

ÉTUDE DES GLYCOPROTÉINES CARBOXYLIQUES ET SULFATÉES DE LA SÉCRÉTION BRONCHIQUE HUMAINE

R. HAVEZ, M. DEMINATTI, P. ROUSSEL, P. DEGAND, A. RANDOUX ET G. BISERTE

Unité de Recherches de l'I.N.S.E.R.M. sur la Biochimie des Protéines,
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lille (France)*

(Reçu le 25 avril, 1967).

SUMMARY

Study of Carboxylic and Sulfated Glycoproteins in Bronchial Mucus

Acidic glycoproteins are isolated from the reduction products of fibrillar mucus of sputum. The sensitivity of these glycoproteins towards neuraminidase depends upon the pathological state and the blood group of the patient (especially upon the secretor or non-secretor character). Histochemical studies and analysis of the substances synthesised in fragments of bronchial mucosa surviving *in vitro*, demonstrate the incorporation of radio-sulfate in the pure serous cells, mixed type of secreting glandular cells, and in the goblet cells of the epithelial surface. The sulfated glycoproteins (free from uronic acid) are localized in the group of acidic glycoproteins of sputum.

Au sein des produits élaborés par les formations glandulaires de l'arbre trachéo-bronchique, deux groupes de glycoprotéines représentent les composants majeurs impliqués dans la structure du réseau fibrillaire des sécrétions normales et pathologiques. Caractérisés en électrophorèse en agarose et séparés par électrophorèse préparative en film liquide¹, ces deux groupes de glycoprotéines se différencient par leur point iso-électrique et par leur affinité tinctoriale pour le bleu de toluidine. L'un correspond à des substances de groupe sanguin riches en fucose, colorées sur le diagramme d'électrophorèse en agarose par le réactif de Schiff après oxydation périodique et par les colorants des protéines. L'autre groupe, de caractère plus acide, se révèle par le bleu de toluidine et peut être isolé des produits de réduction douce du mucus fibrillaire de l'expectoration sous forme d'un complexe avec le bromure de cetyltriméthylammonium². Nous avons pu isoler ces glycoprotéines acides à partir de différents mucus fibrillaires d'expectorations et préciser la nature des constituants responsables de leur caractère acide. Les études histochimiques et l'analyse des produits de synthèse formés dans les fragments de biopsie bronchique en survie nous ont permis de démontrer l'incorporation de sulfate inorganique dans la structure de ces

* Directeur: Professeur Paul Boulanger.

glycoprotéines et d'identifier les éléments cellulaires dans lesquels a lieu leur formation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'ensemble des glycoprotéines de caractère acide peut être isolé des produits de réduction douce du mucus fibrillaire de l'expectoration. Le fractionnement a porté sur les sécrétions bronchiques de quatre malades: deux bronchitiques chroniques, dont l'un (observation 1) était un sujet de groupe sanguin A sécréteur et l'autre (observation 2) un sujet de groupe sanguin B non sécréteur; un asthme allergique (observation 3) chez un malade de groupe sanguin O sécréteur; et enfin un cancer bronchique (observation 4) chez un sujet de groupe sanguin A sécréteur. Dans ces quatre cas, le diagnostic pouvait être posé sans aucune difficulté, le tableau clinique et radiologique étant tout à fait caractéristique, et l'étude a été faite avant la mise en œuvre de toute thérapeutique.

Les expectorations recueillies sont traitées dans les 24 h qui suivent leur émission. Après réduction douce du mucus fibrillaire, une électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage permet de séparer les différents groupes de composants libérés, en précisant leur importance relative. Les glycoprotéines de caractère acide sont isolées par fractionnement de l'adialysable soluble du mucus fibrillaire réduit. L'action de la neuraminidase permet de déterminer pour chacune des préparations obtenues la proportion de résidus d'acide *N*-acétylneuraminique, grâce à leur affinité tinctoriale pour le bleu de toluidine.

Un fractionnement au Rivanol* à pH 1.5 après hydrolyse par la papaïne et par la pronase conduit à l'isolement d'un glycopeptide dans lequel l'étude en spectrophotométrie infra-rouge montre la présence de groupes sulfate. Ce glycopeptide se retrouve dans les fragments de biopsie bronchique maintenus en survie dans un milieu de Hanks³ renfermant du radiosulfate; d'autre part, l'examen histologique et autoradiographique de ces biopsies permet d'identifier les éléments cellulaires où s'effectue la synthèse des glycoprotéines sulfatées.

Isolement des glycoprotéines acides

Préparation des produits de réduction du mucus fibrillaire. Le mucus fibrillaire, débarrassé de ses composants solubles dans l'eau, est dialysé à 4° contre de l'eau distillée pendant 48 h, puis lyophilisé. La poudre lyophilisée est remise en suspension dans un tampon phosphate 0.075 *M* de pH 7.3 à la concentration de 10 mg par ml. La suspension est soumise à une agitation magnétique pendant une nuit. On ajoute alors de la L-cystéine à la concentration finale de 0.075 *M* et le mélange est de nouveau agité pendant 2 h à 37°. On peut aussi utiliser comme agent réducteur le mercapto-éthanol, à raison de 2 μ l par mg de poudre lyophilisée.

Après 2 h de réduction, le mélange est centrifugé 20 min à 3000 tours/min. Le faible culot qui apparaît est éliminé. La partie solubilisée est dialysée trois jours contre de l'eau distillée à 4°, puis lyophilisée.

Fractionnement des produits de réduction. L'adialysable lyophilisé est mis en solution dans l'eau distillée à la concentration de 0.6% (p/v). On abaisse le pH de la

* Lactate de 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine.

solution à 2.3 avec HCl 1 *N*. Le précipité formé est séparé par centrifugation et remis en solution dans un volume égal de tampon phosphate 0.01 *M* de pH 8.0. On ajoute alors goutte à goutte, sous agitation continue, une solution aqueuse à 10% de bromure de cétyltriméthylammonium (Cetavlon), à raison de 1 ml de solution pour 20 ml de préparation. Un précipité se forme, que l'on sépare du surnageant par centrifugation; on le redissout dans le chlorure de sodium 2.5 *M* et le sel d'ammonium quaternaire est éliminé par l'addition de terre à foulon⁴. La solution est alors dialysée trois jours contre de l'eau distillée à 4°, puis lyophilisée.

La préparation ainsi obtenue contient les glycoprotéines acides encore souillées des acides nucléiques précipités par le Cetavlon.

