylated compounds. In our case, this suppression occurred with the sialylated as well as the unsubstituted disaccharide units. Furthermore, there may be a difference between the TLC assay and the microtiter adhesion assay, as seen with compounds 3 and 6. The correlation between the two assays was good but not perfect, possibly because of differences in the conformation of the specific oligosaccharides surrounded by the polyisobutylmethacrylate on the TLC plate versus being attached to a plastic surface in what is basically an aqueous milieu in the microtiter plate. Nevertheless, both assays corroborated that the disaccharide units were the basic receptors.

Disaccharide binding of *P. aeruginosa* may be significant with regard to mucin adhesion in chronic lung diseases. Disaccharide chains are among the most abundant in mucins (15) and are easily accessible for adhesion, since mucins are in the airways and since the disaccharide chains are located peripherally and internally on oligosaccharides. Others have commented on the lactose binding of *P. aeruginosa* (1, 5), which seems to be shared by an ever-increasing list of bacteria (5) and even fungi (4). Assuming that these internal lactose sequences belonging to membrane glycolipids are accessible, lactose binding may be the cellular counterpart of disaccharide binding in areas in which mucin binding is not important, e.g., buccal cells and injured tracheal cells; however, we have been unable to inhibit adhesion to mucins with lactose (11). It is particularly interesting that piliated strains showed less adhesion to the disaccharides than did nonpiliated strains. Why this is so needs to be sorted out, since pili undoubtedly function as adhesins for mucins (13).

The question of sialic binding still, however, remains problematic. Many studies have reported the involvement of sialic acid in *P. aeruginosa* adhesion (1, 3, 7, 10, 14, 19), but the identification of a separate sialic acid-containing receptor has been elusive. Baker et al. (1) and we (this study) have shown that lactose or type 1 and type 2 disaccharide binding accompanies sialic acid binding, but it is not clear that we necessarily found separate sialic acid binding in this study. This problem could probably be overcome after the full repertoire of *Pseudomonas* adhesins is known and each is tested independently for sialic acid binding. For the time being, pili and alginate, the receptors of which are unknown, and a nonpilus adhesin which recognizes disaccharide units are the putative adhesins, but it is possible that enzymes such as neuraminidase and exoenzyme S, which recognize sialic acid (17), may be the basis of a sialic acid recognition system. Alternately, the role of sialic acid may be as an accessory function, such as maintaining the conformation of oligosaccharide chains or increasing the affinity of adhesion.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Public Health Service grants HL33622 and K04HL01479; the Cystic Fibrosis Foundation, United

States; and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France.

We thank Leanne Forsyth for preparation of the manuscript.

#### REFERENCES

- Baker, N. R., G. C. Hansson, H. Leffler, G. Riise, and C. Svanborg-Eden. 1990. Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 58:2361-2366.
- EGge, H., J. C. Michalski, and G. Strecker. 1982. Heterogeneity of urinary oligosaccharides from mannosidosis: mass spectrometric analysis of permethylated man<sub>3</sub>, man<sub>6</sub> and man<sub>7</sub> derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 213:318-326.
- Hazlett, L. D., M. Moon, and R. S. Berk. 1986. In vivo identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 51:687-689.
- Jimenez-Lucho, V., V. Ginsburg, and H. C. Krivan. 1990. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect. Immun.* 58:2085-2090.
- Karlsson, K. A. 1989. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 58:309-350.
- Kobata, A. 1972. Isolation of oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol.* 28:262-271.
- Komiyama, K., B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1987. Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 55:2364-2369.
- Krivan, H. C., V. Ginsburg, and D. D. Roberts. 1988. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo Gm1) and gangliotriosylceramide (asialo Gm2). *Arch. Biochem. Biophys.* 260:493-496.
- Mandrell, R. E., J. M. Griffiss, and B. A. Macher. 1988. Lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. *J. Exp. Med.* 168:107-126.
- Marcus, H., A. Austria, and N. R. Baker. 1989. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal epithelium. *Infect. Immun.* 57:1050-1053.
- Ramphal, R. Unpublished observation.
- Ramphal, R., et al. 1987. Abstr. Proc. 9th Int. Symp. Glycoconjugates, abstr. G131.
- Ramphal, R., C. Guay, and G. B. Pier. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* adhesins for tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.* 55:600-603.
- Ramphal, R., and M. Pyle. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* 41:339-344.
- Roussel, P., G. Lamblin, M. Lhermitte, N. Houdret, J. J. Lafitte, J. M. Perini, A. Klein, and A. Scharfman. 1988. The complexity of mucins. *Biochimie* 70:1471-1482.
- Saiman, L., K. Ishimoto, S. Lory, and A. Prince. 1990. The effect of piliation and exoproduct expression on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers. *J. Infect. Dis.* 161:541-548.
- Simpson, D. A., and D. E. Woods. 1990. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1990, B180, p. 56.
- Strecker, G., M. C. Peers, J. C. Michalski, T. Hondi-Assah, B. Fournet, G. Spik, J. Montreuil, J. P. Farriaux, P. Marteaux, and P. Durand. 1977. Structure of nine sialyl-oligosaccharides accumulated in eleven patients with different types of sialidosis. *Eur. J. Biochem.* 75:391-403.
- Vishwanath, S., and R. Ramphal. 1985. Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa*: predominance of amino sugars in binding sites. *Infect. Immun.* 48:331-335.
- Wang, W. T., N. C. LeDonne, B. Ackermann, and C. C. Sweeley. 1984. Structural characterization of oligosaccharides by high performance liquid chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry and exoglycosidase digestion. *Anal. Biochem.* 141:366-381.
- Woodward, H., B. Horsey, V. P. Bhavanandan, and E. A. Davidson. 1982. Isolation, purification, and properties of respiratory mucus glycoproteins. *Biochemistry* 21:694-701.

## IV<sup>ème</sup> PARTIE

### RECHERCHE D'ADHESINE(S) DE *P. AERUGINOSA* RECONNAISSANT LES MUCINES

Dans la première et la troisième partie de notre travail, nous avons montré l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines salivaires et à des néoglycolipides. Les propriétés d'adhésion des mutants non piliés de *P. aeruginosa* sont analogues à celles des souches sauvages. Cela laisse supposer que des protéines de la membrane externe de *P. aeruginosa* sont capables de reconnaître d'une part des sites appartenant aux glycopeptides salivaires et d'autre part les chaînes N-acétyllactosaminiques de type 1 et 2.

Saiman et coll. (147) ont déjà montré que des mutants isogéniques non piliés de *P. aeruginosa* adhéraient aux cellules trachéales bovines en culture, et Chi et coll. (25) ont obtenu des résultats analogues avec une lignée de pneumocytes de type II (A549). Ramphal et coll. ont par ailleurs décrit l'adhésion de mutants non piliés sur des mucines bronchiques (137).

Ces différentes études suggèrent l'intervention d'adhésines appartenant à la membrane externe et distinctes des pili mais, pour l'instant, aucune de ces adhésines n'a été caractérisée.

Dans cette quatrième et dernière partie de notre travail, nous avons tenté d'identifier une ou des protéine(s) de la membrane externe intervenant dans l'adhésion de *P. aeruginosa* aux mucines.

En effet, devant la difficulté à caractériser les sites de reconnaissance de *P. aeruginosa*, nous avons décidé de faire évoluer notre stratégie et d'essayer d'isoler et de purifier la (ou les) adhésine(s) de *P. aeruginosa*, avec l'espoir, si on pouvait en isoler suffisamment, de la (ou les) fixer sur des supports chromatographiques. La préparation de tels supports serait très utile pour mettre au point des systèmes de chromatographie d'affinité, permettant d'identifier les sites glycaniques reconnus par *P. aeruginosa* en partant d'un mélange de chaînes glycaniques de mucines salivaires ou bronchiques.

Ultérieurement, de tels systèmes pourraient peut-être permettre de comparer l'expression des sites récepteurs de *P. aeruginosa* situés sur des mucines sécrétées dans différentes situations pathologiques.



*P. aeruginosa*, en tant que bacille Gram négatif, possède une paroi composée d'une membrane interne, d'un espace périplasmique et d'une membrane externe en relation directe avec l'environnement (fig. 6).

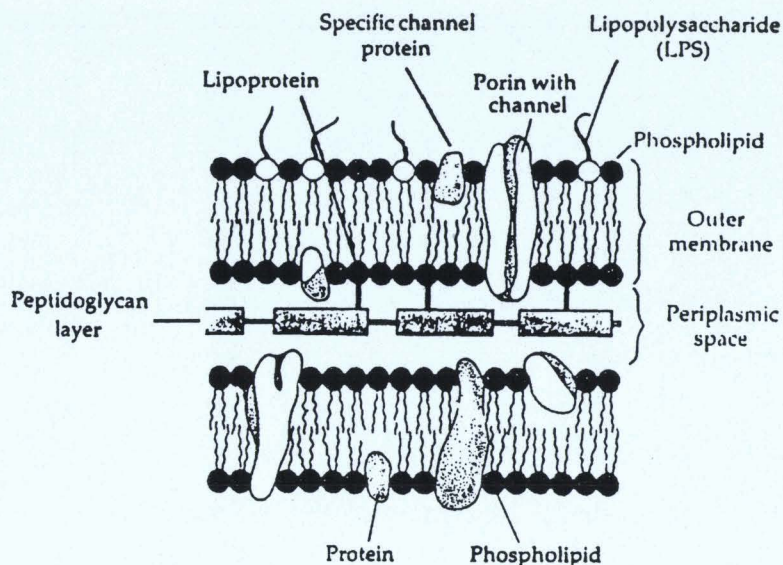


Figure 6: Schéma d'une paroi de bacille Gram négatif

La membrane externe contient un certain nombre de protéines qui interviennent dans les échanges avec le milieu extérieur. Certaines, comme les porines, trans-membranaires, sont responsables du passage spécifique ou non spécifique de molécules. D'autres protéines, de plus petite taille, permettent le passage spécifique de substrats nécessaires à la croissance (52). Parmi ces protéines membranaires, il n'a jamais été décrit de protéines ayant une activité d'adhésine.

A l'aide d'une technique originale d'adhésion, nous avons mis en évidence l'affinité des mucines salivaires et bronchiques pour une (?) protéine de la membrane externe ayant une masse moléculaire relative d'environ 50 kDa.

Nous avons essayé de purifier cette protéine par chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose sur laquelle des mucines bronchiques humaines ont été greffées. Malheureusement, les faibles rendements obtenus n'ont pas permis de purifier cette protéine en quantité importante.

Une technique d'électroélution a permis la préparation de cette adhésine de 50 kDa à partir d'extraits membranaires de *P. aeruginosa*.

## IV. A. CONDITIONS EXPERIMENTALES

### IV. A. 1. Mise en évidence d'une fraction membranaire de *P. aeruginosa* ayant une affinité pour les mucines

#### IV. A. 1. a. Extraction des protéines de la membrane externe de *P. aeruginosa*

La souche 1244 NP de *P. aeruginosa* utilisée dans notre étude est un mutant isogénique de *P. aeruginosa* 1244 qui n'exprime plus le gène des pili.

Une préculture de *P. aeruginosa* 1244 NP est effectuée dans 10 ml de milieu minimum type M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  33 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM, NaCl 8 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  18 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM, thiamine 0.1% (p/v), glucose 0.2% (p/v)) à 37°C pendant 24 h sans agitation. 2 l de milieu M9 sont ensuite inoculés par cette préculture et incubés 48 h à 25°C.

La technique d'extraction est inspirée de la méthode décrite par Domenico et coll. (38) qui est schématisée sur la figure 7. Le milieu de culture est centrifugé à 4000 tr/min pendant 90 min à + 4°C. Le culot est récupéré dans 200 ml de tampon citrate 50 mM, pH 4.5, contenant 0.1% (p/v) de Zwittergent® 3-14 (Calbiochem). Des inhibiteurs de protéases (PMSF, 1 mM et EDTA, 10 mM) sont ajoutés au milieu d'extraction qui est alors incubé 25 min à 45°C. L'ensemble est agité toutes les 5 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 10 500 tr/min pendant 7 min à + 4°C. Le surnageant contenant les protéines extraites est recueilli et mis en dialyse contre de l'eau contenant 0.02% (p/v) d'azide de sodium. L'extrait protéique est fractionné en chromatographie d'affinité sans être lyophilisé. Une fraction de cet extrait protéique est lyophilisée pour être étudiée en électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS).

