

50376  
1979  
130

50376  
1979  
130

N° d'ordre : 783

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# MEMOIRE

présenté à l'UNIVERSITÉ DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE**

**SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE**

par

Annick CRETEL



**STRUCTURE DE 14 GLYCANNES DES SIGA DU LAIT DE FEMME  
COMPARAISON AVEC LES IGA SÉRIQUES HUMAINES**

Soutenu le 19 Octobre 1979, devant la Commission d'Examen

Président	J. MONTREUIL
Rapporteur	G. SPIK
Examineurs	G. BISERTE
	A. CAPRON
	G. STRECKER
	B. FOURNET



Ces travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire associé au C.N.R.S. No. 217 "Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués" - Professeur Jean MONTREUIL), sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK, Maître de Conférence.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 4
<u>I - PREPARATION DES sIgA</u>	p. 7
<u>II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES sIgA</u>	p. 8
A - PROPRIÉTÉS PHYSIQUES	p. 8
B - PROPRIÉTÉS CHIMIQUES	p. 8
<u>III - ETUDE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DES sIgA</u>	p. 9
A - ÉTUDE DES CHAÎNES LÉGÈRES	p. 9
1 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	p. 9
2 - ETUDE STRUCTURALE	p. 12
a - <u>Etude de la chaîne peptidique</u>	p. 12
b - <u>Etude de la chaîne glucidique</u>	p. 13
c - <u>Mode de liaison des chaînes légères aux chaînes lourdes</u>	p. 16
3 - ROLE DES CHAINES LEGERES	p. 16
B - ÉTUDE DES CHAÎNES LOURDES	p. 18
1 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	p. 18
2 - ETUDE STRUCTURALE	p. 18
a - <u>Etude de la chaîne peptidique</u>	p. 18
b - <u>Etude de la partie glycanique</u>	p. 22
3 - ROLE DES CHAINES LOURDES	p. 29
a - <u>Rôle de la partie peptidique</u>	p. 29
b - <u>Rôle de la partie glycanique</u>	p. 31

C - ÉTUDE DE LA PIÈCE DE SÉCRÉTION	p. 31
1 - PREPARATION DE LA PIECE DE SECRETION	p. 33
a - <u>Préparation de la pièce de sécrétion libre</u>	p. 33
b - <u>Préparation de la pièce de sécrétion liée</u>	p. 34
2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	p. 34
a - <u>Propriétés physiques</u>	p. 34
b - <u>Propriétés chimiques</u>	p. 34
3 - ETUDE DES DETERMINANTS ANTIGENIQUES DE LA PIECE DE SECRETION	p. 36
4 - ROLE DE LA PIECE DE SECRETION	p. 38
D - ÉTUDE DE LA PIÈCE DE JONCTION	p. 38
1 - PREPARATION DE LA CHAINE DE JONCTION	p. 40
2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	p. 41
a - <u>Propriétés physiques</u>	p. 41
b - <u>Propriétés chimiques</u>	p. 41
3 - ETUDE STRUCTURALE	p. 44
4 - ROLE DE LA PIECE DE JONCTION	p. 44
E - CONCLUSION	p. 48
1 - MODELE DE TOMASI ET BIENENSTOCK	p. 48
2 - MODELE DE HEREMANS	p. 48
<u>IV - CONFORMATION DES IMMUNOGLOBULINES</u>	p. 50
A - NOTION DE DOMAINE	p. 50
1 - CONCEPT DE BASE	p. 50
2 - DEFINITION DES DOMAINES	p. 52
B - MISE EN ÉVIDENCE DES DOMAINES	p. 53
1 - METHODE BIOLOGIQUE	p. 53
2 - METHODE CHIMIQUE	p. 53

3 - METHODES PHYSIQUES	p. 53
a - <u>Dichroïsme circulaire (D.C.) et dispersion optique rotatoire (D.O.R.)</u>	p. 53
b - <u>Microscopie électronique</u>	p. 54
c - <u>Diffraction aux rayons X</u>	p. 54
C - CONTACTS INTER-DOMAINES	p. 58
D - RÔLE DES DOMAINES	p. 58
1 - ROLE DES DOMAINES DE LA REGION VARIABLE	p. 61
2 - ROLE DES DOMAINES DE LA REGION CONSTANTE	p. 61
E - CONCLUSION	p. 62
V - <u>BIOSYNTHESE DE LA MOLECULE D'IgA DE SECRETION</u>	p. 63
A - ORIGINE DES IMMUNOBLASTES	p. 63
B - FORMATION DE LA MOLECULE D'IMMUNO- GLOBULINE	p. 63
C - FORMATION DE LA MOLECULE DE sIgA	p. 65
VI - <u>ROLE BIOLOGIQUE DES sIgA</u>	p. 67
VII - <u>CONCLUSION</u>	p. 70
MATERIELS ET METHODES	p. 71
I - <u>PREPARATION ET ANALYSE DES IgA</u>	p. 72
A - PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM	p. 72

B - PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	p. 73
1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE QAE-SEPHADEX	p. 73
2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SP-SEPHADEX	p. 73
3 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ULTROGEL AcA <sub>44</sub>	p. 75
C - CONTRÔLE DE L'HOMOGENÉITÉ DES PRÉPARATIONS D'IgA	p. 75
1 - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE	p. 75
2 - IMMUNOELECTROPHORESE SUR GELOSE	p. 75
II - <u>ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES IgA</u>	p. 76
A - COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION	p. 76
1 - PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE	p. 76
2 - PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR COUCHE MINCE	p. 76
B - MASSE MOLÉCULAIRE	p. 76
C - COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS	p. 76
D - COMPOSITION EN GLUCIDES	p. 77
1 - COMPOSITION CENTESIMALE	p. 77
2 - COMPOSITION MOLLAIRE	p. 77
III - <u>PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES</u>	p. 77
A - ISOLEMENT DE LA "HINGE REGION"	p. 77
1 - HYDROLYSE TRYPSIQUE ET PEPSIQUE DES sIgA	p. 77
a - <u>Principe</u>	p. 77
b - <u>Mode opératoire</u>	p. 78
2 - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE-PEPSIQUE DES IgA	p. 78

B - PRÉPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES	p. 79
1 - HYDROLYSE PRONASIQUE	p. 79
2 - PURIFICATION DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE	p. 79
3 - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES	p. 80
a - <u>Par chromatographie d'échanges d'ions</u>	p. 80
b - <u>Par électrophorèse sur papier</u>	p. 80
C - PRÉPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES	p. 81
1 - ACTION DE LA SOUDE ET REDUCTION	p. 81
2 - SEPARATION DES GLYCANNES REDUITS	p. 82
a - <u>Chromatographie de gel filtration</u>	p. 82
b - <u>Chromatographie sur échangeurs d'ions</u>	p. 82
c - <u>Chromatographie de partage</u>	p. 82
IV - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ET DES GLYCANNES REDUITS</u>	p. 83
<u>DES sIgA</u>	
A - COMPOSITION MOLLAIRE EN ACIDES AMINÉS ET EN GLUCIDES	p. 83
B - ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES DES IgA	p. 83
1 - METHYLATION	p. 83
a - <u>Préparation du sulfinylcarbanion</u>	p. 83
b - <u>Méthylation</u>	p. 84
c - <u>Analyse chromatographique en phase gazeuse</u>	p. 85
2 - SPECTROMETRIE DE MASSE	p. 85
3 - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION	p. 86
a - <u>Hydrazinolyse et diazotation</u>	p. 86
b - <u>Méthylation</u>	p. 87
c - <u>Analyse chromatographique en phase gazeuse</u>	p. 87
4 - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	p. 87



## RESULTATS

p. 89

### I - PREPARATION ET ANALYSE DES sIgA

p. 90

#### A - PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

p. 90

#### B - PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub>

p. 90

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE QAE-SEPHADEX

p. 90

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SP-SEPHADEX

p. 90

3 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ULTROGEL AcA<sub>44</sub>

p. 91

#### C - CONTRÔLE DE L'HOMOGENÉITÉ DES PRÉPARATIONS D'SIgA

p. 91

1 - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE

p. 91

2 - IMMUNOELECTROPHORESE SUR GELOSE

p. 91

3 - CONCLUSION

p. 94

### II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES sIgA

p. 94

#### A - COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION

p. 94

1 - PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

p. 94

2 - PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION  
SUR COUCHE MINCE

p. 94

#### B - MASSE MOLÉCULAIRE

p. 96

#### C - COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

p. 96

#### D - COMPOSITION EN GLUCIDES

p. 96

III - <u>PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES</u>	p. 98
A - ISOLEMENT DE LA "HINGE REGION"	p. 98
1 - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT PROTEASIQUE DES IgA	p. 98
2 - ETUDE DES DIFFERENTS PICS OBTENUS	p. 101
a - <u>Composition en acides aminés</u>	p. 101
b - <u>Composition centésimale et molaire en glucides</u>	p. 101
3 - DETERMINATION DU TYPE DE LIAISON DANS LES DIFFERENTS PICS	p. 104
B - PRÉPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES	p. 104
1 - FRACTIONNEMENT DE LA "HINGE REGION"	p. 104
2 - SEPARATION DES GLYCANNES REDUITS A PARTIR DE LA FRACTION I	p. 106
3 - HOMOGENEITE DES GLYCANNES ALCALI-LABILES PRESENTS DANS LA FRACTION I	p. 106
4 - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER	p. 108
5 - PURIFICATION DES GLYCANNES REDUITS A PARTIR DE LA FRACTION II ALCALI-LABILE	p. 108
C - PRÉPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI- STABLES	p. 108
1 - HYDROLYSE PRONASIQUE ET PURIFICATION DE L'HYDROLYSAT	p. 108
2 - ETUDE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE	p. 111
a - <u>Composition en acides aminés</u>	p. 111
b - <u>Composition en glucides</u>	p. 111
3 - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES	p. 111
a - <u>Sur colonne de résine Dowex 1 x 2</u>	p. 111
b - <u>Par électrophorèse sur papier</u>	p. 111

IV - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DES sIgA</u>	p. 114
A - ÉTUDE DES GLYCANNES ALCALI-LABILES	p. 114
1 - COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDES	p. 114
2 - ETUDE DE LA STRUCTURE	p. 114
a - <u>Etude du glycanne A</u>	p. 114
b - <u>Etude du glycanne B</u>	p. 120
c - <u>Etude du glycanne C</u>	p. 122
d - <u>Etude du glycanne D</u>	p. 125
e - <u>Etude du glycanne E</u>	p. 131
B - ÉTUDE DES GLYCOPEPTIDES N-GLYCOSIDIQUES NEUTRES	p. 134
1 - COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES AMINES ET EN GLUCIDES	p. 134
a - <u>Composition en acides aminés</u>	p. 134
b - <u>Composition en glucides</u>	p. 134
2 - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES NEUTRES	p. 137
a - <u>Etude du glycopeptide I</u>	p. 137
b - <u>Etude du glycopeptide II</u>	p. 137
c - <u>Etude du glycopeptide III</u>	p. 139
C - ÉTUDE DES GLYCOPEPTIDES N-GLYCOSIDIQUES ACIDES	p. 139
1 - COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES AMINES ET EN GLUCIDES	p. 139
a - <u>Composition en acides aminés</u>	p. 139
b - <u>Composition molaire en glucides</u>	p. 142
2 - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ACIDES	p. 142
a - <u>Etude du glycopeptide IV</u>	p. 142
b - <u>Etude du glycopeptide V</u>	p. 144

c - <u>Etude du glycopeptide VI</u>	p. 144
d - <u>Etude du glycopeptide VII</u>	p. 146
D - DISCUSSION	p. 155
CONCLUSIONS GENERALES	p. 161
BIBLIOGRAPHIE	p. 167

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années les recherches entreprises au laboratoire ont porté, sur la structure des groupements glycaniques des glycoprotéines d'origine sérique et lactée, sur la maternisation des laits et plus particulièrement sur la défense de l'intestin du nourrisson. Il semble, en effet, que celle-ci soit assurée par l'association de trois protéines présentes dans le lait de Femme: les immunoglobulines IgA, la lactotransferrine et le lysozyme. Comme les glycannes présents dans les IgA pourraient jouer un rôle important dans les interactions avec les récepteurs cellulaires ou avec la lactotransferrine, nous nous sommes intéressées à l'analyse détaillée de la structure de ces glycannes.

Les travaux antérieurement effectués sur les IgA de sécrétion (sIgA) par DESCAMPS (1974) ont porté sur la purification et la caractérisation des sIgA. En outre, les résultats préliminaires obtenus par DESCAMPS (1974) ont montré que les IgA du lait de Femme possèdent 12 groupements glycaniques liés à la chaîne polypeptidique par des liaisons de type asparaginy-N-acétyl glycosaminique et 7 groupements glycaniques alcali-labiles liés à la chaîne polypeptidique par des liaisons O-glycosidiques faisant intervenir les résidus de N-acétylgalactosamine et les résidus de sérine et de thréonine.

Nous avons repris cette étude. En effet, la comparaison entre les constituants glucidiques présents dans les sIgA du lait de Femme et ceux des IgA sériques myélomateuses (BAENZIGER et KORNFELD, 1974) montre qu'il existe de profondes différences. Notre travail a donc consisté à isoler les glycopeptides des IgA du lait de Femme, dans le but de caractériser et d'en analyser la structure chimique, afin d'étudier par la suite, l'interaction de ces glycannes dans les différents rôles biologiques des IgA de sécrétion.

Nous présenterons en premier lieu, dans le chapitre des généralités, l'état actuel de nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques des IgA et de ses constituants, ainsi que les différents rôles des IgA de sécrétion. En second lieu nous présenterons nos travaux personnels. Ils concernent la préparation rapide et quantitative des sIgA, leur caractéristiques physico-chimiques et en particulier les structures des glycanes liés N-glycosidiquement et O-glycosidiquement à la protéine.

Jusqu'à présent, nos travaux ont fait l'objet des communications orale et par affiche suivantes:

1. CRETEL A., PAMBLANCO M. et SPIK G.

"Isolement et détermination de la structure des groupements glycaniques des IgA du lait de Femme".-Forum des Jeunes de la Société de Chimie Biologique, Villeneuve D'Ascq, 27-29 Juin 1978.

2. "Heterogeneity of the glycans O-glycosidically linked to the hinge region of secretory IgA isolated from human milk". - Kiel (cinquième symposium international des glycoconjugués)- Septembre 1979.

et des publications suivants:

1. A. CRETEL, M. PAMBLANCO, H. EGGE, G. STRECKER, J. MONTREUIL et G. SPIK, 1979, dans " Glycoconjugates - Proceedings of the Fifth International Symposium ". (R. Schauer, P. Boer, E. Buddecke, M.F. Kramer, J.F.G. Vliegenthart and H. Wiegandt eds.) pp. 26-27, Georg Thieme, Stuttgart.
2. CRETEL A., PAMBLANCO M., STRECKER G., DECOTTIGNIES J.P., MONTREUIL J. et SPIK G. 1979, Biochimie (mémoire soumis à publication).
3. STRECKER G., CRETEL A., FOURNET B., SPIK G. et MONTREUIL J., 1979, Biochimie (sous presse).

GENERALITES



Très riche en composants divers, le lait humain a été étudié depuis de nombreuses années. Ainsi en 1901, MORO décrit pour la première fois des réactions de précipitation entre une préparation de lait humain et un sérum humain anti-lait total. Ces études se poursuivent en 1903 par SCHLOSSMAN et MORO, en 1909 par THOMSEN, en 1910 par BAUER et en 1955 par DU PAN et al., pour analyser par des techniques immunologiques, les relations qui existent entre les protéines du lait et les protéines sériques. Il faut cependant attendre les études immunologiques faites par HANSON en 1960 pour qu'une douzaine de protéines communes au sérum et au lait soient identifiées chez l'Homme. Parmi ces 12 protéines il faut citer en particulier les immunoglobulines et notamment les immunoglobulines IgA dont nous poursuivons l'étude.

La présence des immunoglobulines dans les IgA du lait de Femme a été démontrée par de nombreux auteurs : LUNSFORD et DEUTSCH (1957), GUGLER et al. (1958), SKVARIL et REJNEK (1958), FILIPE DA SILVA et MONTEIRO (1959-1960), FERRI et TUTIYA (1959), HANSON (1959), KARTE (1959), SCHWICK et al. (1959), MONTREUIL et al. (1960), Von MURALT et al. (1961), TOMASI et al. (1963), LUBIN et al. (1964), AXELSSON et al. (1966), CEDERBLAD et al. (1966).

Les immunoglobulines IgA ont été isolées à partir du lait humain par MONTREUIL et al. pour la première fois en 1960. Elles ont été caractérisées par la suite dans divers liquides biologiques : sérum, colostrum, salive, urine, fluide nasal, bronchial et duodéal provenant de l'Homme ou de différents mammifères.

Des différences structurales ont été mises en évidence entre les IgA sériques et les IgA de sécrétion appelées S IgA. La masse moléculaire et la constante de sédimentation de ces dernières sont plus élevées. En plus d'une pièce de sécrétion (SC) caractérisée pour la première fois par HAVEZ et al. (1966) elles possèdent une pièce de jonction (J) {HALPERN et KOSHLAND (1970)}. La formule structurale des IgA du lait qui a été proposée, a été la suivante :  $(IgA)_2.SC.J..$

Les IgA sériques représentent 20 % de la population des immunoglobulines. Leur taux est de 1,8 mg/ml. Elles sont monomériques chez l'Homme et souvent dimériques et sans pièce de sécrétion chez la plupart des autres mammifères. Cependant, selon BRANDTZAEG (1971), THOMPSON et ASQUITH (1970) et WALDMAN et al. (1970) 1,5 % des IgA sériques posséderaient une pièce de sécrétion. Dans les sécrétions le taux des IgA est parfois plus important. Il est de 2 g/l dans le lait humain par exemple.

Les S IgA existent sous une forme monomérique et sous une forme polymérique. Dans le colostrum, 20 % des IgA sont monomériques (TOMASI, 1965) et 20 % sont sous forme de hauts polymères {TOMASI, (1965), BRANDTZAEG (1970)}.

Les IgA de sécrétion et les IgA sériques sont constituées de deux sous-classes appelées IgA<sub>1</sub> et IgA<sub>2</sub>. Elles sont différenciées par la nature antigénique spécifique des chaînes lourdes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ . Le rapport IgA<sub>1</sub> : IgA<sub>2</sub> varie suivant l'origine des immunoglobulines. Il est de 1 pour 3 dans le colostrum (MOTA, 1977) et de 9 pour 1 dans le sérum (RIESEN et al. 1976).

Durant ces vingt dernières années, l'apport des connaissances sur les immunoglobulines a été considérable et les progrès réalisés facilitent la compréhension de leur structure moléculaire et du contrôle génétique de leur biosynthèse. La plupart de ces connaissances sont relatées dans les revues générales de TOMASI et BIENENSTOCK (1968), HOPPER et NISONOFF (1971), TOMASI et GREY (1972), GALLY et EDELMAN (1972), NATVIG et KUNKEL (1973), VAERMAN (1973), HEREMANS (1974), NISONOFF et al. (1975), CAPRA et KEHOE (1975), LAMM (1976), BAZIN (1976) et TOMASI (1976).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux IgA de sécrétion, à leur structure, leur rôle, leur biosynthèse et nous les différencierons des IgA sériques.

## I - PREPARATION DES s IgA

Nous ne nous intéressons qu'aux méthodes de préparation des IgA de sécrétion.

De très nombreuses méthodes ont été décrites pour préparer des IgA à partir de sécrétion d'origine diverses (HEREMANS, 1974). Les IgA lactées ont été isolées pour la première fois en 1960 par MONTREUIL et coll. par fractionnement du lactosérum humain au sulfate d'ammonium et chromatographie sur Amberlite XE-64. Ce procédé a été modifié par DESCAMPS (1974) en introduisant une chromatographie de gel filtration sur des fractions enrichies en IgA. La préparation des IgA à partir du colostrum délipidé et décaséiné peut se faire par chromatographie sur échangeurs d'ions : DEAE-cellulose ; CM-cellulose (KOBAYASHI, 1971) ou

par précipitation du lactosérum à 30-40 % de saturation en sulfate d'ammonium suivie de chromatographie de gel filtration sur colonne de Séphadex G-200 (MOTA, 1977).

## II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES sIgA

### A - PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

L'ultracentrifugation analytique et la chromatographie de gel filtration ont permis de déterminer que la masse moléculaire des IgA de sécrétion d'origine humaine, est comprise entre 375.000 et 394.000 daltons (TOMASI et CALVANICO, 1968, NEWCOMB et al. 1968, HURLINAM et al. 1969). Ces valeurs sont identiques aux valeurs trouvées pour les IgA d'origine animale (VAERMAN, 1973). La masse moléculaire des IgA de sécrétion diffère de celle des IgA sériques monomériques qui est de 150.000 daltons. Le coefficient de sédimentation des IgA monomériques est de 7 S, alors qu'il est de 10,5 S pour les IgA dimériques et de 11,4 S pour les IgA de sécrétion (TOMASI et BIENENSTOCK, 1968).

Le coefficient d'extinction molaire est le même pour les différents types d'IgA :  $E_{280 \text{ nm}}^{1\%}$  est égal à 13,9 (TOMASI et BIENENSTOCK, 1968), quant au volume spécifique partiel il est de 0,723 pour TOMASI et BIENENSTOCK (1968). Ces valeurs sont retrouvées par CEBRA et ROBBINS (1966) pour les IgA de sécrétion de Lapin.

### B - PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Les IgA de sécrétion sont très résistantes aux enzymes protéolitiques et aux agents de réduction. En particulier, les IgA<sub>2</sub> sont résistantes à l'action de la papaïne (MOTA, 1977). Elles sont

également plus résistantes aux pH acides (CEDERBLAD et al. 1966, KENNY et al. 1967, TOMASI et CZERWINSKY, 1967).

Il n'existe pas de différences appréciables dans la composition en acides aminés des IgA sériques et des IgA de sécrétion (Tableau I p.10).

Le taux de glucides (Tableau II p.11) est plus faible dans le cas des IgA sériques. Ceci s'explique par l'apport en glucides de la pièce de jonction et surtout de la pièce de sécrétion. Les IgA de sécrétion possèdent environ 11 % de glucides totaux, 5 % d'oses neutres, 5 % d'hexosamines et environ 1 % d'acide N-acétylneuraminique.

### III - ETUDE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DES sIgA

Les sIgA sont formées d'un dimère d'IgA insérant une pièce de jonction et une pièce de sécrétion. Un monomère d'IgA est constitué par deux chaînes légères et deux chaînes lourdes reliées entre-elles par des ponts disulfure.

#### A - ÉTUDE DES CHAÎNES LÉGÈRES

##### 1 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les chaînes légères sont de nature peptidique, elles possèdent selon ZIKAN et al. (1972) une masse moléculaire de 22.000 daltons. Dans une molécule d'IgA de sécrétion il y a 4 chaînes légères (Fig. 20 p. 51). Elles sont de type  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Les deux types de chaînes n'ont pas de déterminant antigénique commun et leur structure primaire est très différente, bien que l'on retrouve suffisamment d'homologies pour qu'une origine commune soit évidente (DE PREVAL, 1976). Les chaînes  $\kappa$  représentent 66 % des chaînes légères des immunoglobulines humaines.

TABLEAU I

Composition en acides aminés des IgA colostrales et des IgA sériques.

	IgA colostrales				IgA sériques				
	AXELSON <i>et al.</i> (1966)	MUH (1966)	TOMASI et BIENENSTOCK (1968)	DESCAMPS (1974)		HEIMBURGER <i>et al.</i> (1964)			
	g.p.100 g	g.p.100 g Résidus p.170.000	Moles p.100	g.p.100 g Résidus p.170.000	Moles p.100	g.p.100g Mole d'AA par mole			
Asp	6,94	7,8	7,9	7,75	114	8,8	6,15	86	
Thr	6,99	7,3	9,2	7,5	126	9,7	7,65	121	
Ser	7,34	8	10,8	7,9	155	11,9	7,93	146	
Glu	9,79	11,2	10,1	10,5	140	10,8	10,52	130	
Pro	5,96	6,3	8,4	7,3	125	9,9	6,26	104	
Gly	3,29	3,5	7,5	3,15	87	6,7	3,22	90	
Ala	3,79	4,6	6,9	3,7	88	6,8	3,87	87	
Cys	2,74	2,8	2,7	4,4	61	2,4	2,1	33	
Val	6,39	5,2	7,6	4,95	85	6,6	6	97	
Met	0,57	0,35	0,6	0,6	8	0,6	0,8	10	
Ile	2,18	1,4	2,2	1,7	25	2	1,74	25	
Leu	7,66	6,7	9,2	6,9	104	8	7,76	110	
Tyr	4,77	4	3,2	3,7	85	3	4,38	43	
Phe	3,71	3,3	3,1	3,6	41	3,2	3,66	40	
Trp	-	non dosé	-	non	dosé		3,3	28	
Lys	4,55	3,9	4,7	4,0	53	4,1	4,57	57	
His	1,78	1,6	1,7	1,6	20	1,6	1,93	23	
Arg	4,71	3,8	4,2	4,5	49	3,8	4,55	47	
TOTAL		82,1 p.100			1316		1320	88,4 p.100	1271

TABLEAU II

Composition centésimale en glucides des IgA de sécrétion et des IgA sériques.

	IgA de sécrétion						IgA sériques	
	MONTREUIL et al. (1960)	HAVEZ <i>et al.</i> (1966)	HANSON et JOHANSSON (1967)	TOMASI et BIENENSTOCK (1968)	DESCAMPS (1974)	HEREMANS (1960)	HEIMBURGER et <i>al.</i> (1964)	
Osés neutres	2,7 à 5,5	-	-	-	5,6	-	-	
Hexoses	-	5,0	4,77	4,4 à 5,9	4,65	4,75	3,2	
Fucose	-	2,8	0,73	0,8 à 1,03	0,95	0,22	0,22	
Hexosamines	2,5	4,3	4,1	2,9 à 5,2	4,05	3,75	2,9	
GlcNAC	-	-	-	-	3,53	-	-	
GalNAC	-	-	-	-	0,52	-	-	
ANAN	-	0,4	0,65	-	-	1,74	1,80	
Méthode Dische	0,3 à 1,55	-	-	-	1,8	-	-	
Méthode Warren	-	-	-	0,79 à 1,27	1,2	-	-	
TOTAL		12,5 p.100	10,25 p.100			10,46	8,12	

GlcNAC : N-acétyl glucosamine ; GalNAC : N-acétyl galactosamine ; ANAN : acide N-acétyl neuraminique



Les chaînes légères se retrouvent dans chaque classe d'immunoglobulines mais un seul type est présent par molécule : ainsi les IgA ont pour formule  $\alpha_2\lambda_2$  ou  $\alpha_2\kappa_2$ . Un individu peut posséder les 2 types de chaînes.