Purification des glycoprotéines acides

Les produits libérés par réduction douce du mucus fibrillaire peuvent être soumis directement à l'électrophorèse préparative en film liquide, mais cette méthode est également mise en œuvre comme étape finale de purification des glycoprotéines acides isolées. L'opération est conduite en appareil Elphor-Vap, en utilisant un tampon Tris 0.8 *M* + acide citrique 0.008 *M* de pH 8.6 pour la chambre d'électrophorèse. Une différence de potentiel de 1750 V sous 160 mA donne un fractionnement satisfaisant avec une vitesse d'injection de la solution tampon de 74 ml/h. La température de la chambre d'électrophorèse est maintenue à 5°. La densité optique des fractions séparées est mesurée à 278 m μ et à 260 m μ . Les oses réducteurs libérés par hydrolyse sont dosés par la méthode à l'orcinol adaptée à l'autoanalyseur Technicon⁵.

Hydrolyse des glycoprotéines et fractionnement des glycopeptides

Les glycoprotéines acides isolées sont hydrolysées par la papaïne (48 h à 37° en tampon phosphate 0.01 *M* de pH 6.5), puis par la pronase (24 h à 37° en présence d'acétate de calcium 0.1 *M* à pH 7.3). Les glycopeptides obtenus sont étudiés par électrophorèse en agarose, en tampon véronal-HCl de pH 8.2 et de force ionique 0.05. Les diagrammes sont colorés par le réactif de Schiff après oxydation périodique et par le bleu de toluidine. Un fractionnement de l'hydrolysate est effectué selon la méthode préconisée par Whitehouse et Boström⁶ pour l'isolement des mucopolysaccharides sulfatés. On abaisse le pH de la solution à la valeur de 1.5 par addition de HCl 1 *N*. Un faible précipité apparaît, que l'on sépare par centrifugation et qui correspond aux acides nucléiques. On ajoute goutte à goutte, sous agitation continue, une solution de Rivanol à 10% dans l'eau distillée jusqu'à la concentration finale de 0.3% de Rivanol. Le mélange est conservé deux heures à 4°, et le précipité contenant les glycopeptides est centrifugé, puis remis en solution dans l'eau distillée. Le Rivanol est alors éliminé par le chlorure de sodium à la concentration finale de 5%, et les glycopeptides sont précipités par quatre volumes d'éthanol, lavés et repris dans une solution de chlorure de sodium à 0.8%. D'autre part, les glycopeptides solubles dans le Rivanol à pH 1.5 sont également précipités par l'éthanol, dans les mêmes conditions.

Spectrophotométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge des préparations obtenues sont effectués sur un mélange de bromure de potassium (300 mg) et de 2 mg de glycopeptide avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer, modèle 21.

Étude des oses libérés par hydrolyse

Les fractions glycoprotéiques (5 mg) sont hydrolysées par 2 ml d'acide chlorhydrique 1 N ou 2 N pendant 2 h à 100°.

Les hydrolysats sont lyophilisés puis étudiés en chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 2040 b dans le système *n*-butanol-pyridine-HCl 0.1 N (5:3:2) (bibl. 7). Les glucides libérés sont révélés par l'oxalate d'aniline.

Incorporation de radiosulfate dans la muqueuse bronchique humaine

Des biopsies de muqueuse bronchique prélevées au niveau de l'éperon de la bronche lobaire moyenne sont lavées dans une solution de ClNa à 0.8 g pour 100 ml, soigneusement découpées en très minces fragments que l'on place dans le milieu de Hanks*³ additionné de 150 μ C de sulfate marqué par le ³⁵S. Les fragments sont maintenus en survie sous agitation rotative douce à 37° pendant des temps variables de 120 à 390 min. Ils sont ensuite lavés par la solution de ClNa à 0.8 g pour 100 ml afin d'éliminer le sulfate libre en excès.

Pour l'étude histologique, les fragments tissulaires sont fixés par le formol Baker. Les coupes histologiques sont recouvertes d'une émulsion photographique pelliculaire (AR 10 Kodak). On procède au développement de l'émulsion après des temps d'exposition variables de 7 jours à un mois. L'identification des éléments morphologiques est effectuée soit par coloration au Bleu Alcian (pH 0.2) et au glychémalun de Mayer, soit par coloration au Bleu Alcian associé au réactif de Schiff après oxydation périodique.

Afin de préciser la nature des produits de sécrétion qui incorporent le radio-sulfate, les fragments tissulaires sont soumis à une hydrolyse par la papaïne, puis par la pronase, dans les conditions décrites plus haut. On ajoute à l'hydrolysats tissulaire une préparation de glycopeptides de mucus fibrillaire obtenue dans les mêmes conditions. L'ensemble est fractionné sur colonne de Biogel P 20 et les fractions éluées analysées par dosage des oses à l'orcinol, la radioactivité étant mesurée à l'aide d'un appareil de comptage à scintillation. Les glycopeptides isolés sont soumis à une étude électrophorétique en agarose de pH 8.2 avec autoradiographie.

RÉSULTATS

Électrophorèse préparative en film liquide

L'électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage sépare dans les produits de réduction douce du mucus fibrillaire de l'expectoration quatre groupes de composants. Vers la région cathodique du diagramme se localise l'ensemble des protéines du mucus bronchique, essentiellement d'origine glandulaire: la kallicréine, la transferrine bronchique et les γ_A -globulines, mais aussi d'origine cellulaire comme le lysozyme. A l'extrémité anodique, une fraction bien individualisée correspond à des acides nucléiques. La partie moyenne du diagramme se décompose en deux fractions distinctes, comme le montre la courbe de dosage des oses libérés par hydrolyse (Fig. 1).

La première fraction moyenne, riche en oses (zone ombrée des diagrammes), précipite à pH 2.3; reprise en électrophorèse en agarose, elle se colore intensément par le bleu de toluidine et plus faiblement par le réactif de Schiff après oxydation perio-

* Commercialisé par l'Institut Pasteur de Paris.