#### IV. A. 1. b. Marquage des mucines à l'iode<sup>125</sup>

Les mucines sont dissoutes dans du tampon PBS (phosphate de sodium 75 mM, NaCl 75 mM, azide de sodium 0.02% (p/v), pH 7.2) à la concentration de 10 mg/ml 24 h sous agitation à +4°C. A cette solution sont ajoutés 750  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{NaI}^{125}$ /mg de mucines ainsi que 2 billes de polystyrène sur lesquelles sont couplées des fonctions N-chloro-benzènesulfonamide permettant la réaction d'iodation (Iodo-beads®, Pierce). Après un temps de contact de 15 à 17 min,

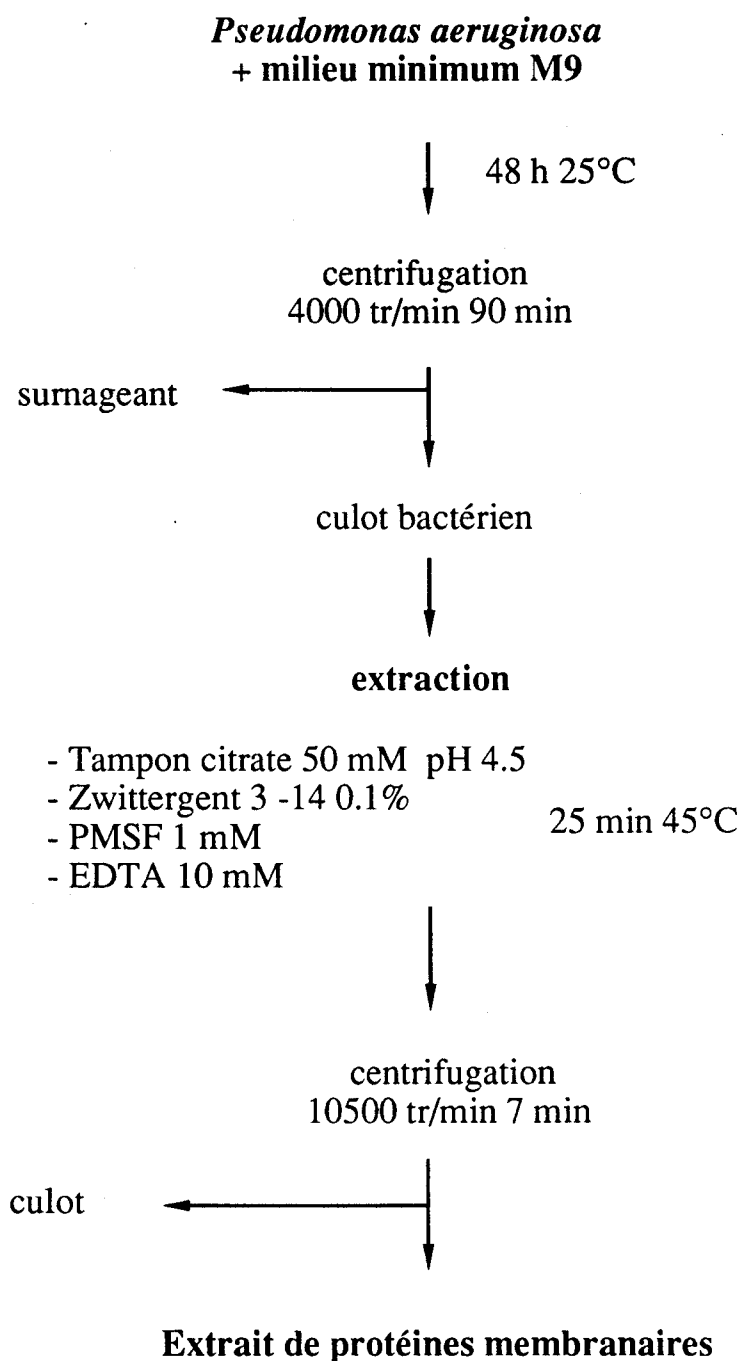


Figure 7 : Protocole de purification des protéines membranaires de *P. aeruginosa*.

le contenu du tube est transféré dans un autre tube contenant de l'iodure froid ( $\text{NaI}^{127}$ ) pour arriver à la concentration finale de 0.5 M.

Lorsque l'iodure de sodium est solubilisé, le mélange est déposé sur une colonne de Sepharose S6B (Pharmacia) (20 x 1 cm) équilibrée en chlorure de guanidinium 6 M.

Des fractions de 1 ml sont recueillies à un débit de 20 ml/h. Les rayonnements  $\gamma$  sont mesurés sur 25  $\mu\text{l}$  d'une dilution au 1/20<sup>e</sup> de chaque tube. Le pic exclu, correspondant aux mucines radiomarquées, est mis en dialyse contre de l'eau additionnée d'azide de sodium à 0.02% (p/v) puis conservé en milieu liquide à + 4°C jusqu'à utilisation.

Le marquage à l'iode<sup>125</sup> a été effectué sur :

- des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D), purifiées par deux tours d'ultracentrifugation après extraction aqueuse de l'expectoration (59),
- des mucines salivaires, purifiées par ultracentrifugation, obtenues chez un malade atteint de mucoviscidose (N) et chez un individu sain (A).

#### IV. A. 1. c. Révélation des protéines membranaires par les mucines I<sup>125</sup>

Les PAGE-SDS sont effectuées suivant la méthode de Laemmli (84). Les conditions de transfert sur nitrocellulose Hybond ECL (Amersham) sont celles décrites par Towbin et coll. (165).

La réplique sur nitrocellulose des protéines de membrane de *P. aeruginosa* est saturée dans une solution de Tween 20 (Merck) à 0.5% (v/v) dans du tampon PBS, pH 7.2 pendant 2 h sous agitation à température ambiante. Les mucines radiomarquées sont ensuite ajoutées à la concentration approximative de 1 mg/12 ml de PBS. Après 2 h de contact à température ambiante sous agitation lente, la bande de nitrocellulose est lavée par du PBS pendant 90 min avec changement du bain toutes les 15 min. Après séchage à température ambiante, la bande de nitrocellulose est révélée par autoradiographie pendant 48 h à -70°C.

## IV. A. 2. Essais de purification des adhésines de *P. aeruginosa*

Deux approches ont été utilisées pour purifier une fraction protéique présentant une affinité pour les mucines : la première par chromatographie d'affinité et la seconde par électroélution après PAGE-SDS de l'extrait membranaire.

### IV. A. 2. a. Chromatographie d'affinité

#### Support de chromatographie d'affinité

L'extrait de protéines membranaires a été déposé sur une **colonne de Fractogel greffée par des groupements lactoN-néotétraose** (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (Biocarb), ainsi que sur une colonne de Fractogel témoin non greffée TSK HW 55 (F) (Merck).

Une **colonne de Sepharose sur laquelle ont été greffées des mucines** a aussi été utilisée comme support d'affinité.

Les mucines bronchiques couplées à la matrice de Sepharose sont celles qui ont été utilisées pour le radiomarquage à l'iode<sup>125</sup> (mucines purifiées d'un patient (D) souffrant de bronchite chronique).

Le couplage des mucines est effectué sur un gel de Sepharose activé par le bromure de cyanogène suivant la technique décrite par March et coll. (103). 30 ml de Sepharose S4B (Pharmacia) sont lavés par 1,5 l d'eau déminéralisée à + 4°C sur verre fritté. Le gel, débarrassé de l'excès d'eau, est remis en suspension dans 25 ml d'une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M. Cette suspension est conservée à + 4°C sous agitation douce. 3.5 ml d'une solution de BrCN dans l'acétonitrile (2 g de BrCN par ml d'acétonitrile) sont ajoutés au gel. Après un temps de contact de 3 min, le gel est rapidement lavé par 3 l d'eau déminéralisée à + 4°C.

Au gel activé placé dans une éprouvette, on ajoute 100 mg de mucines ou de glycopeptides dissous dans 25 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M. L'ensemble est mis en agitation rotative pendant 24 h à + 4°C puis le gel est lavé par 500 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M. Afin de contrôler l'efficacité du couplage, le premier filtrat est dialysé et lyophilisé. On sature les sites activés libres, par une solution de glycolle 1 M dans l'eau sous agitation rotative pendant 3 h à température ambiante ou une nuit à + 4°C. Le gel est ensuite lavé par 500 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M puis par 500 ml de tampon de chromatographie.

Compte tenu des quantités de mucines récupérées dans le premier filtrat, on peut évaluer le rendement de couplage à 40%.

#### Conditions de chromatographie d'affinité

La colonne de Sepharose-mucines ainsi que les colonnes de Fractogel sont équilibrées dans du tampon acétate de sodium 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, azide de sodium 0.02% (p/v), pH 6.5.

Une nuit avant le dépôt, l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa* est dialysé contre le tampon d'équilibre.

Le dépôt sur la colonne s'effectue à débit très lent (5 ml/h) et en circuit fermé pendant 18 h. La colonne est ensuite lavée par 4 à 5 volumes de tampon d'équilibre. La colonne est alors éluée par un tampon acétate de sodium 150 mM, NaCl 2 M, azide de sodium 0.02% (p/v) pH 4.5, puis par le chlorure de guanidinium 3 M et enfin par le chlorure de guanidinium 6 M. Des fractions de 2 ml sont recueillies lors de l'éluion et une mesure de l'absorbance à 278 nm est effectuée. Les fractions non retenues (FNR) et les fractions retenues (FR) sont dialysées, lyophilisées et étudiées en PAGE-SDS.

#### IV. A. 2. b. Electroéluion de la protéine de 50 kDa

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide préparatives sont effectuées selon la méthode de Laemmli (84). Les deux bandes latérales du gel contenant les témoins de masse moléculaire ainsi qu'un dépôt d'extrait membranaire sont colorés par le bleu Coomassie pendant 2 h et servent de repères pour le découpage du gel au niveau de la bande de 50 kDa. L'électroéluion est ensuite conduite pendant 8 h et la fraction éluée est mise en dialyse puis concentrée.

## IV. B. RESULTATS

### IV. B. 1. Caractérisation d'une adhésine de 50 kDa

Les protéines de la membrane externe d'un mutant isogénique de *P aeruginosa* non-pilié (1244 NP) ont été préparées suivant le protocole résumé dans la figure 7. La quantité de matériel obtenu est de l'ordre de 55 mg d'extrait protéique dialysé pour 2 l de milieu de culture.

Le mélange de protéines membranaires a été étudié en PAGE-SDS et coloré par le bleu Coomassie (fig. 8, couloir 1). Ces protéines ont des masses moléculaires relatives allant de 94 kDa à 14 kDa. Des répliques de ces protéines sur nitrocellulose ont été mises en contact avec différentes mucines marquées à I<sup>125</sup> (fig. 8, couloirs 2-4).

Une bande unique, de 50 kDa environ, correspondant à une bande majeure en bleu Coomassie, est révélée par les différentes préparations de mucines radiomarquées.

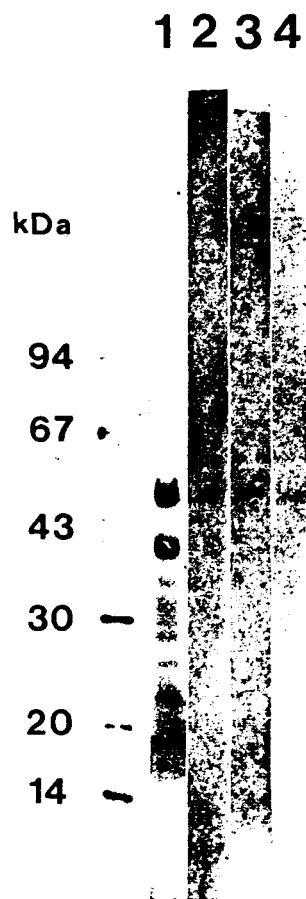
### IV. B. 2. Chromatographies d'affinité

Les profils d'éluion des chromatographies d'affinité sont relativement similaires. Pour cette raison, ils ne seront pas tous présentés. L'exemple choisi est le fractionnement de l'extrait protéique membranaire sur la colonne de Sepharose-mucines (fig. 9). FR 1 est la fraction éluee par augmentation de la force ionique et baisse du pH, tandis que FR 2 et FR 3 sont les fractions éluees respectivement par le chlorure de guanidinium 3 M et par le chlorure de guanidinium 6 M.

#### IV. B. 2. a. Chromatographies sur Fractogel

L'extrait protéique total ainsi que les fractions non retenues (FNR) et retenues (FR) des colonnes de Fractogel-lactoN-néotétraose et témoin ont été étudiées en PAGE-SDS. Des répliques sur nitrocellulose de ces fractions ont été révélées par les mucines bronchiques (D) radiomarquées (fig. 10-11).

Les PAGE-SDS ainsi que les transferts sur nitrocellulose révélés par les mucines bronchiques (D) radiomarquées montrent que la chromatographie d'affinité sur Fractogel lactoN-néotétraose ne permet pas de purifier la fraction protéique de 50 kDa (fig. 10).



- 1 : Extrait de protéines membranaires
- 2 : Révélation par des mucines salivaires d'un patient atteint de mucoviscidose (N) radiomarquées ( $I^{125}$ )
- 3 : Révélation par des mucines salivaires d'un individu sain (A) radiomarquées ( $I^{125}$ )
- 4 : Révélation par des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D) radiomarquées ( $I^{125}$ )

Figure 8 : PAGE-SDS de l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa* 1244 NP.  
 (1) Coloration au bleu Coomassie; (2-4) Révélation par des mucines  $I^{125}$  après transfert sur nitrocellulose.