## 2 - ETUDE STRUCTURALE

La chaîne légère est constituée d'une région constante ( $C_L$ ) et d'une région variable ( $V_L$ ). La région variable est formée, quelque soit l'allotype, par environ 110 acides aminés  $NH_2$  terminaux. Les différences de séquence sont dues à des permutations d'acides aminés mais dans de nombreux cas, il y a conservation des propriétés physico-chimiques des résidus modifiés. Il y a 3 zones variables différenciées : les zones hypervariables, les régions conservées et les régions définissant les sous-groupes de variabilité. Il y a 3 zones hypervariables pour les chaînes légères aux positions  $L_1$  : 25-34,  $L_2$  : 55-60 et  $L_3$  : 89-97 (KABAT et WU, 1971).

En regroupant les séquences  $V_k$  humaines, MILSTEIN et PINK (1970) ont subdivisé la zone variable des chaînes légères  $\kappa$  en 3 groupes :  $V_k$  I,  $V_k$  II,  $V_k$  III. Les résultats obtenus sur les chaînes  $\lambda$  humaines ne permettent pas une classification aussi simple. Cependant il est possible de distinguer au moins 5 sous-groupes :  $V_\lambda$  I à  $V_\lambda$  V.

Ces résultats n'ont été obtenus que grâce à la détermination complète de la séquence peptidique des chaînes.

### a - Etude de la chaîne peptidique :

$\alpha$  - Etude de la chaîne  $\kappa$

L'analyse de 2 chaînes légères  $\kappa$  appartenant soit à des IgA sériques, soit à des IgG sériques d'un même individu a montré que ces deux molécules sont identiques sur la base des critères suivants :



mobilité électrophorétique à différents pH, composition en acides aminés, "fingerprint" des peptides tryptiques et des peptides chymotrypsiques, séquences des 40 premiers résidus d'acides aminés situés en position N-terminale (FAIR et al., 1975).

La structure primaire complète d'une chaîne  $\kappa$  d'IgG<sub>1</sub> humaine (Fig. 1 p. 14) a été déterminée par EDELMAN et al. en 1969, celle d'une IgG<sub>4</sub> humaine par PINK et al. en 1970. Ces structures, comparées avec celle d'une chaîne  $\kappa$  d'IgM humaine (KÖHLER et al. 1970), montrent que la région constante de ces 3 chaînes est identique. De nombreuses homologies sont trouvées d'autre part, dans la région variable, les différences portent en général sur la modification d'un seul résidu d'acide aminé.

#### $\beta$ - Etude de la chaîne $\lambda$

La structure primaire d'une chaîne légère de type  $\lambda$  d'IgA sériques myélomateuses a été déterminée partiellement par SHINODA et al. 1970.

LIU et al. (1976) donnent la structure complète d'une chaîne légère  $\lambda$  (BUR) d'une IgA<sub>1</sub> myélomateuse : la chaîne légère possède 213 acides aminés 2 ponts disulfure intrachaîne, elle est liée à la chaîne  $\alpha$  par 1 pont disulfure au niveau de l'avant dernier acide aminé (Fig. 2 p. 15).

#### b - Etude de la partie glucidique :

Il n'y a, sur les chaînes légères, que dans les cas pathologiques, que les auteurs trouvent des glucides. SOX et HOOD (1970) trouvent environ 15 % de glucides sur les chaînes légères de patients atteints de myélomes multiples. Dans les 5 cas étudiés, le glycanne se trouve fixé au niveau

1 10 20  
ASP- ILE- GLN- MET- THR- GLN- SER- PRO- SER- THR- LEU- SER- ALA- SER- VAL- GLY- ASP- ARG- VAL- THR-  
30 40  
ILE- THR- CYS- ARG- ALA- SER- GLN- SER- ILE- ASN- THR- TRP- LEU- ALA- TRP- TYR- GLN- GLN- LYS- PRO-  
50 60  
GLY- LYS- ALA- PRO- LYS- LEU- LEU- MET- TYR- LYS- ALA- SER- SER- LEU- GLU- SER- GLY- VAL- PRO- SER-  
70 80  
ARG- PHE- ILE- GLY- SER- GLY- SER- GLY- THR- GLU- PHE- THR- LEU- THR- ILE- SER- SER- LEU- GLN- PRO-  
90 100  
ASP- ASP- PHE- ALA- THR- TYR- TYR- CYS- GLN- GLN- TYR- ASN- SER- ASP- SER- LYS- MET- PHE- GLY- GLN-  
110 120  
GLY- THR- LYS- VAL- GLU- VAL- LYS- GLY- THR- VAL- ALA- ALA- PRO- SER- VAL- PHE- ILE- PHE- PRO- PRO-  
130 140  
SER- ASP- GLU- GLN- LEU- LYS- SER- GLY- THR- ALA- SER- VAL- VAL- CYS- LEU- LEU- ASN- ASN- PHE- TYR-  
150 160  
PRO- ARG- GLU- ALA- LYS- VAL- GLN- TRP- LYS- VAL- ASP- ASN- ALA- LEU- GLN- SER- GLY- ASN- SER- GLN-  
170 180  
GLU- SER- VAL- THR- GLU- GLN- ASP- SER- LYS- ASP- SER- THR- TYR- SER- LEU- SER- SER- THR- LEU- THR-  
190 200  
LEU- SER- LYS- ALA- ASP- TYR- GLU- LYS- HIS- LYS- VAL- TYR- ALA- CYS- GLU- VAL- THR- HIS- GLN- GLY-  
210 214  
LEU- SER- SER- PRO- VAL- THR- LYS- SER- PHE- ASN- ARG- GLY- GLU- CYS

FIGURE 1

Structure primaire d'une chaîne  $\kappa$  d'IgG<sub>1</sub> humaine d'après EDELMAN et al. (1969).



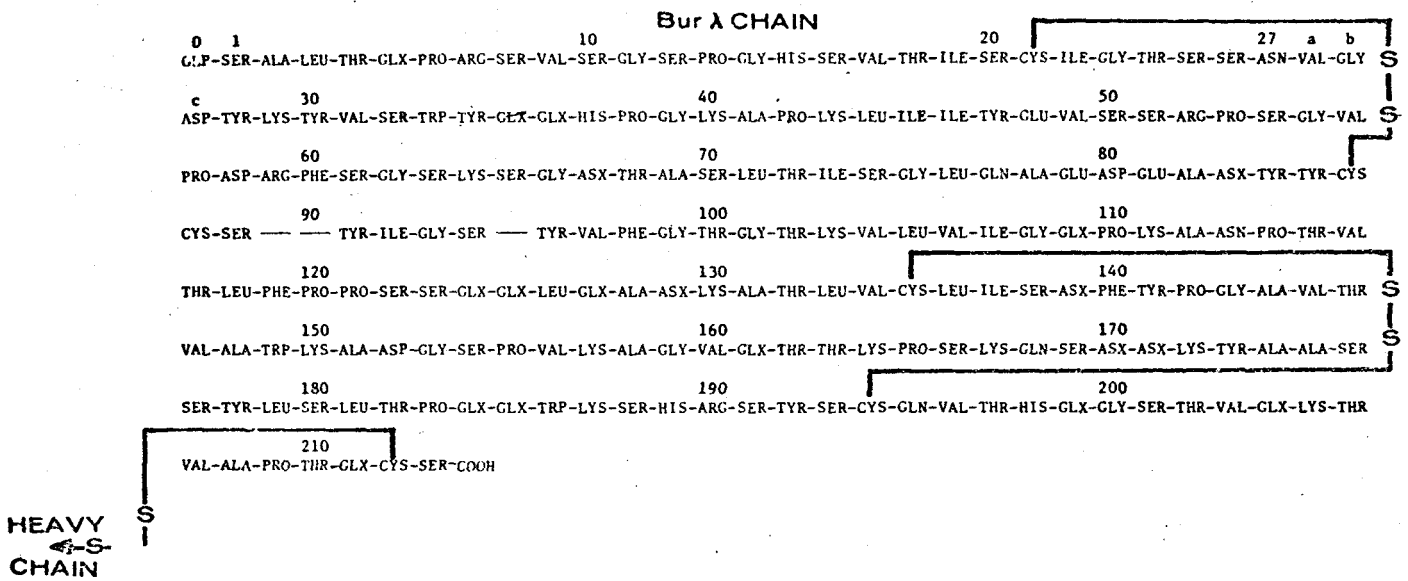


FIGURE 2

Structure primaire complète d'une chaîne légère de type λ d'une IgA<sub>1</sub> sérique myélomateuse d'après LIU et al. (1976).



d'une séquence Asn-X-Ser dans la zone variable des chaînes légères. Ces études sont confirmées par celles de TOMANA et al. (1972), qui montrent, dans la composition en monosaccharides des IgA sériques de patients atteints de myélome, l'absence constante de résidus de N-acétylgalactosamine et une absence occasionnelle de résidus de fucose.

c - Mode de liaison des chaînes légères aux chaînes lourdes :

Il existe une hétérogénéité structurale supplémentaire pour les immunoglobulines d'une même classe due au mode de liaison des chaînes légères aux chaînes lourdes. Ainsi, les chaînes légères sont reliées aux chaînes lourdes par des liaisons covalentes et non covalentes, dont le nombre et la position varient selon le sous-groupe et l'allotype de l'immunoglobuline.

En effet pour les IgA<sub>1</sub> et certaines IgA<sub>2</sub> d'allotype A<sub>2m</sub> (2) des liaisons ponts disulfure relient les chaînes L aux chaînes lourdes et les chaînes lourdes entre-elles. Par contre, dans certaines IgA<sub>2</sub> d'allotype A<sub>2m</sub> (1) ces liaisons relient les chaînes légères entre-elles et les chaînes lourdes entre-elles (Fig. 3 p. 17).

3 - ROLE DES CHAINES LEGERES

Différents rôles ont été attribués aux chaînes légères. Ces rôles seraient directement en relation, avec la structure de la chaîne peptidique. Ainsi, la zone dite "conservée" qui est présente lors du repliement de la molécule dans les principales courbures de la chaîne polypeptidique serait impliquée dans les liaisons inter et intra-domaines, tandis que la zone variable serait responsable de la diversité des anticorps et de leur contact avec l'antigène.

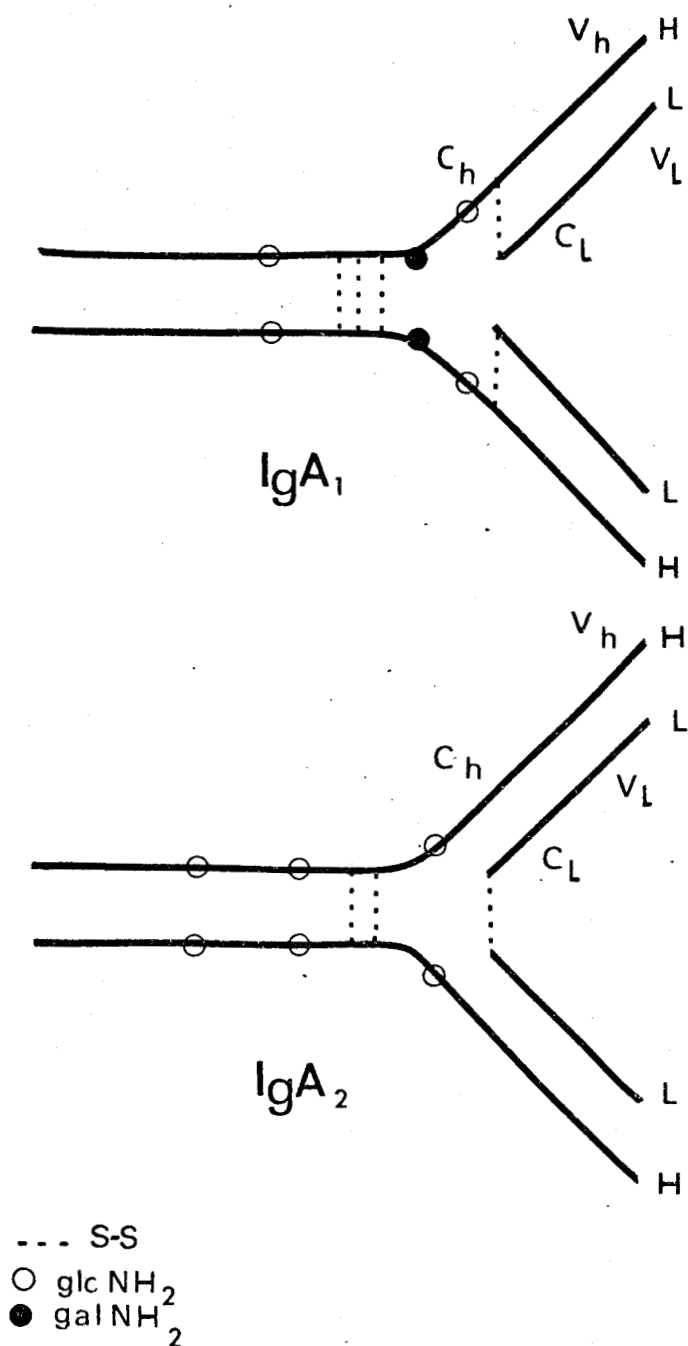


FIGURE 3

Mode de liaison des chaînes légères sur les chaînes lourdes dans les deux sous-classes d'IgA. Le nombre et la position des ponts disulfure sont arbitraires. Position des zones variables (V) et des zones constantes (C) sur les différentes chaînes.



## B - ÉTUDE DES CHAÎNES LOURDES

### 1 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Les chaînes lourdes sont de nature glycoprotéinique. Il existe 4 chaînes lourdes dans les IgA de sécrétion de type  $\alpha$ . La masse moléculaire des chaînes  $\alpha$  varie selon les auteurs. Elle est comprise entre 52.000 et 58.000 daltons pour CEBRA et SMALL (1967), DORRINGTON et ROCKEY (1970), MONTGOMERY et al. (1969), alors que ZIKAN et al. (1972) trouvent 64.000 daltons. Ces valeurs sont les mêmes chez la plupart des chaînes  $\alpha$  de différents mammifères.

### 2 - ETUDE STRUCTURALE

#### a - Etude de la chaîne peptidique

La chaîne  $\alpha$  possède environ 470 acides aminés. Elle renferme de nombreux résidus de proline concentré dans une même zone qui confère à la molécule une grande flexibilité, cette région est appelée "hinge region" ou zone charnière.

La chaîne  $\alpha$  renferme un grand nombre de résidus de cystéine qui permet la formation de ponts disulfure intrachaîne et interchaîne .

Les différences chimiques et la présence de déterminants antigéniques spécifiques au niveau des chaînes  $\alpha$ , ont permis la subdivision des chaînes  $\alpha$  en deux groupes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  (KUNKEL et PRENDERGAST (1966), FEINSTEIN et FRANKLIN (1966), VAERMAN et HEREMANS (1966), PUTNAM (1977)). Deux variants allotypiques ont été caractérisés pour les chaînes  $\alpha_2$  selon le nombre et la position des ponts disulfure (KUNKEL et al. en 1969, VYAS et FUDENBERG en 1969, TORANO et PUTNAM en 1978). En effet, il n'y a pas de ponts disulfure entre les chaînes  $\alpha$  et L dans le type  $A_{2m}$  (2) (GREY et al. en 1968). Par contre, ces ponts existent dans le type  $A_{2m}$  (1) (JERRY et al. 1972), (Fig. 3 p. 17).

Dans le colostrum la forme A<sub>2m</sub> (2) prédomine (JERRY et al. 1972)

La chaîne lourde est constituée d'une région variable (VH) et de 3 régions constantes (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> et CH<sub>1</sub>).

Comme pour la région V<sub>L</sub>, la région V<sub>H</sub> est constituée de 110 acides aminés NH<sub>2</sub> terminaux, différenciés en 3 zones : hypervariable, conservée et définissant les sous-groupes de variabilité.

Les études de ces différentes régions sont faites dans le chapitre IV concernant l'étude conformationnelle des Immunoglobulines.

#### α - Structure primaire d'une chaîne α

Ces études sont effectuées sur des IgA sériques myélomateuses. La structure primaire d'une IgA<sub>1</sub> a été réalisée par LIU et al. (1976), KORTT et al. (1978), d'une IgA<sub>2</sub> d'allotype A<sub>2m</sub> (1) par TORANO et al. (1977), d'une IgA<sub>2</sub> d'allotype A<sub>2m</sub> (1) par TORANO et al. (1978). L'étude comparative de ces 3 chaînes α est rassemblée Fig. 7 p. 20. L'allotype A<sub>2m</sub> (1) de la chaîne α<sub>2</sub> diffère de la chaîne α<sub>1</sub> par la position de 14 acides aminés qui sont identiques à l'allotype A<sub>2m</sub> (2) de la chaîne α<sub>2</sub>. L'allotype A<sub>2m</sub> (2) diffère en 6 positions avec l'allotype A<sub>2m</sub> (1) mais est identique à α<sub>1</sub>. Les deux premiers changements sont situés dans le domaine CH<sub>1</sub> et les quatre autres dans le domaine CH<sub>3</sub>. L'allotype A<sub>2m</sub> (1) apparaît être une chaîne hybride avec une identité du domaine CH<sub>3</sub> avec la chaîne α<sub>1</sub> et une identité des domaines CH<sub>1</sub> et CH<sub>2</sub> et de la "hinge region" avec l'allotype A<sub>2m</sub> (2) (Fig. 8 p. 21).

De plus, le polymorphisme des IgA apparaît être restrictif. Les deux allotypes A<sub>2m</sub> (2) et A<sub>2m</sub> (1) s'excluent mutuellement comme le montre Van LOGHEM et al. (1976).

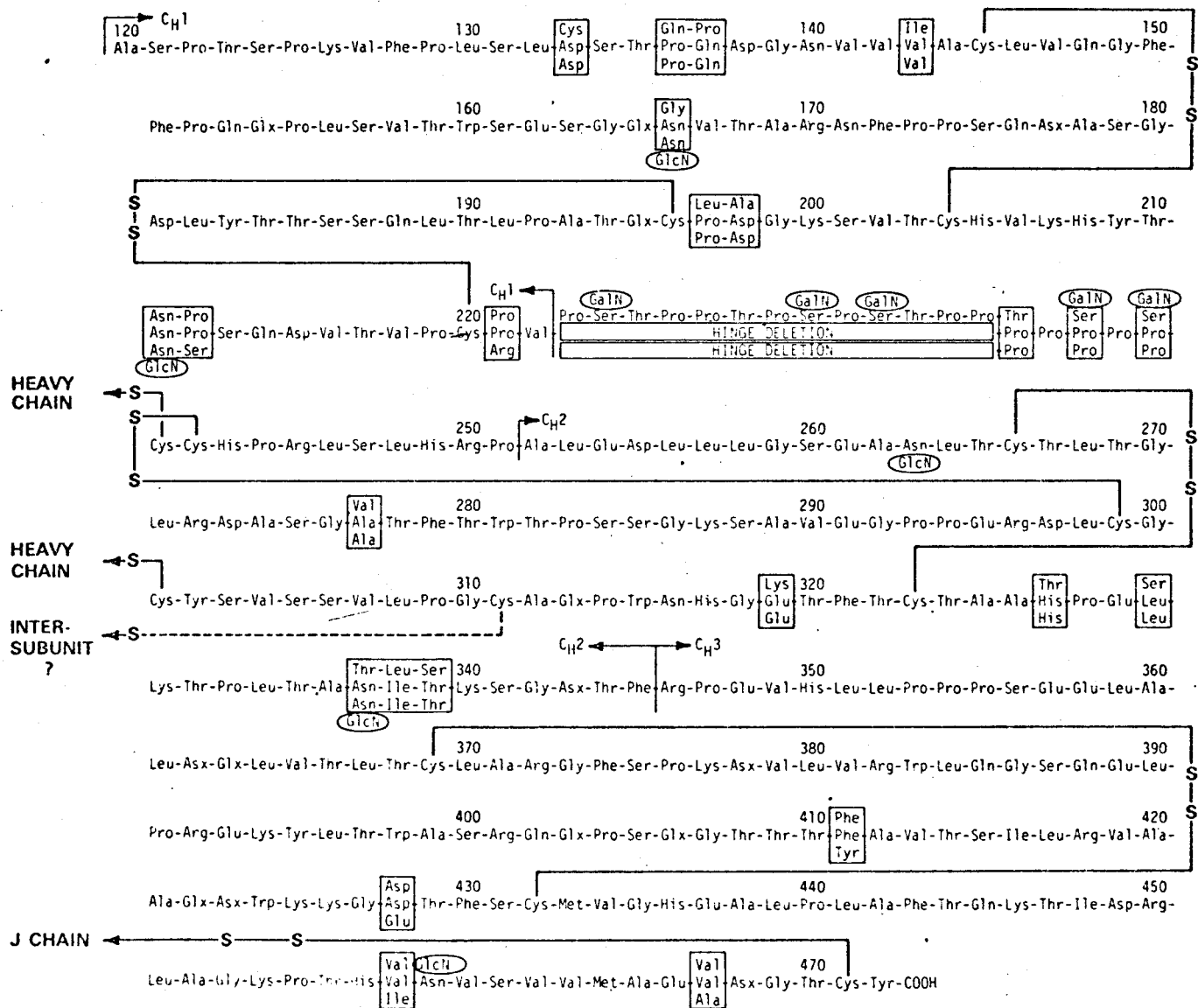


FIGURE 7

Structure primaire d'une chaîne  $\alpha_2$  (IgA<sub>2</sub> allotype A<sub>2m</sub> (2)), d'une chaîne  $\alpha_1$  comparée à une chaîne  $\alpha_2$  (IgA<sub>2</sub> allotype A<sub>2m</sub> (1)) d'après TSUZUKIDA et al. (1979).





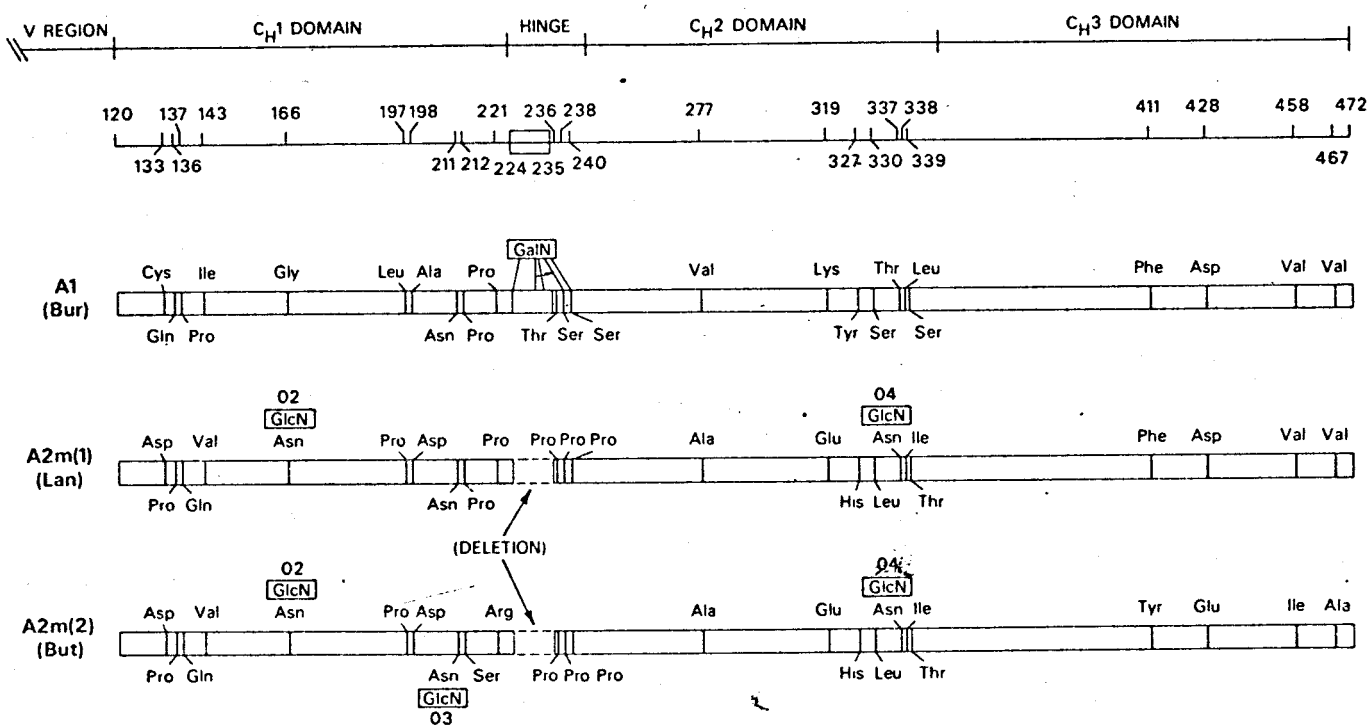


FIGURE 8

Différence de la séquence en acides aminés de la région constante des 3 chaînes  $\alpha$  des IgA sériques humaines par TSUZUKIDA et al. en 1979.



### $\beta$ - Structure de la "hinge region"

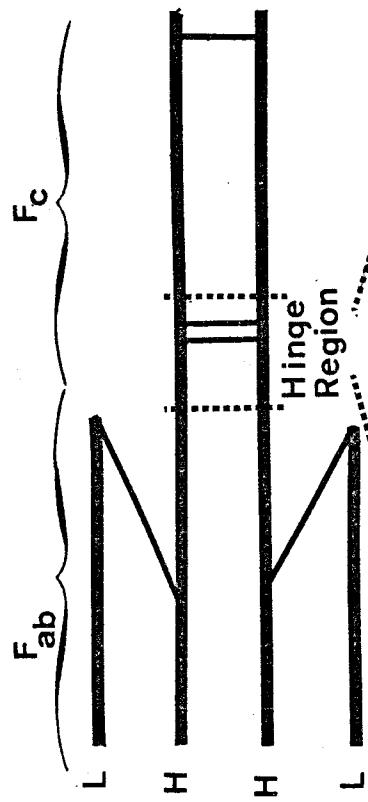
Les études structurales effectuées par FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) sur des IgA<sub>1</sub> et IgA<sub>2</sub> sériques myélomateuses, nous fournissent des renseignements très intéressants sur la structure primaire des chaînes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ . Ainsi, ils isolent un fragment qui contient la "hinge region" ; cette région est constituée par environ 20 acides aminés et elle se situe au centre de la chaîne  $\alpha$ . Au niveau de la "hinge region" se situe le pont disulfure qui relie les chaînes entre-elles. Fig. 9 p. 23.

