

BIOCHIMIE. — *Étude in vitro de l'incorporation de radiosulfate dans la muqueuse bronchique humaine.* Note de MM. **RAYMOND HAVEZ**, **MARC DEMINATTI**, **PHILIPPE ROUSSEL**, **PIERRE DEGAND**, **ALAIN RANDOUX** et **GÉRARD BISERTE**, transmise par M. Charles Gernez-Rieux.

Des fragments de muqueuse bronchique sont maintenus en survie à 37°C pendant des temps variables dans le milieu de Hanks additionné de sulfate marqué par le ³⁵S. Les études histochimiques et les autoradiographies démontrent une incorporation très intense de radiosulfate au niveau de l'épithélium de surface, dans les acini séreux et les croissants séreux des glandes mixtes. Après hydrolyse par la papaïne et par la pronase des fragments tissulaires, un glycopeptide radioactif est isolé; il a le comportement électrophorétique des sulfoglycopeptides du mucus fibrillaire de l'expectoration.

Des biopsies de muqueuse bronchique prélevées au niveau de l'éperon de la bronche lobaire moyenne (1) sont lavées dans le sérum physiologique, soigneusement découpées en très minces fragments qu'on place dans le milieu de Hanks (2) additionné de 150 µCi de sulfate marqué par le ³⁵S. Les fragments sont maintenus en survie sous agitation rotative douce à 37°C pendant des temps variables de 120 à 360 mn. Ils sont ensuite lavés par du sérum physiologique 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 radiographique 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 periodique.

L'examen des coupes colorées par le bleu Alcian-glychémalun et superposées à leurs autoradiographies, montre une incorporation très intense de radiosulfate au niveau de l'épithélium de surface et dans certains éléments des parties distales et des portions terminales des glandes mixtes tubuloacineuses. On trouve également sur certaines coupes intéressant les formations cartilagineuses des bronches une incorporation de radiosulfate par les chondrocytes, mais beaucoup moins importante que dans les formations glandulaires.

L'étude comparative des coupes histologiques colorées par le réactif de Schiff après oxydation periodique (fig. 1 A) et des autoradiographies correspondantes (fig. 1 B) permet de constater que les acini intensément colorés par le réactif de Schiff sont faiblement radioactifs. Certains acini sont caractérisés par la présence d'une zone très radioactive en forme de croissant. Les acini ou parties d'acini les plus radioactifs sont formés de cellules séreuses contenant dans leur région apicale des granulations colorées, en quantité variable selon les cellules. Au niveau de certaines

cellules séreuses, l'amas des grains photographiques se superpose exactement à ces granulations. Les cellules des parois des canaux excréteurs n'incorporent pas de radiosulfate dans les temps de survie mis en œuvre.

Afin de préciser la nature des produits de sécrétion qui incorporent le radiosulfate, nous avons mélangé les fragments tissulaires avec une préparation de mucus fibrillaire obtenue à partir de la sécrétion bronchique du même sujet : l'ensemble a été hydrolysé par la papaïne (48 h à 37°C en tampon phosphate 0,01 M de pH 6,5), puis par la pronase (24 h à 37°C en présence d'acétate de calcium 0,1 M à pH 7,3). L'hydrolysât obtenu

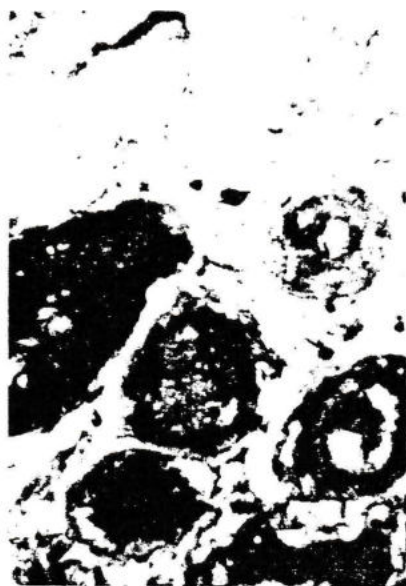


Fig. 1 A.