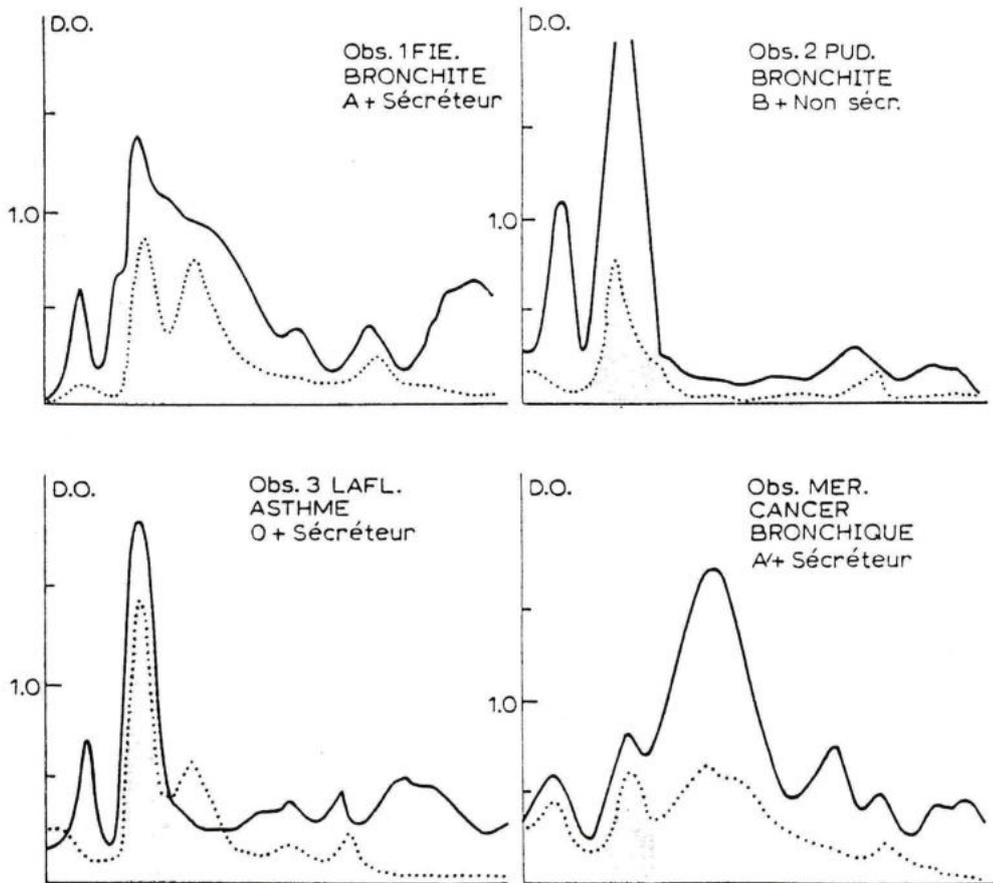


Fig. 1. Fractionnement des produits de réduction douce de mucus fibrillaires d'expectorations obtenues chez quatre malades. Les 48 échantillons séparés par électrophorèse préparative en film liquide à haut voltage (appareil Elphor-Vap) sont analysés par mesure des variations de densité optique à 260 $m\mu$ (courbes en traits pleins) et par dosage des oses à l'orcinol (courbes en traits pointillés). Le groupe des glycoprotéines de caractère acide est indiqué par la zone ombrée des diagrammes.

dique (PAS); la partie anodique de cette fraction est moins nettement caractérisée par la coloration PAS que sa partie cathodique. Toute la première fraction correspond aux glycoprotéines de caractère acide, encore souillées d'une trace de sérumalbumine.

La seconde fraction moyenne du diagramme d'électrophorèse préparative est également riche en oses; elle possède une activité très importante de substance de groupe sanguin et se révèle à la fois par l'Amidoschwarz et par la coloration PAS, mais ne se colore pas par le bleu de toluidine.

L'étude comparative des expectorations des quatre malades a donné les résultats suivants (Fig. 1). On reconnaît tout d'abord aisément les groupes essentiels caractéristiques des composants fibrillaires; dans tous les cas, sauf dans l'observation de cancer bronchique, le groupe des glycoprotéines de caractère acide représente la fraction majeure; dans le cas du sujet de groupe sanguin B non-sécréteur, cette fraction possède une importante activité Le^a . On remarque, d'autre part, l'importance variable de la fraction identifiée aux substances de groupe sanguin de caractère neutre (substances A et H).

La méthode utilisée permet donc une appréciation exacte de l'importance relative du groupe des glycoprotéines neutres et du groupe des glycoprotéines de caractère acide. Une étude plus approfondie reste bien entendu indispensable si l'on veut préciser l'intérêt sémiologique de cette méthode, qui apporte des renseignements nouveaux par rapport aux méthodes d'électrophorèse de zones (en agarose ou sur

papier), grâce à une analyse plus fidèle et plus individuelle des glycoprotéines spécifiques des sécrétions bronchiques.

Étude des glycoprotéines acides isolées

Les préparations isolées par fractionnement de l'adialysable du mucus fibrillaire réduit donnent, après purification en électrophorèse préparative en film liquide, des solutions opalescentes et de viscosité modérée. L'électrophorèse en agarose à pH 8.2 caractérise une fraction homogène, de mobilité comparable à celle des β -globulines du sérum humain. Cette mobilité, bien différente de celle observée en électrophorèse en film liquide (où ces glycoprotéines occupent une position voisine de la sérualbumine), démontre l'influence du gel d'agarose sur le déplacement. Ces glycoprotéines sont révélées par le réactif de Schiff après oxydation periodique; elles se colorent par le bleu de toluidine et donnent, dans la région anodique de la zone colorée, une métachromasie d'intensité variable.

Ultracentrifugation. Deux des préparations de glycoprotéines acides isolées, No. 3 (asthme) et No. 4 (cancer bronchique), ont été étudiées par ultracentrifugation en tampon phosphate de pH 7.1 à la concentration de 15 mg par ml. Quatre constituants ont été identifiés dans la préparation No. 3. L'un représente 46% de l'ensemble et sédimente à 20° avec une constante de 11.4. Deux composants, de constante de sédimentation $S_{20} = 8.2$ et 9.1, représentent respectivement 23.4 et 27.4% de la préparation. Un dernier composant mineur (3.2%) possède une constante de sédimentation légèrement plus faible ($S_{20} = 6.7$). Une hétérogénéité comparable est retrouvée dans l'analyse de la préparation No. 4: le composant majeur (77% de l'ensemble) possède une constante de sédimentation de 7.0, tandis que 19% de la préparation sédimentent plus rapidement, avec une constante $S_{20} = 11.6$; un composant mineur (4%), de plus faible taille moléculaire, est également caractérisé.

Les préparations de glycoprotéines acides isolées du mucus fibrillaire de l'expectoration, bien qu'homogènes en électrophorèse, correspondent donc en réalité à un groupe de molécules de tailles moléculaires différentes. Tous les procédés de fractionnement (électrophorèse préparative à différents pH, chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-200 avec recyclage ou en tampon urée) mis en œuvre pour tenter de séparer ces différents composants ont abouti à un échec. En particulier, l'ensemble de la préparation est exclu d'une colonne de Sephadex G-200.

