

## ÉTUDE DES GLYCOPROTÉINES BRONCHIQUES HUMAINES DE TYPE MUCIQUÉ OBTENUES PAR LAVAGE DE BRONCHES MACROSCOPIQUEMENT SAINES\*

JEAN-JACQUES LAFITTE, GENEVIÈVE LAMBLIN, MICHEL LHERMITTE, PASCALE HUMBERT,  
PIERRE DEGAND ET PHILIPPE ROUSSEL

*Unité de Recherches n° 16 de l'I.N.S.E.R.M. sur la Biochimie des Protéines,  
Groupe d'Étude des Glycoprotéines de Sécrétion, Place de Verdun, 59045 Lille (France)*

(Reçu le 26 août 1976; accepté après modification, le 18 novembre 1976)

### ABSTRACT

Bronchial mucins, prepared from washings performed in macroscopically healthy areas of bronchial mucosa from 6 adult individuals, are glycoproteins of acidic nature that contained both sialic acid residues and sulfate groups. The number of sialic acid residues was greater than the number of sulfate groups.

### SOMMAIRE

Les mucines bronchiques, préparées à partir de lavages bronchiques, dans des zones macroscopiquement saines de 6 adultes, sont des glycoprotéines qui possèdent un caractère acide et contiennent des résidus d'acide sialique et des restes de sulfate. Le nombre de résidus d'acide sialique est supérieur au nombre de restes de sulfate.

### INTRODUCTION

L'atteinte pathologique de l'arbre trachéo-bronchique peut, chez l'homme, se manifester cliniquement par la survenue d'une expectoration qui traduit l'hyper-sécrétion de la muqueuse bronchique. De nombreuses études ont été consacrées à l'étude du mucus qui est ainsi éliminé<sup>1,2</sup>. Celui-ci contient notamment des glycoprotéines du type des mucines (*O*-glycoprotéines) pouvant avoir des caractères d'acidité variés: certaines molécules sont pratiquement dépourvues de caractères acides<sup>3,4</sup>; d'autres, au contraire, contiennent des proportions plus ou moins importantes de résidus d'acide sialique ou de groupements de sulfate<sup>2</sup>.

À l'état physiologique, la sécrétion élaborée par la muqueuse bronchique est progressivement déglutic. Une étude préliminaire a montré qu'il était possible de préparer des glycoprotéines bronchiques à partir de lavages réalisés sous fibroscopie dans des zones où la muqueuse bronchique était macroscopiquement normale<sup>5</sup>.

\*Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un Contrat I.N.S.E.R.M.

La définition des principaux types de glycoprotéines bronchiques élaborés par une muqueuse macroscopiquement normale pourrait constituer un élément de référence très important pour l'étude des différentes mucines sécrétées au cours des affections bronchiques.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Lavages bronchiques.* — Les lavages bronchiques ont été réalisés, sous fibroscopie, dans des zones macroscopiquement saines, chez 6 sujets de groupe sanguin O, indemnes de tout antécédent de bronchite chronique et ayant reçu 30 min avant l'examen endoscopique une injection intramusculaire d'atropine (0,25 mg) et de chlorazépate de potassium (1-*H'*-benzo[*f*]3-carboxy-7-chloro-2,3-dihydro-2,2-dihydroxy-5-phényl-1,4-diazépine dipotassium) (20 mg). Les lavages ont été réalisés avec une solution physiologique de chlorure de sodium (500 ml) contenant de la *N*-acétylcystéine (4‰) et de la xylocaïne (0,4‰). Les produits des différents lavages ont ensuite été réunis, dialysés contre eau distillée et lyophilisés, pour constituer un pool de mucus bronchique (1,4 g).

*Reduction du pool de mucus bronchique.* — Le pool de mucus bronchique (1,4 g) est mis en suspension dans un tampon<sup>3</sup> phosphate de sodium 75mM (140 ml) de pH 7,3. Après 12 h d'agitation à 4°, la réduction du mucus est effectuée à l'aide de mercaptoéthanol utilisé à la concentration de 1 % (v/v) pendant 4 h à 37°. Une centrifugation permet de séparer un culot qui est éliminé et un surnageant qui est dialysé à 4°, contre de l'eau distillée pendant 4 jours, puis qui est lyophilisé. On obtient ainsi le mucus réduit.