Fig. 1 B.

Fig. 1 A. — Étude des acini séreux et muqueux d'une glande mixte par coloration au bleu Alcian et à l'acide periodique-réactif de Schiff. La coloration rouge des cellules muqueuses se traduit en noir sur ce cliché. On remarque dans la partie supérieure droite de la coupe un acini séreux non coloré par le réactif de Schiff.

Fig. 1 B. — Autoradiographie de la coupe précédente. Les grains noirs de l'émulsion photographique se localisent au niveau des éléments séreux des glandes mixtes (comparer avec la figure 1 A).

a été fractionné sur colonne de Biogel P 20, et les fractions éluées ont été analysées par dosage des oses à l'orcinol, la radioactivité étant mesurée à l'aide d'un appareil de comptage à scintillation.

On peut isoler une fraction qui est exclue du gel et qui est à la fois radioactive et de nature glucidique. A partir de cette fraction, on obtient, par précipitation au Rivanol à pH 1,5, un sulfoglycopeptide qu'on étudie en électrophorèse en agarose de pH 8,2. L'autoradiographie caractérise trois fractions radioactives, chacune d'elles se localisant très exactement au niveau de zones colorables par le bleu de toluidine. Ces glycopeptides

exclus d'une colonne de Biogel P 20 ont un poids moléculaire supérieur à 20 000.

Un second pic de radioactivité est élué plus tardivement de la colonne de Biogel P 20. Il correspond à des précurseurs métaboliques et au sulfate libre, obtenu avec la fraction des sels minéraux. Une étude d'un mélange d'hydrolysats de mucus bronchique et de radiosulfate nous a permis de démontrer que, dans les conditions expérimentales utilisées, une séparation totale du radiosulfate libre et des glycopeptides est obtenue par chromatographie sur colonne de Biogel P 20. Aucune interaction n'est observée entre les glycopeptides et le radiosulfate libre. Cette observation confirme donc l'incorporation de sulfate dans la structure de glycopeptides sécrétés par les cellules séreuses et l'épithélium de surface de la muqueuse bronchique humaine.

Les conclusions tirées d'une étude limitée à des biopsies de muqueuse bronchique prélevées au niveau de l'éperon de la bronche lobaire moyenne ne préjugent pas cependant des variations possibles dans la distribution des éléments sécréteurs identifiés à d'autres étages de l'arbre trachéo-bronchique. On sait, en effet, que, chez le Rat, l'incorporation de sulfate, étudiée *in vivo* par Mc Carthy et Reid^(*), se localise exclusivement au niveau de la trachée et des grosses bronches, mais n'intéresse pas les bronchioles.

Nos résultats complètent et confirment la notion de la synthèse glandulaire d'une sulfoglycoprotéine, déjà identifiée et isolée des structures fibrillaires du mucus bronchique humain [(*)], (5)].

(*) Séance du 27 février 1967.

(1) Les prélèvements de muqueuse bronchique ont été effectués par les Professeurs C. Voisin et V. Macquet, dans le Service de Clinique pneumophysiologique de l'hôpital Calmette de Lille.

(2) J. H. HANKS, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71, 1949, p. 96.

(3) C. Mc CARTHY et L. REID, *Quart. J. Exp. Physiol.*, 49, 1964, p. 81.

(4) R. HAVEZ, P. ROUSSEL, P. DEGAND et G. BISERTE, *C. R. Soc. Biol.*, 159, 1965, p. 1167.

(5) A. RANDOUX, Les glycoprotéines sulfatées d'origine bronchique (Thèse, Médecine, Lille, 1966).

(Unité de Recherches de l'I.N.S.E.R.M.
sur la Biochimie des Protéines, Cité Hospitalière, Lille,
et Département des Applications biologiques
du Centre de Recherches nucléaires,
rue Loess, de Strasbourg-Cronembourg, Bas-Rhin.)