Il faut cependant noter l'apparition de bandes de masse moléculaire relative inférieure à 50 kDa:

- dans les fractions éluées par le chlorure de guanidinium de la colonne de Fractogel-lactoN-néotétraose, une protéine de 30 kDa est reconnue par les mucines bronchiques radiomarquées (fig. 10, couloir 4); cette bande, qui n'est pas révélée sur la réplique de l'extrait membranaire total (fig. 10, couloir 1), est aussi observée après chromatographie sur colonne de Fractogel non greffée (fig. 11, couloir 4): il ne s'agit donc pas d'une fraction reconnaissant les groupements lactoN-néotétraoses;

- dans la fraction FR 1, éluée de la colonne de Fractogel non greffée par la solution de NaCl 2 M à pH 4.5, deux bandes (30 et 17 kDa) sont révélées par les mucines bronchiques (D) radiomarquées (fig. 11, couloir 3).

On peut se demander si la révélation de fractions protéiques de masse moléculaire inférieure à 50 kDa, ne traduit pas une dégradation de l'adhésine.

#### IV. B. 2. b. Chromatographies sur Sepharose et Sepharose-mucines

Le même extrait de protéines membranaires a été fractionné sur une colonne de Sepharose-mucines bronchiques (D), ainsi que sur une colonne de Sepharose non greffée faisant office de témoin. Les différentes fractions éluées ont été étudiées en PAGE-SDS suivi d'une coloration par le bleu Coomassie ou d'une révélation par les mucines bronchiques radiomarquées (fig 12 et 13).

Aucune protéine n'est éluée par la solution de NaCl 2 M à pH 4.5 des colonnes de Sepharose-mucines et Sepharose (fig. 12 et 13, couloir 2 ).

L'utilisation du chlorure de guanidinium permet l'élution de matériel bactérien à partir de la colonne de Sepharose-mucines (fig. 12). Le profil obtenu en PAGE-SDS, après coloration au bleu Coomassie des fractions FR 2 et FR 3 sont très similaires. Ils montrent la présence de deux bandes, l'une de 50 kDa et la seconde d'une masse moléculaire relative d'environ 60 kDa (fig. 12, BC couloirs 3 et 4). Lorsque ces fractions FR 2 et FR 3 sont révélées par les mucines (D) I<sup>125</sup>, des différences apparaissent : la bande de 50 kDa est révélée dans la fraction FR 2, alors qu'elle ne l'est pas dans la fraction FR 3 (fig. 12, Mucine I<sup>125</sup> couloirs 3 et 4). La bande de 60 kDa n'est jamais révélée par les mucines radiomarquées.

Aucune fraction majeure n'est retenue sur la colonne de Sepharose témoin (fig. 13).

### **IV. B. 3. Electroélution**

L'extrait membranaire total et la fraction électroéluée ont été caractérisés en PAGE-SDS coloré par le bleu de Comassie. Des répliques sur nitrocellulose de ces deux fractions ont été révélées par les mucines (D) radiomarquées (fig. 14).

Il semble que la masse moléculaire relative de la fraction électroéluée soit légèrement plus faible. Néanmoins, la protéine électroéluée est toujours reconnue par les mucines radiomarquées.

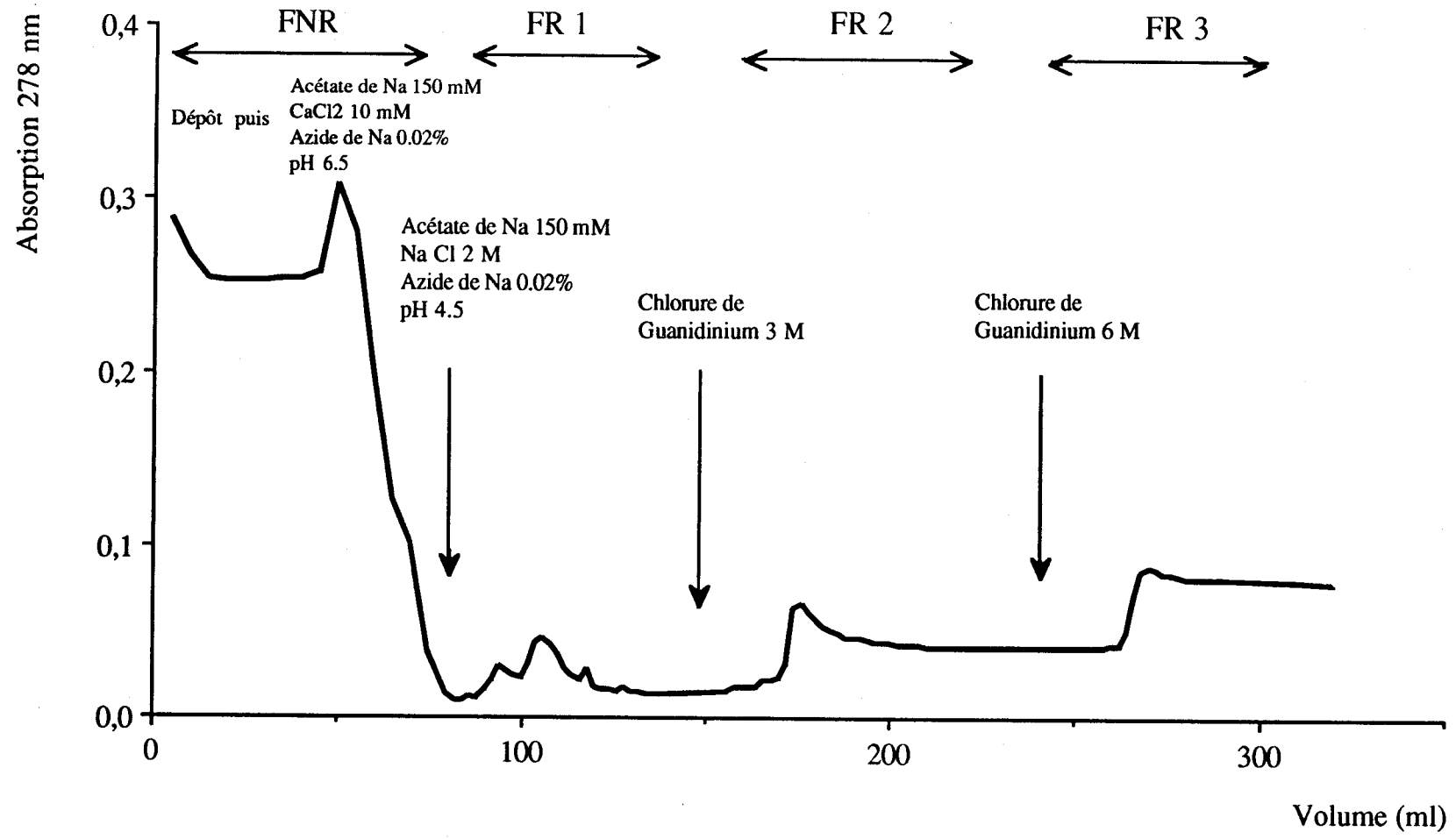
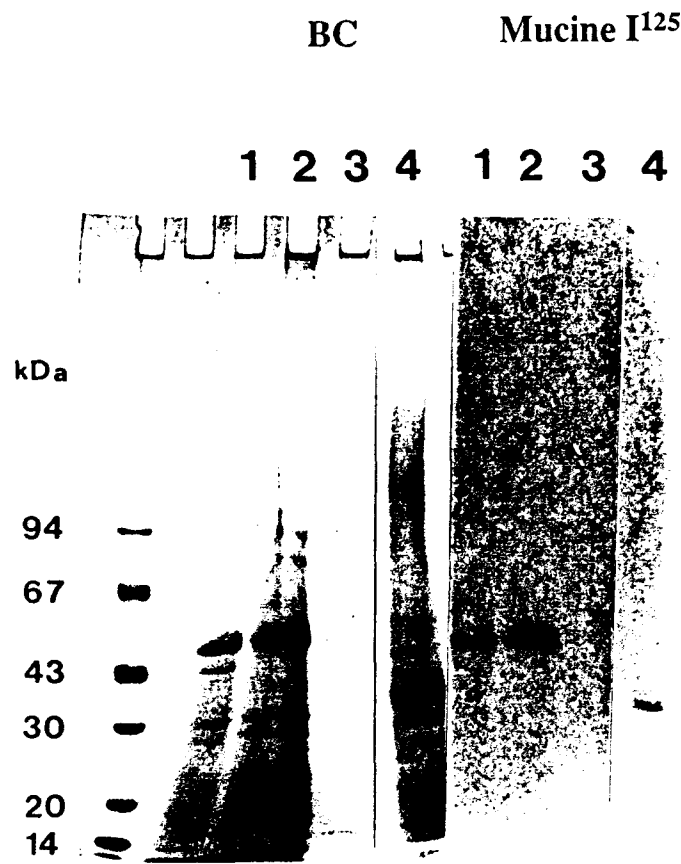


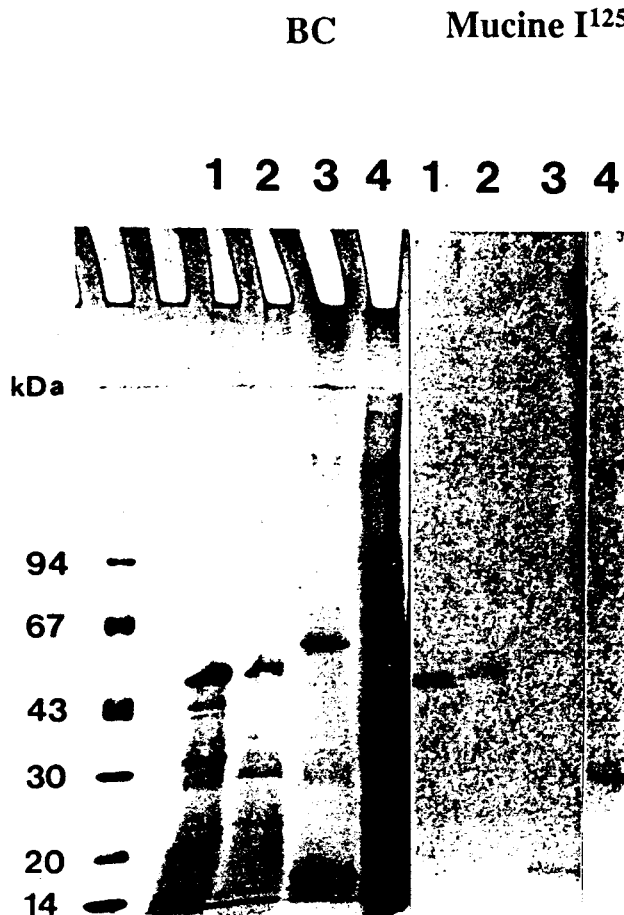
Figure 9 : Chromatographie d'affinité de l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa*. Les protéines de membrane de *P. aeruginosa* 1244 NP sont fractionnées sur une colonne de Sepharose-mucines respiratoires d'un patient atteint de bronchite chronique (D) (20 x 1.25 cm). Le débit est de 5 ml/h et les fractions sont de 2 ml. L'absorption est mesurée à 278 nm. (FNR = Fraction non retenue ; FR = Fraction retenue)



- 1 : Extrait protéique total
- 2 : Fraction non retenue (FNR)
- 3 : Fraction éluée par  $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$  150 mM, NaCl 2 M, pH 4.5 (FR 1)
- 4 : Fraction éluée par le chlorure de guanidinium 3 M et 6 M (FR 2 + FR 3)

Figure 10 : Chromatographie d'affinité de l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa* sur colonne de Fractogel greffée par des groupements N-acétyllactosaminiques.

BC = coloration par le bleu Coomassie. Mucine I<sup>125</sup> = révélation des transferts sur nitrocellulose par des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D) marquées par I<sup>125</sup>.



1 : Extrait protéique total

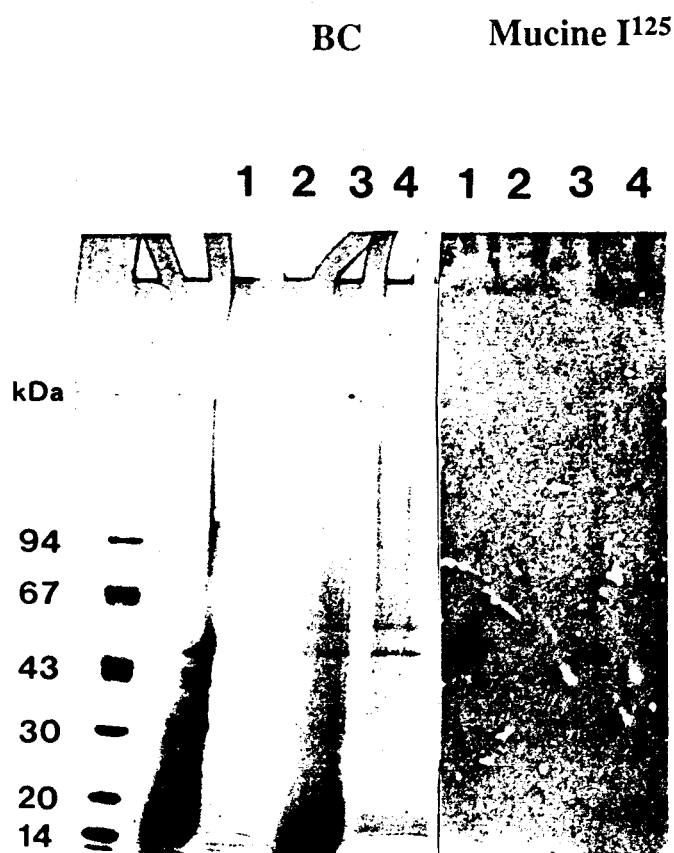
2 : Fraction non retenue (FNR)

3 : Fraction éluée par  $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$  150 mM, NaCl 2 M, pH 4.5 (FR 1)

4 : Fraction éluée par le chlorure de guanidinium 3 M et 6 M (FR 2 + FR 3)

Figure 11: Chromatographie d'affinité sur colonne de Fractogel non greffée de l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa*.

