

UNIVERSITE DE LILLE  
FACULTE DES SCIENCES

---



MEMOIRE PRESENTE  
A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE  
POUR L'OBTENTION  
DU GRADE DE DOCTEUR-ES-SCIENCES D'ETAT

par M<sup>lle</sup> NICOLE ANTONY

---

PREMIERE THESE

**RECHERCHES SUR LES GLOBULINES IMMUNES  
DU COLOSTRUM DE VACHE.**

DEUXIEME THESE

**PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ**

---

*Présenté le 13 novembre 1965, devant la commission d'examen*

Président : M. J. MONTREUIL.

Examineurs : MM. M. DURCHON et G. BISERTE

Ce travail a été effectué dans le  
Laboratoire de Biochimie générale et appliquée de la Faculté  
des Sciences de Lille grâce à une subvention de la Délégation  
Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Comité de  
la Nutrition Animale et Humaine : Contrat 61-FR-170) à laquelle  
nous adressons nos vifs remerciements.

A mes Parents

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à la  
Faculté des Sciences de Lille

Chef de Laboratoire à l'Institut de  
Recherches sur le Cancer de Lille

Je vous remercie d'avoir bien voulu m'accepter dans votre Laboratoire de la Faculté des Sciences. Je n'oublierai jamais les courtes années que j'y ai passées, l'ambiance de bonne camaraderie et l'atmosphère de ruche laborieuse que j'y ai trouvées. J'avais admiré vos cours transcendants de Chimie Biologique ; j'ai eu la chance, ensuite, de pouvoir apprécier, au contact du parfait "honnête homme" que vous êtes, votre simplicité, votre grande humanité, votre droiture, votre savoir impressionnant, votre extraordinaire capacité de travail, votre fougue de chercheur infatigable et votre optimisme inébranlable. Je vous suis infiniment reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous exprime ici toute ma gratitude et vous prie de croire à mon profond et respectueux attachement.

A Messieurs les Professeurs M. DURCHON et G. BISERTE

qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse et que nous remercions très vivement.

A Messieurs les Professeurs P. BOULANGER et R. OSTEUX

dont j'avais admiré les cours et qui m'ont fait découvrir pour la première fois ce qu'était la Chimie Biologique.

A tous mes anciens camarades du Laboratoire, - et plus

particulièrement à Monsieur A. CHERON - j'adresse chaleureusement mes remerciements pour leur aide précieuse et pour leur amicale collaboration. Je n'oublierai jamais leur sympathique bonne humeur et leur dynamisme.

J'adresse mes plus vifs remerciements à

- Monsieur le Professeur J. TONNELAT et à Mademoiselle A. BARNEOUD  
(Laboratoire de Biologie physico-chimique de la Faculté des Sciences d'Orsay) et à Monsieur M. MONSIGNY qui ont effectué les analyses par ultracentrifugation du colostrum et des différentes fractions de globulines  $\gamma G$ .
- Madame FILITTI-WURMSER (Station Centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S., Paris) qui a déterminé le poids moléculaire des globulines  $\gamma G$  du colostrum de Vache par ultracentrifugation.
- Messieurs PETIT et GODON (Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales du C.E.R.D.I.A. de Massy) qui ont mesuré le poids moléculaire des globulines  $\gamma G$  par diffusion de la lumière.
- Monsieur le Professeur G. BISERTE (Laboratoire de Biochimie Pathologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille) et Mademoiselle M.T. PICQUE qui ont précisé la nature des amino-acides N-terminaux.
- Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX (Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Lille) qui a effectué les dosages d'acides aminés.
- Mademoiselle France GUERMONPREZ qui a bien voulu se charger de la présentation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

---

	pages
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>GENERALITES</u> .....	8
I - <u>Les protéides du lait de Vache</u> .....	9
A - Les caséines .....	9
B - Les protéides du lactosérum .....	14
Variations de la composition du lait en protéides au cours de la lactation .....	19
II - <u>Les globulines immunes</u> .....	20
1 - <u>Les globulines immunes du sang</u> .....	21
A - Hétérogénéité des globulines immunes. Nomenclature des globulines immunes .....	21
B - Méthodes de préparations des globulines immunes .....	27
C - Propriétés physico-chimiques des globulines immunes .....	30
D - Structure des globulines immunes .....	32
2 - <u>Les globulines immunes du colostrum et du lait et     l'immunisation passive par le lait</u> .....	39
A - L'immunisation passive transplacentaire .....	40
B - Immunisation passive par le colostrum .....	42
3 - <u>Origine des globulines immunes du lait et du     colostrum</u> .....	55
4 - <u>Isolement et propriétés physico-chimiques des     globulines du lait et du colostrum</u> .....	57
A - Préparation des globulines immunes .....	57
B - Propriétés physico-chimiques des globulines immunes .....	64
III - <u>Conclusions</u> .....	64



2° - <u>ETUDE DES VARIATIONS DE LA TENEUR DU LAIT DE VACHE</u> <u>EN PROTEIDES AU COURS DE LA LACTATION</u> .....	109
<u>Matériel et techniques</u> .....	110
A - Prélèvement des échantillons .....	110
B - Préparation des échantillons .....	110
C - Analyse électrophorétique .....	111
<u>Résultats</u> .....	111
<u>Discussion</u> .....	115
<u>Conclusions</u> .....	124
3° - <u>PROCEDES D'ISOLEMENT DES GLOBULINES IMMUNES DU</u> <u>COLOSTRUM DE VACHE</u> .....	126
I - <u>Préparation et étude des laits colostraux</u> .....	128
A - Mode opératoire .....	128
B - Résultats .....	129
C - Discussion .....	131
D - Conclusions .....	133
II - <u>Fractionnement du lactosérum colostrale par le</u> <u>sulfate d'ammonium</u> .....	134
A - Mode opératoire .....	135
1° - Isolement des précipités .....	135
2° - Etude des précipités .....	137
B - Résultats .....	137
1° - Résultats généraux .....	138
2° - Résultats particuliers à chacun des précipités .....	142
1 - Précipité P <sub>1</sub> .....	142
2 - Précipité P <sub>2</sub> .....	146
3 - Précipité P <sub>3</sub> .....	148
4 - Précipité P <sub>4</sub> .....	150
5 - Précipité P <sub>5</sub> .....	150
6 - Précipité P <sub>6</sub> .....	152
<u>Conclusions générales</u> .....	152

III - <u>Chromatographie sur DEAE-cellulose</u> .....	153
A - Mode opératoire .....	154
1° - Choix du procédé chromatographique ..	154
2° - Préparation des colonnes de DEAE-cellulose .....	154
3° - Etude physico-chimique et immunologi- que des fractions chromatographiques.	156
B - Fractionnement des précipités P <sub>1</sub> .....	157
1° - Résultats .....	157
2° - Discussion et conclusions .....	167
C - Fractionnement des précipités P <sub>3</sub> .....	168
1° - Résultats .....	168
2° - Discussion et conclusions .....	172
D - Fractionnement des précipités P <sub>4</sub> .....	174
1° - Résultats .....	174
2° - Discussion et conclusions .....	181bis
IV - <u>Conclusions générales</u> .....	182
4° - <u>ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DES GLOBULINES <math>\gamma</math>G</u> <u>DU COLOSTRUM DE VACHE</u> .....	191
A - Poids moléculaire .....	192
B - Etude du groupement glycanique .....	195
1 - Composition centésimale .....	195
2 - Identification des oses constituant les globulines $\gamma$ G.....	197
3 - Composition molaire .....	198
4 - Etude préliminaire de la structure du glycane .....	199
C - Etude de la fraction protéique .....	201
1 - Dosage des acides aminés .....	201
2 - Détermination des amino-acides N-terminaux .....	204
D - Etude de la nature du point d'attache glycanne- protéine .....	205
5° - <u>ETUDE COMPAREE DES GLOBULINES <math>\gamma</math>G DU SERUM ET DU</u> <u>COLOSTRUM DE VACHE</u> .....	209
I - <u>Comportement électrophorétique et immunophorétique</u> <u>des globulines <math>\gamma</math>G sériques et colostrales</u> .....	210
A - Résultats .....	210
1 - Etude électrophorétique .....	210
2 - Etude immunophorétique .....	211
B - Discussion et conclusions .....	211

II - <u>Etude physico-chimique comparée des globulines</u> <u><math>\gamma</math>G sériques et colostrales</u> .....	216
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u> .....	220
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	226

jeunes enfants alimentés au lait maternel présentent rarement des troubles intestinaux et qu'ils sont préservés de certaines formes d'anémies et des maladies classiques de l'enfance, comme la rougeole, la coqueluche ou la scarlatine.

Le mécanisme de la protection de l'enfant vis-à-vis de ces diverses maladies est, à présent, connu grâce aux résultats qui ont été obtenus par l'application des méthodes modernes d'analyse et qui ont montré que les deux laits présentaient des différences, à la fois, qualitatives et quantitatives. Les unes concernent, d'une part, les constituants minéraux ou les composés "énergétiques", comme les protides, les glucides et les lipides (Tableau I), et, d'autre part, les biocatalyseurs (Tableau II) comme les vitamines. Elles sont essentiellement d'ordre quantitatif et d'importance nutritionnelle. Les autres, au contraire, sont d'ordre qualitatif et concernent l'existence, dans les deux laits, de substances qui sont les supports d'activités biologiques particulières. Par exemple, le lait de Femme contient une proportion importante d'osides (20 à 25 g p. litre de colostrum ; 7 à 8 g p. litre de lait "parfait") dont la présence a été démontrée par POLONOVSKI et LESPAGNOL et qui ont été isolés et étudiés par KUHN et al. et par MONTREUIL (voir, à ce propos, les revues générales de KUHN ( 2 ) et de MONTREUIL ( 3 ) ). Ces glucides, qui n'existent pas dans le lait de Vache, sont des facteurs de croissance pour des bacilles saprophytes de l'intestin du Nourrisson, comme les Lactobacillus bifidus, dont la prolifération empêche celles de bactéries pathogènes comme les Salmonella. Ainsi est assurée la protection du tractus intestinal des enfants nourris au lait de Femme. D'autre part, la présence, dans ce dernier, d'un métalloprotéide spécifique, responsable du transport du fer : la lactotransferrine (voir p. 16), explique la fréquence très faible des anémies par ferriprivation chez les nourrissons alimentés au lait maternel. Quant à l'immunisation totale ou partielle des enfants vis-à-vis de certaines maladies infectieuses, elle serait réalisée par les anticorps présents dans le lait de Femme.

TABLEAU I

Composition (en g p. litre) en sels minéraux et en substances "énergétiques" des laits de Femme et de Vache (\*)

	<u>Lait de Femme</u>	<u>Lait de Vache</u>
Extrait sec	117 ± 3	125 ± 3
Cendres	2,5 à 3,5	7,5 à 9,5
<u>Sels</u>		
Chlorures	1,2	1,6 à 1,8
Citrates	1,25	2 à 3,25
Phosphates	0,4	2 à 2,5
Calcium (en CaO)	0,35	1,25 à 1,6
Cuivre	0,0005	0,0005
Fer	0,001	0,001
Potassium (en KOH)	0,78	1,4 à 1,75
Sodium (en NaOH)	0,17	0,58 à 0,85
<u>Composés organiques</u>		
Lactose	65 à 70	47 ± 1
Lipides	35	35
Protides	14	35 ± 3

( \* ) La composition est donnée pour des laits "parfaits" et représente des valeurs moyennes. Elle est différente pour les laits colostraux (voir, à ce sujet, LING, KON et PORTER) ( 4 ). Elle varie en outre avec la race, dans le cas du lait de Vache (voir les revues générales d'ALAIS ; de COURTOIS et PERLES ; de FOURESTIER et DE FOSSEY ; de LING, KON et PORTER ( 5 ).

TABLEAU II

Composition (en mg p. litre) en vitamines des laits de Femme et de Vache ( \* )

<u>Nature de la vitamine</u>	<u>Lait de Femme</u>	<u>Lait de Vache</u>
Vitamine A	1600 U.I.	1200 à 2000 U.I.
Carotènes		0,250 à 0,500
Vitamine D	14 U.I.	18 à 23 U.I.
Vitamine E	5,5	0,8
Vitamine B <sub>1</sub>	0,15 à 0,6	0,4
Vitamine B <sub>2</sub>	0,4 à 1	1,5 à 2
Vitamine B <sub>6</sub>	0,1	0,35 à 0,4
Vitamine B <sub>12</sub>	traces	0,006
Vitamine C	30 à 50	10 à 20
Vitamine PP	1,7	0,9
Acide pantothénique	2	3,5 à 4
Acide folique	0,002	0,001
Biotine	0,004	0,02 à 0,03
Choline	90	130
Inositol	390	130

( \* ) Ces valeurs varient avec l'alimentation et la nature du lait (lait colostral ou lait "parfait") et, en outre, avec la race dans le cas du lait de Vache. Il s'agit donc de taux moyens (voir les revues générales d'ALAIS ; de KARLIN et de LING, KON et PORTER (6).

Celui-ci représenterait donc un véritable "vaccin buccal" apportant, en particulier, les globulines immunes  $I_{gA}$  ( $\gamma_{1A}$  ;  $\beta_{2A}$ ) et  $I_{gM}$  ( $\gamma_{1M}$  ;  $\beta_{2M}$ ) (\*) dont le nouveau-né ne commence la synthèse que 10 jours environ après sa naissance. Ce phénomène de l'immunisation par le lait n'est pas spécifique de l'Homme. Il est, au contraire, d'ordre général et intéresse l'ensemble des Mammifères. Nous verrons même qu'il est, pour certains d'entre eux, d'une importance vitale, car, si l'enfant vient au monde avec, dans son sang, une proportion importante d'anticorps que lui a fournis la mère, par la voie transplacentaire, il n'en est pas de même pour d'autres espèces, comme les Bovidés, qui naissent "agamma-globulinémiques". Dans leur cas, en effet, les globulines immunes n'ont pas pu forcer la barrière placentaire et les anticorps, dont ils ont besoin pour survivre, leur sont apportés, dans les premiers jours qui suivent la naissance, par le lait colostrale (voir p. 40).

L'importance de ce phénomène biologique explique le nombre élevé de travaux qui ont été réalisés à propos des globulines immunes du lait de Femme et du lait de Vache. Les recherches ont été entreprises dans plusieurs directions. Les unes concernent le phénomène d'immunisation lui-même, tant est grande son importance biologique, à laquelle s'ajoute, dans le cas du bétail, une importance économique puisqu'il intéresse la protection des troupeaux contre le risque d'épidémies. Les autres portent sur une "maternisation" des globulines immunes du lait de Vache destinée à les rendre efficaces dans la protection du Nourrisson. D'autres, enfin, sont d'ordre physico-chimique. En effet, nous verrons que les laits colostraux,

---

( \* ) Nous désignerons les trois types de globulines immunes par les initiales  $\gamma G$ ,  $\gamma A$  et  $\gamma M$  (voir p. 23).

contrairement au sérum, possèdent une composition en protéides très simple et sont riches en globulines immunes. L'isolement de ces dernières en est singulièrement facilité et le colostrum représente, à cet égard, un excellent matériel de départ pour réaliser leur préparation en quantités élevées. L'étude des propriétés physico-chimiques des globulines du système gamma du lait est en relation étroite avec les recherches d'ordre biologique. En effet, la comparaison des propriétés et de la structure des globulines immunes du sang et du lait pourrait permettre de résoudre le problème de l'origine de ces dernières.

Nous nous sommes particulièrement attachée à la mise au point de procédés d'isolement des globulines immunes du lait de Vache et à l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. Nous exposerons les résultats que nous avons obtenus en les faisant précéder d'un historique de la question. Le plan de notre mémoire sera donc le suivant.

Dans le premier chapitre, après avoir rapidement décrit les caractéristiques des protéides du lait de Vache et précisé les principaux caractères des globulines immunes, nous exposerons l'évolution des idées concernant les anticorps du lait.

Dans le second chapitre, nous décrirons les techniques générales que nous avons appliquées.

Le troisième chapitre sera consacré à une étude cinétique des variations quantitatives du lait au cours de la lactation, dans le but de définir les conditions les plus favorables à l'isolement des globulines immunes.

Le quatrième chapitre sera réservé à la description des procédés d'isolement des globulines immunes du lait.

Dans le cinquième chapitre, nous apporterons les résultats que nous a fournis l'étude physico-chimique des globulines  $\gamma G$  du

colostrum de Vache.

Dans le dernier chapitre, nous effectuerons une étude comparée des globulines immunes du lait et du sang de la Vache.

## GENERALITES

Les globulines immunes du lait sont accompagnées d'autres protéides dont il nous a paru indispensable de décrire les principales caractéristiques. Ce premier chapitre sera donc consacré, en premier lieu, aux protéides du lait, puis à des généralités sur les globulines du système gamma et enfin, à l'histoire de la question des globulines immunes du lait.

## I - LES PROTEIDES DU LAIT DE VACHE (\*)

Le lait contient des protéides dont la nature et les proportions varient suivant les Mammifères et, pour un même animal, suivant le stade de la sécrétion lactée. La classification des protéides du lait est généralement fondée sur la propriété que possèdent les caséines d'être facilement éliminées par simple acidification du lait préalablement délipidé. On obtient, de cette manière, une solution qui contient tous les autres constituants du lait et que l'on appelle le lactosérum. On distingue donc classiquement 1°) les caséines et 2°) les protéides du lactosérum.

La composition du lait de Vache en protéides a été déterminée par différentes méthodes (précipitation aux points iso-électriques des protéides ou fractionnement par les sels neutres ou par l'éthanol), mais les résultats les plus précis ont été obtenus par l'analyse électrophorétique. Nous avons rapporté dans le tableau III la répartition et les mobilités électrophorétiques des protéides du lait.

### A - LES CASEINES ( \* \* )

Les caséines sont les principaux constituants protéidiques des laits : elles représentent, en effet, 80 p.100 des protéides totaux du lait de Vache (45 p.100 des protéides totaux du lait de Femme). Elles furent longtemps classées parmi les phosphoprotéides, mais, depuis les travaux de CRAVICIOLO - MUNOZ et coll (7), on sait que les

---

( \* ) Revues générales : ALAIS ; BISERTE ; FONTAINE ; GARNIER ; KON et COWIE ; Mc MEEKIN ( 8 ) .

( \* \* ) Voir les revues générales c'ALAIS; d'ASCHAFFENBURG ; de BISERTE; de FONTAINE ; de MONTREUIL et de PYNE ( 9 ) .

TABLEAU III

Les protéides du lait de Vache : répartition ( \* ) et  
mobilité électrophorétiques ( \* \* )

	g p.100 g de protéides totaux	g de protéides p. 1 de lait	Mobilités électropho- rétiques (***) ( $\times 10^{-5}$ )
<u>Caséines</u>	80	30 $\pm$ 3	
Caséine $\alpha_s$	44	16,5	- 6,7
Caséine kappa	12	4,5	
Caséine $\beta$	21,6	8,1	- 3,1
Caséine $\gamma$	2,4	0,9	- 2
<u>Protéides du lactosé- rum</u>	20	7,5 $\pm$ 0,5	
$\alpha$ -lactalbumine	5	1,8	- 4,2
$\beta$ -lactoglobulines	10	3,7	- 5,1
Globulines immunes	2,5	1	-1,7 à 2,5
Protéides divers(****)	2,5	1	

( \* ) D'après ALAIS ( 10 )

( \* \* ) D'après Mc MEEKIN ( 11 )

( \* \* \* ) Les électrophorèses ont été effectuées, avec des solutions à 1 g p. 100 de protéides, en tampon véronal, de pH 8,4 et de force ionique 0,1.

( \* \* \* \* ) Lactotransferrine de GROVES (12) ; lactolline de GROVES et de GROVES, BASCH et GORDON ( 13 ) ; enzymes, etc...

caséines renferment des proportions variables d'hexoses, d'hexosamines et d'acides sialiques. Il s'agit donc de glycophosphoprotéides.

Les caséines les mieux connues sont celles du lait de Vache dans lequel elles se trouvent sous la forme de sels de calcium et on appelle caséinogènes ou caséinates de calcium ces formes naturelles, en réservant le nom de caséines aux substances préparées par acidification du lait.

La caséine du lait de Vache a été découverte, en 1838, par MULDER (14). Elle fut isolée et étudiée, dès la fin du siècle dernier, par HAMMARSTEN (15) qui la considérait comme une protéine homogène. Cependant, l'hétérogénéité de la préparation fut rapidement démontrée par OSBORNE et WAKEMAN (16), par LINDERSTROM-LANG et coll. (17), par CHERBULIEZ et coll. (18), par SVEDBERG et coll. (19), et par MELLANDER (20). Ce dernier caractérisa 3 constituants de mobilités électrophorétiques différentes qu'il appela caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et qui furent isolés ultérieurement par différents procédés. Enfin, l'étude du mécanisme de la coagulation de la caséine par la présure a permis de démontrer que la caséine  $\alpha$  de MELLANDER était hétérogène et qu'elle pouvait être fractionnée en deux groupes de constituants. Le premier est représenté par les "caséines non précipitables par le calcium" : caséine kappa et m de WAUGH et v. HIPPEL (21), caséines  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  de Mc MEEKIN, HIPPEL et GROVES (22), caséine  $\lambda$  de LONG, Van WINKLE et GOULD (23). Le second contient les "caséines précipitables par le calcium" : caséines  $\alpha_s$  de WAUGH et v. HIPPEL (24) ou caséine  $\alpha_1$  de Mc MEEKIN, HIPPEL et GROVES (25) ; caséine  $\alpha_r$ .

Les propriétés physico-chimiques de la caséine kappa sont particulièrement bien connues depuis les travaux d'ALAIS et de JOLLES et al. (voir, à ce propos, ALAIS (26)). Il s'agit d'un glycoprotéide contenant environ 5 p.100 de glucides totaux (galactose 1,3 à 1,6 p.100, galactosamine 1,22 à 1,73 p.100 et acide sialique 2,1 à 2,4 p.100), d'un poids moléculaire de 28 000 environ. Il est hydrolysé par la présure en deux fragments. L'un est un caséino-glycopeptide de poids moléculaire 8000, contenant 30 p.100 de glucides et une proportion

importante d'hydroxy-aminoacides. L'autre est une protéine insoluble, la paracaséine kappa, qui a perdu la propriété essentielle de la caséine kappa de stabiliser des micelles de caséines  $\alpha_S$  et  $\beta$ . La conséquence de cette modification de la caséine kappa par la présure est la coagulation du lait. En effet, dans le lait, les caséines sont associées en micelles de 40 à 300  $\mu$  formés par des complexes de la caséine kappa avec la caséine  $\alpha_S$ . En présence l'une de l'autre, trois molécules de caséine  $\alpha_S$  et une molécule de caséine kappa forment un complexe stable en suspension, auquel s'associe la caséine  $\beta$ . Le complexe est dissocié, et les caséines précipitent, sous l'action de la présure (hydrolyse de la caséine kappa) ou des sels de calcium (rupture du complexe des caséines  $\alpha_S$  et kappa).

#### Propriétés des caséines.

Les caséines du lait de Vache sont facilement précipitées en ajustant à pH 4,6, par l'addition d'acide chlorhydrique 1 N, le lait délipidé et préalablement dilué avec de l'eau au 1/5 de son volume (procédés de HAMMARSTEN ( 27 ) et de LINDERSTROM-LANG ( 28 ). Après un repos de 24 h, les caséines sont éliminées par filtration ou centrifugation. La solution obtenue constitue le lactosérum.

Les caséines sont insolubles dans l'eau et les solutions acides. Elles sont solubles en milieu alcalin.

Les principales propriétés physiques et chimiques des caséines sont rassemblées dans le tableau IV.

Seule la caséine kappa contient des glucides. D'après JOLLES et al. ( 29 ), le groupement osidique serait constitué par 3 enchaînements identiques :

Acide sialique  $\longrightarrow$  Gal  $\longrightarrow$  Gal NH Ac  $\longrightarrow$  acide aminé

ou par l'enchaînement unique suivant :

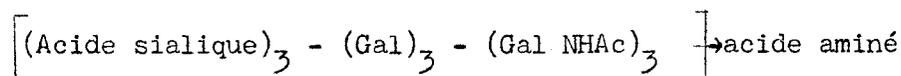


TABLEAU IV

Propriétés physico-chimiques des caséines du lait de Vache.

	N p.100	P p.100	Moles de P p. mole de caséine	pH <sub>i</sub>	PM	Mobilité électrophorétique
Caséine de HAMMARSTEN	15,6-15,7	0,81-0,83			75 000 à 100 000	
Caséine α	15,6	0,94	7	4,6-4,7		- 6
Caséine β	15,18-15,45	0,50-0,59	4 à 5	4,9	25 000	- 3,3
Caséine γ	14,3-15,4	0,11		5,8-6,4	30 000	- 2
Caséine α <sub>s</sub>	15,1-15,4	1,01	9	4,4	27 000	- 6
Caséine kappa	14,3-15,3	0,217	2	3,7	28 000 56 000 125 000	- 3,3

Le premier schéma de structure est très voisin de celui d'un glyco-protéide isolé du colostrum de Vache par KUHN et EKONG ( 30 )

### B - LES PROTEIDES DU LACTOSERUM.

Les premières études sur la composition en protéides du lactosérum de Vache, ont été effectuées, dès 1885, par SEBELIEN ( 31 ) qui isola, par fractionnement par des sels neutres, deux composés qu'il appela albumine et globuline. En 1936, PEDERSEN ( 32 ) isola, par ultracentrifugation, trois fractions :

- la fraction  $\alpha$  , de constante de sédimentation 1,8 S qui fut identifiée à l'  $\alpha$  -lactalbumine.

- la fraction  $\beta$  , de constante de sédimentation 3 S qui est la  $\beta$  -lactoglobuline

- la fraction  $\gamma$  , de constante de sédimentation 7 S constituées par les globulines immunes.

Plus tard, l'analyse électrophorétique révéla la complexité de la composition du lactosérum qui fut confirmée par l'isolement ou la caractérisation d'un nombre élevé de constituants protéidiques.

#### 1 - $\alpha$ -lactalbumine.

L'  $\alpha$  -lactalbumine a été isolée cristallisée par WICHMANN, en 1899 ( 33 ) et son nom lui a été donné par SVEDBERG ( 34 ). Elle a été identifiée au composant  $\alpha$  (  $S_{20w}$  1,9 ) des diagrammes d'ultracentrifugation de PEDERSEN.

L'  $\alpha$  -lactalbumine représente 20 à 25 p.100 des protéides du lactosérum (1,1 à 1,3 p. l de lait). Sa constante de sédimentation est de 1,75 et son poids moléculaire de 16 500 (  $\pm$  1000 ). Elle est insoluble dans l'eau entre pH 4,1 et 4,6 et dans les solutions de chlorure de sodium à 5 et 10 p.100 et dans l'éthanol à 70 p.100. Elle est soluble dans les solutions alcalines diluées et dans l'acide chlorhydrique 0,1 N . Elle est précipitée de ses solutions aqueuses par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (1,3 M) à pH 4 ou à

0,76 de saturation à pH 6. Elle n'est pas précipitée par le sulfate d'ammonium à 0,58 de saturation à pH 6.

## 2 - $\beta$ -lactoglobulines.

Les  $\beta$ -lactoglobulines A et B constituent 43 à 50 p.100 des protéides du lactosérum (2,4 à 3,2 g p. 1 de lait). Elles correspondent au composant  $\beta$  ( $S_{20w}$  3,1) de PEDERSEN ( 35 ). Leur constante de sédimentation est de 3,1, leur poids moléculaire de 36 000 (forme monomère) et leur point isoélectrique est de 5,09 pour la lactoglobuline A et de 5,23 pour la lactoglobuline B. Elles sont insolubles dans l'eau à pH 4,5 - 5,5 et dans l'éthanol à 50 p.100. Elles sont insolubles dans les solutions saturées de chlorure de sodium. Elles sont précipitées de leurs solutions aqueuses par le sulfate d'ammonium, à 0,8 de saturation à pH 6, mais non par le sulfate d'ammonium à demi-saturation pH7.

Les deux formes A et B de  $\beta$ -lactoglobulines peuvent être séparées par électrophorèse et les différences que l'on observe dans les mobilités électrophorétiques sont liées à la composition même des deux  $\beta$ -lactoglobulines : en effet, dans la lactoglobuline B, un reste d'acide aspartique et un reste de valine de la lactoglobuline A sont remplacés par un reste de glycofolle et par un reste d'alanine. (GORDON, BASCH et KALAN ; PIEZ et al. ; TOWNEND) ( 36 ).

La présence, dans les laits, des lactoglobulines A et B est déterminée génétiquement : un animal sécrète la globuline A ou B ou le mélange des deux globulines.

La forme B se trouve toujours à l'état de monomère ou de dimère, tandis que la forme A se polymérise en dimères et en tétramères dans la zone de pH 3,7 - 5,3.

Les  $\beta$ -lactoglobulines se combinent avec les sels ferriques en donnant des complexes riches en fer (jusqu'à 34,2 de fer p. 100 g de protéine) : les ferrilactines, à partir desquelles on les obtient cristallisées (ZWEIG et BLOCK ; BLOCK et al.) ( 37 ).

Récemment, un nouveau variant : la  $\beta$ -lactoglobuline C

a été identifié par BELL ( 38 ). Il se distingue de la  $\beta$ -lactoglobuline B par le remplacement d'un reste d'acide glutamique par un reste d'histidine (KALAN, GORDON, BASCH et TOWNEND) ( 39 ).

### 3 - "Protéine rouge" de GROVES et al. ( 40 ).

La présence d'une "protéine rouge" dans le lait de Vache a été signalée pour la première fois, en 1939, par SØRENSEN et SØRENSEN ( 41 ). GROVES ( 42 ) réussit, en 1960, à isoler ce protéide à l'état pur à partir des précipités de caséines. Il s'agit d'un glycoprotéide (7 p.100 d'hexoses, hexosamines et acides sialiques), de poids moléculaire 86 000, capable de fixer réversiblement le fer et qui est différent de la transferrine sérique par ses propriétés physico-chimiques (GORDON et al. ) ( 43 ) et immunologiques (DERECHIN et JOHNSON) ( 44 ). Il s'agit donc d'une lactotransferrine spécifique.

MONTREUIL et al. ( 45 ) ont isolé du lait de Femme une lactotransferrine spécifique qui possède, comme la "protéine rouge" de GROVES, la propriété de fixer réversiblement le fer mais s'en distingue par ses caractères physico-chimiques et par sa spécificité immunologique.

L'importance biologique de ces lactotransferrines est évidente. Ces métallo-protéides représentent, en effet, la forme spécifique de transport du fer dans les laits.

### 4 - Lactolline.

A partir des précipités de caséines du lait de Vache, GROVES et GROVES, BASCH et GORDON ( 46 ) ont préparé à l'état cristallisé, une protéine "basique" qu'ils ont appelée lactolline et dont ils ont précisé la composition en acides aminés ainsi que les propriétés physiques : son poids moléculaire est de  $42\ 900 \pm 5000$  ( $S_{20w}$  3,21 à pH 5 ; son point isoélectrique de 7,1).

### 5 - Protéines solubles de la "membrane" des globules lipidiques.

Deux glycoprotéides ( $S_{20w}$  9,05 et 17,6) contenant de

2,7 à 4,04 p.100 de glucides totaux (hexoses, fucose, hexosamines, acides sialiques) forment un complexe avec la riboflavine et l'acide phosphorique. Ils sont adsorbés à la surface des globules de graisses (70 mg de protéides p. 100 g de lipides) et prendraient part aux réactions d'oxydation des lipides : (HERALD et BRUNNER ; BRUNNER et THOMPSON) ( 47 ). En 1962, JACKSON, COULSON et CLARK ( 48 ) ont isolé un glycoprotéide des globules lipidiques et en ont décrit les propriétés :  $S_{20w}$  4,8 ; PM 123 000 ;  $pH_i$  4,2 ; hexoses 5,2 - 5,9 p.100 ; hexosamine 3,9 p.100 ; acide sialique 4 - 5 p.100 ; phosphore 0,68 p.100. COULSON et JACKSON( 49 ) ont étudié ses propriétés immunologiques et montré sa spécificité.

#### 6 - Enzymes. ( \* )

De faibles quantités des enzymes suivants ont été mis en évidence dans les laits :

- protéase, dont le pH optimum d'activité est de 9,2
- lactoperoxydase, isolée cristallisée par THEORELL et AKESON ( 50 ) ( 2mg p. litre de lait). Il s'agit d'un enzyme héminique de poids moléculaire 82 000 à 93 000.
- catalase
- amylase
- lactase
- lipases
- xanthine oxydase, métallo-flavoprotéide (NAD ; Mo ; Fe) de poids moléculaire 300 000.
- phosphatase alcaline, dont la destruction au cours de la pasteurisation représente un essai de contrôle de celle-ci
- lysozyme

#### 7 - Facteur antitrypsique du colostrum.

LASKOWSKI et LASKOWSKI ( 51 ) ont isolé par fractionnement

---

( \* ) Voir la revue générale de GARNIER ( 52 ) et les articles de HEYNDRIKX ( 53 ).

par le sulfate d'ammonium du filtrat de défécation trichloracétique du lactosérum, un inhibiteur de la trypsine. Le composé a été obtenu à l'état cristallisé. Ce serait un glycoprotéide, distinct de l'inhibiteur tryptique du suc pancréatique par ses propriétés physico-chimiques. Il est présent seulement dans les laits colostraux et jusqu'au 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour. Son rôle serait d'éviter l'hydrolyse des globulines immunes dans l'intestin et de permettre le passage des globulines immunes intactes au travers de la muqueuse intestinale (voir le paragraphe suivant).

#### 8 - Protéoses-peptones.

Les protéoses peptones de ROWLAND ( 54 ) sont des composés mal définis qui ne sont pas précipités à pH 4,6 après un chauffage de 30 mn à 95°C ; mais sont précipitées par l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Il s'agit de glycoprotides de  $S_{20w}$  0,8 et 2,8, contenant de 2,8 à 6,94 p.100 d'hexoses, 2 à 3,6 p.100 d'acide sialique et de 0,6 à 1,5 p.100 de phosphore.

#### 9 - Protéides sériques.

On sait depuis longtemps que les laits, en général, et le lait de Vache, en particulier, renferment une proportion importante de protéides sériques (15 p.100 environ des protéides du lactosérum). Ce sont essentiellement :

##### a - La sérumalbumine.

La présence de sérumalbumine dans le lait de Vache a été signalée, en 1932, par PESKETT et FOLLEY ( 55 ). Elle fut ultérieurement confirmée par les analyses électrophorétiques (les premières caractérisations furent effectuées par DEUTSCH ( 56 ), SMITH ( 57 ), STANLEY, WHITNAH et ANDREWS ( 58 ), HEYNDRICKS et al. ( 59 ), BISERTE et al. ( 60 ) et immunologiques (COULSON et STEVENS ( 61 ) ; voir aussi la figure 12; p.117). Elle fut isolée à l'état cristallisé par POLIS et al. ( 62 ) et par COULSON et STEVENS ( 63 ) qui démontrèrent que ses propriétés physico-chimiques étaient identiques à celles de la

sérumalbumine d'origine sérique. Elle représenterait de 4 à 5 p. 100 des protéides totaux du lactosérum.

b - Les globulines immunes, à l'étude desquelles nous nous sommes attachée et auxquelles nous consacrons les deux paragraphes suivants.

#### VARIATIONS DE LA COMPOSITION DU LAIT EN PROTEIDES AU COURS DE LA LACTATION.

La composition des laits en protéides varie avec l'âge et l'alimentation de l'animal. Toutefois, ces variations sont de faible amplitude et intéressent essentiellement l'industrie laitière. C'est pourquoi, nous renvoyons le lecteur aux revues générales ( \* ) qui concernent cette question pour nous attacher essentiellement aux modifications très importantes que subit la composition du lait au cours de la lactation. Cette dernière, en effet, passe par les stades suivants :

- 1 - La sécrétion anténatale se produit 1 à 2 mois avant la naissance et est riche en sels minéraux, en albumine et en globulines immunes.
- 2 - Le colostrum. Jusqu'au 12e jour, la glande mammaire sécrète un liquide très riche en protéides, principalement en globulines immunes et relativement pauvre en lactose ( \* \* ). Sa teneur élevée en lactoflavine lui confère une coloration jaunâtre.
- 3 - Le lait de transition est sécrété du 12e au 30e jour.

---

( \* ) Voir, en particulier, KON et COWIE ( 64 )

( \* \* ) Le colostrum de Femme renferme des proportions élevées d'osides qui constituent le "gynolactose" de POLONOVSKI et LESPAGNOL.

4 - Le lait parfait est sécrété au delà du 1er mois.

Au cours de cette évolution, le lait subit des modifications quantitatives très importantes qui portent principalement sur sa composition en glucides (augmentation progressive du taux de lactose) et en protéides. Ces dernières seront étudiées, d'une manière détaillée, dans les prochains chapitres.

## II - LES GLOBULINES IMMUNES.

Les réactions immunitaires mettent en jeu deux types distincts de composés : les antigènes et les anticorps, qui se définissent, l'un par rapport à l'autre, de la manière suivante : on appelle antigène toute substance dont la pénétration dans un organisme déclenche la formation d'un anticorps. En général, un anticorps est spécifique d'un antigène. Toutefois, il arrive qu'un anticorps réagisse avec plusieurs antigènes. On dira que ces derniers possèdent des "motifs antigéniques communs" et que la réaction immunitaire est "croisée".

Les anticorps sont présents dans le sang et dans les tissus, mais aussi dans des liquides d'excrétion comme l'urine et le lait. Jusqu'à présent, les études physico-chimiques des anticorps ont principalement porté sur les anticorps sériques et nous nous proposons de résumer l'essentiel des connaissances actuelles sur ce sujet. Nous ferons ensuite, dans un second paragraphe, le point de la question des globulines immunes du lait.

## 1 - LES GLOBULINES IMMUNES DU SANG ( \* )

Parmi les protéides sériques, les "  $\gamma$ -globulines" occupent une place privilégiée depuis que TISELIUS et KABAT ont démontré, en 1939, qu'elles étaient le support de l'activité anticorps. Cependant, malgré le nombre important de travaux dont elles ont fait l'objet, nos connaissances sur leurs propriétés physico-chimiques et sur leur structure sont encore très fragmentaires et concernent essentiellement un seul des trois groupes fondamentaux de globulines immunes, les globulines  $\gamma$ G. Encore convient-il de souligner que la représentation actuelle de la molécule de globulines  $\gamma$ G est une image "synthétique", une mosaïque constituée par des résultats acquis principalement à propos des globulines de l'Homme et du Lapin. On admet, en effet, qu'il existe un schéma général de structure des globulines immunes, et que la spécificité d'un anticorps est vraisemblablement portée, comme dans le cas des insulines, par de discrets détails d'architecture moléculaire et que les résultats acquis à propos des globulines d'une espèce pourront être étendus aux globulines d'autres espèces. Cependant, les travaux progressent avec une lenteur relative et les principales difficultés auxquelles se heurtent les chercheurs sont dues essentiellement à l'extraordinaire hétérogénéité des globulines immunes.

### A - HETEROGENEITE DES GLOBULINES IMMUNES.

#### NOMENCLATURE DES GLOBULINES IMMUNES.

La notion de  $\gamma$ - globulines est née à la suite de l'étude des protéides sériques effectuées en électrophorèse libre par TISELIUS, en 1937, qui les définissait comme un groupe de protéides dont la

---

( \* ) La connaissance des propriétés des globulines immunes étant le fruit de très nombreux travaux classiques, nous n'avons pas toujours fait figurer les noms des auteurs qui ont apporté leur contribution à l'établissement de certains faits et nous renvoyons le lecteur aux principales revues générales concernant le sujet : BISERTE ; BOYD ; COHEN et PORTER ; FAHEY ; GRABAR et BURTIN ; HEREMANS ; HUGUES ; KUNKEL ; PORTER ; PUTNAM ; SINGER ; STAUB et RAYNAUD ( 65 ).

vitesse de migration électrophorétique, à pH 8,6 était comprise entre 0,5 et 2,8  $\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-5} 10^{-5}$ . En 1939, TISELIUS et KABAT démontrèrent que les anticorps précipitants (ou précipitines) étaient localisés dans la fraction  $\gamma$ -globulinique, en étudiant la composition électrophorétique d'un immunosérum, avant et après la précipitation des anticorps par l'addition de l'antigène spécifique et en démontrant que le taux des  $\gamma$ -globulines avait considérablement diminué après la réaction de précipitation.

Très rapidement, on parvint à la conclusion que les  $\gamma$ -globulines représentaient un groupe hétérogène et, actuellement, on a substitué au terme de  $\gamma$ -globulines, l'expression de "globulines du système  $\gamma$ ", de "globulines immunes" ou d'immuno-globulines (HEREMANS).

L'hétérogénéité des globulines a été démontrée, à la fois, par l'électrophorèse, par l'ultracentrifugation, par l'immuno-électrophorèse, par la chromatographie et par l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.

#### 1° - Hétérogénéité électrophorétique.

L'asymétrie du pic des  $\gamma$ -globulines en électrophorèse libre s'explique par la présence de constituants qui possèdent des mobilités électrophorétiques différentes et que l'électrophorèse préparative a permis de caractériser et d'isoler. A la suite des travaux de DEUTSCH, en 1956, deux zones électrophorétiques fondamentales ont été distinguées: l'une correspond au groupe des  $\gamma$ -globulines "lentes" ou  $\gamma_2$ -globulines ; l'autre au groupe des  $\gamma$ -globulines "rapides" ou  $\gamma_1$ -globulines. Ces dernières ont encore été appelées  $\beta_2$ -globulines ou T-globulines.

#### 2° - Hétérogénéité à l'ultracentrifugation.

L'ultracentrifugation des globulines du système gamma a conduit MULLER-EBERHARD, KUNKEL et FRANKLIN à distinguer deux groupes de  $\gamma$ -globulines : les unes possèdent une constante de sédimentation de 7 S et sont appelées  $\gamma_{7S}$  ou  $\gamma_{SS}$  globulines ( \* ) ; les autres

---

( \* ) SS signifiant "seven S".

possèdent une constante de sédimentation de 19 S et sont appelées  $\gamma_{19S}$  - globulines ou  $\gamma_{1M}$ -globulines ( \* ) .

Nota. Dans le sérum, et plus particulièrement dans les urines, ont été caractérisées ou isolées des  $\gamma$ -globulines de faible constante de sédimentation (3,5 - 4 S). On les appelle "microglobulines" ou "protéines  $\gamma_{\mu}$ " ou "chaînes L". A ce type de globulines se rattachent les protéines urinaires pathologiques de BENCE-JONES.

### 3° - Hétérogénéité immunoélectrophorétique.

L'analyse immuno-électrophorétique a singulièrement éclairci la question de l'hétérogénéité des globulines du système  $\gamma$  . On sait, en effet, à présent, qu'il existe 3 types fondamentaux de globulines immunes antigéniquement différents dont l'existence se manifeste sur les immunophorégrammes par la présence de 3 arcs nettement individualisés, et on distingue :

- a - l'antigénicité  $\gamma$  proprement dite ou  $\gamma G$  (\*\*), portée par les globulines "lentes" (ou  $\gamma_2$ -globulines, ou  $\gamma_{7S}$ -globulines).
- b - l'antigénicité  $\beta_{2A}$  ou  $\gamma_{1A}$  ou  $\gamma A$  ( ++ ) portée par des globulines "rapides" de constante de sédimentation 7S.
- c - l'antigénicité  $\beta_{2M}$  ou  $\gamma_{1M}$  ou  $\gamma M$  ( \*\* ), portée par les globulines "rapides" macromoléculaires, de constante de sédimentation 19 S.

### 4° - Hétérogénéité chromatographique.

L'application de la chromatographie sur échangeurs d'ions ou sur gel de dextrans permet d'isoler les différents groupes de globulines immunes.

( \* )  $\gamma_{1M}$  rappelle le comportement électrophorétique  $\gamma_1$  de ces globulines et M précise leur nature macromoléculaire.

( \*\* ) La nomenclature  $\gamma G$ ,  $\gamma A$  et  $\gamma M$  que nous avons adoptée est celle qui a été proposée à Prague, en mai 1964, au cours du "Meeting on Nomenclature of Human Immunoglobulins sponsored by the World Health Organization" (Bulletin of the World Health Organization) ( 66 ).

Par exemple, les globulines  $\gamma G$  et  $\gamma A$  sont déplacées de la DEAE-cellulose par le passage de tampons phosphatés aux concentrations suivantes : 0,005 et 0,01 M pour les  $\gamma G$  ; 0,02 M et 0,35 M pour les  $\gamma A$ . D'autre part, la chromatographie sur Sephadex G 200 permet d'obtenir d'excellentes séparations des globulines 19 S, 7 S et 4 S.

Toutefois, la notion d'hétérogénéité des globulines immunes ne se limite pas à la classification de ces substances en 3 groupes fondamentaux, car la chromatographie a révélé l'hétérogénéité même de chacun de ces groupes. En effet, la chromatographie sur DEAE-cellulose des globulines  $\gamma G$  permet, par exemple, de réaliser un "découpage" plus ou moins profond de ce groupe et d'obtenir des sous-fractions qui sont différentes par leurs propriétés physico-chimiques (électrophorèse, composition en glucides et en amino-acides) (voir, à ce sujet BISERTE, HAVEZ, DAUTREVAUX, LEROY et VALDIGUIE) ( 67 ). Il semble, a priori, que le nombre des fractions puisse être augmenté à l'infini et aucune tentative n'a été faite pour classer ou pour désigner chacune de ces fractions aux propriétés physico-chimiques fuyantes et mal définies. Cependant, à la suite des travaux de FAHEY, Mc COY et GOULIAN ( 68 ) et FAHEY et HORBETT ( 69 ) on a admis l'existence de deux sous-groupes de globulines  $\gamma G$  : les globulines  $\gamma G$  "lentes", de comportement électrophorétique plus cathodique que celui des globulines  $\gamma G$  "rapides". L'isolement de ces deux groupes de globulines est aisément réalisé par chromatographie sur DEAE-Sephadex qui tire parti d'une légère différence de poids moléculaire ( $S_{20w}$  des  $\gamma G$  "rapides" = 6,2 ; des  $\gamma G$  "lentes" = 6,5).

##### 5° - Hétérogénéité physico-chimique.

Les propriétés physico-chimiques des 3 groupes fondamentaux de globulines immunes  $\gamma G$ ,  $\gamma A$  et  $\gamma M$  sont très nettement différentes et le tableau VII est, à cet égard, très démonstratif. Elles seront exposées en détail dans un prochain paragraphe (voir p. 30 ).

## 6° - Hétérogénéité biologique.

L'hétérogénéité physico-chimique et immunochimique des globulines immunes peut s'expliquer par le rôle même que jouent ces substances. En effet, un anticorps étant spécifique d'un antigène, on peut admettre qu'il existe, dans le sang d'un individu, autant d'entités physico-chimiques "anticorps" que d'antigènes à l'agression desquels l'individu a été soumis. Les premières expériences de localisation d'activités anticorps dans des fractions isolées à partir de préparations de globulines immunes sont en faveur de cette conception. On voit, en effet, à l'examen du tableau V (voir p. 26), que les activités anticorps sont portées par des fractions bien distinctes de globulines immunes. Mais la question se complique par le fait qu'un même antigène peut provoquer la formation d'anticorps appartenant à deux des trois groupes fondamentaux de globulines immunes et même aux trois groupes !

A cette hétérogénéité qui est liée au rôle des anticorps, et que nous pourrions appeler "hétérogénéité immunitaire", s'ajoute une "hétérogénéité génétique" qui se manifeste par l'existence d'allotypes.

### Conclusions.

1 - La notion d'hétérogénéité des globulines immunes est actuellement bien démontrée. Elle n'est toutefois pas encore nettement définie. La pluralité des nomenclatures proposées jusqu'à présent est très significative et l'accord est loin d'être fait sur les terminologies à employer. Certains auteurs se fondent sur le comportement électrophorétique, d'autres sur les diagrammes immunoélectrophorétiques, d'autres encore sur les résultats de l'ultracentrifugation. Récemment, une tentative a été faite pour unifier la désignation des 3 groupes fondamentaux de globulines immunes : la lettre  $\gamma$  précise l'appartenance à la famille des immunoglobulines ; chaque groupe est ensuite défini par une lettre : G pour les globulines  $\gamma_{7S}$  ; A pour les globulines  $\gamma_{1A}$

Tableau V

Répartition de quelques activités anticorps sur les trois groupes de globulines immunes ( \* )

	Y G	Y A	Y M
Diphthérie	+ + +	+ +	+
Tétanos	+ +	+	+ +
Typhoïde H	+ +	+	+ +
Typhoïde O	+	+ +	+ + +
Paratyphoïde B	+	+	+ + +
Pertussis	+		
Polyomyélite types I et III	+ +	+ +	+ +
Isoagglutinines a et b		+	+ + +

( \* ) D'après SCHULTZE ( 70 ) . Voir aussi HEIDE ( 71 ) .

ou  $\beta_{2A}$  ; M pour les globulines "macromoléculaires"  $\gamma_{1M}$  ou  $\beta_{2M}$ .  
 Nous avons rassemblé dans le tableau VI les différentes synonymies.

2 - On conçoit donc aisément que les propriétés physico-chimiques des  $\gamma$ -globulines soient encore mal définies et que les résultats acquis par les différents auteurs soient souvent discordants. Il serait d'ailleurs illusoire d'espérer obtenir des caractéristiques précises car chaque individu possède, en principe, son propre système gamma-globulinique qui est constitué, en proportions variables, de nombreux anticorps différents et dont les propriétés sont une moyenne des propriétés de chacune de ces entités immunologiques.

Les propriétés physico-chimiques des globulines immunes que nous nous proposons de décrire dans un prochain paragraphe ne seront donc pas absolues et ne représenteront que des ordres de grandeurs.

#### B - METHODES DE PREPARATION DES GLOBULINES IMMUNES.

Les procédés de préparations des globulines immunes sont des procédés généraux applicables à l'isolement des globulines immunes de toutes les espèces.

##### 1 - Méthodes non spécifiques.

###### a - Relargage par les sels neutres.

Le sulfate d'ammonium est le plus généralement employé. Les globulines  $\gamma G$  précipitent dans la fraction à 0,33 de saturation (à pH 7 et à 0°C) et les globulines  $\gamma A$  dans la fraction à 0,33-0,45 de saturation. On obtient, de cette manière, des préparations enrichies en globulines mais souillées de protéides divers. Ce procédé représente donc un excellent "fractionnement de base", mais doit être associé à d'autres méthodes, comme la chromatographie sur échangeurs d'ions, pour obtenir des globulines immunes à l'état pur.

Tableau VI

Synonymie des termes utilisés pour désigner les anticorps.

<p>Anticorps Globulines immunes Immunoglobulines Globulines <math>\chi</math> de TISELIUS (*) Globulines du système <math>\chi</math></p>	<p>Globulines <math>\chi</math> "rapides" Globulines <math>\chi_1</math> Globulines <math>\beta_2</math> T-globulines</p>	<p>Globulines <math>\beta_{2A}</math> Globulines <math>\chi_{1A}</math> IGA <math>\chi_A</math>  Globulines <math>\chi_{19S}</math> Globulines <math>\beta_{2M}</math> Globulines <math>\chi_{1M}</math> IGM <math>\chi_M</math></p>
	<p>Globulines <math>\chi</math> "lentes" Globulines <math>\chi_2</math></p>	<p>Globulines <math>\chi_{7S}</math> Globulines <math>\chi_{SS}</math> IGG <math>\chi_G</math>  Globulines <math>\chi_{6,2S}</math> "rapides"  Globulines <math>\chi_{6,5S}</math> "lentes"</p>

( \* ) Les protéides qui constituent la fraction  $\chi$ -globulinique de TISELIUS ne sont pas tous des globulines immunes.

b - Fractionnement par les solvants neutres.