*Chromatographie sur colonne d'Ecteola-cellulose.* — Le mucus réduit (740 mg) est dissous dans une solution de NaCl 0,1M (15 ml) et déposé sur une colonne d'Ecteola-cellulose (3 × 30 cm) équilibrée dans la même solution. La colonne est successivement éluée par la solution d'équilibre NaCl 0,1M, puis par une solution NaCl 0,1M-HCl 0,01M, puis par un gradient continu de NaCl de 0,1 à 0,7M contenant HCl 0,01M (1500 ml) et enfin par une solution NaCl M-HCl 0,01M. On recueille des fractions de 10 ml dans lesquelles on mesure l'absorbance à 260 nm, ainsi que la teneur en oses combinés, grâce à une méthode automatique à l'orcinoïl<sup>6</sup>. Les différentes fractions contenant des oses combinés sont dialysées et lyophilisées.

*Chromatographie sur colonne de Sepharose 4 B.* — Les fractions séparées sur colonne d'Ecteola-cellulose sont soumises à une chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sepharose 4 B (2,5 × 53 cm) équilibrée dans un tampon de pH 8,0 (Tris 0,1M-NaCl 0,2M). On recueille des fractions de 5 ml qu'on analyse comme précédemment. Les fractions glycoprotéiques purifiées sont dialysées et lyophilisées.

*Étude électrophorétique en agarose.* — Les études électrophorétiques sont réalisées en agarose avec un tampon<sup>3</sup> véronal de sodium de pH 8,2. Les lames sont fixées à l'aide d'un mélange chloroforme-éthanol-acide acétique (3:6:1) pendant 2 h. Les lames sont ensuite colorées par l'Amidoschwarz, le réactif de Schiff après oxydation périodique ou le Bieù de Toluidine<sup>7</sup>.

*Composition chimique.* — La composition en acides aminés est déterminée sur un analyseur Multichrom B Beckman. Le gradient utilisé permet la séparation des acides aminés et des osamines sur une seule colonne. Les préparations étudiées sont, au préalable, soumises à une hydrolyse, en tube scellé sous vide, par HCl 5,6M pendant 24 h à 110°.

La composition en sucres est effectuée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et per(triméthylsilylation), selon une légère modification<sup>8</sup> de la technique de Reinhold<sup>9</sup>. Les colonnes utilisées (0,3 × 150 cm) contiennent 3% d'OV 17 sur du Chromosorb WAW (80–100 mesh, Supelco).

Les dosages d'acide sialique et de groupements de sulfate ont été réalisés selon les méthodes précédemment indiquées<sup>8</sup>.

## RÉSULTATS

*Préparation du mucus réduit à partir d'un pool de lavages bronchiques.* — Les lavages bronchiques réalisés chez 6 sujets de groupe sanguin O sont réunis en pool, dialysés et lyophilisés (1,4 g). Ce pool est soumis à une réduction par le mercapto-éthanol qui permet d'obtenir 760 mg d'un matériel, soluble dans l'eau et non dialysable, qui constitue le mucus réduit. L'étude électrophorétique du mucus réduit montre qu'il comprend des constituants de mobilité anodique supérieure à celle de l'albumine et qui sont uniquement révélés par le Bleu de Toluidine, une fraction de mobilité analogue à la sérualbumine uniquement révélée par l'Amidoschwarz et un mélange de constituants de mobilité  $\alpha$  et  $\beta$  révélés par l'Amidoschwarz, le réactif de Schiff après oxydation périodique et faiblement le Bleu de Toluidine (Fig. 1).

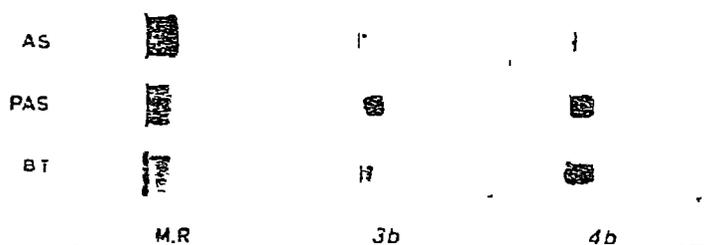


Fig. 1. Étude électrophorétique en agarose à pH 8,2 du mucus réduit (M.R.) et des fractions glycoprotéiques 3b et 4b. Les lames sont révélées par l'Amidoschwarz (AS), le réactif de Schiff après oxydation périodique (PAS) et le Bleu de Toluidine (BT).