Mise en évidence d'une activité de substance de groupe sanguin. Les glycoprotéines acides isolées du mucus fibrillaire chez les sujets sécréteurs conservent une activité variable de substance de groupe sanguin. Cette activité, mesurée par une méthode d'inhibition de l'hémagglutination spécifique, permet de neutraliser avec 156 μ g de préparation No. 1 (bronchite chronique) 1 ml d'immunsérum anti-A de titre 1/32; 72 μ g de préparation No. 3 (asthme) inhibent la même quantité d'immunsérum anti-H de même activité. Il faut au contraire 1.25 mg de préparation No. 4 (cancer bronchique) pour inhiber 1 ml de l'immunsérum anti-A, tandis que la préparation No. 2, obtenue chez un sujet de groupe B, mais non sécréteur, ne possède aucune activité inhibitrice. Cette préparation No. 2, riche en acide sialique, inhibe l'hémagglutination virale et possède une activité de substance de groupe Le^a.

Action de la neuraminidase. 30 mg de glycoprotéines acides sont purifiés dissous dans 5 ml de tampon acétate de calcium 0.01 M de pH 7.4 et hydrolysés à 37° par deux additions successives de 1 mg de pronase. L'hydrolyse est poursuivie pendant

48 h et l'hydrolysats est lyophilisé. L'étude électrophorétique en agarose à pH 8.2 révèle une fraction homogène colorée par le bleu de toluidine, ainsi que par le réactif de Schiff après oxydation periodique.

Pour certaines préparations, une nette différenciation apparaît dans la répartition des affinités tinctoriales, conduisant à un front anodique métachromatique, faiblement révélé par la réaction PAS, accolé à une région cathodique colorée en bleu par le bleu de toluidine et intensément révélée par la réaction PAS. Cet aspect est notamment observé sur la préparation No. 1, qui conserve d'autre part la quasi-totalité de sa coloration par le bleu de toluidine après hydrolyse par la neuraminidase de *Vibrio cholerae* (Fig. 2): les glycopeptides ne perdent donc pas leur caractère acide après action de la neuraminidase. D'autres préparations, au contraire, (substance Le^a de la préparation No. 2) ne sont plus que très faiblement colorées par le bleu de toluidine après traitement par la neuraminidase. Dans les deux cas, on constate, après action de la neuraminidase, une nette diminution de l'affinité tinctoriale pour le réactif de Schiff après oxydation periodique.

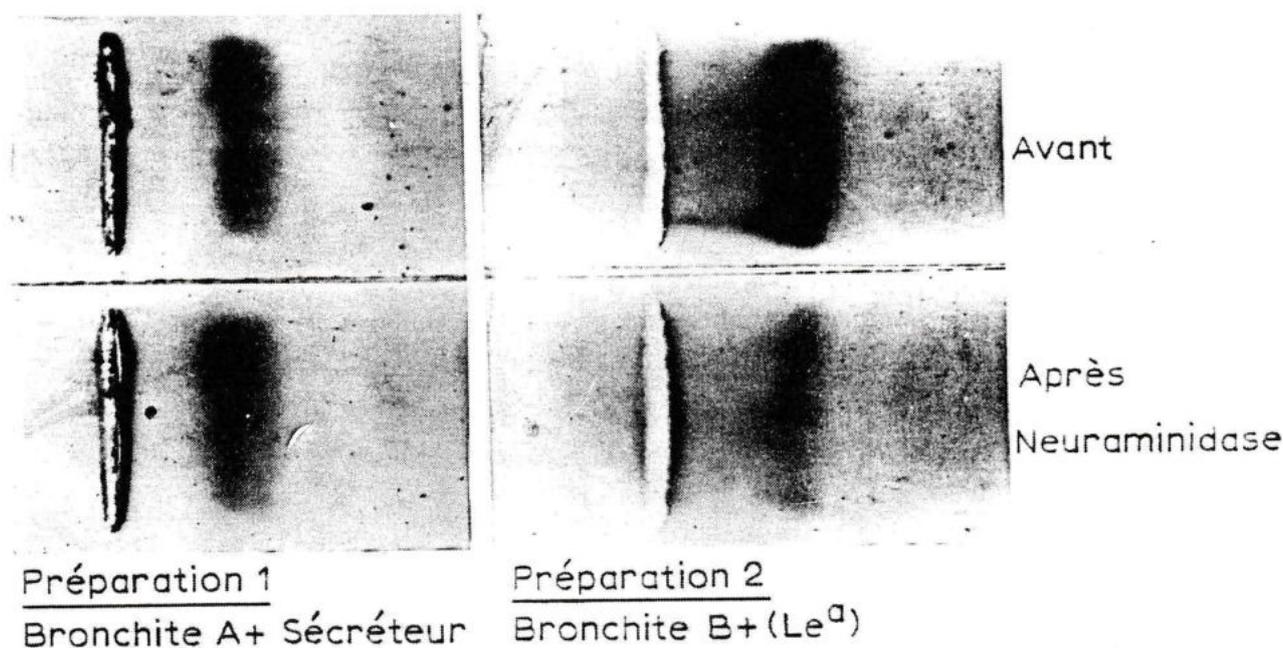


Fig. 2. Action de la neuraminidase sur l'affinité tinctoriale des glycoprotéines acides isolées pour le bleu de toluidine. Les deux préparations étudiées correspondent aux glycoprotéines acides des observations 1 et 2 de la Fig. 1.

Une proportion, variable selon les sujets, de glycopeptides sensibles à l'action de la neuraminidase est donc mise en évidence dans les hydrolysats pronasiques de glycoprotéines acides. Ces résultats confirment les données obtenues dans l'étude de la composition glucidique: on constate, en effet, que les préparations sensibles à l'action de la neuraminidase ont un rapport acide sialique/fucose généralement élevé et toujours supérieur à 1 (préparation No. 2), tandis qu'un rapport acide sialique/fucose faible (0.3 à 0.5) correspond à des glycoprotéines acides peu sensibles à l'action de la neuraminidase.

Ces résultats soulignent la parenté structurale des glycoprotéines des sécrétions bronchiques avec les substances de groupe sanguin. Le caractère acide peut être rattaché à l'existence de résidus d'acide sialique, libérés par hydrolyse acide douce; mais leur proportion variable est dans une certaine mesure en contradiction avec la con-

stance de l'acidité. Comme, d'autre part, l'hétérogénéité de coloration par l'acide periodique + réactif de Schiff et par les colorants basiques, comme le bleu de toluidine, suggère l'intervention d'un autre groupement fonctionnel acide, nous avons été amenés à rechercher l'existence, dans la copule polysaccharidique, de groupements sulfate, qui avaient déjà été caractérisés dans une préparation de glycoprotéines isolée du mucus fibrillaire de l'expectoration par d'autres méthodes de fractionnement².

