

## **Diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines et défense antimicrobienne de la muqueuse bronchique**

---

**Geneviève Lamblin  
Michel Lhermitte  
André Klein  
Jean-Marc Perini  
Philippe Roussel**

---

Les mucines bronchiques humaines forment une vaste famille de glycoprotéines synthétisées par la muqueuse bronchique. La diversité de leur partie peptidique (apomucines) résulte de l'expression de plusieurs gènes. Cette diversité est cependant considérablement amplifiée par les phénomènes post-traductionnels de O-glycosylation. La partie glycanique des mucines, qui correspond à 80 % de la masse moléculaire de ces molécules, est en effet formée de centaines de chaînes glycaniques différentes. Cette mosaïque de structures glycaniques permet la reconnaissance des micro-organismes inhalés, reconnaissance qui est sans doute le préalable indispensable à leur élimination par le système mucociliaire. La diversité glycanique des mucines constitue ainsi un élément fondamental dans la défense de la muqueuse trachéo-bronchique.

---

### ADRESSE

---

G. Lamblin : directeur de recherche à l'Inserm.  
M. Lhermitte : professeur de toxicologie.  
A. Klein : MCU-PH de biochimie.  
J.M. Perini : MCU-PH de biochimie.  
P. Roussel : PU-PH de biochimie. Inserm  
U. 16, place de Verdun, 59045 Lille,  
France.

m/s n° 10, vol. 7, décembre 91

**L**es sécrétions trachéo-bronchiques, qui forment le mucus bronchique, représentent un élément essentiel du système mucociliaire qui protège la muqueuse de l'appareil respiratoire et qui permet l'évacuation des particules et des micro-organismes inhalés.

Les mucines bronchiques, glycoprotéines très riches en sucres, responsables en grande partie des propriétés rhéologiques du mucus, en sont les principaux constituants. Ces mucines,

synthétisées par les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et par les cellules muqueuses des glandes sous-muqueuses, forment un groupe de glycoprotéines complexes et polydispersées dont la masse moléculaire est comprise entre quelques centaines de mille et plus d'un million de daltons [1]. L'origine de cette diversité, qui est sans doute une propriété générale des mucines, a suscité pendant longtemps de nombreuses controverses.

Cependant, des progrès importants

## RÉFÉRENCES

1. Roussel P, Lamblin G, Lhermitte M, *et al.* The complexity of mucins. *Biochimie* 1988 ; 70 : 1471-82.
2. Slayter HS, Lamblin G, Le Treut A, *et al.* Complex structure of human bronchial mucus glycoprotein. *Eur J Biochem* 1984 ; 142 : 209-18.
3. Marianne T, Perini JM, Lafitte JJ, *et al.* Peptides of human bronchial mucus glycoproteins : size determination by electron microscopy and by biosynthetic experiments. *Biochem J* 1987 ; 248 : 189-95.
4. Perini JM, Vandamme-Cubadda N, Aubert JP, *et al.* Multiple apomucin translation products from human respiratory mucosa mRNA. *Eur J Biochem* 1991 ; 196 : 321-8.
5. Carlson DM. Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J Biol Chem* 1968 ; 243 : 616-26.
6. Lamblin G, Lhermitte M, Boersma A, Roussel P, Reinhold V. Oligosaccharides of human bronchial glycoproteins : neutral di- and trisaccharides isolated from a patient suffering from chronic bronchitis. *J Biol Chem* 1980 ; 255 : 4595-8.
7. Roussel P, Lamblin G, Degand P, Walker-Nasir E, Jeanloz RW. Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J Biol Chem* 1975 ; 250 : 2214-22.
8. Lamblin G, Boersma A, Klein A, Roussel P, Van Halbeek H, Vliegthart JFG. Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 9061-8.
9. Klein A, Lamblin G, Lhermitte M, *et al.* 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 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* 1988 ; 171 : 631-42.
10. Hounsell EF, Feizi T. Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med Biol* 1982 ; 60 : 227-36.
11. McGuire EJ, Roseman S. Enzymatic synthesis of the protein-hexosamine linkage in sheep submaxillary mucin. *J Biol Chem* 1967 ; 242 : 3745-55.
12. Carraway KL, Hull SR. O-glycosylation pathway for mucin-type glycoproteins. *Bio Essays* 1989 ; 10 : 117-21.

ont été réalisés ces dix dernières années, grâce à l'utilisation de la microscopie électronique pour la visualisation des mucines et aux développements de la génétique moléculaire. Aujourd'hui, plusieurs arguments démontrent que les mucines bronchiques humaines appartiennent à une vaste famille de glycoprotéines dont les peptides, ou apomucines, sont très divers.

(1) L'utilisation de la microscopie électronique a permis d'observer que les mucines bronchiques humaines se présentaient comme un ensemble de filaments d'apparence flexible, dont la taille varie entre 400 nm et plus de 1 000 nm [2].

(2) Au cours d'expériences de culture de fragments de muqueuse bronchique, l'utilisation d'anticorps préparés contre des épitopes peptidiques de mucines bronchiques a permis de mettre en évidence toute une série de précurseurs peptidiques de masses moléculaires comprises entre 100 et 400 kDa [3].

(3) Des expériences de traduction *in vitro*, réalisées avec des préparations d'ARNm de muqueuse bronchique humaine, ont montré que les apomucines ainsi produites correspondaient à une large famille de protéines dont les masses moléculaires sont comprises entre 100 et plus de 400 kDa [4].

(4) Enfin le clonage et le séquençage d'un nombre croissant d'ADNc de mucines bronchiques, correspondant à des gènes différents, indiquent clairement que les mucines respiratoires humaines possèdent une grande diversité dans leur partie peptidique (Voir l'article de N. Porchet, *et al.*, p. 1024 de ce numéro).