COHN et coll. ( 72 ) ont décrit un procédé de fractionnement des protéides plasmatiques par l'éthanol, à des concentrations variables et à des forces ioniques et à des pH rigoureusement contrôlés. Les anticorps se retrouvent dans les fractions II et III (éthanol à 25 p.100 ; pH 6,9 ; - 5°C ;  $\mu$  0,09) ( \* ). Le sous-fractionnement éthanolique de cette dernière fournit des préparations enrichies en globulines immunes : la fraction II<sub>2</sub> contient 98 p.100 de globulines  $\gamma$  G pseudoglobuliniques ; la fraction II<sub>3</sub>, 96 p.100 de globulines  $\gamma$  G euglobuliniques ; la fraction III, 15 p.100 de globulines  $\gamma$  G, 33 p.100 de globulines  $\beta$  <sub>1</sub> et 34 p.100 de globulines  $\beta$  <sub>2</sub> .

La méthode de COHN , comme les procédés de relargage par les sels neutres, ne fournit donc pas de préparations pures de globulines immunes et représente, elle aussi, un excellent fractionnement de base, prélude à la chromatographie préparative.

c - Méthodes chromatographiques.

La chromatographie sur résines échangeuses d'ions ou sur phosphate de calcium a été préconisée pour préparer les globulines immunes. Elle a été généralement abandonnée au profit de la chromatographie sur celluloses modifiées (DEAE- , CM- , phosphoryl-, SM-celluloses) ou sur gels de Sephadex. L'application de ces dernières méthodes au sérum lui-même ne conduit pas toujours à des préparations très pures. En outre, les quantités obtenues sont relativement faibles. Aussi, ce procédé est-il employé en association avec les procédés précédents de relargage par les sels neutres ou de fractionnement par l'éthanol.

---

( \* ) La fraction I est obtenue par précipitation par l'éthanol à 8 p.100 (pH 7,2 ; - 3°C ;  $\mu$  0,14) : elle est constituée du fibrinogène et du facteur antihémophilique.

#### d - Techniques électrophorétiques.

L'électrophorèse préparative en veine liquide ou sur support inerte a été très utilisée, mais elle est pratiquement abandonnée actuellement à cause des rendements faibles qu'elle fournit. Elle a toutefois eu le mérite de montrer l'hétérogénéité de la répartition des anticorps dans les diverses fractions électrophorétiques.

#### 2 - Méthodes spécifiques.

Le principe des méthodes spécifiques est fondé sur l'isolement de la combinaison de l'anticorps avec l'antigène, puis sur la dissociation de celle-ci, soit en milieu acide, à des pH variant de 1 à 3,5, soit en milieu basique (solutions saturées de chaux ou de baryte).

Ces méthodes restent d'application très délicate. En outre, elles conduisent souvent à des mélanges de deux ou de trois types d'anticorps et les rendements en globulines immunes sont de l'ordre de 10 à 50 p.100 seulement.

#### C - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES GLOBULINES IMMUNES.

Jusqu'à présent, les recherches ont principalement porté sur les globulines immunes du sang humain et nous avons rassemblé dans le tableau VII, à titre comparatif, les propriétés physico-chimiques des trois groupes fondamentaux de globulines immunes : YG, YA et Y M. Il s'agit, rappelons-le, de valeurs moyennes qui présentent, suivant les auteurs, des variations importantes et nous en avons exposé plus haut les raisons. Toutefois, des conclusions générales peuvent être tirées. On voit, en effet, que les trois groupes fondamentaux de globulines immunes, antigéniquement distincts, possèdent des propriétés physico-chimiques nettement différentes, principalement en ce qui concerne les poids moléculaires, les mobilités électrophorétiques et les teneurs en glucides.

Tableau VII

Propriétés physiques et composition chimique des globulines immunes sériques humaines (\*)

	$\gamma$ G	$\gamma$ A	$\gamma$ M
g p. litre de sérum	12 à 15	1 à 4	1
$S_{20w}$	6,6	6,6 et plus	19
Poids moléculaire	160000 $\pm$ 8000	160000 $\pm$ 8000	930000 $\pm$ 46500
pHi	6,2 à 7,3	4,8 à 6,5	5,5 à 7,4
Mobilité électrophorétique (**)	+ 0,6 à - 3	- 1,2 à -3,6	- 0,5 à - 2,3
<u>Glucides</u> (en g p.100 de protéide)			
Hexoses p.100	1,1 - 1,2	3,2 à 4,9	5,2 à 6,2
Fucose p.100	0,3	0,2 à 0,22	0,62 à 0,7
Hexosamines p.100	1,1 à 1,4	2,9 à 3,8	2,9 à 4,4
Acides sialiques p.100	0,2 à 0,22	1,7 à 1,8	1,3 à 2
Glucides totaux p.100	2,7 à 3,12	8 à 10,72	10,2 à 13,3
<u>Acides aminés</u> (en g p.100 g de protéides) (***)			
Acide aspartique	7,69	6,15	7,12
Acide glutamique	11,26	10,52	10,62
Arginine	4,02	4,55	5,05
Histidine	2,28	1,93	1,83
Lysine	6,96	4,57	4,88
Alanine	3,18	3,87	3,51
Cystine/2	2,20	2,10	1,58
Glycocolle	3,35	3,22	3,06
Isoleucine	2,14	1,74	2,70
Leucine	7,21	7,76	6,33
Méthionine	0,85	0,80	1,16
Phénylalanine	4,29	3,66	3,96
Proline	6,05	6,26	5,27
Sérine	9,69	7,93	6,95
Thréonine	7,18	7,65	7,23
Tryptophanne	3,83	3,30	2,80
Tyrosine	5,97	4,38	4,21
Valine	8,10	6	6,49
Acides aminés N-terminaux	Asp, Glu(0,92 : 0,91)	-	Asp, Glu
Acides aminés C-terminaux	Ser, Gly	-	-

(\*) Voir les revues générales mentionnées à la p. 21.

(\*\*) en  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1} 10^{-5}$

(\*\*\*) HEIMBURGER, HEIDE, HAUPT et SCHULTZE (73)

## D - STRUCTURE DES GLOBULINES IMMUNES.

Nos connaissances actuelles de la structure des globulines immunes se limitent essentiellement aux globulines  $\gamma$  G de l'Homme et du Lapin. Elles sont beaucoup plus fragmentaires en ce qui concerne les globulines  $\gamma$  A et  $\gamma$  M.

### 1 - Structure de la protéine.

La principale difficulté que l'on rencontre dans l'exploration de la structure de la fraction protéique des globulines immunes est apportée par l'impossibilité où l'on se trouve généralement de préciser la nature et le nombre des acides aminés N- et C-terminaux (voir, par exemple, le cas des globulines bovines ; p. 204 ). Ces résultats peuvent s'expliquer, à la fois, par l'hétérogénéité des globulines immunes et par l'existence possible de fonctions terminales  $\text{NH-CO-CH}_3$  et  $\text{CONH}_2$ . Toutefois, les auteurs sont parvenus à la conclusion qu'il existait plusieurs amino-acides en position N-terminale dans les molécules de globulines immunes et, depuis de nombreuses années, on admet que ces dernières possèdent plusieurs chaînes polypeptidiques.

Actuellement, le schéma de structure illustré par la figure 1 ( p. 34 ) est universellement adopté. Il nous est impossible, dans le cadre de cette étude, de décrire en détail les nombreux travaux expérimentaux qui ont permis de parvenir à cette représentation de la molécule de globuline immune  $\gamma$  G et nous nous bornerons à résumer les principaux résultats qui sont en faveur de ce schéma structural.

Il s'agissait, pour les chercheurs, de résoudre un problème apparemment paradoxal : celui de la structure de trois classes de substances hétérogènes qui possédaient néanmoins des relations antigéniques. Il a été abordé par l'application de deux séries de procédés de dégradation susceptibles de livrer les motifs antigéniques communs et les motifs antigéniques différents : procédés enzymatiques et procédés chimiques.

a - Dégradation enzymatique des globulines immunes.

L'hydrolyse papaïnique des globulines  $\gamma$  G de Lapin fournit 3 fragments de constante de sédimentation 3,5 S qui peuvent être séparés par chromatographie sur colonnes de CM - cellulose. Ils sont désignés par leur ordre d'élution sous le nom de fragments I, II et III (PORTER).

Les fragments I (PM : 50 000) et II (PM : 53 000) sont semblables du point de vue chimique et biologique. Chacun possède le pouvoir de se combiner à un antigène, - sans toutefois le précipiter-, d'une manière "univalente" et porte donc un seul site de combinaison avec l'antigène.

Le fragment III cristallisable, d'un poids moléculaire de 80 000, renferme la fraction glucidique, est antigéniquement différent des fragments I et II et ne possède aucune "activité anticorps".

Des résultats identiques ont été obtenus avec les globulines  $\gamma_{7S}$  humaines et murines. La papaïne, en effet, fournit des fragments 3,5 S dont l'un (fragment S) possède une vitesse de migration plus faible que l'autre (fragment F) (\*). Ils ont été identifiés, respectivement, aux fragments I et II, d'une part et au fragment III d'autre part.

L'électrophorèse en gel d'amidon montre que chacun des fragments est hétérogène, d'une part, et que, d'autre part, les images électrophorétiques sont différentes d'une espèce à l'autre et, pour une espèce donnée, d'un type d'anticorps à un autre.

b - Dégradation chimique des globulines immunes.

L'existence de plusieurs chaînes peptidiques, dans les molécules de globulines immunes, soupçonnée depuis la détermination des acides aminés N-terminaux, a été démontrée à la suite des travaux de EDELMAN et al. , de FRANEK et de PHELPS et al..

---

(\*) De nombreuses terminologies ont été proposées pour désigner les fragments de clivage papaïnique. Les synonymies sont les suivantes :

Fragments I et II	: S, A, A + C
Fragment III	: F, B

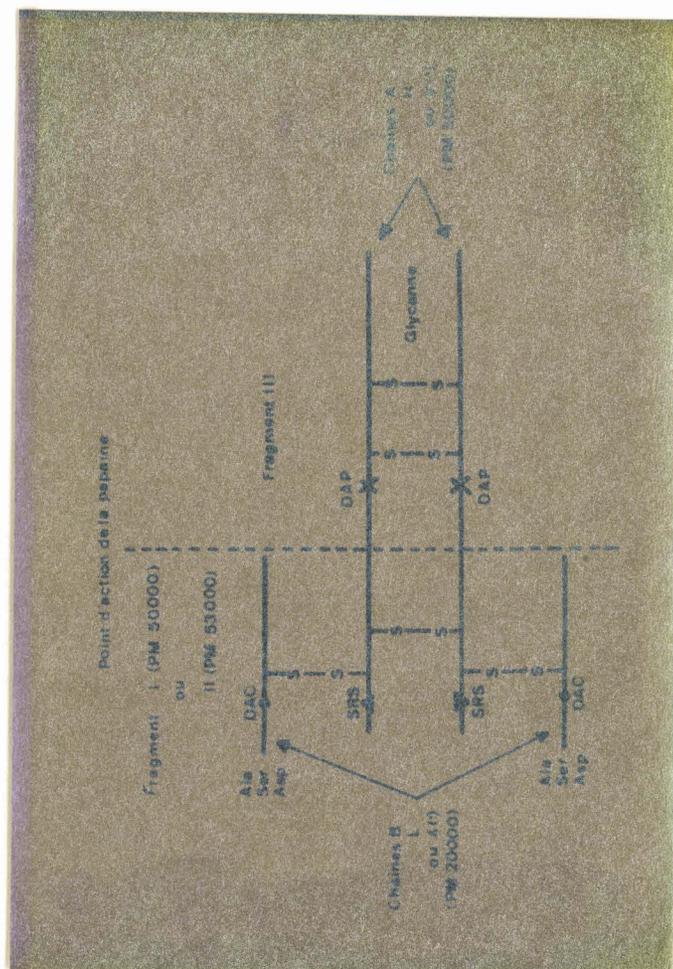


Figure 1

Schéma de structure des globulines  $\gamma G$  (d'après FLEISCHMAN, PORTER et PRESS) (74).

Ces auteurs ont observé que les solutions concentrées d'urée (6 à 8 M) ou l'oxydation performique provoque un effondrement du poids moléculaire qui tombe à 50 000 environ.

Le perfectionnement des procédés de rupture des ponts disulfure, par réduction puis alkylation, permet d'obtenir des chaînes peptidiques de deux types qui peuvent être séparées par chromatographie sur Sephadex. L'une, d'un poids moléculaire de 50 000, est appelée "chaîne A" ou "chaîne H" (Heavy chain) (\*). Elle donne une réaction croisée avec le fragment III, mais non avec les fragments I et II. La chaîne H et le fragment papainique III portent le génotype spécifique du déterminant génétique Gm. L'autre chaîne d'un poids moléculaire de 20 000, est appelée "chaîne B" ou chaîne L (Light chain) (\*). Elle donne une réaction d'identité partielle avec les fragments papainiques I et II et porte les déterminants génétiques I et II.

D'après les rendements en produits de dégradation (chaîne H : 70 p.100, chaîne L = 30 p.100 ; fragment I et II = 2/3 de la molécule), on admet, mais la démonstration n'en a pas été apportée, que la molécule de globuline YG est constituée par l'association par des ponts disulfure (15 au total) de 2 chaînes H et de 2 chaînes L. Toutefois, il ne peut s'agir que d'une hypothèse de travail. En effet, on ignore

1 - le nombre réel de chaînes. Certains auteurs ont, par exemple, proposé la structure à 6 chaînes schématisée dans la figure 2 (p. 36).

2 - la composition en amino-acides et la nature et le nombre des amino-acides N-terminaux de chacune des chaînes.

3 - si les chaînes isolées sont homogènes, car le seul critère applicable, à cause de leur solubilité exclusive dans les

(\*) Nomenclature proposée par le Bulletin of the World Health Organization ( 75 ) :

Chaîne H = chaîne  $\gamma$  ,  $\beta$  ou  $\mu$  suivant le groupe de globulines immunes (respectivement YG, YA, YM)

Chaîne L = chaîne  $\chi$  ou  $\lambda$ .

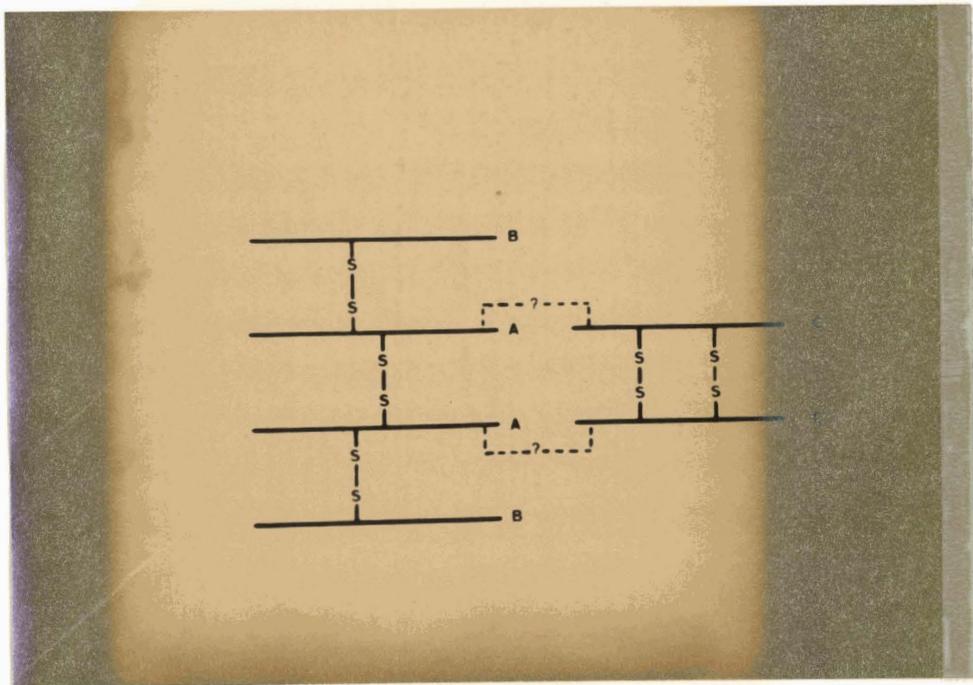


Figure 2

Schéma de structure à 6 chaînes peptidiques des globulines  $\gamma G$   
(d'après COHEN et PORTER) (76).

solutions d'urée, est l'électrophorèse en gel d'amidon.

4 - Les proportions relatives exactes des deux chaînes.

#### Signification des fragments I et II.

Des recherches effectuées dans le domaine des globulines pathologiques de BENCE-JONES ont permis de distinguer deux groupes de globulines immunes humaines antigéniquement distincts : les globulines immunes du type I (2/3 des  $\gamma$ G normales) et du type II (1/3 des  $\gamma$ G normales). Le motif antigénique est porté par la chaîne L du fragment S. On est donc amené à distinguer, d'une part, le fragment  $S_I$  porteur des chaînes  $L_I$  et, d'autre part, le fragment  $S_{II}$  porteur des chaînes  $L_{II}$ . Chacun de ces fragments est commun aux trois types de globulines  $\gamma$ G,  $\gamma$ A et  $\gamma$ M et ces dernières se différencient par le fragment F porteur du déterminant spécifique de chaque classe de globulines immunes (voir fig. 1 ; p. 34).

Les chaînes  $L_I$  et  $L_{II}$  possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. En particulier, elles ont des comportements électrophorétiques distincts.

#### Conclusions.

Les résultats que nous venons d'exposer peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - La fraction protéique des globulines immunes semble formée par 4 chaînes unies par des ponts disulfure : 2 chaînes L (ou B) et 2 chaînes H (ou A).

2 - Les chaînes L sont communes aux 3 types fondamentaux de globulines immunes  $\gamma$ G,  $\gamma$ A et  $\gamma$ M. Elles portent les déterminants antigéniques communs aux 3 groupes de globulines immunes dépendant du système génétique Inv. Il en existe 2 types antigéniquement distincts :  $L_I$  et  $L_{II}$  qui déterminent l'existence de deux types de globulines immunes : les types I et II.

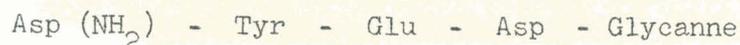
3 - Les chaînes H, de nature glycoprotidique, sont spécifiques de chacun des 3 groupes de globulines immunes et l'on

distingue les chaînes  $H_{\gamma G}$  ou  $\gamma$  ; les chaînes  $H_{\gamma A}$  ou  $\alpha$  et les chaînes  $H_{\gamma M}$  ou  $\mu$ . Elles portent les déterminants antigéniques particuliers à chacun des 3 groupes de globulines immunes dépendant des systèmes génétiques Gm pour les globulines  $\gamma G$ , Am pour les globulines  $\gamma A$  et Mm pour les globulines  $\gamma M$ . En outre, elles contiennent le site anticorps réactif.

4 - Les globulines  $\gamma G$  et  $\gamma A$  posséderaient le même schéma de structure assimilé à celui d'un "monomère", tandis que les globulines  $\gamma M$  seraient constituées par l'association de 6 "monomères" unis par des ponts disulfure.

## 2 - Structure du groupement glycanique.

Seul le groupement glycanique des globulines  $\gamma G$  humaines a été étudié jusqu'à présent. Il est constitué de galactose, mannose, fucose, N-acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique dans les proportions molaires suivantes : 5 : 3 : 2 : 10 : 1 (ROSEVAER et SMITH ( 77 ) ). Il est attaché sur le fragment III (fragment F) de la molécule. Selon ROSEVAER et SMITH ( 78 ) et NOLAN et SMITH ( 79 ), la liaison glucide-protéine se ferait par l'intermédiaire de la N-acétylglucosamine et de l'acide aspartique et la séquence peptidique suivante a été proposée par les auteurs :



Récemment CLAMP et PUTNAM ( 80 ) ont isolé des hydrolysats pronasiques de globulines  $\gamma G$  humaines un glycopeptide d'un poids moléculaire de 2 300. Ce résultat implique l'existence de 2 unités polyosidiques par molécule de globulines  $\gamma G$ . Selon les auteurs, les osides posséderaient une structure ramifiée puisque 3 résidus de N-acétylneuraminique seraient en position terminale non réductrice; les trois derniers attachés à des résidus de galactose. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de MONTREUIL, CHOSSON et SPIK ( 81 ) qui ont observé, au cours des hydrolyses acides de globulines  $\gamma G$  humaines, une libération préférentielle

de l'acide N-acétylneuraminique, du fucose et du galactose tandis que le mannose apparaît plus tardivement et se trouve donc en position plus interne dans la molécule. Ces auteurs ont, en outre, identifié la N-acétyllactosamine, parmi les produits de l'hydrolyse acide ménagée des globulines  $\gamma$ G humaines

## 2 - LES GLOBULINES IMMUNES DU COLOSTRUM

ET

### L'IMMUNISATION PASSIVE PAR LE LAIT.

L'immunisation d'un individu peut être réalisée de deux manières. Dans un premier cas, l'organisme réagit contre la pénétration d'un antigène en fabriquant lui-même ses anticorps. Il s'agit alors d'une immunisation active, comme la réalise la vaccinothérapie. Dans l'autre cas, les anticorps eux-mêmes sont introduits dans l'organisme. Il s'agit alors d'une immunisation passive, telle qu'elle est obtenue par la sérothérapie.

L'existence d'un phénomène d'immunisation passive transmise par la mère aux Mammifères nouveaux-nés est connue depuis longtemps, puisque la première observation remonte à 1799, quand HUFELAND ( 82 ) remarqua que la descendance de vaches qui avaient été atteintes du "small pox" était réfractaire à cette maladie. HUFELAND, dès cette époque, suggéra que le lait jouait un rôle dans cette protection immunitaire. BURCKHARDT ( 83 ) et RICHET ( cité par BURCKHARDT ) obtinrent des résultats identiques en 1879. Les auteurs inoculèrent le "small pox" ovin à des brebis, 6 semaines avant la fin de la gestation, et observèrent que les agneaux résistaient à la maladie. Par la suite, les expériences se multiplièrent et confirmèrent la transmission par la mère à sa descendance d'une résistance à diverses affections : anthrax

de la Brebis (CHAUVEAU, 1880) ( 84 ), de la Vache (ARLOING et al. , 1882) ( 85 ) et du Cobaye (KITASATO, 1890) ( 86 ) ; rage du Chien (HOEGYES, 1889) ( 87 ). Depuis, un nombre considérable de travaux ont été effectués qu'il nous est impossible de rapporter en totalité dans notre mémoire. Nous nous limiterons à la description de quelques expériences démonstratives, en renvoyant le lecteur à l'excellente revue générale de CAMPBELL et PETERSEN ( 88 ).

L'immunisation du Mammifère nouveau-né fut d'abord regardé comme un mécanisme héréditaire, mais on sait actuellement que l'immunisation est réalisée, soit par la voie transplacentaire, soit par la voie buccale, -et dans ce cas les anticorps sont apportés par le lait -, soit par les deux voies successivement.

#### A - L'IMMUNISATION PASSIVE TRANSPLENTAIRE.

Chez l'Homme l'immunisation passive in utero de l'enfant par la mère, par la voie transplacentaire, est un phénomène bien connu. Toutefois, il n'est pas général chez les Mammifères et il n'a lieu que si le placenta est "perméable" aux anticorps, comme c'est le cas pour l'Homme, le Lapin, le Cobaye, le Singe. Chez d'autres espèces, comme le Porc, le Cheval, la Chèvre et la Vache, le placenta constitue une véritable barrière qui s'oppose au passage des anticorps maternels. Ces animaux, à la naissance, sont agammaglobulinémiques et nous verrons plus loin que les anticorps leur sont apportés par le colostrum pendant les deux premiers jours de leur vie. L'importance de celui-ci sera donc en relation étroite avec la structure du placenta (Tableau VIII ; p. 41 )

La transmission placentaire des anticorps chez l'Homme a été mise en évidence, en 1923, par KUTNER et RATNER ( 89 ). Ces auteurs, en effet, ont montré que le sang de jeunes enfants non immunisés contre la diphtérie, ne renfermait pas d'antitoxine, tandis que le sang d'enfants de mères immunisées contenait, à la naissance, beaucoup plus d'antitoxine que le propre sang maternel, avant toute ingestion de colostrum. A la suite de cette observation KUTNER et RATNER conclurent au transfert des anticorps par le placenta.

Tableau VIII

Relation entre la structure du placenta et le mode de transfert passif des globulines immunes de la mère au foetus ou au nouveau-né (d'après VAHLQUIST) ( 90 ) .

	Nombre de couches entre les circulations maternelle et foetale à terme	Transmission placentaire ou amniotique	Importance du colostrum
Porc	6	0	+++
Ruminants	5	0	+++
Carnivores	3	<u>±</u>	+
	2	+ (sac vitellin)	<u>±</u>
	2	+++ (placentaire)	0
Homme	2	+++ (placentaire)	0

Le phénomène de cette transmission a été particulièrement bien étudié chez l'Homme où l'on a montré que la diffusion des anticorps commençait vers le 5e mois de la vie foetale et qu'elle était très sélective. En effet, seules sont transmises de la mère au foetus les globulines  $\gamma G$  à l'exclusion des globulines  $\gamma A$  et  $\gamma M$  (HITZIG ; FRANKLIN et KUNKEL ; GITLIN et al. ) ( 91 ). Il n'est donc pas surprenant que l'analyse immuno-électrophorétique révèle la présence exclusive, dans les sérums des enfants nouveaux-nés, de globulines  $\gamma G$  (SCHEIDEGGER et MARTIN DU PAN) ( 92 ).

Les globulines  $\gamma M$  et  $\gamma A$  apparaissent, dans le sang des nourrissons, les premières entre le 1er et le 14e jour après la naissance (SMITH ; SAUTIERE) ( 93 ), les secondes, vers la 3e ou la 4e semaine seulement (HITZIG ; SAUTIERE) ( 94 ). Le tableau IX est à cet égard très démonstratif. Il ne semble pas que les auteurs aient effectué leurs recherches sur des sérums de nouveaux-nés alimentés avec du lait maternel. Il serait, en effet, intéressant de suivre, dans ce cas, l'évolution des globulines  $\gamma A$  dont le lait maternel est particulièrement riche (voir les revues générales de HANSON et de v. MURALI, GUGLER et ROULET) ( 95 ).

Le passage spécifique des globulines  $\gamma G$  par la voie transplacentaire implique que le transfert dépend de la structure des globulines. Des recherches récentes semblent montrer que le fragment III provenant de l'hydrolyse papaïnique des globulines  $\gamma G$  (voir p. 33 ) traverse préférentiellement les membranes placentaires (BRAMBELL et al. ) ( 96 ). S'il en était ainsi, on comprendrait aisément que seuls les déterminants des globulines  $\gamma G$  soient présents dans le sang du nouveau-né, puisque le fragment III porte la spécificité antigénique des globulines  $\gamma G$ ,  $\gamma A$  et  $\gamma M$ .

## B - IMMUNISATION PASSIVE PAR LE COLOSTRUM.

### 1 - Mise en évidence du phénomène.

L'immunisation passive du nouveau-né par le lait fut démontrée, en 1892, grace à une remarquable série de travaux effectués

Tableau IX

Variations des  $\gamma$ -globulines : IgA-globulines et IgM-globulines

(HITZIG) (97) dosées par méthode immunochimique.

Origine du sérum	$\gamma$ G-globulines (mg/100 ml)	$\gamma$ A-globulines (*)	$\gamma$ M-globulines (+)
Adulte sain	1170	32	$7,4 \pm 2,1$
Mère	1090	42	$10,7 \pm 5,1$
Cordon	1250	< 1	< 1
Enfant :			
0-14 jours	990	< 1	$2,5 \pm 0,7$
15-30 jours	950	$3,7 \pm 1,0$	$3,0 \pm 1,0$
2è mois	630	$18,1 \pm 10,2$	$2,9 \pm 1,3$
3è et 4è mois	580	$19,9 \pm 8,1$	$3,9 \pm 1,5$
4è au 15è mois	750	$27,6 \pm 11,0$	$6,2 \pm 2,6$

( \* ) Unités arbitraires.

par EHRLICH ( 98 ) . L'auteur entreprit ses expériences à la suite de l'observation que la durée de l'immunisation des souriceaux vis-à-vis de certains antigènes injectés à leur mère pendant la gestation, était du même ordre que celle de souriceaux qui recevaient du sérum de lapins immunisés vis-à-vis des même antigènes. L'auteur concluait que l'immunité, dans le premier cas comme dans le second, était passive. Dans un second temps, EHRLICH démontra que le lait était bien le vecteur de l'immunité et réalisait une véritable vaccination buccale, en immunisant, vis-à-vis de différents antigènes, des souriceaux nés de mères non immunisées et nourris avec du lait d'autres souris préalablement immunisées.

Sur la base de ces résultats, EHRLICH posa d'audacieuses hypothèses qui reçurent, par la suite, une éclatante démonstration. Il suggéra, en effet, que les anticorps du lait traversaient la paroi du tube digestif sans subir de dégradations profondes et il proposait la fabrication de vaccins "buccaux".

Une autre conséquence de la découverte d'EHRLICH fut de susciter de nombreuses recherches dont nous résumerons brièvement les résultats les plus démonstratifs.

a - Les observations d'EHRLICH furent confirmées, dès l'année suivante , par KLEMPERER ( 99 ) qui montra que le lait d'une chèvre immunisée contre Salmonella typhosa protégeait les souris des atteintes de ce germe et que son administration, par voie rectale, à une femme, 3 jours après son accouchement, provoquait l'apparition, dans son lait, d'anticorps "anti-Salmonella typhosa".

b - L'immunisation passive par le lait est particulièrement importante et facile à démontrer lorsque le placenta est totalement imperméable aux protéides sériques de la mère. La première observation à ce sujet fut faite en 1912 par FAMULENER ( 100 ) qui découvrit qu'il n'existait pas de transmission placentaire chez la Chèvre. En effet, l'auteur démontra, d'une part, l'absence d'hémolysines dans le sang de chevreaux issus de mères préalablement immunisées vis-à-vis des hématies de

Mouton et, d'autre part, l'apparition de ces anticorps dès la première ingestion de lait ou de sérum maternel. FAMULENER suggéra même que les anticorps du lait et du sang devaient être identiques et que la glande mammaire servait de "dépôts" à ces derniers.

c - Les expériences les plus convaincantes furent effectuées à propos de l'immunisation du Veau. On sait, en effet, que le placenta de la Vache, comme celui de la Chèvre, du Porc et du Cheval, constitue avec ses 7 couches de tissus, une barrière infranchissable aux anticorps (SCHNEIDER et SZATHMARY ( 101 ) ; RATNER, JACKSON et GRUEHL (102)). Il n'est donc pas surprenant que, dans le sérum de Veau, la proportion de globulines gamma ne représente, au jour du vêlage, que de 1 à 2,5 p.100 seulement des protéides totaux, tandis qu'elle atteint, dans le sérum de l'animal adulte, 14 à 34 p.100. Ces résultats posent le problème de l'origine des  $\gamma$ -globulines dans le sérum du Veau. Cette énigme a été résolue et l'on sait, à présent, que les premiers anticorps synthétisés par le Veau, ne recevant pas de colostrum n'apparaissent, dans son sang, qu'à la 3<sup>e</sup> semaine et n'atteignent leur taux maximal qu'au bout de la 8<sup>e</sup> semaine. Au contraire, les anticorps sont présents dans le sérum du Veau moins de 24 h après l'absorption de colostrum.

L'origine colostrale des anticorps sériques du Veau fut démontrée par les travaux de nombreux auteurs.

$\alpha$ - HOWE (103) fut le premier à démontrer, en le fractionnant par les sels neutres, que le sérum du veau nouveau-né, prélevé avant l'ingestion de colostrum, était dépourvu de la "fraction globulinique" précipitable par le sulfate d'ammonium à 17,4 p.100 et que cette fraction apparaissait dans le sérum de veau, dès l'ingestion de colostrum. D'autre part, HOWE (104) identifia cette fraction aux "globulines" du colostrum que l'on savait être, dès cette époque, le support de l'immunité. Cette découverte fut confirmée ultérieurement par de nombreux chercheurs et fut étendue aux autres espèces animales, en particulier, grâce à l'analyse électrophorétique. En réalité, la notion d'agamma-globulinémie a été récemment abandonnée au profit de

celle d'hypogamma-globulinémie, car l'agamma-globulinémie totale a été très rarement observée chez le veau nouveau-né et la présence de  $\gamma$ -globulines en faible quantité (1 à 2,5 p.100 des protéides sériques totaux) peut être mise en évidence par électrophorèse et par immuno-électrophorèse. Toutefois, on ne détecte jamais d'anticorps spécifiques, même s'il s'agit de veaux nés de mères hyperimmunisées (voir à ce sujet la revue générale de von STECK) (105). Cependant, le sérum du veau possède, à la naissance, une activité bactéricide, mais elle serait due, selon TURK (106) à la properdine et au complément que le fœtus est capable de synthétiser " in utero".

La conclusion que l'on peut tirer de ces expériences est qu'aucune globuline possédant une activité d'anticorps ne passe la barrière placentaire chez le Veau. En outre, les travaux de HOWE (107) ont prouvé l'origine colostrale des globulines gamma sériques. Des travaux ultérieurs confirmèrent cette observation et mirent en lumière le rôle du colostrum dans l'immunisation du Veau.

$\beta$  - L'importance du colostrum pour le Veau a été démontrée à la suite de l'observation de SMITH et LITTLE (108) que les veaux nourris avec du colostrum survivaient en plus grand nombre que ceux qui en étaient privés et les auteurs concluaient que le colostrum protégeait les jeunes animaux. A peu près à la même époque LITTLE et ORCUTT (109) et ORCUTT et HOWE (110) montraient que les agglutinines naturelles de Erucella arbortus bovis se retrouvaient dans le sérum des Veaux quelques heures après l'ingestion de colostrum, en même temps que le taux des globulines passait de 0,5 à 3 p.100 des protéides sériques totales du veau.

Ce résultat fut confirmé, en 1930, par MASSE et coll. (111) qui immunisèrent une Vache, avant la parturition, contre la toxine diphtérique et démontrèrent que le veau naissait sans antitoxines, mais que celles-ci apparaissaient 24 heures après ingestion de colostrum.

$\delta$  - Enfin, des études électrophorétiques ont révélé l'apparition des anticorps dans le sérum de veaux nouveaux-nés alimentés avec du colostrum et ont permis de suivre leur évolution au cours de l'allaitement. Les résultats obtenus par HANSEN et PHILIPS (112) et par JAMESON et al. (113) sont, à cet égard, les plus démonstratifs. HANSEN et PHILIPS montrèrent que le pic correspondant aux globulines gamma, absent dans les sérums de Veau à la naissance, apparaissait 24 h après l'ingestion de colostrum (Fig. 3 ; p. 48 ). JAMESON a étudié l'évolution des différents protéides sériques chez le Veau nourri avec du colostrum pendant les 5 jours qui suivirent le vélage et démontré que la proportion des globulines immunes atteignait son maximum au 3e jour, dépassant même la proportion d'anticorps du sang maternel (Fig. 4 ; p. 49 et tableau X ; p. 50 ). Nous avons vu plus haut que la proportion normale des globulines  $\delta$  était atteinte au bout de la 8e semaine chez le veau qui ne recevait pas de colostrum. On voit donc que l'absorption de colostrum réalise l'immunisation du veau nouveau-né par un mécanisme compensateur qui pallie l'absence de synthèses de globulines immunes par l'animal.

$\delta$  - Enfin, il est démontré que l'immunisation précoce du Veau est l'apanage exclusif des laits colostraux. En effet, l'administration à des veaux nouveaux-nés de laits "parfaits", au lieu de colostrums, ne détermine pas d'augmentation du taux des anticorps sériques (DEUTSCH et SMITH) (114). Voir aussi la revue générale de v. STECK (115)). Ce résultat peut s'expliquer, à la fois, par la faible teneur en globulines immunes des laits "parfaits" (voir Tableau XVIII ; p. 118 ) et par la présence, dans les laits colostraux, de l'inhibiteur tryptique (voir p. 17

## 2 - Mécanisme de l'absorption des globulines immunes colostrales.

L'adsorption des globulines colostrales par la voie digestive est extrêmement rapide puisqu'on les retrouve dans le sérum de l'animal nouveau-né moins de 12 à 24 h après l'ingestion du

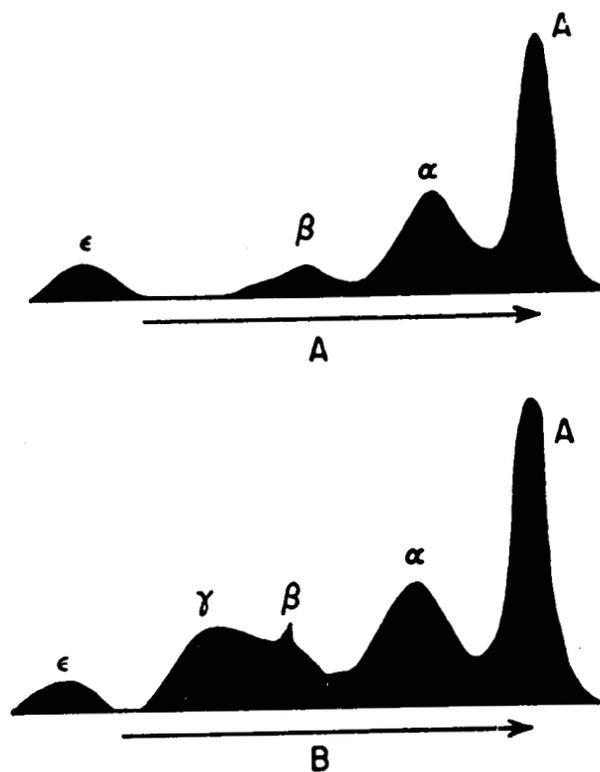


Figure 3

Diagrammes électrophorétiques du Sérum de Veau avant l'ingestion de colostrum de Vache (1) et 24 heures après l'ingestion (2).

On remarquera, dans ce dernier cas, l'élévation du pic  $\gamma$ , correspondant aux globulines immunes (d'après HANSEN et PHILLIPS) (116).

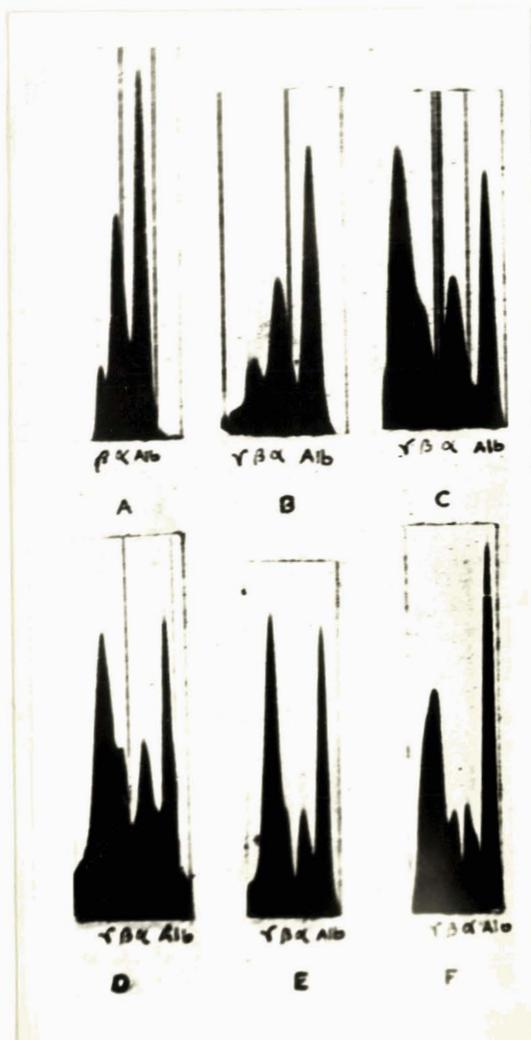


Figure 4

Diagrammes électrophorétiques de sérums de Veau alimenté par la mère dès le vélage. Prélèvements effectués 18 h (A), 36 h (B), 3 j (C), 5 j (D) et 2 ans (E) après la naissance. Electrophorèse en tampon phosphate 0,2 M et NaCl 0,15 M, de pH 7,7, sous une tension de 2,5 V/cm (d'après JAMESON et al.) (117).

Tableau X

Variation des proportions (en p.100 de protéides totaux) des protéides sériques chez le veau alimenté par la mère dès le vêlage (d'après JAMESON et al.) (118).

Age du veau	$\gamma$ -globulines	$\beta$ -globulines	$\alpha$ -globulines	Sérum albumine
nouveau-né	0 ou traces	5,9	36,8	57,3
18 heures	6,0	9,2	75,3	49,5
36 heures	41,6	7,2	21,8	29,8
3 jours	49,2	5,7	17,8	27,3
5 jours	48,7	6,0	10,5	34,9
2 ans	43,7	6,2	9,9	40,2

colostrum (voir Fig. 3 et 4). Introduites à l'aide d'une canule duodé- nale, les globulines colostrales apparaissent dans le sang 20 à 30 minu- tes plus tard (BALFOUR et COMLINE) (119). De nombreux travaux (voir, en particulier, SMITH ; COMLINE et al. ; PAYNE et MARSH (120) ont démontré que l'absorption des globulines immunes du colostrum s'effectuait préfé- rentiellement dans le duodénum.

L'apparition dans le sang de globulines du système gamma apportées par la voie digestive pose une énigme. En effet, ce transfert implique que ces protéides ont traversé la paroi intestinale sans avoir subi de modifications profondes sous l'action des enzymes protéolytiques du tube digestif. Une solution satisfaisante n'a pas encore été appor- tée à ce problème et l'explication du phénomène reste du domaine de l'hypothèse. On peut, en effet, appuyer sur de solides arguments expé- rimentaux, aussi bien la thèse du passage des anticorps intacts que celle du passage des anticorps partiellement dégradés.

#### a - Hypothèse de l'absorption des globulines colostrales intactes.

On peut parfaitement envisager que les globulines gamma ne subissent aucune modification dans le tractus digestif du Mammifère nouveau-né en invoquant, d'une part, la qualité de protéines "homologues" qu'elles possèdent et, d'autre part, la présence de l'inhibiteur tryptique dans les laits colostraux.

DENT et SCHILLING (121) ont étudié l'absorption intestinale des protéines et démontré que l'administration au Chien de sérum- albumine humaine déterminait une augmentation importante du taux des acides aminés dans le sang portal. Au contraire, l'absorption par le Chien de protéides plasmatiques de Chien (protéines "homologues") ne s'accompagne d'aucune variation du taux des acides aminés dans le sang portal. De cette observation est née la notion de protéines "homologues" dont certaines résisteraient à l'action des protéases digestives et traverseraient intactes la muqueuse intestinale.

La protection des globulines immunes colostrales vis-à-vis de l'action des protéases digestives peut encore s'expliquer par la

présence d'un "inhibiteur trypsique" (voir p. 17 ) dans les laits colostraux. Cependant, l'intervention de l'inhibiteur trypsique ne suffit pas, à elle seule, pour expliquer l'absorption des  $\gamma$ -globulines intactes. En effet, celle-ci est maximale dans les premières heures qui suivent la naissance. Or, l'inhibiteur trypsique est présent dans le lait pendant 2 à 3 jours. Cette observation conduisit BALFOUR et COMLINE (122) à démontrer qu'il existait, dans le lait colostrale, trois facteurs qui favorisent l'absorption des globulines immunes. Il s'agit :

- 1 - des phosphates inorganiques
- 2 - du glucose - 6 - phosphate
- 3 - d'un protéide de faible poids moléculaire qui agirait comme un agent tensio-actif ou en se liant aux mucopolysaccharides de l'épithélium intestinal. Selon BALFOUR et COMLINE, l'action combinée de ces trois facteurs et de l'inhibiteur trypsique serait nécessaire à l'absorption des globulines immunes.

b - Hypothèse de l'absorption des globulines colostrales partiellement dégradées.

Le transfert de l'immunité par la voie digestive peut parfaitement s'expliquer même si les globulines immunes subissent une protéolyse digestive, à la condition toutefois d'être fragmentées en gros polypeptides. On sait, en effet, depuis les travaux de PETERMANN (123) et de BRIDGMANN (124) que les  $\gamma$ -globulines conservent leur activité immunologiques même après avoir été réduites en demi ou en quart de molécules. PORTER (125), en 1950, démontra qu'une  $\gamma$ -globuline anti-ovalbumine de Lapin conservait son activité biologique initiale après une digestion papaïnique. Le même auteur, en 1958 (126), réussit à isoler de l'hydrolysate, trois fragments principaux dont deux avaient conservé l'activité anticorps, tandis que le troisième était le support de l'activité antigénique de la molécule.

Des travaux récents de MORRIS (127) ont montré que le fragment III des  $\gamma$ -globulines (voir le schéma de la page 34 )

administré par voie buccale à des jeunes souris ou rats traversait aisément la muqueuse gastro-intestinale.

Enfin, un facteur "anatomique" et "physiologique" intervient : il s'agit de la "perméabilité transitoire" de l'intestin du Mammifère nouveau-né. En effet, l'absorption des globulines colostrales par le tube digestif est limitée aux premiers jours qui suivent la naissance. Selon HANSEN et PHILLIPS (128), elle est maximale à la naissance. Le tableau XI est, à cet égard, démonstratif. On voit que l'augmentation du taux des anticorps sériques chez le veau est plus importante lorsque le colostrum est administré dès la naissance. Elle est nulle si la première ingestion de colostrum a lieu une semaine après le vêlage.

### 3 - Origine des globulines immunes du lait et du colostrum.

Le problème de l'origine des globulines immunes du lait et du colostrum n'est pas encore résolu et, à l'heure actuelle, chacune des trois hypothèses suivantes, émises en 1954 par CANTARUTTI (129), conserve toute sa valeur.

a - Transfert dans la glande mammaire des globulines immunes sériques intactes.

b - Transfert dans la glande mammaire des globulines sériques modifiées.

c - Synthèse par la glande mammaire de globulines immunes spécifiques.

En outre, on ne peut exclure, a priori, l'intervention simultanée de ces trois mécanismes ! Sur la base des expérimentations biologiques, physiologiques, métaboliques et immunologiques, il est impossible de trancher la question tant les arguments invoqués en faveur de chacune de ces trois hypothèses sont démonstratifs et convaincants (voir, à ce sujet, la revue générale de CAMPBELL et PETERSEN) (130). Nous nous limiterons à l'exposé des résultats qui tendent à démontrer l'existence d'une synthèse de globulines immunes dans la glande mammaire.

Tableau XI

Augmentation de la proportion de  $\gamma$ -globulines sériques chez le Veau après l'administration de colostrum à différents ages (d'après HANSEN et PHILLIPS) (131).

Age du Veau (en jours)	Proportion de $\gamma$ -globulines sériques (en p. 100 des protéides totaux)	
	Avant l'ingestion	24 h après l'ingestion
0	1,1	19
1	1,2	10,7
2	2,5	6,1
7	4,5	4,2

WORK et al. (132) ont montré que la radioactivité des globulines immunes du lait était nettement supérieure à celle des globulines immunes du sérum, 6 heures après l'injection de  $^{14}\text{C}$ -glycolle à la lapine (Tableau XII ) et concluent à une synthèse des globulines immunes par la glande mammaire.

L'injection d'antigènes dans le pis de Vache par le canal mammaire (voie diathélique, selon CAMPBELL et PETERSEN) provoque l'apparition d'anticorps spécifiques dans le lait et non dans le sang (CAMPBELL et al.) (133). Les auteurs proposent même une hypothèse séduisante selon laquelle la pénétration de certains antigènes dans le pis, au cours de la têtée, serait provoquée par la salive du nouveau-né.

Ces deux expériences sont donc en faveur d'une synthèse d'anticorps par la glande mammaire. Il reste toutefois à prouver que cette synthèse est bien réalisée par le tissu mammaire lui-même et non par des plasmocytes dont la glande est extrêmement riche au début de la lactation. Cette plasmocytose pourrait parfaitement expliquer la richesse particulière des laits colostraux en globulines immunes (CAMPBELL, PORTER et PETERSEN) (134).

L'application des méthodes immunologiques et immunophorétiques ne peuvent, à elles seules, résoudre le problème de l'origine des anticorps du lait. Certes, les globulines immunes du lait et du sang donnent lieu à des réactions d'identité en apparence parfaites (voir, par exemple, HANSON et JOHANSSON (135) et nos propres résultats, p.

216 ), mais ces réactions ne peuvent, en aucun cas, constituer une démonstration de l'identité absolue des deux groupes de substances et permettre de conclure que les globulines immunes proviennent du sang ou d'éléments "mobiles" du sang comme les plasmocytes. Seules, la comparaison des propriétés physico-chimiques, de la composition et de la structure des globulines immunes du sang et du lait, associées aux observations accumulées depuis un siècle dans les différents domaines, permettront de résoudre l'énigme de l'origine des globulines immunes chez les Mammifères. Il est surprenant, à cet égard, que les travaux d'ordre physico-chimiques effectués sur les globulines immunes des

Tableau XII

Radioactivité (en cps/mn) de la sérumalbumine et des  $\gamma$ -globulines du lait et du sang 6 h après l'injection de  $^{14}\text{C}$ -glycocolle à la lapine

(D'après WORK et al.) (136).

	<u>Lait</u>	<u>Sang</u>
Globulines	1378	776
Sérumalbumine	1511	313

laits soient aussi peu nombreux et nous nous proposons de les exposer dans le paragraphe suivant.

#### 4 - Isolement et propriétés physico-chimiques des globulines du lait et du colostrum.

##### A - Préparation des globulines immunes.

Les premières tentatives d'isolement d'une globuline dont la présence dans le lait avait été pressentie par HAMMARSTEN (137), furent faites en 1885 par SEBELIEN (138) par précipitation au sulfate de magnésium. Elles furent reprises, en 1894, par WASSERMANN (139) qui appliqua au lait un fractionnement au sulfate d'ammonium malgré les conclusions de HALLIBURTON (140) qui infirmait la présence de globulines dans le lait. CROWTHER et RAISTRICX (141), en 1916, appliquèrent le procédé au sulfate de magnésium pour préparer les globulines du lait qu'ils fractionnèrent ensuite en euglobulines insolubles dans l'eau pure à leur point isoélectrique et en pseudoglobulines solubles dans l'eau à leur point isoélectrique, même en l'absence de sels.

SMITH (142) , en 1946, démontra l'hétérogénéité des préparations obtenues par les fractionnements au sulfate de magnésium et décrivit deux procédés de préparation des globulines immunes du colostrum et du lait par un fractionnement au sulfate d'ammonium.

Depuis, diverses méthodes ont été proposées par différents auteurs. Toutes fournissent des préparations hétérogènes qui n'ont pas permis d'effectuer des études physico-chimiques précises et poussées sur les globulines du lait et du colostrum.

1 - Procédés de SMITH. Le mode opératoire de SMITH est différent suivant qu'il concerne le colostrum ou le lait.

##### a - Préparation des globulines immunes du colostrum de Vache (SMITH) (143).

Le fractionnement des protéides du colostrum de Vache selon le procédé de SMITH (144) est schématisé dans la figure 5 .

2 l de colostrum collecté 1 h après le vêlage est écrémé par centrifugation et décaséiné.