*Isolement des glycoprotéines bronchiques.* — Le mucus réduit est soumis à une chromatographie d'échange ionique sur colonne d'Ecetola-cellulose, éluée par des solutions de molarité croissante en chlorure de sodium (Fig. 2). On peut ainsi séparer quatre fractions. Les constituants élués par le gradient de chlorure de sodium forment, sur la courbe du dosage des oses combinés, un pic très étalé qui est arbitrairement découpé en deux fractions 3 et 4 et dont la traînée n'est pas retenue (Fig. 2). Les 4

fractions ainsi séparées sont dialysées et lyophilisées (1, 205 mg; 2, 24 mg; 3, 22 mg; 4, 14 mg). Après élution par le gradient de chlorure de sodium, la colonne est éluée par une solution NaCl 0,1M-HCl 0,01M qui ne permet d'obtenir que des traces de matériel réagissant avec l'orcinol.

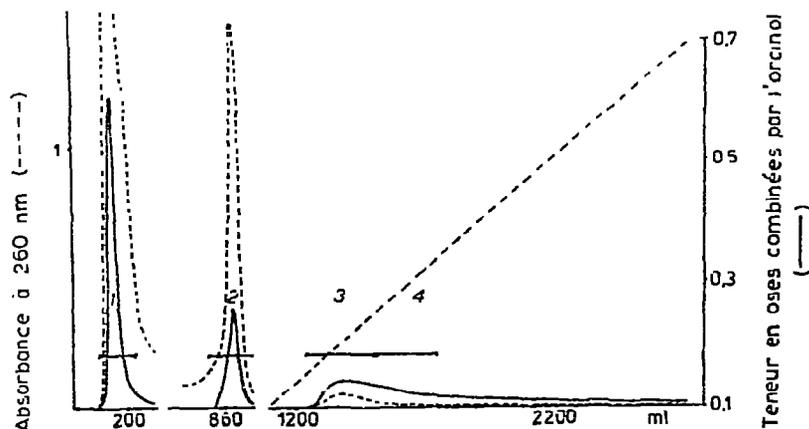


Fig. 2. Chromatographie du mucus bronchique réduit sur colonne d'Ecteola-cellulose ( $3 \times 30$  cm). L'élution est conduite à l'aide de NaCl 0,1M (500 ml), de NaCl 0,1M-HCl 0,01M (700 ml), et d'un gradient de NaCl 0,1-0,7M contenant HCl 0,01M (1500 ml).

TABLEAU I

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES FRACTIONS GLYCOPROTÉIQUES 3b ET 4b<sup>a</sup>

Acides aminés	Fraction 3b		Fraction 4b	
	Résidus/ 100 résidus	$\mu\text{Mol/g}^a$	Résidus/ 100 résidus	$\mu\text{Mol/g}^a$
Acide aspartique	2,67	53,2	3,22	55,9
Threonine	27,54	548,2	23,55	408,5
Sérine	18,57	369,7	18,69	324,2
Acide glutamique	3,89	77,4	4,32	75,0
Proline	14,75	293,6	12,52	217,1
Glycine	6,54	130,1	8,65	150,1
Alanine	8,23	163,8	8,16	141,5
Vaine	3,96	78,9	4,45	77,2
$\frac{1}{2}$ Cystine	0,6	12,0		Traces
Méthionine	0,76	15,2	1,09	18,9
Isoleucine	2,11	42,1	2,15	37,3
Leucine	2,3	45,8	2,84	49,3
Tyrosine	1,11	21,8	1,4	24,3
Phénylalanine	1,23	24,4	1,25	21,7
Lysine	2,23	44,3	3,11	54,0
Histidine	1,53	30,5	2,71	47,0
Arginine	2,00	39,8	1,87	32,5

<sup>a</sup>Poids sec.

TABLEAU II

COMPOSITION CHIMIQUE DES FRACTIONS 3b ET 4b<sup>a</sup>

Residus	Fraction 3b		Fraction 4b	
	%	$\mu\text{Mol/g}$	%	$\mu\text{Mol/g}$
Acides aminés	19,53	1 990,8	17,06	1 734,5
Fucose	8,4	510	9,3	565
Galactose	20,3	1 130	20,8	1 155
N-Acétyleglucosamine	11,9	540	14,2	640
N-Acétylegalactosamine	16,5	745	12,7	575
Acide N-acétylneuraminique	13,3	430	11,2	360
Sulfate	0,8	100	2,0	245
Fuc + Gal + GalNAc + GlcNAc + SA/GalNAc		4,5		5,7

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en % du poids sec et en  $\mu\text{mol}$  par g de poids sec.