Ainsi la diversité des mucines bronchiques humaines, comme probablement celle de nombreuses autres mucines, résulte d'abord de l'existence de plusieurs gènes et de leur mode d'expression. Cependant la partie peptidique de ces molécules n'en représente que 20 %. La synthèse des 80 % restants est liée à des réactions post-traductionnelles (O-

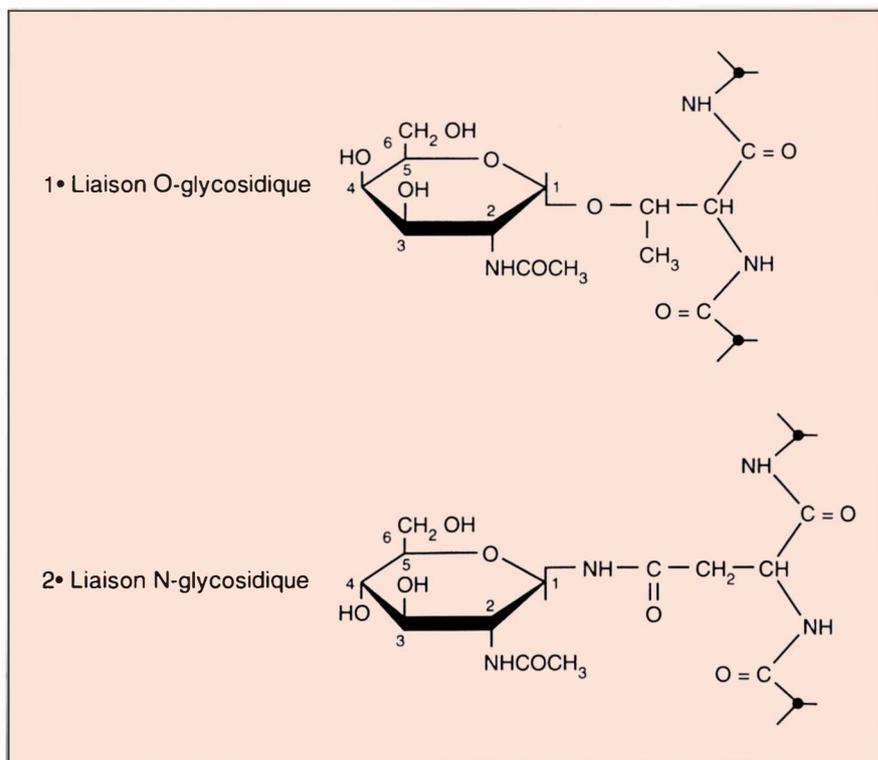


Figure 1. **Liaisons glycanne-protéine de type O-glycosidique [1] et de type N-glycosidique [2].**

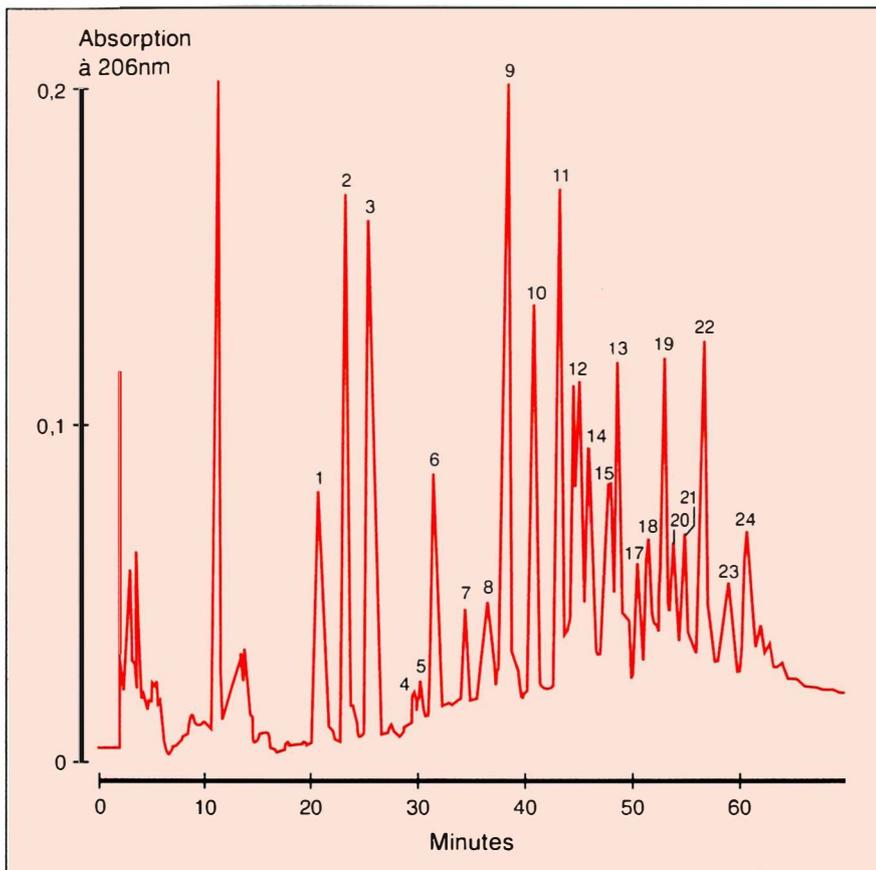


Figure 2. **Fractionnement en HPLC d'un ensemble d'oligosaccharides neutres illustrant la diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques.** Il s'agit des oligosaccharides neutres les plus courts — qui ont une longueur moyenne de quatre sucres : si les six premiers pics correspondent chacun à un seul oligosaccharide, les pics suivants peuvent correspondre à un mélange de deux à quatre oligosaccharides différents.

glycosylation, N-glycosylation, sulfatation...).

Au cours de cette revue générale, nous voudrions montrer que les phénomènes post-traductionnels, notamment la O-glycosylation, amplifient considérablement la diversité de la famille des mucines et qu'ils jouent sans doute un rôle important dans la fonction biologique de ces molécules.

### La diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques

Les glycoprotéines se définissent par la présence de chaînes glycaniques liées de façon covalente à leur axe peptidique. Dans le cas des mucines,

les liaisons glycanes-protéine sont surtout de type O-glycosidique entre des résidus de N-acétylgalactosamine (GalNAc) situés à l'extrémité réductrice des chaînes glycaniques et les groupements hydroxyles de résidus de sérine ou de thréonine de l'axe peptidique (figure 1).