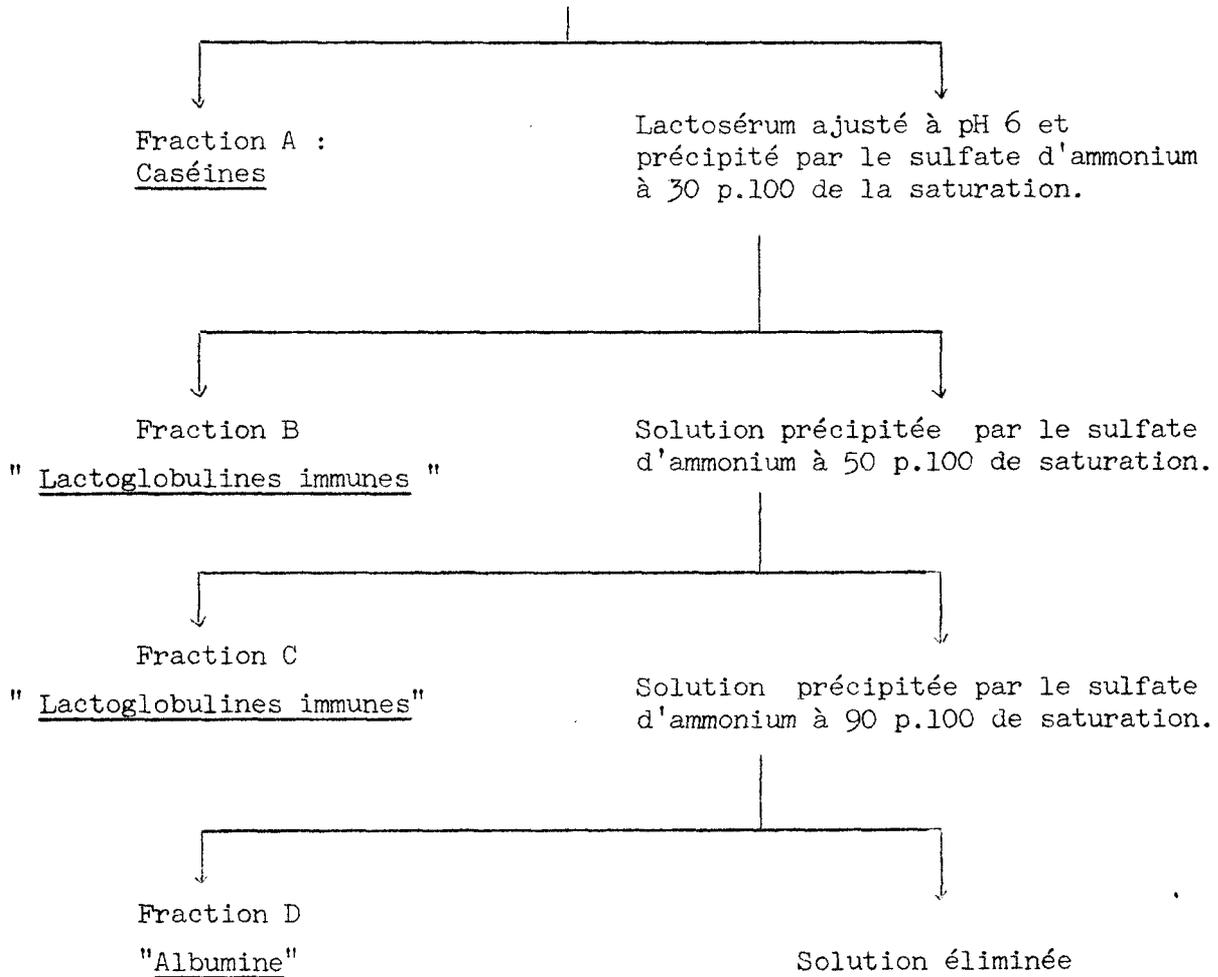


Figure 5

Schéma de fractionnement des globulines immuniques du colostrum de Vache  
(D'après SMITH) ( 145)

L'analyse électrophorétique montre que la fraction C renferme 85 p.100 de globulines immunes et que, seule, la fraction B est constituée de globulines immunes pures. Par dialyse, elle fournit l'euglobuline et la pseudoglobuline, dans un rapport pseudoglobuline/euglobuline de 0,75.

b - Préparation des globulines immunes du lait de Vache (SMITH)(146).

Le procédé de fractionnement des globulines immunes du lait de Vache décrit par SMITH est illustré par le schéma de la figure 6 (p. 61 ) dans laquelle nous avons précisé la composition en globulines immunes des diverses fractions déterminée par électrophorèse. On voit que la fraction E est hétérogène mais qu'elle fournit, par dialyse, une fraction de pseudoglobulines pure . La fraction F est homogène et fournit, par dialyse, des euglobulines et des pseudoglobulines électrophorétiquement homogènes. Toutefois, l'ultracentrifugation révèle une certaine hétérogénéité due principalement à la présence de composés "lourds" 20 S (Tableau XIII); p. 61).

2 - Procédé de fractionnement éthanolique du lait de BAIN et DEUTSCH (147).

BAIN et DEUTSCH ont tenté d'appliquer au lait la méthode de fractionnement éthanolique des protéides du sang décrite par COHN et al. (148). Les auteurs ont isolé, de cette manière, plusieurs fractions globuliniques parmi lesquelles se trouvait une fraction de globulines immunes homogène à l'électrophorèse à pH 8,6, mais hétérogène en pH neutre ou acide.

3 - Procédé au rivanol de KENYON et al. (149).

HOREJSI et SMETANA (150) ont décrit, en 1956, un procédé d'isolement des globulines immunes du sérum fondé sur la propriété que possède le rivanol (lactate de 2-éthoxy-6,9 - diamino-acridine) de précipiter la totalité des protéides sériques sauf les globulines immunes (et la transferrine) que l'on isole de la solution surnageante

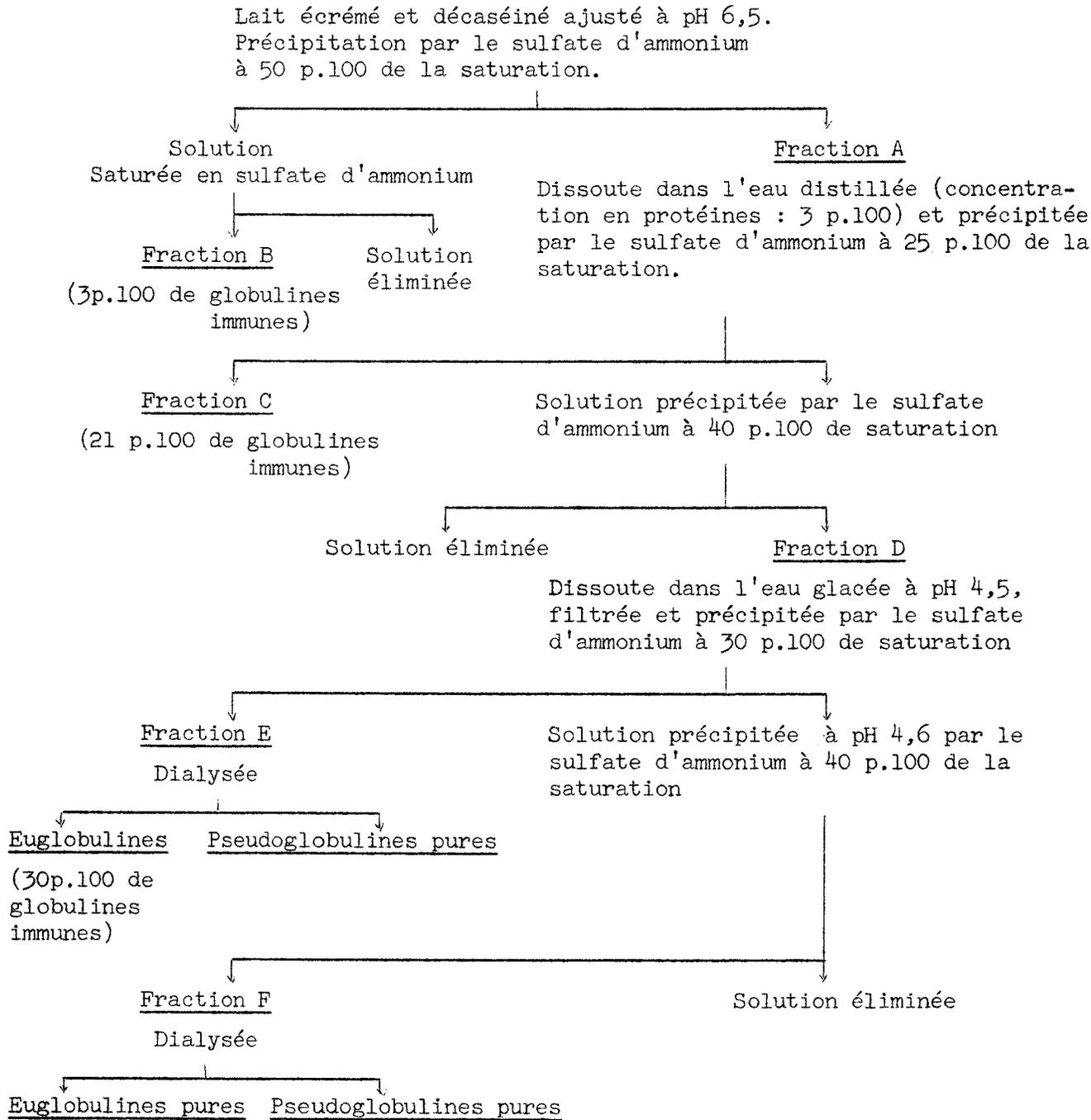


Figure 6

Schéma de fractionnement des globulines immunes du lait de Vache

(D'après SMITH (151)).

Tableau XIII

Répartition centésimale des constituants de diverses préparations de globulines immunes déterminée par ultracentrifugation

(SMITH ) (152).

	3 S	7 S	10 S	20 S
Euglobuline du colostrum		85	5	10
Pseudoglobuline du colostrum	6	88	6	
Euglobuline du lait		76	12	12
Pseudoglobuline du lait		90	10	

par un fractionnement éthanolique. Sur le même principe, KENYON et al. (153) ont mis au point un procédé de préparation des globulines immunes du colostrum et du petit lait de Vache. Le mode opératoire est le suivant.

A un volume de colostrum ou de lait, délipidés et décaséinés, on ajoute 3,5 volumes d'une solution aqueuse de rivanol à 0,4 p.100 (p : v) et on ajuste le pH à 8,5. Le précipité est éliminé par centrifugation ou par filtration. Le liquide surnageant est débarrassé du rivanol par adsorption sur charbon activé. L'analyse électrophorétique des solutions protéiques montre que l'on peut obtenir, à partir du lait, des préparations renfermant 89 p.100 de globulines immunes. Appliqué au colostrum, le procédé fournit des solutions de globulines immunes homogènes à l'électrophorèse (mobilité électrophorétique : - 1,8 à - 2,2  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1}$  à pH 8,6 et force ionique 0,1). Cependant la méthode ne semble pas avoir reçu d'application ultérieure.

Nous avons soumis ce procédé à une étude critique et observé que les globulines immunes étaient, en réalité, accompagnées de lactalbumine, de sérum albumine et de lactotransferrine dont la présence a été révélée par l'analyse immunophorétique. En outre, le charbon adsorbe des quantités élevées de globulines immunes et les rendements sont faibles. Toutefois, l'application de procédés récents d'élimination du rivanol par le chlorure de sodium ou les Sephadex et de chromatographie sur DEAE-cellulose pourrait améliorer notablement les performances de la méthode au rivanol. Des travaux sont poursuivis, au laboratoire, dans ce but.

#### 4 - Procédés électrophorétiques et chromatographiques ( \* )

La séparation des protéides du lait délipidé, décaséiné et dialysé a été réalisée par HILPERT et ENKELMANN (154) par électrophorèse continue sur papier (Appareil Spinco ; tampon véronal de pH 8,6

---

( \* ) Parmi les procédés physiques, nous pourrions, en outre, citer le procédé de PEDERSEN (155) d'isolement des globulines immunes du lait par ultracentrifugation.

et de force ionique 0,02 ; papier filtre cartonné SCHLEICHER et SCHULL 2668 ; 1000 V et 75 mA ; 100 mg de protéide/ml). Les auteurs ont obtenus 5 fractions dont l'une est riche en globulines immunes que la dialyse a séparées en eu - et en pseudo-globulines, mais ont limité leurs recherches à la lactalbumine et aux lactoglobulines.

L'électrophorèse préparative sur acétate de cellulose a été appliquée au fractionnement des protéides du lactosérum par MHATRE et al. (156) (tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,05 ; 200 V ; 15 mn). L'auteur obtient cinq fractions qu'il élue par un mélange d'éthanol et de chloroforme et qu'il étudie, ensuite, par électrophorèse libre. Les fractions A, B et C sont hétérogènes mais sont enrichies respectivement en sérum albumine,  $\beta$ -lactoglobulines et  $\alpha$ -lactalbumine. Les fractions D (pseudoglobuline) et E (euglobulines) paraissent homogènes. L'auteur ne précise pas les rendements qu'il a obtenus et n'a pas effectué de recherches physico-chimiques sur les protéides isolés.

L'électrophorèse préparative sur amidon et sur poudre de cellulose Solka Floc BW 200 a été appliquée par BISERTE (157) à l'étude des protéides du lactosérum.

Les méthodes chromatographiques ont été peu employées, jusqu'à présent. Elles visent, plus souvent, à la préparation d'autres protéides comme les  $\beta$ -lactoglobulines et l' $\alpha$ -lactalbumine : chromatographie sur colonnes d'amidon (PREAUX et LONTIE) (158) ; chromatographie sur DEAE-cellulose (YAGUCHI et al.) (159) ; chromatographie sur Sephadex (PREAUX et LONTIE) (160). Récemment, MURPHY et al. (161) ont isolé par chromatographie sur DEAE-Sephadex des globulines immunes du colostrum, de la "sécrétion sèche" (\*) et du sérum de Vache et les ont comparées du point de vue antigénique. Les résultats de leurs travaux seront discutés plus loin (voir p. 216).

---

( \* ) La sécrétion sèche "ou sécrétion anténatale" est prélevée à la fin de la période de "non-lactation" et avant l'accumulation du colostrum.

B - Propriétés physico-chimiques des globulines immunes du colostrum et du lait de Vache.

Les études physico-chimiques ont essentiellement porté, jusqu'à présent, sur des préparations de globulines, de pseudo-globulines et d'euglobulines obtenues à partir de colostrums ou de laits par l'application des procédés de SMITH.

Nous avons rassemblés, dans différents tableaux, les propriétés physiques (Tableau XIV) et les compositions en glucides (Tableau XV) et en acides aminés (Tableau XVI) des globulines immunes du lait et du colostrum de Vache.

III - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude bibliographique sont les suivantes :

1 - Les procédés d'isolement des globulines immunes du lait et du colostrum sont loin d'être satisfaisants. Les procédés de SMITH fournissent des préparations homogènes à l'électrophorèse, mais hétérogènes à l'ultracentrifugation. Certaines sont, en particulier, souillées de globulines "lourdes" 19 S. D'autre part, les nombreux sous-fractionnements auxquels sont soumises les préparations de globulines en vue de les purifier, risquent de conduire à l'isolement de "populations" particulières de globulines immunes. Il nous paraissait donc souhaitable de mettre au point un procédé de préparation qui fournît le rendement en globulines immunes le plus élevé possible.

2 - La détermination des propriétés physico-chimiques des globulines immunes du lait et du colostrum de la Vache sont très fragmentaires. Par exemple, le tableau XV montre qu'une seule détermination de la composition molaire en oses des globulines colostrales a été effectuée jusqu'à présent. En outre, la composition en acides aminés des globulines immunes du colostrum et du lait a été déterminée par l'application de méthodes microbiologiques et on ignore encore leur teneur

Tableau XIV

Propriétés physiques des globulines immunes du colostrum et du lait de  
Vache (d'après SMITH) (162).

	pHi	Mobilités électropho- rétiques(*)	D <sub>20w</sub> x10 <sup>-7</sup> (**)	Poids moléculaires	
Colostrum	Globulines totales	5,85	-2,1	3,5	160à190000
	Euglobulines	6 à 6,2	-1,7à-1,9	3,34	-
	Pseudoglobulines	5,6 à 6	-2,2à-2,5	3,86	-
Lait	Globulines totales	-	-2,1		(***) 180000-160000
	Euglobulines	6,5	-		-
	Pseudoglobulines	5,6	-		-

( \* ) en  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1} 10^{-5}$  en tampon véronal de pH 8,3-8,4  
et de force ionique 0,1.

( \*\* ) en  $\text{cm}^2 \text{sec}$  à pH 8,45  $\pm$  0,02

( \* \* \* ) valeur de PEDERSEN (163)

Tableau XV

Composition centésimale et molaire en glucides des globulines immunes du colostrum, du lait et du sérum de Vache.

	Globulines totales		Colostrum		Lait	
	a	b	Euglobulines	Pseudoglobulines	Pseudoglobulines	a
<u>Références</u>						
<u>Composition centésimale</u>						
Osés "neutres" p.100 (c)	2,65 ± 0,1	1,11	2,93 ± 0,18	2,52 ± 0,13	2,96 ± 0,16	
Hexoses p.100		0,93				
Fucose p.100		0,18				
Hexosamines p.100	1,48 ± 0,09	1,49	1,58 ± 0,03	1,52 ± 0,05	1,45 ± 0,03	
Acides sialiques p.100		0,29				
<u>Composition molaire</u>						
Galactose		6				
Mannose		3				
Fucose		2				
Hexosamines		15				
Acides sialiques		1,5				

( a ) Valeurs de SMITH, GREENE et BARTNER (164)

( b ) Valeurs de NOLAN et SMITH (165)

( c ) Hexoses + fucose

Tableau XVI

Composition en acides aminés (en g p.100 g de protéine) des globulines immunes du colostrum, du lait et du sérum de Vache.

Références	COLOSTRUM			LAIT	
	Pseudoglobulines	Euglobulines	Globulines totales	Pseudoglobulines	Euglobulines
	a	b	a	a	a
N total	-	15,9	-	15,63	-
S total	-	1,1	1,09	1,01	1,01
Acide aspartique	-	9,4	-	-	-
Acide glutamique	-	12,3	-	-	-
Arginine	3,64	5,6	5,6	4,36	4,76
Histidine	2,13	2,3	1,83	1,99	1,95
Lysine	7,2	6,1	6,2	6,30	6,3
Alanine	-	-	-	-	-
Cystine	3,04	-	3,14	3,26	3,28
Glycocolle	-	-	-	-	-
Isoleucine	3,23	4,2	3,14	2,77	3,02
Leucine	9,1	8,5	10,4	8,9	-
Méthionine	1,23	1,3	1,10	0,89	0,87
Phénylalanine	3,8	3,9	3,62	3,6	-
Proline	-	10	-	-	-
Sérine	-	-	-	-	-
Thréonine	9,8	9	10,3	9,4	10,6
Tryptophanne	2,7	3,2	2,39	2,74	-
Tyrosine	-	6,7	-	-	-
Valine	9,4	8,7	10,4	10,2	-

( a ) Valeurs de SMITH et GREENE (166) et de SMITH, GREENE et BARTNER (167) déterminées par des dosages microbiologiques.

( b ) Valeurs de HANSEN, POTTER et PHILLIPS (168) et HANSEN et CARLSON (169) déterminées par des dosages microbiologiques. 2



TRAVAUX PERSONNELS

---

---

- 1° - DESCRIPTION DES METHODES.
- 2° - ETUDE DES VARIATIONS DE LA TENEUR DU LAIT DE VACHE EN PROTEIDES AU COURS DE LA LACTATION.
- 3° - PROCEDES D'ISOLEMENT DES GLOBULINES IMMUNES DU COLOSTRUM DE VACHE.
- 4° - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES GLOBULINES  $\gamma$ G DU COLOSTRUM DE VACHE.
- 5° - ETUDE COMPAREE DES GLOBULINES  $\gamma$ G DU SERUM ET DU COLOSTRUM DE VACHE.

1° - DESCRIPTION DES METHODES

Nous nous proposons de décrire dans ce chapitre les méthodes d'application générale que nous avons utilisées, en nous réservant d'exposer au début de chacun des autres chapitres, les procédés particuliers.

Nous décrirons, dans ce chapitre les procédés analytiques qui sont autant de critères que nous avons systématiquement appliqués dans l'ensemble de nos recherches aux préparations obtenues et auxquels nous nous référerons constamment dans les chapitres ultérieurs. Nous exposerons successivement :

- 1 - Les méthodes chimiques que nous avons utilisées dans l'étude du groupement glucidique et de la fraction protéique.
- 2 - Les méthodes physiques d'électrophorèse et d'ultra-centrifugation.
- 3 - Les méthodes immunologiques.

METHODES CHIMIQUES
--------------------

I - PROCÉDES D'ÉTUDE DE LA FRACTION GLUCIDIQUE

1° - DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES DES GLYCOPROTEIDES.

La composition centésimale en glucides des glycoprotéides est déterminée à l'aide de méthodes colorimétriques spécifiques de chacun des groupes de glucides suivants : oses "neutres" (\*), osamines et acides sialiques (\*\*) et nous exposerons les modes opératoires que nous avons appliqués à propos de chacun d'eux.

---

( \* ) Hexoses + 6-désoxyhexoses.

( \* \* ) Nous n'avons pas décelé d'acides uroniques dans les globulines immunes avec le réactif de DISCHE (170) au carbazol sulfurique.

## A - DOSAGE DES OSES NEUTRES.

Nous avons utilisé la méthode de dosage des oses "neutres" totaux de TILLMANS et PHILIPPI (171) , modifiée par RIMINGTON (172) dont le principe est le suivant :

PRINCIPE. Les aldohexoses et les méthylpentoses donnent, à chaud, une coloration brun orangé intense avec les solutions sulfuriques d'orcinol.

### REACTIFS.

1 - Solution d'orcinol à 1,5 g p.100 ml d'une solution d'acide sulfurique à 30 p.100 ( v : v ) . Cette solution doit être conservée à 0°C, dans des flacons en verre Pyrex.

2 - Solution aqueuse d'acide sulfurique d<sup>e</sup> 1,83 pur à 60 p.100 (v:v)

3 - Solution d'oses "neutres" destinées à la préparation des témoins internes, renfermant 200 µg d'oses totaux p. ml, dans des rapports molaires identiques à ceux du glycoprotéide étudié et préalablement déterminés par chromatographie quantitative sur papier (SPIK et MONTREUIL) (173).

MODE OPERATOIRE. Dans un tube à essai très propre, on introduit successivement : 1 ml de la solution de glycoprotéide correspondant à environ 150 µg (+ 50) d'oses totaux p. ml, 2 ml de la solution d'orcinol et 15 ml de la solution d'acide sulfurique. Le mélange est soigneusement agité à l'aide d'une tige de verre à extrémité aplatie et maintenu au bain-marie à 80°C pendant 20 minutes. On refroidit ensuite rapidement les tubes et on les conserve à l'obscurité pendant au moins 45 minutes. L'absorbance des solutions est déterminée à 510 mµ . La coloration est stable pendant 6 heures à la température ordinaire et pendant 24 heures à + 2°C.

Dans chaque série de dosages, des tubes-témoins sont introduits : dans les uns, la solution de glycoprotéide est remplacée

par 1 ml d'eau et, dans les autres, par 1 ml de la solution titrée d'oses neutres.

#### B - DOSAGE DES OSAMINES.

La composition en osamines des préparations de glycoprotéides a été déterminée par la méthode d'ELSON et MORGAN (174), modifiée par BELCHER et al. (175) dont le principe et le mode opératoire sont les suivants:

PRINCIPE. Les osamines libres, traitées par l'acétylacétone en milieu alcalin, donnent naissance à des chromogènes qui fournissent, avec le réactif d'EHRlich au p. diméthylamino-benzaldéhyde, une coloration rose violacé. Le procédé nécessite donc la libération préalable des osamines présentes, sous une forme conjuguée, dans les glycoprotéides. L'hydrolyse des liaisons osaminidyl est effectuée, à chaud, par l'acide chlorhydrique 4 N.

#### MODE OPERATOIRE.

1° - Hydrolyse chlorhydrique. Une quantité de glycoprotéide correspondant à 1 mg ( $\pm$  0,5) d'osamines totales est hydrolysée par 10 ml d'acide chlorhydrique 4 N redistillé et exempt de fer, à 100°C, pendant 4 heures, dans un tube scellé sous vide. L'hydrolysate est ensuite neutralisé, soit par l'addition de soude 4 N en présence de phénolphthaléine, soit par une élimination sous vide de l'acide chlorhydrique effectuée dans un exsiccateur ou par le procédé de BISERTE et MOSCHETTO (176) (lyophilisation de l'hydrolysate préalablement amené à une concentration 0,8 N en acide chlorhydrique).

2° - Dosage colorimétrique des osamines.

a - Réactifs.

1 - Solution alcaline d'acétylacétone obtenue en mélangeant, au moment de l'emploi, 2 ml d'acétylacétone et 48 ml d'une

solution de carbonate de sodium 1,25 N.

2 - Solution à 1,6 g de p. diméthylaminobenzaldéhyde p. 30 ml d'acide chlorhydrique concentré.

3 - Solution titrée de chlorhydrate de glucosamine contenant 50  $\mu$ g de glucosamine p. ml.

b - Protocole expérimental. A 1 ml de la solution à doser, renfermant au maximum 100  $\mu$ g de glucosamine, on ajoute 1 ml de la solution d'acétylacétone et 2 ml d'eau bidistillée. Les tubes, hermétiquement bouchés, sont maintenus au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Ils sont ensuite refroidis et additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après agitation, on porte de nouveau au bain-marie à 75°C pendant 5 minutes. On ajoute alors lentement 1ml de réactif d'EHRlich et on chauffe encore pendant 30 minutes à 75°C. Les tubes sont refroidis et additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après une agitation soigneuse, on abandonne pendant 30 minutes à l'obscurité. La mesure des absorbances est effectuée à 530 m $\mu$ .

### C - DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES.

Nous avons effectué les dosages d'acides sialiques totaux par la méthode de WERNER et ODIN (177) à la diphenylamine. En effet, des études critiques effectuées par différents auteurs (voir, par exemple, GIBBONS (178) et MONTREUIL et SPIK (179) ) ont permis de démontrer que les causes d'erreur apportées par ce procédé étaient négligeables. Au contraire, d'autres méthodes, comme celle de WARREN (180), sont l'objet de causes d'erreurs importantes. En effet, elles s'appliquent aux acides sialiques libres et nécessitent donc une hydrolyse préalable des liaisons sialyl. Or celle-ci est toujours incomplète, qu'elle soit chimique ou enzymatique (voir, par exemple, GIBBONS (181) et MONTREUIL et BISERTE (182)). Toutefois, dans le cas particulier des glycoprotéides d'origine bovine, le procédé de WERNER et ODIN (183) est entaché d'une légère erreur. En effet, nos résultats

sont exprimés en acide N-acétylneuraminique et l'on sait que les glycoprotéides d'origine bovine contiennent, en outre, des acides N, O-diacétyl, N,O-triacétyl et N-glycolylneuraminiques. Or, à quantités égales, les différents acides sialiques ne donnent pas la même intensité de coloration (WARREN) (184) et les solutions de "témoins-internes" doivent posséder la même composition centésimale en acides sialiques que le composé soumis à l'analyse (MONTREUIL et SPIK) (185). Ne disposant que d'acide N-acétylneuraminique, il ne nous a pas été possible de corriger nos résultats.

PRINCIPE. Les acides sialiques, sous l'action des acides présents dans le réactif à la diphenylamine, sont rapidement désacétylés et décarboxylés en 2-désoxy-4-amino-octose (GOTTSCHALK) (186). Ce composé donne un chromogène qui, se condensant avec la diphenylamine, fournit une coloration bleu violacé.

#### REACTIFS

1 - Solutions aqueuses d'acide trichloracétique à 5, 7,5 et 15 g p. 100 ml.

2 - Réactif à la diphenylamine. Dissoudre 5 g de diphenylamine pure dans un mélange de 450 ml d'acide acétique pur et de 50 ml d'acide sulfurique pur. Le réactif se conserve à + 2°C et à l'obscurité. Si des cristaux se forment, on les redissout par chauffage dans un bain-marie tiède.

3 - Solution titrée d'acide sialique renfermant 100 µg d'acide N-acétylneuraminique pur par ml. Pour assurer une bonne conservation ajouter une goutte d'HCl concentré et du chloroforme et placer à + 2°C. En effet, les acides sialiques sont très rapidement détruits en milieu alcalin.

#### MODE OPERATOIRE

Dans des tubes à essais, on introduit  
- soit un poids de substance contenant 100 à 200 µg d'acides

sialiques et 3 ml d'acide trichloracétique à 5 p.100

- soit 1 ml de solution de la substance et 2 ml d'acide trichloracétique à 7,5 p.100

- soit 2 ml de solution de la substance et 1 ml d'acide trichloracétique à 15 p.100.

Aux 3 ml de solution ainsi obtenue, on ajoute 6 ml du réactif à la diphénylamine. Les tubes sont soigneusement agités et placés au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Ils sont ensuite refroidis et maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. La mesure des absorbances est effectuée à 530 m $\mu$  .

## 2° - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE EN OSES DES GLYCOPROTEIDES.

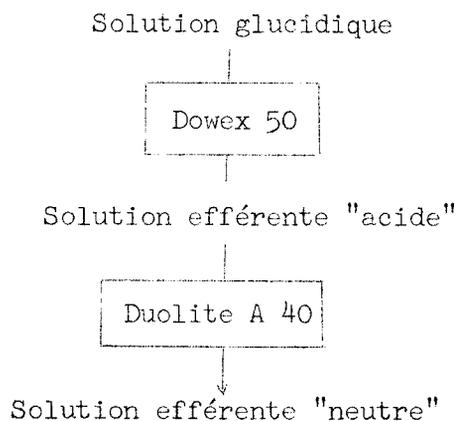
L'identification et le dosage chromatographique et électrophorétique des oses constituant les glycoprotéides sont réalisés au laboratoire en appliquant les modes opératoires suivants.

### A - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSES "NEUTRES"

Nous avons identifié et dosé les oses "neutres" entrant dans la constitution des globulines immunes en appliquant le mode opératoire décrit par MONTREUIL (187) et par MONTREUIL et SCHEPPLER (188).

PRINCIPE. L'identification et le dosage individuel des glucides ont été effectués par chromatographie sur papier après purification des solutions à étudier. En effet, la présence d'ions minéraux provoque des "trainées" et rend impossible la lecture des chromatogrammes. Il convient donc d'en débarrasser les solutions glucidiques obtenues par hydrolyse acide des glycoprotéides. Cette "déméralisation" est réalisée par le passage successif des hydrolysats sur des colonnes de résine à échange de cations (Dowex-50 ; forme acide), puis d'anions (Duolite A-40 ; forme formiate). Le procédé est illustré par le schéma

ci-dessous :



Le mode opératoire que nous avons appliqué comporte les étapes suivantes :

- hydrolyse des globulines immunes
- purification de l'hydrolysat
- chromatographie des oses
- dosage des oses.

#### MODE OPERATOIRE.

1 - Hydrolyse des globulines immunes. 500 mg de protéides sont hydrolysés par 50 ml d'acide chlorhydrique 2 N, pendant 1 heure, à 100°C.

2 - Purification de l'hydrolysat. L'hydrolysat est passé successivement sur une colonne de Dowex-50 x 8 (mesh 25-50 ; forme acide (\*) ; 2 x 40 cm), puis sur une colonne de Duolite A-40 (mesh 25-50 ; forme

---

( \* ) La forme acide de l'échangeur de cations est obtenue par le passage sur la colonne de 0,5 l d'acide chlorhydrique 3 N, suivi par un lavage soigneux à l'eau distillée jusqu'à obtenir un pH d'environ 6.

formiate ( \* ) ; 2 x 40 cm). Le liquide effluent est évaporé à siccité. Le résidu est repris par 1 ml d'eau distillée et soumis à l'analyse chromatographique sur papier (10 à 25  $\mu$ l sur papier Whatman n° 1 ou 20 à 40  $\mu$ l sur papier Whatman n° 3).

3 - Identification chromatographique des oses. La séparation chromatographique des oses a été effectuée avec les systèmes-solvants suivants :

- n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) (PARTRIDGE) (189) ; durée de la chromatographie : 2 jours sur papier Whatman n° 3 ; 4 jours sur papier Whatman n° 1.
- Pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2) (JERMYN et ISHERWOOD) (190) ; durée de la chromatographie : 1 jour sur papier Whatman n° 1.

Les oses ont été révélés avec le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (191) obtenu en mélangeant 2 volumes d'une solution éthanolique d'aniline à 2 p.100 ( v : v ) et 3 volumes d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 p.100 ( p : v ). Après pulvérisation du réactif, les chromatogrammes sont maintenus à 105°C pendant 10 à 15 minutes. L'emplacement des hexoses et des 6-désoxyhexoses est révélé par l'apparition de taches brunes.

Les oses ont été identifiés en comparant leur comportement chromatographique à celui d'oses purs de référence. Ce procédé n'est pas satisfaisant car il n'est pas exempt de causes d'erreurs et il ne doit pas être considéré comme un critère absolu. Au laboratoire, les oses constituant les glycoprotéides sont isolés par chromatographie

---

( \* ) La forme formiate de l'échangeur d'anions est obtenue par le passage sur la colonne de 1 l d'une solution de soude 3 N, suivi d'un lavage avec 3 à 5 l d'eau distillée, du passage d'un volume d'acide formique concentré égal à celui de la résine et d'un lavage prolongé à l'eau distillée jusqu'à pH 6.

préparative et leurs constantes physiques sont déterminées (pouvoir rotatoire ; morphologie et point de fusion des osazones et hydrazones). Malheureusement, l'application de ces critères nécessite des quantités importantes de glycoprotéides lorsque ces derniers renferment, - comme c'est le cas des globulines immunes -, de faibles quantités de glucides et il ne nous a pas été possible de les respecter.

4 - Dosage des oses. Le dosage des oses constituant les globulines immunes a été effectué selon le mode opératoire décrit par MONTREUIL et al. (192).

a - Principe. Les oses réduisent en milieu alcalin le ferricyanure de potassium en ferrocyanure. L'addition d'un sel ferrique provoque la formation de ferrocyanure ferrique (bleu de Prusse) que l'on maintient en solution par l'addition préalable d'acide oxalique.

b - Mode opératoire. Sur une même feuille de papier Whatman n° 3, on effectue des dépôts de la solution glucidique, espacés de 5 cm et correspondant à des quantités d'oses de 20 à 50  $\mu$ g. Après la chromatographie, la feuille<sup>est</sup> séchée à la température du laboratoire et des bandes de référence sont découpées dans le chromatogramme et révélées. Elles permettent de localiser avec précision des taches correspondant aux différents glucides. On découpe alors des carrés de papier filtre englobant largement les taches et on les extrait pendant 24 heures à la température du laboratoire par 10 ml d'eau bidistillée, additionnée d'une goutte de toluène pur. Des carrés de papier de dimensions identiques sont découpés dans le chromatogramme immédiatement au dessus ou au dessous des précédents. Ils représentent les "témoins-papier" et subissent un traitement identique.

Les dosages sont ensuite effectués. Ils nécessitent les solutions de réactifs suivantes :

Solution de ferricyanure de potassium préparée extemporanément en dissolvant 0,2 g de ferricyanure de potassium dans 100 ml d'eau bidistillée.

Solution de cyanure de sodium fraîchement préparée :

Cyanure de sodium R.P.	1,5 g
Carbonate de sodium anhydre pur R.P.	8 g
Eau bidistillée q.s.p.	500 ml

Solution aqueuse d'acide oxalique à 2 g p. 100 ml d'eau bidistillée.Solution phospho-ferrique :

Sulfate ferrique anhydre pur R.P.	5 g
Acide phosphorique à 60°Bé pur R.P.	75 ml
Eau bidistillée q.s.p.	500 ml

Le mode opératoire est le suivant :

Dans des tubes très propres, jaugés à 25 ml, on introduit 5 ml de la solution de glucides réducteurs (10 à 40  $\mu$  g d'oses), 1 ml de solution aqueuse de ferricyanure de potassium et 1 ml de réactif au cyanure de sodium. Les opérations ultérieures sont effectuées à l'abri de la lumière. Le mélange est maintenu pendant 9 minutes au bain-marie bouillant, refroidi rapidement sous un courant d'eau et additionné de 10 ml environ d'eau bidistillée. On ajoute ensuite 0,25 ml de la solution aqueuse d'acide oxalique, puis 1 ml de la solution phospho-ferrique et on complète à 25 ml avec de l'eau bidistillée. Après un séjour à l'obscurité variant de 3 à 5 heures (on effectue des mesures successives jusqu'au moment où la coloration est stabilisée), l'intensité de la coloration bleue est déterminée à l'électrophotomètre de MEUNIER (écran rouge) ou au spectrophotomètre à 632 m $\mu$ . Des courbes de référence, établies avec des solutions d'oses purs, permettent de déterminer la concentration en sucres des solutions d'élution.

B - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINES.

Les hexosamines sont d'abord libérées du groupement polyosidique par une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N redistillé et exempt de fer), pendant 4 h à 100°C, dans des tubes scellés sous vide. L'acide chlorhydrique est ensuite éliminé sous vide ou par

lyophilisation selon le procédé de BISERTE et MOSCHETTO (193) (voir p. 73). Une quantité suffisante (0,5 à 1 g) de globulines immunes est hydrolysée de manière à réaliser sur le même hydrolysât le dosage colorimétrique des osamines totales (voir p. 73) et l'identification de ces dernières en appliquant les méthodes suivantes :

1 - Méthode de désamination de GARDELL et al. (194)

a - Principe. La glucosamine et la mannosamine, d'une part, la galactosamine, d'autre part, sont désaminées à chaud par la ninhydrine, respectivement, en arabinose et en lyxose qui sont aisément identifiés par chromatographie sur papier.

b - Mode opératoire. Le résidu sec de l'évaporation de l'hydrolysât chlorhydrique de globulines immunes correspondant à environ 5 mg d'osamines est traité à 100°C pendant 30 minutes par 2 ml d'une solution de ninhydrine (0,48 g dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M, pH 4,7). La solution est purifiée par un passage sur Dowex-50 et sur Duolite A-40 (20 x 2 cm) et les pentoses présents dans le liquide neutre effluent sont identifiés par chromatographie sur papier dans le système-solvant de PARTRIDGE (voir p. 78) ( $R_g$  par rapport au glucose : arabinose 1,2 ; lyxose 1,4) et dans le système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD (voir p. 78) ( $R_f$  de l'arabinose 0,23 ; du lyxose 0,30). Les pentoses sont révélés par le réactif à l'oxalate d'aniline (voir p. 78) et donnent des taches roses caractéristiques.

2 - Méthode de chromatographie sur colonne de GARDELL. (194 bis)

a - Principe. Les osamines sont identifiés par chromatographie sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex-50).

b - Mode opératoire. Le résidu sec d'une partie aliquote de l'hydrolysât chlorhydrique des globulines immunes correspondant à 1 mg d'osamines totales est repris par 0,25 ml d'acide chlorhydrique

0,3 N. La solution est déposée au sommet d'une colonne de Dowex-50 (mesh 200-400 ; 40 x 0,7 cm) préalablement activée par l'acide chlorhydrique 4 N et lavée avec 100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. Les osamines sont déplacées par une solution d'acide chlorhydrique 0,3 N. Des fractions de 1 ml sont recueillies toutes les 20 minutes, à l'aide d'un collecteur de fractions, dans des tubes jaugés à 15 ml et les osamines sont dosées par la méthode de BELCHER et al. (195) (voir p. 73 ). Les courbes de concentration sont tracées : la glucosamine et la mannosamine constituent le premier pic d'éluion qui est suivi de celui de la galactosamine. La somme des absorbances des tubes correspondant à chacun des pics permet de doser les osamines.

### 3 - Méthode électrophorétique de FOSTER (196).

a - Principe. Les osamines préalablement libérées par une hydrolyse chlorhydrique sont réacétylées par le procédé de LEVY et Mac ALLAN (197) sous la forme N-acétylosamines qui sont aisément séparées par électrophorèse sur papier et dosées colorimétriquement par la méthode de REISSIG, STROMINGER et LELOIR (198).

#### b - Mode opératoire.

$\alpha$  - Réacétylation. Le résidu sec d'une partie aliquote de l'hydrolysate correspondant à environ 2 mg d'osamines totales est repris rapidement par 1 ml de soude 1 N refroidie à 0°C, puis par 75  $\mu$ l d'anhydride acétique. Après un contact de 20 minutes à la température du laboratoire, au cours duquel on agite de temps en temps, la solution est évaporée à siccité. Le résidu est repris par 4 ml de méthanol et la solution est passée sur des petites colonnes d'échangeurs d'anions (Duolite A-40 ; forme formiate). Le liquide effluent est évaporé à siccité.

$\beta$  - Electrophorèse. Le résidu est repris par l'eau et soumis à une électrophorèse sur papier d'Arches n° 304, en tampon borate 0,025 M de pH 9,2 (12 volts/cm ; 4 heures). La révélation est effectuée avec le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE ( voir p. 178 ).

Y - Dosage. A 0,7 ml de solution de N-acétylosamine (20 à 40  $\mu$ g), on ajoute 0,5 ml d'une solution de tétraborate de potassium 0,7 M de pH 9,2. On porte au bain-marie bouillant pendant 3 minutes en tubes bien bouchés, puis après refroidissement, on ajoute 6 ml de réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde (solution à 10 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde dans l'acide acétique à 12,5 p.100 d'acide chlorhydrique 10 N (v : v), dilué au 1/10 au moment de l'emploi avec de l'acide acétique). Les tubes sont agités, bouchés et maintenus pendant 20 minutes à 37°C. Après refroidissement, les absorbances sont déterminées à 585 m $\mu$ .

### C - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES.

PRINCIPE. Les liaisons des acides sialiques sont très fragiles en milieu acide et ces composés sont aisément libérés par une hydrolyse sulfurique douce. Ils sont ensuite purifiés sur un échangeur d'anions, puis identifiés par chromatographie sur papier.

#### MODE OPERATOIRE.

1 - Hydrolyse des liaisons "sialyl". 200 à 500 mg de globulines immunes sont traitées par 20 ml d'acide sulfurique 0,1 N à 80°C pendant 1 heure. L'hydrolysats est amené à pH 6,5 par l'addition d'eau de baryte et le précipité de sulfate de baryum est éliminé par centrifugation.

2 - Purification des hydrolysats. La solution surnageante est passée sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex-50 ; forme H<sup>+</sup>; 1 x 10 cm), puis d'échangeurs d'anions (Dowex 1 x 8 ; forme formiate ; 1 x 10 cm). L'échangeur d'anions est lavé soigneusement à l'eau distillée et les acides sialiques sont ensuite élués par le passage d'environ 20 ml d'acide formique 0,33 N. L'éluat est lyophilisé.

3 - Identification des acides sialiques par chromatographie sur papier. Le résidu sec précédent est repris par 0,1 ml d'eau distillée et

10 à 20  $\mu$ l sont soumis à une chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (199) (n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N)(1 : 2 : 1) pendant 24 heures. Les acides sialiques sont révélés par le réactif de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (200) ( \* ).

## II - PROCÉDES D'ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE.

Nos recherches sur la fraction protéique des globulines immunes du lait de Vache ont porté

- A - Sur la détermination de la composition en acides aminés
- B - Sur la détermination des acides aminés N-terminaux.

### A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES.

La détermination de la composition en acides aminés des globulines immunes a été effectuée par le procédé de chromatographie sur échangeurs de cations dont le principe a été énoncé pour la première fois par SPACKMAN, STEIN et MOORE (201). Le procédé que nous avons appliqué utilise un appareil de dosage entièrement automatique (Autoanalyzer Technicon). Il a été mis au point par PIEZ et MORRIS (202) et modifié par DAUTREVAUX (203). Nous nous limiterons à l'exposé du principe du mode opératoire.

PRINCIPE. Les acides aminés sont séparés par chromatographie sur échangeur de cations (Dowex-50 x 12) avec une solution tampon de citrate de sodium et d'acide citrique de pH et de molarité croissants.

( * )	p-diméthylaminobenzaldéhyde	0,5 g
	Acide trichloracétique	5 g
	Ethanol/eau ( v : v )	20 ml
	n-butanol	60 ml

Le dosage des acides aminés à leur sortie de la colonne est effectué automatiquement à l'aide d'un réactif à la ninhydrine et les absorbances sont enregistrées. Le passage des acides aminés se traduit par l'apparition de pics dont la mesure de la surface, effectuée en les assimilant à des triangles, permet de calculer la quantité de chacun des amino-acides présents dans les hydrolysats.

La principale cause d'erreur de la méthode est apportée par la dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse. Celle-ci est effectuée sous vide avec des solutions d'acide chlorhydrique très pur et exempt de fer. Malgré ces précautions, on ne peut éviter la destruction partielle de certains acides aminés, - comme les acides aspartique et glutamique, la sérine, la thréonine, la méthionine -, ou totale, comme c'est le cas du tryptophane. Une autre cause d'erreur est due à la grande stabilité de liaisons peptidiques comme celles de l'isoleucine et de la valine qui sont incomplètement hydrolysées en 24 h. C'est pourquoi, on réalise deux hydrolyses (chacune en 3 exemplaires) à deux temps différents (24 et 72 h, par exemple) et l'on extrapole au temps zéro les courbes de destruction. On retient les valeurs les plus élevées des acides aminés comme l'isoleucine et la valine.

Le procédé offre l'avantage d'être rapide (durée de la chromatographie : 29 h) et plus précis que la méthode d'élution des taches d'acides aminés séparés par électro-chromatographie sur papier et révélés par la ninhydrine (BISERTE, BOULANGER et PAYSANT) (204) ou que la technique de dosage chromatographique des DNP-amino-acides préconisée par LEVY (205).

#### MODE OPERATOIRE.

Les grandes lignes du mode opératoire sont les suivantes:

1 - L'hydrolyse est effectuée sur 10 mg de globulines immunes, par 5 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N trois fois redistillé. La solution est introduite dans un tube et congelé à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Elle est ensuite dégazée sous vide et les tubes sont scellés sous vide. La solution

est maintenue à 105°C pendant des temps variant de 24 à 72 h. Elle est ensuite refroidie avant l'ouverture des tubes.

L'acide chlorhydrique est éliminé de trois manières :

a - par évaporation sous vide, dans un exsiccateur, en présence de soude en pastilles. Dans ces conditions, l'acide glutamique peut estérifier la sérine et la méthionine risque de s'oxyder en méthionine sulfonée. Ces réactions introduisent des causes d'erreur qui ont été signalées par IKAWA et SNELL ( 205<sup>bis</sup> ).

b - par lyophilisation suivant le procédé de BISERTE et MOSCHETTO (voir p. 73 ).

c - par évaporation à 40°C dans un évaporateur rotatif.

2 - Le résidu sec est repris par 5 ml d'une solution de norleucine 0,5 M à laquelle on ajoute 2 ou 3 gouttes d'acide chlorhydrique 5,6 N. Une partie aliquote de la solution est ensuite soumise à la chromatographie qui est réalisée sur colonne de Dowex-50 x 12 (0,9 x 133 cm), à 60°C, à l'aide d'un gradient de force ionique et de pH d'une solution de citrate de sodium et de chlorure de sodium, en présence de thiodiglycol ( \* ) et de "Brij 35" ( \* \* ) réalisé au moyen d'un "Varigrad" de PETERSON et SOBER (206). Le débit du liquide effluent est réglé à 30 ml/h. La durée de la chromatographie est de 21 h, à la suite desquelles DAUTREVAUX injecte pendant une heure supplémentaire, une solution de citrate trisodique 2,4 N.

3 - Le dosage des acides aminés est réalisé automatiquement à trois longueurs d'onde différentes : 441, 571, 573 m $\mu$ , la première étant

( \* ) Le thiodiglycol réduit la cystine en cystéine et on dose uniquement cette dernière.

( \* \* ) Le Brij 35 est un agent tensioactif qui est indispensable à l'analyse continue.

réservée au dosage de la proline. Les quantités de chacun des amino-acides présents dans l'hydrolysate sont calculées par rapport à un "témoin-interne" de nor-leucine.

#### Dosage spécifique du tryptophane.

Le tryptophane est détruit au cours de l'hydrolyse acide et n'apparaît donc pas sur les diagrammes chromatographiques. Son dosage nécessite donc l'application d'une méthode spécifique. Il a été réalisé par le procédé de SPIES et CHAMBERS (207) à la p. diméthylaminobenzaldéhyde en présence de nitrite de sodium. Le mode opératoire est le suivant (Procédé L) :

Dans une fiole conique bouchée à l'émeri, on introduit 30 mg de p. diméthylaminobenzaldéhyde, 9 ml d'acide sulfurique 21,4 N et une quantité de protéide contenant 5 à 120  $\mu$ g de tryptophane, en solution dans 1 ml de soude 1 N. On maintient le mélange à 25°C pendant une heure, à l'obscurité. La coloration est ensuite développée en ajoutant à la solution 0,1 ml d'une solution aqueuse fraîchement préparée de nitrite de sodium pur R.P., à 0,04 g p. 100 ml. Après 30 minutes de repos à l'obscurité, l'absorbance de la solution est mesurée à 590 m $\mu$  par rapport à un témoin réalisé dans les mêmes conditions mais dépourvu de p. diméthylaminobenzaldéhyde. La concentration en tryptophane est calculée par rapport à des solutions-témoins de tryptophane introduites dans chaque série de dosages.

#### B - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX.

Les acides aminés N-terminaux ont été identifiés et dosés par le procédé de BISERTE et coll. (208).

1° - Principe. Le fluoro-dinitro-benzène, se condense avec les groupements aminés libres de protéides en donnant un DNP-protéide dont l'hydrolyse fournit des amino-acides libres et des DNP-amino-

acides. L'identification et le dosage de ces derniers sont effectués par chromatographie sur papier ou en couche mince.

2° - Mode opératoire.

a - Préparation de la DNP-protéine. 100 mg de globulines immunes sont dissous dans 20 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 2 p.100 ( p : v ). On ajoute, ensuite 0,3 ml de fluoro-dinitro-benzène et on maintient le mélange sous agitation continue, à la température du laboratoire et à l'obscurité, pendant 18 h. La DNP-protéine précipite et est recueillie par centrifugation, après avoir acidifié le mélange par l'addition de 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré pur R.P.. Le précipité est lavé plusieurs fois à l'eau, 3 fois à l'éthanol absolu, puis 3 fois à l'éther. Il est ensuite séché à l'air.

b - Hydrolyse de la DNP-protéine. La DNP-protéine est hydrolysée en tube scellé sous vide, par 5 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé et exempt de fer, pendant 24 h à 100°C. L'hydrolysate est refroidi et transvasé dans une ampoule à décantation dans laquelle on ajoute environ 4 volumes d'eau distillée. La solution est extraite plusieurs fois par l'éther privé de peroxydes ( \* ) jusqu'à ce que ce dernier soit incolore. Les extraits étherés sont rassemblés : ils renferment les DNP-amino-acides étherosolubles.

La solution aqueuse est extraite par un mélange de n-butanol et d'acétate d'éthyle ( v : v ) : on obtient de cette manière , les DNP-amino-acides hydrosolubles (  $\alpha$  -mono-DNP-arginine ;  $\alpha$  -mono-DNP-histidine et une faible quantité de di-DNP-histidine ; et DNP-acide cystéique). L'identification et le dosage des DNP-amino-acides est ensuite réalisé par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier.

---

( \* ) La préparation d'éther sans peroxydes est réalisée en le distillant sur du chlorure stanneux, puis en le lavant avec une solution de carbonate de sodium à 20 p.100 ( p : v ) et enfin avec de l'eau. L'éther sans peroxydes doit être conservé à l'abri de la lumière en présence de sulfate ferreux pulvérisé, L'utilisation d'éther <sup>sans</sup> peroxydes est indispensable pour éviter l'oxydation de la DNP-méthionine.

c - Chromatographie des DNP amino-acides.

$\alpha$  - DNP-amino-acides éthéro-solubles.

La chromatographie bidimensionnelle des DNP-amino-acides éthérosolubles est effectuée sur papier Whatman n° 1 en combinant l'emploi des deux systèmes-solvants suivants :

1) Toluène	30 ml
Monochlorhydrine du glycol	18 ml
Pyridine	9 ml
Ammoniaque 0,65 N	18 ml

La phase supérieure est recueillie et filtrée sur papier Whatman n° 1. Une chromatographie ascendante est effectuée pendant 18 h. Après séchage des chromatogrammes à l'air et à l'abri de la lumière, la chromatographie dans la 2e dimension est réalisée avec le système-solvant suivant :

2) Solution de phosphate disodique 1 M et de phosphate monosodique 2 M. A diluer de moitié avant l'emploi (chromatographie descendante pendant 15 h).

$\beta$  - DNP-amino-acides hydrosolubles.

L'identification des DNP-amino-acides hydrosolubles est effectuée par chromatographie ascendante unidimensionnelle dans le système-solvant n° 1, décrit ci-dessus.

La révélation des DNP-amino-acides ne nécessite aucun réactif puisque ces composés apparaissent sous la forme de taches jaunes sur les chromatogrammes. Toutefois, l'observation de ces derniers en lumière de WOOD permet de détecter de faibles quantités de DNP-amino-acides (fluorescence brune) et d'identifier la 2,4-dinitraniline qui donne une fluorescence jaune vert caractéristique.