Isolement des glycopeptides sulfatés

L'hydrolysats obtenu par action successive de la papaïne et de la pronase sur une préparation de glycoprotéines acides isolées du mucus bronchique a été fractionné selon la technique de Whitehouse et Boström⁵. Les *glycopeptides précipités par le Rivanol* à pH 1.5 sont homogènes en électrophorèse en agarose à pH 8.2. Colorés par le bleu de toluidine, avec lequel ils donnent une faible réaction métachromatique, ils ne sont pas révélés par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Les *glycopeptides solubles dans le Rivanol* à pH 1.5 migrent moins rapidement dans le gel d'agarose; ils se colorent faiblement par le bleu de toluidine mais sont intensément révélés par le réactif de Schiff après oxydation periodique. Deux groupes de glycopeptides sont donc séparés par fractionnement au Rivanol à pH 1.5. Les glycopeptides solubles dans le Rivanol sont sensibles à l'action de la neuraminidase, tandis que les glycopeptides précipités par le Rivanol conservent leur affinité pour le bleu de toluidine après action de cet enzyme.

Nous avons réalisé sur les glycopeptides "insolubles" une étude spectrophotométrique en infra-rouge: un pic bien individualisé, situé à 1240 cm^{-1} , traduit la vibration de la liaison S = O; un second élément caractéristique du spectre est représenté par la vibration des liaisons C-O-S, qui donne un pic visible à 820 cm^{-1} . Le spectre est donc tout à fait comparable à celui que l'on obtient avec le kérate-sulfate⁸ et correspond à une structure polysaccharidique sulfatée, dépourvue d'acide uronique.

Étude de l'incorporation de radiosulfate dans la muqueuse bronchique humaine

Il était intéressant de préciser la nature des éléments glandulaires de la muqueuse bronchique humaine où s'effectue la synthèse des glycoprotéines sulfatées. L'étude de ces glycoprotéines par coloration au bleu de toluidine et au réactif de Schiff après oxydation periodique ne permet pas de définir exactement la participation respective des résidus d'acide N-acétylneuraminique et des groupements sulfate dans l'affinité tinctoriale. C'est pourquoi nous avons eu recours à l'étude de l'incorporation de radiosulfate dans des fragments de biopsie bronchique. Grâce aux techniques histo-chimiques et autoradiographiques, on peut localiser très exactement les éléments cellulaires qui synthétisent les glycoprotéines sulfatées. L'hydrolyse enzymatique des fragments tissulaires libère ensuite les glycopeptides, qu'une chromatographie de gel-filtration et un fractionnement au Rivanol permettent d'isoler. L'identité de leur comportement électrophorétique avec celui des glycopeptides isolés de l'hydrolysats de mucus bronchique du même sujet est démontrée par autoradiographie.

Étude histologique. L'examen des coupes colorées par le Bleu Alcian (pH 0.2)-glychémalun, superposées à leurs autoradiographies (Fig. 3), traduit une incorporation très intense de radiosulfate au niveau de l'épithélium de surface et dans certains éléments des glandes mixtes situés dans la muqueuse et la sous-muqueuse. On retrouve



Fig. 3. Histo-autoradiographie colorée au glychémalun de la muqueuse bronchique humaine après incorporation *in vitro* de sulfate marqué par le ^{35}S .

On observe un intense noircissement de la pellicule photographique au niveau de l'épithélium de surface (1). Le canal excréteur (2) est identifié par sa structure bistratifiée, dont les noyaux cellulaires ont un aspect sombre. Dans la partie inférieure, on observe des zones radioactives de répartition inégale, dont certaines en forme de croissant (3).

également, dans certaines coupes intéressant les formations cartilagineuses des bronches, une fixation de radiosulfate par les chondrocytes; mais, pour des temps d'incubation de 2 ou 6 h, cette synthèse de chondroïtine-sulfate marqué reste relativement modérée. L'incorporation de radiosulfate est toujours beaucoup moins intense au niveau des chondrocytes qu'au niveau des éléments sécréteurs.

Si l'on analyse au faible grossissement ($\times 25$) les éléments morphologiques caractérisés dans la Fig. 3 après 6 h 30 min d'incubation en présence de radiosulfate, on observe une radioactivité très intense au niveau de l'épithélium de surface situé dans la partie supérieure du cliché. On retrouve dans la profondeur les éléments caractéristiques d'une glande tubulo-acineuse, avec son canal excréteur. Celui-ci apparaît bordé d'une couche cellulaire dont les noyaux, colorés par le glychémalun, expliquent le fin liseré noir observé, qui ne doit pas être confondu avec une région d'incorporation du radiosulfate.

Un examen pratiqué avec un plus fort grossissement confirme l'absence de

fixation sélective de sulfate dans les cellules bordant le canal excréteur. On observe au contraire des formations arrondies ou des croissants finement granuleux correspondant à des éléments glandulaires qui incorporent intensément le sulfate. Pour préciser la nature des produits élaborés par les différents éléments d'une glande mixte (tubules muqueux, acini séreux homogènes et bien arrondis, et acini séreux et muqueux possédant un croissant séreux habituellement décrit sous le nom de croissant de Gianuzzi), nous faisons l'étude comparative de la coupe histologique colorée par le réactif de Schiff après oxydation périodique (Fig. 4 A) et de l'autoradiographie correspondante