Ces liaisons sont labiles à pH alcalin [5], ce qui les distingue des liaisons N-glycosidiques qui s'effectuent entre un résidu de N-acétylglucosamine et un résidu d'asparagine et qui sont rencontrées dans de nombreuses glycoprotéines sériques ou membranaires (figure 1). Outre la GalNAc, les chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines contiennent de la N-acétylglucosamine

(GlcNAc), du galactose (Gal), du fucose (Fuc) et de l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc). Les mucines bronchiques peuvent contenir également des groupements sulfate ainsi que de faibles quantités de mannose (Man) qui témoignent de la présence probable de quelques chaînes glycaniques liées par liaisons N-glycosidiques (cette hypothèse est discutée dans le paragraphe suivant). On n'a encore jamais trouvé d'acide uronique dans les mucines [1].

Bien qu'il n'existe que cinq différents types de sucres dans les mucines bronchiques humaines (comme dans la plupart des mucines), l'assemblage de ces sucres au cours de la biosynthèse des chaînes glycaniques conduit à une très grande variété de structures, qui diffèrent dans leur composition, leur longueur, leur type de branchement et leur acidité.

Jusqu'en 1980, l'établissement de la structure d'une chaîne glycanique (ou d'un oligosaccharide) était une entreprise difficile qui nécessitait une quantité importante de matériel. On ne disposait guère à l'époque que de techniques chimiques (oxydation périodique, méthylation et dégradation séquentielle par les glycosidases) [6].

Devant l'importance des quantités de mucines nécessaires à la préparation de quelques microgrammes d'oligosaccharides purifiés, toutes les études structurales ont d'abord été réalisées à partir de *pools* de mucines constitués à partir des sécrétions de sujets (de groupe sanguin O, pour limiter l'hétérogénéité) souffrant d'hypersécrétions bronchiques (mucoviscidose ou bronchite chronique). Le « mucus bronchique normal » est en effet d'un recueil difficile puisque, chez l'individu sain, ce mucus, entraîné par l'activité ciliaire, remonte progressivement jusqu'au pharynx où il est dégluti.

Des progrès importants ont été réalisés au cours de ces dix dernières années grâce : (1) à l'avènement de techniques modernes de chromatographie liquide de haute performance (HPLC), permettant la purification rapide d'oligosaccharides et (2) au développement de techniques physiques très performantes, telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et différentes techniques de

## RÉFÉRENCES

13. Strous G. Initial glycosylation of proteins with acetyl galactosaminyl serine linkages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 ; 76 : 2694-8.
14. Cummings R, Kornfeld S, Schneider W, et al. Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 15261-73.
15. Piller V, Piller F, Fukuda M. Biosynthesis of truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 9264-71.
16. Perini JM, Lamblin G, Herscovics A, Roussel P. Identification of human tracheobronchial mucin precursors. Mucus and related topics. In : Chantler E, Ratchiffe NA eds. *Society for Experimental Biology*. Cambridge, 1989 : 37-41.
17. Painter TJ, Watkins WM, Morgan WTJ. Serologically active fucose-containing oligosaccharides isolated from human blood-group A and B substances. *Nature* 1965 ; 206 : 594-7.
18. Oriol R. Phylogeny and ontogeny of blood group antigens. A study by polychromatic tissue immunofluorescence of ABH and related antigens. In : Mayr WR, eds. *Advances in Forensic Haemogenetics 2*. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 1988 : 407-14.
19. Lhermitte M, Rahmoune H, Lamblin G, Roussel P, Strang AM, Van Halbeeck H. Structures of neutral oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, le<sup>a+b-</sup>) patient suffering from chronic bronchitis. *Glycobiology* 1991 ; 1 : 277-93.
20. Lhermitte M, Lamblin G, Lafitte JJ, Degand P, Roussel P, Mazzuca M. Human bronchial-mucus glycoproteins : a comparison between chemical properties and affinity for lectins. *Carbohydr Res* 1981 ; 92 : 333-42.
21. Klein A, Carnoy C, Lamblin G, et al. 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* 1991 ; 198 : 151-68.
22. Lamblin G, Rahmoune H, Wieruszski JM, Lhermitte M, Strecker G, Roussel P. Structure of two sulfated oligosaccharides from respiratory mucins of a patient suffering from cystic fibrosis : a fast atom bombardment mass spectrometric and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic study. *Biochem J* 1991 ; 275 : 199-206.
- spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton à haut champ (<sup>1</sup>H-NMR) ou de spectrométrie de masse (FAB-MS), pour la détermination des structures. S'il existe des enzymes capables de libérer les chaînes glycaniques des glycoprotéines N-glycosylées, ce n'est pas le cas pour les glycoprotéines O-glycosylées, et on ne dispose pour l'instant que de l'endo-N-acétylgalactosaminidase de *Streptococcus pneumoniae* — dont l'action est très limitée sur les mucines bronchiques. Par conséquent, la seule méthode valable pour libérer au moins partiellement les oligosaccharides des mucines reste-elle la coupure de la liaison glycanne-peptide par les agents alcalins dans une réaction de  $\beta$ -élimination. Si cette réaction est effectuée en présence de borohydrure, la dégradation récurrente de l'oligosaccharide libéré (*peeling*) est bloquée [5] et ce traitement conduit à l'obtention d'un mélange d'oligosaccharides réduits (ou oligosaccharides-alditols) [7] et de glycopeptides produits par fragmentation de l'axe peptidique par le borohydrure. Les oligosaccharides réduits obtenus après traitement alcalin d'un ensemble de mucines contiennent de 1 résidu (le résidu de GalNAc de la liaison) à 20 résidus de sucres. Ce mélange peut être séparé par chromatographie d'échange ionique en quatre fractions d'acidité croissante (neutre, sialylée et de plus en plus sulfatées) ; puis chacune de ces fractions peut être sous-fractionnée, selon la taille moléculaire, en trois sous-fractions par chromatographie de gel filtration. On obtient ainsi un total de douze sous-fractions [7]. Jusqu'à présent, seules trois sous-fractions (deux sous-fractions neutres et la sous-fraction correspondant aux plus petits oligosaccharides sialylés) ont été étudiées dans notre laboratoire. Chaque sous-fraction a été soumise à différentes étapes d'HPLC (*figure 2*) qui ont permis de détecter dans chacune d'entre elles une vingtaine de chaînes glycaniques différentes dont la structure a été progressivement déterminée [8]. Une extraordinaire hétérogénéité des structures glycaniques a été constatée. Elle pouvait résulter de différences individuelles dans la structure des oligosaccharides bronchiques des mucines des différents patients ayant contribué à la formation des *pools* de mucines. Aussi, pour écarter toute éventualité de superposition de différents phénotypes de glycosylation (sécréteur, Lewis...), ainsi que toute possibilité de dégradation plus ou moins complète des glycannes de mucines par des glycosidases bactériennes, une étude analogue a été entreprise sur une sécrétion bronchique individuelle. Dans les mucines d'un patient souffrant de bronchiectasies non surinfectées, la même hétérogénéité des chaînes glycaniques a été retrouvée et 80 structures d'oligosaccharides ont déjà pu être déterminées dans les trois sous-fractions étudiées [9]. Sachant que les oligosaccharides contenus dans ces trois sous-fractions ne correspondent qu'à environ 20 % de l'ensemble des oligosaccharides, il est vraisemblable qu'il existe plusieurs centaines de chaînes glycaniques différentes sur les mucines bronchiques sécrétées par un individu.