L'étude comparée de la séquence en acides aminés de la "hinge region" d'une IgA<sub>1</sub> et une IgA<sub>2</sub>, effectuée par ces auteurs, montre qu'il existe une délétion importante à ce niveau dans la chaîne  $\alpha_2$ . Il manque, en effet, 15 acides aminés en particulier des résidus de sérine et de thréonine, Fig. 9 p. 22. Les études de WOLFENSTEIN-TODEL et al. (1979) montrent que des acides aminés de la "hinge region" participent à la formation de 2 ponts disulfure intracaténaux.

### b - Etude de la partie glycanique

#### $\alpha$ - Nature de la partie glycanique

Les premières études effectuées sur la partie glycanique des IgA a été faite sur les IgA sériques myélomateuses. Elles possèdent de 5 à 10 % de glucides. DAWSON et CLAMP en 1968 ont caractérisé une molécule d'IgA contenant environ 2 résidus de fucose, 14-15 résidus de N-acétyl glucosamine, 6 résidus de N-acétyl galactosamine et 5 résidus d'acide N-acétyl neuraminique. Tous ces résidus sont distribués en 6 oligosaccharides fixés sur la chaîne  $\alpha$ . Les structures proposées pour ces glycannes sont données dans la Fig. 10 p. 24.



$\alpha_1$  Val-Thr-Val-Pro-Cys-Pro-Val-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Thr-Pro-Ser-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-Pro(Ser, Pro, Ser)Cys-Cys-His-Pro-Arg

$\alpha_2$  Val-Thr-Val-Pro-Cys-Pro-Val-Pro-----Pro-Pro-----Cys-Cys-His-Pro-Arg

FIGURE 9

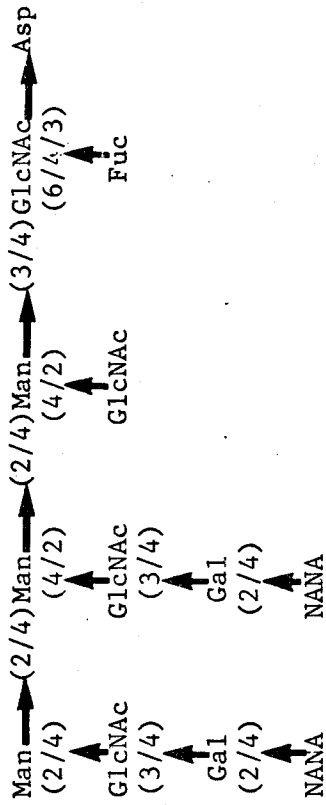
"Hinge region" d'une IgA humaine. Comparaison des chaînes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  des IgA humaines sériques d'après FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) au niveau de la "hinge region".



Type I



Type II



Type III



FIGURE 10

Structures glycaniques des IgA sériques myélomateuses proposées par DAWSON et CLAMP (1968)



En 1974, BAENZIGER et KORNFELD montrent l'existence de 5 glycannes de type O-glycosidique dans des IgA<sub>1</sub> sériques myélomateuses 4 d'entre-eux ont la structure suivante :  $\beta$ -Gal (1  $\rightarrow$  3) GalNAc, le cinquième ne possède qu'un résidu de N-acétylgalactosamine Fig. 11 p. 26. Ils décrivent d'autre part, la structure des glycannes liés N-glycosidiquement à la protéine (Fig. 12 p. 27), seule la structure du glycopeptide II<sub>A</sub> a été établi avec certitude.

Les études statistiques de TOMANA et al. (1976) sur les sous-classes IgA<sub>1</sub> et IgA<sub>2</sub> notent que dans les IgA<sub>1</sub> le nombre de résidus de galactose est identique à celui d'acide N-acétylneuraminique. Pour les IgA<sub>2</sub> il est différent, quand le nombre de résidu de galactose augmente, celui de l'acide N-acétylneuraminique diminue.

La fraction glucidique des IgA de sécrétion est beaucoup moins étudiée.

En 1968, DESCAMPS et al. effectuent leur travaux sur des IgA lactées humaines. Ils mettent en évidence l'existence de 7 glycannes de masse moléculaire d'environ 1000 daltons liés O-glycosidiquement à la protéine, 3 à des résidus de sérine et 4 à des résidus de thréonine. Les autres glycannes de masse moléculaire moyenne sont liés N-glycosidiquement à la protéine. En 1974, DESCAMPS donne les compositions molaires moyennes des glycannes alcali-labiles et alcali-stables. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau III p. 28.

Il faut signaler les différences importantes qui existent au niveau de la fraction alcali-labile des IgA sériques et des IgA du lait de Femme. En effet, les résultats de DESCAMPS (1974) laissent prévoir l'existence de structures O-glycosidiques beaucoup plus complexes que celles données par BAENZIGER et KORNFELD (1974).

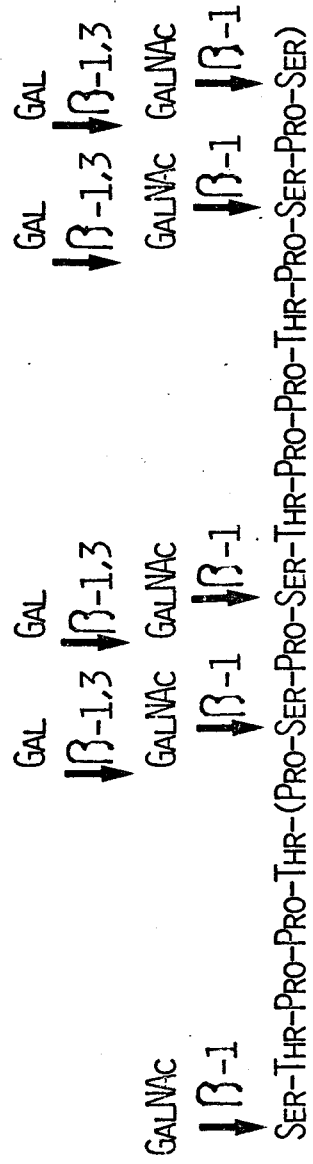


FIGURE 11

Structure et point d'attache des 5 glycannes liés O-glycosidiquement à la chaîne α<sub>1</sub> d'IgA myelomateuses d'après BAENZIGER et KORNFIELD (1974)



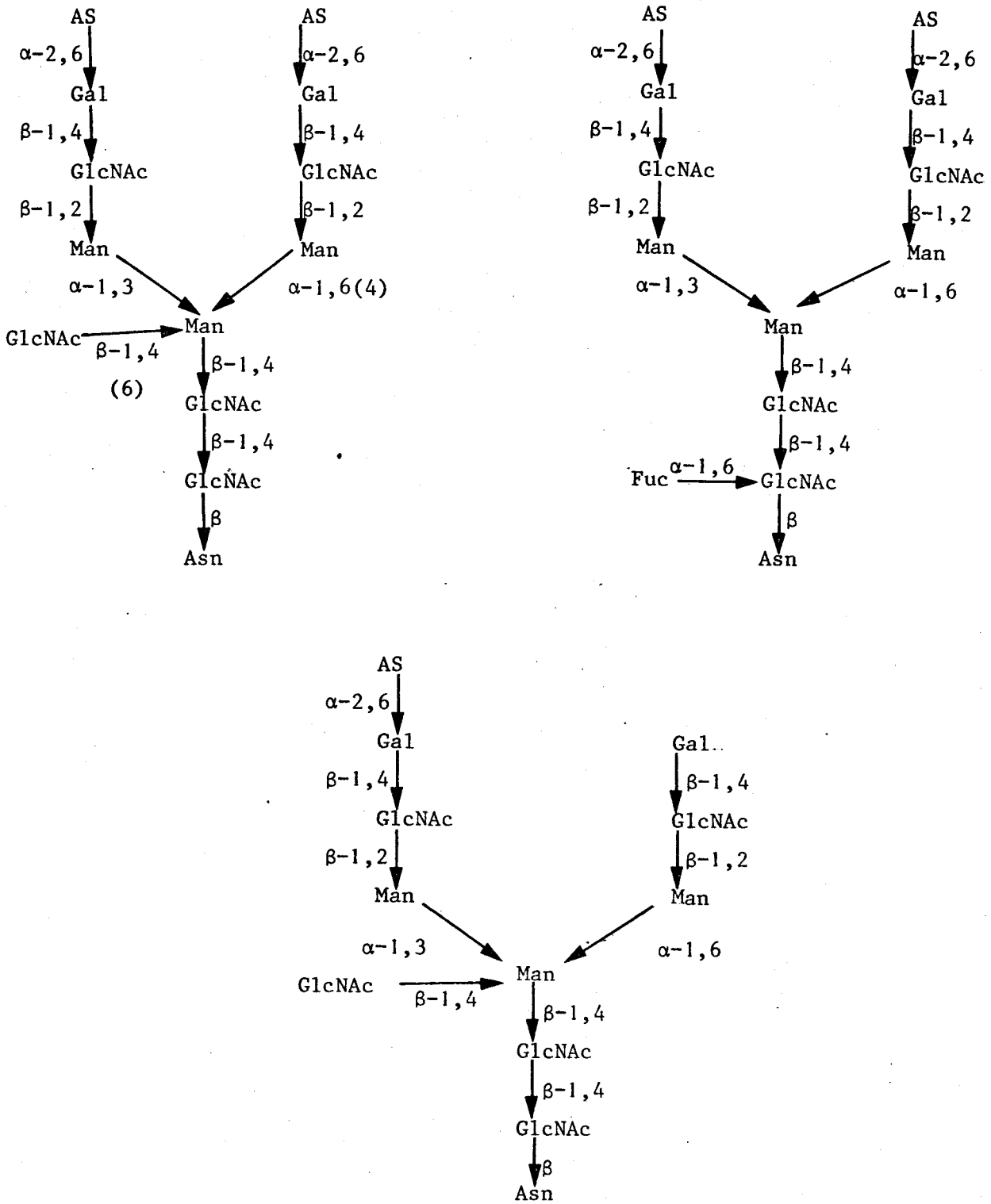


FIGURE 12

Structure des glycopeptides II<sub>A</sub>, II<sub>B</sub> et II<sub>C</sub> isolés des IgA myélomateuses d'après BAENZIGER et KORNFELD (1974).



TABLEAU III

Compositions molaires moyennes des glycanes à liaisons alcali-stables et alcali-labiles des IgA lactées d'après DESCAMPS (1974).

Nature des oses	Glycanes à liaisons	
	alcali-stables	alcali-labiles
Fucose	1	1
Galactose	1 à 2	4
Mannose	5	0
N-acétyl glucosamine	6	1 à 2
N-acétyl galactosamine	0	1
Acide N-acétyl neuraminique	1	1 à 2
Masse moléculaire	3.000	1.800





## $\beta$ - Localisation de la partie glycanique

L'étude de la localisation des glycanes a toujours été faite sur des IgA sériques humaines myélomateuses. La sous-classe IgA<sub>1</sub> est la seule à posséder à la fois des liaisons N- et O-glycosidiques (BAENZIGER et KORNFIELD, 1974). Pour les IgA<sub>1</sub> (Protéine BUR) les oligosaccharides sont au nombre de 3 et liés N-glycosidiquement à la protéine (LIU et al., 1976). Deux des glycanes sont localisés sur le fragment Fc et le dernier sur la zone variable. Ils sont liés aux résidus d'acide aspartique 28, 263 et 459. Les 5 O-glycanes sont situés sur la "hinge region" et liés aux résidus de sérine 224, 230, 232, 238 et 240.

Pour la chaîne  $\alpha_2$  l'allotype A<sub>2m</sub> (2) (protéine BUT) et l'allotype A<sub>2m</sub> (1) (protéine LAN) la délétion au niveau de la "hinge region" entraîne l'absence de O-glycanes. Deux des N-glycanes présents dans la chaîne  $\alpha_1$  subsistent. Il existe d'autre part en plus, trois oligosaccharides pour A<sub>2m</sub> (2) et deux de plus pour A<sub>2m</sub> (1).

La distribution des glycanes dépend de la présence du tripeptide accepteur Asn-X-Thr/Ser avec X représentant tous les acides aminés exceptés la proline. Ces résultats sont rassemblés dans la Fig. 13 p. 30. La localisation des oligosaccharides sur les chaînes  $\alpha$  est étudiée de manière comparative avec celle d'une chaîne  $\gamma$  d'une IgG humaine (EDELMAN et al., 1969), d'une chaîne  $\mu$  d'une IgM humaine (SHIMIZU et al., 1971, PUTNAM et al., 1973) et d'une chaîne  $\epsilon$  d'une IgE humaine (BENNICH et BAHR-LINDSTROM, 1974).

### 3 - ROLE DES CHAINES LOURDES

#### a - Rôle de la partie peptidique

La "hinge region" permet la grande flexibilité de la molécule. Elle délimite sur la molécule d'IgA, deux fragments. Le fragment qui participe avec la chaîne légère à la formation du site anticorps est

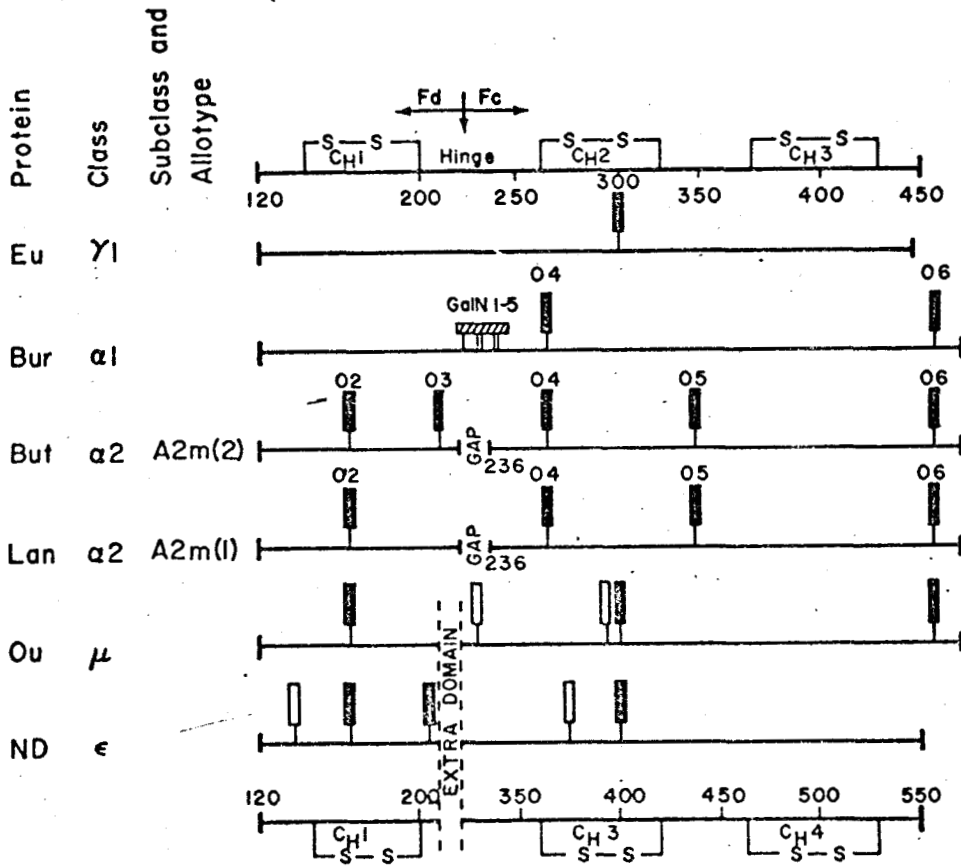


FIGURE 13

Localisation des glycannes sur la chaîne lourde d'une IgM, d'une IgE, d'une IgG et de 3 IgA : IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub> (A<sub>2m</sub> (2)) et IgA<sub>2</sub> (A<sub>2m</sub> (1)) selon TORANO *et al.*, 1977.



appelé fragment Fab (antigen binding). Le second fragment ne renfermant que la chaîne  $\alpha$  est le fragment cristallisable Fc qui possède d'autres fonctions : la fixation du complément et la fixation aux cellules. Les déterminants antigéniques des chaînes lourdes sont retrouvés sur le fragment Fc.

#### b - Rôle de la partie glucidique

Plusieurs rôles ont été proposés pour les glucides des immunoglobulines. Il a été suggéré par MARSHALL (1972), CLAMP (1975), PUTNAM (1977) et SILVERTON et al. (1977) que les glucides augmentent la solubilité, facilitent la sécrétion et jouent un rôle d'espaceur entre les domaines (Fig. 14 p. 32). La présence des glycanes à des positions homologues dans les immunoglobulines humaines et animales n'indique pas seulement que la séquence acceptrice a été conservée en face des grands changements dans la structure primaire des immunoglobulines des différentes classes et espèces, mais suggère aussi que le maintien de leur position à une signification structurale et fonctionnelle.

#### C - ÉTUDE DE LA CHAÎNE DE SÉCRÉTION

La pièce de sécrétion de nature glycoprotéinique est synthétisée principalement par les cellules épithéliales dans les membranes des muqueuses et dans les glandes exocrines (BRANDTZAEG, 1974a, POGER et LAMM, 1974).

Elle est caractérisée pour la première fois par SOUTH et al. (1966) dans la salive de patients déficients en IgA et plus tard dans d'autres sécrétions (HAVEZ et al., 1966) (HANSON et JOHANSSON, 1967) (REMINGTON et SCHAFFER, 1968). Elle existe avec les IgA dans le

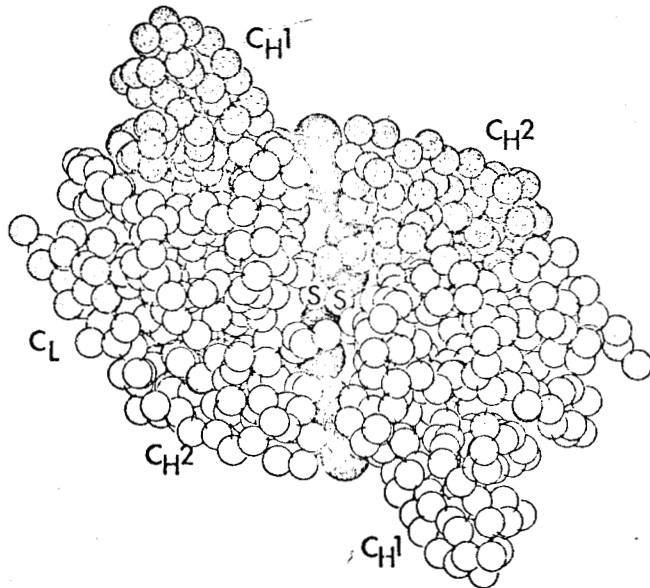
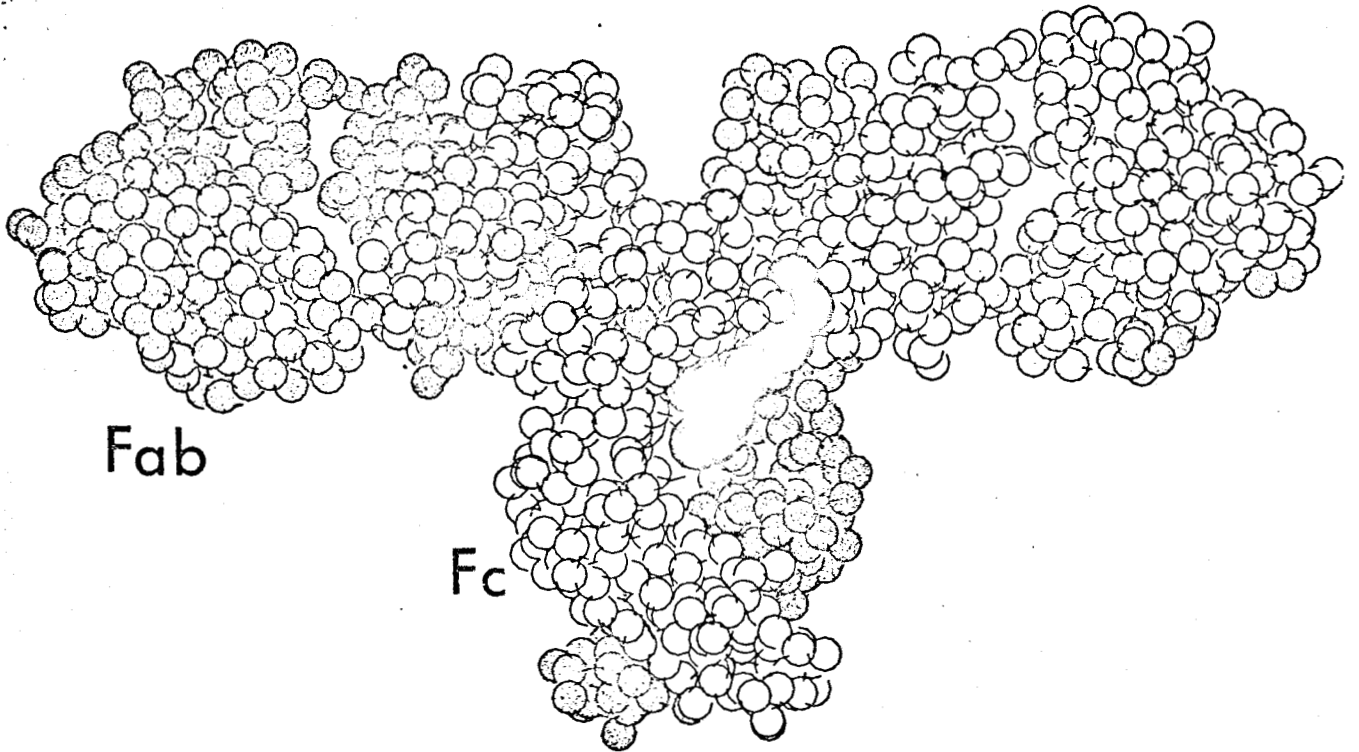


FIGURE 14

● Les glycanes ont un rôle d'espaces entre les domaines  
(SILVERTON et al., 1977)

colostrum humain (BRANDTZAEG et al., 1968 ; NEWCOMB et al., 1968) dans l'urine (TOMASI et BIENENSTOCK, 1968) et dans les excréctions nasales (NEWCOMB et al., 1969). Elle s'associe aux IgA dimériques TOMASI et al. (1965) et aux IgM pentamériques BRANDTZAEG (1975).

D'après WEICKER et UNDERDOWN (1975) la pièce de sécrétion à la même affinité pour les différentes sous-classes d'IgA ainsi que pour les IgM. Pour BRANDTZAEG (1977) la pièce de sécrétion a plus d'affinité pour les IgM que pour les IgA. L'affinité relative de la pièce de sécrétion pour les IgA et les IgM peut influencer la concentration de chacune de ces classes dans les sécrétions externes. Cette affinité a été étudiée par SOCKEN et UNDERDOWN (1978). La pièce de sécrétion se lie aux IgM humaines 2,5 fois mieux qu'aux dimères d'IgA humaines tandis qu'elle se lie 7 fois moins bien aux IgM de Lapin qu'aux dimères d'IgA de Lapin. L'affinité dépend à la fois de la classe de l'immunoglobuline et de l'espèce animale.

## 1 - PREPARATION DE LA PIECE DE SECRETION

### a - Préparation de la pièce de sécrétion libre

La pièce de sécrétion libre a été préparée à partir de colostrum humain par : TOMASI et BIENENSTOCK (1968), KOBAYASHI (1971), Van MUNSTER et al. (1971), LAMM et GREENBERG (1972), BRANDTZAEG (1974 b), WEICKER et UNDERDOWN (1975) et UNDERDOWN et al. (1977). Les derniers auteurs utilisent la chromatographie d'affinité sur colonne d'IgM-Sépharose. Il faut signaler qu'un des principaux contaminants des préparations de pièce de sécrétion est la lactotransferrine, de masse moléculaire très voisine, elle forme de nombreux complexes, en particulier avec la pièce de sécrétion.

b - Préparation de la pièce de sécrétion liée

Les méthodes couramment utilisées sont celles de TOMASI et BIENENSTOCK (1968), KOBAYASHI (1971), BRANDTZAEG (1970), LAMM et GREENBERG (1972), JERRY et KUNKEL (1972). Les conditions douces de réduction et d'alkylation données par BRANDTZAEG (1971) permettent d'isoler la pièce de sécrétion avec 3 déterminants antigéniques intacts.

2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

a - Propriétés physiques

L'étude comparée des propriétés physico-chimiques de la pièce de sécrétion liée et libre montre qu'elles sont identiques.

La pièce de sécrétion a une masse moléculaire d'environ 80.000 daltons. Elle a un coefficient de sédimentation,  $S_{20,w}^{\circ}$ , d'environ 4,3 ; et un coefficient d'extinction molaire,  $E_{280\text{ nm}}^{1\text{p.100}}$ , d'environ 12.

b - Propriétés chimiques

$\alpha$  - Etude de la partie peptidique

Les compositions en acides aminés de la pièce de sécrétion libre et liée sont rassemblées, dans le tableau IV p. 35 . Il est à noter l'absence de méthionine, cette absence est intéressante, elle peut servir de critère de pureté. Le nombre de groupements thiols est élevé, il peut servir à une stabilisation par covalence de la molécule avec le dimère d'IgA (BRANDTZAEG, 1974 c). Le taux de glyco-colle est très élevé (10 % des acides aminés totaux) et il confère à la pièce de sécrétion une structure flexible.