BC = coloration par le bleu Coomassie. Mucine I<sup>125</sup> = révélation des transferts sur nitrocellulose par des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D) marquées par I<sup>125</sup>.



1 : Fraction non retenue (FNR)

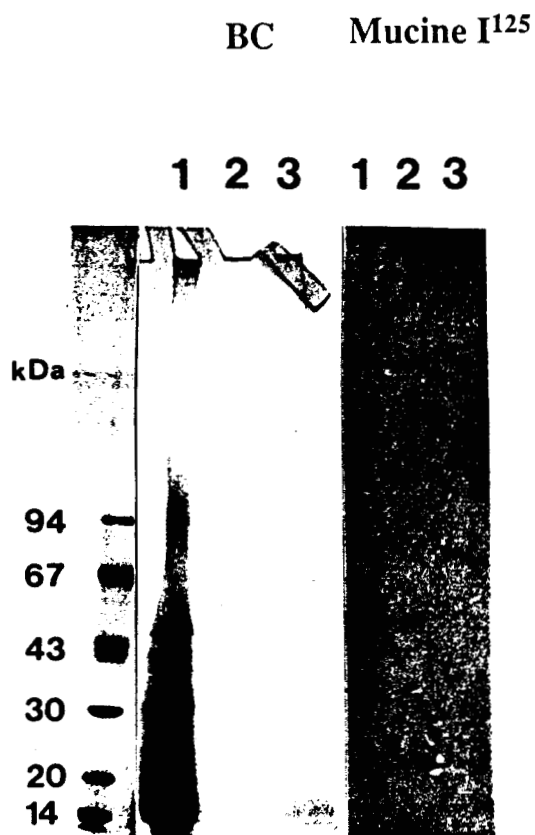
2 : Fraction éluée par  $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$  150 mM, NaCl 2 M, pH 4.5 (FR 1)

3 : Fraction éluée par le chlorure de guanidinium 3 M (FR 2)

4 : Fraction éluée par le chlorure de guanidinium 6 M (FR 3)

Figure 12 : Chromatographie d'affinité de l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa* sur colonne de Sepharose-mucines.

BC = coloration par le bleu Coomassie. Mucine I<sup>125</sup> = révélation des transferts sur nitrocellulose par des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D) marquées par I<sup>125</sup>.



**1** : Fraction non retenue (FNR)

**2** : Fraction éluée par NaCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> 150 mM, NaCl 2 M, pH 4.5 (FR1)

**3** : Fraction éluée par le chlorure de guanidinium 3 M et 6 M (FR 2 + FR3)

Figure 13 : Chromatographie d'affinité de l'extrait de protéines membranaires de *P. aeruginosa* sur colonne de Sepharose non greffée.

BC = coloration par le bleu Coomassie. Mucine I<sup>125</sup> = révélation des transferts sur nitrocellulose par des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D) marquées par I<sup>125</sup>.

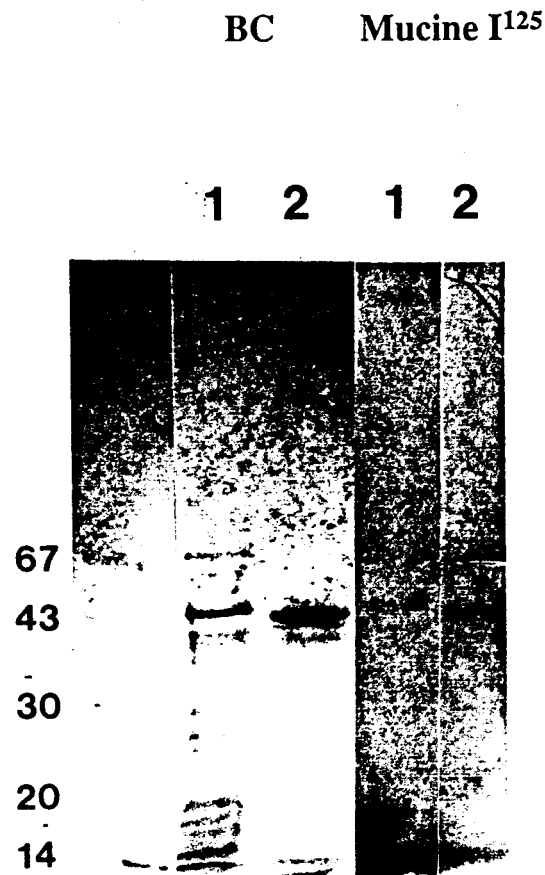


Figure 14 : PAGE-SDS de l'extrait total de protéines membranaires de *P. aeruginosa* 1244 NP (1) et de la fraction électroéluee à partir de PAGE-SDS de cet extrait total (2).  
BC = coloration par le bleu Coomassie. Mucine I<sup>125</sup> = révélation des transferts sur nitrocellulose par des mucines bronchiques d'un patient atteint de bronchite chronique (D) marquées par I<sup>125</sup>.



## IV. C. DISCUSSION

Ces travaux préliminaires de caractérisation des adhésines de membrane externe de *P. aeruginosa* ont permis de mettre en évidence une protéine d'environ 50 kDa, reconnue par des mucines radiomarquées salivaires et bronchiques.

Nous avons comparé le profil électrophorétique de l'extrait membranaire que nous avons obtenu avec ceux qui ont été rapportés dans la littérature (52, 118); il y a des différences sensibles qui peuvent s'expliquer par les modes de culture et par les protocoles d'extraction utilisés. *P. aeruginosa* est habituellement cultivé à 37° C et l'extraction des protéines se fait après éclatement des bactéries et solubilisation des membranes (52, 118). Dans notre étude, le choix du mode de culture et du protocole d'obtention des protéines ne s'est pas fait au hasard. Il est apparu que les souches non piliées de *P. aeruginosa* cultivées à 25°C adhéraient mieux aux mucines bronchiques que les souches cultivées à 37°C. Nous avons donc opté pour une culture à 25°C pour laquelle il semble y avoir une meilleure expression des adhésines. En ce qui concerne le mode d'extraction des protéines membranaires, nous avons recherché une technique faisant appel à des conditions suffisamment douces pour éviter une lyse trop importante des bactéries et une contamination par les protéines intracellulaires. Notre choix s'est porté sur la technique d'extraction par le Zwittergent 3-14 qui semblait remplir les conditions recherchées (fig. 7) (38). Il faudra néanmoins confirmer que la protéine de 50 kDa reconnue par les mucines est bien exprimée à la surface de *P. aeruginosa*.

En ce qui concerne la technique de révélation par les mucines I<sup>125</sup> qui est à la base de nos observations, quelques précisions sont à apporter. La saturation des répliques de nitrocellulose précédant l'incubation avec les mucines radiomarquées a été faite avec une concentration en Tween 20 de 0.5 %. Les essais, réalisés avec la concentration habituellement décrite dans la littérature (0.05 %) (10), ont révélé un grand nombre de bandes d'intensités différentes. Cela signifie que les mucines bronchiques sont capables de reconnaître plusieurs protéines de *P. aeruginosa*. Pour simplifier le problème, nous nous sommes délibérément attachés à caractériser la protéine de 50 kDa qui est la seule à être révélée après une saturation par le Tween 20 à 0.5 % et qui semble donc présenter la plus forte affinité pour les mucines.

Il faut aussi noter que cette fraction protéique de 50 kDa est reconnue par les mucines salivaires normales et celles d'un patient atteint de mucoviscidose

ainsi que par les mucines bronchiques d'un patient souffrant de bronchite chronique (fig. 8). On peut donc déduire de ces résultats que les différences structurales entre, d'une part, les mucines salivaires normales et celles de patients atteints de mucoviscidose (sialylation plus importante dans la mucoviscidose) et, d'autre part, les mucines salivaires et les mucines bronchiques (le rapport sulfate / acide sialique plus élevé dans les mucines salivaires), ne semblent pas se traduire par un comportement différent vis à vis de l'adhésine de 50 kDa.

Cette adhésine a été caractérisée à partir de l'extrait membranaire de la souche 1244 NP de *P. aeruginosa*. Il faudra étudier, dans un futur proche, la répartition de cette adhésine dans différentes souches de *P. aeruginosa*.

Après la première étape de caractérisation, nous nous sommes attaché à la purification de cette adhésine par chromatographie d'affinité.

Les colonnes de Fractogel-lactoN-néotétraose semblaient un moyen rapide pour purifier cette adhésine à haute affinité. En effet, le groupement glycosylé, greffé sur le support Fractogel contient la séquence Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc. Or, dans la troisième partie de notre travail, nous avons montré que la souche non piliée de *P. aeruginosa* (1244 NP) reconnaissait les chaînes N-acétyllactosaminiques de type 2 (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc). Malheureusement, l'utilisation d'une telle colonne n'a pas permis de purifier la protéine de 50 kDa reconnue par les mucines. Par contre, d'autres protéines ayant une affinité pour les mucines radiomarquées mais non visibles dans l'extrait membranaire se sont fixées sur cette colonne et aussi sur la colonne de Fractogel témoin (fig. 10 et 11) !...

Comment une protéine non révélée dans la fraction brute peut-elle être révélée après passage sur Fractogel ? Pour répondre à cette question, il est possible d'envisager une dégradation de la protéine de 50 kDa en plusieurs fragments reconnus par les mucines. Il faut signaler que ce phénomène n'a pas été observé lors des chromatographies d'affinité sur Sepharose, alors qu'elles ont été effectuées dans les mêmes conditions. Une autre hypothèse serait que la colonne de Fractogel-lactoN-néotétraose pourrait concentrer des protéines mineures de *P. aeruginosa* capables de reconnaître les mucines I<sup>125</sup>.

La colonne de Sepharose-mucines bronchiques a permis la purification de deux bandes, l'une de 60 kDa environ et l'autre de 50 kDa. Seule cette dernière a présenté une affinité pour les mucines radiomarquées (fig. 12 et 13).

Bien que la protéine de 60 kDa ne soit pas révélée par les mucines radiomarquées, il est intéressant de constater qu'elle est retenue sur la colonne de Sepharose-mucines mais non sur la colonne de Sepharose témoin. Cela traduit une certaine affinité de cette protéine pour les mucines.

L'utilisation d'un agent chaotropique pour élué la protéine de 50 kDa de son support d'affinité traduit une interaction forte entre les mucines et cette protéine. Ce type d'interaction n'est pas unique. On peut citer le cas du récepteur de la fibronectine de *S. aureus* qui est élué de la colonne de Sepharose-fibronectine par le chlorure de guanidinium 2 M (43). Il faut néanmoins noter que la protéine de 50 kDa éluée avec le chlorure de guanidinium 6M n'est pas révélée par les mucines radiomarquées alors que celle éluée par le chlorure de guanidinium 3M est révélée. On peut se demander s'il ne s'est pas produit un phénomène de dénaturation avec le chlorure de guanidinium 6M.

Compte tenu du faible rendement de la chromatographie d'affinité (une grande partie du matériel reconnu par les mucines radiomarquées n'est pas retenu sur la colonne), il n'était pas envisageable d'obtenir, à court terme, cette adhésine en quantité suffisante pour son analyse ou pour la préparation d'un immunosérum. Or, cette bande de 50 kDa semble majeure en PAGE-SDS. Pour la préparer, nous avons donc utilisé une technique d'électroélution qui nous a permis d'obtenir une fraction apparemment pure de 50 kDa qui est bien révélée par les mucines radiomarquées (fig. 14).

Il faudra utiliser d'autres techniques (HPLC, Isoélectrofocalisation) pour vérifier si cette fraction est pure ou si elle correspond à plusieurs protéines.

## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

Au cours de la colonisation par *P. aeruginosa* des voies aériennes des sujets souffrant de mucoviscidose, les mucines semblent jouer un rôle important.

Pour mieux comprendre les interactions *P. aeruginosa*-mucines, nous avons choisi d'étudier les interactions entre cette bactérie et les mucines salivaires qui, contrairement aux mucines trachéobronchiques, peuvent facilement être recueillies à l'état physiologique.