### Structure des chaînes glycaniques des mucines bronchiques

Hounsell *et al.* [10] ont proposé de distinguer trois parties différentes dans les chaînes glycaniques des mucines (*figure 3*).

La première partie comprend le résidu de N-acétylgalactosamine (GalNAc) lié à l'axe peptidique et le ou les deux sucre(s) fixé(s) sur cette GalNAc : elle constitue le noyau ou cœur de l'oligosaccharide.

La deuxième partie est formée par l'addition alternée de résidus de galactose et de N-acétylglucosamine, c'est le squelette.

La troisième partie, dite périphérique, est représentée par les sucres qui viennent se greffer sur le squelette.

#### • Initiation de la O-glycosylation et formation des cœurs

La biosynthèse des chaînes glycaniques des mucines bronchiques s'effectue par l'action successive de glycosyltransférases, permettant à chaque étape le transfert d'un sucre, à partir d'un nucléotide-sucré donneur, sur un substrat qui est l'apomucine pour la première GalNAc, et



## RÉFÉRENCES

23. Mawhinney TP, Adelstein E, Morris DA, Mawhinney AM, Barbero GJ. Structure determination of five sulfated oligosaccharides derived from tracheobronchial mucus glycoproteins. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 2994-3001.
24. Aubert JP, Porchet N, Crepin M, et al. Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1991 ; 5 : 178-85.
25. Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* 1986 ; 64 : 163-81.
26. Mazuca M, Roche AC, Lhermitte M, Roussel P. Limulus polyphemus lectin sites in human bronchial mucosa. *J Histochem Cytochem* 1977 ; 25 : 470-2.
27. Lamblin G, Lhermitte M, Klein A, et al. The carbohydrate diversity of human respiratory mucins : a protection of the underlying mucosa ? *Am Rev Resp Dis* 1991 ; 144 : 519-24.
28. Rose MC, Voter WA, Sage H, Brown CF, Kaufman B. Effects of deglycosylation on the architecture of ovine submaxillary mucin glycoprotein. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 3167-72.
29. Variyam EP, Hoskins LC. *In vitro* degradation of gastric mucin. Carbohydrate side chains protect polypeptide core from pancreatic proteases. *Gastroenterology* 1983 ; 84 : 533-7.
30. Ofek I, Beachey EH, Sharon N. Surface sugars on animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. *Trends Biochem Sci* 1978 ; 4 : 159-60.
31. Vishwanath S, Ramphal R. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. *Infect Immun* 1984 ; 45 : 197-202.
32. Vishwanath S, Ramphal R. Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa* : predominance of amino sugars in binding sites. *Infect Immun* 1985 ; 48 : 331-5.
33. Wang WT, Le Donne NC, Ackermann B, Sweeley CC. Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry and exoglycosidase digestion. *Anal Biochem* 1984 ; 141 : 366-81.
34. Ramphal R, Carnoy C, Fiebre NC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal  $\beta$ 1-3 GlcNAc) or type 2 (Gal  $\beta$ 1-4 GlcNAc) disaccharide units. *Infect Immun* 1991 ; 59 : 700-4.

glycosyltransférases, qui sont génétiquement contrôlées et dont l'action aboutit à la formation de liaisons glycosidiques avec une anomérie  $\alpha$ . Ces réactions de glycosylation terminales peuvent conférer aux mucines différentes activités antigéniques (figure 5).

C'est au début du siècle que Landsteiner a découvert le système de groupes sanguins ABO et qu'il a montré que les caractères de groupes sanguins étaient hérités selon des lois mendéliennes. Le système ABO a d'abord été défini en termes de substances antigéniques situées sur les