Le dosage des DNP-amino-acides est effectué en mesurant à 360 m $\mu$  (385 m $\mu$  dans le cas de la proline) l'absorbance des

solutions d'élution des taches obtenues en traitant pendant 15 mn à 50°C, chacun des rectangles de papier par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 2 p.100 (p : v).

METHODES    PHYSIQUES
-----------------------

I - ELECTROPHORESE.

Nous avons appliqué les procédés d'électrophorèse de zone sur papier, en gélose et en gel d'amidon à l'analyse des diverses préparations que nous avons obtenues.

A - ELECTROPHORESE SUR PAPIER.

Les électrophorèses des préparations de lactoprotéides (5 à 10 g p. 100 ml du tampon utilisé pour l'électrophorèse) ont été effectuées sur papier Schleicher et Schüll 2043 Amg1 dans le "tampon véronal" de pH 8,6 classiquement utilisé en électrophorèse sur papier et que nous avons choisi à la suite d'une étude critique. Sa composition est la suivante :

Véronal sodé	20,6 g
Véronal	3,6 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Les électrophorèses ont été effectuées à 110 V pendant 16 h et les électrophorégrammes, préalablement séchés à l'air, puis à 100°C pendant 30 mn, ont été révélés à l'aide du réactif à l'Amidoschwarz suivant le procédé de GRASSMAN et HANNIG (209) : séjour de 5 à 10 mn dans une solution à 1 g d'Amidoschwarz 10 B pour 100 ml d'un mélange de méthanol et d'acide acétique (9 : 1) ( v : v ),

suit d'une décoloration des bandes de papier effectuée suivant le mode opératoire décrit par MUNIER (210) à l'aide de la solution suivante :

Acide acétique	100 ml
Solution aqueuse de phénol à 3 g p. 100 ml	900 ml

qui assure une élimination plus complète et plus rapide du colorant que le procédé utilisant une solution d'acide acétique dans le méthanol (1 : 9) ( v : v ).

L'emplacement des protéides est marqué par l'apparition d'une coloration bleue intense.

#### B - ELECTROPHORESE EN GELOSE.

Nous avons appliqué à l'étude des protéides du lait de Vache, la méthode de micro-électrophorèse en gélose décrite par GORDON et al. (211) et dont les étapes sont les suivantes :

- 1° - Préparation de la gélose
- 2° - Préparation des électrophorégrammes
- 3° - Fixation des électrophorégrammes
- 4° - Révélation des électrophorégrammes
- 5° - Enregistrement des protéinogrammes

#### 1° - PREPARATION DE LA GELOSE.

On prépare une solution de gélose (OXOID L10 ou L13 ; Agar Noble DIFCO) à 4 g p. 100 ml d'eau distillée que l'on maintient dans un bain-marie bouillant jusqu'à ce que les bulles d'air aient disparu (environ 1/2 ou 1 heure). On coule alors la gélose sur une grande plaque de verre en une couche de 2 ou 3 mm d'épaisseur. Quand, au bout de 20 minutes environ, la gélose est devenue consistante, on la découpe en bandes parallèles, larges de 2 à 4 cm que l'on lave pendant 3 à 4 jours dans de l'eau distillée, renouvelée chaque jour et maintenue à 4°C. On essore alors les bandelettes à

l'aide de papier filtre et on pèse la gélose à laquelle on ajoute 166 ml de tampon véronal, ajusté à pH 8,2 (voir plus loin) pour 100 g de gélose. Le mélange est enfin fondu au bain-marie bouillant, additionné de 0,5 ml de "Mersephyl" afin de stériliser la préparation et filtré sur plusieurs épaisseurs d'un tissu de coton disposé dans un filtre de Büchner. La gélose est alors répartie dans des tubes bien propres et conservée en chambre froide pendant, au maximum, dix jours.

## 2° - PREPARATION DES ELECTROPHOREGRAMMES.

On liquéfie la gélose en maintenant les tubes qui la contiennent au bain-marie bouillant. On coule alors 3,5 ml de gélose liquide sur des lames de microscope ( \* ), préalablement dégraissées par un lavage avec des détergents ou par un bain prolongé dans l'acide sulfurique. On laisse refroidir pendant une nuit à 4°C dans une chambre humide.

On creuse une entaille de 1 mm de largeur en un endroit de la gélose qui est déterminé expérimentalement pour obtenir la meilleure séparation des protéides. Cette opération est réalisée à l'aide de deux fragments de lame de rasoir de 12 à 14 mm de longueur insérés parallèlement l'un à l'autre dans une pince de MOHR à vis. Le petit fragment de gélose ainsi découpé est enlevé avec la pointe d'un scalpel.

On remplit alors la fente ainsi ménagée avec la solution de protéides à l'aide d'une pipette PASTEUR. Les électrophorégrammes sont rapidement déposés dans la cuve d'électrophorèse et dans chacun des compartiments, -anodique et cathodique -, de celle-ci, on introduit une solution de véronal tamponnée à pH 8,2 dont la composition est la suivante :

---

( \* ) Le dépôt de gélose peut aussi être effectué sur des lames de verre de dimensions variables, la quantité de gélose employée étant alors proportionnelle à la surface de la plaque.

Véronal sodique	20,6 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Ajouter à cette solution , 300 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Laisser séjourner pendant 2 jours puis ajuster le pH à l'aide de soude ou d'acide chlorhydrique.

Les lames sont disposées de manière à ce que la fente de départ se trouve plus près du compartiment cathodique. Le contact de la gélose avec le tampon est réalisé avec de petites bandes de papier filtre, imbibées de la solution de véronal, dont l'un des bords repose sur la gélose et l'autre trempe dans la solution tamponnée. Un courant électrique continu de 4 à 5 V/cm, mesuré aux extrémités des lames, est alors appliqué aux électrophorogrammes pendant 1 à 3 heures.

### 3° - FIXATION DES ELECTROPHOREGRAMMES.

Dès la fin de l'électrophorèse, les lames sont plongées pendant 1 à 3 heures dans une solution à 2 ml d'acide acétique pour 100 ml d'éthanol à 60°. Elles sont ensuite déposées sur une plaque de verre et recouverte pendant 24 heures d'un rectangle de papier d'Arches n° 302 que l'on imbibe de temps en temps avec de l'eau distillée.

### 4° - REVELATION DES ELECTROPHOREGRAMMES ( \* )

#### a - Révélation des protéides.

La révélation des protéides est réalisée avec un réactif à l'Amidoschwarz ou au Vert de lissamine.

---

( \* ) Voir la revue générale de BISERTE (212)

- Révélation par l'Amidoschwarz. Les plaques sont maintenues pendant 5 à 10 mn dans la solution suivante :

Amidoschwarz 10 B	0,1 g
Ethanol à 80 p.100	90 ml
Acide acétique	100 ml

Elles sont ensuite traitées pendant des temps variables par un mélange d'acide acétique et de méthanol (1:3) (v : v).

- Révélation par le Vert de lissamine. Les électrophorégrammes sont maintenus pendant 10 mn dans la solution de colorant dont la composition est la suivante :

Vert de lissamine	1 g
Solution aqueuse d'acide acétique à 10 p.100 ( v : v )	100 ml

Ils sont ensuite lavés avec une solution aqueuse d'acide acétique à 10 p.100 (v : v) jusqu'à décoloration complète de la gélose. L'emplacement des protéides est marqué par l'apparition d'une intense coloration verte.

Ce procédé offre l'avantage d'être plus rapide et moins onéreux. Cependant, il présente un grave inconvénient lorsque des protéides non dénaturables par l'éthanol sont présents dans les électrophorégrammes, car ils se dissolvent aisément dans la solution aqueuse de colorant et échappent ainsi à la révélation.

b - Révélation des glycoprotéides (Procédé de KOIN et GRÖNWALL) (213)

α - Principe. Le groupement polyosidique des glycoprotéides est oxydé par l'acide periodique en polyaldéhydes qui recolorent la fuchsine de SCHIFF.

β - Réactifs.

- Solution d'acide periodique.

Para-periodate de sodium	1,84 g
Acide sulfurique 1 N	18,80 ml
Eau distillée	11,20 ml
Solution aqueuse d'acétate de sodium M/5	15 ml
Ethanol absolu	100 ml

La solution filtrée avant l'usage se conserve pendant plusieurs jours à l'obscurité à 2°C.

- Solution réductrice (à préparer extemporanément)

Iodure de potassium	5 g
Hyposulfite de sodium	5 g
Eau distillée	100 ml
Ethanol absolu	150 ml
Acide chlorhydrique concentré pur	2,5 ml

- Réactif de SCHIFF ( Réactif de KRAMM et KOLB) (214).

On dissout dans 1500 ml d'eau distillée, 4,5 g de fuchsine basique. On ajoute, en agitant, 9,6 g de métabi-sulfite de potassium et on laisse reposer pendant 8 minutes. La solution est additionnée de 40 ml d'une solution d'acide sulfurique 6 N, puis après un repos d'une nuit à 2°C, de 3 à 5 g de charbon activé. Elle est alors filtrée en 3 minutes sur un filtre de BUCHNER. Le réactif, conservé à l'obscurité et à + 2°C, est stable pendant 8 jours.

- Eau sulfitée.

Métabisulfite de sodium	4 g
Eau distillée	1000 ml
Acide chlorhydrique concentré	10 ml

γ - Mode opératoire. La réaction à l'acide periodique-fuchsine de SCHIFF comprend les étapes suivantes :

- bain de 5 mn, dans l'éthanol absolu
- bain de 5 mn, dans la solution d'acide periodique

- lavage de 10 mn, dans l'éthanol à 70 p.100 (v : v)
- bain dans la solution réductrice, prolongé jusqu'à ce que disparaisse la légère teinte jaune que prend la gélose dès son contact avec la solution.
- lavage 10 mn dans l'éthanol à 70 p.100 (v : v)
- essorage entre deux fragments de papier filtre pendant 15 mn
- 3 bains successifs de 5 mn dans l'eau sulfitée
- séchage à l'obscurité

La coloration obtenue doit être immédiatement enregistrée, toute la surface de la gélose se colorant rapidement en rouge violacé.

### C - ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON.

L'électrophorèse en gel d'amidon a trouvé peu d'applications dans nos recherches. En effet, nous l'avons uniquement considérée comme un critère de pureté et non comme un procédé d'exploration de la structure des globulines immunes à laquelle nous ne nous sommes pas intéressée dans cette première série de travaux dont le but essentiel était d'isoler les globulines immunes du lait à l'état pur. C'est pourquoi nous avons effectué nos électrophorèses en gel d'amidon horizontal et vertical suivant le procédé classique de SMITHIES (215) avec le tampon discontinu de POULIK (216).

Les gels renferment 13 g d'amidon pour 100 ml de solution tampon

L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 5 V/cm pendant 5,5 h dans le cas de l'électrophorèse horizontale et sous une tension de 7 à 8 V/cm pendant 17 à 20 h dans le cas de l'électrophorèse verticale.

La révélation des protéides est effectuée en maintenant les gels pendant 10 à 20 mn dans un réactif à l'Amidoschwarz 10 B (Amidoschwarz 1 g ; méthanol 45 ml ; eau distillée 45 ml ; acide acétique 10 ml) et en les décolorant ensuite par un bain prolongé dans une solution de méthanol acétique (méthanol 1 l ; eau distillée 3 l ;

acide acétique 400 ml).

## II - DETERMINATION DES CONSTANTES DE SEDIMENTATION ET DES POIDS

### MOLECULAIRES.

#### A - DETERMINATION DES CONSTANTES DE SEDIMENTATION.

Les constantes de sédimentation des constituants du colostrum et des différents précipités ont été déterminées par ultracentrifugation. Généralement, trois mesures ont été effectuées à des concentrations différentes, voisines de 3,3 - 6 et 10 mg p. ml de tampon phosphate de pH 6,9 à 7,3. L'analyse du colostrum a été réalisée en tampon NaCl 1M - phosphate M/10-bicarbonate M/10, de pH 7,2. Les constantes de sédimentation à 20°C ont été calculées par extrapolation à une dilution infinie.

#### B - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES.

Les poids moléculaires ont été précisés par ultracentrifugation et par diffusion de la lumière.

##### 1 - Détermination par ultracentrifugation.

Les poids moléculaires ont été déterminés d'après les données obtenues par ultracentrifugation à l'approche de l'équilibre de sédimentation, pour un volume spécifique de 0,75, en appliquant l'équation de SVEDBERG, selon la méthode d'ARCHIBALD (217), modifiée par TRAUTMAN (218) et par TRAUTMAN et CRAMPTON (219).

$$M = \frac{S}{D} \frac{RT}{1-V\rho}$$

ou

M = masse moléculaire

S = constante de sédimentation

D = coefficient de diffusion

R = Constante des gaz parfaits ( $8,316 \times 10^7$  ergs/oK/mole)

T = température absolue

V = volume spécifique partiel (g/ml) (\*)

$\rho$  = densité du solvant

$$\frac{RT}{1-V\rho} = \frac{8,316 \times 10^7 \times 293,13}{1-0,75 \times 1,015} = 10 \times 10^{10}$$

$\frac{S}{D}$  est remplacé par sa valeur à l'approche de l'équilibre de sédimentation. Ce rapport est égal à la pente de la courbe  $Y^+$  en fonction de  $X^+$  où

$$Y^+ = \frac{\Delta y_{(m)} \cdot \text{tg } \theta}{X^2_{(m)}}$$

$$\text{et } X^+ = \frac{\left[ \frac{X_{(r)}}{3000G^2_{(x)}} \right]^3 \text{tg } \theta \cdot \Delta z}{X^2_{(m)}} \sum \Delta y$$

$\Delta y$  : Différence entre le sommet de la courbe de gradient de soluté et la ligne de base après agrandissement.

---

( \* ) 0,75 dans le cas des globulines  $\gamma G$

- $\theta$  : angle de travail du dispositif SCHLIEREN.  
 $\omega$  : vitesse angulaire de la centrifugeuse exprimée en ( $2 \pi$  tours/sec)  
 $X_{(m)}$  : distance entre l'axe et la position du ménisque au moment de la mesure.  
 $X_{(r)}$  : distance entre l'axe et le point de référence sur l'échelle agrandie.  
 $G_{(x)}$  : est l'agrandissement total sur l'axe des x  
 $\Delta z$  : est l'intervalle unité sur l'échelle agrandie utilisée pour déterminer les  $\Delta y$   
 $\Delta y$  : hauteur, par rapport à la ligne de base, pour chacun des  $\Delta z$

Le principe de la détermination de la masse moléculaire par la technique de centrifugation à l'équilibre de sédimentation est fondée, d'une part, sur le fait que le rapport S/D ne dépend ni de la viscosité ni de la forme de la particule mais de sa masse moléculaire (ARCHIBALD, 1938) et, d'autre part, sur le fait que ce rapport S/D peut être calculé en déterminant le gradient de concentration au ménisque et la concentration du soluté au ménisque (ce qui revient à déterminer  $\Delta C$  en fonction de  $x_{(m)}$  et de C).

Trois déterminations ont été effectuées à des vitesses différentes (14 290 (20°C), 17 250 (19,96°C) et 21 740 (20,02°C) t/mn) sur une solution de densité 1,015, contenant 17,5 mg de protéides/ml de tampon phosphate/NaCl de pH 7,3 et de force ionique 0,3.

## 2 - Détermination par diffraction de la lumière.

Les déterminations par diffraction de la lumière ont été effectuées à l'aide d'une photo-gonio diffusiomètre SOFICA, sur des solutions de globulines immunes dans le chlorure de sodium à 10 p.100 (p : v), à la concentration de 5,1 mg/ml.

METHODES IMMUNOLOGIQUES
-------------------------

Les procédés immunologiques les plus couramment utilisés dans les recherches sur les protéides sont la méthode d'OUCHTERLONY de diffusion en gel d'agar et la méthode de micro-immunophorèse de SCHEIDEGGER (220) et de GRABAR et coll. (221). Nous décrirons donc successivement les deux protocoles expérimentaux que nous avons appliqués dans notre étude sur les protéides du lait de Vache. Nous ferons précéder cette description de l'exposé de la technique de préparation des immunosérums qui sont utilisés dans l'une et dans l'autre de ces deux méthodes.

#### I - PREPARATION DES IMMUNSERUMS.

Nous avons préparés les immunosérums de Lapin spécifiques des solutions antigéniques suivantes : protéides du sérum de Vache ; protéides du lait et du colostrum de Vache ; globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache. Les injections ont été effectuées par les voies intraveineuse et intramusculaire dans le cas des protéides sériques et par la voie intramusculaire seule dans le cas des protéides lactées, à cause des violents phénomènes de choc que provoquent les injections intraveineuses de ces dernières.

##### 1° - Préparation des immunosérums antiprotéides sériques.

Les immunosérums antiprotéides sériques ont été obtenus en effectuant les cycles d'injections suivants :

1ère, 2è et 5è semaines : I.V. de 1 ml de sérum de Vache dilué au centième avec du sérum physiologique, suivie, une heure après, d'une I.V. de 1 ml de sérum de Vache et d'une I.M. de 2 ml de suspension

antigénique de FREUND ( \* ).

3è et 4è semaines : I.M. de 2 ml de suspension antigénique de FREUND.

Après un repos de 1 à 2 mois, les lapins sont soumis à un nouveau cycle d'injections identique au premier. Des prélèvements de sang sont effectués journalièrement à partir du 8è jour suivant la dernière injection et l'activité de l'immunsérum est étudiée par immuno-électrophorèse. Généralement, le taux des anticorps est maximal vers le 12è jour. Un volume important de sang (25 à 40 ml) est alors prélevé par section longitudinale de la veine marginale de l'oreille du lapin. Après coagulation, le sérum est recueilli par centrifugation et stocké à - 20°C. En cours d'utilisation, il est conservé à + 2°C.

## 2° - Préparation des immunsérums antiprotéides lactés.

Les immunsérums ont été préparés suivant le protocole expérimental précédent, à la différence près, que, seules, des injections intramusculaires de 10 ml de suspension de FREUND (5 ml de solution de protéides + 5 ml d'adjuvant de FREUND) ont été effectuées.

Les solutions de protéides ont été préparées de la manière suivante :

### a - Solutions de lactoprotéides totaux.

Ces solutions sont destinées à la préparation d'immunsérums antiprotéides totaux du lait et du colostrum de Vache. Elles ont été obtenues en dissolvant, dans 100 ml de sérum physiologique, 100 mg d'un mélange à parties égales de protéides totaux de lait et de colostrum de Vache. Ces protéides ont été obtenus par lyophilisation

---

( \* ) La suspension de FREUND est obtenue en mélangeant 1 ml de sérum de Vache avec 1 ml d'adjuvant de FREUND (lanoline 1 g, huile de paraffine 9 g, B.C.G. 5 mg).

des fractions adialysables (dialyses de 4 jours contre eau distillée) de laits et de colostrums préalablement délipidés par centrifugation et décaséinés ( \* ).

Les solutions sont stérilisées par un passage sur des bougies Chamberlan.

#### b - Solutions de globulines $\gamma$ G

La solution antigénique de globulines  $\gamma$  G est préparée en dissolvant, dans 100 ml de sérum physiologique, 0,1 g de protéides obtenus par précipitation du colostrum de Vache par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et à pH 7. Les immunosérums prélevés une semaine après la 3<sup>e</sup> injection I.M., effectuée dans les conditions précisées ci-dessus, révèlent uniquement l'arc des globulines  $\gamma$  G.

## II - TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION EN GEL D'AGAR.

La méthode de diffusion en gel d'agar (Méthode d'OUCHTERLONY) (221bis) comporte les étapes suivantes.

### A - PREPARATION DE LA GELOSE.

4 grammes d'Agar Noble DIFCO sont dissous au bain-marie bouillant, en 20 à 30 mn, dans un mélange de 100 ml de tampon phosphate 0,15 M, de pH 7,1 et de 300 ml d'eau distillée. La solution est filtrée sur papier Chardin ou sur coton et additionnée de 4 gouttes de merthiolate de sodium à 1/10000 afin d'assurer une longue conservation du gel.

---

( \* ) Le lait de Vache est aisément décaséiné par l'addition d'acide chlorhydrique 1 N jusqu'à pH 4,6, suivie d'un repos de 24 h à + 4°C. Le précipité de caséines est éliminé par filtration.

## B - PREPARATION DES PLAQUES DE GELOSE.

Le gel est coulé chaud soit sur des lames porte-objets (2,5 x 7,5 cm) à raison de 3,5 ml par lame ou sur des plaques de verre de plus grandes dimensions ou encore dans des boîtes de Pétri (diamètre 7 cm) à raison de 17 ml par boîte. Les gels sont ensuite maintenus à 4°C pendant 12 heures.

## C - DIFFUSION ANTIGENE-ANTICORPS. FORMATION DES ARCS DE PRECIPITATION.

On découpe dans le gel d'agar une série de trous destinés à recevoir, les uns, les solutions d'antigène et, les autres, les immun-sérums. Ces trous sont pratiqués avec une aiguille sans biseau de 1,15 mm à 3 mm de diamètre extérieur, munie d'un tuyau de caoutchouc relié à une pompe à vide destiné à aspirer les fragments de gélose. Pour assurer l'étanchéité des réservoirs ainsi découpés et pour éviter le passage du liquide entre le gel et la plaque de verre, on verse, dans chacun des trous, une goutte de gel fondu dilué au demi avec de l'eau distillée. Les trous sont alors remplis avec les solutions d'antigène ou d'anticorps selon une disposition dont on trouvera des exemples dans la figure 7. Les lames sont maintenues dans une chambre à diffusion pendant des temps variant de 48 à 72 h.

Les plaques de gélose sont alors lavées dans trois bains successifs de sérum physiologique à + 4°C pendant 24 h pour éliminer les antigènes et les anticorps non précipités. Elles sont ensuite séchées sous du papier d'ARCHES n° 302, puis lavées de nouveau, pendant 48 h, à l'eau courante. Elles sont enfin séchées à l'air libre pendant 24 h, recouvertes de papier Whatman 1 imprégné d'eau distillée, révélées à l'aide du réactif au Vert de lissamine ou à l'Amidoschwarz, suivant le mode opératoire que nous avons décrit à propos de l'électrophorèse en gélose (voir p. 94).

## D - INTERPRETATION DES RESULTATS.

La figure 7 montre les diverses dispositions des dépôts d'antigènes et d'anticorps, ainsi que le tracé qu'affectent les lignes

de précipitation dans les cas les plus couramment étudiés.

Le schéma I montre un exemple de "raccordement d'arcs" caractéristique de deux substances A et B possédant un déterminant antigénique commun. Dans le schéma II, le croisement des arcs de précipitation montre que les antigènes A et E ne possèdent pas de déterminant antigénique commun (réaction de non-identité). Le schéma III illustre une "réaction d'identité partielle" qui démontre l'existence, dans la substance E, d'un site antigénique commun aux composés D et E et d'un site antigénique spécifique de E.

La disposition "en rosette" des réservoirs permet d'utiliser un nombre plus élevé d'antigènes et de faciliter la recherche des réactions d'identité. L'interprétation du schéma IV serait, par exemple, la suivante : A, B, C et D présentent une réaction d'identité totale et possèdent donc un déterminant antigénique commun ; B et C ont, en outre, un second déterminant antigénique commun ; E et D, donnent une réaction d'identité partielle et A et E présentent une réaction de non-identité.

On voit donc que la méthode d'OUCHTERLONY peut apporter des renseignements précieux concernant l'identification de certaines substances.

### III - TECHNIQUE IMMUNOELECTROPHORETIQUE.

La réalisation d'un immuno-électrophorégramme classique comporte les étapes suivantes :

- A - Electrophorèse en gélose.
- B - Double diffusion et formation des arcs de précipitation.
- C - Interprétation des immunophorégrammes et identification des arcs de précipitation.

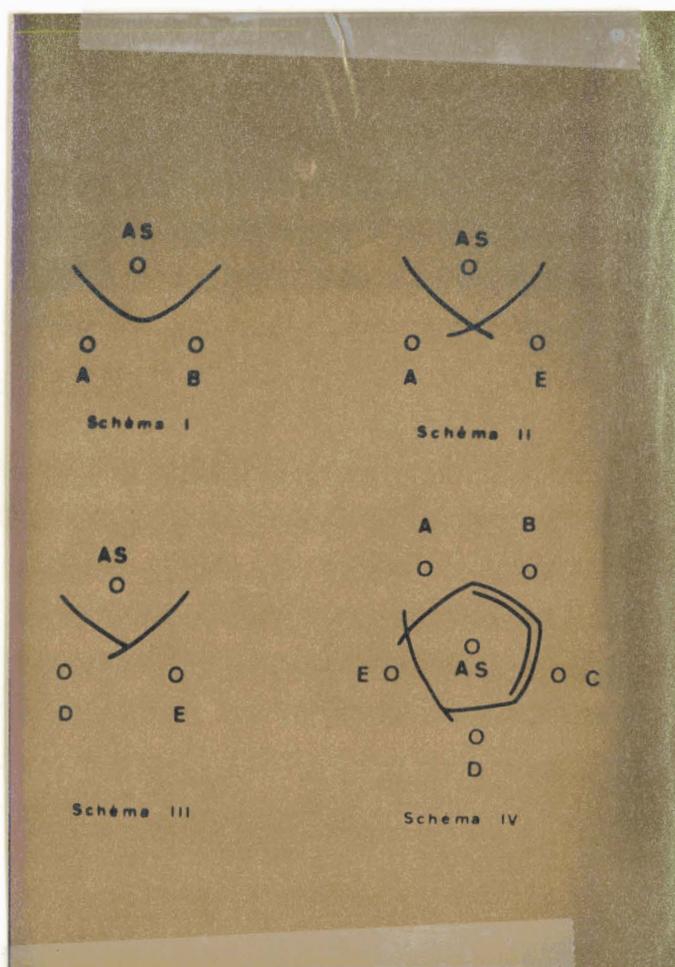


Figure 7

Diagrammes de double diffusion réalisée selon le procédé d'OUCHTERLONY. AS : antisérum capable de réagir avec les antigènes A,B,C,D et E ; A, B : antigènes possédant un site antigénique commun (réaction d'identité totale) ; A, E : antigènes ne possédant pas de site antigénique commun (réaction de non-identité) ; D, E : antigènes possédant un site antigénique commun, E possédant cependant un site antigénique supplémentaire (réaction d'identité partielle) ; B, C : mélanges de deux antigènes possédant , deux déterminants antigéniques identiques dont l'un est, en outre, commun aux antigènes A et D.

#### A - TECHNIQUE ELECTROPHORETIQUE.

Le protocole expérimental d'une électrophorèse destinée à réaliser ensuite un immunophorégramme est, en tous points, identique à celui que nous avons décrit à propos de l'électrophorèse en gélose, à la différence près, que la solution de protéines est déposée, non dans une fente, mais dans un réservoir pratiqué à l'aide d'une aiguille à injections sans biseau de 1,5 mm de diamètre extérieur. Dès la fin de la séparation électrophorétique, on effectue la double diffusion selon le mode opératoire suivant.

#### B - TECHNIQUE DE DOUBLE DIFFUSION.

L'immunsérum est déposé dans une fente creusée longitudinalement dans la gélose à une distance de 5 à 8 mm de l'axe de migration des protéides. Le mode opératoire est ensuite identique à celui que nous avons décrit à propos de la méthode d'OUCHTERLONY : diffusion pendant 2 à 3 jours ; lavage dans le sérum physiologique ; séchage des lames ; lavage dans l'eau courante et révélation par le vert de lissamine ou par l'Amidoschwarz (voir p. 103 ).

#### C - INTERPRETATION DES IMMUNOPHOREGRAMMES.

##### IDENTIFICATION DES ARCS DE PRECIPITATION.

L'identification d'un composé par immuno-électrophorèse peut être effectuée de différentes manières.

1° - En comparant le comportement électrophorétique et, la forme des arcs donnés, d'une part, par le composé étudié (dépot en 1) et un composé pur de référence (dépot en 2) (Fig. 8 a)

2° - Par des réactions d'identité effectués en associant les procédés d'immunoélectrophorèse et de diffusion simple, au moyen des deux méthodes suivantes :

a - Méthode des fentes courtes de CLAUSEN et HEREMANS (222) illustrée par la figure 8 b.

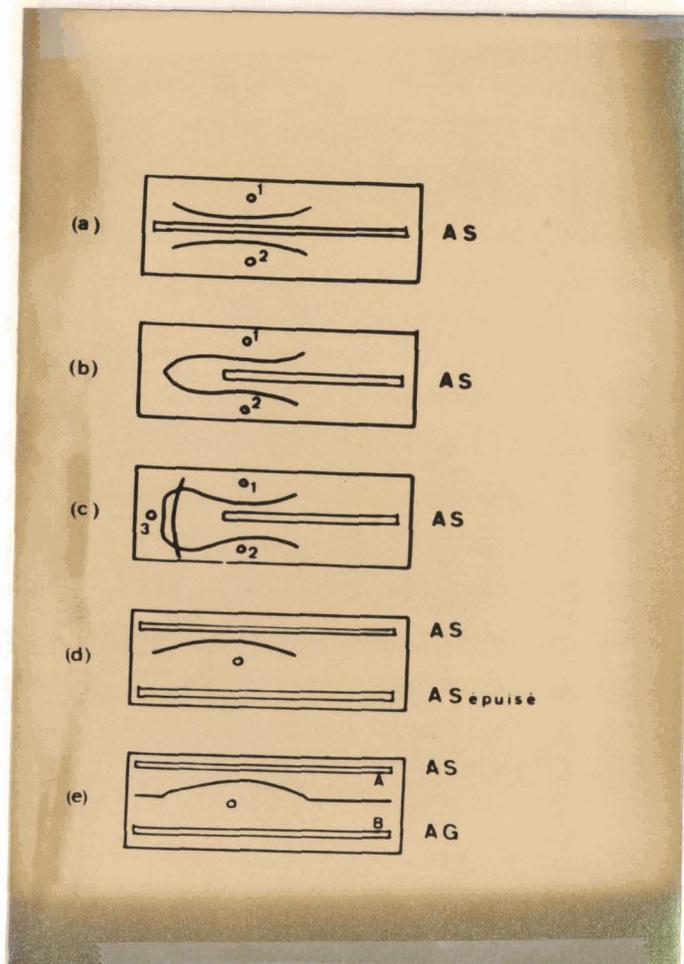


Figure 8

Procédé d'identification par immunoélectrophorèse.

- a - Méthode "comparative"
  - b - Méthode des fentes courtes. Le raccordement des arcs est en faveur d'une identité immunologique entre les antigènes 1 et 2
  - c - Méthode de LEVY et POLONOVSKI. Les solutions antigéniques déposées en 1,2 et 3 donnent une réaction d'identité immunologique. L'arc supplémentaire correspond à la présence en 3 d'un antigène différent.
  - d - Méthode d'épuisement des antisérums.
  - c - Méthode de HANSON
- AS : antisérum ; AG:antigène

b - Méthode des fentes courtes de LEVY et POLONOVSKI (222bis)

illustrée par la figure 8 c, dans laquelle on effectue, en 3, après l'électrophorèse et avant la diffusion, un dépôt d'antigène pur identique à celui qui a été soumis, déposé en 2, à l'électrophorèse.

3° - La méthode d'épuisement sérié d'HEREMANS dont le principe est le suivant : on compare les diagrammes d'immuno-électrophorèse obtenus, d'une part, avec l'immunsérum total et, d'autre part, avec l'immunsérum "épuisé" par des quantités croissantes du composé pur dont on soupçonne l'identité avec la substance étudiée. L'identité immunologique sera reconnue lorsque l'antisérum "épuisé" ne formera pas d'arc de précipitation (Fig. 8 d).

4° - Par la méthode de HANSON (223) qui consiste à faire diffuser l'antisérum déposé dans une gouttière à la rencontre de l'antigène préalablement soumis à l'électrophorèse et de différentes solutions d'antigènes purs contenues dans une seconde gouttière B (Fig. 8 e). L'identité immunologique de deux antigènes sera reconnue lorsque la zone de précipitation formera un trait continu "absorbant" l'arc de précipitation lui-même.

Note. Une variante du procédé consiste à déposer dans la seconde gouttière B, des immunsérums épuisés par un excès de différents antigènes (POORTMAN (224) OSSEMAN (224bis)). Les diagrammes obtenus et leur interprétation seront identiques au cas précédent.

2° - ETUDE DES VARIATIONS DE LA TENEUR DU LAIT DE VACHE EN PROTEIDES  
AU COURS DE LA LACTATION

Nous avons exposé dans la partie historique, les résultats obtenus par de nombreux auteurs à propos des variations de la teneur en globulines immunes du lait de Vache au cours de la lactation et on sait que les laits colostraux en sont particulièrement riches. Il nous a paru intéressant de reprendre cette étude d'une part pour confirmer les travaux antérieurs en les poussant éventuellement plus loin, et, d'autre part, pour nous assurer les meilleures conditions de prélèvement des laits destinés à l'isolement des globulines immunes. Dans ce double but, nous avons déterminé les variations pondérales, d'une part, des protéides totaux et, d'autre part, des globulines immunes au cours de la lactation.

#### MATERIEL ET TECHNIQUES .

##### A - PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS.

Pendant un mois, le lait de Vache a été recueilli deux fois par jour dès après le vélage. Nous avons ensuite espacé les prélèvements: un par jour, puis un tous les trois jours. Le volume de chaque traite a été soigneusement mesuré. Les échantillons de lait ont été recueillis dans des récipients contenant un peu de toluène de manière à empêcher le développement des micro-organismes. Eventuellement, ils ont été conservés à - 20°C.

##### B - PREPARATION DES ECHANTILLONS.

20 ml de lait délipidé par centrifugation à 0°C sont additionnés de 4 volumes d'eau distillée et amenés à pH 4,6 par l'addition d'acide chlorhydrique 1 N. Après un repos de 15 minutes, le précipité de caséine est éliminé par centrifugation. La solution surnageante est soumise à une dialyse de 4 jours en présence d'eau distillée que l'on renouvelle chaque jour, puis lyophilisée. On obtient, de cette manière,

les protéides totaux du lactosérum qui sont pesés.

La caséine a été purifiée par plusieurs lavages successifs avec de l'eau amenée à pH 4,6, lyophilisée et pesée.

#### C - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE.

Les protéides totaux du lactosérum ont été soumis à l'électrophorèse sur papier et en gélose selon les modes opératoires que nous avons décrits plus haut (voir p. 90, 91 ).

### RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans les tableaux XVII (p. 114 ) et XVIII (p. 118 ) et illustrés par les figures 9 (p. 112), 10 (p. 113 ), 11 (p. 116 ) et 12 (p. 117 ). Ils peuvent être résumer de la manière suivante.

1° - La teneur en lactoprotéides totaux (caséines + protéides du lactosérum) atteint 125 g environ p. litre de lait, 24 h après le vélage. Il diminue progressivement jusqu'au 10<sup>e</sup> jour où il se stabilise à environ 30 g p. litre.

2° - La teneur du lait en caséines décroît, elle aussi, progressivement de 70 g environ p. litre le 1<sup>er</sup> jour à environ 25 g p. litre vers le 10<sup>e</sup> jour. Le taux des protéides du lactosérum suit une évolution identique et passe de 80 g à 8 g environ vers le 6<sup>e</sup> jour. La diminution du taux des protéides du lactosérum est donc plus importante que celle des caséines.

3° - L'élimination journalière subit moins de variations : la diminution du taux des protéides est compensée, en effet, par une augmentation de volume de la sécrétion lactée. Ainsi, alors que la quantité de protéides totaux par litre de lait est 5 fois moindre après le 15<sup>e</sup> jour,

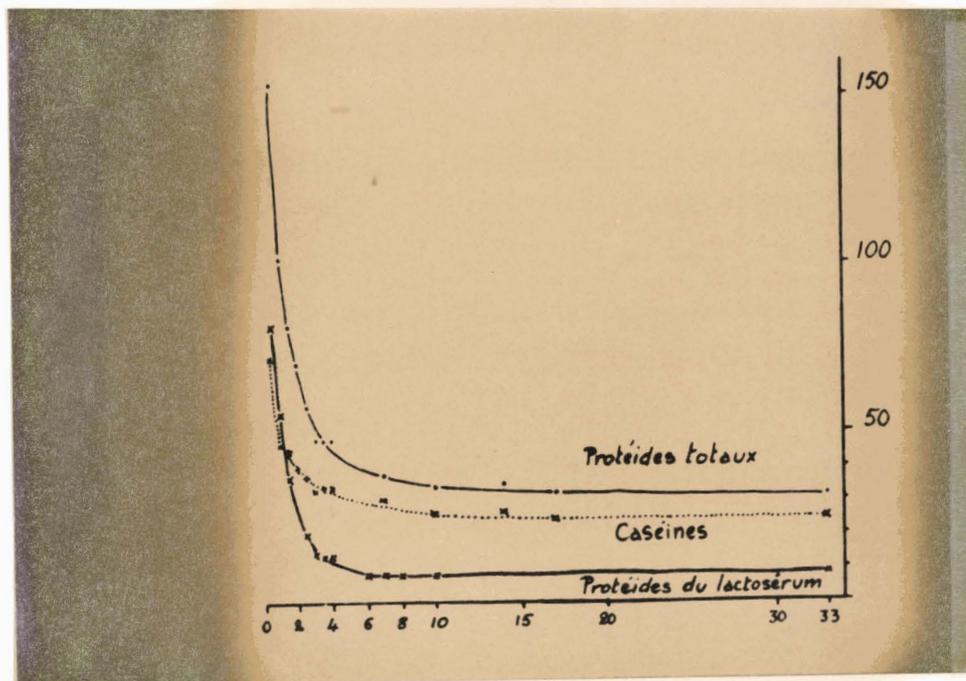


Figure 9

Variation au cours de la lactation de la teneur (en g p. l) du lait de Vache en caséïnes, en protéïdes du lactosérum et en protéïdes totaux.

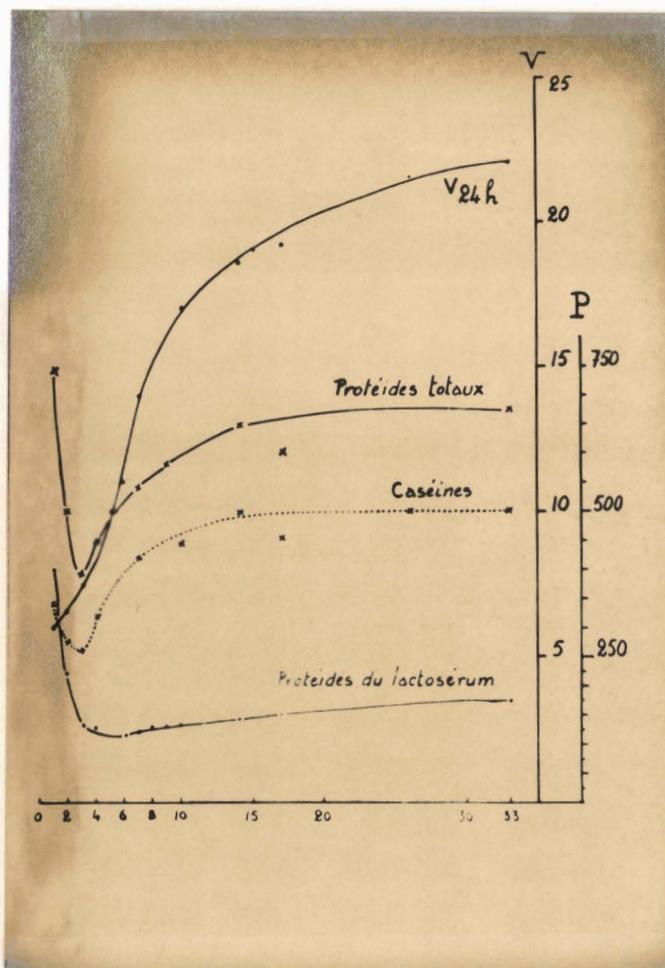


Figure 10

Variation au cours de la lactation chez la Vache du volume journalier ( $V_{24h}$ ) de lait sécrété et de l'élimination journalière des caséines, des protéides du lactosérum et des protéides totaux. En abscisses : nombre de jours écoulés depuis le vélage ; en ordonnées : V : volume en litres de lait sécrété ; P : poids en g de protéides éliminés par 24 heures.

Tableau XVII

Variations du taux des protéides du lait de Vache au cours de la lactation

Jours écoulés après le vélage	Taux de protéides en g p. litre de lait			Volume des 24 h	Elimination journalière (en g de protéides)		
	Caséines	Protéides du lactosérum	Protéides totaux		Caséines	Protéides du lactosérum	Protéides totaux
0,5	72	82	154	-	-	-	-
1	57	67	124	6	348	402	745
2	42	34	76	6,5	275	220	495
3	35	17	62	7,5	263	129	392
4	34	13,6	48	9,5	323	130	453
6	-	7,56	-	11	-	-	-
7	30	7,55	39	14	420	120	540
8	-	7,96	-	16,5	-	131	-
9	-	8,2	-	16	-	131	-
10	26,1	8	34	17	444	136	580
14	27,6	7,7	35	18,5	510	142	652
17	23,6	8,1	32	19	448	154	602
33	22,7	8	31	22	499	176	675

la quantité sécrétée journallement ne subit que de faibles variations.

4° - Les quantités de caséines et de protéides du lactosérum éliminées par 24 h varient en sens inverse : la quantité de protéides du lactosérum passe, en effet, de 400 g à 150 g environ et la quantité de caséines de 350 à 500 g.

5° - Les diagrammes électrophorétiques (Fig. 11 et 12) montrent que la composition du lactosérum varie dans des proportions très importantes et que l'on assiste à un véritable "renversement" dans la répartition des protéides au fur et à mesure que l'on s'éloigne du jour du vélage. En effet, on voit que les laits colostraux sont particulièrement riches en globulines immunes et pauvres en protéides "lactés", comme la lactalbumine et les lactoglobulines. Au contraire, les laits de transition et les laits "parfaits" (voir p.20 ) sont pauvres en globulines immunes et riches en protéides "lactés".

6° - L'enregistrement photométrique des électrophorégrammes nous a permis de déterminer grossièrement la teneur en globulines immunes des différents laits. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XVIII et illustrés par la figure 13. On voit que l'élimination journalière des globulines immunes atteint 330 g dans les 24 heures qui suivent le vélage ! Elle n'est plus que de 38 g dans un lait de transition du 17<sup>e</sup> jour. Au contraire, le taux des protéides "lactés " s'accroît progressivement jusqu'au 10<sup>e</sup> jour pour la lactalbumine et encore au delà du 20<sup>e</sup> jour pour les lactoglobulines.

#### DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus révèlent l'extraordinaire richesse en globulines immunes des laits colostraux et la disparition rapide et continue de celles-ci. Nos observations confirment entièrement celles des autres auteurs.

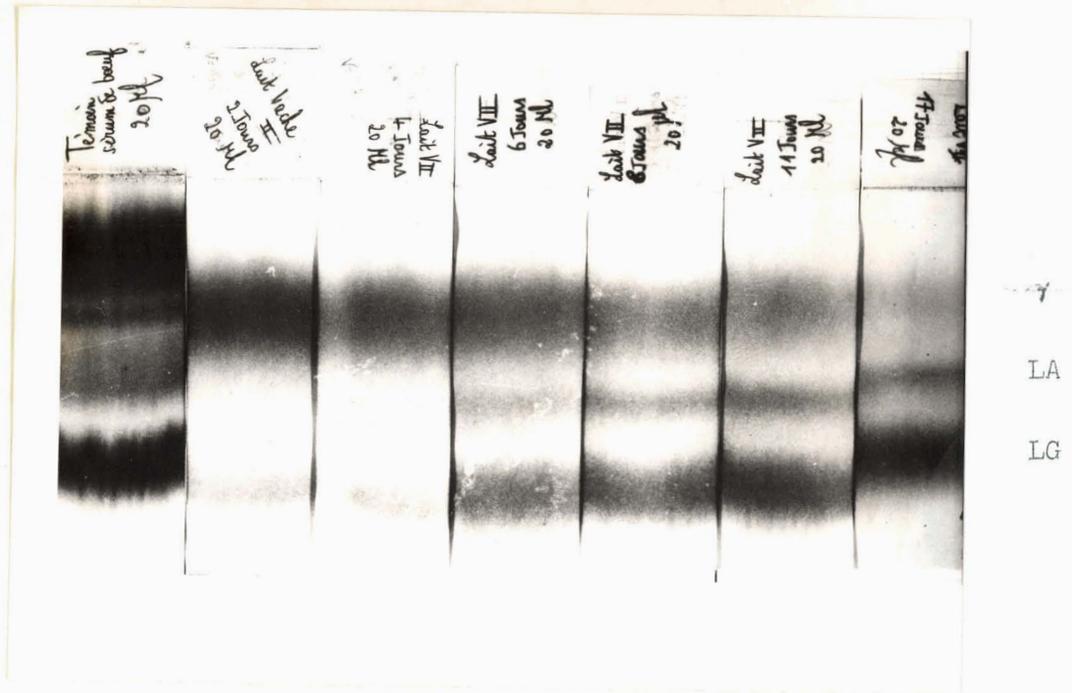


Figure 11

Electrophorèse sur papier à pH 8,6 des protéides du lactosérum de Vache à différents jours de la lactation.  $\gamma$  : zone des  $\gamma$ -globulines; LA : zone de la lactalbumine ; LG : zone des lactoglobulines.

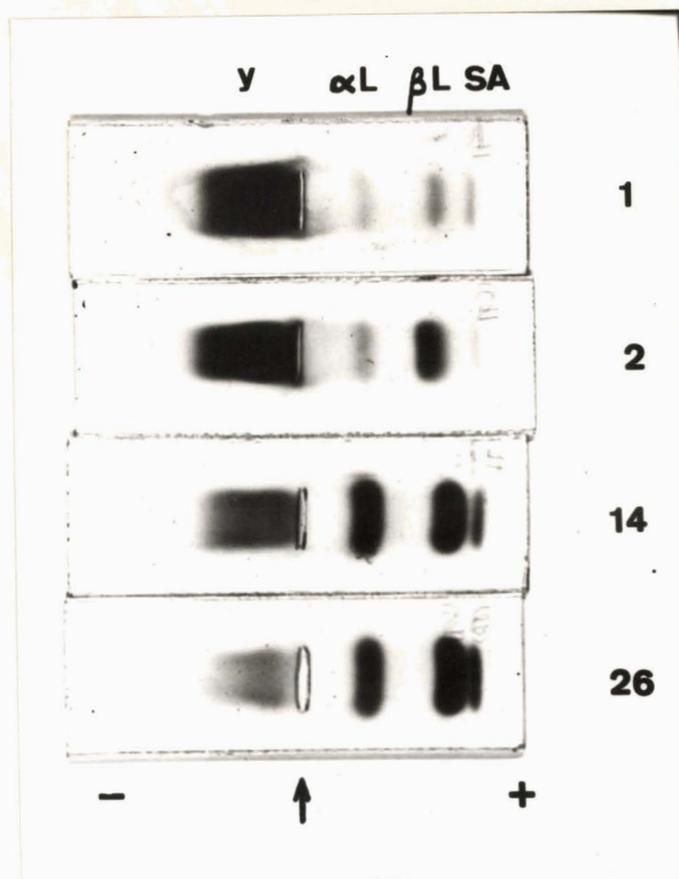


Figure 12

Electrophorèse en gélose (tampon véronal ; pH 8,2 ) de lactosérums de Vache à différents jours après le vélage (indiqués par les nombres).

$\gamma$  : globulines immunes ;  $\alpha L$  :  $\alpha$ -lactalbumine ;  $\beta L$  :  $\beta$ -lactoglobulines ; SA : sérumalbumine. La flèche indique le point de dépôt des lactosérums.

Tableau XVIII

Composition du lait de Vache (en g p. l) en globulines immunes, lactalbumine et lactoglobulines (\*) et élimination journalière de ces composés à différents jours de la lactation.

Jours écoulés depuis le vêlage	Composition du lait (en g p. l)			Élimination journalière (en g)		
	Globulines immunes	Lactalbumine	Lactoglobulines	Globulines immunes	Lactalbumine	Lactoglobulines
1	65	traces	2	390	traces	12
2	31,24	traces	2,46	203	traces	18
4	9,5	1,7	2,4	90	16	23
6	3,9	1,4	2,2	43	15	25
8	3,5	1,5	2,6	58	25	43
10	3,2	1,7	2,9	54	29	49
14	2,8	1,9	3	52	35	56
17	2,1	1,8	4,2	40	34	80
19	1,5	1,45	4,2	33	33	92

( \* ) Pour la caséine, voir le tableau XVII

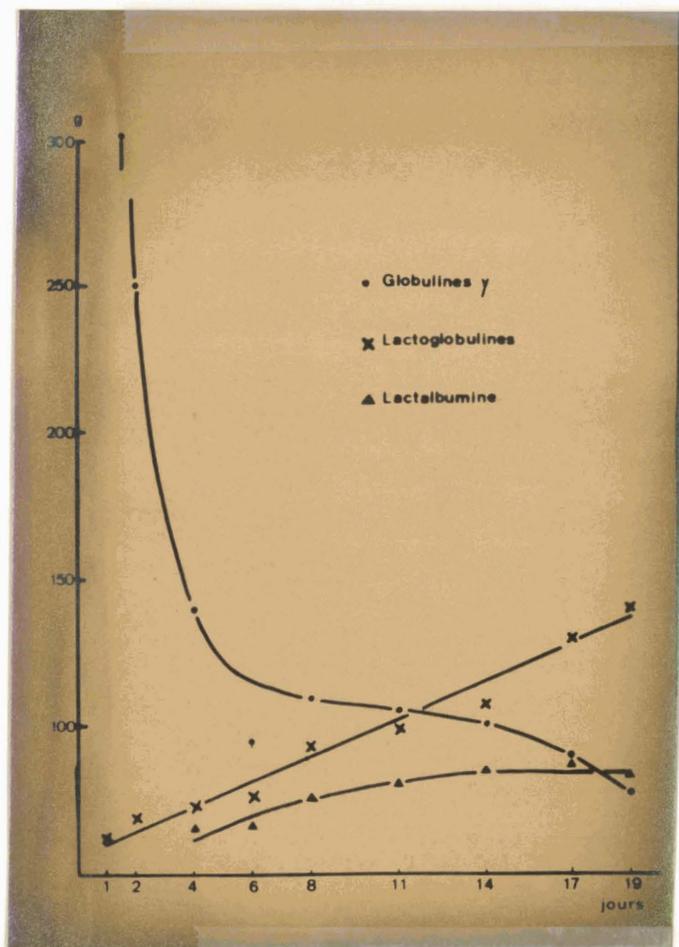


Figure 13

Courbes d'élimination journalière des globulines immunes, de la lactalbumine et de la lactoglobuline du lait de Vache à différents jours de la lactation.

En abscisses : nombre de jours écoulés depuis le vélage ; en ordonnées : quantités (en g) de protéides éliminés par 24 h.

Les premières recherches concernant les variations quantitatives des protéides du lait de Vache ont été effectuées, en 1916, par CROWTHER et RAISTRICK (225) qui ont étudié la répartition dans le lait de la caséine, des "albumines" et des "globulines" pendant les 8 jours qui suivent le vélage. La caséine était précipitée par l'alun de potassium et le taux des "albumines" et des "globulines" était déterminé en dosant l'azote des précipités obtenus en fractionnant le lactosérum par le sulfate de magnésium et le sulfate de sodium. Les résultats sont précisés dans le tableau XIX (p. 121 ). En 1925, ENGEL et SCHLAG (226) ont dressé, par des procédés analogues, un bilan plus complet des variations des différents constituants du lait de Vache, mais ne se sont intéressés, du point de vue protéique, qu'à la caséine et aux protéides totaux du petit lait (Tableau XIX). Nous avons rassemblé dans le tableau XIX les résultats obtenus par d'autres auteurs, soit par dosage d'azote, soit par l'analyse pondérale. Tous révèlent une diminution rapide des protéides totaux du lactosérum.

Les méthodes d'électrophorèse libre ou d'électrophorèse de zone ont permis d'obtenir des résultats plus précis, grâce à leur pouvoir de résolution plus important.