Dans cette étude, nous avons (i) défini des caractéristiques communes aux glycopeptides de mucines salivaires de sujets normaux et de patients atteints de mucoviscidose, (ii) observé un certain nombre de particularités spécifiques de la mucoviscidose, (iii) étudié l'adhésion de *P. aeruginosa* sur des glycopeptides salivaires de sujets sains et de patients souffrant de mucoviscidose, (iv) déterminé des sites récepteurs de *P. aeruginosa* à l'aide de néoglycolipides, et (v) caractérisé une adhésine membranaire de *P. aeruginosa*.

#### i. Caractéristiques communes aux glycopeptides salivaires de sujets normaux et de patients atteints de mucoviscidose

Notre étude a tout d'abord permis de mieux définir les régions hautement glycosylées des mucines salivaires humaines. **Les glycopeptides salivaires sont 5 à 6 fois plus sulfatés que sialylés.** Cette caractéristique est particulière aux mucines salivaires humaines. La plupart des mucines salivaires, comme les mucines sous-maxillaires ovine (51), bovine (166) ou porcine (19) sont très riches en acide sialique.

Contrairement à ces mucines sous-maxillaires et aux mucines bronchiques (72, 155) étudiées jusqu'à présent, les glycopeptides de mucines salivaires humaines prélevées chez des sujets de groupe sanguin O contiennent plus de résidus de N-acétylgalactosamine que de résidus d'acides aminés hydroxylés. Il existe sans doute une glycosylation spécifique des mucines au niveau des glandes salivaires (spécificité d'organe).

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons mis en évidence **une grande hétérogénéité des chaînes glycaniques de mucines salivaires.** La structure de trente sept oligosaccharide-alditols neutres et sialylés de mucines salivaires normales a été déterminée. Une hétérogénéité similaire existe aux niveau des chaînes glycaniques des mucines salivaires de patients atteints de mucoviscidose.

Compte tenu de ces résultats, on peut s'attendre à une hétérogénéité aussi vaste que celle qui a déjà été observée dans les mucines bronchiques humaines (72, 73). Cette étude des chaînes glycaniques de mucines salivaires n'a cependant

pas encore permis d'expliquer le rapport GalNAc / sérine + thréonine supérieur à 1 qui est une particularité structurale des glycopeptides de haute masse moléculaire de mucines salivaires humaines.

## ii. Les glycopeptides salivaires d'enfants atteints de mucoviscidose

L'étude des mucines salivaires de patients atteints de mucoviscidose a permis de définir un certain nombre de caractéristiques spécifiques de cette maladie.

Nous avons tout d'abord remarqué une **déshydratation des sécrétions salivaires et une hypersécrétion de mucines dans la mucoviscidose** par rapport à l'état physiologique. Ces anomalies des sécrétions sont peut-être reliées à des modifications morphologiques des glandes salivaires dans la mucoviscidose : les glandes sous-maxillaires peuvent apparaître hypertrophiées chez les sujets souffrant de mucoviscidose (7).

L'étude de la composition chimique des glycopeptides salivaires a révélé **une plus forte sialylation dans le cas de la mucoviscidose** (cette forte sialylation était un peu surprenante et était en contradiction avec des travaux anciens qui faisaient état de la sécrétion d'une neuraminidase par *P. aeruginosa* : nous avons démontré que cette neuraminidase n'était pas active sur les glycopeptides de mucines). Nous avons aussi mis en évidence une **hypersulfatation des glycopeptides salivaires de haute masse moléculaire chez les malades atteints de mucoviscidose**.

Il faut s'interroger sur l'origine de cette relative "hypersialylation". En effet, des anomalies de sialylation ont déjà été décrites dans la mucoviscidose, au niveau des mucines intestinales (173), mais dans le sens d'une diminution de la sialylation.

Récemment Barash et coll. (6) ont observé des anomalies ioniques de certains compartiments intracellulaires, dans des cellules provenant de sujets atteints de mucoviscidose; ils ont suggéré que ces anomalies pouvaient être responsables d'altérations dans les modifications post-traductionnelles de molécules sécrétées. Les phénomènes post-traductionnels ne s'expriment probablement pas de la même façon dans toutes les cellules qui synthétisent des mucines puisque les anomalies de glycosylation des mucines salivaires (première partie) sont distinctes de celles des mucines intestinales (173).

D'autres hypothèses méritent cependant d'être soulevées pour rendre compte des modifications de sialylation ou de sulfatation des mucines salivaires chez les malades atteints de mucoviscidose.

Les mucines salivaires correspondent en effet à un mélange de mucines sécrétées par différentes glandes. Il se pourrait très bien que, dans la mucoviscidose, l'obstruction de certains canaux excréteurs, comme le canal de Wharton, entrave l'écoulement normal de certaines sécrétions salivaires et modifie complètement la distribution des mucines de la salive totale.

Il faut aussi se méfier, chez ces malades qui sont soumis à une thérapeutique parfois lourde, de l'effet que certains médicaments pourraient avoir sur la sécrétion salivaire ou des effets que les antibiotiques pourraient avoir sur la flore buccale. Les germes, que l'on trouve habituellement chez les sujets sains, possèdent tout un équipement en glycosidases et notamment en neuraminidase (56) : on pourrait donc imaginer qu'il existe une certaine désialylation des mucines salivaires par les neuraminidases bactériennes chez les individus sains et que cette dégradation n'ait pas lieu chez les patients souffrant de mucoviscidose soumis à une antibiothérapie.

L'étude des chaînes glycanne neutres et sialylées des mucines salivaires n'a pas permis de mettre en évidence de chaînes glycanne spécifiques de la mucoviscidose. Il reste néanmoins à étudier les chaînes glycanne plus longues, notamment sulfatées, et à quantifier les différentes chaînes glycanne avant de conclure à la présence ou l'absence d'anomalies de glycosylation des mucines dans la mucoviscidose. Il faudra aussi travailler avec des sécrétions salivaires individuelles de manière à éviter la superposition de différents phénotypes de glycosylation.

### iii. Adhésion de *P. aeruginosa* aux glycopeptides salivaires

Dans notre étude nous avons mis en évidence **une plus forte adhésion de *P. aeruginosa* sur les glycopeptides de mucines salivaires de patients atteints de mucoviscidose que sur ceux d'individus normaux.**

Les raisons de cette adhésion préférentielle n'ont pas pu être déterminées. Cependant, nous avons observé que l'action de la neuraminidase sur les glycopeptides salivaires des patients atteints de mucoviscidose diminuait l'adhésion de *P. aeruginosa*. Cela peut être interprété de deux manières : (i) l'acide sialique est un élément intrinsèque du site de reconnaissance de *P. aeruginosa* ; (ii)

la libération d'acide sialique par la neuraminidase modifie l'accessibilité et la conformation de sites récepteurs adjacents.

Le traitement des glycopeptides salivaires par la neuraminidase de *C. perfringens* n'élimine pas complètement l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les glycopeptides de mucines salivaires. **Cela suggère donc que d'autres récepteurs sont reconnus et qu'il y a au moins deux adhésines de *P. aeruginosa* qui interviennent dans la reconnaissance des mucines salivaires.**

#### iv. Adhésion de *P. aeruginosa* sur des néoglycolipides

Une étape importante dans l'identification des sites récepteurs de *P. aeruginosa* a été franchie grâce à l'utilisation de néoglycolipides préparés à partir d'oligosaccharides de lait et présentant des structures analogues à celles de chaînes glycaniques de mucines.

Ces outils ont permis la **caractérisation de structures N-acétyllactosaminiques comme récepteurs de *P. aeruginosa***. La sialylation de telles structures en  $\alpha 2,3$  ne diminue pas leur reconnaissance par *P. aeruginosa* tandis qu'une sialylation en  $\alpha 2,6$  ou une fucosylation la diminuent.

Les structures N-acétyllactosaminiques sont présentes parmi les chaînes neutres les plus courtes des mucines salivaires normales (Tableau 6, p 146), et certainement aussi au niveau des mucines de malades souffrant de mucoviscidose. Cependant il est pour l'heure impossible d'établir s'il existe des différences dans le nombre et le type de substitution des chaînes N-acétyllactosaminiques présentes sur ces deux types de mucines salivaires. Il n'est donc pas possible d'associer les différences d'adhésion de *P. aeruginosa* sur les glycopeptides salivaires à une différence quantitative des structures N-acétyllactosaminiques entre l'état physiologique et la mucoviscidose.

Dans la première partie de notre mémoire, nous suggérons l'intervention de l'acide sialique dans certains sites récepteurs. Il n'y a pas de contradictions entre cette hypothèse et les résultats obtenus avec les néoglycolipides, si on admet que deux adhésines distinctes sont exprimées par *P. aeruginosa*, l'une reconnaissant les structures sialylées et l'autre spécifique des structures N-acétyllactosaminiques.



#### v. Caractérisation d'une adhésine membranaire

La forte adhésion de mutants isogéniques non piliés de *P. aeruginosa* sur les glycopeptides salivaires (première partie) et sur les néoglycolipides (troisième partie) pose la question du rôle des pili dans le mécanisme d'adhésion. La présence d'adhésines sur les pili a été abondamment décrite dans les années 80 (36, 132, 135, 175), mais il est de plus en plus probable qu'ils ne sont pas les seules structures à comporter des adhésines.

Ramphal et coll. (137) ont suggéré récemment que les pili interviendraient dans des interactions hydrophobes, non spécifiques, permettant un rapprochement de *P. aeruginosa* avec les mucines et qu'ils faciliteraient l'intervention ultérieure d'autres adhésines plus spécifiques.

Des adhésines différentes des pili interviendraient donc dans le mécanisme d'adhésion aux mucines. Pour rechercher ces adhésines, nous nous sommes intéressé aux constituants membranaires de *P. aeruginosa* susceptibles d'interagir avec les mucines.

Une technique originale de révélation, par des mucines radiomarquées, des répliques (sur nitrocellulose) des protéines membranaires bactériennes a été développée. Elle a permis d'identifier **une (?) protéine de *P. aeruginosa* reconnue par les mucines salivaires de sujets normaux et de patients atteints de mucoviscidose** mais aussi par les mucines bronchiques d'un patient souffrant de bronchite chronique. Il apparaît donc que l'adhésion sur cette protéine de 50 kDa n'est pas spécifique des mucines de patients atteints de mucoviscidose.

Une technique de purification par chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose-mucines a été mise au point, mais elle ne permet pas d'envisager la purification de grandes quantités de cette adhésine. Cette protéine étant bien visible en PAGE-SDS, nous avons entrepris sa purification par une technique d'électroélution à partir de gels de polyacrylamide préparatifs. Nous avons ainsi obtenu une préparation d'adhésine de *P. aeruginosa* apparemment pure et reconnaissant toujours les mucines radiomarquées.

Un certain nombre de questions restent posées. On peut notamment se demander si cette adhésine est effectivement exprimée à la surface de *P. aeruginosa*. En effet, le mode d'extraction, aussi doux soit-il, n'évite certainement pas l'éclatement de certaines bactéries et la libération du contenu intracellulaire dans le surnageant d'extraction et on sait que des lectines

intracellulaires, ayant notamment une spécificité pour le galactose, existent chez *P. aeruginosa* (45). Il sera donc nécessaire de confirmer l'expression de cette adhésine en surface.

La question du ou des site(s) récepteur(s) de cette adhésine n'est pas résolue. Il est cependant possible de tirer quelques renseignements de nos résultats préliminaires.

L'interaction mucine-adhésine est caractérisée par une forte affinité puisque (i) il faut recourir au chlorure de guanidinium 3 M pour éluier cette protéine membranaire de la colonne de Sepharose-mucines et (ii) que la fixation des mucines radiomarquées a encore lieu après lavage des nitrocelluloses avec une solution de Tween 20 concentrée (0.5%). Il est donc fort probable que, grâce à sa forte affinité pour les mucines, cette adhésine joue un rôle essentiel dans l'interaction *P. aeruginosa*-mucines.

Cette protéine n'est pas retenue sur la colonne de Fractogel-lactoN-néotétraose, ce qui tend à éliminer les structures uniquement N-acétyllactosaminiques comme sites de reconnaissance potentiels.

Pour compléter ces travaux préliminaires sur l'adhésines de 50 kDa, un certain nombre de points seront à aborder.

A différentes reprises au cours de ce travail, nous avons suggéré l'existence de plusieurs adhésines capables de reconnaître les mucines. Or, lors de la révélation par les mucines radiomarquées une seule et unique bande d'environ 50 kDa a été détectée. Il faudra donc déterminer si cette bande en PAGE-SDS correspond à une protéine homogène ou si elle contient une ou plusieurs adhésines.

Il faudra aussi définir si l'acide sialique, partie intégrante de sites de reconnaissance de *P. aeruginosa* (première partie de ce travail), fait partie des sites reconnus par cette adhésine. La caractérisation des récepteurs de cette adhésine sera essentielle à la compréhension du mécanisme physiopathologique qui mène à l'infection par *P. aeruginosa*.