TABLEAU IV

Composition en acides aminés de la pièce de sécrétion libre et liée, selon différents auteurs

	Pièce S libre (moles p. 100)				Pièce S liée (moles p. 100)			
	KOBAYASHI (1971)	LAMM et coll. (1972)	Van MINSTER et coll.(1971)	SLETTEN et coll. (1975)	TOMASI et coll. (1965)	KOBAYASHI (1971)	LAMM et coll. (1972)	MESTECKY et coll. (1971)
Asp	10,5	9,4	10,6	10,7	7,6	10,7	9,9	8,15
Thr	5,4	5,3	5,9	5,6	8,0	5,6	6,1	8,81
Ser	7,2	12,0	8,1	8,0	9,2	7,4	9,8	11,44
Glu	10,6	11,3	10,3	11,0	8,3	10,7	10,9	10,15
Pro	5,0	4,2	4,8	5,3	6,6	5,0	5,4	7,47
Gly	9,8	11,0	9,4	9,8	15,2	9,9	9,6	8,85
Ala	5,6	5,7	6,1	6,1	5,7	5,7	5,4	6,57
Cystine/2	3,2	2,4	3,5	3,3	2,4	2,7	2,5	2,86
Val	8,3	8,1	8,1	8,7	6,9	8,2	9,1	7,78
Met	0	0,05	< 0,06	0,0	1,4	0	0	0,84
Ile	3,4	2,9	3,6	3,9	2,1	3,4	3,1	1,97
Leu	9,7	8,0	8,7	9,1	8,3	9,5	9,2	8,88
Tyr	4,2	3,7	3,6	4,0	4,0	4,3	3,5	2,96
Phe	3,3	3,1	3,1	3,2	4,7	3,2	3,0	3,09
Trp	1,0	2,0	3,2	N.D	-	2,2	2,0	-
Lys	5,7	6,2	5,6	5,5	4,0	5,7	4,8	4,47
His	5,0	1,0	0,9	0,9	1,4	0,9	1,0	1,57
Arg	2,0	3,8	4,7	4,9	4,0	4,9	4,6	4,13



La séquence NH<sub>2</sub> terminale de la pièce de sécrétion de nombreux mammifères a été trouvée identique (KOBAYASHI, 1971) (Van MUNSTER et al. 1971) (LAMM et GREENBERG, 1972) (BRANDTZAEG, 1974 d) (CUNINGHAM-RUNDLES et al. 1974) (SLETTEN et al. 1975) (THOMPSON et al. 1975) et (LABIB et al. 1976).

La pièce de sécrétion des IgA de Lapin de masse moléculaire 60.000 daltons (O'DALY et CEBRA, 1971 a) présente une délétion de l'ordre de 10.000 daltons au niveau de la portion NH<sub>2</sub> terminale (LAMM et al., 1977).

#### β - Etude de la partie glucidique

Les compositions molaire et centésimale en oses de la pièce de sécrétion libre et liée sont rassemblées dans le tableau V p.37 . Il est à noter l'absence de résidu de N-acétylgalactosamine donc de glycanes liés O-glycosidiquement à la protéine dans les 2 molécules. La pièce de sécrétion de masse moléculaire 80.000 daltons renferme environ 18 % de glucides. Ceci implique, compte tenu que la masse moléculaire moyenne d'un glycanne de type N-acétyllactosaminique est d'environ 2 000 daltons, l'existence de 5 à 6 glycanes par pièce de sécrétion.

### 3 - ETUDE DES DETERMINANTS ANTIGENIQUES DE LA PIECE DE SECRETION

Les IgA sériques et les IgA de sécrétion présentent des différences immunologiques (TOMASI et al., 1965). Elles sont dues aux différents déterminants antigéniques de la pièce de sécrétion.

La liaison non-covalente de la pièce de sécrétion aux dimères d'IgA met en évidence un déterminant antigénique dénommé par Van MUNSTER et al. (1969) et par BRANDTZAEG et al. (1970) le déterminant "I" ou inaccessible. Ce déterminant devient caché lors de la formation complète des IgA de sécrétion.



TABLEAU V

Composition centésimale en glucides de la pièce de sécrétion libre, selon différents auteurs

	TOMASI et coll. (1965)	KOBAYASHI (1971)	Van MUNSTER et coll.(1971)	TOMANA et coll. (1972)	LAMM et coll. (1972)	SLETTEN et coll. (1975)
Gal		3,12	2,11			4,1
Man		3,95	2,16			3,6
Fuc		2,26	1,09			2,1
GlcNAc		4,36	3,56			4,8
GalNAc		0	0			Traces
ANAN		1,9	2,68			4,0
Glucides totaux	9,5	15,59	11,6	11,5	19,4	18,6

Gal : galactose

Man : mannose

Fuc : fucose

GlcNAc : N-acétyl glucosamine

GalNAc : N-acétyl galactosamine

ANAN : acide N-acétyl-neuraminique



Le déterminant "A" qui est accessible existe toujours dans la molécule. Il se divise en 2 groupes : le déterminant A<sub>1</sub> sensible aux agents réducteurs et le déterminant A<sub>2</sub> non sensible.

Il existe de plus, un déterminant C (conformationnel) dans la molécule d'IgA de sécrétion qui n'existe pas ou qui n'est pas accessible quand la pièce de sécrétion est libre (Fig. 15 p. 39).

Un nouveau déterminant antigénique différent des précédents a été mis en évidence par ISCAKI et al. (1978). Il est appelé R (résistant au 2-mercapto-éthanol), il est partiellement caché et localisé près du site de fixation de la pièce de sécrétion aux IgA.

#### 4 - ROLE DE LA PIÈCE DE SECRETION

Différents rôles ont été attribués à la pièce de sécrétion : la protection des IgA vis-à-vis des enzymes protéolytiques, LINDH (1975) ; le transport des IgA à travers la surface épithéliale, SOUTH et al. (1966), BRANDTZAEG (1974 e) ; le transport des IgA polymériques du sérum vers la bile nécessite la présence de la pièce de sécrétion (FISHER et al. 1979) et l'attraction des lymphocytes circulants à IgA de surface vers les membranes des muqueuses, GUY-GRAND et al. (1974), STROBER et al. (1976).

#### D - ÉTUDE DE LA PIÈCE DE JONCTION

La pièce de jonction est caractérisée pour la première fois en 1970 par HALPERN et KOSHLAND. Elle est synthétisée par les plasmocytes RAAM et INMAN (1973), par les lymphocytes B, mais cependant elle ne présente pas d'homologie avec les chaînes légères et les chaînes lourdes.

Elle est appelée "J chaîne" (joining chain) car de nombreux auteurs lui attribuent un rôle dans la polymérisation.

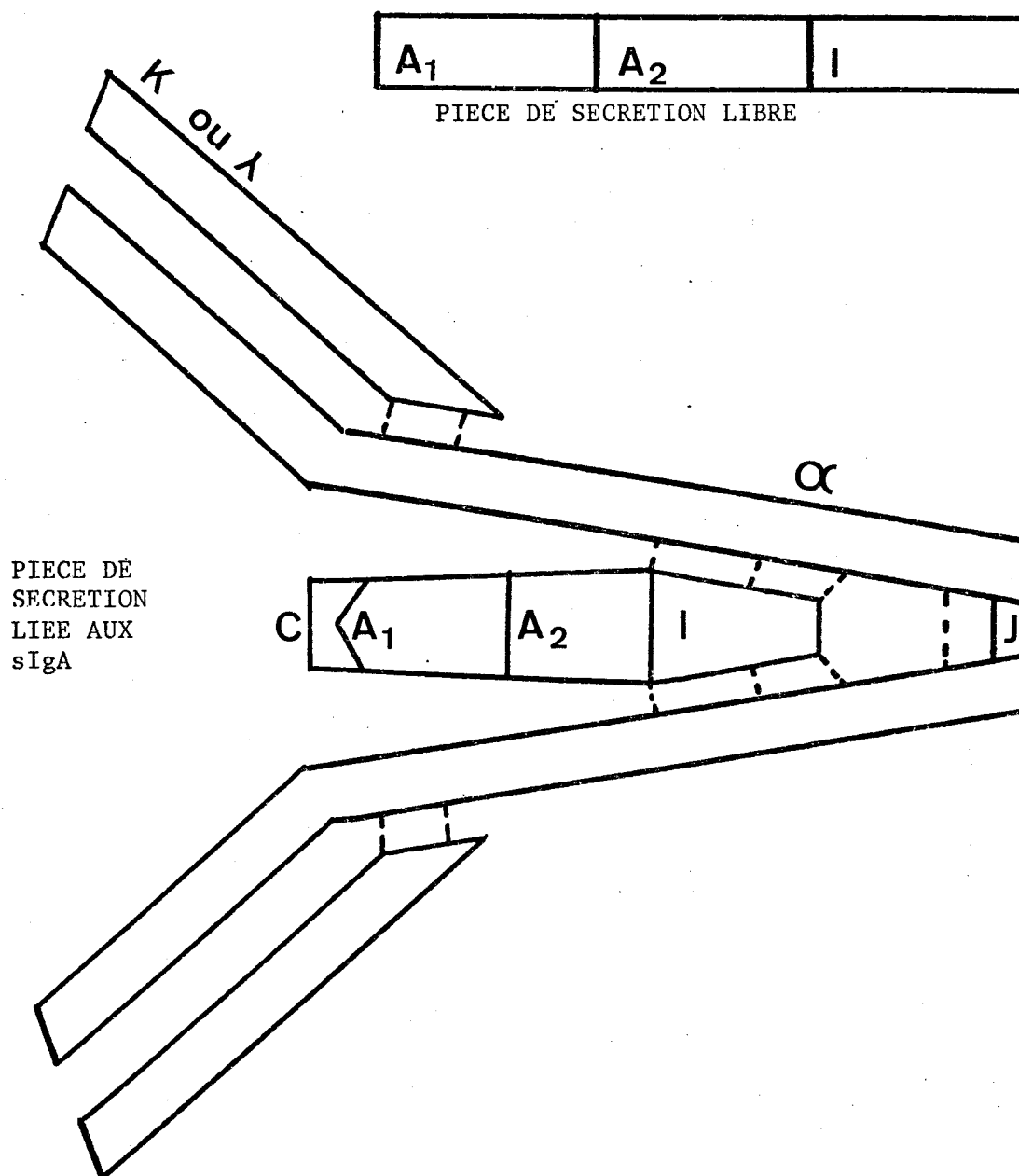


FIGURE 15

Mise en évidence des déterminants antigéniques de la pièce de sécrétion par BRANDTZAEG et al. en 1970.

$A_1, A_2, C$  et  $I$ : déterminants antigéniques de la pièce de sécrétion.



Elle est associée covalentiellement aux immunoglobulines polymérisées IgA et IgM dans le rapport stoechiométrique d'une mole de chaîne J par mole d'immunoglobuline polymérisée {(HALPERN et KOSHLAND, 1973), (CHAPUIS et KOSHLAND, 1975), (MESTECKY et al., 1972) et (MORRISSON et KOSHLAND, 1972)}. Elle a été caractérisée chez de nombreuses espèces de mammifères par PARKHOUSE (1972) ; WEINHEIMER et al. (1971), ZIKAN (1973) et O'DALY et CEBRA (1971a).

Cependant, les travaux récents de BRANDTZAEG (1976) sont en faveur de l'existence de 2 chaînes J par dimère d'IgA et de 3 à 4 par pentamère d'IgM.

La pièce de jonction des IgA est très semblable à celle trouvée dans les IgM (CHAPUIS et KOSHLAND, 1975) par sa composition en acides aminés, par sa carte peptidique, ses propriétés immunologiques et physico-chimiques.

#### 1 - PREPARATION DE LA CHAÎNE DE JONCTION

Les méthodes d'isolement de la chaîne J commencent évidemment par la coupure des ponts disulfure qui lient cette chaîne au polymère. Ceci est fait par réduction-alkylation ou bien par sulfitolyse. Les étapes de purification tiennent compte surtout de l'acidité de la chaîne J, ainsi que de sa masse moléculaire faible. Ces études de préparation ont été effectuées sur les chaînes J humaines par MESTECKY et al. (1972), MEINKE et SPIEGELBERG (1971), sur les chaînes J de Lapin par O'DALY et CEBRA (1971b), de Chien par KEHOE et al. (1972) et de Porc par ZIKAN (1973).

## 2 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

### a - Propriétés physiques

L'étude de la masse moléculaire de la chaîne J des IgA sériques dimériques, des IgA de sécrétion et des IgM de différents mammifères soulève quelques controverses. En général, la chaîne J est considérée comme une simple chaîne de masse moléculaire comprise entre 15.000 et 26.000 daltons cependant divers auteurs, KOWNATZKI et BÄHR (1974) et RICARDO et al. (1974) trouvent une masse moléculaire de l'ordre de 30.000 daltons, ce qui tend à faire penser que la chaîne J existerait sous la forme d'une double chaîne en milieu non dissociant.

### b - Propriétés chimiques

#### $\alpha$ - Etude de la partie peptidique

L'étude comparée des compositions en acides aminés de la chaîne J de différentes origines est réalisée dans le Tableau VI p. 42. D'après ces valeurs nous voyons que la chaîne J renferme 130 acides aminés environ, que son taux d'acide aspartique et d'acide glutamique est élevé ce qui confère à la chaîne J un caractère acide et que d'autre part le taux de cystéine est relativement important.

#### $\beta$ - Etude de la partie glucidique

Les compositions molaire et centésimale en glucide sont données dans le tableau VII p. 43. La masse moléculaire incluant le pourcentage en glucides (7,5 %) est de 15.600 daltons. Il n'y aura donc qu'un seul glycanne par chaîne J. La composition molaire de ce glycanne permet de dire qu'il sera de type N-acétyllactosaminique.

TABLEAU VI

Composition en acides aminés de la chaîne J des IgA myéломateuses et de sécrétion, et des IgM, exprimée en résidus pour 100.

	IgA myéломateuses		IgA de sécrétion		IgM humaines		
	(a)	(b)	humaines (c)	porc (c)	lapin (d)	(e)	(a)
Asp	17,13	16,9	16,1	16,88	15,93	16,05	16,72
Thr	9,26	9,53	8,61	8,32	8,92	8,76	9,06
Ser	5,34	7,25	5,1	6,47	7,44	5,25	5,41
Glu	11,45	12,05	11,25	12,72	10,42	10,92	11,5
Pro	6,15	6,23	6,87	4,09	7,39	7,17	6,18
Gly	1,72	1,96	1,98	1,97	3,68	2,1	1,87
Ala	4,39	4,82	4,7	4,54	3	4,77	4,31
Cys	5,77	4,95	5,35	5,36	4,85	5,06	5,59
Val	7,68	7,38	7,79	6,13	6,76	7,96	7,57
Met	0,48	0,64	0,75	0,84	0,41	0,72	0,53
Ile	6,82	4,7	6,73	6,24	5,75	6,52	6,76
Leu	6,2	6,18	6,49	8,09	6,76	6,42	6,38
Tyr	4,34	4,12	4,47	3,63	3,55	4,48	4,32
Phe	1	0,88	1,05	2,21	2,04	0,98	1,2
Lys	4,34	4,08	4,46	5,69	4,95	4,13	4,5
His	0,66	0,88	0,86	1,82	1,46	0,83	0,87
Arg	7,25	7,45	7,57	4,94	6,65	7,87	7,28

(a) MORRISON et KOSHLAND (1972)

(c) ZIKAN (1973)

(e) MESTECKY et al. (1974)

(b) MESTECKY et al. (1974)

(d) O'DALY et CEBRA (1971a)



TABLEAU VII

Composition centésimale et molaire en glucides de la chaîne J des IgA sériques myélomateuses et des IgA de sécrétion et des IgM.

	IgA sériques myélomateuses				IgA de sécrétion		IgM
	• NIEDERMEIER <i>et al.</i> (1972)		•• MESTECKY <i>et al.</i> (1972)		• NIEDERMEIER <i>et al.</i> (1972)		BAENZIGER (1979)
	p. 100	Résidus/mole	p. 100	Résidus/mole	p. 100	Résidus/mole	Résidus/mole
Fuc	0,34	0,6 (0,5-0,8)	0,34	1	0,38	0,6 (0,5-0,8)	0
Gal	1,27	1,9 (1,6-2,3)	1,27	1	1,61	2,3 (1,8-2,6)	1,9
Man	2,13	3,1 (2,9-3,6)	2,13	2	2,27	3,3 (2,9-3,6)	3,2
GlcNAc	2,72	3,9 (3,3-4,2)	2,72	3	1,93	2,8 (2,6-2,9)	3,4
GalNAc	0	0	0	0	0	0	0
ANAN	1,11	1,0 (0,9-1,0)	1,11	1	1,42	1,2 (1,03-1,3)	0,9
TOTAL	7,57	10,5	7,57	8	7,61	10,2	9,4

• pour une masse moléculaire de la chaîne J de 26.000 daltons

•• pour une masse moléculaire de la chaîne J de 15.600 ± 200 daltons

### 3 - ETUDE STRUCTURALE

La structure primaire complète d'une chaîne J provenant d'IgM a été réalisée par MOLE et al. (1977). Elle est constituée de 129 acides aminés et d'1 oligosaccharide lié sur l'acide aspartique 43 (Fig. 16 p. 45).

BAENZIGER (1979) a déterminé la structure du glycanne de la chaîne J d'une IgM. Le glycanne de type N-acétyllactosaminique est hétérogène. 3 types de structures pour le glycanne qui diffèrent par la présence ou l'absence de résidu d'acide N-acétylneuraminique (Fig. 17 p. 46) ont été mises en évidence.

En 1974, MESTECKY et al., isolent à partir de la chaîne J d'IgA myélomateuses par rupture au bromure de cyanogène, 3 composants. Le premier segment qui contient l'homosérine correspond au segment N terminal, le second a été identifié au segment C terminal, quant au dernier fragment il correspond à l'octapeptide C terminal présent dans la chaîne  $\alpha$ . La chaîne J est liée à l'avant-dernier acide aminé de l'octapeptide. D'après ces résultats MESTECKY et al. (1974) ont réalisé un schéma donné dans la fig. 18 p. 47 où l'on peut voir le site d'attachement de la chaîne J à la chaîne  $\alpha$ .

### 4 - ROLE DE LA PIECE DE JONCTION

Le rôle de la chaîne J concernant la polymérisation des immunoglobulines a été récemment remis en question, en effet, la mise en évidence de molécule 19S sans chaîne J montre qu'elle n'est pas nécessaire à la polymérisation des IgM (STOTT, 1976).

ESKELAND et BRANDTZAEG (1974) ont émis l'hypothèse que la chaîne J serait plutôt impliquée dans le transfert épithélial des immunoglobulines polymériques vers les sécrétions externes. D'autre part, les travaux de KAJI et PARKHOUSE (1974), BRANDTZAEG (1978f) et MESTECKY et al.



PCA-Glu-Asp-Glu-Arg-Ile-Val-Leu-Val-Asp-Asn-Lys-Cys-Lys-Cys-Ala-  
Arg-Ile-Thr-Ser-Arg-Ser-Ser-Glu-Asp-Pro-Asn-Glu-Asp-Glu-Ile-Val-  
Arg-Ile-Ile-Val-Pro-Leu-Asp-Asn-Arg-Glu-Asn-Ile-Ser-Asp-Pro-Thr-  
Ser-Pro-Leu-Arg-Thr-Arg-Phe-Val-Tyr-His-Leu-Ser-Asp-Leu-Cys-Lys  
(Lys)  
(Gln)Cys-Asp-Pro-Thr-Glu-Val-Glu-Leu-Asp-Asn-Gln-Ile-Val-Thr-Ala-  
Thr-Gln-Cys-Asx-Ile-Cys-Asp-Glu-Asn(Ser)Ala(Ser)Glu(Arg)Thr-Tyr-  
Asp-Arg-Asn-Lys-Cys-Tyr-Thr-Ala-Val-Val-Pro-Leu-Val-Tyr-Gly-Gly-  
Glu-Thr-Lys-Met-Val-Glx-Thr-Ala-Leu-Thr-Pro-Asx-Ala-Cys-Tyr-Pro-  
Asx

FIGURE 16

Structure primaire d'une chaîne J humaine ,  
d'après MOLE *et al.* ( 1977)

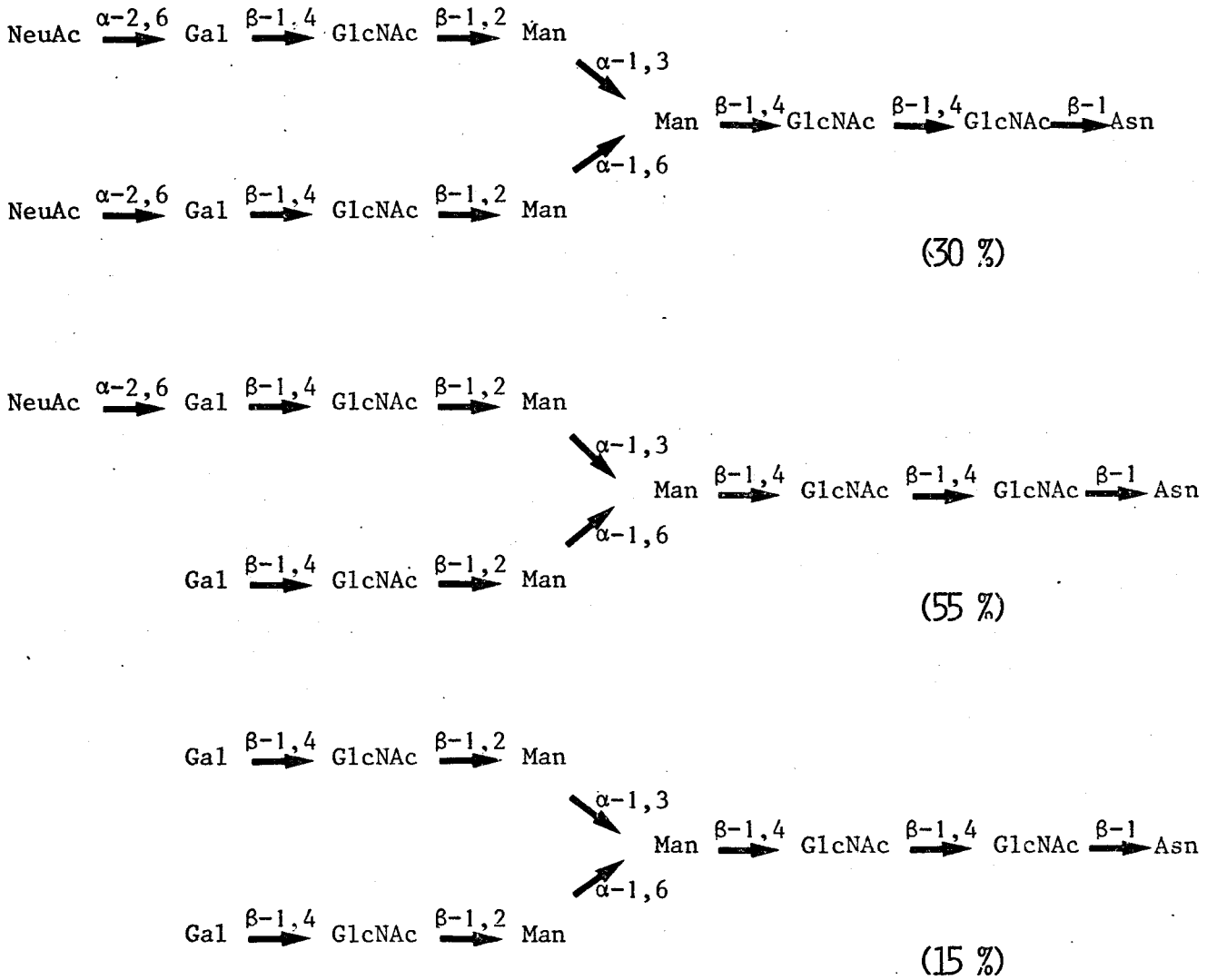


FIGURE 17

Structure des trois variants glycaniques de la chaîne J d'une IgM  
BAENZIGER (1979). Le pourcentage relatif à chacun des glycanes est  
donné entre parenthèse.



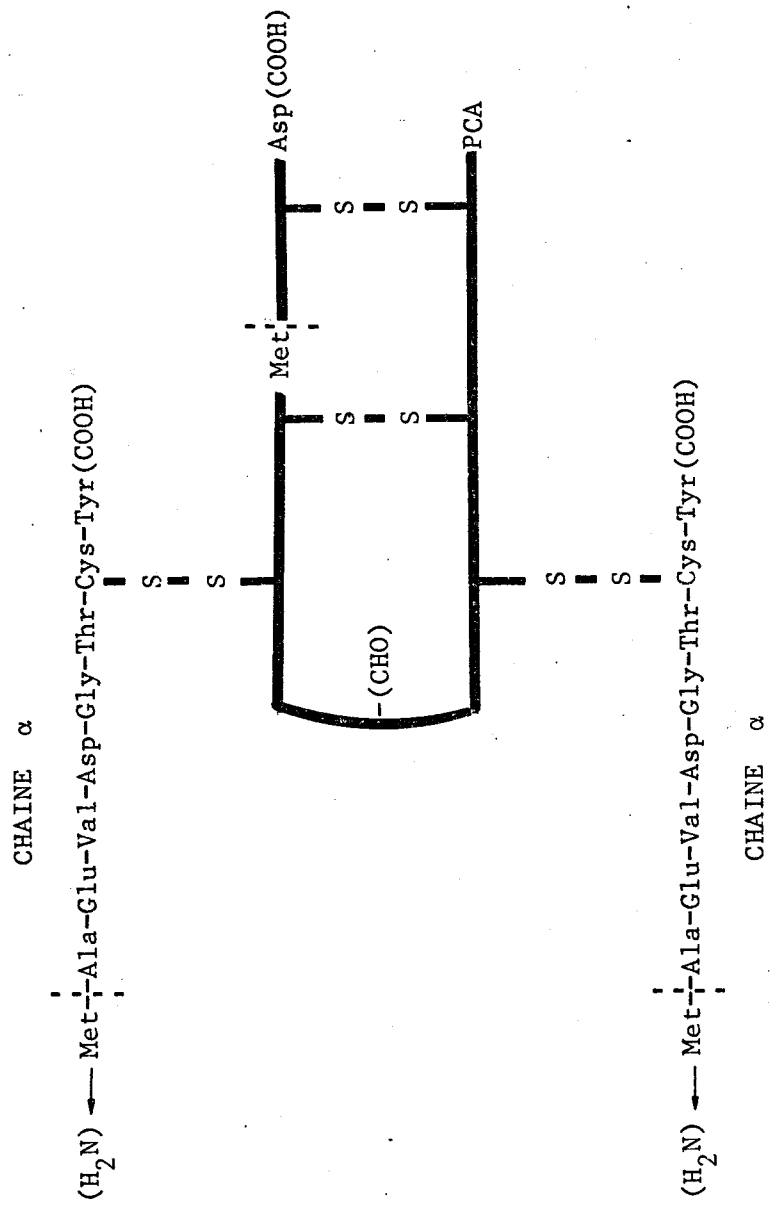


FIGURE 18

Site d'attachement de la chaîne J à la molécule polymérique d'IgA humaine, d'après MESTECKY *et al.* (1974).