Chacune des quatre fractions (1, 2, 3, 4) est ensuite soumise à une chromatographie sur colonne de Sépharose 4 B (Fig. 3). Les différentes fractions ainsi obtenues à partir de 1 (50 mg), 2 (24 mg), 3 (22 mg) et 4 (14 mg) sont dialysées et lyophilisées: 1a, 0,8 mg; 1c, 34,5 mg; 2a, 0,15 mg; 2b, 2,25 mg; 2c, 1,85 mg; 2d, 1,65 mg; 3a, traces; 3b, 7,9 mg; 3c, 1,2 mg; 3d, 0,85 mg; 4a, 0,2 mg; 4b, 5,6 mg; 4c, 1,65 mg et 4d, 0,8 mg.

Les deux principales fractions glycoprotéiques (3b et 4b), absorbant très peu à 260 nm, peuvent correspondre à des mucines. En électrophorèse en agarose, les fractions 3b et 4b sont bien colorées par le réactif de Schiff après oxydation périodique. La fraction 3b est très faiblement colorée par l'Amidoschwarz. La fraction 4b est mieux révélée par le Bleu de Toluidine que la fraction 3b (Fig. 1).

L'étude de la composition chimique de ces deux fractions est rapportée dans les Tableaux I et II.

## DISCUSSION

La sécrétion bronchique éliminée par certains malades atteints de bronchite chronique contient des glycoprotéines non retenues sur une colonne d'Ecteolacellulose équilibrée dans une solution de chlorure de sodium 0,1M et qui ont été qualifiées de glycoprotéines neutres<sup>3,4</sup>.

Une étude préliminaire réalisée sur un pool de lavages bronchiques pratiqués chez 5 adultes dans des zones macroscopiquement saines, a révélé l'absence de mucines neutres<sup>5</sup>. L'étude actuelle réalisée sur un nouveau pool de lavages bronchiques provenant de 6 adultes de groupe sanguin O dans des zones macroscopiquement saines, confirme absolument la première étude.

On peut certainement émettre des critiques sur le caractère parfaitement physiologique de la sécrétion bronchique obtenue par lavage. De nombreux types cellulaires concourent à l'élaboration du mucus bronchique et on ne sait pas actuellement si la technique de lavage n'est pas capable de stimuler la sécrétion de certains

types cellulaires au détriment d'autres. Cependant, pour imparfaite qu'elle soit, cette technique représente l'une des rares voies d'approche de la *sécrétion bronchique humaine normale*.

Les mucines bronchiques obtenues à partir de liquides de lavage constituent une population de molécules acides, essentiellement représentées par les fractions *3b* et *4b* qui ont été arbitrairement séparées (Fig. 3).

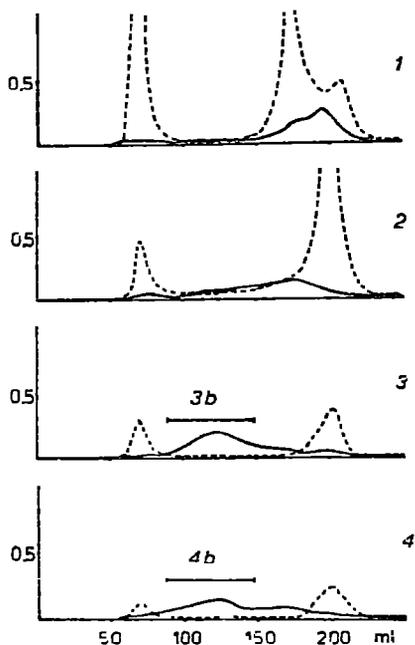


Fig. 3. Étude chromatographique sur colonne de Sépharose 4B ( $2,5 \times 53$  cm) des 4 fractions obtenues par chromatographie sur Ecteola-cellulose du pool de mucus réduit. Dans l'éluat, on mesure l'absorbance à 260 nm (---) et la teneur en oses combinés (—). Chacun des éluats correspondant aux fractions 2, 3 et 4, est découpé en 4 fractions (*a* : de 65 à 85 ml; *b* : de 90 à 145 ml; *c* : de 150 à 165 ml; et *d* : de 170 à 220 ml). L'éluat correspondant à la fraction 1 n'a été découpé qu'en deux fractions (*a* : de 65 à 90 ml; *c* : de 145 à 220 ml).