Cette adhésine sera un outil précieux pour la caractérisation des sites récepteurs de *P. aeruginosa* au niveau des mucines. Des techniques de chromatographie d'affinité sur adhésines immobilisées devrait permettre de purifier à partir d'un mélange d'oligosaccharide-alditols de mucines bronchiques ou salivaires le ou les site(s) de reconnaissance de cette adhésine.

La caractérisation de cette adhésine de *P. aeruginosa* permet d'envisager de nouvelles stratégies pour combattre l'infection chez les malades. Si cette adhésine

est exprimée par une majorité de souches pathogènes de *P. aeruginosa*, il sera possible d'envisager son utilisation à des fins thérapeutiques. Des essais de vaccination dans des modèles de pneumopathies expérimentales pourraient notamment être développés. L'apparition probable dans un futur proche de souris transgéniques, devrait permettre de faire des essais de vaccination sur un modèle exprimant les anomalies du CFTR observées dans la mucoviscidose.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) **Anderson, M. P., D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E. Smith, and M. J. Welsh.** 1991.  
Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR.  
*Science* 251:679-682.
- (2) **Aronso, M., O. Medalia, L. Shori, D. Mirelman, N. Sharon, and I. Ofek.** 1979.  
Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside.  
*J. Infect. Dis.* 139:329-332.
- (3) **Arp, L. H.** 1988.  
Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms.  
*In* Virulence mechanisms of bacterial pathogens. J. A. Roth ed., American Society of Microbiology, Washington, D.C., pp 3-27.
- (4) **Baker, N., G. C. Hansson, H. Leffler, G. Riise, and C. Svanborg-Edén.** 1990.  
Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Infect. Immun.* 58:2361-2366.
- (5) **Baker, N. R., V. Minor, C. Deal, M. S. Shahrabadi, D. A. Simpson, and D. E. Woods.** 1991.  
*Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesin.  
*Infect. Immun.* 59:2859-2863.
- (6) **Barasch, J., B. Kiss, A. Prince, L. Saiman, D. Gruenert, and Q. Al-Awqati.** 1991.  
Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis.  
*Nature* 352:70-73.
- (7) **Barbero, G. J., and M. S. Sibinga.** 1962.  
Enlargement of the submaxillary salivary glands in cystic fibrosis.  
*Pediatrics* 29:788-793.
- (8) **Beachey, E. H.** 1981.  
Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces.  
*J. Infect. Dis.* 143:325-345.
- (9) **Beachey, E. H., C. S. Giampapa, and S. N. Abraham.** 1988.  
Bacterial adherence. Adhesin receptor-mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces.  
*Am. Rev. Respir. Dis.* 138:S45-S48.
- (10) **Beisiegel, U.** 1986.  
Protein blotting.  
*Electrophoresis* 7:1-18.

- (11) **Bergan, T., and N. Høiby.** 1975.  
Epidemiological markers for *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 83:553-560.
- (12) **Berry, A., J. D. Devault, and A. M. Chakrabarty,** 1989.  
High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains.  
*J. Bacteriol.* 171:2312-2317.
- (13) **Bertrand, F., B. Hermelin, A. Paul, and J. Picard.** 1991.  
Pericellular glycogonjugates of cultured fibroblasts from control and cystic fibrosis patients.  
*Int. J. Biochem.* 23:51-57.
- (14) **Boat, T. F., P.-W. Cheng, R. E. Wood.** 1977.  
Tracheobronchial mucus secretion *in vivo* and *in vitro* by epithelial tissues from cystic fibrosis and control subjects.  
*Mod. Probl. Paediat.* 19:141-152.
- (15) **Bock, K., M. E. Breimer, A. Brignole, G. C. Hansson, K-A. Karlsson, G. Larson, H. Leffler, B. E. Samuelsson, N. Strömberg, C. Svanborg Eden, and J. Thurin.** 1985.  
Specificity of binding of a strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal $\alpha$ 1-4Gal-containing glycosphingolipids.  
*J. Biol. Chem.* 260:8545-8551.
- (16) **Boersma, A., G. Lamblin, P. Degand, and P. Roussel.** 1981.  
Separation of a complex mixture of oligosaccharides by HPLC on bonded primary amine packing using a linear-gradient solvent system.  
*Carbohydr. Res.* 94:C7-C9.
- (17) **Breg, J., H. van Halbeek, J. F. G. Vliegthart, G. Lamblin, M-C. Houvenaghel, and P. Roussel.** 1987.  
Structure of sialyl-oligosaccharides isolated from bronchial mucus glycoproteins of patients (blood group O) suffering from cystic fibrosis.  
*Eur. J. Biochem.* 168:57-68.
- (18) **Calcano, G., L. Saiman, and A. Prince.** 1990.  
*Pseudomonas aeruginosa* receptors on cultivated cystic fibrosis epithelial cells can be exposed by *P. aeruginosa* neuraminidase.  
4 th Annual North America and 1990 International Cystic Fibrosis conference, abstract 194.
- (19) **Carlson, D. M.** 1968.  
Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins.  
*J. Biol. Chem.* 243:616-626.

- (20) **Ceri, H., H. A. I. McArthur, and C. Whitfield. 1986.**  
Association of alginate from *Pseudomonas aeruginosa* with two forms of heparin-binding lectin isolated from rat lung.  
*Infect. Immun.* **51**:1-5.
- (21) **Ceri, H., and Y. Westra. 1988.**  
Host binding proteins and bacterial adhesion: ecology and binding model.  
*Biochem. Cell Biol.* **66**:541-548
- (22) **Ceri, H., W. S. Hwang, Y. Westra, C. A. Stremick, and J. B. Wright. 1991.**  
Effects of altered secretion of an endogenous lectin in cystic fibrosis lung.  
11th International Symposium on Glycoconjugates, Toronto, Canada. Abstract 12-4.
- (23) **Ceri, H., W. S. Hwang, and H. Rabin. 1991.**  
Structure, secretion, and bacterial specificity of an endogenous lectin from cystic fibrosis lung.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**:51-55.
- (24) **Cheng, P.-W., T. F. Boat, K. Cranfill, J. R. Yankaskas, and R. C. Boucher. 1989.**  
Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis.  
*J. Clin. Invest.* **84**:68-72.
- (25) **Chi, E., T. Mehl, D. Nunn, and S. Lory. 1991.**  
Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells.  
*Infect. Immun.* **59**:822-828.
- (26) **Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, and E. H. Beachey. 1982.**  
Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermis* to smooth surfaces.  
*Infect. Immun.* **37**:318-326.
- (27) **Clarke, S. W., and D. Pavia. 1991.**  
Mucociliary clearance.  
*In The Lung : Scientific Foundations.* R. G. Crystal, J. B. West et al. eds., Raven Press, New York, pp 1845-1859.
- (28) **Cohen, R. E., A. Aguirre, M. E. Neiders, M. J. Levine, P. C. Jones, M. S. Reddy, and J. G. Haar. 1990.**  
Immunochemistry of high molecular weight human salivary mucin.  
*Arch. oral Biol.* **35**:127-136.

- (29) Cohen, R. E., A. Aguirre, M. E. Neiders, M. J. Levine, P. C. Jones, M. S. Reddy, and J. G. Haar. 1991.  
Immunochemistry and immunogenicity of low molecular weight human salivary mucin.  
Arch. oral Biol. 36:347-356.
- (30) Costerton, J. W., R. T. Irvin, and K.-J. Cheng. 1981.  
The bacterial glycocalyx in nature and disease.  
Ann. Rev. Microbiol. 35:299-324.
- (31) Demuth, R. D., E. E. Golub, and D. Malamud. 1990.  
Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for human salivary glycoprotein.  
J. Biol. Chem. 265:7120-7126.
- (32) DeVault, J. D., A. Berry, T. K. Misra, A. Darzins, and A. M. Chakrabarty. 1989.  
Environmental sensory signals and microbial pathogenesis: *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis.  
Bio/Technology 7:352-357.
- (33) Dogget, R. G., G. M. Harrison, and E. S. Wallis. 1964.  
Comparaison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis.  
J. Bacteriol. 87:427-431.
- (34) Doig, P., N. R. Smith, T. Todd, and R. T. Irvin. 1987.  
Characterization of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells.  
Infect. Immun. 55:1517-1522.
- (35) Doig, P., T. Todd, P. A. Sastry, K. K. Lee, R. S. Hodges, W. Paranchych, and R. T. Irvin. 1988.  
Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells.  
Infect. Immun. 56:1641-1646.
- (36) Doig, P., W. Paranchych, P. A. Sastry, and R. T. Irvin. 1989.  
Human buccal epithelial cell receptors of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of glycoproteins with pilus binding activity.  
Can. J. Microbiol. 35:1141-1145.
- (37) Doig, P., P. A. Sastry, R. S. Hodges, K. K. Lee, W. Paranchych, and R. T. Irvin. 1990.  
Inhibition of pilus-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells by monoclonal antibodies directed against pili.  
Infect. Immun. 58:124-130.



- (38) **Domenico, P., D. L. Diedrich, and B. A. Cunha.** 1989.  
Quantitative extraction and purification of exopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*.  
*J. Microbiol. Meth.* **9**:211-219.
- (39) **Doyle, R. J., and E. M. Sonnenfeld.** 1989.  
Properties of the cell surfaces of pathogenic bacteria.  
*Int. Rev. Cytol.* **118**:33-92.
- (40) **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1989.  
Common themes in microbial pathogenicity.  
*Microbiol. Rev.* **53**:210-230.
- (41) **Franklin, A. L., T. Todd, G. Gurman, D. Black, P. M. Mankinen-Irvin, and R. T. Irvin.** 1987.  
Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to cilia of human tracheal epithelial cells.  
*Infect. Immun.* **55**:1523-1525.
- (42) **Friend, P. A.** 1986.  
Pulmonary infection in cystic fibrosis.  
*J. Infect.* **13**:55-72.
- (43) **Fröman, G., L. M. Switalski, P. Speziale, and M. Höök.** 1987.  
Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*.  
*J. Biol. Chem.* **262**:6564-6571.
- (44) **Garber, N., N. Sharon, D. Shohet, J. S. Lam, and R. J. Doyle.** 1985.  
Contribution of hydrophobicity to hemagglutination reactions of *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Infect. Immun.* **50**:336-337.
- (45) **Gilboa-Garber M.** 1986.  
Lectins of *Pseudomonas aeruginosa* : properties, biological effects, and applications.  
*In* Microbial lectins and agglutinins : properties and biological activity.  
D. Mirelman ed., John Wiley and Sons, New York, pp 255-269.
- (46) **Gilligan, P. H.** 1991.  
Microbiology of airways disease in patients with cystic fibrosis.  
*Clin. Microbiol. Rev.* **4**:35-51.
- (47) **Glick, J., and N. Garber.** 1983.  
The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins.  
*J. Gen. Microbiol.* **129**:3085-3090.
- (48) **Glick, J., N. Garber, and D. Shohet.** 1987.  
Surface hemagglutinating activity of *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Microbios* **50**:69-80.

- (49) **Goldmann, D. A., and J. D. Klingler.** 1986.  
*Pseudomonas cepacia*: biology mechanisms of virulence, epidemiology.  
J. Pediatr. 108:806-812.
- (50) **Goldstein, W., and G. Döring.** 1986.  
Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors  
in patients with cystic fibrosis.  
Am. Rev. Respir. Dis. 134:49-56
- (51) **Gottschalk, A., and A. S. Bhargava.** 1972.  
Submaxillary gland glycoproteins. Their composition, structure and function.  
dans Glycoproteins (Gottschalk, A., ed.) pp.810-829, Elsevier, Amsterdam.
- (52) **Hancock, R. E. W., R. Siehnel, and N. Martin.** 1990.  
Outer membrane proteins of *Pseudomonas*.  
Mol. Microbiol. 4:1069-1075.
- (53) **Hansson, G. C., K.-A. Karlsson, G. Larson, N. Strömberg, and J. Thurin.** 1985.  
Carbohydrate-specific adhesion of bacteria to thin-layer chromatograms: a  
rationalized approach to the study of host cell glycolipid receptors.  
Anal. Biochem. 146:158-163.
- (54) **Hazlett, L. D., M. Moon, and R. S. Berk.** 1986.  
*In vivo* identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas*  
*aeruginosa*.  
Infect. Immun. 51:687-689.
- (55) **Hazlett, L. D., M. M. Moon, M. Strejc, and R. S. Berk.** 1987.  
Evidence for N-acetylmannosamine as an ocular receptor for *P. aeruginosa*  
adherence to scarified cornea.  
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28:1978-1985.
- (56) **van der Hoeven, J. S., C. W. A. van den Kieboom, and P. J. M. Camp.**  
1990.  
Utilization of mucin by oral Streptococcus species.  
Antonie van Leeuwenhoek 57:165-172.
- (57) **Høiby, N.** 1975.  
Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological  
specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases.  
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 83:549-552.
- (58) **Høiby, N.** 1982.  
Microbiology of lung infections in cystic fibrosis.  
Acta Paediatr. Scand. suppl. 301:33-54.