Les premières études électrophorétiques ont été effectuées par SMITH (227), en 1946, qui montra que, dans les laits colostraux, les "lactoglobulines immunes", possédant une mobilité de globulines  $\gamma$ , représentaient la fraction protéique majeure du colostrum de Vache (50 à 60 p.100 des protéides totaux et 85 à 90 p.100 des protéides du lactosérum ). Au contraire, elle devient une fraction "mineure" dans les diagrammes d'électrophorèse des lactosérums de laits parfaits. (SMITH) (228).

Les premières études "cinétiques" précises des variations des protéides du lait ont été réalisées en 1947 par GRONWALL (229) . GRONWALL montra, que pendant les 37 jours de son expérience, le taux des caséines demeurait pratiquement constant, que la quantité de globulines

Tableau XIX

Variations quantitatives (a) (en g p. litre) des protéides du colostrum et du lait de Vache au cours de la lactation.

Jours après le vélage	PROTEIDES TOTAUX						CASEINES				PROTEIDES DU LACTOSERUM		ALBUMINES	GLOBULINES
	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(b)	(c)	(d)	(e)	(c)	(d)	(b)	(b)
0,5	-	103,1	147,8	163	-	-	-	35,1	47,2	50	68	100,6	-	-
1	137	-	66,9	-	140	160	46,5	-	34,4	-	-	32,5	8,7	81,8
1,5	-	38	-	-	-	-	-	27,7	-	-	10,3	-	-	-
2	115,9	-	35,7	-	84	85	42,2	-	27,4	-	-	8,3	10,5	63,2
3	81,9	-	-	-	51	65	36,6	-	-	-	-	-	8,7	36,6
4	57,8	-	-	-	42	45	31,6	-	-	-	-	-	6,8	19,4
5	45,2	35,5	-	-	-	-	20,5	26,8	-	-	8,7	-	4,3	12,4
6	44,6	-	-	-	41	-	28,5	-	-	-	-	-	3,7	12,4
7	43,8	-	-	-	-	-	28,4	-	-	-	-	-	3,7	11,7
8	39	-	-	-	39	-	28,5	-	-	-	-	-	3,1	7,4
10	-	-	-	-	-	35	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	30	-	-	-	-	-	22,3	-	-	7,7	-	-

( a ) Déterminées pondéralement ou par dosage d'azote

( b ) CROWTHER et RAISTRICK (230)

( c ) ENGEL et SCHLAG (231)

( d ) DEUTSCH (232)

( e ) MACY et al. (233)

( f ) PARRISH et al. (234)

( g ) JOURNET et coll. (235)

$\gamma$  diminuait très rapidement pour se stabiliser vers le 7<sup>e</sup> jour et que le taux de  $\beta$ -lactoglobulines augmentait sensiblement ( \* ). Ultérieurement, les analyses électrophorétiques réalisées par différents auteurs confirmèrent ces résultats : Mc MEEKIN (236) ; HEYNDRICKX et al. (237) (voir tableau XX ) ; WAITE et al. (238) ; LARSON et KENDALL (239) ; LARSON et al. (240).

Il est intéressant, en outre, du point de vue de la biochimie comparée, de signaler que des variations identiques ont été observées à propos du lait de nombreux autres Mammifères, comme la Femme, la Truie, la Chèvre, la Jument et la Brebis (voir, en particulier, DEUTSCH (241)). Les variations qualitatives et quantitatives des protéides du lait de Femme, au cours de la lactation, ont été particulièrement bien étudiées et, depuis les dosages de HYTTEN (242), les analyses électrophorétiques ont montré la rapide diminution des globulines immunes du lait dont la "stabilisation" est réalisée vers le 6<sup>e</sup> jour (BISERTE et MASSE (243) ; BISERTE et al. (244) ; DEUTSCH (245) ; FONTAINE (246) ; MONTREUIL et al. (247) NARDUCCI et PALAZZETTI (248) ; NORDBRING (249) ; SAGER (250) ; SCHULTE et MÜLLER (251)). En outre, l'application de l'immuno-électrophorèse a permis d'identifier et de suivre l'évolution des protéides du lait de Femme et de démontrer que les globulines immunes du colostrum humain étaient essentiellement des globulines  $\gamma$  A ( \* \* ) (voir, à ce sujet, la revue générale de HANSON (252)). En effet, la répartition, dans le lait de Femme, des globulines du système gamma est la suivante : globulines  $\gamma$  A : 90 p.100 ; globulines  $\gamma$  G 10 p.100 (De MURALT et al.) (253).

---

( \* ) L'augmentation du taux de  $\beta$ -lactoglobuline au cours de la lactation a également été observée par HEYNDRICKX et al. (254) (voir aussi nos propres résultats, p. 118 et fig. 13).

( \* \* ) Comme dans le lait de la Lapine (FEINSTEIN) (255)

Tableau XX

Variations quantitatives (en g p. l) ( \* ) des protéides du colostrum de Vache au cours de la lactation (d'après HEYNDRICKX et al.) (256).

Temps écoulé depuis le vélage	Protéides totaux	Caséines	"Albumines"	"Globulines"	Globulines immunes ( * * )
0 h	195	58	2	120	115
6 h	148	48	1,8	85	79
12 h	99	40	1,3	49	47
20 h	77	37	0,56	43	30
30 h	57	35	0,80	16	14,7
43 h	46	33	0,66	8	6,9
8 j.	35	28	0,50	2	1,5

( \* ) Déterminées par dosage d'azote sur des fractions protéiques obtenues par la méthode de ROWLAND (257) : précipitation des protéides totaux par l'acide trichloracétique à 12 p.100, de la caséine par acidification des laits à pH 4, 6, des "albumines" par chauffage, des "globulines" par fractionnement au sulfate de magnésium du lactosérum.

( \* \* ) Détermination, par électrophorèse libre de TISELIUS, du constituant de mobilité 1,8 à  $2,1 \times 10^{-5}$ , en tampon véronal de pH 8.

## CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude cinétique des variations du taux des principaux constituants protéidiques du lait sont les suivantes:

1 - Les laits colostraux sont, jusqu'au 3<sup>e</sup> jour, essentiellement composés de globulines immunes qui représentent, en effet, 60 à 95 p.100 des protéides totaux du lactosérum. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne du jour du vêlage, la quantité de globulines immunes décroît et représente, par exemple, moins de 20 p.100 des protéides du lactosérum au 17<sup>e</sup> jour. Au contraire, le taux des protéides "lactés" (lactalbumine, lactoglobulines et caséines) s'accroît progressivement. Ces résultats sont intéressants d'un point de vue à la fois biologique et biochimique.

2 - D'un point de vue biologique, nos conclusions rejoignent celles des nombreux auteurs que nous avons cités dans la partie historique (voir p. 120) et qui soulignaient déjà la richesse particulière des laits colostraux en globulines immunes.

En outre, l'application des méthodes électrophorétiques nous a permis de déterminer la quantité de globulines immunes transmises journallement de la Vache au veau nouveau-né qui reçoit, en 4 jours (\*), compte tenu de la quantité de colostrum qu'il absorbe, environ 500 g de globulines immunes.

3° - Du point de vue de nos propres recherches, il est évident que les laits colostraux représentent, jusqu'au 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour, le matériel de choix pour effectuer l'isolement des globulines immunes dont ils sont particulièrement riches. L'isolement de ces dernières ne devrait donc

---

(\*) Précisons que l'inhibiteur trypsique est présent dans le lait pendant 3 à 4 jours après le vêlage.

pas présenter de difficultés majeures. En effet, comparativement au sérum et à l'inverse de ce dernier, le colostrum est, non seulement, très riche en globulines immunes, mais il renferme, en outre, un nombre restreint de protéides, dont certains d'ailleurs, comme les caséines, peuvent être aisément éliminés d'une manière quantitative.

Cette dernière série de recherches dont nous venons d'exposer les résultats, -en dehors de son intérêt biologique sur lequel nous ne nous sommes guère étendue puisque nos préoccupations étaient essentiellement d'ordre physico-chimique-, nous a placée, dès le début de nos tentatives d'isolement des globulines immunes du lait, dans les conditions expérimentales les plus favorables. En effet, l'application des procédés que nous avons mis au point, et que nous décrirons dans le chapitre suivant, nous a permis d'améliorer nos rendements en utilisant les laits colostraux comme matériel de fractionnement, en choisissant le moment de la lactation où le taux des globulines immunes était maximal et où celui des autres protéides était, au contraire, minimal.

3° - PROCEDES D'ISOLEMENT DES GLOBULINES IMMUNES DU COLOSTRUM

DE VACHE.

A l'exception de protéides qui possèdent des propriétés physico-chimiques particulières, comme les caséines dans les laits ou l'orosomucoïde dans les sérums, l'isolement d'un protéide pur, à partir de milieux biologiques complexes, en une seule opération, est impossible et, généralement, on doit appliquer successivement divers procédés. Au laboratoire, nous combinons le fractionnement des solutions de protéides par le sulfate d'ammonium (gradient de concentration associé à un gradient de pH) avec la chromatographie sur des celluloses modifiées et avec la filtration sur gel de Sephadex. L'emploi de la méthode de relargage conduit à l'isolement de fractions constituées d'un petit nombre de protéides dont l'isolement peut être ensuite achevé par chromatographie.

Nous avons appliqué ce mode opératoire général à la mise au point d'un procédé original de préparation et de fractionnement des globulines immunes du colostrum de Vache préalablement délipidé et décaséiné. Nous décrirons donc successivement :

- 1 - La préparation et l'étude du colostrum (p. 128).
- 2 - Le procédé de fractionnement par le sulfate d'ammonium (p. 134).
- 3 - Les méthodes de chromatographie sur colonnes des préparations obtenues par la méthode de relargage (p. 153).

## I - PREPARATION ET ETUDE DES LAITS COLOSTRAUX.

### A - MODE OPERATOIRE.

#### 1° - Traitement des laits colostraux.

Le colostrum de Vache est recueilli et rassemblé pendant les premières 24 ou 48 heures qui suivent le vélage. Il est, le plus rapidement possible, délipidé par centrifugation à 0°C. On sépare ainsi le beurre et un sédiment abondant ( \* ). Le colostrum est ensuite décaséiné selon le procédé de LINDERSTRØM-LANG (258).

Décaséinisation des laits colostraux. On ajoute lentement (en 3 h) à 2 l de colostrum délipidé ( \* \* ), de l'acide chlorhydrique 0,15 N, jusqu'à obtenir un pH de 4,6 (environ 750 ml). Après un repos de 24 h à + 2°C, on élimine par centrifugation le précipité de caséines. Le lactosérum limpide ainsi obtenu est soumis au fractionnement par le sulfate d'ammonium.

#### 2° - Etude du lactosérum colostrale.

Nous avons appliqué à l'étude des lactosérums colostraux destinés aux divers fractionnements les procédés d'électrophorèse, d'immuno-électrophorèse et d'ultracentrifugation que nous avons décrits dans le chapitre précédent (voir p. 90 ). Les résultats que nous

- 
- ( \* ) Ce précipité est très abondant dans les laits colostraux. Il persiste, en faible quantité, dans les laits "parfaits".
- ( \* \* ) Dans la méthode originale de LINDERSTRØM-LANG, le lait est d'abord dilué au 1/5. Ces conditions ne sont par toujours applicables aux laits colostraux car on observe souvent une mauvaise précipitation des caséines. En outre, l'opérateur doit traiter alors des volumes beaucoup plus importants.

avons obtenus sont les suivants.

## B - RESULTATS

1° - Analyse électrophorétique. Les résultats des analyses électrophorétiques sur papier et en gélose ont été exposés dans le chapitre précédent et nous avons vu que les laits colostraux renfermaient environ 80 à 90 p.100 de globulines immunes et des proportions très faibles des autres protéides, comme les lactoglobulines et la lactalbumine (Fig. 12; p. 117 et tableau XVIII ; p. 118 ).

2° - Analyse immuno-électrophorétique. La figure 14 représente un diagramme immunophorétique caractéristique des laits colostraux. L'interprétation des immunophorégrammes sera effectuée dans le dernier chapitre consacré aux études immunophorétiques des globulines immunes du colostrum et du sérum de Vache et nous nous bornerons ici à préciser la nature des protéides mis en évidence par l'immuno-électrophorèse. On voit que les laits colostraux renferment des globulines  $\gamma G$  et  $\gamma M$  et peut être des globulines  $\gamma A$  ( \* ). On identifie, en outre, les arcs de précipitation de la sérum-albumine, des lactoglobulines et de la lactalbumine.

3° - Ultracentrifugation. L'immunoélectrophorèse n'apporte aucune information concernant les quantités relatives de ces divers constituants. L'électrophorèse permet de déterminer les proportions de lactalbumine et de lactoglobulines présentes dans les colostrums, mais non celles des différentes globulines immunes. Au contraire, l'ultracentrifugation devait en principe apporter des renseignements précieux

---

( \* ) Les immunophorégrammes présentent un arc de précipitation identique à celui que donnent les globulines  $\gamma A$  dans les diagrammes d'immuno-électrophorèse du sérum humain. Ce seul critère est insuffisant pour conclure à la présence de globulines  $\gamma A$  dans le colostrum de Vache. Seul, l'isolement de globulines  $\gamma A$  pures, à partir du sérum de Vache, permettra, quand il sera réalisé, d'effectuer les réactions d'identité indispensables.

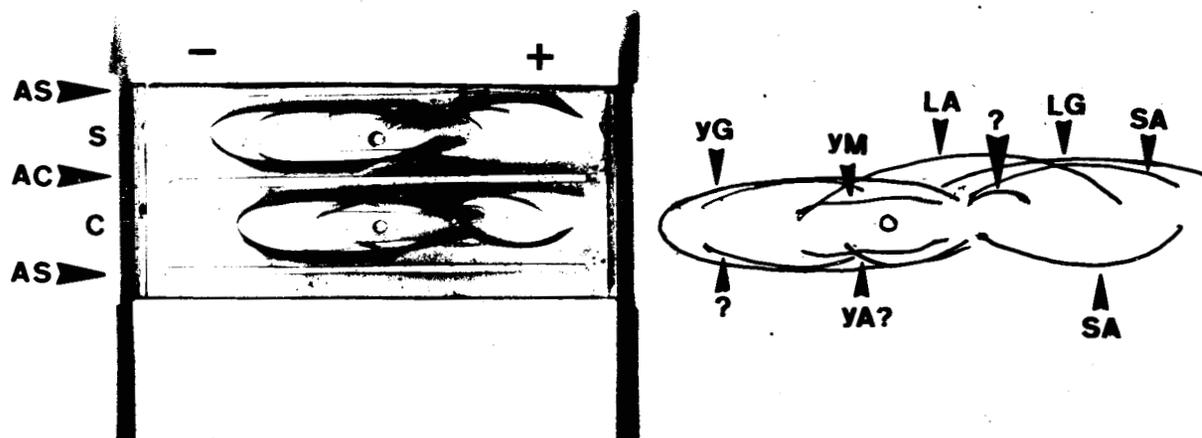


Figure 14

Diagrammes immunophorétiques de sérum (S) et de colostrum (C) de Vache.

AS ; AC : immunsérums de Lapin antiprotéides sériques (AS) et colostrales (AC) de Vaché.

$\gamma G$ ,  $\gamma M$ ,  $\gamma A$  : respectivement, globulines  $\gamma G$ ,  $\gamma M$  et  $\gamma A$  ;  
 LA : lactalbumine ; LG : lactoglobuline ; SA : sérum albumine.

à ce propos, puisque la constante de sédimentation élevée des globulines YM (18-20S) laissait espérer leur caractérisation sur les diagrammes d'ultracentrifugation et leur dosage. La figure 15 montre qu'il n'en a rien été et que deux pics seulement ont été caractérisés dans les laits colostraux : l'un est constitué de substances de faible constante de sédimentation (2,5 S ) qui sont vraisemblablement la lactalbumine et les lactoglobulines) ; l'autre, plus important puisqu'il représente sensiblement, 80 p.100 des protéides totaux, est constitué de composés de constante de sédimentation 6,8 S (globulines  $\gamma$  G + globulines  $\gamma$  A).

### C - DISCUSSION

1 - L'analyse immunoélectrophorétique révèle l'existence, dans le colostrum de Vache, de plusieurs constituants dont les proportions relatives ne peuvent être précisées : globulines  $\gamma$  G,  $\gamma$  A et YM ; lactoglobulines ; lactalbumine ; séralbumine. Au contraire, l'électrophorèse et l'ultracentrifugation permettent de déterminer la composition du colostrum qui est essentiellement constitué de globulines immunes 7S :  $\gamma$  G et  $\gamma$  A dans des proportions respectives inconnues. L'ultracentrifugation du colostrum ne permet pas de déceler de globulines YM ( $S_{20w} 19 \pm 1$ ). Cependant, ces dernières existent dans les laits colostraux puisque nous les avons caractérisées par immuno-électrophorèse (Fig. 14 ; p.13 ) du colostrum et par ultracentrifugation (Fig.15 ; p. 132 ) de certaines fractions chromatographiques obtenues à partir de globulines immunes préparées par relargage au sulfate d'ammonium. Nous pouvons donc conclure que les globulines YM ne sont présentes dans le colostrum de Vache qu'en faible proportion n'excédant pas 3 à 5 p.100 des protéides totaux. En effet, si elles existaient en quantité supérieure, le pic 19 S serait visible sur les diagrammes d'ultracentrifugation.

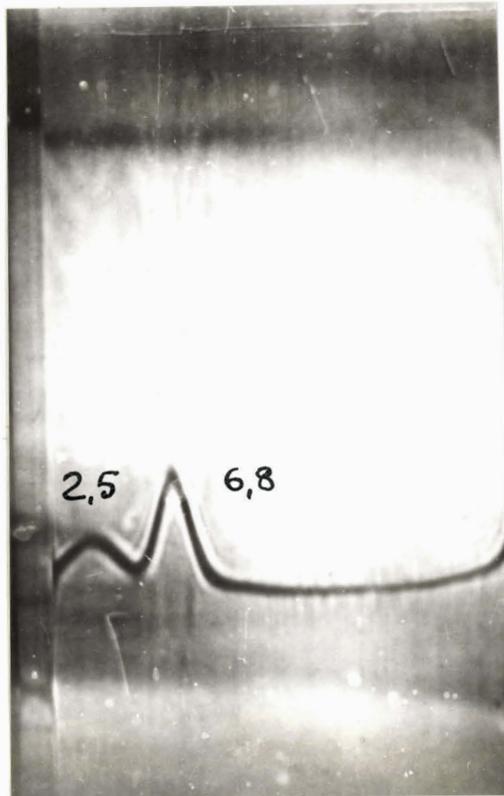


Figure 15

Diagramme d'ultracentrifugation d'un lactosérum colostrale.  
Tampon : NaCl 1M/phosphate 0,1 M/bicarbonate 0,1 M, de pH 7,2.  
Vitesse de régime (en t/mn) : 59 780. Durée du démarrage : 8 mn.  
Inclinaison de la barre : 65. Température : 20°C. Epaisseur de  
la cellule : 12 mm. Temps de centrifugation : 31 mn.

2 - Le pic des composés de  $S_{20w}$  10 est absent des diagrammes d'ultracentrifugation. Cette observation est très importante car elle interviendra dans l'interprétation et dans la discussion de certains diagrammes d'ultracentrifugation de fractions chromatographiques (voir p.163 et 180).

3 - Il est intéressant de souligner qu'il n'y a pas une correspondance absolue entre les comportements électrophorétiques et immunoélectrophorétiques des globulines immunes du sérum et du colostrum de Vache. En effet, les deux sortes de diagrammes (Fig. 12 ; p.117 et fig. 14 ; p.130) montrent que la zone des globulines  $\gamma G$  est amputée de la fraction la plus cathodique des globulines  $\gamma G$  "lentes". Ce résultat interviendra ultérieurement dans notre discussion concernant la comparaison des globulines immunes du sang et du colostrum, car il constituera un argument sérieux dans la démonstration que le colostrum renferme une "population" bien déterminée de globulines immunes.

4 - Les diagrammes d'immunoélectrophorèse que nous avons obtenus présentent moins d'arcs de précipitation que les diagrammes de HANSON (259), de HANSON et JOHANSSON (260) (12 arcs), de GUGLER, BEIN et v. MURALT (261) (12 arcs) et de v. STECK (262). Ce résultat s'explique par la présence, sur les diagrammes des auteurs, des arcs de précipitation des caséines (3 pour les caséines  $\alpha$  ; 1 pour la caséine  $\beta$  et 1 pour la caséine  $\gamma$  ). Ceux-ci sont absents de nos diagrammes, ainsi que la lactotransferrine de GROVES puisque nos antisérums ont été préparés avec des colostrums décaséinés. En dernière analyse, nos résultats sont donc pratiquement identiques à ceux des auteurs précédents.

#### D - CONCLUSIONS

Le colostrum de Vache renferme une proportion importante de globulines immunes représentées essentiellement par des globulines "7 S". Les globulines  $\gamma M$  sont décelables seulement par l'immunoélectrophorèse et non par l'ultracentrifugation. Elles sont donc

présentes dans le colostrum dans une proportion inférieure à 3-5 p.100 des protéides totaux. Les globulines immunes sont accompagnées de faibles quantités de séralbumine, de lactalbumine et de lactoglobulines.

Le colostrum représente donc un excellent matériel pour réaliser l'isolement des globulines immunes. Toutefois, l'analyse des diagrammes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques laissent présager qu'il contient une "population" de globulines immunes apparentées aux globulines "rapides".

## II - FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM COLOSTRAL

### PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Les protéides du lactosérum ont été fractionnés en associant un gradient discontinu de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient discontinu de pH. On obtient, de cette manière, une série de précipités dont la composition centésimale en glucides est déterminée par l'application des méthodes de dosages colorimétriques décrites plus haut (voir p. 71 ) et qui sont soumis systématiquement à l'analyse électrophorétique et immunophorétique destinée à préciser la nature de leurs constituants protéidiques. Certains d'entre eux ont, en outre, été étudiés par ultracentrifugation. Seules les préparations contenant des globulines immunes ont été retenues pour être soumises ensuite à la chromatographie sur celluloses modifiées. Nous exposerons donc essentiellement, dans ce paragraphe, le procédé de fractionnement des lactoprotéides par le sulfate d'ammonium, en renvoyant le lecteur au premier chapitre pour la description des méthodes électrophorétiques, immunophorétiques et ultracentrifugationnelles.

## A - MODE OPERATOIRE.

### 1° - ISOLEMENT DES PRECIPITES.

A 2 volumes de lactosérum ajusté à pH 7 par l'addition d'ammoniaque, on ajoute 1 volume d'une solution saturée en sulfate d'ammonium à la température du laboratoire et ajustée elle-même à pH 7. Après un repos de 24 h à + 4°C, le précipité P<sub>1</sub> formé est recueilli par centrifugation continue effectuée à l'aide d'une centrifugeuse SHARPLESS ou par centrifugation réalisée avec le rotor creux ("batch rotor") de la centrifugeuse préparative SPINCO, modèle L.

Le fractionnement est ensuite poursuivi selon le schéma de la figure 16. L'ajustement des solutions aux différents pH est effectué par l'addition d'acide chlorhydrique 6 N ou d'ammoniaque. La demi-saturation en sulfate d'ammonium est obtenue en ajoutant à la solution S<sub>3</sub>, préalablement ajustée à pH 7, un tiers de son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium à pH 7. Quant à la saturation de la solution S<sub>6</sub>, elle est assurée par une agitation de plusieurs heures, à la température du laboratoire, en présence d'un léger excès de sulfate d'ammonium cristallisé. Un repos de 24 h à + 2°C est observé avant de recueillir chaque précipité selon le mode opératoire décrit à propos de l'isolement du précipité P<sub>1</sub>.

Les précipités sont redissous dans le minimum d'eau distillée, le pH étant éventuellement ajusté à 7-7,5 par l'addition d'ammoniaque. Les solutions obtenues, éventuellement centrifugées, sont ensuite dialysées contre de l'eau distillée dans des tubes de cellophane (NOJAX) (préalablement lavés pendant 2 jours à l'eau courante) (\*), jusqu'à ce que la réaction des ions ammonium, donnée par le réactif de NESSLER, soit négative. La fraction adialysable est enfin lyophilisée et pesée.

---

(\*) Ce lavage est destiné à éliminer des polysides adialysables solubles, constitués de glucose et de xylose, et des protides présents dans les membranes de cellophane.

Solution de protéides lactés, ajustée à pH 7 et additionnée d'un demi-volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à pH 7.

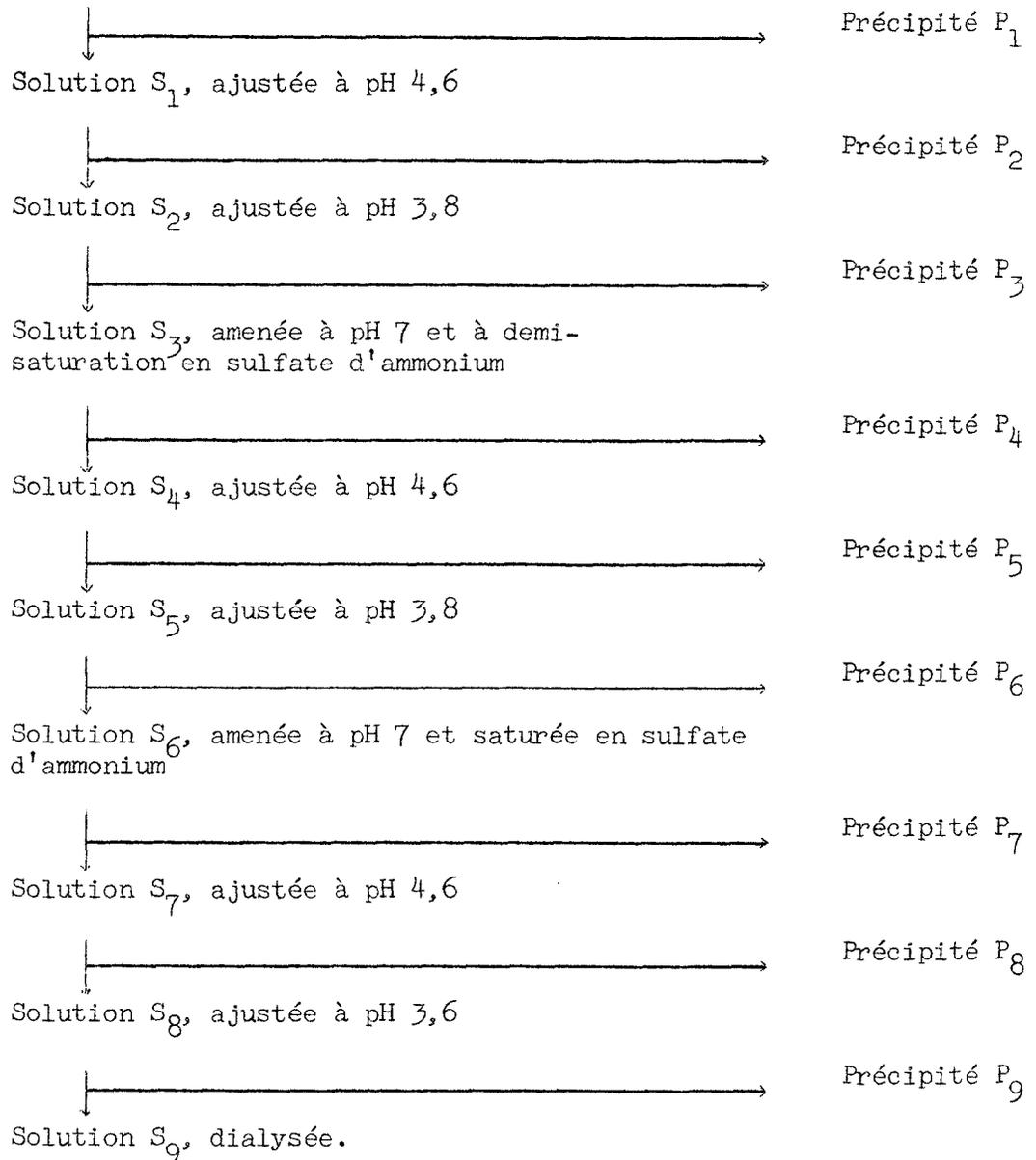


Figure 16

Schéma général de fractionnement du colostrum de Vache.

## 2° - ETUDE DES PRECIPITES.

a - Détermination de la composition centésimale en glucides. La composition centésimale en oses "neutres", osamines et acides sialiques des préparations est déterminée à l'aide des méthodes de dosages colorimétriques que nous avons décrites plus haut (voir p. 71 et suivantes).

b - Etude électrophorétique et immunophorétique. Chacun des précipités obtenus et les colostrums de départ sont soumis à l'électrophorèse sur papier et en gélose et à l'immunoélectrophorèse selon les modes opératoires que nous avons décrits dans le chapitre réservé aux techniques analytiques générales (voir p. 90 et suivantes).

c - Application de la méthode de diffusion d'OUCHTERLONY. La méthode de diffusion d'OUCHTERLONY a été appliquée aux différents précipités dans la recherche de réactions d'identité de certains protéides. Nous en avons décrit le protocole expérimental à la page 102.

d - Ultracentrifugation. Les ultracentrifugations des précipités  $P_1$ ,  $P_3$  et  $P_4$  ont été effectuées dans les conditions que nous avons précisées à la p. 97 .

## B - RESULTATS.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans les tableaux XXI à XXIV et illustrés par les figures 17 à 25. Nous pouvons les résumer de la manière suivante, en exposant, d'abord les résultats généraux, puis les résultats particuliers à chacun des précipités.

1° - RESULTATS GENERAUX.

1 - Le fractionnement des laits colostraux par le sulfate d'ammonium (gradient de concentration et gradient de pH) fournit plusieurs précipités différents par la nature et la répartition des protéides qui les constituent. Ces derniers ont été étudiés par électrophorèse et par immunoélectrophorèse. Le tableau XXII et les figures 17 et 18 montrent que, seuls, les précipités P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> renferment des proportions importantes de globulines immunes. Nos études ultérieures porteront donc essentiellement sur ces trois précipités.

Les différences que l'on observe dans la composition en protéides des précipités obtenus sont confirmées par l'étude de la répartition des glucides conjugués qui varie dans de larges proportions d'un précipité à un autre, ainsi que les rapports oses neutres/osamines et oses neutres/acides sialiques (tableau XXI).

2 - Les précipités P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> représentent de 85 à 90 p.100 des protéides totaux isolés du colostrum par le fractionnement au sulfate d'ammonium. Cette proportion est voisine de celle qui avait été antérieurement déterminée par électrophorèse quantitative (voir p. 118) et par ultracentrifugation (voir p. 131 ) du colostrum. Ce résultat, fondé sur un procédé physico-chimique d'isolement des protéides qui met à l'abri des causes d'erreurs des méthodes électrophorétiques, confirme d'une manière définitive la richesse des laits colostraux en globulines immunes.

3 - L'examen des tableaux XXIII et XXIV (p. 145 et 147 ) et des figures 19 et 20 (p. 143 ) montre que les résultats fournis par la méthode de relargage au sulfate d'ammonium ne sont pas reproductibles malgré une standardisation absolue du procédé. En effet, les rendements pondéraux, d'une part, la composition centésimale en glucides, d'autre part, varient dans de larges proportions d'un colostrum à un autre. Ces résultats pourraient a priori

Tableau XXII

Nature des protéides, identifiés par immuno-électrophorèse et par électrophorèse, présents dans les différents précipités obtenus par un fractionnement par le sulfate d'ammonium de lactosérums colostraux.

Désignation des précipités	Nature des protéides identifiés
P <sub>1</sub>	Globulines $\chi$ G + parfois globulines $\chi$ M
P <sub>3</sub>	Globulines $\chi$ G + parfois globulines $\chi$ M + lactalbumine + lactoglobulines + sérumalbumine
P <sub>4</sub>	Globulines $\chi$ G + globulines $\chi$ A + lactalbumine + traces de lactoglobulines + sérumalbumine
P <sub>6</sub>	Lactalbumine + lactoglobulines + sérumalbumine
P <sub>7</sub>	Globuline "basique" + traces de lactalbumine + lactoglobulines + parfois, lactotransferrine + transferrine + globuline $\alpha_1$ sérique
P <sub>9</sub>	Constituants non révélés en électrophorèse et en immunoelectrophorèse

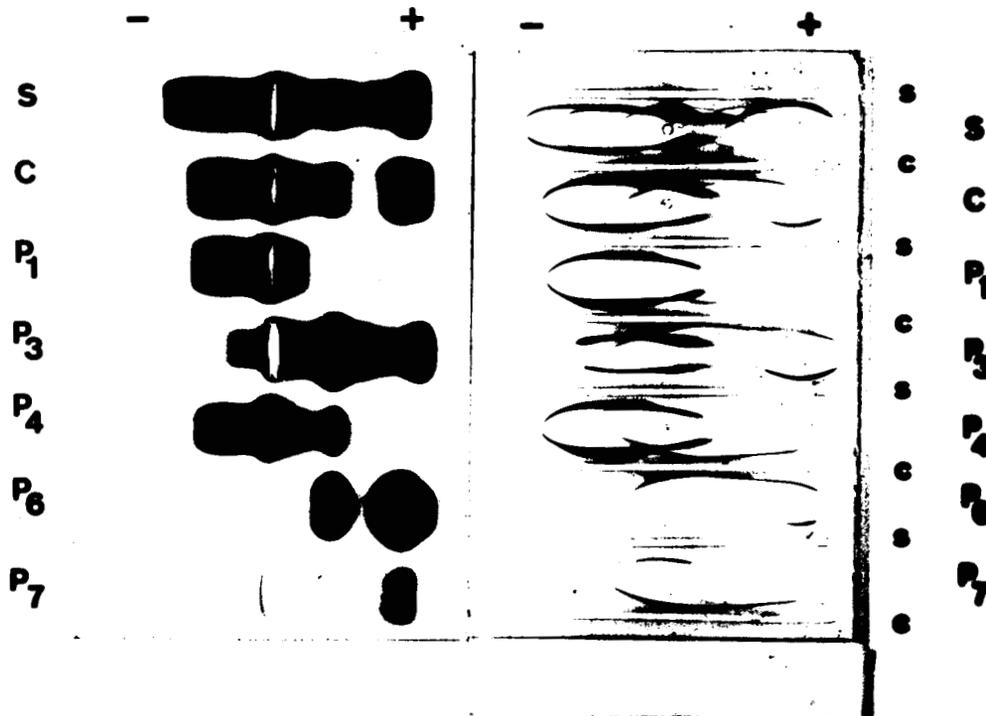


Figure 17

Figure 18

Electrophorégramme en gélose (Figure 17) et immuno-électrophorégramme (Figure 18) des différents précipités obtenus par le fractionnement au sulfate d'ammonium d'un lactosérum colostrale. S : sérum de Vache ; C : colostrum ; P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> : précipités P<sub>1</sub> à P<sub>7</sub> (voir fig. 16 ; p. 136). Les conditions d'électrophorèse et d'immuno-électrophorèse sont précisées, respectivement, à la page 91 et à la page 104.

s : immunsérum antiprotéides sériques ; c : immunsérum antiprotéides colostraux de la Vache.

s'expliquer par des différences dans la composition des laits colostraux en globulines immunes dont la nature et la quantité changent d'un animal à un autre. Toutefois, ce facteur n'est pas exclusif puisque 4 fractionnements effectués, selon un protocole expérimental rigoureusement défini, sur un même colostrum (colostrum n° 2 des tableaux XXIII et XXIV) conduisent à des résultats différents pour un précipité déterminé: les tableaux XXIII (p. 145 ) et XXIV (p. 147 ) montrent, en effet, que 4 précipités  $P_1$  préparés à partir du même colostrum ne possèdent pas la même composition en protéides et en glucides conjugués. On ne peut donc, en aucun cas, prévoir le résultat d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium et les colostrums traités, ainsi que tous les précipités obtenus, doivent faire systématiquement l'objet d'une étude chimique, électrophorétique et immunoélectrophorétique complète.

## 2° - RESULTATS PARTICULIERS A CHACUN DES PRECIPITES.

### 1 - Précipité $P_1$ (1/3 saturation ; pH 7)

Le précipité  $P_1$  est, de loin , le plus abondant puisqu'il représente, à lui seul, 60 à 75 p.100 des protéides totaux isolés du lactosérum colostrale et 75 à 85 p.100 des précipités renfermant des globulines immunes ( $P_1 + P_3 + P_4$ ).

L'application de l'électrophorèse, de l'immunoélectrophorèse et de l'ultracentrifugation aux précipités  $P_1$  permet d'en distinguer 3 catégories (Fig. 19, 20 et 21 ; tableau XXIII).

a - Les uns sont uniquement constitués de globulines  $\gamma G$  (Fig. 21 a ; p. 144 ).

b - D'autres renferment deux composants différents par leurs constantes de sédimentation :  $6,8 \pm 0,3$  pour l'un,  $10 \pm 0,3$  pour l'autre (Fig. 21 b ; p. 144 ). Il s'agit donc d'un mélange de globulines  $\gamma_{7S}$  et de globulines "atypiques" (voir p. 195 ). Dans tous les cas, les globulines  $\gamma G$  de  $S_{20w} 6,8$  représentent de 90 à 95 p.100 des

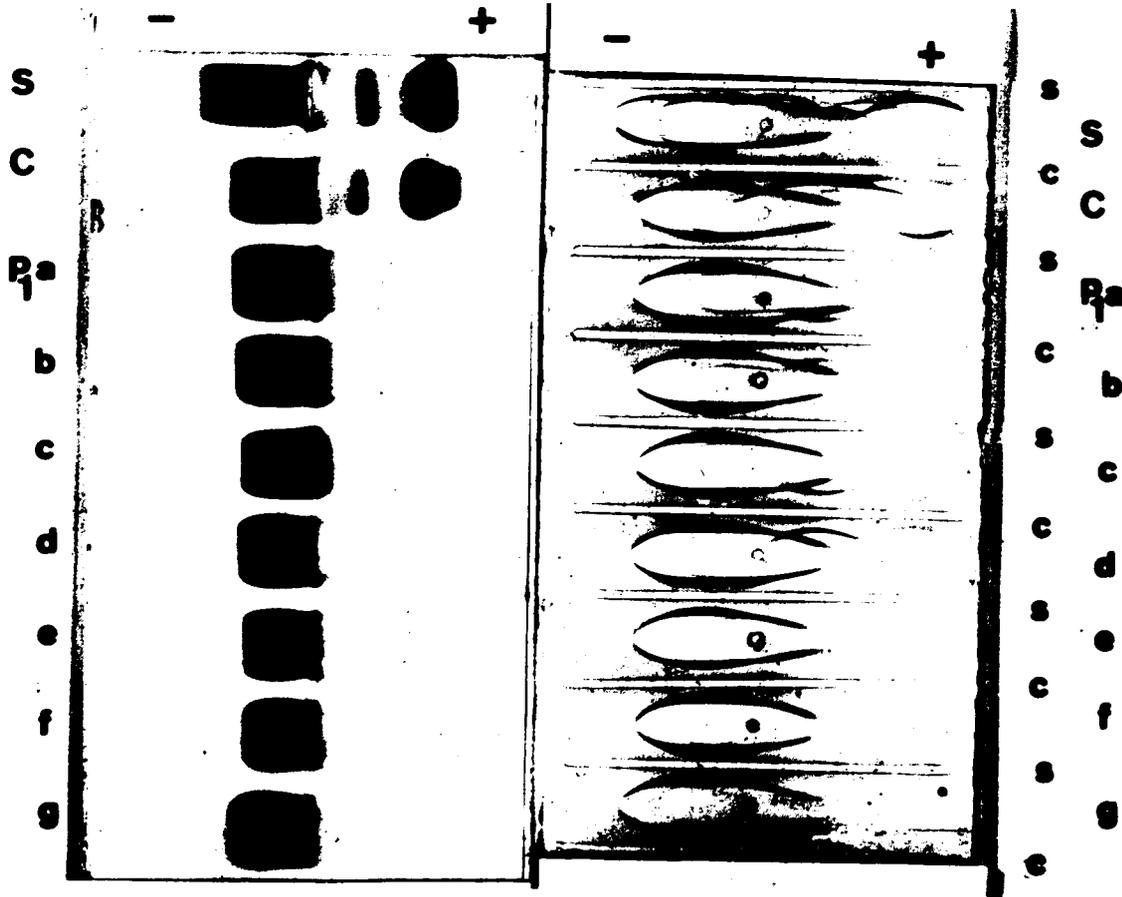


Figure 19

Figure 20

Diagrammes d'électrophorèse en gélose (Figure 19) et d'immuno-électrophorèse (Figure 20) de divers précipités  $P_1$ . Pour les conditions expérimentales voir p. 91 et p. 104. s : immunsérum antiprotéides sériques de la Vache ; c : immunsérum antiprotéides colostraux de la Vache.

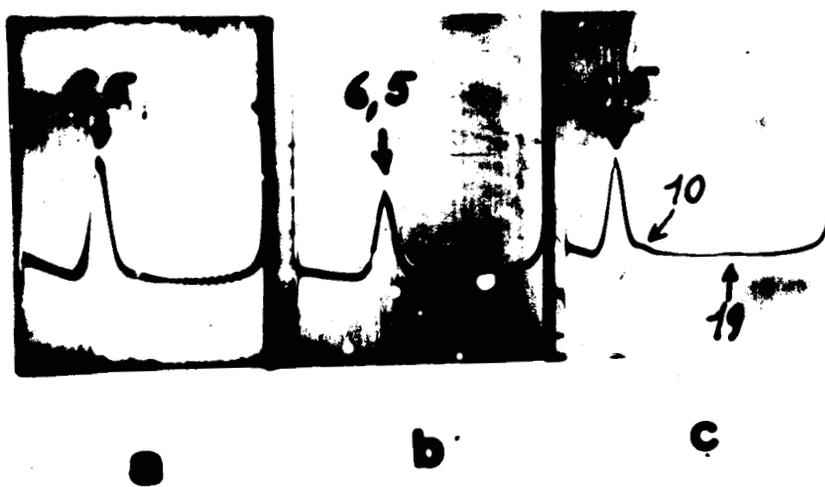


Figure 21

Diagrammes d'ultracentrifugation de différents précipités  $P_1$  provenant du fractionnement de lactosérums colostraux par le sulfate d'ammonium. Tampon phosphate de pH 7. Température : 20°C. Temps de centrifugation : 41 mn (a) , 44 mn (b) et 24 mn (c).

Tableau XXIII

Composition en globulines immunes déterminée par électrophorèse, par immuno-électrophorèse et par ultracentrifugation de différents précipités P<sub>1</sub> obtenus par fractionnement au sulfate d'ammonium de différents colostrums (1/3 de saturation ; pH 7).

Désignation des colostrums	Désignations des fractionnements	Nature des protéides identifiés
1	-	Globulines $\gamma$ G
2	1	Globulines $\gamma$ G + globulines $\gamma$ M
	2	Globulines $\gamma$ G + globulines "atypiques" $\gamma$ <sub>10S</sub> + globulines $\gamma$ M
	3	Globulines $\gamma$ G
	4	Globulines $\gamma$ G
3	-	Globulines $\gamma$ G + globulines "atypiques" $\gamma$ <sub>10S</sub>

protéides totaux.

c- Le troisième groupe des précipités  $P_1$  est représenté par des préparations renfermant 3 types de globulines immunes de constantes de sédimentation 6,8 - 9,9 et 21,1 (Fig. 21 c ; p. 144 ). Il s'agit donc de mélanges de globulines  $\gamma G$ , de globulines "atypiques" et de globulines  $\gamma M$ , dans les proportions approximatives suivantes : 90 p.100, 5 p.100 et 5 p.100. Nous avons rassemblé dans le tableau XXIV les résultats concernant la détermination de la composition centésimale de différentes préparations de précipité  $P_1$ . On voit qu'il existe une certaine dispersion des résultats que nous avons discutée plus haut (voir p. 138 ).

CONCLUSIONS. La précipitation par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et à pH 7 fournit la majeure partie des globulines immunes  $\gamma G$  des lactosérums colostraux. Dans des conditions qu'il est impossible de définir, on obtient parfois des précipités constitués uniquement de globulines  $\gamma G$ , sur lesquelles peuvent être entreprises des études physico-chimiques (voir le chapitre suivant ; p. 191 ). Plus généralement, les globulines  $\gamma G$  sont souillées d'une faible proportion (5 à 10 p.100) de globulines "atypiques" de  $S_{20w}$  10 et de globulines  $\gamma M$  de  $S_{20w}$  20. Dans ce cas, les préparations sont soumises à la chromatographie sur celluloses modifiées (voir plus loin ; p. 153) ou sur Sephadex G 200.

## 2 - Précipité $P_3$ (1/3 saturation ; pH 3,8)

Le précipité  $P_3$  représente, généralement, de 4 à 6 p.100 des protéides totaux des laits colostraux et environ 6 p.100 des 3 précipités riches en globulines immunes ( $P_1 + P_3 + P_4$ ). L'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse montrent que sa composition varie suivant l'origine du colostrum et que, dans tous les cas, elle est très complexe. On y trouve, généralement, une proportion importante de lactalbumine et de séralbumine et une quantité très faible de lactoglobulines

Tableau XXIV

Composition centésimale en glucides de précipités P<sub>1</sub> provenant de différents fractionnement de colostrums de Vache par le sulfate d'ammonium.

Désignation des colostrums	Désignation des fractionnements par le sulfate d'ammonium	Osés "neutres" p.100 (*)	Osamines p.100 (**)	Acides sialiques p.100 (***)	Osés "neutres"	
					Osamines	Acides sialiques
1	-	1,17	-	0,40	-	2,92
2	1	2,40	1,13	1,03	2,12	2,33
	2	1,92	1,19	0,95	1,61	2,04
	3	1,60	0,50	0,65	1,78	2,46
	4	1,94	0,55	0,88	1,96	2,19
3	-	1,27	-	0,73	-	1,75

( \* ) En galactose + mannose ( 1 : 1 )

( \* \* ) En glucosamine

( \* \* \* ) En acide N-acétylneuraminique.

et d'un composé inconnu. Ces protéides sont accompagnés de globulines du système gamma (  $\gamma$  G et YM), en proportions très variables : dans la plupart des préparations, la quantité de globulines immunes est négligeable (Fig. 17) ; dans d'autres, au contraire, elle est suffisamment importante (Fig. 29 ; p. 173 ) pour que leur isolement par chromatographie sur colonne puisse être envisagé. Toutefois, cette proportion n'excède jamais 15 à 20 p.100 des protéides totaux du précipité  $P_3$ . L'ultracentrifugation (Fig. 22) confirme ces résultats. Six constituants peuvent, en effet, être décelés dont les constantes de sédimentation (une seule détermination) sont les suivantes : 1,37 (lactalbumine : 1,75 S) ; 3,75 (sérumalbumine : 4,2 S) ; 5,9 (globulines  $\gamma$ G : 6,5) ; 9,3 (dimère des globulines  $\gamma$ G : 10 S) ; 15,6 (globulines YM : 19 S) ; 22 (globulines "lourdes" non déterminées) ( \* ) .

On voit donc qu'il est impossible, dans le cas du précipité  $P_3$ , comme dans celui des précipités  $P_1$ , de prévoir le résultat d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium et, seule, l'application des différents critères que nous avons décrits permet de définir la composition de la préparation et de décider de son fractionnement ultérieur.

### 3 - Précipité $P_4$ (1/2 saturation ; pH 7)

Le précipité  $P_4$  représente de 7 à 13 p.100 des protéides totaux du colostrum et de 8 à 20 p.100 du poids des précipités riches en globulines immunes ( $P_1 + P_3 + P_4$ ). Comme dans les deux cas précédents, la composition des précipités  $P_4$  varie d'une préparation à une autre. Toutefois, ils sont toujours très riches en globulines immunes qui représentent de 50 à 90 p.100 des protéides totaux. Elles sont accompagnées de trace de lactoglobulines et d'un peu de lactalbumine (Fig. 17 ; p. 141 et 18 ; p. 141 ).

---

( \* ) Les valeurs de S sont inférieures aux valeurs calculées par extrapolation à une dilution infinie car les solutions de protéines sont très concentrées (20 mg/ml). A titre indicatif, les globulines  $\gamma$ G pures possèdent, à la même concentration une constante de 5,75 S.

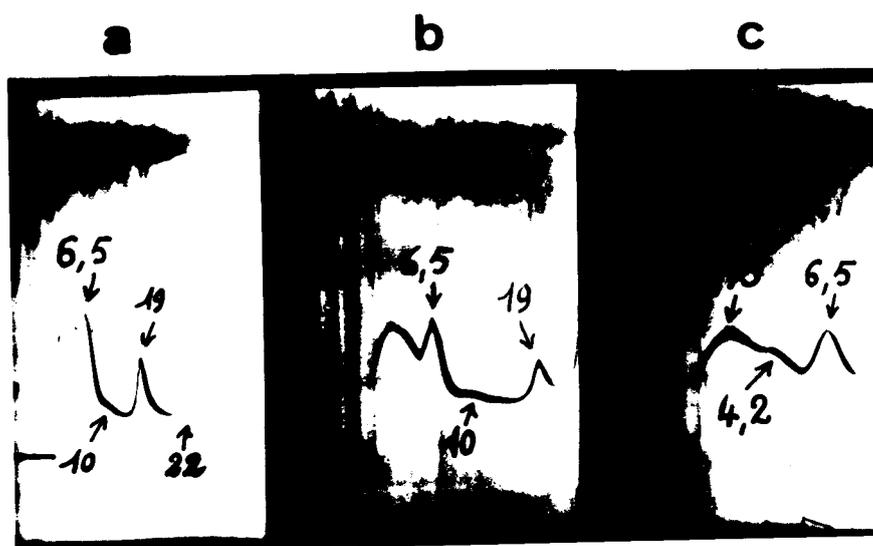


Figure 22

Diagramme d'ultracentrifugation d'un précipité  $P_3$ . Concentration : 20 mg/ml de tampon phosphate de pH 6,9 et de force ionique 0,2. Vitesse de régime : 59 780 t/mn. Durée du démarrage : 9 mn. Diagrammes obtenus à des temps de centrifugation différents : + 15mn (a), + 31 mn (b) et + 71 mn (c). Constituants 1 : 1,37 S ; 2 : 3,75 S ; 3 : 5,9 S ; 4 : 9,3 S ; 5 : 15,6 S ; 6 : de l'ordre de 22 S.

L'immuno-électrophorèse montre l'existence de globulines  $\gamma G$  et, dans certains laits, de globulines  $\gamma A$  (Fig. 18 ). Nous n'avons pas décelé de globulines  $\gamma M$ .

L'ultracentrifugation (Fig. 23) révèle la présence de 3 constituants de constantes de sédimentation :

6,5 S, 10 S, 13 S

Le pic de la lactalbumine n'apparaît pas sur les diagrammes. Ce composé se trouve donc en très faible proportion dans les préparations.

La détermination des rapports molaires des oses neutres a donné les résultats suivants : galactose, mannose, fucose : 6 : 6 : 3. En outre, la glucosamine est la seule osamine présente dans le glycanne.

#### 4 - Précipité $P_6$ (1/2 saturation ; pH 3,8)

Le précipité  $P_6$  (12 à 14 p.100 des protéides totaux) renferme une proportion importante de lactoglobulines et une faible quantité de lactalbumine dont la présence dans cette fraction "tardive" est inexplicable : en effet, on sait que la lactalbumine précipite pour une concentration en sulfate d'ammonium correspondant au tiers de la saturation et à pH 3,5 - 4. La totalité de la lactalbumine devrait donc se trouver dans le précipité  $P_3$ .

Une particularité importante des précipités  $P_6$  est leur teneur élevée en acides sialiques, puisque le rapport oses neutres/ acides sialiques est voisin de 1 (Tableau XXI ; p. 139). Elle pourrait s'expliquer par la présence de l'inhibiteur trypsique qui est un glycoprotéide riche en acide sialique et qui précipite à demi-saturation en sulfate d'ammonium et à pH 4-5.

#### 5 - Précipité $P_7$ (Saturation ; pH 7)

On recueille de très faibles quantités de précipités  $P_7$  qui ne représentent pas plus de 1,5 p.100 des protéides totaux. La composition de ces préparations est complexe, comme le montre le diagramme électrophorétique de la Fig. 17 ; p. 141 ).