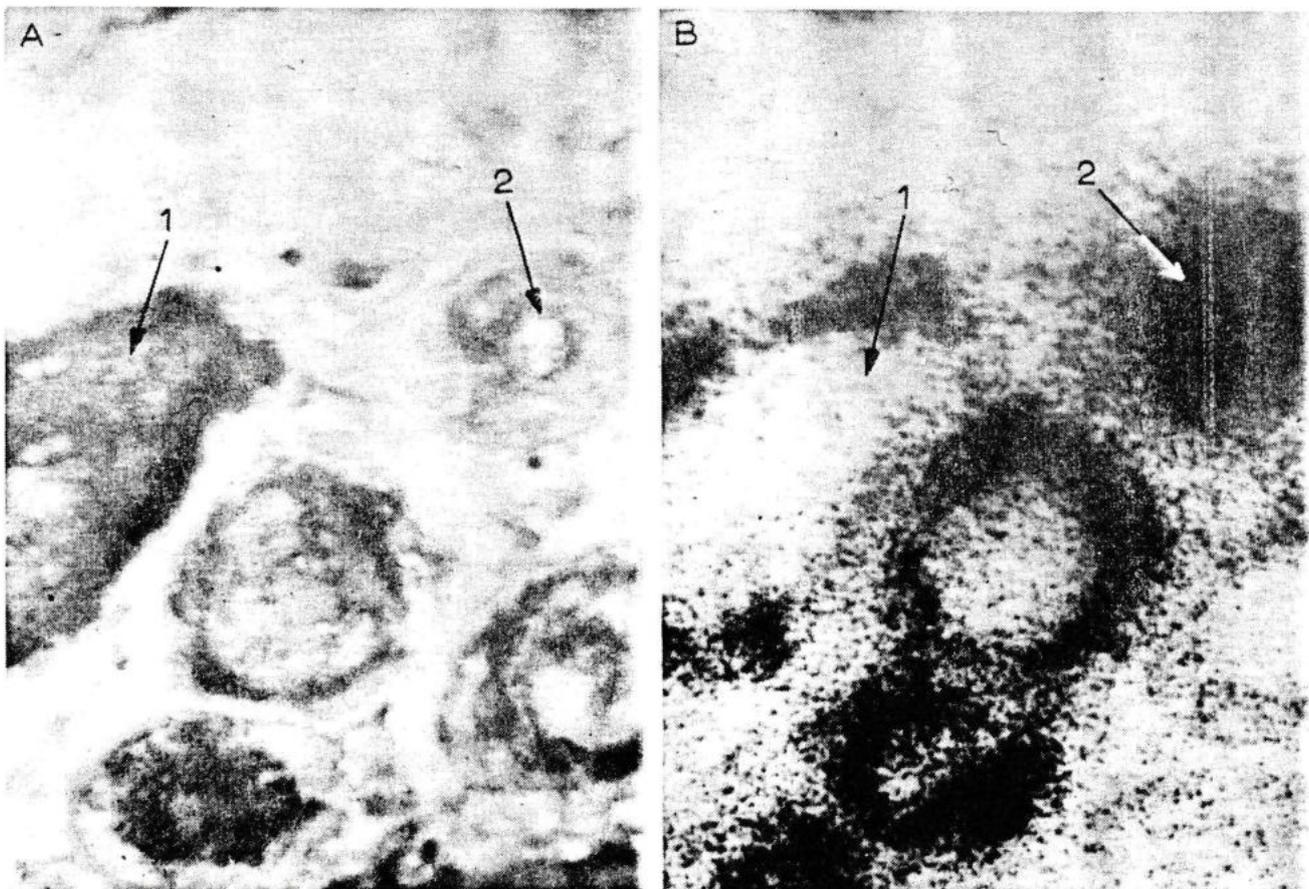


Fig. 4. La comparaison de la coupe histologique colorée par le Bleu Alcian-PAS (4 A) et de son autoradiographie (4 B) démontre l'intense incorporation de radiosulfate au niveau des acini séreux (2). Ces formations sont beaucoup moins colorées par le réactif de Schiff après oxydation périodique les acini muqueux (1).

(Fig. 4 B). Les cellules muqueuses donnent avec la réaction PAS une coloration diffuse, rouge intense (elles apparaissent en noir dans la Fig. 4 A); elles ne se colorent pas par le Bleu Alcian à pH 0.2 et ne fixent que très faiblement le sulfate. Au contraire, la double coloration Bleu Alcian-PAS fait apparaître dans certains tubules muqueux, au-dessus du noyau cellulaire, des traînées bleu-violet, qui correspondent parfois à une région d'incorporation de radiosulfate. Dans les cellules séreuses, on observe quelques granulations révélées par la réaction PAS et d'autres granulations colorées en rouge-violet par le Bleu Alcian+PAS; l'intense radioactivité au niveau de ces cellules séreuses se traduit par l'abondance des grains dans l'émulsion photographique (Fig. 4 B).

L'étude histologique et histo-radiographique nous amène à localiser au niveau des cellules séreuses des glandes mixtes et des cellules caliciformes de l'épithélium de

surface l'incorporation du groupement sulfate dans la structure des glycoprotéines élaborées.

Étude des sulfoglycopeptides marqués par le $^{35}\text{SO}_4^{--}$ isolés des fragments tissulaires

Une partie des fragments de muqueuse bronchique maintenus en survie en présence de radiosulfate est lavée abondamment avec une solution de ClNa à 0.8 g%, dénaturée par chauffage à 100° pendant 10 min et soumise à une hydrolyse par la papaïne, puis par la pronase, dans les conditions mises en œuvre pour la préparation des glycopeptides du mucus. On ajoute à cet hydrolysate de muqueuse bronchique un hydrolysate du mucus du même malade et l'ensemble est soumis à une chromatographie de gel-filtration sur colonne de Biogel P 20 équilibrée en eau distillée. Les fractions éluées sont analysées par dosage des oses à l'orcinol, la radioactivité étant mesurée à l'aide d'un appareil de comptage à scintillation (Fig. 5).

Le premier pic, qui correspond à des substances exclues de la colonne de Biogel P 20 et qui s'inscrit à la fois sur la courbe de radioactivité et sur la courbe du dosage des oses, est formé par des glycopeptides de poids moléculaire égal ou supérieur à 20000; cette fraction est recueillie et lyophilisée. Le second pic, élué beaucoup plus tardivement, ne s'inscrit que sur la courbe de radioactivité: il correspond à des précurseurs métaboliques et au sulfate libre, qui passe avec les sels minéraux. L'étude d'un mélange d'hydrolysate de mucus bronchique et de radiosulfate libre permet de démontrer que, dans les conditions expérimentales utilisées pour les hydrolyses enzymatiques, la séparation consécutive du radiosulfate et des glycopeptides par chromatographie sur colonne de Biogel P 20 est totale; aucune interaction n'est observée entre les glycopeptides et le radiosulfate libre.

La fraction exclue de la colonne de Biogel P 20 est étudiée en électrophorèse en agarose à pH 8.2. Les autoradiographies permettent de situer dans le diagramme obtenu par coloration au bleu de toluidine et au réactif de Schiff après oxydation périodique les composants marqués isolés des biopsies bronchiques. Deux fractions mineures révélées par le bleu de toluidine migrent très rapidement vers l'anode et sont faiblement radioactives. Une autre fraction colorée par le bleu de toluidine correspond par sa mobilité électrophorétique aux glycopeptides sulfatés du mucus bronchique: c'est elle qui représente le composant majeur révélé en autoradiographie. On caractérise enfin une dernière fraction, de mobilité électrophorétique légèrement plus faible, révélée par le PAS et, plus faiblement, par le bleu de toluidine, et qui est peu apparente en autoradiographie. Nous avons pu d'autre part vérifier que tous les glycopeptides marqués par le $^{35}\text{SO}_4^{--}$ étaient précipités par le Rivanol à pH 1.5 (Fig. 5).