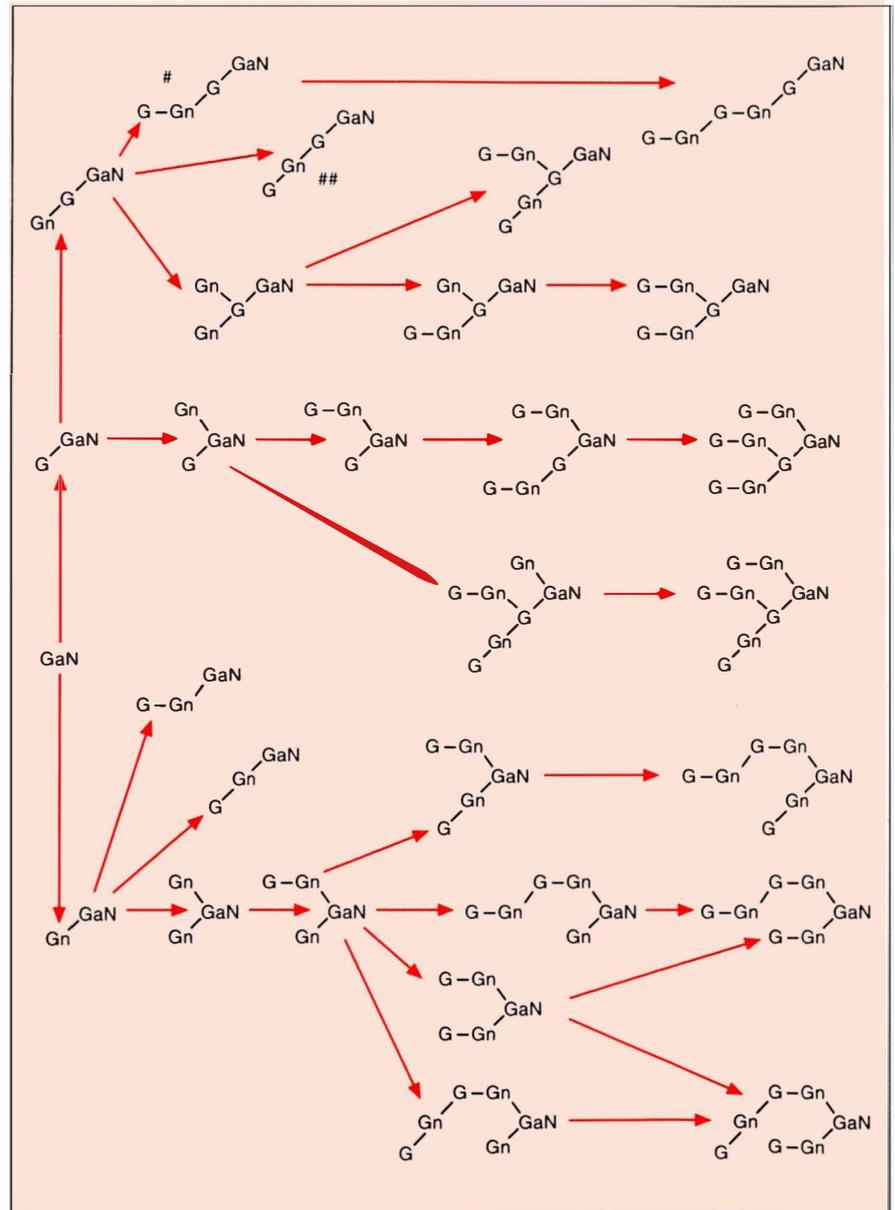


Figure 4. **Différents types de squelettes identifiés dans les chaînes glycaniques des mucines bronchiques.** GaN : N-acétylgalactosamine ; Gn : N-acétylglucosamine ; G : galactose. Les liaisons glycosidiques sont représentées de la façon suivante : / : liaison  $\beta$ 1-3 ; - : liaison  $\beta$ 1-4 ; \ : liaison  $\beta$ 1-6. Les flèches entre les oligosaccharides représentent des voies de biosynthèse hypothétiques. (#) et (##) correspondent à des oligosaccharides qui ont une analogie structurale avec le lacto-N-tétraose et le lacto-N-néotétraose (Tableau I).

globules rouges, mais, curieusement, les premières informations concernant la structure chimique des antigènes de groupes sanguins n'ont pas été obtenues à partir des globules rouges, mais de « substances à activité de groupes sanguins » (qui sont en fait des mucines), sécrétées dans différents mucus ou élaborées en grandes quantités dans des sécrétions pathologiques telles que les liquides de kystes ovariens [17].

Les antigènes de groupes sanguins ABO ne sont pas seulement exprimés sur la membrane plasmique des globules rouges et d'autres cellules [18] mais aussi à la périphérie des chaînes glycaniques de molécules sécrétées comme les mucines. Seuls les individus dits sécréteurs (80 % de la population) expriment des activités de groupes sanguins H (ou O), A ou B au niveau des chaînes glycaniques des mucines salivaires et probablement de l'ensemble des mucines sécrétées (figure 5). Dans les mucines, les structures responsables de ces activités résultent de l'expression de trois gènes, sécréteur (ou *Se*), A ou/et B (codant pour trois glycosyltransférases) qui sont transmis de façon indépendante mais dont l'expression phénotypique est étroitement liée. Chez les individus sécréteurs, l' $\alpha$ 2-L-fucosyltransférase codée par le gène *Se* est capable de greffer un résidu de fucose sur le carbone 2 du résidu de galactose d'un disaccharide de type 1 ou de type 2 pour donner un antigène de groupe sanguin H (figure 5). Celui-ci est le substrat reconnu par les enzymes codées par le gène A ou le gène B ( $\alpha$ 1-3 N-acétylgalactosaminyltransférase pour le gène A et  $\alpha$ 1-3 galactosyltransférase pour le gène B). Chez les individus non sécréteurs, l'absence d' $\alpha$ 2-L-fucosyltransférase empêche l'expression de la N-acétylgalactosaminyltransférase des sujets A ou celle de la galactosyltransférase des sujets B. De nombreuses structures de groupe sanguin H ont été trouvées parmi les chaînes glycaniques des mucines bronchiques des sujets sécréteurs. Elles sont absentes chez les sujets non sécréteurs [19]. Quant aux activités A ou B, elles sont présentes dans les mucines des sujets sécréteurs et absentes chez les sujets non sécréteurs [20].

Le gène *Lewis* est responsable de la synthèse d'une  $\alpha$ 1-3/ $\alpha$ 1-4 fucosyltransférase. Cette enzyme est capable de greffer un résidu de fucose sur une GlcNAc subterminale d'un disaccharide de type 1 pour former l'antigène Lewis a ( $Le^a$ ) (figure 5). L'expression du gène *Lewis* est indépendante du caractère sécréteur de l'individu. Chez les sujets sécréteurs, l'action conjuguée du gène *Se* et du gène *Lewis* donne naissance à la structure Lewis b ( $Le^b$ ) (figure 5). Cette structure a été trouvée à la périphérie de plusieurs chaînes glycaniques des

mucines bronchiques de sujets sécréteurs. Seules les structures  $Le^a$  ont pu être détectées chez des sujets non sécréteurs [19].