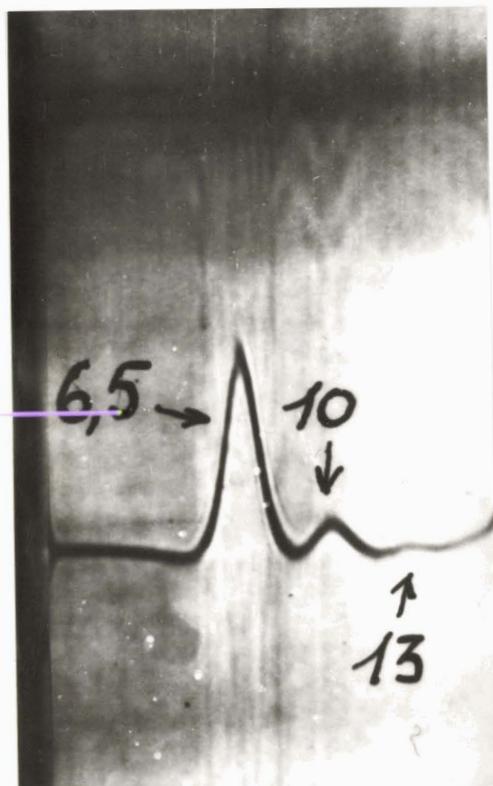


Figure 23

Diagramme d'ultracentrifugation d'un précipité  $P_4$ .

Concentration : 20 mg/ml de tampon phosphate de pH 6,9 et de force ionique 0,2 . Vitesse de régime : 59.780 t/mn. Durée du démarrage : 8 mn. Temps de centrifugation : 57 mn. Constituants 1 : 6,5 S ; 2 : 10 S ; 3 : 13 S .

Elle présente les particularités suivantes :

a - Comme les précipités  $P_6$ , les précipités  $P_7$  possèdent une teneur élevée en glucides et, principalement, en acides sialiques.

b - Dans certains précipités, nous avons identifié outre les lactoglobulines :

$\alpha$  - la lactotransferrine de GROVES

$\beta$  - la transferrine sérique

$\gamma$  - un composé à vitesse de migration cathodique élevée (Fig. 17 ; p. 141 ) qui est peut être la lactolline de GROVES (voir p. 16 ) dont le caractère très basique est bien connu.

6 - Précipité  $P_9$  (Saturation : pH 3,6)

Le précipité  $P_9$  est nul ou très faible (0,5 p.100 des protéides totaux). Aucun de ses constituants n'a pu être révélé par électrophorèse ou par immuno-électrophorèse.

#### CONCLUSIONS GENERALES

1 - L'application du procédé de relargage du colostrum de Vache, avec un gradient de concentration en sulfate d'ammonium associé à un gradient de pH, conduit à un excellent fractionnement de base des protéides colostrales. On obtient, en particulier, 2 fractions enrichies en globulines immunes : l'une majeure, précipite au 1/3 de la saturation en sulfate d'ammonium et à pH 7, l'autre, moins importante, précipite à 1/2 saturation et à pH 7.

2 - Le précipité  $P_1$ , obtenu au 1/3 de la saturation en sulfate d'ammonium et à pH 7, représente 80 à 90 p.100 des globulines immunes totales du colostrum. Parfois, il est souillé d'une faible quantité de globulines  $\gamma$  M décelables par l'immuno-électrophorèse. Plus généralement, il est constitué de globulines  $\gamma$  G pures dont les propriétés physico-chimiques peuvent être déterminées (voir chapitre V ; p. 191 ).

Enfin, dans certains cas, un pic discret (5 p.100) de constituants  $S_{20w}$  10 accompagne les globulines  $\gamma G$ . Il s'agit des globulines "atypiques" qui proviennent en réalité de la di- ou trimérisation de globulines  $\gamma G$  (voir p. 195 ). Ces préparations ne peuvent donc être utilisées pour l'étude des propriétés physiques des globulines  $\gamma G$ , mais conviennent parfaitement pour l'étude de leurs propriétés chimiques.

3 - Les précipités  $P_3$  et  $P_4$  renferment des globulines immunes de comportement anodique dont nous avons entrepris l'isolement et la purification par chromatographie sur DEAE-cellulose.

4 - Malgré la présence soupçonnée de glycoprotéides, intéressants par leur richesse en acides sialiques, dans les précipités  $P_6$  et  $P_7$ , nous nous sommes attachée uniquement à l'étude des précipités  $P_1$ ,  $P_3$  et  $P_4$  qui contiennent la totalité des globulines immunes du colostrum et nous avons entrepris l'isolement et la purification de ces dernières par chromatographie sur DEAE-cellulose.

### III - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE.

La chromatographie sur des colonnes de celluloses modifiées est couramment employée pour préparer et pour purifier des protéides. Nous avons utilisé la DEAE-cellulose en appliquant le mode opératoire de PETERSON et SOBER (263), modifié par BISERTE et coll.(264) dans lequel le déplacement des protéides est effectué à l'aide de solutions tamponnées de phosphates de pH constant et de concentration croissant de manière discontinue. Nos recherches ont porté uniquement sur les précipités  $P_1$ ,  $P_3$  et  $P_4$  obtenus par la méthode du relargage par le sulfate d'ammonium (voir p. 134 ).

## A - MODE OPERATOIRE.

### 1° - CHOIX DU PROCEDE CHROMATOGRAPHIQUE.

Dans une première série de recherches, nous avons appliqué le mode opératoire décrit par MONTREUIL, CHOSSON, HAVEZ et MULLET (264bis) pour séparer les globulines- $\gamma$ A du lait de Femme. Ce mode opératoire était lui-même une adaptation du procédé préconisé par SCHMID et coll. (265) pour isoler l'orosomucoïde : chromatographie sur une résine carboxylique échangeuse de cations (Amberlite XE - 64) à l'aide de solutions de citrate de sodium de concentration et de pH croissant de manière discontinue.

La chromatographie de 500 mg de chacun des précipités  $P_1$ ,  $P_3$  et  $P_4$ , dissous dans 6 ml du tampon de départ, a été effectuée dans des colonnes refroidies à + 4°C, par le passage successif des solutions de citrate de sodium aux concentrations et aux pH suivants : 0,01 M, pH 3,5 - 0,025 M, pH 4,5 - 0,05 M, pH 5,2 - 0,1 M, pH 5,72 - 0,25 M, pH 5,96 - 0,5 M, pH 6,1 et 1 M, pH 6,5. Cet essai s'est soldé par un échec puisque tous les protéides ont été déplacés ensemble par le tampon 0,25 M, de pH 5,96.

Au contraire, la chromatographie sur une cellulose modifiée échangeuse d'anions : la DEAE-cellulose (diéthyl-aminoéthyl-cellulose) nous a fourni d'excellents fractionnements de précipités complexes, selon le protocole expérimental suivant.

### 2° - PREPARATION DES COLONNES DE DEAE-CELLULOSE.

#### a - Activation de la DEAE-cellulose.

La DEAE-cellulose (\*) est d'abord activée par une agitation d'une heure dans de la soude 1 N, en dégazant de temps en

---

( \* ) DEAE-cellulose SERVA.

temps la suspension sous vide pour obtenir une meilleure activation. La DEAE-cellulose est ensuite lavée plusieurs fois, par décantation, avec de l'eau distillée, puis sur un filtre de Büchner jusqu'à neutralité des eaux de lavage. Elle est alors remise en suspension dans de l'eau distillée et amenée au pH de la première solution tampon de chromatographie par addition d'une solution aqueuse d'acide phosphorique à 1 p.100 (v : v). La DEAE-cellulose est enfin traitée par agitation pendant 24 h avec le premier tampon d'élution (solution de phosphate 0,005 M, de pH 8) et lavée plusieurs fois par décantation avec 1 à 2 volumes du même tampon pour éliminer les fines particules qui nuiraient à la qualité de la chromatographie.

b - Montage des colonnes de chromatographie.

Les colonnes de verre utilisées sont entourées d'un manchon dans lequel circule de l'eau à + 4°C. Elles sont préalablement enduites d'une couche de méthylcellulose destinée à éliminer les effets de "traînées" des protéides. Le dépôt de cette couche est réalisé de la manière suivante : une solution de méthylcellulose dans le formol ( \* ) est introduite dans la colonne ; au bout de 5 minutes, la colonne est vidée et maintenue pendant 40 minutes à l'étuve à 120°C. L'opération est répétée 3 à 5 fois. Elle est renouvelée après 2 fractionnements chromatographiques.

La colonne est ensuite munie d'un entonnoir dans lequel on introduit la DEAE-cellulose que l'on maintient en suspension dans le premier tampon de chromatographie à l'aide d'un système d'agitation continue. La quantité de DEAE-cellulose introduite dans les colonnes varie avec le poids de protéides soumis à la chromatographie. Lorsque la préparation de la colonne est terminée, on la "stabilise" à 4°C par

---

( \* ) Obtenue en mélangeant 140 ml d'une solution aqueuse de méthylcellulose à 0,4 p.100 (p : v), 50 ml de solution commerciale de formol et 10 ml d'acide formique concentré. Le mélange peut être conservé à basse température pendant plusieurs mois.

le passage de la première solution tampon que l'on prolonge de 24 à 48 h.

c - Développement des chromatogrammes.

2 à 3 g de protéides sont dissous dans la quantité minimale du premier tampon de chromatographie (solution de phosphate 0,005 M, de pH 8). La solution obtenue est éventuellement centrifugée et ajustée à pH 8. On la dépose avec précaution à la surface de la colonne réfrigérée à + 4°C de DEAE-cellulose (2 x 45 cm). Après le passage, dans cette dernière, de la solution initiale, on "lave" 2 fois successivement avec 2 à 5 ml de la solution tampon pour éliminer toute trace de la solution de protéides, avant de procéder enfin à la chromatographie.

Le déplacement des protéides est réalisé à pH constant (pH 8) par le passage successif de solutions tamponnées de phosphates de sodium 0,005 - 0,01 - 0,02 - 0,035 et 0,05 M.

Des fractions de 5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur Radirac LKB et la densité optique des solutions effluents est enregistrée automatiquement à 253 m $\mu$  avec un appareil Uvicord LKB. Les fractions correspondant à chacun des pics sont réunies, dialysées pendant 3 jours contre de l'eau distillée dans des tubes de cellophane NOJAX préalablement lavés pendant 48 h à l'eau courante.

3° - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES FRACTIONS

CHROMATOGRAPHIQUES.

Chacune des fractions chromatographiques, dans la mesure où les quantités obtenues étaient suffisantes, a été soumise aux analyses suivantes que nous avons décrites dans un chapitre antérieur: détermination de la composition centésimale en glucides (voir p. 72 ), ultracentrifugation (voir p. 97 ), électrophorèse et immuno-électrophorèse (voir p. 91 et 104 ).

## B - FRACTIONNEMENT DES PRECIPITE P<sub>1</sub>

### 1° - RESULTATS

#### 1 - Chromatographie des précipités P<sub>1</sub>

La figure 24 (p. 158) illustre les résultats d'une chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>1</sub>. On voit que le passage de 7 solutions tamponnées différentes fournit 7 fractions d'inégale importance. Chacune d'elle est obtenue en rassemblant les solutions d'éluion correspondant aux pics eux-mêmes, en éliminant les fractions correspondant à la "traînée" des pics d'éluion. L'examen du tableau XXV (p. 159) montre que la quantité totale de protéides récupérés au cours d'un fractionnement n'est que de 50 p.100 environ. Pour d'autres fractionnements, elle atteint 70 p.100. Ce rendement relativement faible s'explique par l'élimination délibérée des éluats correspondant aux "traînées" des pics et par les pertes qui surviennent au cours des dialyses et de la lyophilisation. Il ne semble pas que des protéides restent fixés sur la DEAE-cellulose, puisque le passage sur cette dernière de solutions de carbonate de sodium 0,05 M et 0,50 M ne fournit qu'une quantité négligeable de protéides.

#### 2 - Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique.

La figure 25 (p. 160) montre les résultats de l'électrophorèse en gélose et de l'immuno-électrophorèse des pics obtenus par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>1</sub>. On voit que

a - Les différentes fractions possèdent des vitesses de migrations électrophorétiques différentes et que le déplacement vers l'anode est d'autant plus important que la fraction est éluee plus tardivement de la DEAE-cellulose.

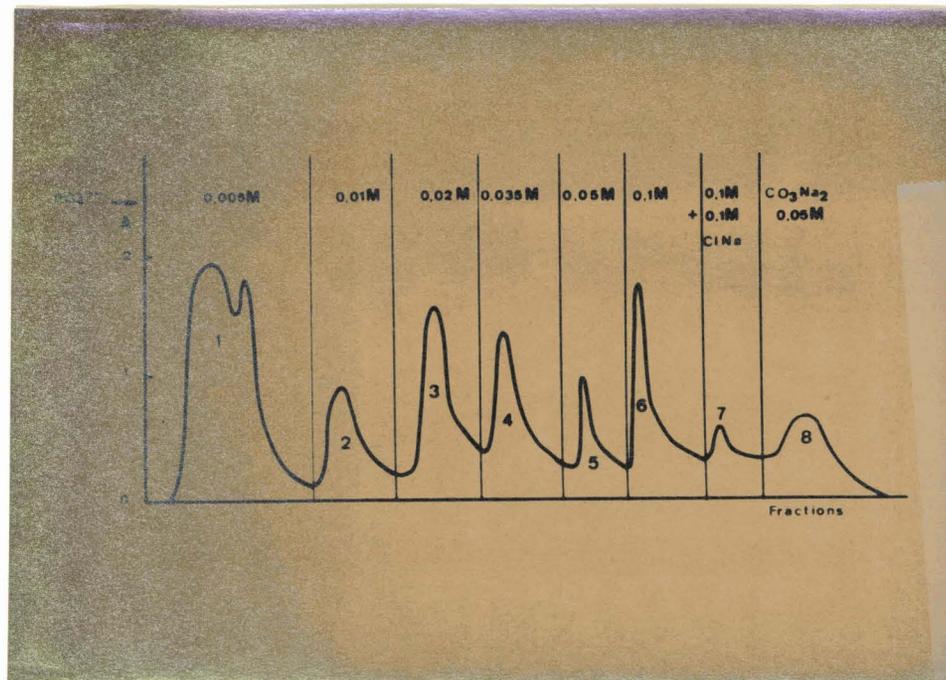


Figure 24

Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (2 x 45 cm) d'un précipité P<sub>1</sub> (2,5 g) obtenu par fractionnement du colostrum de Vache par le sulfate d'ammonium. En ordonnées : densités optiques des solutions d'éluion ; en abscisses : nombre de fractions de 5 ml recueillies.

Tableau XXV

Rendement d'une chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>1</sub>  
et composition des fractions obtenues.

Désignation des fractions	Concentration des tampons phosphate pH 8	Poids obtenus (en g)	Nature des constituants
Précipité P <sub>1</sub>			γG ; γM ; traces de lactalbumine et de lactoglobulines
Pics N° 1	0,005 M	0,33	γG
2	0,01 M	0,16	γG
3	0,02 M	0,21	γG dénaturées
4	0,035 M	0,18	γG
5	0,05 M	0,05	γG ; traces de lactalbumine
6	0,1 M	0,22	γG ; γM ; traces de lactalbumine
7	0,1M + 0,1M NaCl	0,05	γG ; γM
8	CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 0,05M	0,01	γG dénaturées
Poids total .....		1,21	
Poids de précipité P <sub>1</sub> soumis à la chromatographie .....		2,5	
Rendement .....		50 p.100	

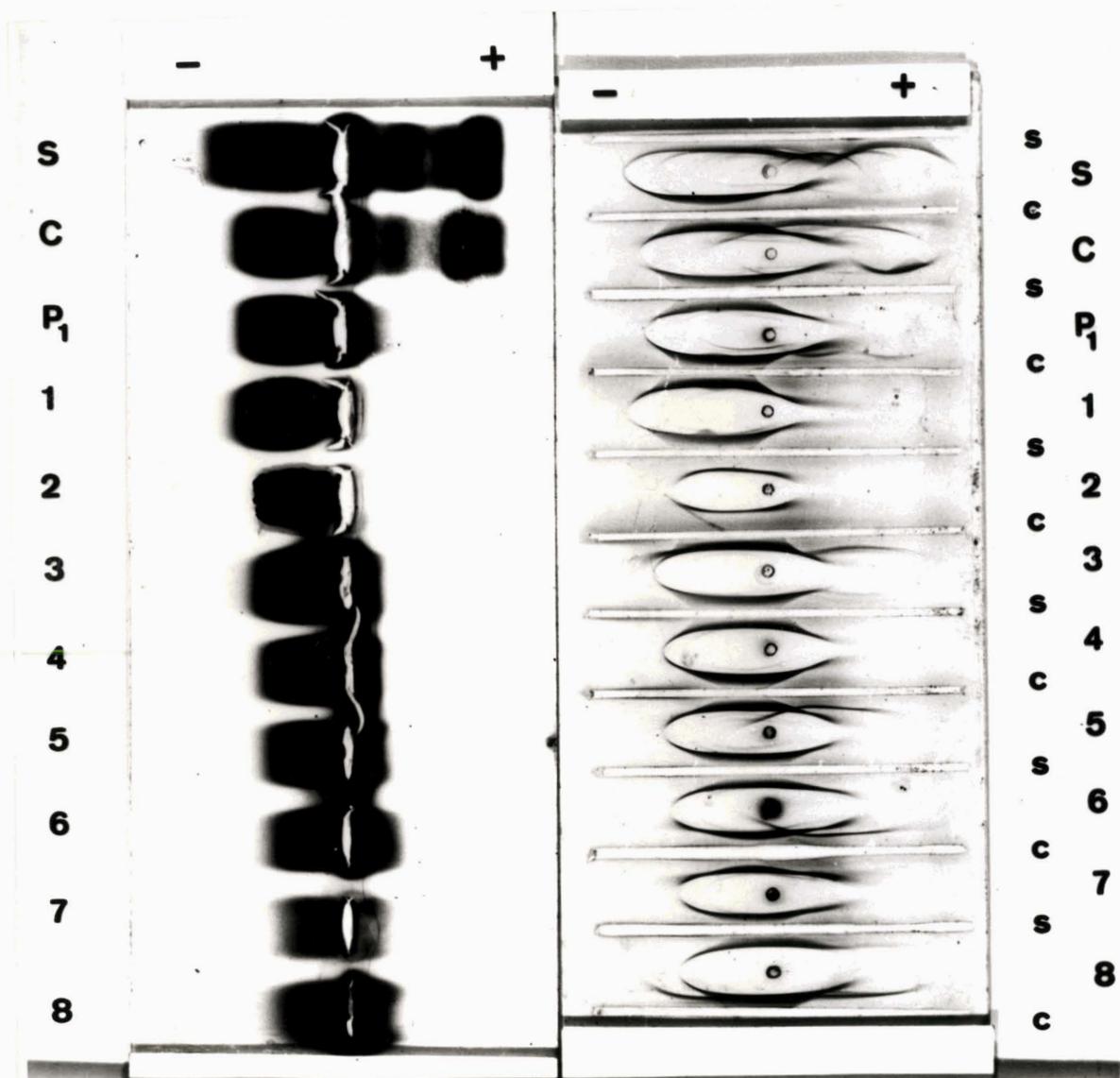


Figure 25

Diagrammes d'électrophorèse en gélose (voir p. 91 ) et d'immuno-  
 électrophorèse (voir p. 104 ) des différents pics obtenus par  
 chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 153 ) d'un précipité P<sub>1</sub>. s:  
 immunsérum antiprotéides sériques de la Vache. c : immunsérum anti-  
 protéides colostraux de la Vache. S : sérum de Vache. C : colostrum  
 décaséiné de Vache. P: précipité P<sub>1</sub> (voir p. 135 ). 1 à 8 d'élution  
 de la DEAE-cellulose.

b - L'immuno-électrophorèse semble démontrer que, seul, le pic 2 soit constitué de globulines  $\gamma G$  pures. En effet, il donne un arc unique de précipitation, tandis que toutes les autres préparations fournissent au moins 2 arcs de précipitation. Cependant, une étude plus poussée des diagrammes conduit à d'autres interprétations :

$\alpha$  - Les pics 1 et 4 présentent un dédoublement d'arc qui est dû, soit à un excès d'anticorps qui entraîne une division secondaire de l'arc des globulines  $\gamma G$ , soit à une hétérogénéité antigénique des globulines  $\gamma G$ . En effet, l'épuisement des antisérums par les globulines  $\gamma G$  du pic 2 fait disparaître les 2 arcs.

$\beta$  - Les immunophorégrammes des pics 3 et 8 sont les témoins de dénaturations profondes des globulines  $\gamma G$  et les nombreux arcs qu'ils présentent ne correspondent pas à autant d'entités différentes, mais à des globulines  $\gamma G$  dénaturées. En effet, tous les arcs supplémentaires se raccordent parfaitement avec l'arc principal des globulines  $\gamma G$  et disparaissent lorsque les immunodiffusions sont effectuées avec un anti-sérum épuisé par les globulines  $\gamma G$  du pic 2.

$\gamma$  - Une étude immunophorétique plus poussée montre la présence, dans les pics 6 et 7 de globulines  $\gamma M$ . La figure 26 est, à cet égard, démonstrative. On voit, en effet, très nettement que l'arc des globulines  $\gamma M$  est présent sur les immunophorégrammes et qu'il subsiste après l'épuisement de l'antisérum par les globulines  $\gamma G$  du pic 2 (Fig. 26 A). En outre, l'application du procédé de HANSON (voir p. 108 ) montre que le raccordement de la ligne de précipitation des globulines  $\gamma G$  du pic 2 s'effectue seulement avec l'arc des globulines  $\gamma G$  et non avec celui des globulines  $\gamma M$  (Fig. 26 B).

$\delta$  - Les pics 5 et 6 contiennent, en outre, une faible quantité de lactalbumine qui n'apparaît pas sur les diagrammes d'électrophorèse en gélose, mais dont l'arc est nettement visible sur les immunophorégrammes.

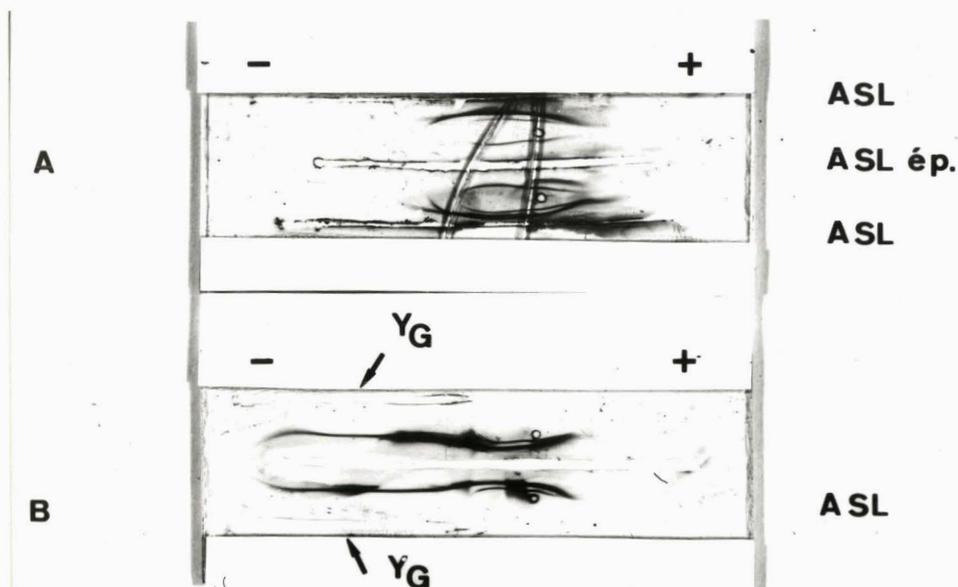


Figure 26

- A - Immunoélectrophorèse des pics 6 et 7 (voir p. 157 ).  
 ASL : immunsérum antiprotéides colostraux totaux.  
 ASL ép. : le même épuisé avec les globulines  $\gamma$ G pures du pic 2. Seul, l'arc correspondant aux globulines  $\gamma$ G a disparu. Au contraire, l'arc des globulines  $\gamma$ M subsiste.
- B - Immunoélectrophorèse selon HANSON (voir p. 108 ) des pics 6 et 7. Les globulines  $\gamma$ G du pic 2 déposées dans la fente courte, donnent un trait de précipitation continu avec l'arc des globulines  $\gamma$ G. L'arc des globulines  $\gamma$ M ne se raccorde pas.

### 3 - Ultracentrifugation.

Les résultats fournis par l'électrophorèse et par l'immuno-électrophorèse ont été confirmés par l'ultracentrifugation. La figure 27 et le tableau XXVI montrent, en effet, que :

a - les globulines  $\gamma G$  de  $S_{20w} 6,5 \pm 0,2$  sont les constituants majeurs de toutes les fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose;

b - toutes les préparations renferment, en faibles proportions, un constituant de  $S_{20w} 10 \pm 1$  qui correspond aux "globulines atypiques" décrites par de nombreux auteurs et qui résultent, en réalité, de la dimérisation spontanée des globulines  $\gamma G 6,5 S$  (voir p. 195 ) ;

c - le pic 6 ( \* ) renferme des globulines  $\gamma M$  de  $S_{20w} 19$  ;

d - la souillure de lactalbumine, présente dans ce dernier, est négligeable puisque le pic d'ultracentrifugation correspondant à cette protéine de  $S_{20w} 1,75$  n'est pas visible sur les diagrammes. Sa caractérisation par l'immunophorèse souligne donc la sensibilité de cette méthode.

### 4 - Etude chimique.

A cause de la grande hétérogénéité des préparations de globulines immunes du colostrum obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose, nous nous sommes limitée à la seule étude de la composition de la fraction glycanique qui était plus aisément réalisable que celle de la fraction protéique. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXVII. Ils nous permettent de faire les observations suivantes.

---

( \* ) Nous ne disposons pas d'une quantité suffisante de globulines du pic 7 pour en effectuer une étude par ultracentrifugation.

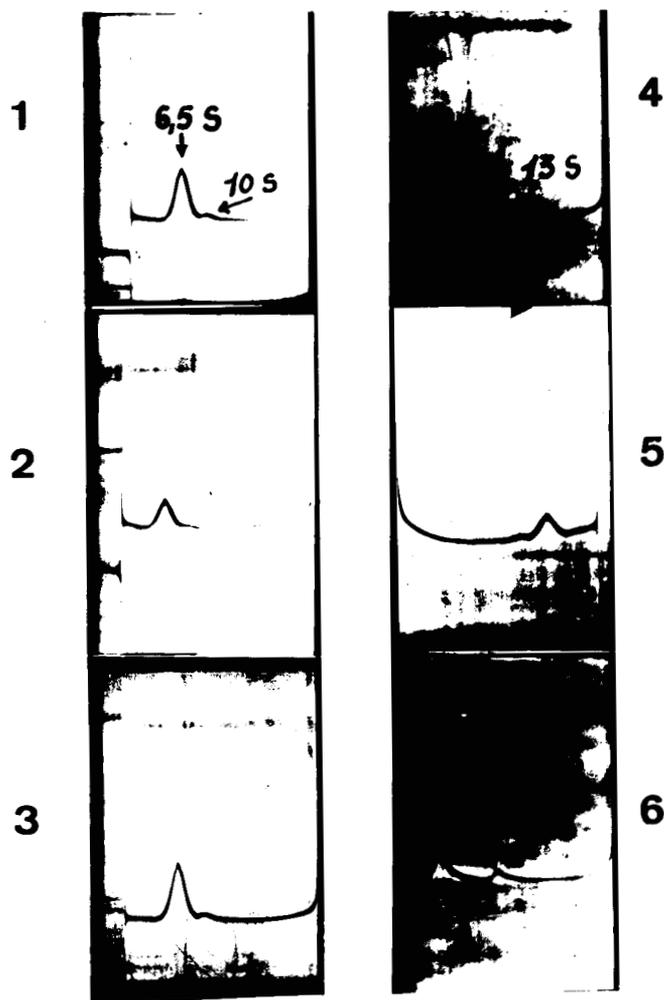


Figure 27

Diagrammes d'ultracentrifugation des diverses fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_1$  (voir p. 157 ). Concentration : 6 mg/ml de tampon phosphate pH 6,9. Temps de centrifugation : 30 mn. De 1 à 6 : n° des pics de chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 158 ).

Tableau XXVI

Répartition des constituants (en p.100) déterminée par ultracentrifugation dans un précipité  $P_1$  ( \* ) et dans diverses fractions de chromatographie sur DEAE-cellulose de ce même précipité.

Désignation des fractions	Concentration des tampon phosphate d'éluion	Constantes de sédimentation (**)			
		6,5 S	10 $\pm$ 1S	13S	19S
Précipité $P_1$ (***)		92	5		3
Pics n° 1	0,005 M	90	10	-	-
2	0,010 M	93	7	-	-
3	0,020 M	90	10	-	-
4	0,035 M	77	18	5	-
5	0,05 M	95	5	-	-
6	0,10 M	78	12	-	20

( \* ) Ce précipité  $P_1$  a fait l'objet de l'étude illustrée par la figure 25 (p.160).

( + \* ) Calculées par extrapolation pour une dilution infinie.

( \* \* \* ) Voir figure 21 c(p. 144).

Tableau XXVII

Composition centésimale en glucides des différentes fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>1</sub> ( \* ) du colostrum de Vache.

Désignation des fractions	Oses p.100	Acides sialiques p.100	Oses
			Acides sialiques
Précipité P <sub>1</sub>	1,96	0,87	2,25
Pics n° 1 ( ** )	1,66	0,48	3,66
2	2,66	0,63	4,22
3	2,33	0,77	3,02
4	1,62	0,70	2,31
5	2,63	0,72	3,65
6 (***)	2,41	1,58	1,52

( \* ) Voir p. 135.

( \*\* ) Voir p. 157.

( \*\*\* ) Nous ne disposions pas de quantités suffisantes des pics 7 et 8 pour en déterminer la composition en glucides.

a - La composition en glucides varie dans de larges proportions d'une fraction chromatographique à l'autre. En particulier, la fraction de "tête" contient moins d'oses neutres et d'acides sialiques que les fractions éluées plus tardivement. Il ne semble pas, toutefois, que le comportement chromatographique des composés soit lié seulement à la teneur en acides sialiques dont la proportion reste trop faible pour déterminer l'"acidité" des protéides. Il est plus vraisemblable que la composition en acides aminés intervient dans la chromatographie et il serait, à cet égard, très important de préciser cette dernière.

b - L'étude de la fraction glucidique confirme l'"hétérogénéité chromatographique" en démontrant qu'il existe des "populations" de globulines  $\gamma$ G différentes par leurs propriétés chimiques et dont la composition en glucides représente un premier caractère distinctif.

## 2° - DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

a - La chromatographie sur DEAE-cellulose des précipités  $P_1$ , obtenus par précipitation du colostrum de Vache par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et à pH 7, à l'aide d'un gradient discontinu de phosphate de sodium, démontre l'hétérogénéité des globulines  $\gamma$ G colostrales. En effet, les fractions obtenues sont différentes par leur composition chimique, - en particulier par leur teneur en glucides - , et par leur comportement électrophorétique. Ce dernier est en relation étroite avec le comportement chromatographique : les globulines  $\gamma$ G éluées le plus tardivement possèdent la migration anodique la plus élevée.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux qui ont été obtenus par différents auteurs à propos des globulines  $\gamma$ G sériques (BISERTE, HAVEZ, DAUTREVAUX, LEROY et VALDIGUIE (266) ; FAHEY et HORBETT (267) ; HAVEZ et al. (268) ; PETERSON et SOBER (269).

b - La chromatographie sur DEAE-cellulose des fractions obtenues par précipitation du colostrum par le sulfate d'ammonium représente un

excellent procédé de préparation de globulines  $\gamma$  G pures. Malheureusement, dans les conditions expérimentales que nous avons décrites, elle réalise un "découpage" des globulines  $\gamma$  G en familles distinctes dont elle permet l'étude ultérieure, mais en interdisant les recherches sur les globulines  $\gamma$  G "totales". Toutefois, à la suite de nos travaux, le procédé a été adapté à l'isolement de ces dernières que l'on obtient avec un rendement élevé par chromatographie "frontale" sur DEAE-cellulose. Un autre perfectionnement à notre méthode a, en outre, été apporté : il concerne l'isolement des globulines  $\gamma$  M des précipités  $P_6$  et  $P_7$  par chromatographie sur des colonnes de Sephadex G 75 ou G 100.

c - Enfin, il est important d'attirer l'attention sur l'action dénaturante qu'exercent sur les globulines  $\gamma$  G, la DEAE-cellulose, la dialyse et la lyophilisation. Elle se manifeste par l'apparition de pics d'ultracentrifugation "anormaux" 10 S et, parfois 13 S qui proviennent de la di- et de la trimérisation des globulines 7 S et, dans les cas graves, par la présence, sur les immunophorégrammes, de plusieurs arcs supplémentaires. Ces dénaturations interdisent toute étude physique ou structurale des globulines  $\gamma$  G. On les élimine en effectuant la chromatographie sur DEAE-cellulose par "analyse frontale" et en évitant de conserver trop longtemps en solution les globulines  $\gamma$  G et de soumettre leurs solutions à des congélations et décongélations répétées.

## C - FRACTIONNEMENT DES PRECIPITES $P_3$

### 1° - RESULTATS

#### 1 - Chromatographie des précipités $P_3$

La figure 28 (p. 169) illustre les résultats d'une chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose d'un précipité  $P_3$ . On voit que le passage des 7 solutions tampons qui ont été utilisées pour

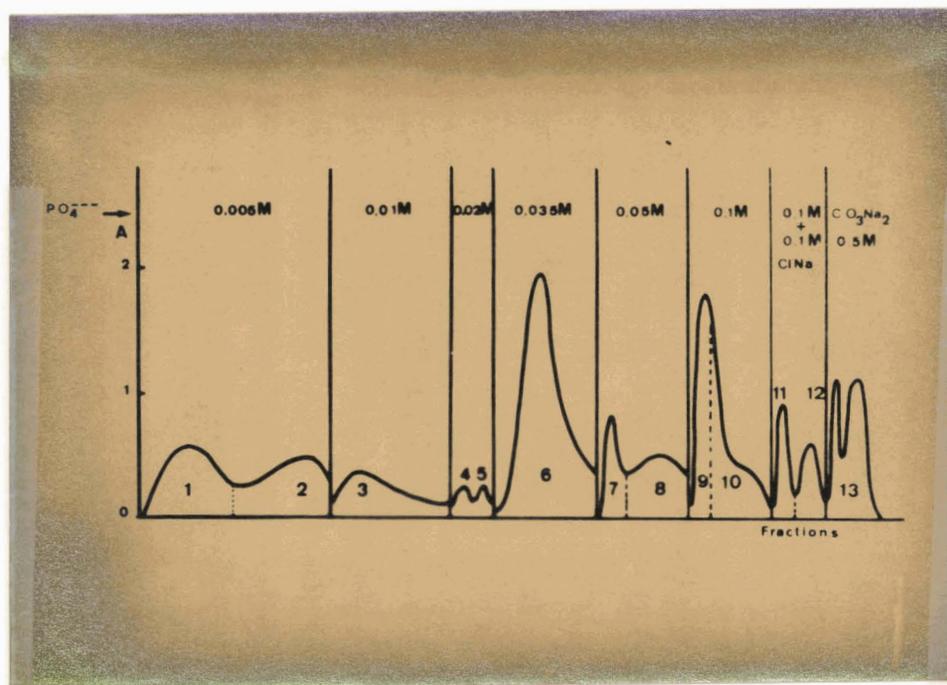


Figure 28

Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (2 x 45 cm) d'un précipité P<sub>2</sub> (2,5 g) obtenu par fractionnement du colostrum de Vache par le sulfate d'ammonium. En ordonnées : densités optiques des solutions d'éluion ; en abscisses : nombre de fractions de 5 ml obtenues.

la chromatographie des précipités  $P_1$  (voir p. 157 ), fournit plusieurs fractions dans des proportions relatives différentes de celles qui ont été obtenues avec les précipités  $P_1$ . En particulier, les pics 1, 2 et 3 qui, dans le cas de ces derniers, étaient majeurs, représentent, dans le cas des précipités  $P_3$ , des fractions mineures. Nous avons précisé, dans le tableau XXVIII (p. 171 ), les rendements que nous avons obtenus pour chacune des fractions.

## 2 - Etude électrophorétique et immuno-électrophorétique.

Les résultats des analyses électrophorétiques et immuno-électrophorétiques des fractions obtenues à partir des précipités  $P_3$  sont illustrés par la figure 29 (p. 173 ). On voit que

a - toutes les fractions obtenues, - à l'exception du pic n° 5 - , sont hétérogènes et renferment, outre des globulines  $\gamma G$ , de la lactalbumine (pics 6 à 12), de la sérumalbumine (pics 9 à 12) et un constituant sérique de comportement  $\alpha_2$  (pics : 8, 9 et 10) visible sur les diagrammes électrophorétiques des pics 9 à 10, en avant de la lactalbumine.

b - comme dans le cas des fractions du précipité  $P_1$ , le comportement des globulines  $\gamma G$  est de plus en plus anodique au fur et à mesure que la concentration des tampons d'élution augmente.

c - les globulines  $\gamma G$  présentent souvent des bifidités et des arcs supplémentaires, témoins de dénaturations plus ou moins profondes (fractions 5, 7, 9, 11 et 12).

d - le pic 10 fournit un arc très fin de comportement  $\beta_2$ -globulinique, qui possède l'allure de l'arc des globulines  $\gamma A$ .

## 3 - Etude chimique.

A cause de l'hétérogénéité des différentes fractions chromatographiques obtenues à partir des précipités  $P_3$ , il nous a paru

Tableau XXVIII

Rendement d'une chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_3$  et composition des fractions obtenues.

Désignation des fractions	Concentration des tampons phosphate pH 8	Poids obtenus (en g)	Nature des constituants
Précipité $P_3$			$\gamma$ G ; lactalbumine ; sérum-albumine ; $\alpha_2$ -globuline
Pics 1	0,005 M	traces	
2	-	traces	
3	0,01 M	0,01	$\gamma$ G
4	0,02 M	traces	
5	-	0,01	$\gamma$ G
6	0,035 M	0,24	$\gamma$ G ; lactalbumine
7	0,05 M	0,01	$\gamma$ G ; lactalbumine
8	-	0,34	$\gamma$ G dénaturées ; $\alpha_2$ -globuline sérique ; lactalbumine
9	0,1 M	0,22	$\gamma$ G ; $\alpha_2$ -globuline sérique ; lactalbumine ; sérumalbumine
10	-	0,20	$\gamma$ G ; $\gamma$ A (?) ; $\alpha_2$ -globuline sérique ; lactalbumine ; sérum-albumine
11	0,1M +ClNa 0,1M	0,06	$\gamma$ G ; lactalbumine
12	-	0,02	$\gamma$ G dénaturées ; lactalbumine ; sérumalbumine
13	$\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,5M	0,09	-
Poids total .....		1,19	
Poids de précipité $P_3$ soumis à la chromatographie .....		2,50	
Rendement .....		47,7 p.100	

illusoire d'entreprendre leur étude chimique.

## 2° - DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Le fractionnement chromatographique du précipité  $P_3$  ne nous a pas permis d'obtenir des globulines  $\gamma G$  pures. Il nous a, en particulier, été impossible de nous débarrasser de la lactalbumine qui est présente dans la plupart des fractions. Il est, d'ailleurs, surprenant que cette protéine se répartisse dans des fractions chromatographiques pourtant bien séparées. Peut-être faut-il invoquer des associations entre la lactalbumine et les autres protéides pour expliquer ce comportement chromatographique ou l'existence d'allotypes de cette protéine ?

En conclusion, le précipité  $P_3$  du colostrum ne peut être utilisé pour la préparation de globulines immunes pures à cause de son hétérogénéité initiale. Il convient d'ailleurs de souligner que la teneur en globulines immunes de ce précipité est très faible en comparaison de celle des précipités  $P_1$  et  $P_4$ . En effet, le calcul montre que la somme des globulines immunes présentes dans ces deux derniers varie de 16 à 20 g, tandis que l'on n'en trouve que de 50 à 400 mg dans les précipités  $P_3$  (+). La "perte" en globulines immunes est donc négligeable.

---

( + ) Voir les deux diagrammes électrophorétiques "extrêmes" des figures 19 (p. 143) et 29 (p. 173) et les rendements en précipités  $P_3$  donnés dans le tableau XXI (p. 139).

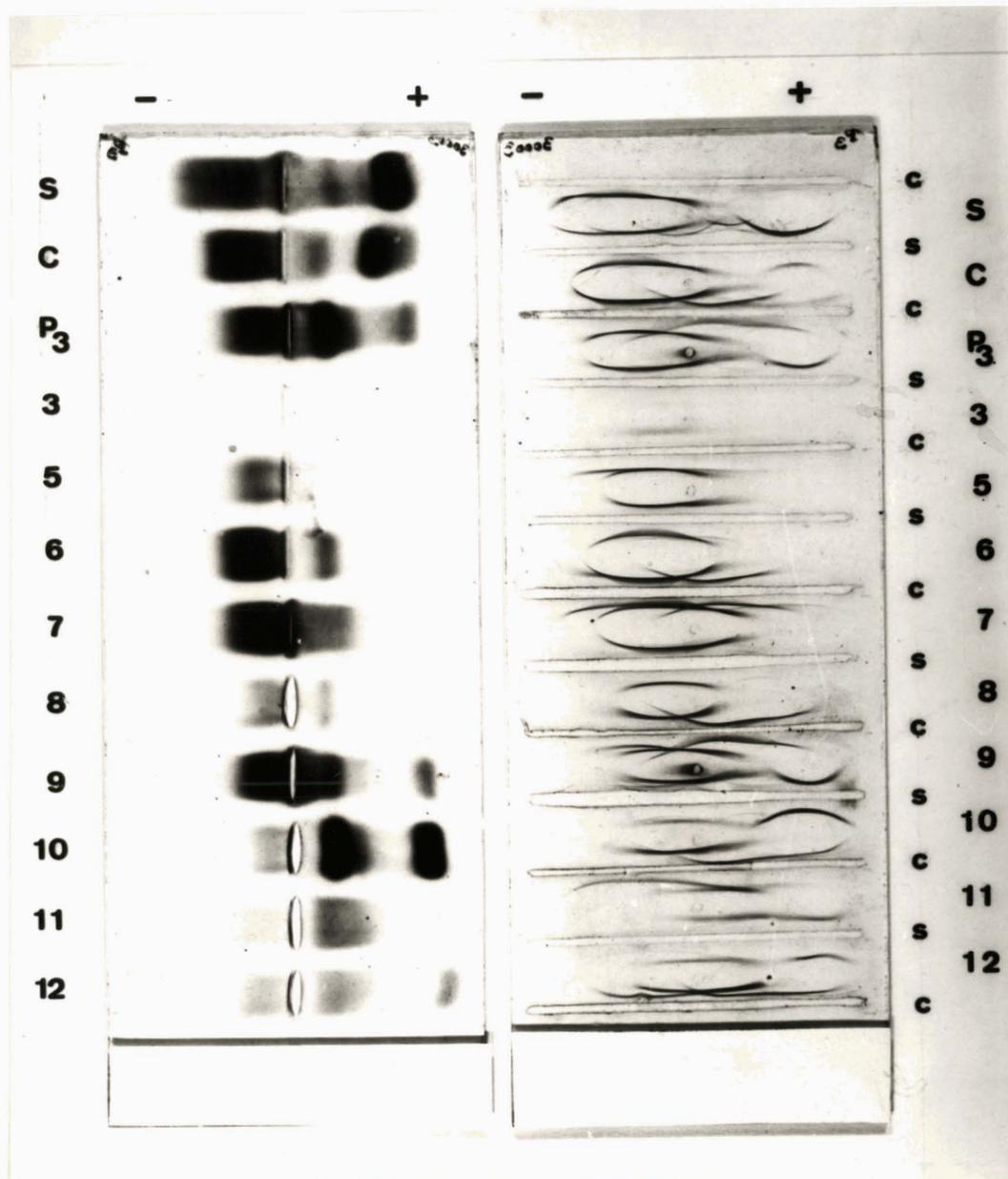


Figure 29

Diagramme d'électrophorèse en gélose (voir p. 91) et d'immuno-électrophorèse (voir p. 104) des différents pics obtenus par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 168) d'un précipité  $P_3$ . s : immunsérum antiprotéides sériques de la Vache. c : immunsérum antiprotéides colostraux de la Vache. S : sérum de Vache. C : colostrum décaséiné de Vache.  $P_3$  : précipité  $P_3$  (voir p. 136) ; 3 à 12 : pics d'élution 3 à 12 de la DEAE-cellulose (voir tableau XXVIII ; p. 171).

## D - FRACTIONNEMENT DES PRECIPITES P<sub>4</sub>

### 1° - RESULTATS

#### 1 - Chromatographie des précipités P<sub>4</sub>

Le figure 30 (p. 175 ) illustre les résultats d'une chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>4</sub> dont les rendements en chacun des pics d'éluion sont précisés dans le tableau XXIX (p. 176 ).

#### 2 - Etude électrophorétique et immuno-électrophorétique.

Les résultats des analyses électrophorétiques en gélose et immunophorétiques des fractions de chromatographie d'un précipité P<sub>4</sub> sont illustrés par la figure 31 (p. 177 ). On voit que toutes les fractions obtenues renferment des globulines  $\gamma$ G pures - à l'exception toutefois du pic n° 8 qui contient des traces de lactalbumine révélées seulement par l'immuno-électrophorèse. Cette dernière montre, en outre, que certaines fractions  $\gamma$ G-globuliniques sont dénaturées (pics n° 2, 7 et 9), comme en témoignent l'apparition de bifidités qui se raccordent avec l'arc des globulines.

#### 3 - Ultracentrifugation.

Les pics n° 1, 2, 5, 7 et 8 ont été soumis à l'ultracentrifugation et les constantes de sédimentation ont été calculées pour une dilution infinie. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXX (p. 179 ) et illustrés par la figure 32 (p. 178 ). Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

a - Comme dans le cas du précipité P<sub>1</sub>, (voir p. 163 ) les globulines  $\gamma$ G de S<sub>20w</sub> 6,5 sont les constituants majeurs de toutes les fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose des précipités P<sub>4</sub>.

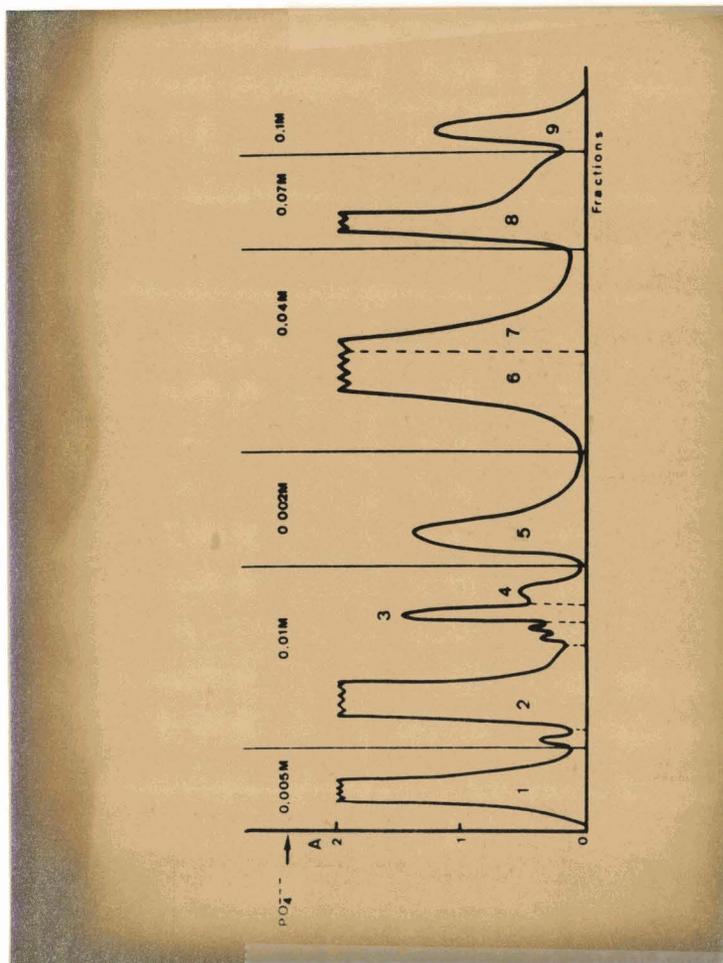


Figure 30

Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (2 x 45 cm) d'un précipité  $P_4$  (2,5 g) obtenu par fractionnement du colostrum de Vache par le sulfate d'ammonium. En ordonnées : densités optiques des solutions d'élué ; en abscisses : nombre de fractions de 5 ml recueillies.

Tableau XXIX

Rendement d'une chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_4$  et composition des fractions obtenues.

Désignation des fractions	Concentration des tampons phosphate de pH 8	Poids obtenus (en g)	Nature des constituants
Précipité $P_4$			$\gamma$ G, traces de lactalbumine
Pics 1	0,005 M	0,48	$\gamma$ G
2	0,01 M	0,56	$\gamma$ G
3	-	0,10	$\gamma$ G
4	-	0,12	$\gamma$ G
5	0,02 M	0,40	$\gamma$ G
6	0,04 M	0,49	$\gamma$ G
7	-	0,35	$\gamma$ G
8	0,07 M	0,46	$\gamma$ G, traces de lactalbumine
9	0,10 M	traces	$\gamma$ G dénaturées
Poids total .....		2,96	
Poids de précipité $P_4$ soumis à la chromatographie .....		5	
Rendement .....		59 p.100	

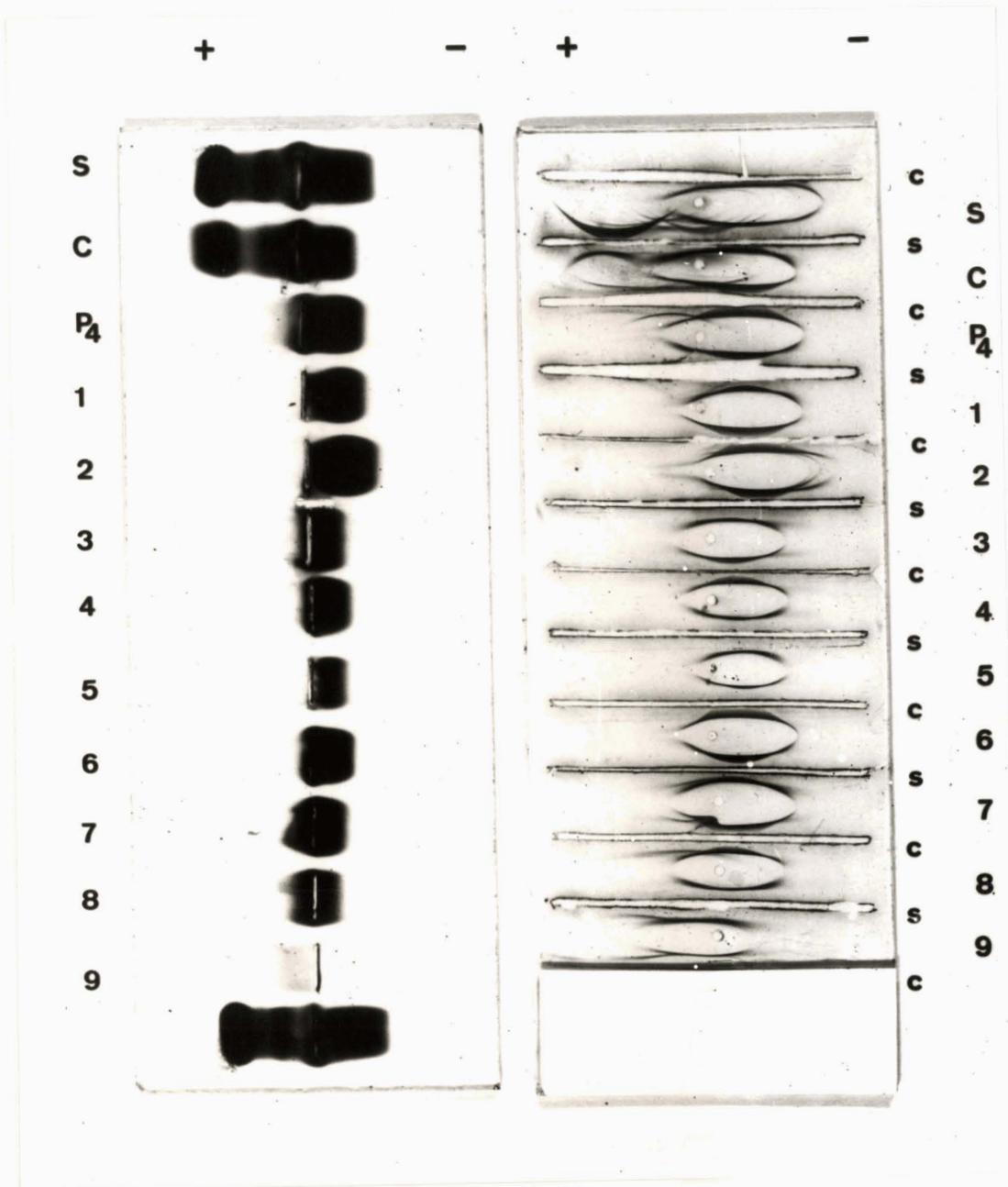


Figure 31

Diagramme d'électrophorèse en gélose (voir p. 91 ) et d'immuno-  
 électrophorèse (voir p. 104) des différents pics obtenus  
 par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 174 ) d'un précipité  
 P<sub>4</sub>. s : immunsérum antiprotéides sériques de la Vache . c : immunsérum  
 antiprotéides colostraux de la Vache. S : sérum de Vache. C : colostrum  
 décaséiné de Vache. P<sub>4</sub> : précipité P<sub>4</sub> (voir p. 136 ) ; 1 à 9 pics  
 d'élution 1 à 9 de la DEAE-cellulose (voir tableau XXIX ; p. 176 ).