Il y a donc une analogie étroite de taille moléculaire, de mobilité électrophorétique et de comportement dans le fractionnement au Rivanol entre les glycopeptides marqués isolés de la muqueuse bronchique et les sulfoglycopeptides provenant du mucus bronchique du même malade.

DISCUSSION

Les études histochimiques et l'analyse des produits de synthèse formés dans les fragments de biopsie bronchique en survie démontrent l'incorporation de sulfate inorganique dans la structure des chaînons polysaccharidiques de certaines glycoprotéines bronchiques. Ces glycoprotéines sulfatées sont présentes dans les structures

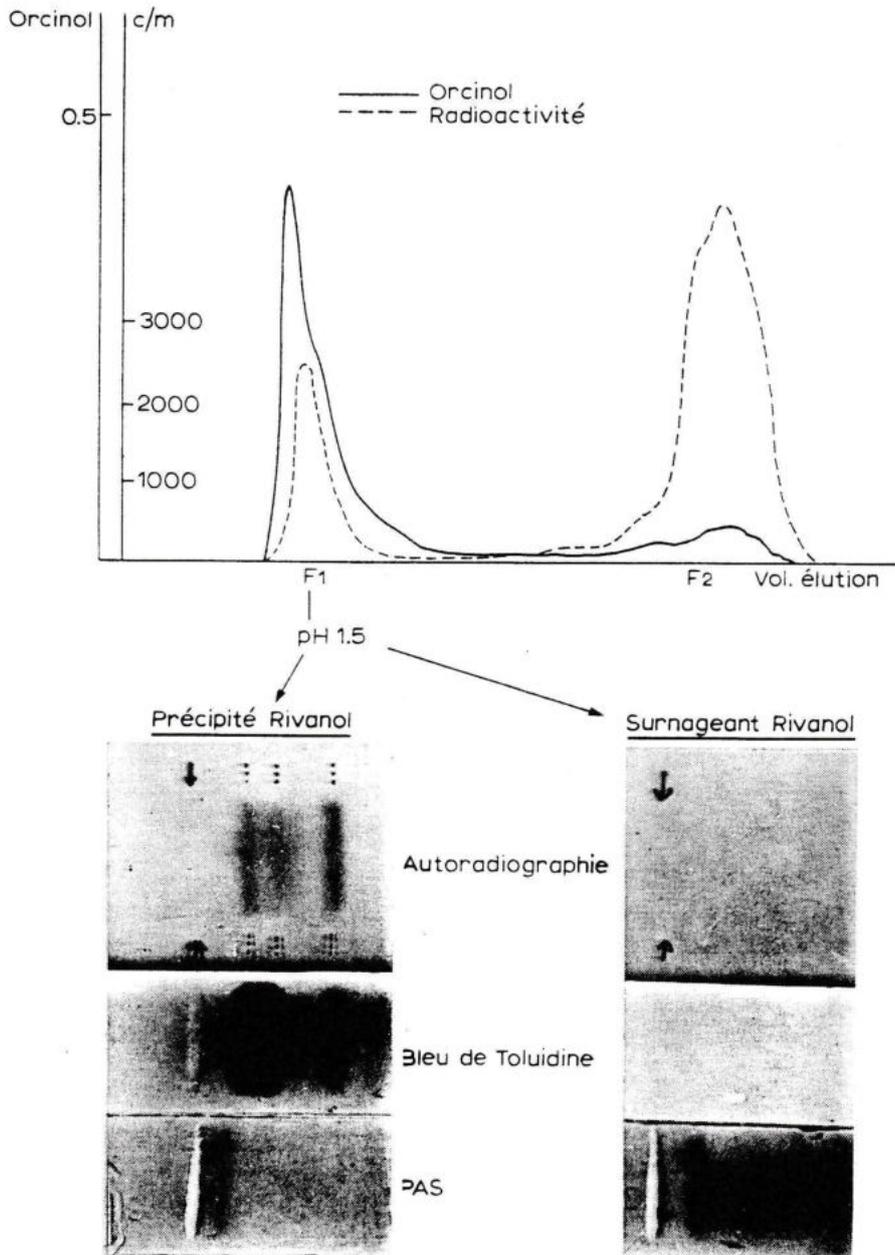


Fig. 5. Fractionnement sur colonne de Biogel P 20 d'un mélange d'hydrolysate de muqueuse bronchique maintenue en survie en présence de radiosulfate et d'un hydrolysate du mucus bronchique du même malade. La fraction F₁, exclue de la colonne de Biogel est fractionnée par le Rivanol à pH 1.5. Les glycopeptides sulfatés caractérisés en autoradioélectrophorèse sont totalement précipités dans ces conditions.

fibrillaires de l'expectoration, où elles accompagnent deux autres types de glycoprotéines d'origine glandulaire: les substances de groupe sanguin riches en fucose et une glycoprotéine dont le caractère acide se rattache essentiellement à la présence de résidus d'acide sialique en position terminale des chaînons polysidiques. Si les substances de groupes sanguins A ou H, riches en fucose, peuvent être aisément isolées des produits de réduction douce du mucus fibrillaire, les sialoglycoprotéines, les substances Le^a et les sulfoglycoprotéines sont obtenues sous forme d'un groupe de composants de taille moléculaire variable, mais toujours supérieure à 200 000. Le degré de sulfatation et la richesse en acide sialique conditionnent l'affinité tinctoriale variable pour les colorants basiques, comme le bleu de toluidine, et pour le réactif de Schiff après oxydation periodique. L'action de la neuraminidase sur ces glycoprotéines isolées permet de mettre en évidence des variations importantes dans le degré de

sulfatation ou de sialidation selon les mucus pathologiques étudiés et selon le caractère sécréteur ou non-sécréteur de l'individu. S'agit-il de produits sécrétés à des stades différents d'un même cycle de sécrétion ou, au contraire, de deux formes ultimes issues de voies métaboliques différentes orientées l'une vers la synthèse de sialoglycoprotéines, l'autre de sulfoglycoprotéines ?