L'antigène X ou antigène SSEA se retrouve sur de nombreux oligosaccharides bronchiques (figure 5). Il résulte probablement de l'action de cette même  $\alpha$ 1-3/ $\alpha$ 1-4 fucosyltransférase sur une GlcNAc subterminale d'un disaccharide de type 2. Quant à l'antigène Y, qui est aussi fréquemment observé à la périphérie des glycanes de mucines bronchiques de sujets sécréteurs (figure 5), il résulte de

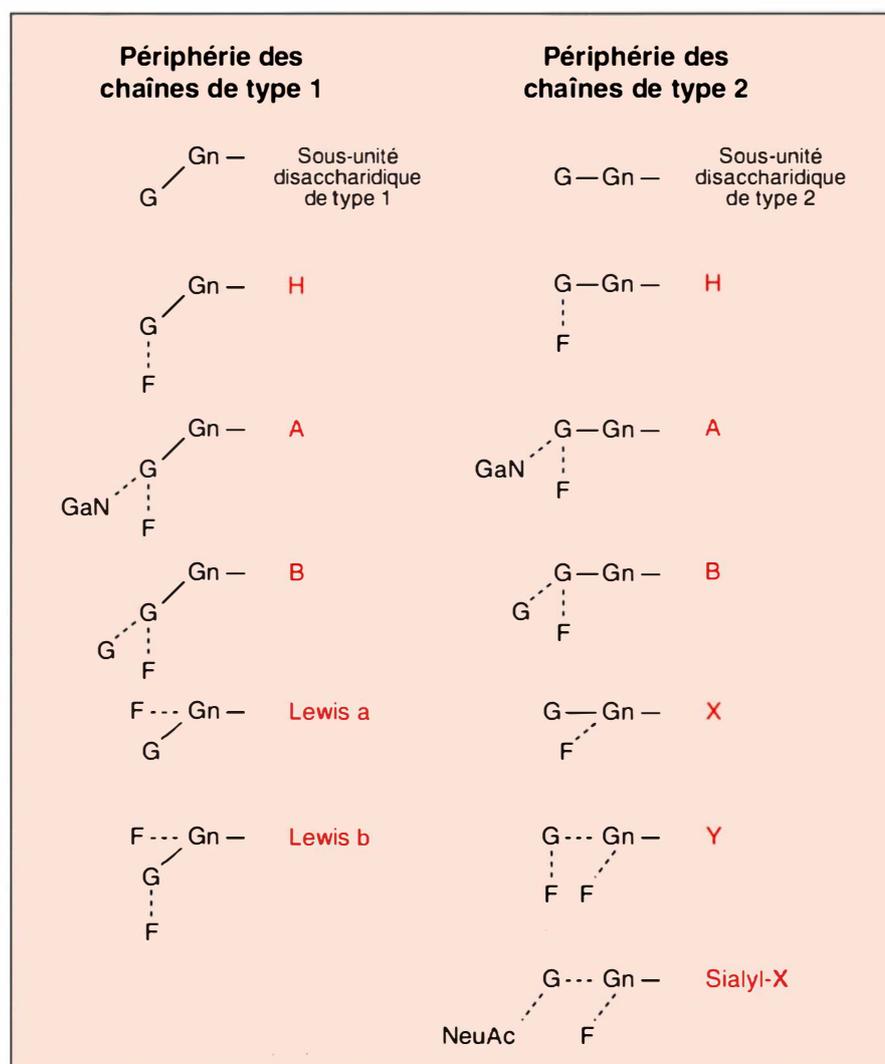


Figure 5. Exemples de structures fucosylées pouvant constituer la périphérie des chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines. Les liaisons sont représentées comme dans la figure 4, sauf pour les liaisons  $\alpha$ , qui sont indiquées en pointillé.

Tableau I		
EXEMPLES DE STRUCTURES GLYCANNIQUES RECONNUES PAR DES MICRO-ORGANISMES ET QUI EXISTENT ÉGALEMENT DANS LES MUCINES BRONCHIQUES HUMAINES [27]		
Structures glycaniques	Bactérie	Origine des structures
Lacto-N-tétraose Gal $\beta$ 1-3 <u>GlcNAc <math>\beta</math>1-3</u> Gal $\beta$ 1-4 Glc Gal $\beta$ 1-3 <u>GlcNAc <math>\beta</math>1-3</u> Gal $\beta$ 1-4 Glc	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Oligosaccharides du lait humain id.
Lacto-N-néotétraose Gal $\beta$ 1-4 <u>GlcNAc <math>\beta</math>1-3</u> Gal $\beta$ 1-4 Glc Gal $\beta$ 1-4 <u>GlcNAc <math>\beta</math>1-3</u> Gal $\beta$ 1-4 Glc	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	id. id.
NeuAc $\alpha$ 2-3 Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc...  Gal $\beta$ 1-3 GalNAc	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Actinomyces naeslundii</i>	Glycoprotéines Cellules ciliées Gangliosides, globoside
NeuAc $\alpha$ 2-3 Gal $\beta$ 1-3 GalNAc	<i>Streptococcus sanguis</i> <i>E. Coli</i> (type <i>S fimbrae</i> )	Mucines salivaires humaines Glycophorine
HSO <sub>3</sub> -O-3 Gal $\beta$ 1...	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Glycolipides
NeuAc $\alpha$ 2-3 Gal...	<i>Virus Influenza</i> (H1N1)	Glycolipides
NeuAc $\alpha$ 2-6 Gal...	<i>Virus Influenza</i> (H3N2)	Glycolipides

Dans les tétrasaccharides, la partie soulignée correspond au site probable d'attachement.

l'action successive des deux fucosyltransférases codées par les gènes *Se* et *Lewis* sur les disaccharides de type 2. Récemment, de nouvelles structures (appelées « H internes ») contenant un résidu de fucose lié en  $\alpha$ 1-2 sur le galactose d'un disaccharide de type 2, en position interne dans le squelette, ont été isolées. On ignore complètement le mécanisme de leur synthèse [21].