(1977) montrent que la synthèse de la chaîne J n'est pas limitée aux cellules productrices des IgA ou des IgM, mais qu'elle est présente aussi dans les cellules qui produisent des IgG, IgD ou des chaînes légères. Le rôle de polymérisation est donc largement remis en question par contre ces mêmes auteurs suggèrent que la chaîne J serait impliquée dans le contrôle de l'immunité humorale de la différenciation des lymphocytes B ou même dans les 2 phénomènes.

## E - CONCLUSION

En conclusion de cette étude structurale des IgA de sécrétion de nombreux modèles ont été proposés.

### 1 - MODELE DE TOMASI ET BIENENSTOCK

En premier lieu celui de TOMASI et BIENENSTOCK (1968) qui montre que les IgA de sécrétion sont formées de 2 unités 7 S superposées, reliées entre-elles par la chaîne J et insérant la pièce de sécrétion (Fig. 19 p. 49). Ce modèle a l'avantage de donner une schématisation simple de la molécule de sIgA. Cependant, il n'est pas satisfaisant, il ne met pas en évidence les différentes propriétés de sIgA.

### 2 - MODELE DE HEREMANS

Les études effectuées par UNDERDOWN (1975) "in vitro" montrent que la pièce de sécrétion est liée covalentiellement seulement à l'un des 2 monomères qui constitue le dimère d'IgA de sécrétion. En effet, l'association entre la pièce de sécrétion et la molécule dimérique d'IgA s'effectue dans un premier temps par des liaisons non covalentes, ce qui rend accessible le déterminant "I", et ensuite une stabilisation par les ponts disulfure a lieu et "I" devient, de cette façon, inaccessible.

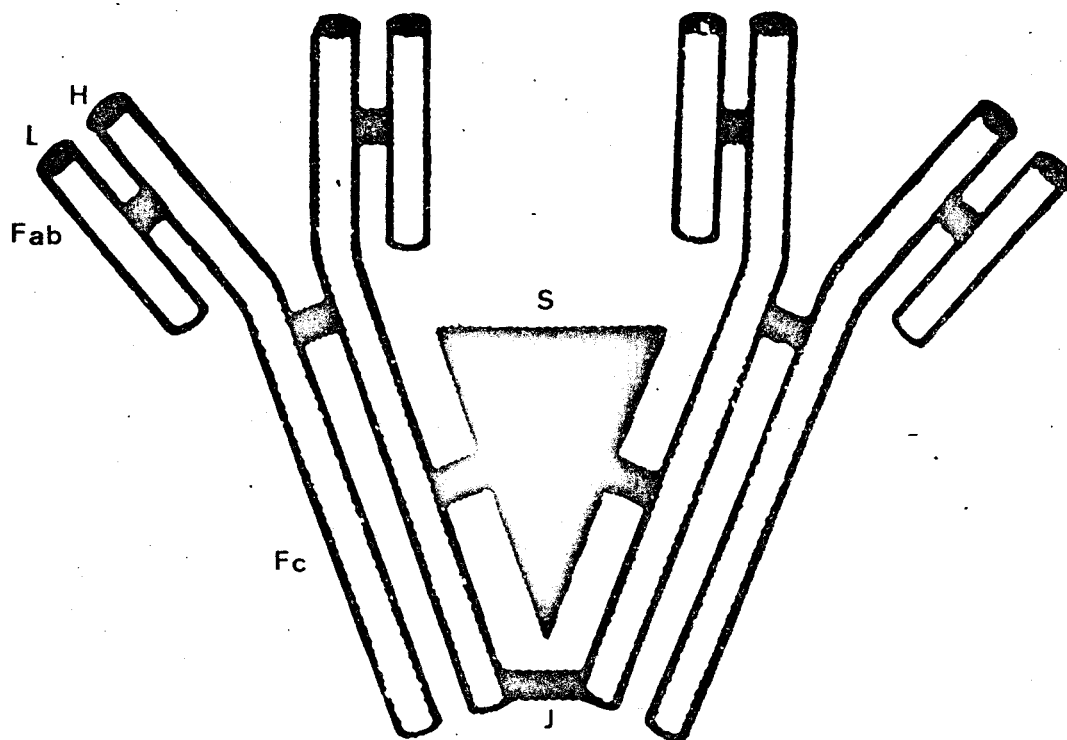


FIGURE 19

Schéma d'une molécule d'IgA de sécrétion, selon TOMASI et BIENENSTOCK (1968).

- H : chaîne lourde
- L : chaîne légère
- S : pièce de sécrétion
- J : pièce de jonction
- Fab : Fragment antigène-binding
- Fc : Fragment cristallisable



Le molécule proposé par HEREMANS en 1974 (Fig. 20 p.51 ) tient compte de la nature et des propriétés immunologiques de la pièce de sécrétion. La pièce de sécrétion réagit très fortement avec le sérum anti-pièce de sécrétion, elle possède des déterminants antigéniques accessibles ou non selon la stabilisation de la molécule, elle protège les sIgA de la protéolyse, de plus elle est très flexible.

Tout ceci a permis à HEREMANS d'établir un modèle dans lequel la pièce de sécrétion serait exposé en surface et enroulée d'un bout à l'autre des 2 fragments Fc des 2 molécules 7s faisant ainsi contact avec les 2 "hinge region". Ce modèle est de tous, celui qui est le plus satisfaisant. Il a l'avantage d'être en accord avec les connaissances actuelles sur les sIgA.

#### IV - CONFORMATION DES IMMUNOGLOBULINES

Les immunoglobulines sont des protéines possédant différentes fonctions biologiques. Durant ces dernières années, différentes études ont montré que les immunoglobulines étaient constituées de domaines et que chacun d'entre-eux possédait un ou plusieurs rôles biologiques bien définis. Ces études ont été jusqu'à présent bien établies dans le cas des IgG. Comme il existe des relations entre la conformation des IgG et celle du monomère des IgA nous décrirons les connaissances actuelles concernant la conformation des IgG.

##### A - NOTION DE DOMAINE

###### 1 - CONCEPT DE BASE

Les études de séquence de BOURGOIS et FOUGEREAU (1970) et de PREVAL et FOUGEREAU (1972) ont montré que les chaînes légères de type  $\kappa$  ou  $\lambda$  comprennent deux ponts disulfure intracaténaïres formant une boucle

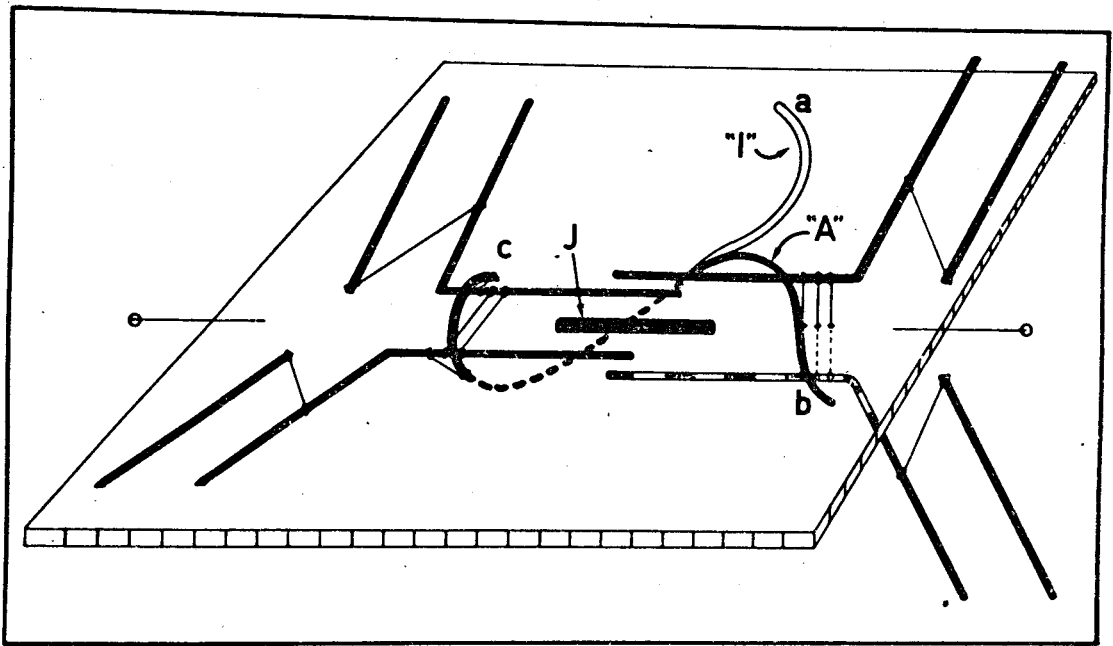


FIGURE 20

Schéma d'une molécule d'IgA de sécrétion selon HEREMANS (1974)

de 60 résidus d'acides aminés, disposés de la même manière dans les moitiés  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  terminales. Les chaînes lourdes  $\gamma$  possèdent 4 ponts disulfures intracaténaire régulièrement disposés dans 4 segments adjacents (un dans chaque fragment Fab et deux dans le fragment Fc). Ces fragments forment chacun une boucle comportant une soixantaine de résidus d'acides aminés, comme dans le cas des chaînes légères. Outre, ces remarques concernant la disposition des boucles, HILL et coll. (1966) ont observé des homologies internes dans la structure primaire du fragment Fc des chaînes  $\gamma$  de Lapin et deux zones d'homologies de 110 résidus d'acides aminés dans les chaînes légères.

Ces observations sont confirmées par les études d'EDELMAN et al. (1969) et d'EDELMAN et GALL (1969) qui postulent que les chaînes légères possèdent 2 domaines conformationnellement semblables :  $V_L$  et  $C_L$  et que la chaîne  $\gamma$  en possède 4 :  $V_H$ ,  $C_H^1$ ,  $C_H^2$  et  $C_H^3$ . Le même nombre de domaines a été caractérisé dans la chaîne  $\alpha$  des IgA par PUTNAM en 1974 et par KRATZIN et al. en 1975. Par contre les études de la séquence de la chaîne  $\mu$  d'une IgM par WATANABE et al. (1973) et par PUTNAM et al. (1973) et de la chaîne  $\epsilon$  d'une IgE par BENNICH et al. (1974) ont révélé l'existence d'un domaine constant supplémentaire :  $C\mu_4$  et  $C\epsilon_4$ .

## 2 - DEFINITION DES DOMAINES

Chaque région d'homologie (segment de 110 résidus d'acides aminés) forme un "domaine" spatial compact stabilisé par un pont disulfure. Ces domaines possèdent une autonomie thermodynamique, c'est-à-dire que leur structure tridimensionnelle peut être acquise indépendamment des autres domaines. Cette indépendance permettrait une évolution propre de chaque domaine et expliquerait que la sélection puisse favoriser l'acquisition de fonctions différentes par une même molécule (EDELMAN, 1970).



## B - MISE EN ÉVIDENCE DES DOMAINES

Les méthodes d'approche de la mise en évidence des domaines ont été des méthodes chimiques, physiques et biologiques.

### 1 - METHODE BIOLOGIQUE

L'utilisation d'enzymes a permis de mettre en évidence des domaines et des régions inter-domaines. En effet, les enzymes scindent la molécule de préférence dans les régions inter-domaines. Ceci suggère que les domaines sont compacts et joints par de petites zones de structure plus simple.

La fragmentation avec la papaïne (PORTER, 1959) ou avec la pepsine (NISONOFF et al., 1960) a permis de couper la molécule en 2, le fragment Fc est obtenu d'une part et le fragment F(ab)<sub>2</sub> de l'autre.

Ensuite, des coupures spécifiques ont permis d'isoler un domaine bien particulier. Ainsi, CATHOU et DORRINGTON en 1974 ont scindé la chaîne légère en 2 domaines : les domaines V<sub>L</sub> et C<sub>L</sub> et ELLERSON et al. en 1972 ont obtenu les domaines CH<sub>2</sub> et CH<sub>2</sub> à partir du fragment Fc.

### 2 - METHODE CHIMIQUE

L'analyse cinétique de la dénaturation des chaînes légères a montré que les domaines C<sub>L</sub> et V<sub>L</sub> peuvent se dénaturer et se renaturer indépendamment les uns des autres.

### 3 - METHODES PHYSIQUES

#### a - Dichroïsme circulaire (D.C.) et dispersion optique rotatoire (D.O.R.)

BJORK et al. (1971), GHOSE et JIRGENSONS (1971) trouvent que le spectre théorique d'un mélange équimolaire de domaine V<sub>L</sub> et C<sub>L</sub> est semblable au spectre obtenu expérimentalement à partir d'une chaîne

légère donc la chaîne légère est bien composée d'une zone  $V_L$  et d'une zone  $C_L$ . La comparaison des spectres (DC) de différents domaines suggère que des différences de conformation existent entre ces domaines. L'étude en DC et DOR des chaînes isolées n'expliquent pas entièrement la conformation de la molécule entière.

#### b - Microscopie électronique

La microscopie électronique des immunoglobulines libres ou combinées aux antigènes révèlent l'existence de régions rigides reliées par des régions flexibles (GREEN, 1969).

#### c - Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet d'établir la structure tertiaire de fragment cristallisé d'une molécule d'immunoglobuline. Les études sont en majorité faites sur les IgG. Les IgA ayant le même nombre de domaines auront sûrement une structure globale analogue.

#### $\alpha$ - Structure des domaines

POLJAK et al. (1973) ont établi que chacun des domaines de la région Fab d'une immunoglobuline de type IgG<sub>1</sub> peut être inclus dans un parallélépipède de 40 x 25 x 25 Å. Chaque domaine (Fig. 21 p. 55) est composé de 7 segments à peu près linéaires ( $fx_{1,2,3,4}$  et  $fy_{1,2,3}$ ) qui forment une structure  $\beta$  plissée anti-parallèle. Ces segments sont joints par d'autres segments ( $b_1$  à  $b_6$ ) de longueur variable qui possèdent une structure hélicoïdale ou une structure random-coil. A la fin de la séquence de chaque domaine il y a quelques résidus ( $e_1$  et  $e_2$ ) qui ne possède pas une structure  $\beta$ -plissée.

Les segments  $fx_{1,2,3,4}$  et  $fy_{1,2,3}$  forment deux faces parallèles reliées par un pont disulfure intrachaine. La face y du domaine est

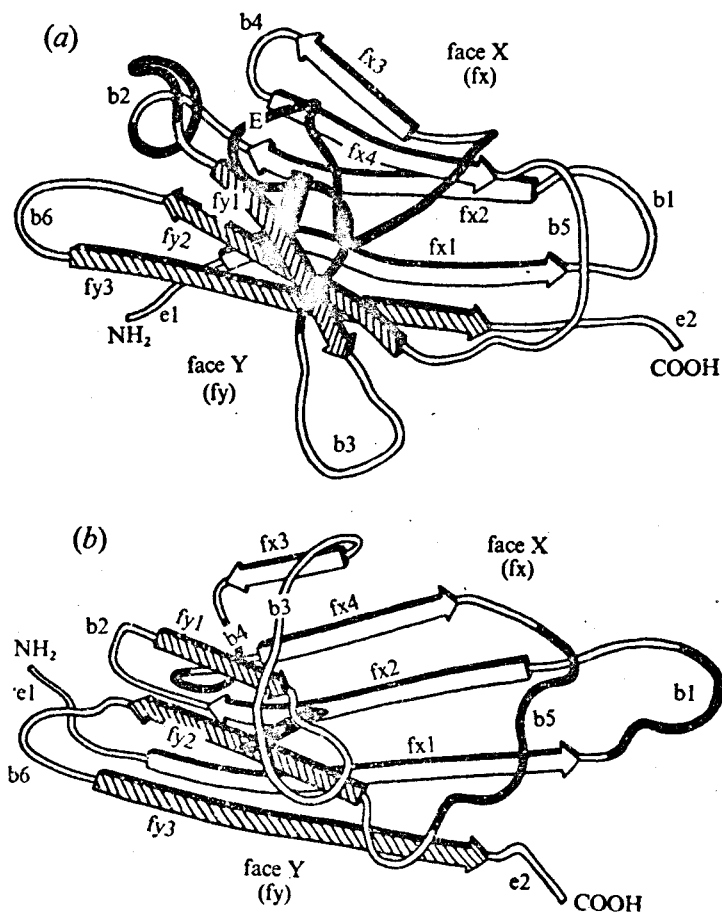


FIGURE 21

Structure tridimensionnelle d'un domaine d'immunoglobuline établie par diffraction des rayons X (EDMUNSON et al., 1975)

- (a) domaine variable
- (b) domaine constant



allongée d'une boucle supplémentaire (E) qui établit le contact entre les domaines. De nombreuses liaisons ponts disulfure se forment entre les couches  $\beta$  plissées. Les résidus d'acides aminés situés à l'intérieur des deux faces sont hydrophobes. L'un d'entre-eux est le tryptophane que l'on retrouve toujours à côté de 2 résidus de cystéine qui permettent d'établir un pont disulfure intracaténaire.

### $\beta$ - Structure des inter-domaines

Entre les fragments Fc et Fab il existe une zone accessible aux agents de protéolyse. Cette région appelée région charnière ou "hinge region" comprend une quinzaine de résidus d'acides aminés dont plusieurs résidus de proline et de cystéine qui sont accessibles et qui sont impliqués dans les ponts intercaténaux. Cette région allongée et flexible permet aux deux fragments Fab de prendre des positions différentes ainsi la molécule Ig peut se présenter soit sous la forme d'un T, soit sous la forme d'un Y.

### $\gamma$ - Localisation des oligosaccharides

Toutes les chaînes lourdes possèdent des oligosaccharides. Leur localisation est montrée dans la Fig. 22 p. 57. Les IgG ont un site de fixation pour l'oligosaccharide en (c) dans le domaine  $C\gamma_2$ .

Les IgM ont un site de fixation dans le domaine  $C\mu_1$  (f) et dans le domaine  $C\mu_2$  (h) et 2 dans le domaine  $C\mu_3$  (a et c). Les IgE ont 3 sites de fixation dans le domaine  $C\epsilon_1$  (g, d et h), un dans le domaine  $C\epsilon_2$  (b) et deux dans le domaine  $C\epsilon_3$  (c). Toutes les IgA ont un site commun dans le domaine  $C\alpha_2$  (e). Les autres sites sont situés au niveau de la "hinge region", du domaine  $C\alpha_1$ , de la région entre les domaines  $C\alpha_2$  et  $C\alpha_3$  et de l'extrémité C terminale de la chaîne polypeptidique (Fig. 19 p. 30).

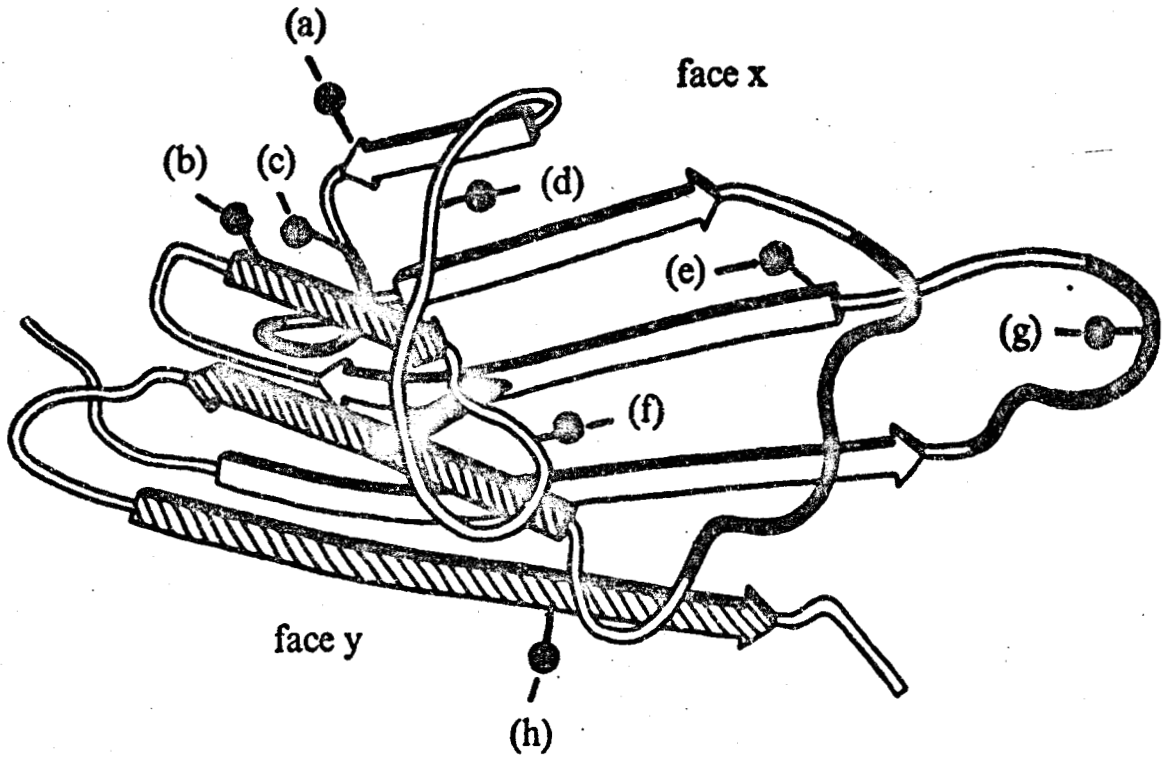


FIGURE 22

Localisation des glycanes à l'intérieur d'un domaine (EDMUNDSON et al., 1975) pour les différentes classes d'immunoglobulines.



Les glycanes, à cause de leur taille et de leur hydrophilie sont exclus de l'intérieur des domaines et peuvent ainsi influencer les contacts interdomaines.

### C - CONTACTS INTER-DOMAINES

La molécule d'immunoglobuline possède un axe central de symétrie et deux axes latéraux au niveau des fragments Fab (Fig. 23 p. 59). Ce schéma de DORRINGTON (1978) montre les interactions qui peuvent exister : interactions protéine-protéine, interactions protéine-glycane. Les interactions protéine-protéine sont soit des interactions mineures longitudinales entre les domaines  $C_L$  et  $V_L$  de la chaîne légère ou entre les domaines  $C_H^1$  et  $V_H$  de la chaîne lourde, soit d'interactions majeures entre les domaines  $V_H$  et  $C_L$ ,  $C_L$  et  $C\gamma_1$  et entre les 2 domaines  $C\gamma_3$  (Fig. 23 p. 59).

Il existe de plus, des interactions protéine-glycane. Les glucides occupent une position fixe dans la molécule. Ils jouent un rôle dans l'interaction des régions Fab et Fc (Fig. 14 p. 32). Le domaine  $C\gamma_1$  est en contact avec le domaine  $C\gamma_2$  par l'intermédiaire des glycanes. Il en est de même pour les domaines  $C\gamma_2$ . Par contre, le domaine  $C_L$  n'a d'interactions ni avec le domaine  $C\gamma_2$  ni avec la chaîne glycanique (Fig. 14 p. 32 et Fig. 23 p. 59).

### D - RÔLE DES DOMAINES

L'hypothèse d'EDELMAN et al. (1969) proposant que les différents domaines des immunoglobulines pouvaient avoir différentes fonctions biologiques, s'est révélée être juste. En effet, les recherches actuelles ont permis d'attribuer aux différents domaines les rôles biologiques résumés dans la Fig. 24 p. 60.

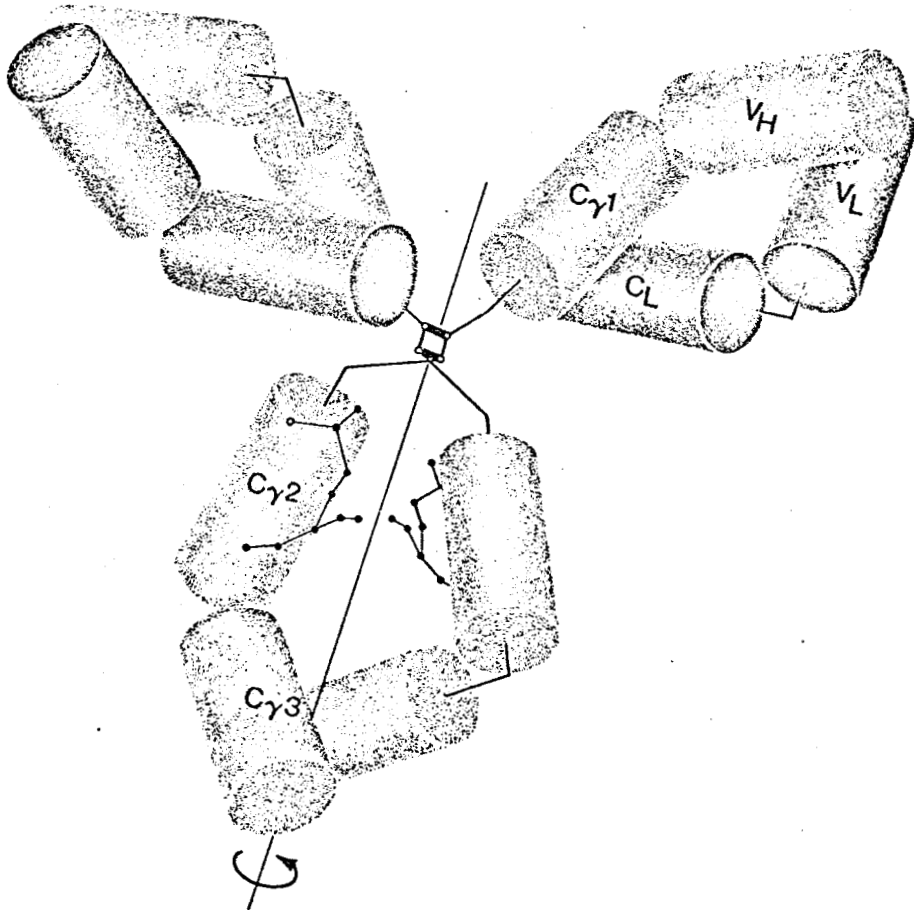


FIGURE 23

Un modèle de molécule d'IgG basée sur des données de diffraction des rayons X. Chaque cylindre représente un domaine compact (DORRINGTON, 1978).