- (59) **Houdret, N., J.-M. Perini, C. Galabert, A. Scharfman, P. Humbert, G. Lamblin, and P. Roussel.** 1986.  
The high lipid content of respiratory mucins in cystic fibrosis is related to infection.  
*Biochim. Biophys. Acta* **880**:54-61.
- (60) **Houdret, N., R. Ramphal, A. Scharfman, J.-M. Perini, M. Filliat, G. Lamblin, and P. Roussel.** 1989.  
Evidence for the *in vivo* degradation of human respiratory mucins during *Pseudomonas aeruginosa* infection.  
*Biochim. Biophys. Acta* **992**:96-105.
- (61) **Irvin, R. T., P. Doig, K. K. Lee, P. A. Sastry, W. Paranchych, T. Todd, and R. S. Hodges.** 1989.  
Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesin: confirmation that the pilin structural protein subunit contains a human epithelial cell-binding domain.  
*Infect. Immun.* **57**:3720-3726.
- (62) **Isaacson, R. E.** 1983.  
Regulation of expression of *Escherichia coli* pilus K99.  
*Infect. Immun.* **40**:633-639.
- (63) **Ishimoto, K. S., and S. Lory.** 1989.  
Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative  $\sigma$  factor (RpoN) of RNA polymerase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:1954-1957.
- (64) **Jamieson, J. D.** 1983.  
The exocrine pancreas and salivary glands.  
*In Histology cell and tissue biology.* Weiss ed., Fifth edition, Elsevier Science Publishing Co., New-York, 765-772.
- (65) **Johanson, W. G. Jr, J. H. Higuchi, T. R. Chaudhuri, and D. E. Woods.** 1980.  
Bacterial adherence to epithelial cells in bacillary colonization of the respiratory tract.  
*Am. Rev. Respir. Dis.* **121**:55-63.
- (66) **Johnson, K., M. L. Parker, and Steve Lory.** 1986.  
Nucleotide sequence and transcriptional initiation site of two *Pseudomonas aeruginosa* pilin genes.  
*J. Biol. Chem.* **261**:15703-15708.
- (67) **Jones, G. W., and R. E. Isaacson.** 1983.  
Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors.  
*Crit. Rev. Microbiol.* **10**:229-260.

- (68) **Karlsson, K.-A.** 1987.  
Preparation of total nonacid glycolipids for overlay analysis of receptors for bacteria and viruses and for other studies.  
*Meth. Enzymol.* **138**:212-220.
- (69) **Karlsson, K.-A., and N. Strömberg.** 1987.  
Overlay and solid-phase analysis of glycolipid receptors for bacteria and viruses.  
*Meth. Enzymol.* **138**:220-232.
- (70) **Kartner, N., J. W. Hanrahan, T. J. Jensen, A. Leonard Naismith, S. Sun, C. A. Ackerley, E. F. Reyes, L.-C. Tsui, J. M. Rommens, C. E. Bear, and J. R. Riordan.** 1991.  
Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance.  
*Cell* **64**:681-691.
- (71) **Kawagishi S., Fahim R. E. F., Wong K. H. and Bennick A.** 1990.  
Purification and characterization of subunits of a high molecular weight human salivary mucin.  
*Arch. oral Biol.* **35**, 265-272.
- (72) **Klein, A., G. Lamblin, M. Lhermitte, P. Roussel, J. Breg, H. Van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart.** 1988.  
Primary structure of neutral oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by combination of 500-Mhz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis.  
1. Structure of 16 oligosaccharides having the Gal $\beta$ (1-3)GalNAc-ol core (type 1) or the Gal $\beta$ (1-3)[GlcNAc $\beta$ (1-6)]GalNAc-ol core (type 2).  
*Eur. J. Biochem.* **171**:631-642.
- (73) **Klein, A., C. Carnoy, G. Lamblin, P. Roussel, A. Van Kuik, P. De Waard, J.F.G. Vliegthart.** 1991.  
Isolation and structural characterization of novel neutral oligosaccharide-alditols from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis.  
1. Structure of 11 oligosaccharides having the GlcNAc $\beta$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc $\beta$ (1-6)GalNAc-ol structural element in common.  
*Eur. J. Biochem.* **198**:151-168.
- (74) **Knowles, M. R., M. J. Stutts, A. Spock, N. Fischer, J. T. Gatzky, and R. C. Boucher.** 1983.  
Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium.  
*Science* **221**:1067-1070.
- (75) **Kobata, A.** 1977.  
Milk glycoproteins and oligosaccharides.  
*In* The glycoconjugates. Volume 1: Mammalian glycoproteins and glycolipids. M. I. Horowitz and W. Pigman eds, Academic Press, New-York, pp 423-440.

- (76) **Komiyama K., Tynan J. J., Habbick B. F., Duncan D. E. and Liepert D. J. 1985.**  
*Pseudomonas aeruginosa* in the oral cavity and sputum of patients with cystic fibrosis.  
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. **59**:590-594.
- (77) **Komiyama, K., B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1987.**  
Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients.  
Infect. Immun. **55**:2364-2369.
- (78) **Komiyama, K., B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1989.**  
Whole, submandibular, and parotid saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis.  
Infect. Immun. **57**:1299-1304.
- (79) **Koop, H. M., M. Valentijn-Benz, A. V. Nieuw Amerongen, P. A. Roukema, and J. de Graaff. 1990.**  
Involvement of human mucous saliva and salivary mucins in the aggregation of the oral bacteria *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus rattus*.  
Antonie van Leeuwenhoek **57**:245-252.
- (80) **Krieg, D. P., J. A. Bass, and S. J. Mattingly. 1986.**  
Aeration selects for mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*.  
J. Clin. Microbiol. **24**:986-990.
- (81) **Krieg, D. P., J. A. Bass, and S. J. Mattingly. 1988.**  
Phosphorylcholine stimulates capsule formation of phosphate-limited mucoid *Pseudomonas aeruginosa*.  
Infect. Immun. **56**:864-873.
- (82) **Krivan, H. C., V. Ginsburg, and D. D. Roberts. 1987.**  
*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2).  
Arch. Biochem. Biophys. **260**:493-496.
- (83) **Krivan, H. C., D. D. Roberts, and V. Ginsburg. 1988.**  
Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc $\beta$ 1-4Gal found in some glycolipids.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**:6157-6161.
- (84) **Laemmli, U. K. 1970.**  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature **227**:680-685.

- (85) **Lam, J., R. Chan, K. Lam, and J. W. Costerton. 1980.**  
Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis.  
*Infect. Immun.* 28:546-556.
- (86) **Lamblin, G., J. J. Lafitte, M. Lhermitte, P. Degand, and P. Roussel. 1977.**  
Mucins from cystic fibrosis sputum.  
*Mod. Probl. Paediat.* 19:153-164.
- (87) **Lamblin G., Lhermitte M., Degand P., Roussel P. and Slayter H. S. 1979.**  
Chemical and physical properties of human bronchial mucus glycoproteins.  
*Biochimie* 61, 23-43.
- (88) **Lamblin, G., A. Klein, A. Boersma, Nasir-ud-Din, and P. Roussel. 1983.**  
Fractionation of oligosaccharides containing sialic acid by liquid chromatography on amino silicagel.  
*Carbohydr. Res.* 118:C1-C4.
- (89) **Lamblin, G., A. Boersma, A. Klein, P. Roussel, H. Van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart. 1984.**  
Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis.  
*J. Biol. Chem.* 259:9051-9058.
- (90) **Lamblin, G., M. Lhermitte, A. Klein, N. Houdret, A. Scharfman, R. Ramphal, and P. Roussel. 1991.**  
The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa ?  
*Am. Rev. Respir. Dis.* 144:S19-S24.
- (91) **Lee, K. K., P. Doig, R. T. Irvin, W. Paranchych, and R. S. Hodges. 1989.**  
Mapping the surface regions of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin: the importance of the C-terminal region for adherence to human buccal epithelial cells.  
*Mol. Microbiol.* 3:1493-1499.
- (92) **Leffler, H., and C. Svanborg-Edén. 1986.**  
Glycolipids as receptors for *Escherichia coli* lectins or adhesins.  
*In* Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity.  
D. Mirelman ed., John Wiley and Sons, New York, pp 83-111.
- (93) **Leprat, R., and Y. Michel-briand. 1980.**  
Extracellular production of neuraminidase by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis.  
*Ann. Microbiol.* 131B:211-227.

- (94) **Lindemann R. A., Newman M. G., Kaufman A. K. and Le T. V.** 1985.  
Oral colonisation and susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* oral isolates from cystic fibrosis patients.  
*J. Dent. Res.* **64**:54-57.
- (95) **Lingwood, C. A., M. Cheng, H. C. Krivan, and D. Woods.** 1991.  
Glycolipid receptor binding specificity of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Biochem. Biophys. Res. Comm.* **175**:1076-1081.
- (96) **Linker, A., and R. S. Jones.** 1966.  
A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*.  
*J. Biol. Chem.* **241**:3845-3851.
- (97) **Lopes, J. D., M. D. Reis, and R. R. Brentani.** 1985.  
Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*.  
*Science* **229**:275-277.
- (98) **Loomis R. E., Prakobphol A., Levine M. J., Reddy M. S. and Jones P. C.** 1987.  
Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular and sublingual saliva.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 452-464.
- (99) **Machan, Z. A., T. L. Pitt, W. White, D. Watson, G. W. Taylor, P. J. Cole, and R. Wilson.** 1991.  
Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* : description of an antistaphylococcal substance.  
*J. Med. Microbiol.* **34**:213-217.
- (100) **Macone, A. B., G. B. Pier, J. E. Pennington, W. J. Matthews, and D. A. Goldmann.** 1981.  
Mucoid *Escherichia coli* in cystic fibrosis.  
*N. Engl. J. Med.* **304**:1445-1449.
- (101) **Magnani, J. L.** 1985.  
Immunostaining free oligosaccharides directly on thin-layer chromatograms.  
*Anal. Biochem.* **150**:13-17.
- (102) **Magnani, J. L.** 1987.  
Immunostaining free oligosaccharides directly on thin-layer chromatograms.  
*Meth. Enzymol.* **138**:208-212.
- (103) **March, S. C., I. Parikh, and P. Cuatrecasas.** 1974.  
A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography.  
*Anal. Biochem.* **60**:149-152.

- (104) **Marcus, H., and N. R. Baker. 1985.**  
Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium.  
*Infect. Immun.* **47**:723-729.
- (105) **Marcus, H., A. Austria, and N. R. Baker. 1989.**  
Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal epithelium.  
*Infect. Immun.* **57**:1050-1053.
- (106) **Martin, D. R. 1973.**  
Mucoid variation in *Pseudomonas aeruginosa* induced by the action of phage.  
*J. Med. Microbiol.* **6**:111-118.
- (107) **May, T. B., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, R. K. Rothmel, T. K. Misra, and A. M. Chakrabarty. 1991.**  
Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* : a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients.  
*Clin. Microbiol. Rev.* **4**:191-206.
- (108) **McArthur, H. A. I., and H. Ceri. 1983.**  
Interaction of rat lung lectin with the exopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Infect. Immun.* **42**:574-578.
- (109) **McEachran, D. W., and R. T. Irvin. 1985.**  
Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal epithelial cells: evidence for two classes of receptors.  
*Can. J. Microbiol.* **31**:563-569.
- (110) **McMillian, B.G. 1980.**  
Infections following burn injury.  
*Surg. Clin. N. Amer.* **60**:185-196.
- (111) **Milne, R. W. and C. Dawes 1973.**  
The relative contributions of different salivary glands to the blood group activity of whole saliva in humans.  
*Vox Sang.* **25**:298-307.
- (112) **Miller, M. J., and D. G. Ahearn. 1987.**  
Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses and other substrata.  
*J. Clin. Microbiol.* **25**:1392-1397.
- (113) **Miller, M. J., L. A. Wilson, and D. G. Ahearn. 1988.**  
Effects of protein, mucin, and human tears on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses.  
*J. Clin. Microbiol.* **26**:513-517.





- (114) Murray, P. A., M. J. Levine, L. A. Tabak, and M. S. Reddy. 1982. Specificity of salivary-bacterial interactions: evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**:390-396.
- (115) Nelson, J. W., M. W. Tredgett, J. K. Sheehan, D. J. Thornton, D. Notman, and J. R. W. Govan. 1990. Mucinophilic and chemotactic properties of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary colonization in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **58**:1489-1495.
- (116) Niederman, M. S., T. D. Rafferty, C. T. Sasaki, W. W. Merrill, R. A. Mattay, and H. Y. Reynolds. 1983. Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**:85-90.
- (117) Niederman, M. S. 1989. Bacterial adherence as a mechanism of airway colonization. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:15-20.
- (118) Nikaido, H., K. Nikaido, and S. Harayama. 1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **266**:770-779.
- (119) Oemrawsingh, I., and P. A. Roukema. 1974. Isolation, purification and chemical characterization of mucins from human submandibular glands. *Arch. oral Biol.* **19**:615-626.
- (120) Palmer, L. B., W. W. Merrill, M. S. Niederman, R. D. Ferranti, and H. Y. Reynolds. 1986. Bacterial adherence to respiratory tract cells. Relationship between *in vivo* and *in vitro* pH and bacterial attachment. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**:784-788.
- (121) Paloske, B. L., B. B. Finlay, and W. Paranchych. 1985. Cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin gene. *FEBS Lett.* **183**:408-412.
- (122) Panjwani, N., T. S. Zaidi, J. E. Gigstad, F. B. Jungalwala, M. Barza, and J. Baum. 1990. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to neutral glycosphingolipids of rabbit corneal epithelium. *Infect. Immun.* **58**:114-118.
- (123) Paranchych, W., P. A. Sastry, D. Drake, J. R. Pearlstone, and L. B. Smillie. 1985. *Pseudomonas* pili. Studies on antigenic determinants and mammalian cell receptors. *Antibiot. Chemother.* **36**:49-57.