La richesse des substances de groupe Le^a en acide sialique a déjà été rapportée par Caldwell et Pigman⁹ et par Gottschalk¹⁰. Ce caractère se retrouve dans l'analyse des sécrétions bronchiques d'un sujet B, non-sécréteur. D'autre part, la synthèse glandulaire de glycoprotéines sulfatées ne renfermant pas d'acide uronique a été décrite dans la glande sous-maxillaire du Chien¹¹ et dans la muqueuse intestinale bovine¹². Dans la muqueuse trachéo-bronchique du Rat, l'incorporation de radio-sulfate, étudiée *in vivo* par McCarthy et Reid¹³, se localise exclusivement au niveau de la trachée et des grosses bronches, mais n'intéresse pas les bronchioles. L'exploration histochimique, jointe à l'analyse des produits de synthèse tissulaire, nous permet de démontrer l'existence dans la muqueuse bronchique humaine d'un processus actif de sulfatation au niveau des cellules séreuses des glandes mixtes et dans les cellules caliciformes de l'épithélium de surface. Les tubules muqueux et les cellules muqueuses des acini séro-muqueux se colorent par le PAS et sont plus ou moins sensibles à l'action de la neuraminidase: ils semblent donc participer essentiellement à la sécrétion des sialoglycoprotéines. Les études réalisées en immunofluorescence permettent en outre de situer au niveau des cellules caliciformes de l'épithélium de surface et des glandes muqueuses ou des tubules muqueux des glandes mixtes la production des glycoprotéines possédant une importante activité de substance de groupe sanguin¹⁴. C'est au contraire dans les éléments séreux des glandes mixtes et dans la partie basale du cytoplasme des glandes muqueuses que se localise la fluorescence spécifique de la transferrine bronchique¹⁵. Ces résultats orientent donc plutôt vers une nette spécialisation des systèmes enzymatiques et des mécanismes de biosynthèse spécifique dans les diverses formations glandulaires de la muqueuse bronchique. La différenciation des équipements enzymatiques ne préjuge d'ailleurs pas d'une synthèse totalement indépendante des divers types de glycoprotéines bronchiques. Il faut en effet remarquer que, si les acini séreux se localisent essentiellement sur les parties distales des glandes mixtes, les tubules muqueux ramifiés, qui sécrètent les substances de groupe sanguin et les sialoglycoprotéines, constituent une partie du canal excréteur dans lequel s'engagent les produits élaborés par les acini séreux; de nombreux croissants de Gianuzzi sont présents dans la paroi des tubules muqueux ramifiés. On conçoit donc aisément que l'activité métabolique plus ou moins importante de chacune de ces formations influence directement la qualité du produit final déversé dans le canal excréteur de surface, revêtu de son épithélium non-sécréteur.

Les produits glandulaires s'enrichissent encore des substances issues de l'extravasation capillaire et des immunoglobulines synthétisées par les éléments lymphoplasmocytaires que l'on trouve en nappe ou en amas dans le chorion et la sous-muqueuse bronchique, entre les formations glandulaires. Dans la lumière bronchique, la sécrétion glandulaire reçoit encore les sulfoglycoprotéines formées au niveau de l'épithélium de surface, l'ensemble constituant un mucus de consistance visco-élastique, qui possède dans sa structure tous les éléments fonctionnels indispensables au rôle physiologique qui va lui incomber. Cette sécrétion, qui tapisse en permanence la muqueuse bronchique, peut exercer, grâce à ses qualités physico-chimiques, à ses

propriétés rhéologiques et à ses capacités d'hydratation, les fonctions d'épuration et d'hydratation permanente de l'air inspiré. Elle maintient en outre un milieu propice à la vie cellulaire, au déplacement et aux fonctions multiples (phagocytose, synthèse du lysozyme, etc.) des éléments mobiles placés à ce niveau au contact même du milieu extérieur.

Nous ne connaissons pas encore dans leur mécanisme intime les phénomènes de régulation indispensables au maintien d'un équilibre satisfaisant dans ce milieu bronchique d'origine et de composition si diverses. Les sulfoglycoprotéines représentent certainement, par le trajet important qu'elles doivent accomplir au sein des formations glandulaires et tubulaires, un élément fondamental dans la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique local. Les études de structure des glycopeptides libérés par hydrolyse enzymatique de ces glycoprotéines permettront sans doute de préciser leurs rapports avec les sialoglycoprotéines et les substances de groupe sanguin.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Mademoiselle C. Richet, collaboratrice-technique I.N.S.E.R.M.

Nous remercions vivement Messieurs les Professeurs Ch. Gernez-Rieux (Directeur de l'Institut Pasteur de Lille), A. Tacquet et C. Voisin pour les conseils et l'aide précieuse qu'ils nous ont apportés au cours de la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

Les glycoprotéines de caractère acide sont isolées par fractionnement des produits de réduction douce du mucus fibrillaire de l'expectoration. Selon l'état pathologique et le groupe sanguin du sujet (notamment le caractère de sécréteur ou non-sécréteur), ces glycoprotéines sont plus ou moins sensibles à l'action de la neuraminidase. Les études histochimiques et l'analyse des produits de synthèse formés dans les fragments de muqueuse bronchique en survie, démontrent l'incorporation de radio-sulfate au niveau des cellules séreuses des glandes mixtes et dans les cellules caliciformes de l'épithélium de surface. Les glycoprotéines sulfatées (dépourvues d'acide uronique) sont caractérisées dans le groupe des glycoprotéines acides du mucus fibrillaire de l'expectoration.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. HAVEZ, P. ROUSSEL, Y. MOSCHETTO, P. DEGAND ET G. BISERTE, *Compt. Rend.*, 260 (1965) 4853.
- 2 R. HAVEZ, P. ROUSSEL, P. DEGAND ET G. BISERTE, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 159 (1965) 1167.
- 3 J. H. HANKS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 71 (1949) 96.
- 4 J. E. SCOTT, in R. L. WHISTLER (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 5, Academic Press, New York, 1965, p. 38.
- 5 J. DEMAILLE, M. DAUTREVAUX, R. HAVEZ ET G. BISERTE, *Bull. Soc. Chim. France*, 12 (1965) 3506.
- 6 M. W. WHITEHOUSE ET M. BOSTRÖM, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961) 135.
- 7 R. BOURRILLON ET J. MICHON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 267.
- 8 V. PEDRINI, L. LENZI ET V. ZAMBOTTI, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110 (1962) 847.
- 9 R. C. CALDWELL ET W. PIGMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 101 (1965) 157.
- 10 A. GOTTSCHALK, *Glycoproteins, their Composition, Structure and Function*, B.B.A. Library, Vol. 5, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 468.

- 11 C. BIGNARDI, G. AURELI, C. BALDUINI ET A. A. CASTELLANI, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 17 (1964) 310.
- 12 S. INOUE ET Z. YOSIZAWA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117 (1966) 257.
- 13 C. MCCARTHY ET L. REID, *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 49 (1964) 81.
- 14 A. E. SZULMAN, *J. Exptl. Med.*, 111 (1960) 785.
- 15 P. MASSON, J. F. HEREMANS ET J. PRIGNOT, *Experientia*, 21 (1965) 604.

Clin. Chim. Acta, 17 (1967) 463-477