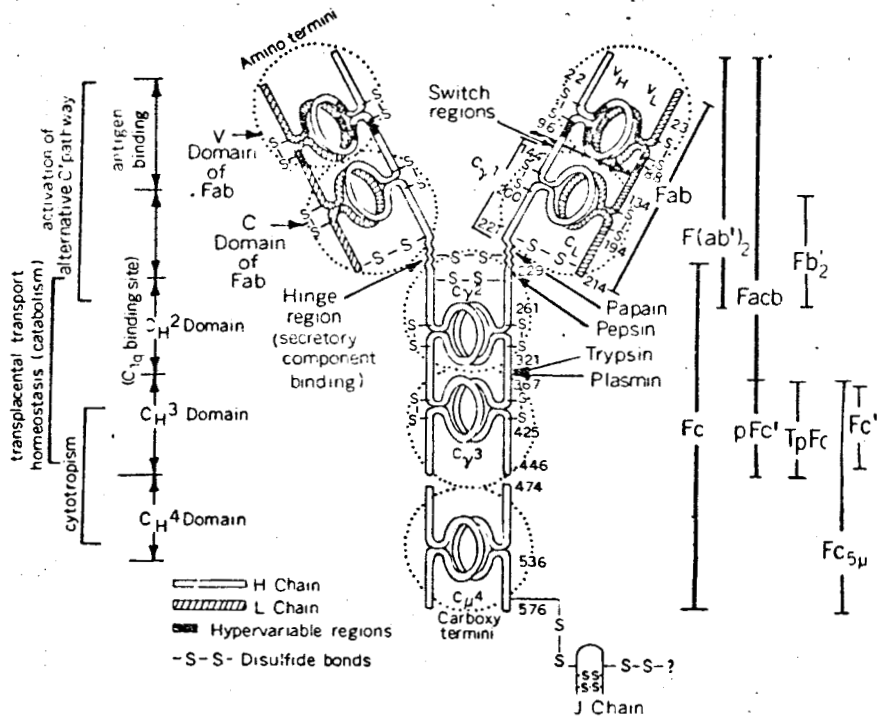


FIGURE 24

Structure d'une immunoglobuline (WINKELHAKE, 1978). Localisation des fonctions des différentes régions de la molécule.





## 1 - ROLE DES DOMAINES DE LA REGION VARIABLE

La région hypervariable est directement en contact avec l'antigène. C'est le site de combinaison à l'antigène. Le plus souvent ce site se trouve en surface de la molécule dans une enclave peu profonde (POLJAK et al., 1973) ou parfois dans une cavité plus profonde (PADLAN et DAVIES, 1975).

## 2 - ROLE DES DOMAINES DE LA REGION CONSTANTE

Les domaines de la région constante sont responsables des fonctions secondaires des molécules d'immunoglobulines (SPIEGELBERG, 1974). Ces fonctions sont restées stables au cours de l'évolution, comme d'ailleurs la structure des domaines. La position de la chaîne polypeptidique sur laquelle les glycanes sont attachés est remarquablement conservée quelque soit la classe des immunoglobulines (Fig. 13 p. 30). D'autre part, ce nombre de résidus d'acide aminé hydrophobe par molécule est invariant (POLJAK et al., 1976).

Les rôles joués par les différents domaines de la région constante sont les suivants :

- a) L'activation du composant  $C_{1q}$  du complément (AUGENER et al., 1971) qui se fixe au niveau du domaine  $C_H2$ . L'activation de la voie alterne  $C'$  se fait au niveau du fragment Fab (LOOS et al., 1972).
- b) Le cytotropisme qui a lieu au niveau du fragment Fc est particulièrement dans les domaines  $C_H3$  et  $C_H4$ . Comme exemple de cytotropisme nous pouvons citer la fixation du complexe antigène-anticorps au macrophage (AREND et MANNIK, 1972) et celle des IgE sur les macrophages (CAPRON et al., 1975). La fixation des IgE aux cellules basophiles ou aux mastocytes se fait en l'absence d'antigène. L'interaction des IgE adsorbées et d'un antigène entraîne, sans dommage pour la cellule, la libération de substances chimiotactiques (HUBSCHER et al., 1974).

c) La régulation du métabolisme se fait également par l'intermédiaire du fragment Fc en particulier la demi-vie des immunoglobulines circulantes et leur production sont régulées par ce fragment.

d) Les domaines de la zone constante permettent également le transport trans-placentaire des immunoglobulines, ainsi que leur transport du sérum maternel vers le colostrum (PITTARD et al., 1977).

e) Les domaines C<sub>H</sub>1 et C<sub>L</sub> ont un rôle d'espaceur entre le site de combinaison à l'antigène et les autres fonctions (DORRINGTON et PAINTER, 1974). Le rôle d'espaceur pourrait aussi être joué par les glycanes.

## E - CONCLUSION

Les immunoglobulines sont constituées de 4 chaînes polypeptidiques, 2 chaînes lourdes et 2 légères. Chaque chaîne est composée de domaines compacts dont la structure et le rôle commence à être bien connu. La molécule d'anticorps a deux fonctions indépendantes : une fonction de reconnaissance de l'antigène, et une fonction effectrice qui se traduit par la fixation du complément, la fixation à certaines cellules, et le transfert placentaire. La dualité fonctionnelle des Ig se retrouve dans la structure, en effet, cette structure présente une certaine stabilité ce qui permet d'expliquer la conservation des sites effecteurs au cours de l'évolution et une certaine variabilité qui permet d'expliquer la spécificité antigénique des immunoglobulines.

## V - BIOSYNTHESE DE LA MOLECULE D'IGA DE SECRETION

### A - ORIGINE DES IMMUNOBLASTES

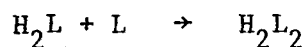
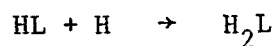
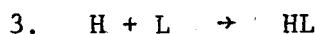
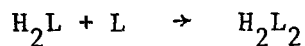
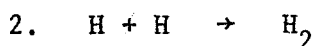
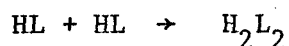
Les plaques de PEYER sont des formations lymphoïdes particulières, situées au niveau des bronches, de l'intestin et de l'appendice, qui contiennent des lymphocytes B et T.

La présence d'un antigène dans les plaques de PEYER provoque la transformation des lymphocytes en lymphoblastes. Après division blastique, les immunoblastes IgA migrent, d'abord vers la lymphe, puis à travers le conduit thoracique vers la circulation, GOWANS et KNIGHT (1964), CRAIG et CEBRA (1971). Certaines cellules vont se loger dans la lamina propia du tube respiratoire ou dans l'épithélium du sein, RUDZIK et al. (1975), GOLDBLUM et al. (1975). La plupart des cellules retournent à la lamina propia de l'intestin où elles se différencient en cellules plasmiques, cellules qui synthétisent des IgA et qui ont une durée de vie d'environ 5 jours, GOWANS et KNIGHT (1964), PIERCE et GOWANS (1975). La présence d'un antigène dans la muqueuse est un facteur déterminant du retour des cellules précurseur de la synthèse d'anticorps à l'intestin, PIERCE et GOWANS (1975).

### B - FORMATION DE LA MOLÉCULE D'IMMUNOGLOBULINE

L'assemblage des chaînes se fait en plusieurs étapes, DORRINGTON (1978) a étudié la formation d'une molécule d'IgG. La première étape consiste au plissement individuel des chaînes H et L qui acquièrent ainsi leur caractéristique de structure secondaire et tertiaire. L'unité de base est le domaine et le plissement des

domaines peut avoir lieu avant que la chaîne polypeptidique complète ne soit libérée du ribosome. Dans la seconde étape il y a association non covalente des chaînes H et L dans les citernes du réticulum endoplasmique. La formation de la molécule à 4 chaînes, n'a lieu que lorsque les chaînes H (ou les demi-molécules HL) sont rejetés. L'association non covalente des chaînes H et L conduit à l'expression de l'activité du site antigénique. La troisième étape est celle de la formation des ponts disulfure entre les unités H et L et les unités H et H. Trois chemins d'assemblage covalent ont été décrits qui dépendent de la classe ou de la sous-classe de l'immunoglobuline étudiée :



L'expression des fonctions biologiques secondaires est permise grâce à l'intégrité des ponts disulfure interchaînes. L'addition des oligosaccharides se fait ensuite dans une quatrième étape lorsque la molécule d'immunoglobuline est transportée au travers du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. La cinquième étape consiste en la polymérisation de la molécule et en l'addition de chaîne supplémentaire : pièce de jonction et pièce de sécrétion.

## C - FORMATION DE LA MOLÉCULE DE SIgA

En ce qui concerne l'assemblage de la chaîne J aux polymères d'IgA ou d'IgM, les travaux de CHAPUIS et KOSHLAND (1975), montrent que dans les IgA tétramériques, la formation du dimère-chaîne J entraîne l'assemblage des 2 autres monomères par des ponts disulfure.

Trois modèles expliquant l'assemblage des IgA de sécrétion dans la muqueuse intestinale sont présentés dans la revue générale de LAMM (1976) (Fig. 25 p. 66).

Les IgA dimériques sériques dans le lamina propria dérivent en grande partie des cellules plasmatiques locales ; il est possible qu'une petite partie ait son origine dans le sérum. Les IgA dimériques traversent la membrane basale et atteignent l'espace interépithélial.

Le premier modèle d'assemblage suppose que la pièce de sécrétion est sécrétée vers l'espace intercellulaire et que là elle se combine au dimère d'IgA. La molécule d'IgA de sécrétion entre dans la cellule épithéliale par un processus de pinocytose, puis elle est sécrétée vers le lumen.

Le deuxième modèle considère que la pièce de sécrétion est un récepteur membranaire. L'assemblage s'effectue dans la membrane plasmatique. Une fois à l'intérieur de la cellule épithéliale, la molécule d'IgA de sécrétion est sécrétée vers le lumen.

Le troisième modèle suppose que la molécule d'IgA dimérique est pinocytée. La vésicule pinocytotique se fusionne avec une vésicule qui dérive du Golgi et qui contient la pièce de sécrétion. Donc, l'assemblage est intracellulaire, la molécule d'IgA de sécrétion est ensuite sécrétée.

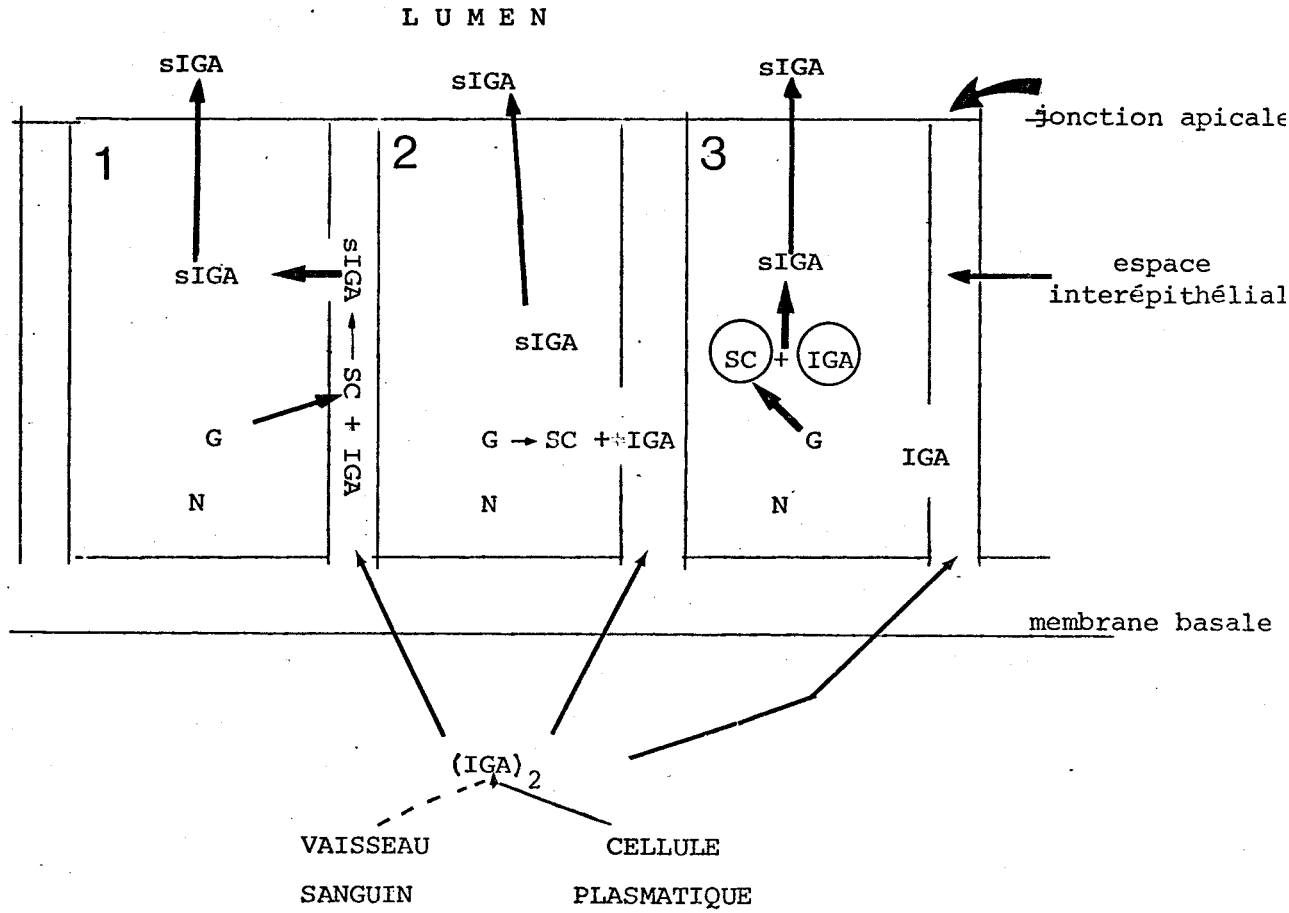


FIGURE 25 Trois modèles d'assemblage des IgA de sécrétion

- 1: l'assemblage pièce de sécrétion-IgA s'effectue dans l'espace interépithéliale
- 2: la pièce de sécrétion est un récepteur membranaire
- 3: l'assemblage s'effectue à l'intérieur de la cellule épithéliale

N = noyau

G = golgi

SC= pièce de sécrétion

(IGA)<sub>2</sub> = IgA dimériques

sIGA = IgA de sécrétion



L'addition des glucides à la molécule d'IgA a été étudiée par DELLA CORTE et PARKHOUSE (1973) sur des IgA myélomateuses. Ces résultats montrent que les résidus de fucose sont incorporés les derniers, juste au moment de la sécrétion.

D'autre part, les travaux de HICKMAN et al. (1977) montrent que la glycosylation des IgA est nécessaire pour leur sécrétion. Ils utilisent la tunicamycine, antibiotique qui bloque la formation des intermédiaires lipidiques N-acétyl glucosaminidiques, pour bloquer la glycosylation.

## VI - ROLE BIOLOGIQUE DES sIgA

Les propriétés et les fonctions biologiques des IgA se distinguent sur le plan biochimique de celles des autres anticorps. En effet, les IgA ne sont pas de bons anticorps précipitants. Elles ont d'autres rôles : activation du complément à partir de C<sub>1</sub>, opsonisation, activité homocytotrope pour les mastocytes ; leur affinité pour l'antigène est relativement faible.

Les propriétés bien établies des IgA consistent en :

- la neutralisation des virus
- l'agglutination des bactéries
- la limitation de l'adsorption des bactéries aux muqueuses
- l'inhibition de l'absorption digestive des antigènes
- l'activation du complément par la voie alterne
- la régulation des réponses immunes.

En effet, KNOP et al. (1971) montrent que les IgA de sécrétion activent le complément. SPIEGELBERG et GÖTZE (1972), montrent que des agrégats chimiques d'IgA sériques myélomateuses peuvent transformer le composant préactivateur  $C_3$  en composant  $C_3$  activé : activation du complément par la voie alterne. Les travaux de BOACKLE et al. (1974), montrent que des agrégats de fragments  $F_{ab}$  et des IgA de sécrétion ou sériques réagissent avec le complément. La pièce de sécrétion n'étant pas nécessaire dans ces interactions.

De plus, les IgA de sécrétion jouent un rôle essentiel dans la protection antivirale et dans la protection contre les bactéries.

Les sIgA peuvent réduire la phagocytose, l'hydrophobicité de surface et la charge de bactéries comme *Salmonella typhimurium* (MAGNUSSON et al. 1979). Elles ont des réactions d'opsonisation à l'égard de certaines bactéries : *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron* (BJORNSON et BJORNSON, 1978). Elles sont liées à des structures particulières de la peau de patients atteints de dermite herpésiforme (YAOÏTA, 1978). Elles ont des réactions de prophylaxie contre les méningococques (POKROVSKI et al., 1978).

ADINOLFI et al. (1966) montrent la lyse d' *Escherichia coli* *in vitro* en présence d'IgA de sécrétion, de lysosyme et d'une solution diluée de sérum humain.

KNOP et al. (1971) montrent *in vivo* une action bactéricide d'*E. coli* qui avait été traitée avec des IgA de sécrétion.

Les sIgA représentent la première ligne de défense des muqueuses contre les agressions par les agents pathogènes et agissent en synergie avec d'autres moyens de défense de l'organisme.



Elles empêchent les bactéries d'adhérer à la surface des muqueuses.

En effet, WILLIAMS et GIBBONS (1972) montrent que les IgA de sécrétion isolées du fluide parotidal inhibent l'adhérence de *Streptococcus* dans les cellules épithéliales. De même, elles préviennent contre l'adhésion d'*Escherichia Coli* au niveau des cellules épithéliales du tractus urinaire (SVANBORG-EDEN et SVENNERHOLM, 1978).

Elles protègent activement la paroi intestinale. D'ailleurs ENGSTROM et al. (1978) montrent qu'une déficience des IgA de sécrétion existe dans le cas de maladie inflammatoire intestinale et dans le cas de colite ulcéraire (PATRONE et al., 1978). En particulier, les sIgA ont un rôle important dans la défense de l'intestin du nourrisson. Il semble qu'elle soit assurée par l'association des IgA, du lysosyme et de la lactotransferrine. Ainsi, BULLEN et al. (1972) suggèrent que les immunoglobulines lactées associées aux transferrines inhibent *in vivo* la croissance des bactéries dans l'intestin du nouveau-né.

SPIK et al. (1978) montrent que l'association des IgA du lait de Femme ou des IgG<sub>1</sub> colostrales bovines avec les transferrines natives, sériques ou lactées, inhibe *in vitro* la croissance de *Escherichia coli* au moins pendant 3 heures. Ceci n'a pas lieu lorsque les transferrines sont saturées en fer.

Les travaux de STOLIAR et al. (1976) montrent que les IgA du lait de Femme inhibent les entérotoxines produites par *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*. Le transfert passif des IgA aux enfants nourris au sein peut expliquer l'absence chez ces nourrissons de diarrées provoquées par des infections de *Escherichia coli*.

SCHOUB et al. (1977) montrent que l'allaitement au sein prévient les gastroentérites infantiles et diminue la mortalité.

Le principe actif antiinfectieux du lait contre les entérobactéries est représenté essentiellement par les sIgA (HANSON et al., 1978).

Enfin, des études récentes ont été effectuées sur des patients atteints de maladies hépatiques.

Les IgA sont retrouvées sur les hépatocytes aussi bien de sujets normaux que de sujets atteints de troubles hépatiques. Cependant le taux des IgA est plus élevé, dans le cas de cirrhose alcoolique (HOPF, 1978) dans les cellules hépatiques et dans le sérum.

HOPF et al. en 1979 montrent que les IgA d'un patient adhèrent *in vitro* à des hépatocytes de Lapin et que cette réaction n'a pas lieu avec des IgA provenant d'un sujet normal. Ils en concluent que les deux types d'IgA diffèrent et que l'hépatocyte peut avoir trois rôles spécifiques possibles : l'élimination des complexes Ag-IgA par le foie, l'élimination des IgA sériques en excès ou le transport des IgA par la bile vers l'intestin.

## VII - CONCLUSION

La différence essentielle entre IgA de sécrétion et les IgA sériques est la présence de la pièce de sécrétion qui protège la molécule d'IgA et lui confère en même temps des déterminants antigéniques caractéristiques. La structure primaire des IgA est bien connue, il n'en est pas de même pour les structures glycaniques. De plus, toutes les études de structure ont été effectuées sur des protéines sériques myélomateuses.

Compte tenu de l'importance des IgA dans la défense des muqueuses et de son taux élevé en glucides, notre but a été de déterminer les structures glycaniques des IgA du lait de Femme, afin d'étudier par la suite l'interaction de ces glycannes dans les différents rôles biologiques des IgA.

## MATERIELS ET METHODES

## I - PREPARATION ET ANALYSE DES IgA

Nous utilisons dans les grandes lignes le procédé de fractionnement du lait maternel, mis au point par MONTREUIL et coll. (1960) modifié par DESCAMPS (1974) qui associe un gradient de pH à un gradient de concentration en sulfate d'ammonium.

### A - PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

Le lait maternel provenant du lactarium est délipidé par centrifugation à 10.000 tours dans un rotor "Spinco Batch" pendant 30 minutes à 4°C. Après une dialyse de 4 jours contre de l'eau, il est décaséiné : le lait est amené à pH 4,6 avec de l'HCl 0,1 N, et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le lactosérum ainsi obtenu est amené à pH 7 par  $\text{NH}_4\text{OH}$  4N et lyophilisé. Le lactosérum lyophilisé est redissous dans un volume d'eau distillée nécessaire pour obtenir une solution à 3 % (p/v).

Le lactosérum subit une série de précipitations au sulfate d'ammonium. En premier lieu il est précipité à 33 % de saturation en sulfate d'ammonium à pH 7 afin d'obtenir le précipité  $P_1$ . Le précipité  $P_2P_4$  très riche en immunoglobulines IgA est obtenu à pH 7 et à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. Ce précipité est redissous dans l'eau distillée, dialysé quatre jours contre de l'eau et lyophilisé. Le reste du lactosérum est conservé il ne contient pas d'IgA.

## B - PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ P<sub>2</sub>P<sub>4</sub>

La purification du précipité P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> s'effectue par chromatographie de gel filtration et par chromatographie d'échanges d'ions, selon le schéma de la Figure 26 p. 74.

### 1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE QAE-SEPHADEX

La purification du précipité P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> s'effectue en premier lieu sur une colonne de QAE Sephadex A-50 (Pharmacia - Fine Chemicals) (7,5 x 40 cm) stabilisée dans le tampon Tris-HCl 0,01 M pH 8. Le précipité P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> est dissous dans le même tampon et dialysé contre ce tampon pendant 2 jours à +4°C. Le dialysat est réajusté à pH 8 avec une solution de NH<sub>4</sub>OH 4N et la concentration finale est de 5 % (p/v). L'élution de la fraction non retenue sur QAE-Sephadex s'effectue avec le tampon de départ. Les autres fractions sont obtenues par addition de NaCl au tampon Tris-HCl 0,1M pH 8. La première fraction est éluée par addition de NaCl 0,1M et la seconde par addition de NaCl 1M. Le débit de l'élution est de 60 ml/h et les fractions recueillies sont de 20 ml.

### 2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SP-SEPHADEX

La fraction non retenue sur QAE-Sephadex est chromatographiée sur colonne de SP-Séphadex (Pharmacia) (3 x 20 cm) stabilisée dans l'eau. Le débit de la colonne est de 20 ml/h et les fractions recueillies sont de 5 ml. La fraction non retenue est directement lyophilisée. La fraction retenue est éluée par une solution d'acétate de sodium à 0,4 M, dialysée contre de l'eau et lyophilisée.

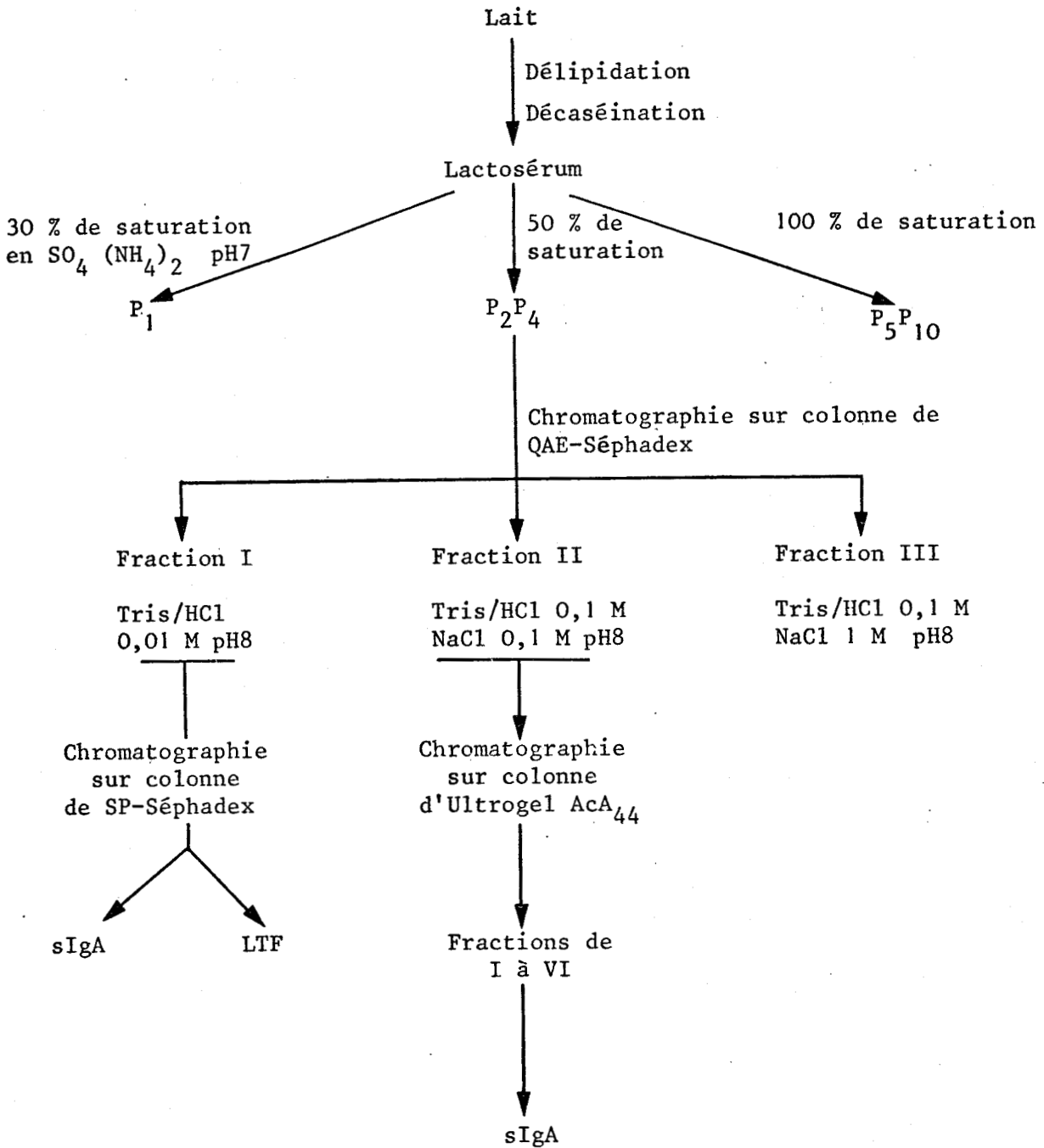


FIGURE 26

Schéma de fractionnement du lait utilisé pour la purification des sIgA.