- (124) **Paranchych, W., and L. S. Frost. 1988.**  
The physiology and the biochemistry of pili.  
*Adv. Microbiol. Physiol.* **29**:53-114.
- (125) **Pecha, B., D. Low, and P. O'Hanley. 1989.**  
Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by piliated *Escherichia coli* in murine model.  
*J. Clin. Invest.* **83**:2102-2108.
- (126) **Petersen, N. T., N. Høiby, C. H. Mordhorst, K. Lind, E. W. Flensburg, and B. Bruun. 1981.**  
Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma-possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Acta Pædiatr. Scand.* **70**:623-628.
- (127) **Plotkowski, M. C., G. Beck, J. M. Tournier, M. Bernado-Filho, E. A. Marques, and E. Puchelle. 1989.**  
Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelium and the effect of leucocyte elastase.  
*J. Med. Microbiol.* **30**:285-293.
- (128) **Plotkowski, M. C., M. Chevillard, D. Pierrot, D. Altemeyer, J. M. Zahm, G. Colliot, and E. Puchelle. 1991.**  
Differential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells in primary culture.  
*J. Clin. Invest.* **87**:2018-2028.
- (129) **Prakobphol A., Levine M. J., Tabak L. A., and Reddy M. S. 1982.**  
Purification of low-molecular weight, mucin type glycoprotein from human submandibular and sublingual saliva.  
*Carbohydr. Res.* **108**, 111-122.
- (130) **Ramphal, R., and M. Pyle. 1983.**  
Adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to acid-injured tracheal epithelium.  
*Infect. Immun.* **41**:345-351.
- (131) **Ramphal, R., and M. Pyle. 1983.**  
Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract.  
*Infect. Immun.* **41**:339-344.
- (132) **Ramphal, R., J. C. Sadoff, M. Pyle, and J. D. Silipigni. 1984.**  
Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium.  
*Infect. Immun.* **44**:38-40.

- (133) **Ramphal, R., and M. Pyle. 1985.**  
Further characterization of the tracheal receptor for *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Eur. J. Clin. Microbiol.* 4:160-162.
- (134) **Ramphal, R., and G. B. Pier. 1985.**  
Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to  
tracheal cells.  
*Infect. Immun.* 47:1-4.
- (135) **Ramphal, R., C. Guay, and G. B. Pier. 1987.**  
*Pseudomonas aeruginosa* adhesins for tracheobronchial mucin.  
*Infect. Immun.* 55:600-603.
- (136) **Ramphal, R., N. Houdret, L. Koo, G. Lamblin, and P. Roussel. 1989.**  
Differences in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucin glycopeptides from  
sputa of patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis.  
*Infect. Immun.* 57:3066-3071.
- (137) **Ramphal, R., L. Koo, K. S. Ishimoto, P. A. Totten, J. Cano Lara, and  
S. Lory. 1991.**  
Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* pilin-deficient mutant to mucin.  
*Infect. Immun.* 59:1307-1311.
- (138) **Ramphal, R., C. Carnoy, S. Fiebre, J. C. Michalski, N. Houdret, G.  
Lamblin, G. Strecker, and P. Roussel. 1991.**  
*Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1  
(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide units.  
*Infect. Immun.* 59:700-704.
- (139) **Reddy, M. S., M. J. Levine, and A. Prakobphol. 1985.**  
Oligosaccharide structures of the low-molecular-weight salivary mucin from a  
normal individual and one with cystic fibrosis.  
*J. Dent. Res.* 64:33-36.
- (140) **Reynolds, H. Y. 1991.**  
Integrated host defense against infections.  
*In The lung : Scientific Foundations.* R. G. Crystal, J. B. West et al. eds., Raven  
Press, New York, pp 1899-1911.
- (141) **Roberts, D. D. 1990.**  
Interactions of respiratory pathogens with host cell surface and extracellular matrix  
components.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3:181-186.
- (142) **Roberts, D. D., L. D. Olson, M. F. Barile, V. Ginsburg, and H. C.  
Krivan. 1989.**  
Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified  
glycoproteins.  
*J. Biol. Chem.* 264:9289-9293.

- (143) **Rommens, J. M. et al.** 1989.  
Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.  
*Science* **245**:1059-1065.
- (144) **Ronson, C. W., B. Tracy Nixon, and F. M. Ausubel.** 1987.  
Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli.  
*Cell* **49**:579-581.
- (145) **Rose, M. C., C. F. Brown, J. Z. III Jacoby, W. S. Lynn, and B. Kaufman.** 1987.  
Biochemical properties of tracheobronchial mucins from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals.  
*Pediatr. Res.* **22**:545-551.
- (146) **Roussel, P., G. Lamblin, M. Lhermitte, N. Houdret, J. J. Lafitte, J. M. Perini, A. Klein, and A. Scharfman.** 1988.  
The complexity of mucins.  
*Biochimie* **70**:1471-1482.
- (147) **Saiman, L., J. Sadoff, and A. Prince.** 1989.  
Cross-reactivity of *Pseudomonas aeruginosa* antipilin monoclonal antibodies with heterogeneous strains of *P. aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*.  
*Infect. Immun.* **57**:2764-2770.
- (148) **Saiman, L., K. Ishimoto, S. Lory, and A. Prince.** 1990.  
The effect of piliation and exoproduct expression on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers.  
*J. Infect. Dis.* **161**:541-548.
- (149) **Sastry, P. A., J. R. Pearlstone, L. B. Smillie, and W. Paranchych.** 1983.  
Amino acid sequence of pilin isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PAK.  
*FEBS Lett.* **151**:253-256.
- (150) **Sato, H., and K. Okinaga.** 1987.  
Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse epidermal cells.  
*Infect. Immun.* **55**:1774-1778.
- (151) **Sato, H., K. Okinaga, and H. Saito.** 1988.  
Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection.  
*Microbiol. Immunol.* **32**:131-139.
- (152) **Scanlin, T. F., Y.-M. Wang, and M. C. Glick.** 1985.  
Altered fucosylation of membrane glycoproteins from cystic fibrosis fibroblasts.  
*Pediatr. Res.* **19**:368-374.

- (153) **Schrager, J., and M. D. G. Oates. 1971.**  
The isolation and partial characterization of the principal glycoprotein from human mixed saliva.  
*Arch. oral Biol.* **16**:287-303.
- (154) **Singh, A., L. D. Hazlett, and R. S. Berk. 1990.**  
Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to mouse corneas in organ culture.  
*Infect. Immun.* **58**:1301-1307.
- (155) **Slayter, H. S., G. Lamblin, A. Le Treut, C. Galabert, N. Houdret, P. Degand, and P. Roussel. 1984.**  
Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein.  
*Eur. J. Biochem.* **142**:209-218.
- (156) **Speert, D. P., F. Eftekhar, and M. L. Puterman. 1984.**  
Nonopsonic phagocytosis of strains of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients.  
*Infect. Immun.* **43**:1006-1011.
- (157) **Speert, D. P., S. W. Farmer, M. E. Campbell, J. M. Musser, R. K. Selander, and S. Kuo. 1990.**  
Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis.  
*J. Clin. Microbiol.* **28**:188-194.
- (158) **Speziale, P., M. Hook, T. Wadstrom, and R. Timpl. 1982.**  
Binding of basement membrane protein laminin to *Escherichia coli*.  
*FEBS lett.* **146**:55-58.
- (159) **Speziale, P., G. Raucci, L. Visai, L. M. Switalski, R. Timpl, and M. Höök. 1986.**  
Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* Cowan I.  
*J. Bacteriol.* **167**:77-81.
- (160) **Stoll, M. S., T. Mizuochi, R. A. Childs and T. Feizi. 1988.**  
Improved procedure for the construction of neoglycolipids having antigenic and lectin-binding activities, from reducing oligosaccharides.  
*Biochem. J.* **256**: 661-664.
- (161) **Tabak, L. A., M. J. Levine, I. D. Mandel, and S. A. Ellison. 1982.**  
Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity.  
*J. Oral Pathol.* **11**:1-17.
- (162) **Terry, J. M., S. E. Pina, and S. J. Mattingly. 1991.**  
Environmental conditions which influence mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PA01.  
*Infect. Immun.* **59**:471-477.

- (163) **Thomas, D. D., J. B. Baseman, and J. F. Alderette. 1985.**  
Fibronectin mediated *Treponema pallidum* adherence through recognition of the cell-binding domain.  
J. Exp. Med. 161: 514-528.
- (164) **Totten, P. A., J. C. Lara, and S. Lory. 1990.**  
The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene.  
J. Bacteriol. 172:389-396.
- (165) **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979.**  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.
- (166) **Tsuji, T., and O. Toshiaki 1986.**  
Carbohydrates structures of bovine submaxillary mucin.  
Carbohydr. Res. 151:391-402.
- (167) **Tuomanen, E., and A. Weiss. 1985.**  
Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells.  
J. Infect. Dis. 152:118-125.
- (168) **Vishwanath, S., and R. Ramphal. 1984.**  
Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin.  
Infect. Immun. 45:197-202.
- (169) **Vishwanath, S., and R. Ramphal. 1985.**  
Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa* : predominance of amino sugars in binding sites.  
Infect. Immun. 48:331-335.
- (170) **Veerman E. C. I., Valentijn-Benz M., Bank R. A. and Nieuw Amerongen A. V. 1989.**  
Isolation of high molecular weight mucins from human whole saliva by ultracentrifugation.  
J. Biol. Buccale 17, 307-312.
- (171) **Wabha, A. H., and J. H. Darrell. 1965.**  
The identification of atypical strains of *Pseudomonas aeruginosa*.  
J. Gen. Microbiol. 38:329-342.
- (172) **Welsh, M. J. 1990.**  
Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia.  
FASEB J. 4:2718-2725.
- (173) **Wesley, A., J. Forstner, R. Qureshi, M. Mantle, and G. Forstner. 1983.**  
Human intestinal mucin in cystic fibrosis.  
Pediatr. Res. 17:65-69.

- (174) Woods, D. E., J. A. Bass, W. G. Johanson, Jr, and D. C. Straus. 1980.  
Role of adherence in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients.  
Infect. Immun. 30:694-699.
- (175) Woods, D. E., D. C. Straus, W. G. Johanson, Jr., V. K. Berry, and J. A. Bass. 1980.  
Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells.  
Infect. Immun. 29:1146-1151.
- (176) Woods, D. E., D. C. Straus, W. G. Johanson, Jr., and J. A. Bass. 1981.  
Role of salivary protease activity in adherence of Gram-negative bacilli to mammalian buccal epithelial cells *in vivo*.  
J. Clin. Invest. 68:1435-1440.



## RESUME

Dans le but d'expliquer la prédominance de *P. aeruginosa* au cours des infections bronchiques dans la mucoviscidose, nous nous sommes intéressé à l'interaction de ce germe avec les mucines, en prenant comme modèle les mucines salivaires de patients atteints de mucoviscidose.

La mucoviscidose se caractérise par (i) une hypersécrétion de mucines salivaires, (ii) une sialylation importante de tous les glycopeptides salivaires et (iii) des taux élevés de sulfate et de fucose pour les glycopeptides salivaires de haute masse moléculaire.

Par une technique d'adhésion *in vitro* il a été montré que *P. aeruginosa* adhère de manière plus importante sur les glycopeptides salivaires de patients atteints de mucoviscidose que sur ceux de sujets normaux et que cette adhésion était en partie liée à l'acide sialique.

Une caractérisation des chaînes glycaniques a été effectuée en utilisant des techniques de purification par HPLC, et d'analyse par spectrométrie de masse FAB et spectroscopie RMN. Pour la première fois une forte hétérogénéité des chaînes glycaniques de mucines salivaires humaines a été décrite et 37 oligosaccharides neutres et sialylés ont été identifiés.

L'utilisation de néoglycolipides présentant des structures glycaniques similaires à celles rencontrées au niveau des mucines a permis de démontrer que la structure N-acétyllactosamine et des structures sialylées en  $\alpha 2,3$  étaient reconnues par *P. aeruginosa*.

Pour tenter de caractériser les adhésines de *P. aeruginosa* intervenant dans la reconnaissance des mucines, une technique de révélation des protéines membranaires par des mucines radiomarquées a été développée et a permis de caractériser une adhésine de *P. aeruginosa* de 50 kDa.