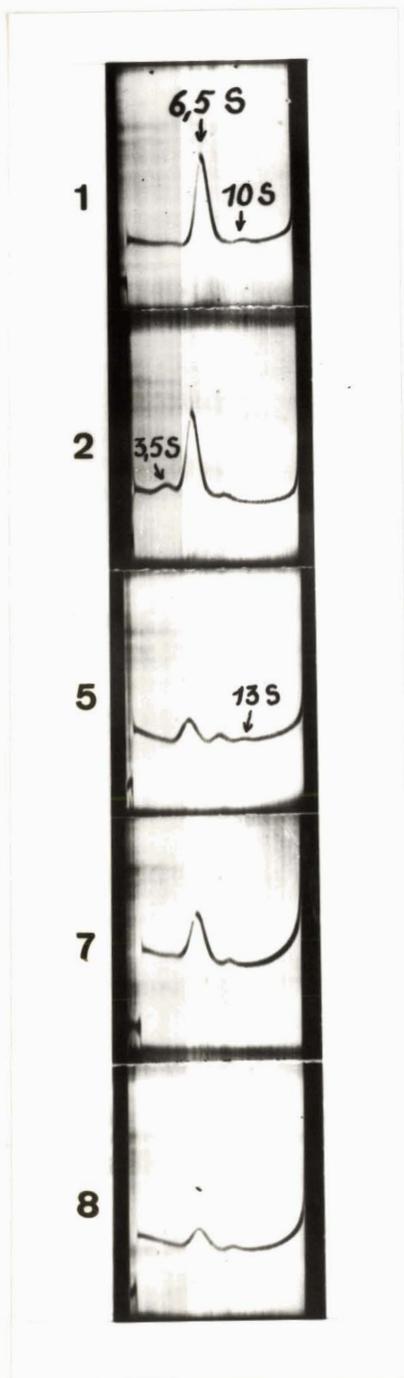


Figure 32

Diagrammes d'ultracentrifugation des diverses fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_4$  (voir p. 136 ).  
Concentration : 50 mg/3 ml de tampon phosphate de pH 7,3. Temps de centrifugation : 45 mn. 1,2,5,7,8 : n° des pics de chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 174 ).

Tableau XXX

Répartition des constituants déterminée par ultracentrifugation (en p.100) dans un précipité P<sub>1</sub> et dans diverses fractions de chromatographie de ce même précipité sur DEAE-cellulose.

Désignation des fractions	Concentration des tampons phosphate d'éluion	Constantes de sédimentation (*)			
		3,5 S	6,5 S	10 ± 1 S	13 S
Précipité P <sub>4</sub>	-	-	76	18	6
Pics n° 1(**)	0,005	4	90	6	-
2	0,01	14	76	10	-
5	0,02	-	66	23	11
7	0,04	-	90	10	-
8	0,07	-	88	12	-

( \* ) Déterminée par extrapolation à une dilution infinie.

( \* \* ) Voir p. 174

b - Dans toutes les fractions, elles sont accompagnées de globulines YG de  $S_{20w} 10 \pm 1 S$  ( \* ) qui sont, comme nous l'avons vu (p. 163 et 153), des produits de dimérisation des globulines YG 6,5 S.

c - Cette "dimérisation" est particulièrement importante dans le pic n° 5 où elle semble être aggravée par une "trimérisation" qui se manifeste par l'apparition d'un composé de  $S_{20w} 13$ .

d - Dans les pics 1 et 2, se trouve un constituant de  $S_{20w} 3,5$  qui ne préexiste pas dans le précipité  $P_4$ . On doit donc admettre qu'il s'agit d'un artefact qui s'explique vraisemblablement par des ruptures de ponts disulfure dont l'origine reste inconnue.

#### 4 - Etude chimique

Comme dans le cas des fractions chromatographiques obtenues à partir du précipité  $P_1$ , nous nous sommes limitée à la détermination de la composition centésimale en glucides que nous avons rapportée dans le tableau XXXI (p. 181). Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sont identiques à celles qui concernaient le fractionnement du précipité  $P_1$  ( p. 167 ) :

a - La composition en glucides et le comportement électrophorétique varient d'une fraction chromatographique à une autre, sans qu'il soit possible d'établir une relation entre la teneur en glucides, - en particulier, en acides sialiques - , et le comportement électrophorétique.

b - Ces résultats confirment la notion d'hétérogénéité des globulines immunes.

---

( \* ) Valeurs obtenues, respectivement, pour les pics n° 1, 2, 5, 7 et 8 : 10,8 - 10,9 - 9,35 - 10,1 - 9.

Tableau XXXI

Composition centésimale en glucides des différentes fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>4</sub> de colostrum de Vache.

Désignation des fractions	Oses p.100	Acides sialiques p.100	Oses
			Acides sialiques
Précipité P <sub>4</sub>	2	0,65	3
Pics n° 1	1,67	0,53	3,2
2	2,15	0,71	3
5	2,84	0,52	5,48
7	2,30	0,55	4,18
8	2,49	0,59	4,21

## 2° - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

a - Comme dans le cas du précipité  $P_1$ , la chromatographie sur DEAE-cellulose du précipité  $P_4$  fournit plusieurs fractions de globulines  $\gamma G$  pures, différentes les unes des autres par leur composition en glucides et par leur comportement électrophorétique.

b - Comme dans le cas des fractions obtenues par chromatographie du précipité  $P_1$ , les diagrammes d'ultracentrifugation révèlent la présence de composés "anormaux" de constantes de sédimentation 3,5 - 10 et 13 S, (voir p. 168, 184 et 195) témoin de l'action dénaturante des sels neutres et de la DEAE-cellulose. Celle-ci provoque, en outre, l'hydrolyse de liaisons sialyl puisque le taux d'acides sialiques de toutes les fractions - sauf celui de la fraction 2 - est inférieur à celui de la préparation initiale.

c - Contrairement au lait de Femme, le fractionnement du lait de Vache ne conduit pas à l'isolement de globulines  $\gamma A$ . En effet, MONTREUIL, CHOSSON, HAVEZ et MULLET (269bis) ont obtenu des globulines  $\gamma A$  pures par chromatographie sur Amberlite XE-64 du précipité  $P_4$  du lait de Femme. Ces résultats s'expliquent par la teneur élevée de ce dernier en globulines  $\gamma A$ , tandis que le lait de Vache n'en contient pas ou seulement des traces.

#### IV - CONCLUSIONS GENERALES

---

---

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre étude électrophorétique, immuno-électrophorétique et physico-chimique des globulines immunes du colostrum de Vache, fractionnées par relargage au sulfate d'ammonium puis par chromatographie sur DEAE-cellulose, sont les suivantes :

1 - Le colostrum de Vache est très riche en globulines immunes qui sont constituées en majeure partie, par des composés de constante de sédimentation 6,5 S, représentés essentiellement par des globulines  $\gamma G$ . La présence de globulines  $\gamma A$  n'a pu être démontrée, quoique l'un des arcs de précipitation semble être caractéristique de ce type de globulines immunes. Cependant, ce critère n'est pas suffisant pour tirer une conclusion et une certitude ne pourra être acquise que lorsque l'isolement des globulines  $\gamma A$  sériques aura été réalisé. Au contraire, la présence en faible quantité de globulines  $\gamma M$  a pu être mise en évidence .

2 - Les globulines immunes du colostrum de Vache, comme leurs homologues sériques, sont très hétérogènes. La démonstration en est apportée par deux séries de résultats. L'une concerne la dissociation de ces globulines en deux groupes principaux : le premier, le plus important, est précipitable au tiers de la saturation en sulfate d'ammonium et à pH neutre (précipité  $P_1$ ), le second est précipitable à demi-saturation et à pH neutre (précipité  $P_4$ ). L'autre concerne le "découpage" profond

des globulines immunes de ces deux groupes par chromatographie sur DEAE-cellulose. Toutes les fractions obtenues possèdent des compositions en oses et des comportements électrophorétiques différents. Cependant, toutes donnent en immuno-électrophorèse et en diffusion selon OUCHTERLONY des réactions d'identité totales (Fig. 33 ; p. 184 ) En outre, les sérums épuisés par l'une seulement de ces fractions ne donnent plus de réactions de précipitation avec l'ensemble des fractions. Ces dernières possèdent donc des motifs antigéniques identiques ou très voisins et seules, de légères variations structurales, dont la nature reste à préciser, les distinguent les unes des autres.

3 - Cependant, la plus grande prudence doit être observée dans l'interprétation des résultats des fractionnements par le sulfate d'ammonium ou par la chromatographie sur DEAE-cellulose. On peut, en effet, se demander dans quelle mesure certains d'entre eux ne sont pas la conséquence d'artéfacts, à l'analyse des deux expérimentations suivantes :

a - Nous avons soumis un précipité  $P_1$  (1/3 de saturation ; pH 7), qui contenait des globulines  $\gamma G$  de constante de sédimentation 6,5 S souillées d'une faible quantité de composant 10 S, à un nouveau fractionnement par le sulfate d'ammonium suivant le schéma de la figure 16 , p. 136 . Nous avons obtenu deux précipités, l'un, au 1/3 de la saturation et à pH 7 ( $p_1$  ) ; l'autre à demi-saturation et à pH 7 ( $p_4$  ). On peut donc se demander si la distinction des globulines  $\gamma G$  en deux groupes différents par leurs caractères de précipitation par le sulfate d'ammonium correspond bien à la réalité et si les globulines  $\gamma G$  présentes dans le précipité  $P_4$ , ne sont pas, en fait, des globulines identiques à celles du précipité  $P_1$ . Leur précipitation tardive peut s'expliquer de deux manières. On peut, en effet, envisager qu'une partie des globulines  $\gamma G$  s'associent avec d'autres protéides qui joueraient vis-à-vis d'elles un effet "protecteur" et que l'augmentation de la concentration saline

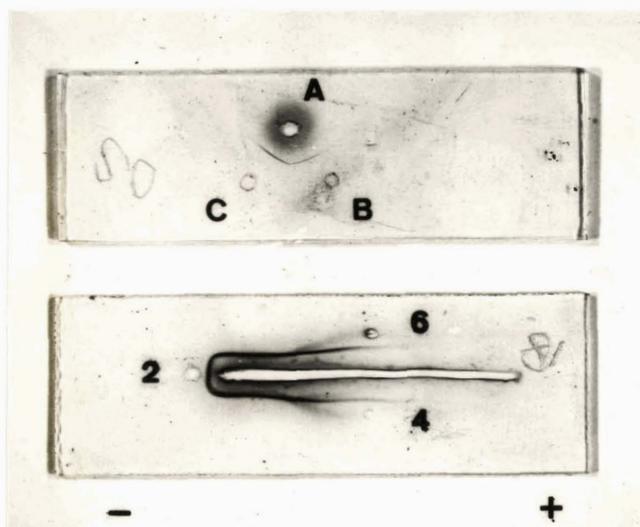


Figure 33

- 1 - Double diffusion, en gélose, selon le procédé d'OUCHTERLONY (voir p. 102), d'un immunsérum antiprotéides sériques du Boeuf (A), du pic n° 1 obtenu par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_1$  (B) et du pic n° 8 obtenu par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_4$ .
- 2 - Méthode des fentes courtes de LEVY et POLONOVSKI (voir p. 108) appliquée à 3 fractions de chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité  $P_1$ . 2,4,6 : respectivement pics 2, 4 et 6.

détruirait ces associations. On peut, d'autre part, penser que la précipitation des protéides par le sulfate d'ammonium dépend de l'"environnement" et que les caractères de précipitation d'un protéide sont différents suivant qu'il se trouve en solution, seul ou accompagné de tous les autres constituants micro- ou macromoléculaires présents dans les solutions biologiques.

Nous formulons donc une réserve quant à l'existence, dans le colostrum, de deux catégories distinctes de globulines  $\gamma G$  : celles des précipités  $P_1$  et  $P_4$ . Le dosage des oses ne nous a pas permis de trancher la question. En effet, les compositions centésimales en glucides des deux précipités sont très voisines :

$P_1$	: Oses "neutres"	$1,92 \pm 0,1$
	Acides sialiques	$0,88 \pm 0,12$
	Osés/Ac. sialiques	2,2
$P_4$	: Oses "neutres"	$2,08 \pm 0,3$
	Acides sialiques	0,93
	Osés/Ac. sialiques	2,2

La détermination de la composition en amino-acides apportera peut-être une solution à ce problème.

Nota : L'analyse par ultracentrifugation des deux sous-fractions obtenues par relargage d'un précipité  $P_1$  montre que toutes les manipulations ont légèrement dénaturé les globulines  $\gamma G$ . En effet, il apparaît sur les diagrammes d'ultracentrifugation, le pic d'un constituant 10 S et même, dans le précipité obtenu à demi-saturation, un constituant 3,5 S (Tableau XXXII ; p. 186). Ce résultat confirme nos conclusions de la p. 168.

b - Nous avons, d'autre part, soumis les globulines  $\gamma G$  d'un pic 1 obtenu par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir p. 174) d'un précipité  $P_4$  (voir p. 136) à une nouvelle chromatographie sur DEAE-cellulose, dans des conditions identiques. Les résultats que

Tableau XXXII

Répartition, déterminée par ultracentrifugation, des constituants présents dans deux sous-fractions obtenues à partir d'un précipité  $P_1$ .

Origine	Constantes de sédimentation		
	3,5 S	6,5 S	10 S
$P_1$ obtenu par précipitation du colostrum par $SO_4 Am_2$ au $1/3$ de saturation et pH 7	0	+	traces
Précipités obtenus par fractionnement du $P_1$ précédent par le sulfate d'ammonium suivant le schéma de la figure 16 (p. 136)			
$p_1$	0	92	8
$p_4$	3,5	95	1,5

nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXXIII (p. 188 ) et illustrés par les figures 34 (p. 189 ) et 35 (p. 190 ) . On voit qu'un nouveau "découpage" est réalisé et que les premières fractions importantes apparaissent avec le passage de solutions de phosphate d'une concentration supérieure à 0,02 M, alors que les protéides du pic 1 avaient été obtenus avec une solution de phosphate 0,005 M ! On comprend donc aisément que, dans ces conditions, nous avons renoncé à effectuer une étude poussée des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose et que nous avons donné notre préférence aux préparations obtenues par précipitation par le sulfate d'ammonium.

4 - En effet, le fractionnement des protéides colostraux par le sulfate d'ammonium permet d'obtenir rapidement des quantités élevées de globulines immunes qui, dans certains cas, sont pures et peuvent être soumises à l'analyse en vue de déterminer leurs propriétés physico-chimiques et leur structure. Dans le chapitre suivant, nous exposerons les résultats que nous avons acquis à propos des globulines YG constituant le précipité P<sub>1</sub> préparé par précipitation du colostrum à 1/3 de saturation en sulfate d'ammonium et à pH neutre (voir p. 135 ).

Tableau XXXVIII

Rendement (en mg) de la re-chromatographie sur DEAE-cellulose des globulines YG d'un pic n° 1 obtenu par chromatographie sur DEAE-cellulose (tampon 0,005 M ; pH 8) d'un précipité P<sub>4</sub> (voir p. 174 ).

N° des pics	Concentration du tampon de pH 8	Poids obtenus (en mg)
1	0,005 M	8
2	0,01 M	8
3	0,02 M	47
4	0,035 M	80
5	0,05 M	31
6	0,10 M	28
7	0,1 M + NaCl 0,1 M	5
8	CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 0,05 M	2
Total .....		209
Poids de protéides soumis à la chromatographie .....		400
Rendement .....		52 p.100

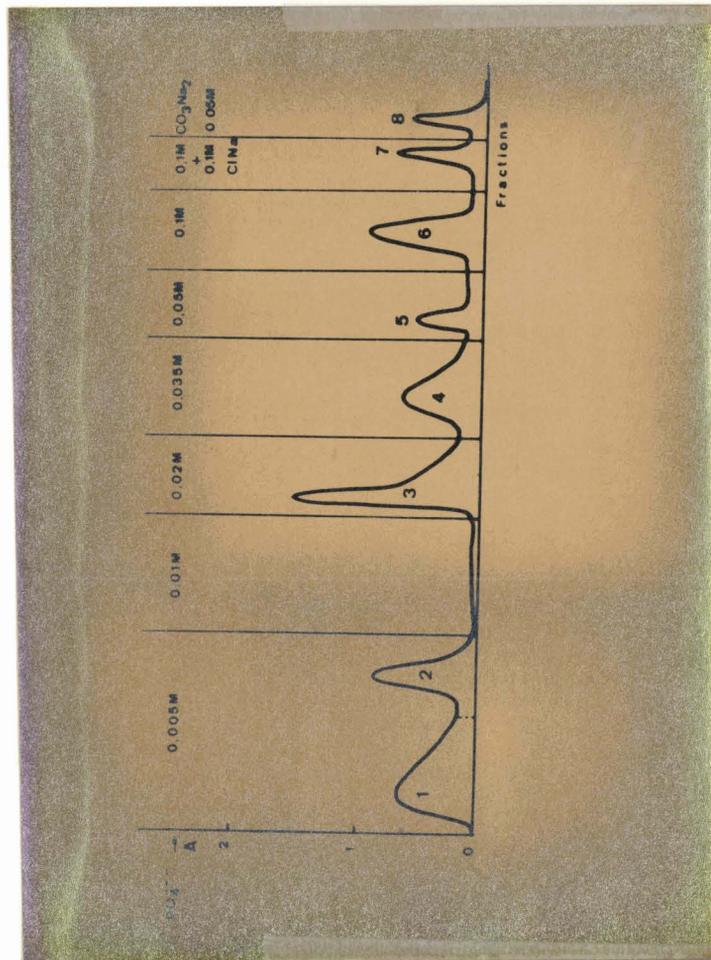


Figure 34

Re-chromatographie sur DEAE-cellulose (2 x 25 cm) des globulines  $\gamma$ G d'un pic n° 1 de chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>4</sub> (voir la figure 30 ; p. 175).

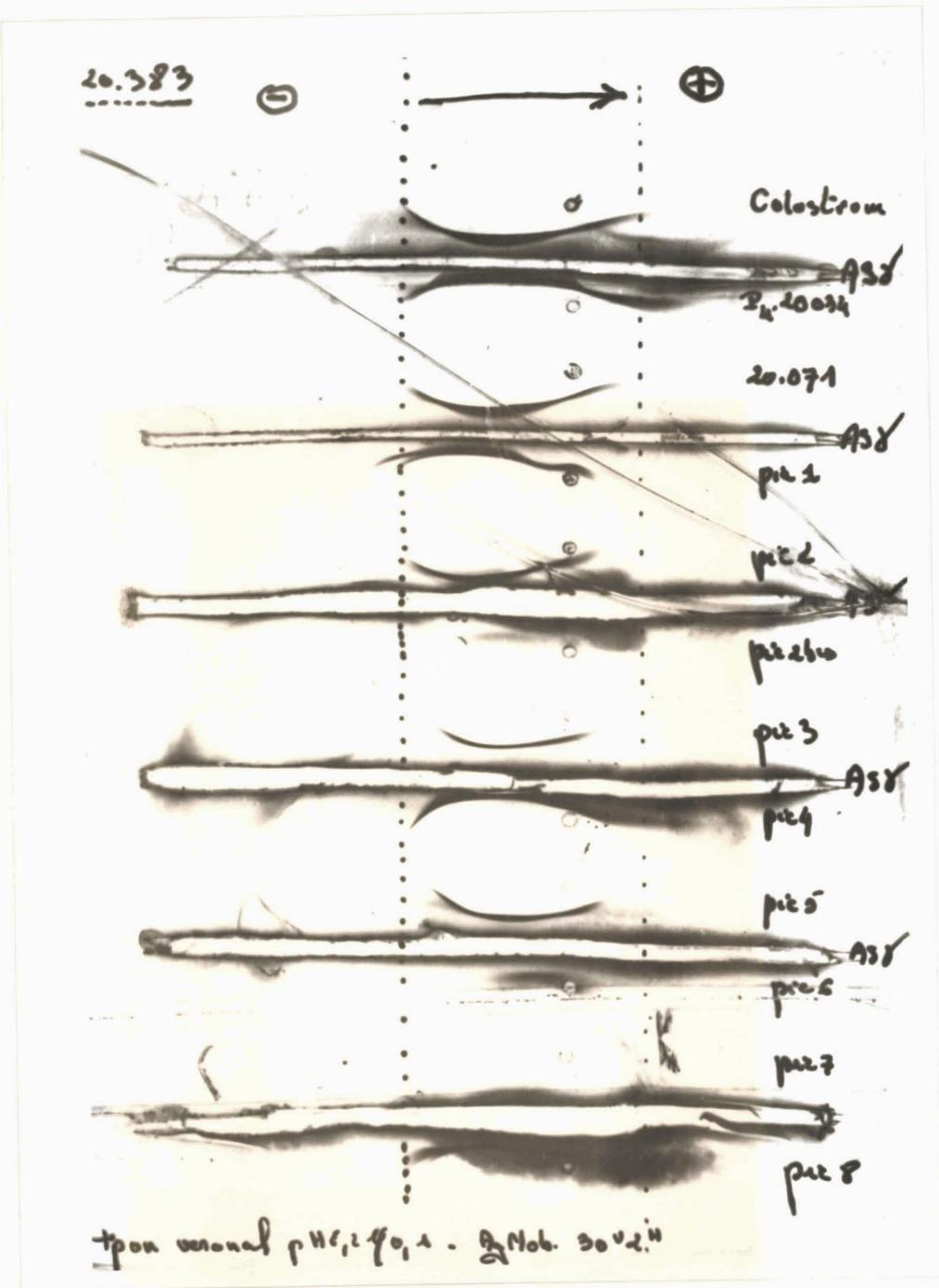


Figure 35

Immuno-électrophorèse des différents pics (1 à 8) obtenus par re-chromatographie sur DEAE-cellulose (voir fig. 34 ; p. 189 ) d'un pic n° 1 provenant de la chromatographie sur DEAE-cellulose d'un précipité P<sub>4</sub> (voir fig. 30 ; p. 175 ).

4° - ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DES GLOBULINES  $\gamma$ G DU

COLOSTRUM DE VACHE

Nous avons vu dans le chapitre précédent (voir p.142 ) que certains précipités  $P_1$ , obtenus, par précipitation du colostrum de Vache (délipidé et décaséiné) par le sulfate d'ammonium au tiers de la saturation et à pH 7, étaient constitués par des globulines  $\gamma G$  pures. Sur l'un d'entre eux, nous avons effectué une étude physico-chimique complète qui nous a permis de préciser - pour la première fois - la composition molaire en glucides et en amino-acides des globulines  $\gamma G$  du colostrum de Vache. En outre, nous avons déterminé la nature des amino-acides N-terminaux et commencé l'exploration de la structure du groupement glycanique et des modalités de l'attache glycanne-protéine.

#### A - POIDS MOLECULAIRE

Le poids moléculaire des globulines  $\gamma G$  du colostrum de Vache a été déterminé par ultracentrifugation et par diffraction de la lumière.

1 - L'ultracentrifugation des globulines  $\gamma G$  colostrales, a été effectuée dans un tampon phosphate-NaCl de pH 7,3 et de force ionique 0,3. La constante de sédimentation  $S_{20w}$  calculée par extrapolation à une dilution infinie est de  $6,5 \pm 0,2$ .

Le poids moléculaire a été déterminé d'après les données fournies par l'ultracentrifugation à l'approche de l'équilibre de sédimentation, (voir p. 97 ) et en tenant compte d'un volume spécifique partiel de 0,750. Sa valeur est la suivante :

$$132\ 600 \pm 5500$$

2 - La mesure du poids moléculaire par diffusion de la lumière a fourni une valeur très voisine de

$$132\ 000 \pm 8000.$$

## Discussion

Nous avons rassemblé dans le tableau XXXIV ( p. 194 ) les valeurs de constantes de sédimentation et de poids moléculaires des globulines immunes du colostrum, du lait et du sérum de Vache obtenues par différents auteurs et par nous-même. On voit que nos valeurs de la constante de sédimentation et du poids moléculaire sont inférieures à celles des autres auteurs. Ce résultat s'explique aisément à la lumière des recherches récentes qui ont été effectuées sur les globulines immunes et que nous pouvons résumer de la manière suivante :

1 - Il est bien établi , à présent, que la valeur de la constante de sédimentation des globulines  $\gamma$ G est inférieure à 7 S. En effet, calculée par extrapolation à une dilution infinie, elle est, par exemple, de 6,6 pour les globulines  $\gamma$ G humaines. Cette erreur, vieille de 20 ans, s'explique par le fait que certains auteurs ont négligé de tenir compte de l'influence de la concentration sur la valeur de la constante de sédimentation (PUTNAM) (270).

2 - Les "anciennes" valeurs de poids moléculaires des globulines  $\gamma$ G de différentes espèces animales varient de 127 000 à 188 000 (voir la revue générale de PORTER) (271). Actuellement, les valeurs oscillent entre 130 000 et 145 000) : 137 300 (CAMMACK) (272) et 145 000  $\pm$  5000 (MARLER et al) (273) pour les globulines  $\gamma$ G du Lapin ; 151 000 pour celles du Cheval (PAIN) (274). Deux explications peuvent être données à la dispersion des résultats et aux valeurs élevées de certaines déterminations :

a - De nombreux auteurs ont calculé des poids moléculaires sur la base de valeurs erronées de volume spécifique partiel, de constante de sédimentation et de constante de diffusion. CAMMACK (275) a, par exemple, démontré que le poids moléculaire des globulines  $\gamma$ G du Lapin était de 179 000 ou de 137 300 suivant que l'on

Tableau XXXIV

Constantes de sédimentation et poids moléculaires des globulines  $\gamma$ G du colostrum, du lait et du sérum de Vache.

Origine	$S_{20w}$	Poids moléculaires	Références
Colostrum	7	160 000 à 190 000 ( a )	SMITH (276)
	$6,5 \pm 0,2$	$132\ 600 \pm 5500$ ( a )	Résultats personnels
		$132\ 000 \pm 8000$ ( b )	Résultats personnels
Lait	-	180 000 ( a )	SMITH (277)
	-	171 000 ( c )	GUTFREUD (278)
Sérum	-	180 000 ( a )	SMITH et BROWN (279)
	-	157 000 ( b )	HEIDE (280)
	-	171 000 ( c )	GUTFREUD (281)
	$7,28 - 7,31$	160 000 ( a )	KOENIG et PEDERSEN (282)
	-	169 000 ( a )	PHELPS et CANN (283)

( a ) Déterminé par ultracentrifugation

( b ) Déterminé par diffusion de la lumière

( c ) Déterminé par pression osmotique

négligeait ou non de faire intervenir la concentration dans le calcul des constantes de sédimentation et de diffusion.

b - Les globulines  $\gamma$ G ont une tendance marquée à se "copolymériser". Ces agrégats, qui peuvent être rendus responsables de valeurs élevées de poids moléculaires, se forment dans les solutions maintenues à 2°C (COHEN et PORTER) (284), au cours de dialyses prolongées ou de la lyophilisation. Leur présence se manifeste par l'apparition sur les diagrammes d'ultracentrifugation d'un pic de  $S_{20w}$  9,5 - 10 qui est probablement un dimère (PUTNAM et UDIN (285) ; TONNELAT (Communication personnelle)).

### Conclusions

La détermination de la constante de sédimentation et du poids moléculaire des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache nous conduisent aux résultats suivants :

$$S_{20w} = 6,5 \pm 0,2$$

$$P M = 132600 \pm 5500$$

Ces valeurs sont en parfait accord avec les données les plus récentes concernant ces deux constantes physiques des globulines  $\gamma$ G.

### B - ETUDE DU GROUPEMENT GLYCANNIQUE

#### 1 - Composition centésimale

La composition centésimale de diverses préparations de globulines  $\gamma$ G colostrales a été déterminée en appliquant les procédés de dosages colorimétriques de dosage des oses (p. 72 ), des osamines (p. 74 ) et des acides sialiques (p. 73 ). Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXXV (p. 196 ). On voit que la composition centésimale en glucides varie d'une préparation à

Tableau XXXV

Composition centésimale en glucides des globulines immunes du colostrum et du sérum de Vache .

	COLOSTRUM						SERUM				
	Résultats personnels				Résultats de SMITH <u>et al.</u> (a)	NOLAN et SMITH (b)	SMITH et al. (a)	DUQUESNE et al. (c)			
Oses "neutres" (d)	2,40	1,92	1,60	1,94	2,65 ± 0,1	1,11	2,05 ± 0,16	1,17	1,21	1,12	1,09
Hexoses	-	-	-	-	-	0,93	-	-	-	-	-
Fucose	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-
Hexosamines	1,13	1,19	0,90	0,99	1,48 ± 0,09	1,49	1,26 à 1,35	1,24	1,13	1,12	1,24
Acides sialiques	1,03	0,95	0,65	0,88	-	0,29	-	0,36	0,14	0,28	0,35
Oses/osamines	2,12	1,61	1,78	1,96	1,79	0,74	1,51 à 1,62	0,94	1,07	1	0,87
Oses/Ac. sialiques	2,33	2,04	2,46	2,19	-	3,80	-	3,28	8,64	4	3,30

(a) SMITH, GREENE et BARTNER (286)

(b) NOLAN et SMITH (287)

(c) DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL (Communication personnelle)

(d) Hexoses + Fucose

l'autre et que les valeurs moyennes oscillent aux environs de 2 p.100 pour les oses, de 1 p.100 pour les osamines et de 0,95 p.100 pour les acides sialiques.

Nous avons rapporté dans le même tableau, les valeurs obtenues par SMITH, GREENE et BARTNER (288) et par NOLAN et SMITH (289). Nos valeurs se rapprochent de celles de SMITH et al., en particulier, en ce qui concerne le rapport oses/osamines. Au contraire, elles se distinguent nettement des valeurs de NOLAN et SMITH par un taux plus élevé en oses et en acides sialiques et par une teneur plus faible en osamines.

Nous avons, en outre, fait figurer, à titre comparatif, des résultats concernant les globulines  $\gamma$ G sériques que nous interpréterons dans le dernier chapitre.

## 2 - Identification des oses constituant les globulines $\gamma$ G

L'application des procédés d'identification chromatographiques et électrophorétiques des oses constituant les glycoprotéides nous a donné les résultats suivants.

Le galactose, le mannose et le fucose ont été identifiés dans les globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache en comparant leur comportement chromatographique avec celui d'oses purs de référence. Nous avons vu plus haut (p. 78 ) que ce critère était insuffisant et qu'il devait s'accompagner de la détermination des pouvoirs rotatoires des oses et des propriétés de leurs dérivés (hydrazones, osazones). La faible teneur en glucides des globulines  $\gamma$ G ne nous a malheureusement pas permis d'appliquer les deux derniers critères et nous formulons donc une réserve quant à la nature des oses neutres.

La N-acétylglucosamine est le seul ose aminé présent dans la fraction glycannique des globulines  $\gamma$ G colostrales. En effet, la désamination oxydative par la ninhydrine ne fournit que de l'arabinose (voir p. 81 ) ; la chromatographie sur colonne de Dowex-50 selon GARDELL (290) (voir p. 81 ) ne donne qu'un seul pic correspondant à la glucosamine ; l'électrophorèse des hydrolysats réacétylés de

globulines YG révèle la présence exclusive de N-acétylglucosamine.

L'analyse chromatographique des acides sialiques (voir p. 83) montre que les acides N-glycolyl et N-acétylneuraminiques coexistent dans les globulines YG colostrales.

### 3 - Composition molaire

L'application des procédés d'identification (voir p. 72) et de dosages (voir p. 76) chromatographiques et électrophorétiques des oses constituant les glycoprotéides nous a permis de déterminer la composition molaire en oses des globulines YG du colostrum de Vache :

Galactose	:	6
Mannose	:	6
Fucose	:	2
N-acétylglucosamine	:	8
Acide N-acétylneuraminique	}	4
Acide N-glycolylneuraminique		

Nos résultats s'éloignent très sensiblement de ceux de NOLAN et SMITH (291) qui attribuent aux groupements glycanniques de globulines YG du colostrum de Vache la composition suivante

Galactose	:	6
Mannose	:	3
Fucose	:	2
Hexosamines	:	15
Acides sialiques	:	1,5

Le faible taux de mannose trouvé par ces auteurs peut s'expliquer par les modalités même de l'hydrolyse utilisée par les auteurs ( $\text{SO}_4 \text{H}_2$  0,25 N ; 18 h ;  $105^\circ\text{C}$ ). On sait, en effet, que l'hydrolyse sulfurique est incomplète et que, seule, l'hydrolyse chlorhydrique est capable d'hydrolyser quantitativement le groupement glycannique des glycoprotéides (MONTREUIL et SCHEPPLER (292). MICHON et BOURRILLON (293)).



#### 4 - Etude préliminaire de la structure du glycanne

La faible teneur en glucides des globulines  $\gamma$ G ne nous a pas permis d'effectuer des recherches poussées sur le groupement glycanique. Nous nous sommes limitée à une étude cinétique de la libération, des oses sous l'action de l'acide sulfurique dilué. On sait, en effet, que les acides chlorhydrique et sulfurique dilués, agissant sur des polyosides, libèrent préférentiellement des oses et de faibles quantités d'oligosides (MONTREUIL et CHOSSON (294) ; MONTREUIL, CHOSSON et SPIK (295)). Ce type d'hydrolyse représente donc le procédé de choix pour déterminer les positions relatives des oses constituant les glycannes, en se fondant sur ce principe que les oses les plus "externes" seront libérés les premiers, au contraire des oses les plus "internes".

##### a - Mode opératoire

250 mg de globulines  $\gamma$ G colostrales sont hydrolysés par 15 ml d'acide sulfurique 0,1 N à 100°C pendant des temps variant de 0,5 à 6 h. Les hydrolysats sont dialysés et la fraction dialysable est purifiée sur des colonnes d'échangeurs d'ions (Dowex-50 et Duolite A-40), Le liquide effluent, convenablement concentré, est soumis à la chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le système-solvant n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Les glucides sont identifiés à l'aide de témoins latéraux et grâce aux colorations spécifiques qu'ils donnent avec les réactifs à l'oxalate d'aniline et à la benzidine-acide trichloracétique.

##### b - Résultats

Les acides sialiques sont libérés en totalité en 30 à 45 mn. Ils sont suivis par le fucose, puis par le galactose et par une partie de la N-acétylglucosamine. Le mannose apparaît beaucoup plus tardivement.

- La N-acétyllactosamine a été identifiée dans les hydrolysats par son comportement chromatographique et par les colorations caractéristiques qu'elle donne avec les réactifs à l'oxalate d'aniline (coloration brun jaunâtre) et à la benzidine trichloracétique

(coloration jaune). En outre elle ne fournit pas de chromogène avec les solutions de carbonate de sodium et ne donne pas de coloration par la réaction d'EHRLICH "indirecte". Elle apparaît dès le début de l'hydrolyse acide.

### c - Discussion

On peut conclure de ces résultats que, dans la fraction glycanique des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache, l'acide sialique et le fucose se trouvent en position "externe", suivis par le galactose, puis par une partie des osamines. L'autre fraction des osamines et le mannose constituent la fraction plus "interne" et plus stable de la molécule. En outre, la N-acétyl-lactosamine est présente dans le glycanne et se trouve en position externe.

Le schéma de structure du glycanne des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache se rattache donc au schéma général commun à de nombreux glycoprotéides d'origine animale. En effet, des résultats identiques ont été obtenus par hydrolyse acide de l'orosomucoïde (EYLAR et JEANLOZ (296) ; JEANLOZ (297) ; MONTREUIL et al (298) ; SONNET (299) WINZLER (300)), de la fétuine (SPIRO) (301), de l'ovomucoïde (BRAGG et HOUGH (302) ; CHATTERJEE et MONTGOMERY (303) ; MONTREUIL et CHOSSON (304) ; CHOSSON, MONTREUIL et SCHEPPLER (305) ; MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (306) ; MONTREUIL, CHOSSON et SPIK (307), le fibrinogène (MESTER et coll. (308), l'haptoglobine (JAYLE ) (309), la glycoprotéine  $\alpha_2$ -B a de sérum humain (KAMIYAMA et SCHMID) (310), les uromucoïdes et séromucoïdes totaux de l'Homme, du Boeuf, du Cheval, du Mouton, du Porc et du Veau, la transferrine et la lactotransferrine humaines et les globulines  $\gamma$ G sériques de l'Homme et du Boeuf (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (311) ; MONTREUIL, CHOSSON et SPIK (312).

D'autre part, la présence de N-acétyllactosamine renforce cette conception. En effet, ce diholoside a été identifié dans de nombreux glycoprotéides : substances spécifiques des groupes sanguins (YOSIZAWA (313) ; KUHN et KIRCHENLOHR (314) ; COTE et MORGAN (315) ; MASAMUNE (316)), mucine gastrique du Porc (TOMARELLI et al. (317), l'orosomucoïde (EYLAR et JEANLOZ (318) MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (319),

la fétuine (SPIRO) (320), l'acide kératosulfurique (HIRANO, HOFFMAN et MEYER) (321), les uromucoïdes et séromucoïdes totaux de l'Homme, du Boeuf, du Cheval, du Mouton, du Porc, et du Veau, la transferrine et la lactotransferrine humaines et les globulines  $\gamma$ G sériques de l'Homme et du Boeuf (MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (322) ; MONTREUIL, CHOSSON et SPIK (323)).

#### d - Conclusion

Dans la fraction glycanique des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache, comme dans de nombreux glycoprotéides d'origine animale, l'acide sialique et le fucose se trouvent en position externe, suivis, du galactose et d'une partie de la N-acétylglucosamine vraisemblablement lié l'un à l'autre sous la forme de N-acétyllactosamine. L'autre fraction de la N-acétylglucosamine et le mannose sont en position interne.

### C - ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE

#### 1° - Dosage des acides aminés

La composition en acides aminés des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache a été déterminée suivant le protocole expérimental que nous avons décrit plus haut ( voir p. 84 ) (dosage chromatographique sur colonne effectué à l'aide d'un appareil Autoanalyzer Technicon).

Nos résultats concernant la composition centésimale de la protéine ont été rassemblés dans le tableau XXXVI (p. 202 ) dans lequel nous avons fait figurer, à titre comparatif, d'une part, les résultats de SMITH et GREENE (324) et, de SMITH, GREENE et BARTNER (325) concernant les globulines  $\gamma$ G totales du colostrum de Vache, et, d'autre part, les résultats de DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL (326) concernant les globulines  $\gamma$ G du sérum de Vache.

En outre, nous avons précisé dans le tableau XXXVII, les compositions molaires des globulines  $\gamma$ G colostrales et sériques de la Vache.

Tableau XXXVI

Composition en acides aminés (en g de résidus pour 100 g de protéine sèche) des globulines immunes du colostrum et du sérum de Vache.

	COLOSTRUM		SERUM	
	Résultats personnels (globulines $\gamma$ G)	SMITH et al. (a)	SMITH et al. (a)	DUQUESNE et al. (b)
Acide aspartique	9,65	-	-	8,70
Acide glutamique	13,55	-	-	11,10
Arginine	3,49	4,36	5,6 - 6,02	6,24
Histidine	2,41	1,99	2,01- 2,09	2,42
Lysine	7,27	6,30	6,06- 6,08	7,21
Alanine	3,40	-	-	3,42
Cystine/2	1,48	1,58	2,89- 2,95	2,42
Glycocolle	3,47	-	-	3,75
Isoleucine	3,30	2,77	3,05- 3,31	2,69
Leucine	7,35	8,90	7,2 - 7,5	6,94
Méthionine	-	0,89	1,14- 1,22	1,62
Phénylalanine	3,98	3,60	3,06- 3,31	5,03
Proline	7,90	-	-	3,60
Sérine	9,55	-	-	9,48
Thréonine	7,80	9,4	9,8 - 10,1	9,40
Tryptophanne	3,17	2,74	2,62	1,90
Tyrosine	4,20	-	-	4,50
Valine	8,02	10,2	9,6 - 10,4	9,72

(a) SMITH et GREENE (327) ; SMITH, GREENE et BARTNER (328) ; Dosages microbiologiques.

(b) DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL (Communication personnelle). Dosages chromatographiques.

Tableau XXXVII

Composition molaire et amino-acides N-terminaux des globulines immunes  $\gamma$ G isolées du colostrum et du sérum (DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL) (Communication personnelle) de Vache.

<u>Glucides</u>	<u><math>\gamma</math>G du colostrum (a)</u>	<u><math>\gamma</math>G du sérum (b)</u>
Galactose (c)	6	5
Mannose	6	7
Fucose	2	3
N-acétylglucosamine	8	9
Acide N-acétylneuraminique	} 4	} 2
Acide N-glycolylneuraminique		
<u>Acides aminés</u>		
Aspartique	107	102
Glutamique	134	116
Arginine	29	54
Histidine	22	24
Lysine	73	76
Alanine	61	65
Cystine/2	18	32
Glycocolle	78	87
Isoleucine	37	32
Leucine	83	83
Méthionine	-	17
Phénylalanine	35	47
Proline	88	50
Sérine	140	147
Thréonine	99	125
Tryptophane	22	14
Tyrosine	33	37
Valine	104	133
N-terminaux	Asp, Glu	Ala, Asp, Glu, Ser, Val

(a) Poids moléculaire 132.600

(b) Poids moléculaire 140.000

(c) Valeurs de NOLAN et SMITH (330) : galactose 6, Mannose 3, fucose 2, Hexosamines 15, acides sialiques 1,5

## Discussion

Jusqu'à présent, aucune détermination précise et complète de la composition en amino-acides des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache n'avait été réalisée. Nos résultats sont donc originaux. En effet, seuls existaient les résultats de SMITH et GREENE (331) et de SMITH, GREENE et BARTNER (332). Ils avaient été obtenus, en 1946, par des méthodes microbiologiques et ne portaient que sur 11 des 20 amino-acides constituant les globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache. Il convient toutefois de signaler que les valeurs de SMITH et al. sont très voisines de nos valeurs personnelles.

L'analyse de nos résultats montre que les globulines  $\gamma$ G colostrales sont, comme les globulines  $\gamma$ G, en général, relativement riches en acides aminés dicarboxyliques (23 p.100 g de protéine) et en hydroxy-amino-acides (17,25 g p. 100 g de protéine).

### 2° - Détermination des amino-acides N-terminaux

L'application de la méthode de dinitrophénylation (voir p. 87 ) a permis de démontrer que l'acide glutamique et l'acide aspartique se trouvaient en position N-terminale dans les proportions, respectivement, de 70,6 et de 29,4 p.100.

## Discussion

Ces résultats sont difficilement interprétables car le nombre de résidus de DNP-aspartique et de DNP-glutamique par mole de globulines  $\gamma$ G n'a pas été déterminé et on ne peut tirer aucune conclusion quant aux nombre de chaînes polypeptidiques présentes dans les molécules de globulines  $\gamma$ G. Cependant, ces résultats nets contrastent avec ceux que fournissent les globulines  $\gamma$ G sériques bovines où l'on caractérise 5 DNP-amino-acides dans des rapports molaires fragmentaires : DNP-alanine (0,09 à 0,12), aspartique (0,13 à 0,23), glutamique (0,06 à 0,15), sérine (0,09 à 0,14), valine (0,11 à 0,35) (DUQUESNE et al. (Communication personnelle) ; LAY et POLGLASE (333) ; Mc FADDEN et

SMITH (334) ; PORTER et PRESS (335)).

D - ETUDE DE LA NATURE DU POINT D'ATTACHE

GLYCANNE-PROTEINE

Nous avons abordé l'étude de la nature du point d'attache glucide-protéine dans les globulines YG du colostrum de Vache en utilisant la pronase, enzyme protéolytique isolé de Streptomyces griseus par NOMOTO et NARAHASHI (336) et en appliquant le protocole expérimental de YAMASHINA et IZUMI (337), modifié par MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (338).

Mode opératoire

5 g de globulines YG colostrales, dissous dans 1 l de solution d'acétate de calcium 0,01 M de pH 8, sont hydrolysés pendant 48 h à 37°C par 100 mg de pronase. Pendant toute la durée de l'hydrolyse, le pH est maintenu constant, par l'addition de soude 1 N, à l'aide d'un pH-stat Radiometer. L'hydrolysate, préalablement ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique concentré, est ramené à 50 ml par évaporation sous vide et additionné de 10 volumes d'éthanol absolu. Le précipité est de nouveau hydrolysé par la pronase dans les conditions précisées ci-dessus. Ce mode opératoire est répété deux fois encore.

Le précipité alcoolique obtenu après la quatrième digestion enzymatique est dissous dans 50 ml d'eau distillée et débarrassé des protéides par l'acide trichloracétique (concentration finale : 5 g p. 100 ml). La solution surnageante est purifiée par un passage sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex-50 x 8 ; mesh 25-50 ; forme acide ; 2 x 40 cm) et d'anions (Duolite-A40 ; mesh 25-50 ; forme formiate ; 2 x 40 cm). Le liquide effluent est lyophilisé.

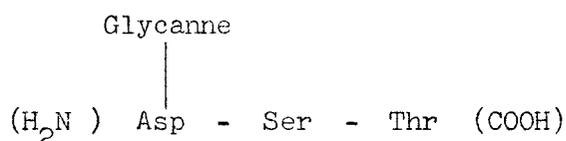
La poudre obtenue est dissoute dans 2 ml d'eau distillée et la solution est passée sur une colonne de Sephadex G 25. Des fractions de 5 ml sont recueillies, dont on détermine la teneur en oses



Nos résultats sont à rapprocher de ceux de DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL (Communication personnelle) qui ont isolé des hydrolysats pronasiques des globulines  $\gamma$ G du sérum de Vache un glycopeptide dont la composition en acides aminés est la suivante (pour 9 osamines) :

Acide aspartique	:	2
Sérine	:	2
Thréonine	:	2

et dont la structure s'écrit :



On voit que si notre hypothèse concernant la structure du glycopeptide obtenu à partir des globulines  $\gamma$ G colostrales se vérifiait, ces dernières posséderaient un point commun avec les globulines  $\gamma$ G sériques.

#### CONCLUSION

L'étude physico-chimique que nous avons effectuée sur les globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache nous a conduite à préciser la constante de sédimentation ( $S_{20w}$   $6,5 \pm 0,2$ ) et le poids moléculaire ( $132\ 600 \pm 5500$ ) de ces substances et à déterminer, pour la première fois, leur composition molaire en glucides et en acides aminés ainsi que la nature des acides aminés N-terminaux (aspartique et glutamique dans le rapport 7 : 3).

Nous avons, en outre, commencé l'exploration de la structure du groupement glycanique et montré que celle-ci se rattachait au schéma général de structure commun à de nombreux glycoprotéides d'origine animale : acides sialiques et fucose en position "externe", suivis du galactose et d'une partie de la glucosamine ; l'autre fraction de la glucosamine et le mannose, en position plus "interne" ;

présence de N-acétyllactosamine en position externe.

Enfin, l'hydrolyse pronasique nous a permis d'isoler un glycopeptide renfermant seulement de l'acide aspartique et de la sérine et qui présente des points communs avec un glycopeptide obtenu à partir des globulines  $\gamma$ G sériques.

5° - ETUDE COMPAREE DES GLOBULINES YG DU SERUM ET DU COLOSTRUM  
DE VACHE.

Nous avons vu dans le premier chapitre (p. 53) que l'origine des globulines immunes du lait et du colostrum restait encore, à l'heure actuelle, une énigme et que trois hypothèses pouvaient être envisagées :

- 1 - Transfert dans le lait ou le colostrum de globulines immunes sériques intactes.
- 2 - Transfert dans le lait ou le colostrum de globulines immunes sériques modifiées :
- 3 - Transfert dans le lait ou le colostrum de globulines immunes spécifiques synthétisées par le tissu mammaire lui-même.

Le problème a été abordé - chez différents Mammifères - par de nombreux auteurs, principalement à l'aide de l'électrophorèse et de l'immuno-électrophorèse. Il est évident que l'application de ces deux méthodes ne peut résoudre la question et qu'elles doivent être associées à des recherches physico-chimiques. C'est pourquoi, nous avons entrepris une étude comparative, à la fois, électrophorétique, immunologique et chimique, des globulines immunes du colostrum et du sérum de Vache. Nous en rapportons les résultats dans ce dernier chapitre.

## I - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOPHORETIQUE DES GLOBULINES $\gamma$ G

### SERIQUES ET COLOSTRALES.

L'application des méthodes d'électrophorèse et d'immuno-électrophorèse que nous avons décrites, plus haut (p. 91 et 104) à l'étude comparée des globulines  $\gamma$  G sériques et colostrales nous a apporté les résultats suivants.

#### A - RESULTATS

##### 1 - Etude électrophorétique.

L'électrophorèse en gélose et en gel d'amidon du colostrum et du sérum, d'une part, des globulines  $\gamma$  G du colostrum et du sérum, d'autre part, montre que le colostrum ne contient que la fraction "rapide"

(fraction anodique) des globulines  $\gamma$ G sériques. Les électrophorégrammes en gélose (Fig. 12 ; p. 117 ) et en gel d'amidon (Fig. 36 ; p. 212 ) sont à cet égard très démonstratifs.

## 2° - Etude immunophorétique

Les résultats que nous a apportés l'application des méthodes immunophorétiques peuvent se résumer de la manière suivante.

1 - L'arc de précipitation des globulines  $\gamma$ G colostrales est plus court que celui des globulines  $\gamma$ G sériques (Fig. 37 ; p. 213 ). Ce résultat confirme la nature "rapide" de ces composés.

2 - L'arc de précipitation des globulines  $\gamma$ G colostrales correspond à la bifidité cathodique interne de l'arc de précipitation des globulines  $\gamma$ G sériques.

Nous en apportons la démonstration de la manière suivante :

a - les comportements électrophorétiques de l'arc de précipitation "interne" donné par les globulines  $\gamma$ G sériques et colostrales sont identiques (Fig. 38 a)

b - l'épuisement de l'immunsérum de Lapin antiprotéides sériques bovines par une préparation de globulines  $\gamma$ G colostrales de Vache fait disparaître sélectivement la bifidité cathodique interne de l'arc de précipitation des globulines  $\gamma$ G sériques (Fig. 38 b)

## B - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos résultats confirment ceux qui ont été obtenus, par des démonstrations directes ou indirectes, par d'autres auteurs. Ils conduisent à la conclusion qu'il existe, dans la glande mammaire de la Vache, une diffusion sélective, vers le colostrum, d'une "population" de globulines  $\gamma$ G : les globulines  $\gamma$ G "rapides".