### 3 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ULTROGEL AcA<sub>44</sub>

La purification de la 1ère fraction retenue sur QAE-Séphadex chromatographiée sur colonne d'Ultrogel AcA<sub>44</sub> (LKB, IBF). Nous utilisons deux colonnes couplées de type Pharmacia (5 x 100 cm). Le gel est stabilisé dans le tampon d'élution : Tris-HCl 0,1 M-NaCl 1 M pH 8. Le débit utilisé est de 32 ml/h. Les fractions recueillies sont de 16 ml.

## C - CONTROLE DE L'HOMOGÉNÉITÉ DES PRÉPARATIONS D'IGA

Chaque fraction est analysée par électrophorèse sur acétate de cellulose et par immunoelectrophorèse sur gélose afin de vérifier l'homogénéité des préparations d'IgA.

### 1 - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE

Les électrophorèses sont réalisées sur des bandes de 2,5 cm x 16 cm fournies par POLIPHOR, dans le tampon LAURELL (1957) pH 8,6, et sous une tension de 120 V pendant 2 heures. La révélation des protéines est réalisée par le réactif à l'Amidoschwartz.

### 2 - IMMUNOELECTROPHORESE SUR GELOSE

Les immunoelectrophorèses sont effectuées selon la méthode de GRABAR et WILLIAMS (1955), modifiée par SCHEIDEGGER (1955). L'électrophorèse sur gélose, effectuée dans un tampon véronal pH 8,2 et sous une tension de 30 V pendant 90 minutes, est suivie d'une diffusion de 48 heures contre un sérum de Lapin anti-protéides lactées et un sérum de Cheval anti-protéines sériques. La révélation des protéides est réalisée par le réactif à l'Amidoschwartz.

## II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES IgA

### A - COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION

#### 1 - PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

L'étude de la constante de sédimentation d'une solution d'IgA à 10 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 0,1M, NaCl 1 M pH 8 s'effectue dans une ultracentrifugeuse Beckman modèle E.

#### 2 - PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR COUCHE MINCE

La méthode utilisée est celle décrite par LAINE et al. (1977).

### B - MASSE MOLÉCULAIRE

La masse moléculaire des IgA lactées a été déterminée par équilibre de sédimentation dans une ultracentrifugeuse Beckman modèle E, selon la méthode de YPHANTIS (1964), modifiée par CHERVENKA (1970). La solution d'IgA est à une concentration d'1 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, NaCl 1 M pH 8.

### C - COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

La composition en acides aminés est déterminée à l'Auto-analyseur Beckman. "Multichrom S 120 B" après hydrolyse acide des IgA selon la méthode décrite par SPACKMAN et al. (1958) modifiée par CHARET et al. (1973). L'hydrolyse des IgA s'effectue en tubes scellés sous vide, par l'acide chlorhydrique 5,6 N bidistillé, pendant 24 h, 48 h et 72 h dans une étuve à 105°C.



## D - COMPOSITION EN GLUCIDES

### 1 - COMPOSITION CENTESIMALE

Les oses "neutres" ont été dosés par la méthode colorimétrique à l'orcino1-sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (1929), modifiée par RIMINGTON (1931, 1940).

Les osamines sont dosées par la méthode colorimétrique d'ELSON et MORGAN (1933), modifiée par BELCHER et coll. (1954), après avoir été libérées par une hydrolyse effectuée en présence de 1'HCl 4 N pendant 4 heures à 100°C.

Les acides sialiques sont dosés par la méthode à la diphénylamine de NIAZI et STATE (1948), modifiée par WERNER et ODIN (1952).

Les protocoles expérimentaux sont ceux préconisés par MONTREUIL et SPIK (1963).

### 2 - COMPOSITION MOLAIRE

Les rapports molaires des glucides sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse, selon le procédé décrit par ZANETTA et al. (1972).

## III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

### A - ISOLEMENT DE LA "HINGE REGION"

#### 1 - HYDROLYSE TRYPSIQUE ET PEPSIQUE DES sIgA

##### a - Principe

Nous utilisons la méthode décrite par FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) qui consiste à séparer la "hinge région" renfermant les glycanes liés O-glycosidiquement des autres glycanes liés N-glycosidiquement. La "hinge region" est très riche en proline et elle est peu sensible à l'hydrolyse par la trypsine et la pepsine.

b - Mode opératoire

Les IgA provenant du précipité  $P_2P_4$  sont précipitées à l'éthanol afin d'éliminer des oligosaccharides libres. Ensuite les IgA sont soumises à une hydrolyse trypsique, puis à une hydrolyse pepsique.

$\alpha$  - Hydrolyse trypsique

A une solution d'1 g d'IgA dans 100 ml de bicarbonate d'ammonium 0,2 M à pH 8,3 on ajoute la trypsine (Trypsin-DFP Worthington Biochemical Corporation) dans le rapport 1 pour 50 (E/S). L'enzyme est activé par addition préalable de 2 ml d'acétate de calcium 0,01 M, pendant 30 minutes avant l'emploi. L'addition de trypsine est renouvelée toutes les 4 heures. L'hydrolyse est faite à 37°C en présence d'une goutte de toluène. Le pH est maintenu à 8,3 pendant 15 heures par de l' $NH_4OH$  0,1 N (pH-stat). L'arrêt de l'hydrolyse se fait par abaissement du pH à 5,3. La solution est ensuite lyophilisée.

$\beta$  - Hydrolyse pepsique

L'hydrolysats trypsique est hydrolysé par la pepsine (Pepsin Krist. Lyophilisiert 100 mU/mg Merck) dans le rapport 1 pour 50, et dans une solution d'acide formique à 5 %, qui maintient le pH à 1,5 pendant l'hydrolyse. La durée de l'hydrolyse est de 15 heures, elle s'effectue à 37°C. L'arrêt de l'hydrolyse se fait par élévation du pH à 3. L'hydrolysats est concentré à l'évaporateur rotatif, repris plusieurs fois par de l'eau et lyophilisé.

2 - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE-PEPSINE DES IgA

L'hydrolysats trypsique-pepsique est fractionné sur une colonne de Biogel P-30 (200-400 mesh (Bio-Rad) (4 x 130 cm), stabilisée dans une solution molaire d'acide acétique. Le débit du fractionnement est

de 23 ml/h. Les fractions recueillies sont de 7,5 ml. Le repérage des fractions glycopeptidiques est effectué par le réactif au phénol-sulfurique, selon la méthode de DUBOIS et al. (1956).

## B - PRÉPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES

La fraction glycopeptidique totale alcali-stable obtenue lors du fractionnement sur Biogel P-30 est soumise dans un premier temps à une hydrolyse pronasique, puis à une purification des glycopeptides.

### 1 - HYDROLYSE PRONASIQUE

Nous avons appliqué dans ces grandes lignes le procédé de YAMASHINA et MAKINO (1952), modifié par MONSIGNY et al. (1968).

A une solution d'1 g de fraction glycopeptidique totale alcali-stable dans 100 ml d'acétate de calcium 0,01 M, on ajoute 20 mg de pronase (Calbiochem). L'hydrolyse est effectuée à pH 7,8 et à 37°C, sous agitation, pendant 72 heures, en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,15 N, contrôlée par un titrateur automatique (pH-stat TTT IC Radiometer). L'hydrolysats est ensuite ajusté à pH 4,5 avec l'acide acétique glacial, puis concentré à 10 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange est maintenu pendant 2 heures à la température du laboratoire puis à 4°C pendant 18 heures. Le précipité recueilli par centrifugation est redissous dans l'eau, puis lyophilisé.

### 2 - PURIFICATION DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE

L'hydrolysats pronasique est chromatographié sur une colonne de Biogel P-30 (200-400 mesh) (4 cm x 130 cm), stabilisée dans une solution molaire d'acide acétique. Les fractions phénol-positives

sont récupérées, rassemblées, puis lyophilisées.

### 3 - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES

#### a - Par chromatographie d'échanges d'ions

Les glycopeptides sont chromatographiés sur une colonne de Dowex 1 x 2 (200-400 mesh) (Bio-Rad) (3 x 22 cm) stabilisée dans l'acétate de pyridine 2 mM pH 5. La fraction neutre est obtenue par élution dans le même tampon, elle est ensuite diluée avec de l'eau distillée et lyophilisée. La fraction acide est obtenue par passage sur la colonne d'une solution d'acétate de pyridine 350 mM pH 5. Elle est également diluée et lyophilisée.

#### b - Par électrophorèse sur papier

La séparation des glycopeptides pronasiques se fait ensuite par électrophorèse préparative en toit, sur papier Whatman 3. Le dépôt est d'1 mg de glycopeptide par cm. Les systèmes tampons utilisés sont les suivants :

- pH 2,4 : acide acétique/eau (6 : 94 ; v/v)
- pH 6,5 : pyridine/eau/acide acétique (25 : 225 : 1 ; v/v/v).

Les électrophorèses sont réalisées pendant 18 heures sous une tension de 10V/cm.

Après séchage du papier et repérage des glycopeptides par révélation des bandes latérales par le réactif à la ninhydrine-cadmium et par celui à l'acide periodique-benzidine, de MONTGOMERY et WU (1963), spécifique des glucides, les bandes de papier renfermant des glycopeptides sont éluées par de l'eau distillée.

## C - PRÉPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES

La fraction glycopeptidique alcali-labile ou "hinge region" est chromatographiée sur colonne de Biogel P-30 dans les conditions décrites à la p. 78. Ensuite elle est soumise à l'action de la soude et réduction, puis on procède à la séparation des glycanes alcali-labiles réduits.

### 1 - ACTION DE LA SOUDE ET REDUCTION

Nous avons employé deux conditions différentes d'action de la soude et réduction. Les conditions utilisées sont une modification de la méthode de CARLSON (1966).

150 mg de glycopeptides sont dissous dans 150 ml de NaOH 0,1 N, en présence de  $\text{BH}_4\text{K}$  1 M et maintenu sous agitation pendant 72 heures à 45°C et à l'obscurité. Au moment d'arrêter la réaction, la solution est placée dans un bain de glace ; la réaction s'arrête par addition de Dowex 50 x 8 (25-50 mesh ; forme  $\text{H}^+$ ) (Bio-Rad) jusqu'à pH 4. La solution est filtrée sur laine de verre, évaporée à sec et reprise par 3 fois 3 ml environ de méthanol anhydre. Le produit sec est récupéré par de l'eau distillée et lyophilisé.

D'autre part, 30 mg de glycopeptides sont dissous dans 5 ml de NaOH 0,1 N en présence de  $\text{NaBD}_4$  0,8 M et maintenu pendant 72 heures à 37°C. Au moment d'arrêter la réaction, le produit est dilué 10 fois avec de l'eau ; la réaction s'arrête par addition d'acide acétique 4 N jusqu'à pH 5. Le produit est concentré et purifié sur Dowex 50 x 2 (200-400 mesh) stabilisée dans l'acide formique 0,01 N. Le produit élué est concentré et lyophilisé. Ensuite il est repris par de l'eau, évaporé à sec et repris par 3 fois 3 ml environ de méthanol anhydre. Le produit sec est récupéré par de l'eau et lyophilisé.

## 2 - SEPARATION DES GLYCANNES REDUITS

Les méthodes utilisées sont une modification des procédés de SPIRO et BHOYROO (1974) et de BAENZIGER et KORNFELD (1974).

### a - Chromatographie de gel filtration

L'ensemble des glycanes réduits au  $BH_4K$  est fractionné sur colonne de SG-25 fine (1,8 cm x 127 cm) (PHARMACIA), stabilisée dans le tampon acétate de pyridine 0,1 M à pH 5. Le débit du fractionnement est de 12 ml/h.

La fraction réduite au  $BD_4Na$  est purifiée sur colonne de Biogel P-2 (1 cm x 55 cm), stabilisée dans l'eau. Le débit du fractionnement est de 5 ml/h ; les fractions recueillies sont de 0,8 ml.

### b - Chromatographie sur échangeurs d'ions

Nous utilisons du Dowex 1 x 2 (200-400 mesh ; forme acétate), stabilisée dans le tampon acétate de pyridine 2 mM à pH 5. La chromatographie se réalise en utilisant le gradient continu de force ionique du tampon acétate de pyridine à pH 5, de 2 mM à 0,35 M. Le débit du fractionnement est de 15 ml/h. ; les fractions recueillies sont de 2,5 ml.

### c - Chromatographie de partage

Dans un premier temps, les glycanes réduits sont chromatographiés sur papier Whatman 3, 1 nuit dans le solvant de FISHER et NEBEL (1955) : pyridine, acétate d'éthyle, acide acétique, eau (5 : 5 : 1 : 3 par volume). Les bandes latérales sont révélées par le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et al. (1952). Les bandes de papier renfermant les glycanes réduits sont éluées par l'eau distillée. Ensuite leur homogénéité est analysée sur couche mince en gel de silice (DC-Plastikfolien Kieselgel 60 F 254 ; 20 x 20 cm, MERCK) dans le solvant suivant : n-Butanol, éthanol, acide acétique, eau, pyridine (10 : 100 : 3 : 30 : 10). La révélation est faite par le réactif à l'orcinol sulfurique. 100 mg d'orcinol sont

dissous dans 100 ml d'acide sulfurique à 20 % et la solution est pulvérisée sur la couche mince qui est ensuite séchée à l'étuve pendant 10 minutes environ.

## IV - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ET DES GLYCANNES REDUITS DES sIGA

### A - COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES AMINÉS ET EN GLUCIDES

La détermination de la composition molaire en acides aminés des glycopeptides a été effectuée par la méthode décrite à la p. 76.

La composition molaire en monosaccharides des oligosaccharides est déterminée par dosage chromatographique en phase gazeuse des dérivés trifluoroacétylés des sucres libérés par méthanolyse, selon la méthode de ZANETTA et al. (1972). L'analyse chromatographique en phase gazeuse est réalisée sur une colonne de OV 210. La température initiale est de 100°C, la température finale est de 220°C. Le débit du gaz vecteur (N<sub>2</sub>) est de 15 ml/min.

### B - ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES DES IGA

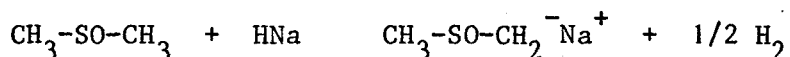
#### 1 - METHYLATION

La méthylation des oligosaccharides est réalisée suivant la méthode de HAKOMORI (1964).

#### a - Préparation du sulfinylcarbanion ( SANDFORD et CONRAD, 1966)

2,5 g d'une suspension à 50 % d'hydrure de sodium dans la paraffine sont introduits dans un flacon à pénicilline de 100 ml. La paraffine est éliminée par 3 lavages à l'heptane (30 ml) suivies de décantation. Le flacon est ensuite bouché à l'aide d'une pastille de caoutchouc, sertie par un joint métallique.

L'hydrure de sodium est alors séché sous azote par introduction de 2 seringues. On injecte alors 30 ml de diméthyl sulfoxyde et la réaction commence aussitôt avec dégagement d'hydrogène :



Cette réaction est accélérée par chauffage (55°C) dans un bain ultrasonique. Après arrêt du dégagement d'hydrogène, le flacon est à nouveau saturé d'azote et conservé au réfrigérateur.

#### b - Méthylation

1 mg d'oligosaccharide, réduit ou non réduit, est dissous dans 1 ml de diméthylsulfoxyde, dans un flacon à pénicilline de 5 ml qui est ensuite scellé, puis saturé d'azote. Après une demi-heure d'agitation au bain ultrasonique, on ajoute au moyen d'une seringue 0,5 ml de sulfinylcarbanion. Après 1 h d'agitation au bain ultrasonique, on le congèle soit directement, soit après repos de 2 à 4 heures à la température ambiante. Au produit congelé on ajoute 0,5 ml d'iodure de méthyle et on replace le flacon pendant une demi-heure au bain ultrasonique. Les produits méthylés sont ensuite extraits dans le mélange chloroforme-eau. La phase chloroformique obtenue après extraction par 3 fois 5 ml de chloroforme, est ensuite lavée par 5 fois 5 ml d'eau, puis séchée par du sulfate de sodium anhydre. Après filtration sur laine de verre, la solution est évaporée à sec. Le résidu est purifié soit sur colonne de LH 20 (PHARMACIA), soit sur colonne de gel de silice (Kieselgel 60 reinst 70-230 mesh ASTM - Merck).

Après purification, le produit méthylé est soumis à une méthanolyse et les dérivés méthylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse, ainsi qu'après peracétylation.



### c - Analyse chromatographique en phase gazeuse

Différents types de colonnes, de phases ou de supports sont utilisés pour la résolution des analyses chromatographiques des glucides en phase gazeuse. Ainsi les colonnes sont soit des colonnes de verre soit des colonnes capillaires. Les colonnes de verre (0,3 x 300 cm) sont remplies de Carbowax 6000 3 % sur chromosorb W (80-100 mesh). La température est programmée de 120°C à 200°C à raison de 2°C/min (FOURNET et MONTREUIL, 1973). Elles peuvent également être remplies de silicone OV-17 à 3 % sur chromosorb W (60-80 mesh). La température programmée est de 250°C à 280°C à raison de 4°/min. Le débit du gaz vecteur (N<sub>2</sub>) est de 20 ml/min. Les colonnes capillaires ( $\phi_{\text{ext}} : 0,7 \text{ mm} \times 55 \text{ m}$   
 $\phi_{\text{int}} : 0,4 \text{ mm}$ ) sont remplies de Carbowax 20 M. La température programmée est de 150°C à 220°C à raison de 2°C par minute. La pression d'entrée est de 0,4 bars.

### 2 - SPECTROMETRIE DE MASSE

Les produits méthylés subissent une série de transformations selon le protocole décrit par FOURNET (Communication personnelle), avant d'être analysés en spectrométrie de masse.

Ainsi les oligosaccharides méthylés sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique bidistillée 4 N pendant 4 heures à 100°C. On évapore à siccité et on élimine l'acide à l'aide du méthanol ou de l'éthanol distillé. Après peracétylation, et séchage sous azote, le produit est réduit au BH<sub>4</sub>Na ou BD<sub>4</sub>Na. A 1 mg de produit méthylé dissous dans 1 goutte de méthanol distillé et dans 1 ml d'eau, on ajoute 10 mg environ de BD<sub>4</sub>Na. La réduction s'effectue pendant 14 h environ à température ambiante. On arrête la réaction par du Dowex 50 x 8 (25-50 mesh ; forme H<sup>+</sup>) ; on filtre sur laine de verre.

Le produit séché à l'évaporateur rotatif est repris par 3 fois 2 ml de méthanol anhydre et séché à siccité. Le produit méthylé et réduit est peracétylé.

Un autre procédé que nous avons utilisé consiste à traiter l'oligosaccharide réduit au  $BH_4K$  et méthylé par de l'ATFA 2N pendant 2 h à  $100^\circ C$ . Le produit est séché à l'évaporateur rotatif et repris plusieurs fois par du méthanol pour bien éliminer l'acide. Le produit sec est peracétylé. Ensuite, il est désacétylé, selon la méthode décrite par KUNG et HUDSON (1978) le produit repris par 0,5 ml d'acétone et 2 ml de NaOH 0,1 N est maintenu pendant 60 minutes à la température ambiante. On arrête la réaction par du Dowex 50 x 8 (25-50 mesh ; forme  $H^+$ ) jusqu'à pH4. La solution filtrée sur laine de verre est évaporée à sec et reprise plusieurs fois par du méthanol anhydre et évaporée à sec. Ensuite, nous effectuons une réduction au  $BD_4Na$  dans les conditions décrites précédemment.

Les oligosaccharides méthylés peuvent être également analysés après une simple méthanolyse (ZANETTA et al. 1972).

La spectrométrie de masse a été effectuée sur un appareil RIBER MAG GCMS R10-10, à filtre quadripolaire. Les produits analysés ont été préalablement séparés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de OV 17, la température du four est programmée de  $140^\circ C$  à  $270^\circ C$  à raison de  $4^\circ C/min$ .

### 3 - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION

#### a - Hydrazinolyse et diazotation

L'hydrazinolyse et la diazotation sont réalisées suivant la méthode de BAYARD et MONTREUIL (1974) :

1 mg de glycopeptide N-glycosidique rigoureusement anhydre est dissous dans 200  $\mu l$  d'hydrazine. Après chauffage à  $100^\circ C$  pendant

24 h en tube scellé, la solution est évaporée sous courant d'azote et le résidu sec est séché sous vide sur acide sulfurique. Le résidu est ensuite repris sur 1 ml d'acide acétique 2N et 10 mg de nitrite de sodium sont ajoutés. La désamination nitreuse est conduite pendant 3 heures à 4°C. Après passage d'un courant d'azote pour éliminer le N<sub>2</sub>O formé, la solution est amenée à pH 9 avec NaOH 1 N et 20 mg de BH<sub>4</sub>Na sont ajoutés pour réduire les oligosaccharides formés. Après 2 heures de réaction, la solution est neutralisée par l'acide acétique et lyophilisée.

b - Méthylation

Après déshydratation de la poudre obtenue sous le P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> un cycle de méthylation selon HAKOMORI est réalisé (voir p. 83).

c - Analyse chromatographique en phase gazeuse

Le mélange d'oligosaccharides obtenus est analysé après méthylation sur colonne capillaire OV 101 ( $\phi_{ext}$  : 0,7 mm x 40 m)  
 $\phi_{int}$  : 0,4 m  
avec une programmation de température de 140°C à 310°C à raison de 5°C/min. Le gaz vecteur est l'azote. La pression d'entrée est de 0,4 bars. Chacun des pics ainsi séparé est analysé en spectrométrie de masse.

4 - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

L'étude de la résonance magnétique nucléaire du proton a été réalisée sur les oligosaccharides préalablement traités par l'eau lourde (D<sub>2</sub>O) de manière à obtenir un échange des hydrogènes mobiles (fonctions hydroxyles). L'analyse des oligosaccharides et des glycopeptides a été effectuée sur un appareil Bruker HX 360, à 360 MHz opérant en transformées de FOURIER.

Les glissements chimiques ont été mesurés par rapport au sel de sodium du 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulphonate, par l'intermédiaire d'un témoin interne constitué d'acétone :  $\delta = 2,225$  ppm.

L'interprétation des spectres a été rendue possible grâce à l'étalonnage préalable des déplacements chimiques des protons à l'aide de glycopeptides et d'oligosaccharides de structure connue. En particulier, les déplacements chimiques des protons obtenus avec les glycopeptides des IgA du lait de Femme ont été comparées avec les valeurs obtenues lors de l'étude des glycopeptides de la sérotransferrine humaine, DORLAND et al. (1977), de différents sialyloligosaccharides, DORLAND et al. (1978), et qui ont été résumés dans la revue générale de MONTREUIL et VLIEGENTHART (1978).

## RESULTATS

## I - PREPARATION ET ANALYSE DES sIgA

### A - PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

Le relargage au sulfate d'ammonium des protéines du lactosérum dans les conditions précisées à la p. 72 conduit à l'obtention d'environ 1 g de précipité  $P_2P_4/1$  de lactosérum. Le précipité est fortement enrichi en immunoglobulines IgA, en effet une valeur de 80 p. 100 d'IgA a pu être déterminée par immunodiffusion simple selon MANCINI et al. (1965).

### B - PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ $P_2P_4$

#### 1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE QAE-SEPHADEX

40 g de  $P_2P_4$  sont dissous dans 800 ml de tampon Tris-HCl 0,01 M pH 8 et fractionnés selon le principe décrit à la p. 73. Trois fractions sont ainsi obtenues. La première fraction correspond à l'élution de la colonne par le tampon de départ. Elle renferme des sIgA contaminées par de la lactotransferrine. La seconde fraction obtenue par élution de la colonne par du tampon Tris-HCl 0,1 M - NaCl 0,1 M pH 8, contient des sIgA, de la lactotransferrine, de la sérumalbumine, de l' $\alpha$ -lactalbumine et du lysozyme. La dernière fraction qui correspond à l'élution par un tampon Tris-HCl 0,1 M - NaCl M pH 8, renferme les mêmes protéines que la deuxième fraction avec très peu de sIgA.

#### 2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SP-SEPHADEX

Les 18 g de fraction I récupérés après chromatographie sur colonne de QAE-Sephadex sont chromatographiés sur une colonne de SP-Sephadex. La lactotransferrine reste fixée sur la colonne alors que les sIgA sont éluées par de l'acétate de sodium 0,22 M. La

lactotransferrine est éluée de la colonne par le passage d'une solution d'acétate de sodium 0,4 M. Les deux fractions sont dialysées contre de l'eau et lyophilisées.

15 g d'sIgA et 3 g de lactotransferrine sont ainsi obtenus.

### 3 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ULTROGEL Aca<sub>44</sub>

5 g de la fraction II sont chromatographiés sur une colonne d'Ultrogel Aca<sub>44</sub> dans un tampon Tris-HCl 0,1 M - NaCl 0,1 M pH 8. Le profil de la courbe d'éluion est schématisé dans la Fig. 27 p. 92. La première fraction contient 1,5 g d'sIgA. Les autres fractions sont plus complexes.

L'étude des deux lots d'IgA obtenus soit à partir de la fraction I, soit à partir de la fraction II (fractionnement sur une colonne de QAE-Séphadex) a été faite par des méthodes physico-chimiques et immunologiques.

## C - CONTRÔLE DE L'HOMOGÉNÉITÉ DES PRÉPARATIONS D'SIGA

### 1 - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE

L'électrophorèse en acétate de cellulose des sIgA pures provenant des différents fractionnements du précipité P<sub>2</sub>P<sub>4</sub> montre qu'elles ne donnent qu'une seule bande révélabale à l'Amidoschwartz. Fig. 28 p. 93 et Fig. 30 p. 95.