Dans la composition chimique de ces glycoprotéines acides, on retrouve tous les constituants qui ont été identifiés dans les mucines bronchiques isolées à partir de l'expectoration. On retrouve ainsi la richesse caractéristique de la partie polypeptidique en acides aminés hydroxylés. Pour les mucines isolées de l'expectoration, ces acides aminés constituent des points d'attache pour les chaînes glycaniques par l'intermédiaire de liaison du type 3-*O*-(2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-sérine ou -thréonine<sup>8,10</sup>.

Si on admet pour ces glycoprotéines bronchiques isolées par lavage chez des sujets de groupe sanguin O que les résidus de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose sont tous engagés dans des liaisons glycanne-protéine de type *O*-glycosyle, la valeur du rapport molaire (galactose + fucose + *N*-acétylhexosamines + acide sialique)/*N*-acétyl-

galactosamine représente une estimation de la longueur moyenne des chaînes glycaniques de ces molécules. La valeur de ce rapport est de 4,5 pour la fraction 3b et de 5,7 pour la fraction 4b. On peut aussi constater qu'entre les fractions 4b et 3b, il y a une évolution parallèle du nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés (Tableaux I et II).

En outre, dans les fractions 3b et 4b, le nombre de résidus d'acide sialique est plus grand que celui des groupements de sulfate. Toutefois, la proportion de groupements de sulfate augmente sensiblement dans la fraction 4b par rapport à la fraction 3b (Tableau II).

Ces différentes constatations suggèrent que, dans nos conditions expérimentales, les glycoprotéines bronchiques obtenues chez l'adulte par lavage bronchique, dans des zones macroscopiquement saines, représentent une population de molécules contenant plus de résidus d'acide sialique que de restes de sulfate et dont la longueur moyenne des chaînes glycaniques pourrait être de 4 à 6 sucres.

On peut remarquer à titre comparatif que, pour des glycoprotéines bronchiques isolées chez un enfant de groupe sanguin O, atteint de mucoviscidose<sup>8</sup>, la proportion de groupements de sulfate est plus grande que celle des résidus d'acide sialique et le rapport (galactose + fucose + N-acétylhexosamines + acide sialique)/N-acétylgalactosamine est voisin de 10.

Il est actuellement difficile de savoir si de telles différences correspondent à des modifications des processus de biosynthèse des glycoprotéines au cours de certaines bronchopathies ou à des différences dans la répartition des différents types cellulaires qui synthétisent les glycoprotéines bronchiques.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame M. Luyckx et Mademoiselle M. C. Tirlemont pour leur collaboration technique au cours de la réalisation de ce travail.

#### RÉFÉRENCES

- 1 R. HAVEZ, P. ROUSSEL, P. DEGAND ET G. LAMBLIN, *Exp. Arn. Biochim. Med.*, 32 (1973) 121-148.
- 2 T. F. BOAT ET L. W. MATTHEWS, dans M. J. DULFANO (Ed.), *Sputum*, Thomas, Springfield (Illinois), 1973, pp. 243-274.
- 3 G. LAMBLIN, M. LHERMITTE, P. DEGAND, Y. H. SERGEANT ET P. ROUSSEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 322 (1973) 372-382.
- 4 M. LHERMITTE, G. LAMBLIN, J. J. LAFITTE, J. ROUSSEAU, P. DEGAND ET P. ROUSSEL, *Biochimie*, 58 (1976) 367-372.
- 5 J. J. LAFITTE, M. LHERMITTE, G. LAMBLIN, B. DOUAY, P. DEGAND ET P. ROUSSEL, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 281 (1975) 1901-1904.
- 6 J. DEMAÏLE, M. DAUTREVAUX, R. HAVEZ ET G. BISERTE, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1965) 3506-3511.
- 7 R. HAVEZ, P. ROUSSEL, P. DEGAND ET G. BISERTE, *Clin. Chim. Acta*, 17 (1967) 281-295.
- 8 P. ROUSSEL, G. LAMBLIN, P. DEGAND, E. WALKER-NASIR ET R. W. JEANLOZ, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 2114-2122.
- 9 V. N. REINHOLD, *Methods Enzymol.*, 25 (1972) 244-249.
- 10 R. HAVEZ, P. ROUSSEL, P. DEGAND, Y. DELMAS-MARSALET ET G. BISERTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 245-259.