De nombreuses chaînes glycaniques de mucines bronchiques portent des groupements acides, résidus d'acide N-acétylneuraminique ou de sulfate qui confèrent aux mucines leur caractère polyanionique. Cinq types de liaisons de l'acide sialique ont déjà été identifiés dans les chaînes glycaniques des mucines bronchiques, où l'acide sialique (NeuAc) est lié soit sur la GalNAc de liaison avec le peptide, soit sur un résidu de Gal situé en position terminale : (1) NeuAc $\alpha$ 2-6 GalNAc- ; (2) NeuAc $\alpha$ 2-3 Gal $\beta$ 1-3 GalNAc- (= core 1 sialylé) ; (3) NeuAc $\alpha$ 2-3 Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc-R ; (4) NeuAc $\alpha$ 2-6 Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc-R ; (5) NeuAc $\alpha$ 2-3 Gal $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3) GlcNAc-R. La structure (5) est res-

ponsable de l'activité antigénique sialyl-X (figure 5).

Les chaînes glycaniques sulfatées sont difficiles à isoler à l'état pur et peu de structures sulfatées ont été décrites jusqu'à présent. Toutefois, dans quelques chaînes glycaniques, des fonctions ester-sulfate ont été localisées sur des résidus de galactose, soit sur le carbone 3 [22], soit sur le carbone 6 [23]. On vient de montrer que les chaînes glycaniques des mucines bronchiques peuvent contenir à la fois des résidus d'acide sialique et des groupements sulfate (manuscrit en préparation).

Des traces de mannose sont fréquemment observées dans la composition chimique des mucines bronchiques humaines. Étant donné la difficulté à purifier complètement ces mucines et à les débarrasser de contaminants auxquels elles sont souvent associées, ce mannose a longtemps été considéré comme une contamination. Pourtant la découverte récente de sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser [ou Thr]) dans la séquence des mucines bronchiques humaines [24] semble indiquer la présence de quelques chaînes

glycaniques à liaisons N-glycosidiques, au milieu d'un grand nombre de chaînes glycaniques à liaisons O-glycosidiques.

L'extraordinaire diversité de structures glycaniques des mucines bronchiques est surprenante. De nombreuses transférases doivent intervenir dans leur synthèse : (i)  $\beta$ -galactosyl- et  $\beta$ -N-acétylglucosaminyltransférases pour les cœurs et les squelettes ; (ii) sialyl-, fucosyl-, sulfo-,  $\alpha$ -galactosyl-,  $\alpha$ -N-acétylgalactosaminyltransférase pour la partie périphérique. Toutefois cette diversité n'est sans doute pas le fruit du hasard. On sait, pour d'autres muqueuses, que la synthèse des O-glycannes dépend d'un certain nombre de facteurs :

- la présence ou l'absence de certaines glycosyltransférases (on peut citer comme exemple l'absence d' $\alpha$ -2-L-fucosyltransférase codée par le gène *Se*, chez les non-sécréteurs) ;
- il peut y avoir compétition entre deux ou plusieurs glycosyltransférases pour le même accepteur : le produit synthétisé dépendra de la disponibilité en nucléotides-sucres et de l'affinité des enzymes ;

- la séquence d'intervention des différentes glycosyltransférases est déterminée par leur spécificité [25].

Il existe des différences d'expression des glycosyltransférases d'une cellule sécrétant des mucines à une autre : ainsi la limuline, lectine reconnaissant spécifiquement les structures sialylées, a une affinité pour les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique, mais n'en a pas pour les cellules des glandes muqueuses [26]. Dans une cellule synthétisant des mucines, les grains de mucines n'ont parfois pas le même contenu glucidique, indiquant que cette même cellule pourrait synthétiser différents types de mucines.

La découverte récente de multiples apomucines bronchiques (voir l'article de N. Porchet et al., p. 1024 de ce numéro) pose le problème de la relation entre apomucines et glycosylation : toutes les chaînes glycaniques peuvent-elles être synthétisées sur toutes les apomucines ou existe-t-il une spécificité de glycosylation pour une apomucine donnée ? Contrairement aux N-glycoprotéines, nos connaissances de la biosynthèse des O-glycannes sont encore très limitées et il faudra encore beaucoup de travail pour mettre en évidence les glycosyltransférases impliquées dans cette biosynthèse et comprendre leur programmation. Finalement, seule une faible partie de

l'ensemble des oligosaccharides des mucines bronchiques a pu être identifiée jusqu'à présent. Devant la diversité des squelettes de ces oligosaccharides et le nombre impressionnant de substitutions déjà observé pour des chaînes glycaniques relativement courtes (13 modes de substitution différents ont pu être identifiés sur un simple tétrasaccharide) [27], on peut aisément envisager l'existence de centaines de chaînes glycaniques différentes dans les mucines bronchiques humaines.

### La diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines a-t-elle un rôle biologique ?

Longtemps les chaînes glycaniques des glycoprotéines ont été un peu considérées comme des éléments de « décoration moléculaire ». Pourtant les glycannes des mucines sont sûrement importants dans la conformation filamenteuse de ces molécules : après déglycosylation des mucines sous-maxillaires, les apomucines se présentent sous forme globulaire [28]. Les glycannes constituent ainsi un élément essentiel dans la structuration et le maintien des propriétés rhéologiques du mucus bronchique néces-

saires au bon fonctionnement du système mucociliaire. On sait également que les glycannes des mucines les protègent de l'action des enzymes protéolytiques [29].

Le rôle des glycannes dans les interactions hôte/micro-organisme et dans les phénomènes d'adhérence bactérienne a été envisagé à partir de 1955 : les propriétés hémagglutinantes de certaines souches d'*Escherichia coli* étaient inhibées en présence de manose (voir revue dans [30]). Depuis, de nombreux exemples de structures glycaniques pouvant être exprimées par les cellules de l'hôte et reconnues par les adhésines (ou hémagglutinines) de micro-organismes ont été décrits. Il en est ainsi pour *Actinomyces naeslundii* et *Streptococcus sanguis* qui colonisent la cavité buccale, ou pour *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et le virus de l'influenza qui peuvent être pathogènes dans l'arbre trachéo-bronchique (Tableau I) [27].