SMITH (340) et LARSON (341) ont démontré que, seules, les globulines  $\gamma$  "rapides" apparaissaient dans le sérum de Veau après



Figure 36

Electrophorèse en gel d'amidon horizontal (voir p. 96 ) de globulines YG sériques (S) et colostrales (C).

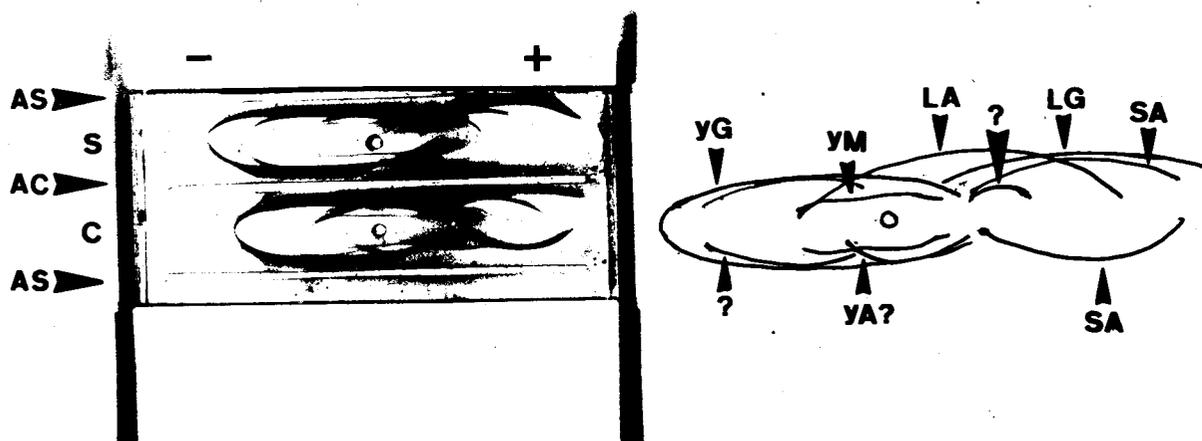


Figure 37

Diagrammes immunophorétiques de sérum (S) et de colostrum (C) de Vache.

AS ; AC : immunsérums de Lapin antiprotéides sériques (AS) et colostrales (AC) de Vache.

YG, YM, YA : respectivement, globulines  $\gamma$ G, YM et YA ;

LA : lactalbumine ; LG : lactoglobuline ; SA : sérum albumine.

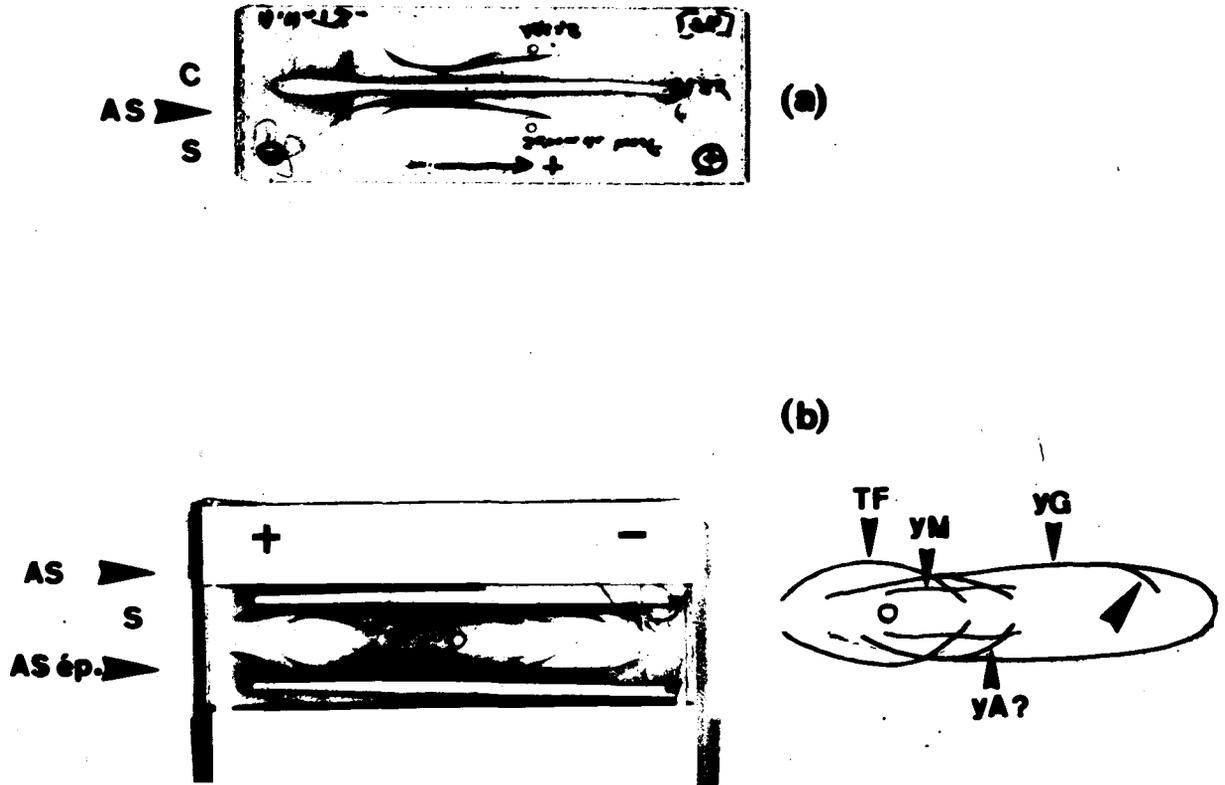


Figure 38

(a) Immuno-électrophorèse de globulines  $\gamma G$  sériques (S) et colostrales (C).  
 AS : immunsérum de Lapin antiprotéides sériques.

(b) Immuno-électrophorèse d'un sérum de Boeuf vis-à-vis d'un immunsérum de Lapin antiprotéides sériques (AS) et du même immunsérum épuisé par des globulines  $\gamma G$  colostrales (AS ép.). Dans ce dernier cas, la bifidité cathodique interne a disparu.

TF : transferrine ;  $\gamma G$ ,  $\gamma M$ ,  $\gamma A$  (?): globulines  $\gamma G$ ,  $\gamma M$  et  $\gamma A$  (?)

l'ingestion de colostrum.

En injectant à une vache du  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$  et en effectuant des prélèvements de sang et de lait après 3, 11 et 24 h d'incorporation, LARSON et GILLESPIE (342) ont montré que la caséine, la lactalbumine et la lactoglobuline possédaient une radioactivité spécifique nettement plus élevée que celles des globulines immunes du lait et que la radioactivité spécifique de ces dernières était identique à celle des globulines immunes du sérum. Ce résultat est en faveur d'une origine "sérique" des globulines immunes du lait.

Récemment, MURPHY, AALUND, OSEBOLD et CARROLL (343) ont soumis du sérum de Vache à la chromatographie sur DEAE-Sephadex (procédé de FAHEY, COY et GOULIAN) (344) et séparé deux fractions de globulines  $\gamma\text{G}$  qu'ils ont étudiées par électrophorèse et par immuno-électrophorèse. Les auteurs ont ainsi démontré que le premier pic d'éluion était constitué par des globulines  $\gamma\text{G}$  électrophorétiquement lentes, de  $S_{20w}$  6,5, tandis que le second pic renfermait des globulines  $\gamma\text{G}$  électrophorétiquement "rapides", de  $S_{20w}$  6,2. Le même protocole expérimental appliqué au colostrum de Vache fournit seulement le second pic de globulines  $\gamma\text{G}$  "rapides". L'étude immunophorétique de ces globulines conduit les auteurs comme nous-mêmes, à la conclusion que la bifidité cathodique de l'arc des globulines  $\gamma\text{G}$  sériques correspond aux deux groupes précédents de globulines  $\gamma\text{G}$  qui présenteraient des sites antigéniques différents.

On peut donc poser en hypothèse que les globulines immunes du colostrum de Vache proviennent des plasmocytes sanguins et que leur synthèse s'effectue probablement dans la glande mammaire elle-même qui présente, au début de la lactation, une plasmocytose intense (voir p. 55 ). Mais, quelle que soit l'origine des globulines immunes colostrales, "sérique" ou "mammaire", un transport sélectif de ces composés est réalisé par la glande mammaire. Seules, en effet, les globulines  $\gamma\text{G}$  "rapides" passent dans le colostrum, accompagnées par une faible quantité de globulines  $\gamma\text{G}$  "lentes", de globulines  $\gamma\text{M}$  et, peut-être, de globulines  $\gamma\text{A}$  (voir nos travaux et ceux de MURPHY, AALUND, OSEBOLD

et CARROLL) (345) ( \* ). Une "filtration" de ce genre n'a rien de surprenant et elle est réalisée par de nombreux Mammifères (voir p. 40 )

## II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE COMPAREE DES GLOBULINES $\gamma$ G SÉRIQUES

### ET COLOSTRALES

Parallèlement à nos travaux sur les globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache, des recherches ont été entreprises au laboratoire sur les globulines  $\gamma$ G du sérum de Vache. Nous avons rassemblés dans les tableaux XXXV (p. 196), XXXVI (p. 202 ) et XXXVII (p. 203 ) les résultats concernant l'étude de la composition centésimale et molaire des deux types de globulines  $\gamma$ G. En outre, nous avons décrit les résultats que nous ont apportés nos recherches sur la structure du groupement glycanique (p. 195 ) et sur les modalités de l'attache glucide-protéine (p. 205 ) dans les globulines  $\gamma$ G sériques et colostrales. Nous pouvons les résumer de la manière suivante:

1 - Les compositions centésimales en glucides sont différentes (Tableau XXXV ; p. 196 ). Les globulines  $\gamma$ G "rapides" du colostrum contiennent une proportion de glucides plus élevée que les globulines  $\gamma$ G sériques ("rapides" + "lentes") : 4 g de glucides totaux p.100 dans les premières; 2,5 g p.100 dans les secondes. Elles sont, en outre, plus riches en acides sialiques : 0,9 p.100 , en moyenne, contre 0,30 p.100 dans les globulines sériques.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux que

---

( \* ) Ces dernières ont été caractérisées uniquement par immuno-électrophorèse.

HEIDE et SCHMIDTBERGER (346) ont obtenus à propos des globulines  $\gamma$ G sériques humaines. Les auteurs ont isolé, par électrophorèse préparative, des fractions "lentes" et "rapides" de globulines  $\gamma$ G humaines et ont étudié leurs propriétés physico-chimiques. Ils ont montré que la teneur en glucides - principalement en acides sialiques - était plus élevée dans les globulines "rapides": 2,98 g de glucides totaux p.100 (0,18 d'acide sialique) dans les globulines "lentes" ; 3,77 g de glucides totaux p.100 (0,47 d'acide sialique) dans les globulines "rapides".

2 - Les compositions molaires en glucides sont, elles aussi, distinctes dans les globulines  $\gamma$ G colostrales et sériques (Tableau XXXVII ; p.203 ).

3 - Au contraire, aucune différence ne s'est manifestée, jusqu'à présent, dans les recherches sur la structure du glycanne. Dans les deux cas, les résultats de l'hydrolyse partielle sont identiques : libération préférentielle de l'acide sialique et du fucose, suivi du galactose et d'une partie de la glucosamine ; libération plus tardive du mannose et du reste de la glucosamine ; caractérisation de la N-acétyllactosamine, des deux mannobioses et du mannotriose.

4 - Les modalités de la liaison glucide-protéines semblent être les mêmes dans les globulines  $\gamma$ G colostrales et sériques.

5 - Au contraire, les compositions en acides aminés des globulines  $\gamma$ G colostrales et sériques présentent des différences significatives, dont les principales sont les suivantes (Tableau XXXVII ; p. 203 ).

a - Les unes portent sur des acides aminés "neutres" : phénylalanine, proline, thréonine, tryptophanne, valine et cystéine. Les différences dans les proportions molaires de ce dernier amino-acide sont, à notre avis, très importantes. En effet, en se fondant sur la présence en quantités sensiblement égales, dans le sérum, de globulines  $\gamma$ G "lentes" et "rapides", le calcul montre que les globulines  $\gamma$ G "lentes" renfermeraient, théoriquement, 46 résidus de cystéine, tandis que les globulines  $\gamma$ G "rapides" n'en renferment que 18.

Les recherches entreprises au laboratoire confirmeront peut-être cette hypothèse.

b - D'autres différences intéressantes portent sur les proportions relatives d'acides aminés dicarboxyliques et des acides aminés basiques. On voit, en effet, que les globulines  $\gamma$  G colostrales renferment - en supposant que les fonctions  $\beta$  et  $\gamma$  carboxyliques des acides aspartique et glutamique ne soient pas amidifiées - 121 charges négatives (241 résidus d'acides aminés dicarboxyliques et 4 résidus d'acides sialiques contre 124 résidus d'acides aminés basiques), tandis que les globulines  $\gamma$  G sériques ("lentes" + "rapides") n'en renferment que 66 (218 résidus d'acides aminés dicarboxyliques et 2 résidus d'acides sialiques contre 154 résidus d'acides aminés basiques). Ce résultat explique le caractère "anionique" marqué et le comportement électrophorétique des globulines  $\gamma$  G "rapides".

6 - La détermination des amino-acides N-terminaux a donné des résultats très nets puisque les acides DNP-aspartique et glutamique ont pu être identifiés sans ambiguïté tandis que, dans le cas des globulines  $\gamma$  G sériques, la nature des acides aminés N-terminaux est difficile à préciser puisque un mélange de 6 à 7 DNP-amino-acides sont caractérisés dans des proportions fragmentaires (voir p. 204 ).

#### CONCLUSIONS

L'étude physico-chimique comparée des globulines  $\gamma$  G du colostrum et du sérum de Vache révèle des différences très significatives qui expliquent les comportements électrophorétiques et immunophorétiques particuliers de ces deux sortes de composés. Des recherches plus poussées sont entreprises au laboratoire pour réaliser un meilleur fractionnement des globulines  $\gamma$  G des deux origines de manière à démontrer éventuellement l'identité de certaines fractions. Il sera à cet égard, intéressant de comparer les propriétés physico-chimiques des globulines "lentes" et "rapides" du sérum de Vache. Peut-être se manifestera alors une identité

parfaite entre les globulines  $\gamma$  G "rapides" du colostrum et du sérum qui prouvera l'origine "sérique" des premières. Il est évident qu'une telle étude comparative devra être entreprise sur le colostrum et sur le sérum de la même Vache - ce qui n'a pas été le cas dans nos recherches.

Cependant, bien que nos résultats soient encore fragmentaires, nous avons démontré que les globulines  $\gamma$  G "totales" du colostrum et du sérum de Vache sont physico-chimiquement différentes et que, seule, la fraction des globulines  $\gamma$  G "rapides" est présente dans le colostrum.

CONCLUSIONS GENERALES



Les conclusions générales auxquelles nous conduisent les résultats que nous avons obtenus sur les globulines immunes du colostrum de Vache sont les suivantes :

1 - L'étude cinétique des variations des principaux protéides du lactosérum de Vache, caséines, lactalbumine, lactoglobulines et globulines immunes, nous a permis de déterminer, pour la première fois, les quantités de chacun d'eux éliminées journallement et de préciser, par exemple, que le Veau recevait, par l'allaitement maternel, dans les 4 jours qui suivent le vêlage, 500 g environ de globulines immunes. D'un point de vue biologique, nos conclusions rejoignent celles de nombreux auteurs qui soulignaient la richesse des laits colostraux en globulines immunes et leur faible teneur en autres protéides. Le colostrum représente donc, jusqu'au 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour après le vêlage, le matériel de choix pour effectuer l'isolement des globulines immunes.

2 - L'étude immuno-électrophorétique du colostrum de Vache permet de caractériser des globulines  $\gamma G$  et  $\gamma M$ , la présence de ces dernières étant confirmée par l'existence d'un pic de sédimentation 18-20 S dans les diagrammes d'ultracentrifugation.

Un arc de précipitation de type  $\gamma A$  est visible sur certains immunophorégrammes, mais ce critère nous paraît insuffisant pour conclure à la présence de globulines  $\gamma A$  dans les laits colostraux de Vache. La confirmation ne pourra en être apportée qu'à la suite de l'isolement, non encore réalisé, de globulines  $\gamma A$  du sérum de Vache.

3 - L'application d'un procédé de relargage des protéides par un gradient de concentration en sulfate d'ammonium associé à un gradient de pH, nous a permis d'obtenir trois précipités dont nous avons effectué une analyse électrophorétique, immunoélectrophorétique,

ultracentrifugationnelle et chimique complète.

Le précipité  $P_1$  (tiers de saturation ; pH 7), le plus abondant, représente 60 à 75 p.100 des protéides totaux du lactosérum colostrale. Il est essentiellement - et parfois quantitativement - constitué de globulines  $\gamma G$ .

Le précipité  $P_3$  (tiers de saturation ; pH 3,8) (\*) est très complexe. Il renferme, en effet, outre la lactalbumine, la sérum-albumine et les lactoglobulines, de très faible quantité de globulines immunes et nous n'avons effectué aucune tentative pour réaliser l'isolement de ces dernières.

Le précipité  $P_4$  (demi-saturation ; pH 7), représente 7 à 13 p.100 des protéides totaux du lactosérum colostrale. Il renferme une proportion très importante de globulines immunes accompagnées d'une faible quantité de lactoglobulines et de lactalbumine.

4 - L'application de la chromatographie sur des colonnes de DEAE-cellulose à l'isolement ou à la purification des globulines immunes des précipités  $P_1$  et  $P_4$  a abouti à un fractionnement de ces dernières en de nombreuses "populations" différentes les unes des autres par leur composition en glucides, -principalement, en acides sialiques. Les globulines immunes du colostrum de Vache, comme leurs homologues sériques, sont donc très hétérogènes.

Cependant, la plus grande prudence doit être observée dans l'interprétation des résultats fournis par la chromatographie sur DEAE-cellulose. Celle-ci possède, en effet, une action dénaturante en provoquant des dimérisations ou des coupures des molécules de globulines qui se manifestent par l'apparition de constituants de constante de sédimentation 10 S et 3,5 S. En outre, on observe des ruptures des liaisons "sialyl" qui se traduisent par une diminution du taux des acides sialiques des globulines passées sur colonnes par

---

( \* ) Le précipité  $P_2$  (tiers de saturation ; pH 4,6) est inexistant.

rapport aux globulines natives (voir tableaux XXVII ; p. 166 et XXXI ; p. 181 ). En outre, la re-chromatographie sur DEAE-cellulose de "pics" homogènes obtenus par une première chromatographie sur le même support conduit à un nouveau "découpage" des composés. On peut donc se demander quelle est la part des artefacts dans la chromatographie des protéides sur DEAE-cellulose. C'est pourquoi nous avons renoncé à effectuer une étude poussée des fractions de globulines colostrales obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose et donné notre préférence aux fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium.

5 - La précipitation des laits colostraux dépourvus de globulines  $\gamma M$  par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et à pH 7 conduit à des préparations qui renferment, à l'état pur, 80 à 90 p.100 des globulines  $\gamma G$  du colostrum. Nous en avons effectué une étude physico-chimique complète dont les résultats sont originaux. Les principales caractéristiques des globulines  $\gamma G$  colostrales sont les suivantes :

Constante de sédimentation  $S_{20w}^{\circ}$  : 6,5 S

Poids moléculaire :  $132600 \pm 5500$

Oses neutres : 1,6 à 2,4 p. 100

Osamines : 0,9 à 1,19 p. 100

Acides sialiques : 0,65 à 1,03 p.100

Oses/Osamines : 1,61 à 2,12

Oses/Acides sialiques : 2,04 à 2,46

Acides aminés N-terminaux : Aspartique, Glutamique (3:7)

Pour la première fois, nous avons précisé la composition molaire en oses et en acides aminés des globulines  $\gamma G$  colostrales.

Le galactose, le mannose, le fucose, la N-acétylglucosamine et les acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques sont présents dans les rapports molaires suivants : 6 : 3 : 2 : 15 : 1,5 p. mole de globuline.

Le dosage des acides aminés montre que les globulines  $\gamma$ G colostrales de Vache sont, comme toutes les globulines  $\gamma$ G, relativement riches en acides aminés dicarboxyliques (23 g p. 100 g de protéine) et en hydroxy-amino-acides (17,25 g p. 100 g de protéine)

Enfin, nous avons abordé l'étude de la structure du groupement glycanique et du point d'attache de ce dernier avec la protéine :

L'étude de la cinétique de libération des glucides par hydrolyse ménagée montre que, dans les globulines  $\gamma$ G colostrales de Vache comme dans de nombreux autres glycoprotéides d'origine animale, l'acide sialique et le fucose se trouvent en position externe, suivi du galactose et d'une partie de la glucosamine ; l'autre fraction de cette dernière et le mannose sont en position plus interne. En outre, comme dans de nombreux glycoprotéides, la N-acétyllactosamine est présente dans le glycanne et est libérée dès le début de l'hydrolyse.

La détermination de la nature du point d'attache glycanne-protéine a été abordée par hydrolyse pronasique qui nous a conduite à l'isolement d'un glycopeptide qui contient seulement, associé au glycanne, de l'acide aspartique et de la sérine.

6 - Parallèlement à nos recherches sur les globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache, des travaux étaient effectués au laboratoire sur leurs homologues sériques. Une étude physico-chimique comparative montre qu'il existe des différences très nettes entre les deux types de globulines  $\gamma$ G :

a - Les globulines  $\gamma$ G colostrales sont plus riches en glucides (4 g p.100) que les globulines  $\gamma$ G sériques (2,5 g p.100). Elles contiennent aussi plus d'acides sialiques. En outre, les compositions molaires en glucides sont différentes.

b - Les compositions en acides aminés présentent des différences significatives qui portent principalement sur le nombre de résidus de cystéine (18 résidus dans les  $\gamma$ G colostrales ; 32 dans les  $\gamma$ G sériques) et sur les proportions relatives d'acides aminés dicarboxyliques (241 dans les  $\gamma$ G colostrales ; 218 dans les  $\gamma$ G sériques) et d'acides aminés basiques (124 dans les  $\gamma$ G colostrales ; 154 dans les  $\gamma$ G sériques).

7 - Ces résultats expliquent le caractère "anionique" marqué et le comportement électrophorétique particulier des globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache. Celles-ci, en effet, ne représentent que la fraction "rapide" des globulines immunes et l'arc de précipitation qu'elles fournissent correspond à la bifidité cathodique interne de l'arc de précipitation classique des globulines  $\gamma$ G sériques.

Nous apportons donc la démonstration que les globulines  $\gamma$ G du colostrum de Vache correspondent à la fraction "rapide" des globulines  $\gamma$ G sériques.

Pour démontrer qu'elles sont les globulines  $\gamma$  G sériques rapides - et que les globulines colostrales ont une origine sérique - des recherches physico-chimiques plus poussées doivent être entreprises sur les deux types de globulines isolées à partir du colostrum et du sérum de la même vache. Nous n'avons pas réalisé cette étude, car nos recherches ne devaient représenter qu'un travail d'approche. Nous espérons fermement, néanmoins, que nous avons nettement délimité le problème et bien précisé les points les plus importants sur lesquels porteront les explorations futures. En ce qui concerne ces dernières, nous apportons, en tout état de cause, les moyens de les entreprendre.

BIBLIOGRAPHIE

Les numéros entre parenthèses qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

- ALAIS C. , Sciences du lait et principes des techniques laitières,  
Sep. éd., Paris, 1961 (5, 6, 8, 9, 10, 26)
- ALAIS C. , Thèse Ing. Doct., Paris, 1962 (10, 26)
- ARCHIBALD, W.J. , Phys. Rev., 1938, 53, 746 (217)
- ARLOING, CORNEVIN et THOMAS, C.R. Acad. Sci., 1882, 94, 1396 (85)
- ASCHAFFENBURG R., J. Dairy Sci., 1956, 23, 135 (9)
- BAIN J.A. et DEUTSCH H.F., Arch. Biochem. , 1948, 16, 221 (147)
- BALFOUR W.E. et COMLINE R.S. , J. Physiol., 1961, 160, 234 (119, 122)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.N., Analyst., 1954, 79, 201  
(175, 195)
- BELL K. , Nature, 1962, 195, 705 (38)
- BISERTE G., Ann. Biol. Clin., 1955, p. 254 (157)
- BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, suppl. 3, 93 (212)
- BISERTE G., Les protéines du lait, in JAVILLIER et coll.,  
Biochimie Générale, 1, 900, Masson éd., Paris, 1959  
(8, 60)
- BISERTE G., Protéines du plasma, in JAVILLIER et coll., Biochimie  
Générale, 1, 862, Masson éd., Paris, 1959 (65)
- BISERTE G., Données récentes sur les protéines du lait ,  
Exp. Ann. Biochim. Méd., Masson éd., 1965 ( 8, 9)
- BISERTE G., BOULANGER P. et PAYSANT P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958,  
40, 2067 (204)
- BISERTE G., BRETON A. et FONTAINE G., Arch. Franc. Ped., 1955, 12,  
20 (244)

- BISERTE G., HAVEZ R., DAUTREVAUX M., LEROY N. et VALDIGUIE P.,  
Ann. Biol. Clin., 1962, 20, 855 (67, 266)
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P.,  
Chromatog. Rev., 1960, 2, 59 (208)
- BISERTE G., LATURAZE J. et HAVEZ R., Path. Biol., 1961, 9, 1673 (264)
- BISERTE G. et MASSE L., C.R. Soc. Biol., 1948, 142, 664 (243)
- BISERTE G. et MOSCHETTO Y., Communication personnelle (176, 193)
- BLOCK R.J., BOLLING D., WEISS K.W. et ZWEIG G., Arch. Biochem.  
Biophys., 1953, 47, 88 (37)
- BOYD W.C., The Proteins of Immune Reactions in NEURATH H. et BAILEY K.,  
The Proteins, 2B, 755, Academic Press, New York 1954 (65)
- BRAGG P.D. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11 (302)
- BRAMBELL, F.W.R., HEMMINGS W.A., OAKLEY C.L. et PORTER R.R., Proc.  
Roy. Soc., B. 151, 478 (96)
- BRIDGMANN, W.B., J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 657 (124)
- BRUNNER J.R. et THOMPSON M.P., J. Dairy Sci., 1961, 44, 1224 (47)
- Bulletin of the World Health Organization, 1964, 30, 447 (66, 75)
- BURCKHARDT A.E., Dtsch. Arch. klin. Med., 1879, 24, 506 (83)
- CAMMACK K.A., Nature, 1962, 194, 745 (272, 275)
- CAMPBELL B. et PETERSEN W.E., Dairy Sci. Abst., 1963, 25, 345  
(1, 88, 130)
- CAMPBELL B., PORTER R.M. et PETERSEN W.E., Nature, 1950, 166, 913  
(134)
- CAMPBELL B., SARWAR M. et PETERSEN W.E., Science, 1957, 125, 932 (133)
- CANTARUTTI F., Acta paediatr. Latena, 1954, 7, 198 (129)
- CHATTERJEE A.K. et MONTGOMERY R., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 99,  
426 (303)
- CHAUVEAU A., C.R. Acad. Sci., 1880, 91, 148 (84)
- CHERBULIEZ E. et MEYER F., Helv. Chim. Acta, 1933, 16, 600 (18)

- CHERBULIEZ E. et SCHNEIDER M.C., *Helv. Chim. Acta*, 1932, 15, 597 (18)
- CHOSSON A., MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., *C.R. Acad. Sci.*, 1962, 255,  
3261 (305)
- CLAMP J.R. et PUTNAM F.W., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 3233 (80)
- CLAUSEN J. et HEREMANS J.F., *J. Immunol.*, 1960, 84, 128 (222)
- COHEN S. et PORTER R.R., Structure and biological activity of  
immuno globulins, *Adv. Immunol.*, 1964, 4, 287 (65, 76, 284)
- COHN E.J., STRONG L.E., HUGHES W.L. Jr., MULFORD D.J., ASHWORTH J.N.,  
MELIN M. et TAYLOR H.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68,  
459 (72, 148)
- COMLINE R.S., ROBERTS H.E. et TITCHEN D.A., *Nature*, 1951, 167, 561;  
1951, 168, 84 (120)
- COTE R.H. et MORGAN W.T.J., *Nature*, 1956, 178, 1171 (315)
- COULSON E.J. et JACKSON R.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 97,  
378 (49)
- COULSON E.J. et STEVENS H., *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 355 (61, 63)
- COURTOIS J.E. et PERLES R., *Précis de Chimie Biologique*, 2, 589,  
Masson éd., Paris, 1960 (5)
- CRAVIOTO-MUNOZ J., JOHANSSON B. et SVENNERHOLM L., *Acta Chem. Scand.*,  
1955, 9, 1033 (7)
- CROWTHER C. et RAISTRICK H., *Biochem. J.*, 1916, 10, 434 (141, 225,  
230)
- DAUTREVAUX M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, 54, 1105 (203)
- DENT C.E. et SCHILLING M.A., *Biochem. J.*, 1949, 44, 324 (121)
- DERECHIN S.S. et JOHNSON P., *Nature*, 1962, 194, 473 (44)
- DEUTSCH H.E., *J. Biol. Chem.*, 1947, 169, 437 (56, 232, 241, 245)
- DEUTSCH H.F. et SCHMITH V.R., *Am. J. Physiol.*, 1957, 191, 271 (114)
- DISCHE Z., *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 439 (170)
- DUQUESNE N., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., *Communication personnelle*  
(326)

- EHRlich P., Z. Hyg. Infekt Kr., 1892, 12, 18 (98)
- ELSON H. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824 (174)
- ENGEL H. et SCHLAG H., Milchwirtschaft. Forsch., 1925, 2, 1  
(226, 231)
- EYLAR E.H. et JEANLOZ R.W., J. Biol. Chem., 1962, 237, 622 (296, 318)
- FAHEY J.L., Heterogeneity of  $\gamma$ -globulins, Adv. Immunol., 1962, 2, 42  
(65)
- FAHEY J.L. et HORBETT A.P., J. Biol. Chem., 1959, 234, 2645 (69, 267)
- FAHEY J.L., Mc COY P.F. et GOULIAN M., J. Clin. Invest., 1958, 37,  
272 (68, 344)
- FAMULEWER L.W., J. Infect. Dis., 1912, 10, 332 (100)
- FEINSTEIN A., Nature, 1963, 199, 1197 (255)
- FLEISCHMAN J.B., PORTER R.R. et PRESS E.M., Biochem. J., 1963, 88,  
220 (74)
- FONTAINE G., Les protides du lait, Thèse Méd., Lille, 1954 (8, 9, 246)
- FOSTER A.B., Adv. Carbohydrate Chem., 1957, 12, 81 (196)
- FOURESTIER M. et DE FOSSEY B.M., Dictionnaire des constantes  
biologiques, Maloine éd., Paris, 1943 (5)
- FRANKLIN E.C. et KUNKEL H.G., J. Lab. Clin. Med., 1958, 52, 724 (91)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207 (194 bis, 290)
- GARDELL S., HEJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta Chem. Scand.,  
1950, 4, 970 (194)
- GARNIER J., Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 1964, 4, 163 (8, 52)
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1962, 82, 32 P. (178)
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1963, 89, 380 (181)
- GITLIN D., ROSEN F.S. et MICHAEL J.G., Pediatrics, 1963, 31, 197 (91)
- GORDON W.G., BASCH J.J. et KALAN E.B., J. Biol. Chem., 1961, 236,  
2908 (36, 40)

- GORDON W.G., GROVES M.L. et BASCH J.J., *Biochemistry*, 1963, 2, 817 (43)
- GORDON A., KEIL B. et SEBESTA K., *Nature*, 1949, 164, 498 (211)
- GOTTSCHALK A., *Yale J. Biol. Med.*, 1956, 28, 525 (186)
- GRABAR P. et BURTIN P., *Immuno-electrophoretic Analysis*  
Elsevier éd., Amsterdam 1964 (65)
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193  
(221)
- GRASSMAN W. et HANNIG K., *Angew. Chem.*, 1950, 62, 170 ; *Naturwissenschaften*, 1950, 37, 496 (209)
- GRÖNWALL A., *Nature*, 1947, 159, 376 (229)
- GROVES M.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3345 (12, 13, 40, 42, 46)
- GROVES M.L., BASCH J.J. et GORDON W.G., *Biochemistry*, 1963, 2, 814  
(13, 46)
- GUGLER E., BEIN M. et MURALT G. von, *Schweiz. med. W.*, 1959, 89, 117  
(261)
- GUTFREUD H., *Trans. Faraday Soc.*, 1954, 50, 628 (278, 281)
- HAMMARSTEN O., *Z. physiol. Chem.*, 1883, 7, 227 (15, 27, 137)
- HANSEN R.G. et CARLSON D.M., *J. Dairy Sci.*, 1956, 39, 663 (169)
- HANSEN R.G. et PHILLIPS P.H., *J. Biol. Chem.*, 1947, 171, 223  
(112, 116, 128, 131)
- HANSEN R.G., POTTER R.L. et PHILLIPS P.H., *J. Biol. Chem.*, 1947, 171,  
229 (168)
- HANSON L.A., *Experientia*, 1959, 15, 471 (223, 259)
- HANSON L.A., *Immunological Studies of Human Milk with Special  
Reference to the Immune Globulins*, Gothenburg, 1961  
(95, 252)
- HANSON L.A. et JOHANSSON B., *Experientia*, 1959, 15, 37 (135)
- HANSON L.A. et JOHANSSON B., *Experientia*, 1959, 15, 377 (260)
- HAVEZ R., BISERTE G., LEROY N., LATURAZE J. et BONIFACE L., *Path.  
Biol.*, 1961, 9, 1689 (268)

- HEIDE K., Kolloid-Z., 1956, 146, 52 (280)
- HEIDE K., Bibl. haemat., 1961, 12, 245 (71)
- HEIDE K., HAUPT H. et SCHMIDTBERGER R., Behringwerk-Mitteil., 1959, Heft 37, 29 (346)
- HEIMBURGER N., HEIDE K., HAUPT H. et SCHULTZE H.E., Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 293 (73)
- HERALD C.T. et BRUNNER J.R., J. Dairy Sci., 1957, 40, 948 (47)
- HEREMANS J.F., Les Globulines sériques du Système Gamma, Arscia éd., Bruxelles 1960 (65)
- HEYNDRICKS G.V., Ann. Paediatr., 1962, 198, 356 ; Pediatrics, 1963, 31, 1019 (53)
- HEYNDRICKX G.V. et DE VLEESCHAUWER A., Biochim. Biophys. Acta, 1951, 6, 487 (59, 254, 256)
- HEYNDRICKX G.V. et DE VLEESCHAUWER A., Experientia, 1952, 8, 317 (59, 237)
- HEYNDRICKS G.V. et DE VLEESCHAUWER G.V., Bull. Soc., Chim. Biol., 1952, 34, 1016 (59)
- HILPERT H. et ENKELMANN D., Milchwissenschaft, 1963, 18, 109 (154)
- HIRANO G., HOFFMAN P. et MEYER K., Fed. Proc., 1960, 19, 146 (321)
- HITZIG W.H., Helv. Paediat. Acta, 1957, 12, 596 ; 1961, 16, 46 ; in GRABAR P. et BURTIN P., Analyse immunophorétique, Masson éd., Paris, 1960, p. 121 et Immunophoretic Analysis, Elsevier éd., Amsterdam, 1964, p. 125 (91, 94, 97)
- HOEGYES A., Ann. Inst. Pasteur, 1889, 3, 429 (87)
- HOREJSI J. et SMETANA R., Acta Med. Scand., 1956, 155, 65 (150)
- HOWE P.E., J. Biol. Chem., 1921, 49, 115 ; 1922, 52, 51 ; 1922, 53, 479 ; J. Exp. Med., 1924, 39, 313 (103, 104, 107)
- HUFELAND C.W., III Aufl. Wien , Ann., 1799, p.19, cité dans NEUMANN Dtsch. med. Wschr., 1895, 21, 841 (82)
- HUGUES W., Interstitial proteins : the proteins of blood plasma and lymph, in NEURATH H. et BAILEY K., The Proteins, 2 B, 663. Academic Press, New York, 1954 (65)

- HYTTEN F.E., Brit. Med. J., 1954, 175, 249 (242)
- IKAWA M. et SNELL E.F., J. Biol. Chem., 1955, 236, 146 (205 bis)
- JACKSON R.H., COULSON E.J. et CLARK W.R., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 97, 373 (48)
- JAMESON E., ALVAREZ-TOSTADO C. et SORTOR H.H., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1942, 51, 163 (113, 117, 118)
- JAYLE M.F., Conférence, Club français des Mucopolysaccharides, Paris, avril 1964 (309)
- JEANLOZ R.W., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 303 (297)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402 (190)
- JOLLES P., ALAIS C., ADAM A., DELFOUR A. et JOLLES J., Chimia, 1964, 18, 357 (29)
- JOURNET M. et JARRIGE R., Ann. Zootechnie, 1960, 9, 133 (235)
- KALAN E.B., GORDON N.G., BASCH J.J. et TOWNEND R., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 96, 376 (39)
- KAMIYAMA S. et SCHMID K., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 58, 80 ; 1962, 63, 266 (310)
- KARLIN R., Ann. Nutr. Alim., 1960, 14, 53 (6)
- KENYON A.J., ANDERSON R.K. et JENNESS R., J. Dairy Sci., 1959, 42, 133 (149, 153)
- KITASATO S., Z. Hyg. Infekt Kr., 1890, 8, 55 (86)
- KLEMPERER F., Arch. exp. Path. Pharmak, 1893, 31, 356 (99)
- KOENIG V.L. et PEDERSEN K.O., Arch. Biochem., 1950, 25, 97 (282)
- KOIW E. et GRONWALL A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, 4, 244 (213)
- KON S.K. et COWIE A.T., Milk, Academic Press éd., New York, 1961 (8, 64)
- KRAMM D.E. et KOLB C.L., Anal. Chem., 1955, 27, 1079 (214)
- KUHN R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297 (2)
- KUHN R. et EKONG D., Chem. Ber., 1963, 96, 683 (30)

- KUHN R. et KIRCHENLOHR W., Chem. Ber., 1954, 87, 384 et 560 (314)
- KUNKEL H.G., Macroglobulins and High Molecular Weight Antibodies, in The Plasma Proteins, 1, 279, Academic Press, New York, 1960 (65)
- KUTTNER A. et RATNER B., Am. J. Diseases Children, 1923, 25, 413 (89)
- LARSON B.L., J. Dairy Sci., 1958, 41, 1033 (341)
- LARSON B.L. et GILLESPIE D.C., J. Biol. Chem., 1957, 227, 565 (342)
- LARSON B.L. et KENDALL K.A., J. Dairy Sci., 1957, 40, 377 (239)
- LARSON B.L., ROLLERI G.D. et KENDALL K.A., J. Dairy Sci., 1956, 39, 204 (240)
- LASKOWSKI M. Jr. et LASKOWSKI M., J. Biol. Chem., 1951, 190, 653 (51)
- LAY W.P. et POLGLASE W.J., Can. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 39 (333)
- LEVY G.A. et Mac ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127 (197)
- LEVY A.L., Nature, 1954, 193, 1087 (205)
- LEVY G. et POLONOVSKI J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1293 (222bis)
- LINDERSTRØM-LANG K., C.R. Trav. Lab. Carlsberg, 1929, 17, n° 9 (28, 258)
- LINDERSTRØM-LANG K. et KODAMA S., C.R. Trav. Lab. Carlsberg, 1925, 16, n° 1 (17)
- LING E.R., KON S.K. et PORTER J.W.G., The composition of milk and the nutritive value of its components, in KON S.K. et COWIE A.T., Milk, 2, 195, Academic Press éd., 1961 (4, 5, 6)
- LITTLE R.B. et ORCUTT M.L., J. Exp. Med., 1922, 35, 161 (109)
- LONG J., van WINKLE Q. et GOULD I.A., J. Dairy Sci., 1958, 41, 317 (23)
- Mc FADDEN M.L. et SMITH E.L., J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2784 (334)
- Mc MEEKIN T.L., J. Milk and Food Technol., 1952, 15, 57 (236)

- Mc MEEKIN T.L., Milk proteins, in NEURATH H. et BAILEY K., The proteins, 2A, 389, Academic Press éd., New York, 1954 (8, 11)
- Mc MEEKIN T.L., HIPP N.J. et GROVES M.L., Arch. Biochem. Biophys., 1959, 83, 35 (22, 25)
- MACY I.G., KELLEY H. et SLOAN R., Bull. Natl. Research Council, 1950, 119 (233)
- MARLER E., NELSON C.A. et TANFORD C., Biochemistry, 1964, 3, 279 (273)
- MASAMUNE H., Compt. Rend. 3ème Congr. Intern. Biochim., Bruxelles, 1955, 72 (316)
- MASON J.N., DALLING T. et GORDON W.S., J. Path. Bact., 1930, 33, 783 (111)
- MELLANDER O., Biochem. Z., 1939, 300, 240 (20)
- MESTER L., MOCZAR E., MEDGYESI G. et LAKI K., C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 3210 (308)
- MHATRE N.S., LEEDER J.C. et WOGAN G.N., J. Dairy Sci., 1962, 45, 717 (156)
- MICHON J. et BOURRILLON R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 277 (293)
- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, suppl. 3, 3 (187)
- MONTREUIL J., Les phosphoproteides, in JAVILLIER et al., Traité de Biochimie Générale, 1, 1003, Masson éd., Paris 1959 (9)
- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 12, 1399 (3)
- MONTREUIL J. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 959 (182)
- MONTREUIL J., BISERTE G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 3372 (338)
- MONTREUIL J. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3071 (294, 304)
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAYEZ R. et MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 732 (264bis)

- MONTREUIL J. et MOLLET S., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 368 (247)
- MONTREUIL J., CHOSSON A. et SPIK G., Bull. Soc. Chim. Biol. (sous presse) (81, 295, 307, 312, 323)
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 13 (188, 192, 292)
- MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosage des Glucides, Fascicule 1 : Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux, Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, éd., 1963 (179, 185)
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493 (298, 306, 311, 319, 322)
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413 (45)
- MORRIS I.G., Proc. Roy. Soc., 1963, B157, 160 (127)
- MULDER G.J., Ann. Pharm., 1838, 28, 73 (14)
- MUNIER R., Communication personnelle
- MURALT G. von, GUGLER E. et ROULET D.L.A., in PEETERS H., Protides of the Biological Fluids, 8th Colloquium 1960, Elsevier éd., Amsterdam, 1961, p. 166. (253)
- MURALT G. von, GUGLER E. et ROULET, D.L.A., Immuno-Electrophoretic studies of the Proteins of Human milk and colostrum, in GRABAR P. et BURTIN P., Immunophoretic Analysis, Elsevier éd., Amsterdam, 1964, p. 261 (95)
- MURPHY F.A., AALUND O., OSEBOL D.J.W. et CARROLL E.J., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 108, 230 (161, 343, 345)
- NARDUCCI U. et PALAZZETTI P., Minerva ginec., 1955, 7, 427 (248)
- NOLAN C. et SMITH E.L., J. Biol. Chem., 1962, 237, 453 (79, 165, 169bis, 287, 289, 291, 330, 339)
- NOMOTO M. et NARAHASHI Y., J. Biochem., 1959, 46, 839 (336)
- NORDBRING F., Acta Soc. Med. Upsalien., 1957, 62, 113 (249)
- ORCUTT M.L. et HOWE P.E., J. Exp. Med., 1922, 36, 291

- OSBORNE T.B. et WAKEMAN A., J. Biol. Chem., 1918, 33, 7 (16)
- OSSERMAN E.F., J. Immunol., 1959, 84, 93 (224bis)
- OUCHTERLONY Ö., Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1949, 26, 507 (221bis)
- PAIN R.H., Biochem. J., 1963, 88, 234 (274)
- PARRISH D.B., WISE G.H., HUGUES J.S. et ATKESON F.W., J. Dairy Sci., 1950, 33, 457 (234)
- PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238 (189)
- PARTRIDGE S.M., Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52 (191)
- PAYNE L.C. et MARSH C.L., Federation Proc., 1962, 21, 909 (120)
- PEDERSEN K.O., Biochem. J., 1936, 30, 948 (32, 35, 155, 163)
- PESKETT G.L. et FOLLEY S.J., J. Dairy Research, 1932, 4, 279 (55)
- PETERMAN M.L., J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 106 (123)
- PETERSON E.A. et SOBER H.A., Anal. Chem., 1954, 31, 857 (206)
- PETERSON E.A. et SOBER H.A., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 751 (263, 269)
- PHELS R.A. et CANN J.R., Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 149 (283)
- PIEZ K.A., DAVIE E.W., FOLK J.E. et GLADNER J.A., J. Biol. Chem., 1961, 236, 2912 (36)
- PIEZ K.A. et MORRIS L., Anal. Biochem., 1960, 1, 187 (202)
- POLIS D., SHMUKLER A.W. et CUSTER J.H., J. Biol. Chem., 1950, 187, 349 (62)
- POORTMANS J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 40 (224)
- PORTER R.R., Biochem. J., 1950, 46, 479 (125)
- PORTER R.R., Nature, 1958, 182, 670 (126)
- PORTER R.R. et PRESS E.M., Biochem. J., 1957, 66, 600 (335)

- PORTER R.R.,  $\gamma$ -Globulin and Antibodies, in PUTNAM F.W., The plasma Proteins, 1, 241, Academic Press, éd., New York, 1960 (65, 271)
- POULIK M.D., Nature, 1957, 180, 1477 (216)
- PREAUX G. et LONTIE R., Compt. Rendus F.N.R.S., 1956 (158, 160)
- PUTNAM F.W., Structure and function of the plasma proteins, in NEURATH H. ; The Proteins, 3, 153, Academic Press éd., New York, 1965 (65, 270)
- PUTNAM F.W. et UDIN B., J. Biol. Chem., 1952, 202, 727 (285)
- PYNE G.T., Dairy Sci. Abstr., 1955, 17, 131 (9)
- RATNER B., JACKSON H.C. et GRUEHL H.L., J. Immunol., 1927, 14, 275 (102)
- REISSIG J.L., STROMINGER J.L. et LELOIR L.F., J. Biol. Chem., 1955, 217, 959 (198)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062 (172)
- ROSEVEAR J.W. et SMITH E.L., J. Biol. Chem., 1961, 236, 425 (77, 78)
- ROWLAND S.J., J. Dairy Res., 1937, 8, 6 (54)
- ROWLAND S.J., J. Dairy Research, 1938, 9, 42 (257)
- SAGER C.A., Mschr. Kinderheilk, 1959, 107, 402 (250)
- SAUTIERE M., Etude des béta-2A-Globulines du sérum sanguin, Thèse de Médecine, Lille, 1962 p. 60 (93, 94)
- SCHEIDEGGER J.J., Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103 (220)
- SCHEIDEGGER J.J. et MARTIN DUPAN R., Et. Néo-Natales, 1957, 6, 135 (92)
- SCHNEIDER L. et SZATHMARY J., Z. Immun. Forsch., 1938, 94, 438 (101)
- SCHULTZE H.E., Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 610 (70)
- SCHULTE K.E. et MULLER F., Milchwissenschaft, 1954, 9, 375 (251)
- SEBELIEN J., Z. Physiol. Chem., 1885, 9, 445 ; 1895, 20, 443 (31,138)

- SINGER S.J., Structure and function of antigen and antibody proteins, in NEURATH H., *The Proteins*, 3, 269, Academic Press éd., 1965 (65)
- SMID K., Mc NAIR M.B. et BÜRGI A.F., *J. Biol. Chem.*, 1959, 230, 859 (265)
- SMITH E.L., *J. Biol. Chem.*, 1946, 164, 345 (142, 143, 144, 145, 227)
- SMITH E.L., *J. Biol. Chem.*, 1946, 165, 665 (57, 146, 151, 152, 228)
- SMITH E.L., *J. Biol. Chem.*, 1946, 165, 675 (162, 276, 277 )
- SMITH E.L., *J. Dairy Sci.*, 1948, 31, 127 (142, 340)
- SMITH R.T., *Ped. Clin. North America*, 1960, 7, 2269 (93)
- SMITH T., *J. Exp. Med.*, 1925, 41, 81 (120)
- SMITH E.L. et BROWN D.M., *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 241 (279)
- SMITH E.L. et GREENE R.D., *J. Biol. Chem.*, 1947, 171, 355 (166, 324, 327, 331)
- SMITH E.L., GREENE R.D. et BARTNER E., *J. Biol. Chem.*, 1946, 164, 359 (164, 167, 286, 288, 325, 328, 332)
- SMITH T. et LITTLE R.B., *J. Exp. Med.*, 1922, 36, 181 ; 1923, 37, 671; 1924, 39, 303 (108)
- SMITHIES O., *Biochem. J.*, 1955, 61, 629 ; in *Adv. in Protein Chemistry*, p. 65, Academic Press, 1959 (215)
- SONNET J., *Les Glycoprotéides sériques à l'état normal et pathologique*, Thèse, Bruxelles 1956, Arscia éd., (299)
- SØRENSEN M. et SØRENSEN S.P.L., *C.R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1939, 23, n° 7 (41)
- SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S., *Anal. Chem.*, 1958, 30, 190 (201)
- SPIES J.R. et CHAMBERS D.C., *Anal. Chem.*, 1949, 21, 1249 (207)
- SPIK G. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 739 (173)

- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 382 (301, 320)
- STANLEY W.G., WITNAH C.H. et ANDREWS A.C., J. Dairy Sci., 1950, 33, 275 ; 1951, 34, 265 (58)
- STAUB A.M. et RAYNAUD M., Cours d'immunologie générale et de sérologie de l'Institut Pasteur, C.D.V. éd., 5 Place de la Sorbonne, Paris (5e), 1964 (65)
- von STECK F.T., Schweiz. Arch. Tierheil., 1962, 104, 532 (262)
- von STECK F.T., Schweiz. Arch. Tierheil., 1962, 104, 593 (105, 115, 262)
- SVEDBERG T., Nature, 1937, 139, 1051 (34)
- SVEDBERG T., CARPENTER L.M. et CARPENTER D.C., J. Am. Chem. Soc., 1930, 52, 241 et 701 (19)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154 (199, 200)
- THEORELL Å. et ÅKESON Å., Arkiv. Kemi, Mineral. Geol., 1943, 17B, n° 7, 1 (50)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36 (171)
- TOMARELLI R.M., HASSINEN J.B., ECKHARDT E.R., CLARK R.H. et BERNHART F.W., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 225 (317)
- TOWNEND R., Arch. Biochem. Biophys., 1965, 109, 1 (36)
- TRAUTMAN R., J. Phys. Chem., 1956, 60, 1211 (218)
- TRAUTMAN R. et CRAMPTON C.F., J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 4036 (219)
- TURK J.L., Nature, 1959, 183, 839 (106)
- VALQUIST B., Advan. Pediat., 1958, 10, 305 (90)
- WAITE R. et WHITE J.C.D., J. Dairy Res., 1956, 23, 65 (238)
- WARREN L., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1971 (180, 184)
- WASSERMANN A., Z. Hyg. Infektkr., 1894, 18, 235 (139)

- WAUGH D.F. et HIPPEL P.H. von , J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 4576  
(21, 24)
- WERNER J. et ODIN L., Acta. Soc. Med. Upsaliensès, 1952, 57, 230  
(177, 183)
- WICHMANN A., Z. physiol. Chem., 1899, 27, 575 (33)
- WINZLER R.J., in : Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and  
Biology of Mucopolysaccharides, 1958, p. 245 (300)
- WORK T.S., CAMPBELL P.N. et ASKONAS B.A., Symposium sur la biogenèse  
des Protéines, IIème Congrès international de  
Biochimie. Paris, 1952 (132, 136)
- YAGUCHI M., TARASSUK N.P. et HUNZIKER H.G., J. Dairy Sci., 1961, 44,  
589 (159)
- YAMASHINA I. et IZUMI K., in EGAMI F. et OSHIMA Y., Biochemistry  
and Medicine of Mucopolysaccharides, Maruzen éd.,  
Tokyo, 1962, 39 (337)
- YOSIZAWA Z., Tohoku J. Exp. Med., 1949, 51, 51 ; 1950, 52, 145 (313)
- ZWEIG G. et BLOCK R.J., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 51, 200 (37)