Des structures analogues existent dans les chaînes glycaniques des mucines bronchiques et il est tentant de penser que les multiples chaînes glycaniques qui recouvrent les molécules d'apomucines représentent une mosaïque de sites reconnus par les bactéries ou les virus, permettant leur « piégeage » et leur élimination par la clairance mucociliaire. La diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques jouerait ainsi un rôle fondamental dans la défense de la muqueuse sous-jacente.

A cet égard, la colonisation de la muqueuse respiratoire humaine par *Pseudomonas aeruginosa* qui s'observe au cours de la mucoviscidose représente un problème intéressant. Vishwanath et Ramphal [31] ont mis au point une méthode d'étude de l'adhérence de *Pseudomonas* en utilisant des plaques de microtitration recouvertes de mucines. Ils ont observé que *Pseudomonas aeruginosa* avait une affinité particulière pour certaines préparations de mucines bronchiques humaines. Ce phénomène d'adhérence met en jeu, d'une part, des adhésines bactériennes et, d'autre part, les glycannes des mucines (figure 6) [32].

L'identification des sites glycaniques reconnus par *Pseudomonas aeruginosa* représentait un problème difficile car l'hétérogénéité importante des chaînes

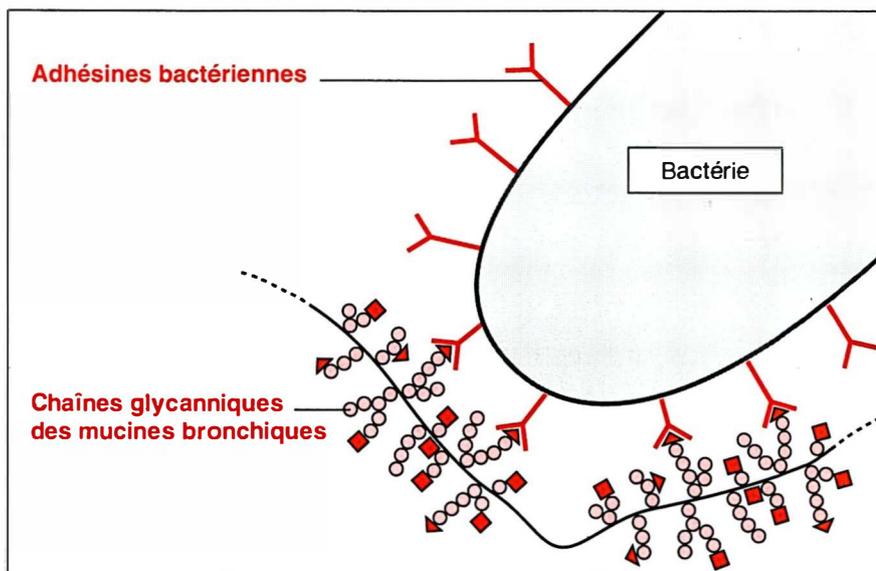


Figure 6. Schématisation des interactions mucines/bactéries.

glycanniques des mucines bronchiques ne permet pas de les obtenir en quantité suffisante pour tester leurs propriétés individuelles d'adhérence. Cependant, cette identification a pu être réalisée en utilisant des oligosaccharides analogues à certaines chaînes glycanniques des mucines bronchiques, tels que le lacto-N-tétraose et le lacto-N-néotétraose du lait maternel qui peuvent être préparés en abondance.

Ces oligosaccharides de lait inhibent l'attachement de *Pseudomonas aeruginosa* aux mucines bronchiques. Lorsqu'ils sont transformés en néoglycolipides par greffe d'une partie hydrophobe, ils s'attachent au plastique des plaques de microtitration et peuvent être utilisés pour étudier la fixation de *Pseudomonas aeruginosa* [33]. Le lacto-N-tétraose et le lacto-N-néotétraose — qui contiennent des unités disaccharidiques, Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (type 1) ainsi que Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (type 2) — sont reconnus spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* [34]. Des structures analogues sont très abondantes dans les squelettes des chaînes glycanniques des mucines (figure 4). Les adhésines de *Pseudomonas aeruginosa* qui reconnaissent ces structures sont probablement situées sur la membrane externe car ce sont les souches de *Pseudomonas* dépourvues de *pili* (souches obtenues par manipulation génétique) qui adhèrent le mieux aux néoglycolipides. Il reste à déterminer si, chez les malades atteints de mucoviscidose et infectés par *Pseudomonas aeruginosa*, l'expression des sites de reconnaissance glycanniques sur les mucines bronchiques est altérée.

En conclusion, la diversité des glycanes des mucines est sans doute un élément essentiel de la protection de la muqueuse, en permettant la fixation des micro-organismes inhalés, préalable indispensable à leur élimination par le système mucociliaire. L'identification des glycosyltransférases impliquées dans la genèse de cette diversité, l'étude de leur expression dans les différents types cellulaires, de leur mode de régulation et de leurs altérations pathologiques représente un champ d'investigation essentiel pour la compréhension des mécanismes moléculaires de la colonisation microbienne en pathologie bronchopulmonaire ■

## Summary

### Carbohydrate chains of human tracheobronchial mucins and antimicrobial defence of respiratory mucosa

Human respiratory mucins consist of a broad family of glycoproteins synthesized by the respiratory mucosa. The peptide diversity (apomucins) stems from the expression of several genes. However the mucin diversity is significantly increased by post-translational phenomena, mostly O-glycosylation that is responsible for 80 % of the weight of the mucin molecule. This O-glycosylation leads to a remarkable diversity of carbohydrate chains and several hundreds of different chains exist on the mucins from a single individual.

This carbohydrate mosaic allows the recognition of inhaled microorganisms which are then eliminated by the activity of the mucociliary system. Thus the carbohydrate chain diversity may play an essential role in the defense of the underlying respiratory mucosa.

## TIRÉS A PART

G. Lamblin.