### 2 - IMMUNOELECTROPHORESE SUR GELOSE

Les IgA isolées soit par chromatographie sur QAE-Séphadex suivie de chromatographie sur SP-Séphadex, soit par chromatographie sur QAE-Séphadex suivie de chromatographie sur Ultrogel Aca<sub>44</sub> ne donnent qu'un seul arc de précipitation en présence d'un sérum de Lapin

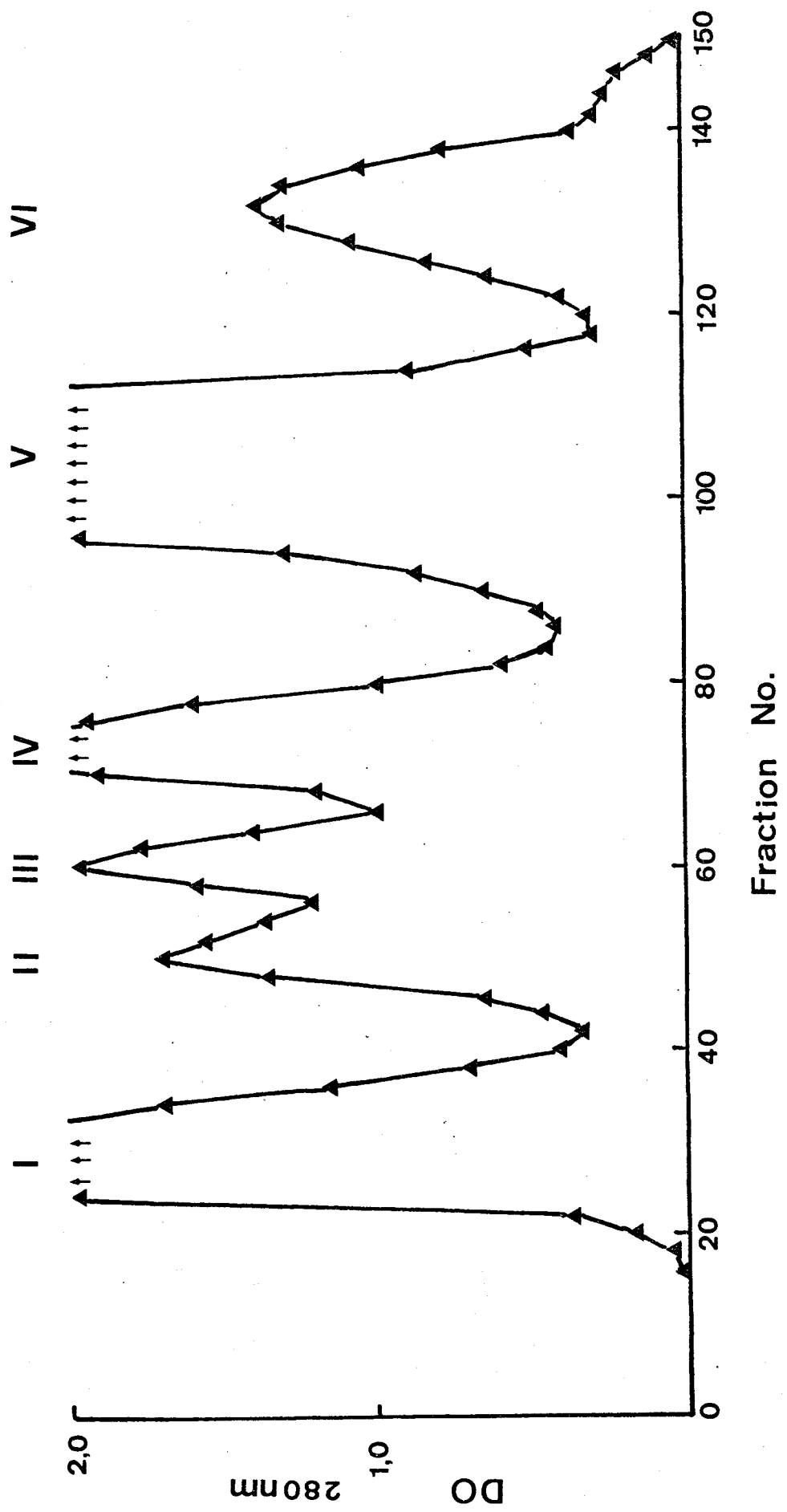


FIGURE 27

Chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA<sub>44</sub> de la fraction II obtenue après séparation sur colonne de QAE-Sephadex du précipité P<sub>2</sub>P<sub>4</sub>.





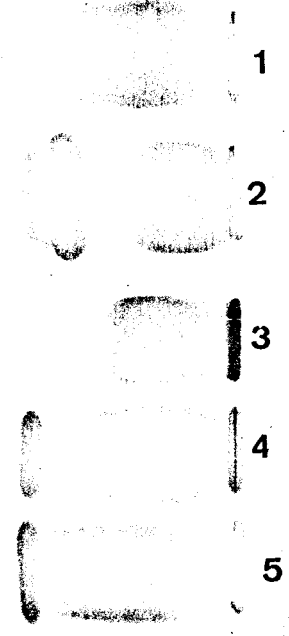


FIGURE 28

Electrophorèse sur acétate de cellulose (tampon véronal pH 8,6) des différentes fractions isolées du précipité  $P_2P_4$  par chromatographie sur colonne de QAE-Séphadex. (1) Lactosérum ; (2) Précipité  $P_2P_4$  ; (3) Fraction I ; (4) Fraction II ; (5) Fraction III.

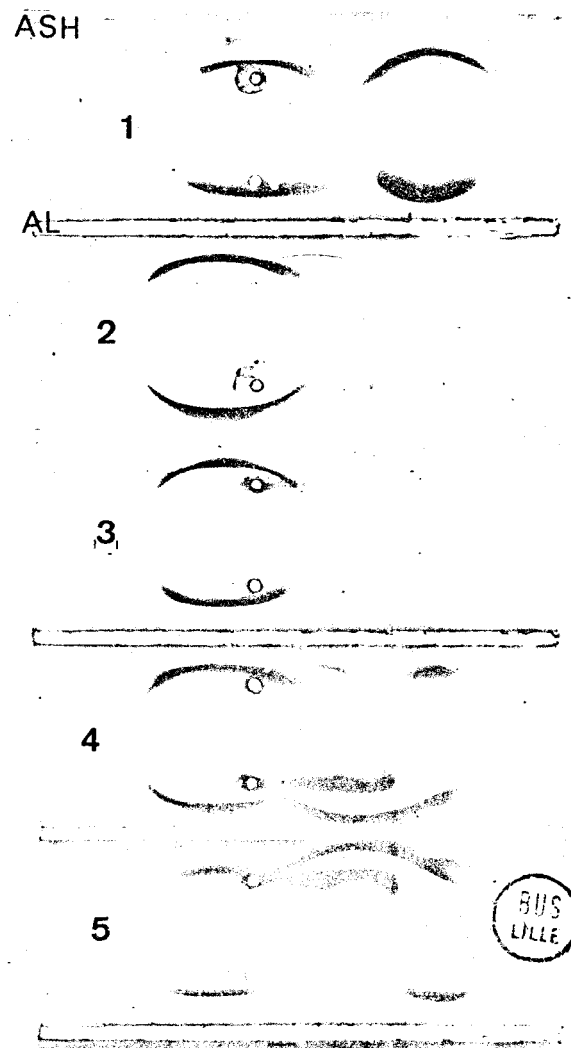


FIGURE 29

Immunoélectrophorèse de ces mêmes fractions en présence de sérum de Cheval anti-protéides sériques humaines (ASH) et de sérum de Lapin anti-protéides du lait humain total (AL).

anti-protéides lait de Femme et du sérum de Cheval anti-protéides sériques humaines. Le 2<sup>é</sup> lot d'IgA est immunologiquement pur (Fig.31 p.95), présence de pièce de sécrétion libre dans le premier lot ( Fig. 29 p.93) .

### 3 - CONCLUSION

L'électrophorèse en acétate de cellulose et l'immuno-électrophorèse n'ont pas montré de différences entre les 2 fractions d'IgA. Des études physico-chimiques vont confirmer ou non l'identité de ces 2 lots.

## II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES sIgA

### A - COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION

#### 1 - PAR ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE<sup>∞</sup>

L'étude préliminaire par ultracentrifugation a montré que notre préparation d'IgA renferme environ 80 % d'un composé ayant un  $S_{20,w}^{\circ}$  de 10,1 S ; 15 % environ de composés plus lourds, hauts polymères d'IgA de 13 S . La constante de sédimentation du composé majeur avoisine donc la valeur 11 S caractéristique des IgA de sécrétion.

#### 2 - PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR COUCHE MINCE<sup>\*</sup>

L'étude du rapport IgA 7 S - 11 S et hauts polymères effectuée sur notre préparation d'IgA montre que le composé majeur est 11 S ; la présence de traces de hauts polymères a pu être détectée, par contre il ne semble pas exister de composés 7 S ; tout au moins ils ne sont pas détectables par cette méthode.

---

<sup>∞</sup> Nous remercions A. Verbert et M. Coniez pour les études effectuées à l'aide de l'ultracentrifugeuse analytique.

<sup>\*</sup> Nous remercions Mme Hayem pour l'étude chromatographique en couche mince

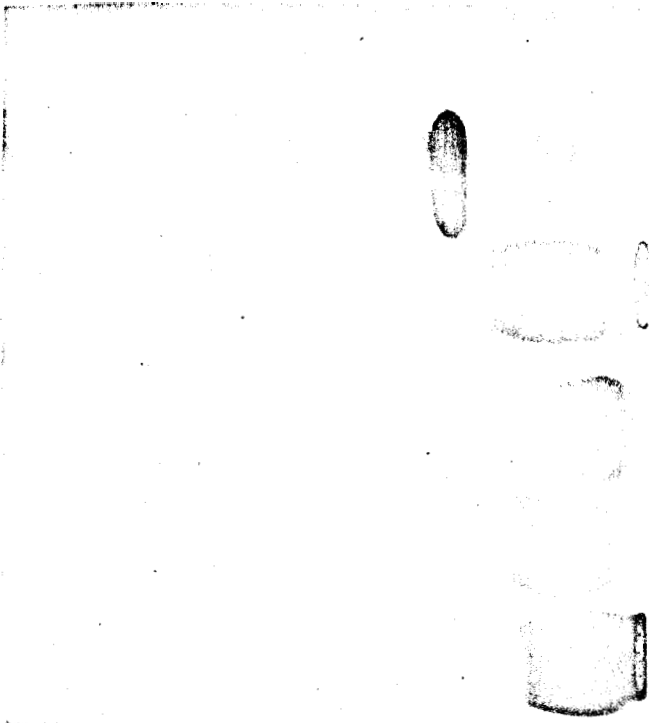


FIGURE 30

Electrophorèse sur acétate de cellulose des constituants de la fraction II après chromatographies sur colonne d'Ultrogel AcA<sub>44</sub>

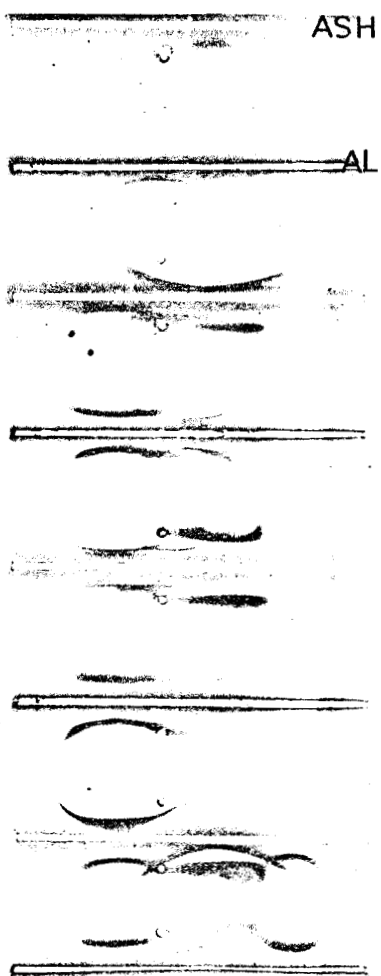


FIGURE 31



Immunoélectrophorèse des différents constituants de la fraction II en présence de sérum de Cheval anti-protéides sériques humaines (ASH) et de sérum de Lapin anti-protéides lait humain total (AL).

## B - MASSE MOLECULAIRE <sup>∞</sup>

La masse moléculaire de notre préparation d'IgA a été déterminée selon le procédé décrite à la p. 76 . Elle est égale à  $331.000 \pm 16.550$ . Cette valeur est en accord avec celles déjà citées dans la littérature.

## C - COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

La composition en acides aminés de la molécule d'IgA du lait de Femme a été déterminée d'après la composition de 3 échantillons différents d'IgA après des temps d'hydrolyse de 24 h, 48 h et 72 h. Les valeurs obtenues sont en accord avec celles déjà citées par différents auteurs. (Tableau I, p. 10).

## D - COMPOSITION EN GLUCIDES

Les compositions centésimales et molaires en glucides obtenus pour les IgA de la fraction I avant et après double précipitation au sulfate d'ammonium et de la fraction II, sont rassemblées dans le Tableau VIII p. 97 .

L'application des méthodes de dosage colorimétrique décrites à la p. 77, permet de dire que les IgA provenant de la fraction II sont plus riches en glucides que celles provenant de la fraction I. De même, on peut remarquer que lorsque les IgA de la Fraction I sont précipitées par 2 fois consécutives au sulfate d'ammonium 33% de saturation et à pH 7, le taux de glucides diminue sensiblement et il est comparable à celui des IgA provenant de la fraction II. Ces résultats sont en accord avec ceux de DESCAMPS (1974). En plus, il semblerait que cette différence de contenu en glucides ne soit pas due seulement à la présence de la chaîne de sécrétion mais aussi à la présence de glycopeptides provenant du P<sub>10</sub> qui sont adsorbés sur les IgA.

TABLEAU VIII

Composition centésimale et molaire des IgA lactées totales isolées du précipité P<sub>2</sub>P<sub>4</sub>

	P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	sIgA obtenues à partir de la fraction I		sIgA obtenus à partir de la fraction II
		Avant précipitation au sulfate d'ammonium	Après précipitation au sulfate d'ammonium	
<u>Composition centésimale</u>				
Oses neutres	10,85	12,54	5,54	5,4
Osamines	7,6	8,93	4,78	5,01
Acides sialiques	2,44	1,98	1,5	1,53
Oses totaux	20,89	23,45	11,82	11,84
<u>Composition molaire</u>				
Fucose	1,71	1,78	1,35	1,44
Galactose &	4	4	4	4
Mannose	0,53	1,34	3,1	2,88
N-acétylglucosamine	2,79	3,23	3,54	3,61
N-acétylgalactosamine	0,63	0,82	1,45	1,47
Acide N-acétylneuraminique	1,12	0,64	0,99	1,11

(&amp;) Les résultats sont calculés sur la base de 4 résidus de galactose.



La chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides après méthanolyse et trifluoroacétylation permet d'identifier la présence de résidus de fucose, galactose, mannose, N-acétyl glucosamine, N-acétyl galactosamine et d'acide N-acétyl neuraminique dans les différentes préparations d'IgA quelque soit leur provenance. On peut constater que les rapports molaires des IgA isolées à partir de la fraction I purifiées sont sensiblement semblables à ceux des IgA de la fraction II.

Nous pouvons donc conclure que la purification poussée des IgA isolées de la fraction I est nécessaire lorsque ces sIgA sont utilisées pour des études de groupements glycaniques.

Les sIgA de la fraction II et celles de la fraction I après repurification par double précipitation au sulfate d'ammonium sont rassemblées.

Ensuite, ces sIgA servent à la préparation des glycopeptides.

### III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

#### A - ISOLEMENT DE LA "HINGE REGION"

Une hydrolyse trypsique et une hydrolyse pepsique sont effectuées dans les conditions décrites à la p. 78, sur les IgA totales provenant du précipité P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub>, afin d'obtenir la "hinge region" (Fig. 32 p. 99). Cette étude a été faite sur 15g d'IgA lactées.

#### 1 - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT PROTEASIQUE DES IgA

Le fractionnement de l'hydrolysat trypsique-pepsique des IgA sur colonne de Biogel P-30 (Fig. 33 p.100) nous donne 3 pics phénol positifs. Les deux pics majeurs contiennent respectivement la

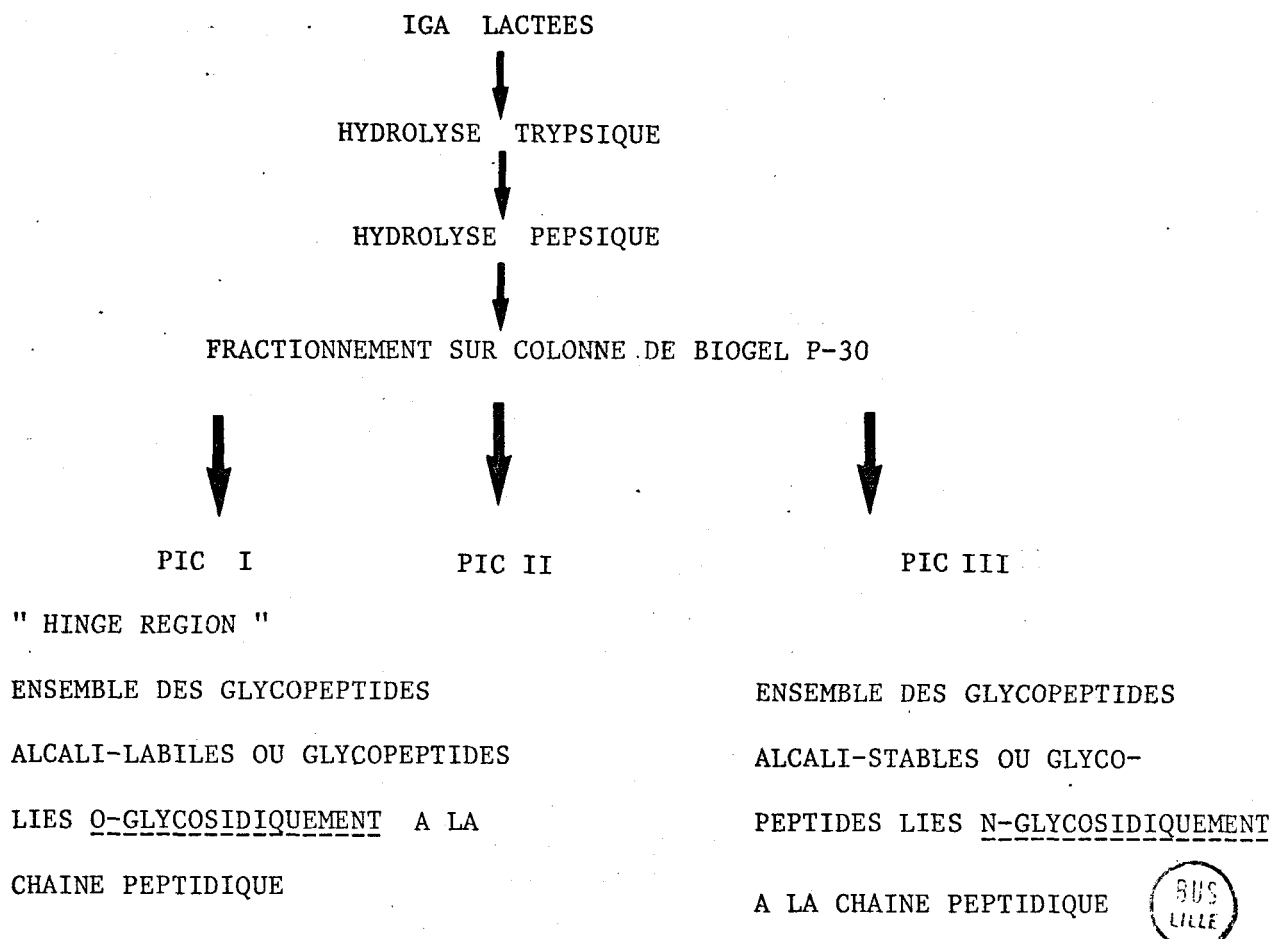


FIGURE 32

SCHEMA DE FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES  
DES IGA DE LAIT DE FEMME

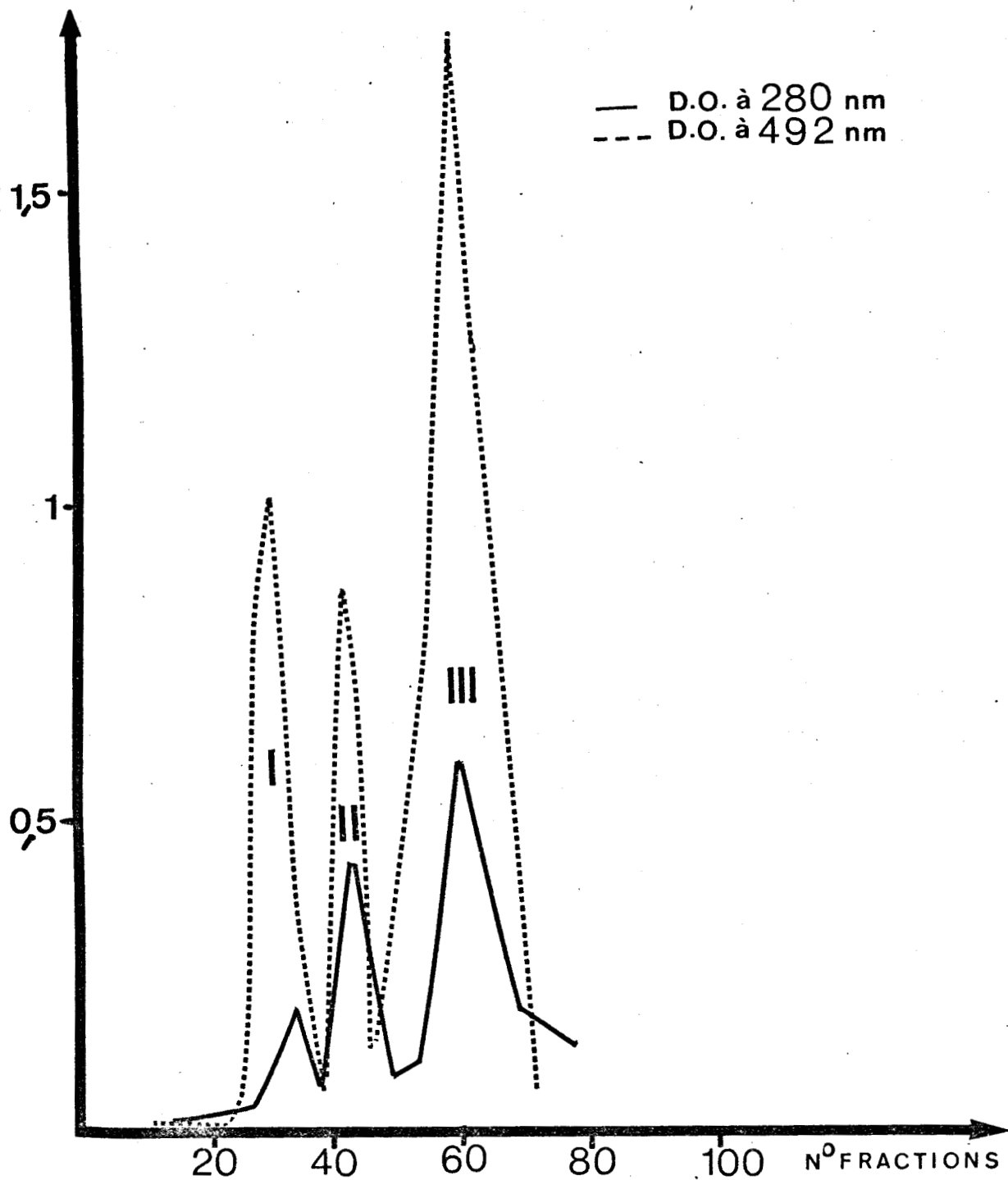


FIGURE 33

Chromatographie sur colonne de Biogel P-30 de l'hydrolysate  
trypsique et pepsique des sIgA.

Pic I: fraction alcali-labile

Pic II: fraction intermédiaire, mélange des deux autres fractions

Pic III: fraction alcali-stable.





fraction glucidique alcali-labile et la fraction glucidique alcali-stable. Le pic mineur, intermédiaire, renferme les deux types de glycannes.

Les quantités obtenues de ces pics après le traitement de 1 g d'IgA totales sont de 43 mg pour le pic I (soit un rendement en oses totaux de 5,6 %), 35 mg pour le pic II (soit un rendement de 4 % en oses totaux), et de 240 mg de pic III (soit un rendement de 76 % en oses totaux). Le rendement total en % d'oses totaux récupérés est de 86 %.

## 2 - ETUDE DES DIFFERENTS PICS OBTENUS

### a - Composition en acides aminés

Les résultats de l'hydrolyse acide des acides aminés sont rassemblés dans le tableau IX p.102. Il est intéressant de constater que le pic I possède 3 fois plus de résidus de proline que le pic II et 5 fois plus que le pic III, et qu'il a 3 fois plus de résidus de sérine et de thréonine que chacun des autres pics.

### b - Composition centésimale et molaire en glucides

Les résultats concernant la fraction glucidique de ces 3 pics sont rassemblés dans le Tableau X p.103. Les compositions centésimales en oses totaux, déterminées par dosage chromatographique, sont les suivantes : 15,3 % d'oses totaux pour le pic I, 13,4 % pour le pic II et 37,6 % pour le pic III.

L'étude de la composition molaire en glucides montre la présence d'un résidu de N-acétylgalactosamine et l'absence de résidu de mannose dans le pic I, alors que le pic III est dépourvu de N-acétylgalactosamine et renferme un taux élevé de mannose. Le pic II, quant à lui, possède les 2 types de glycannes.

TABLEAU IX

Composition en acides aminés des pics I, II et III obtenus après fractionnement de l'hydrolysate tryptique et pepsique des IgA du lait de Femme

	Pic I	Pic II	Pic III
Asp*	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Thr	2,7 (3)	1,17 (1)	1,1 (1)
Ser	2,6 (2-3)	1,18 (1)	0,68 (1)
Glu	0,8 (1)	0,89 (1)	0,8 (1)
Pro	4,8 (5)	2,48 (2-3)	0,7 (1)
Gly	1,4 (1-2)	0,83 (1)	0,84 (1)
Ala	1,9 (2)	0,55 (0-1)	0,7 (1)
Cys	traces	1,09 (1)	0,5 (0-1)
GlcNH <sub>2</sub>	6,2 (6)	0,68	2,4 (2-3)
GalnH <sub>2</sub>	3,8 (4)	0,36	0 (0)
Val	1,8 (2)	0,94 (1)	0,6 (1)
Ile	traces	traces	traces
Leu	0,5 (0-5)	0,73 (1)	0,72 (1)
Tyr	traces	traces	traces
Phe	"	"	"
Lys	"	"	"
His	0,75 (1)	"	"
Arg	0,6 (0-1)	"	"

\* Résultats calculés sur la base d'un résidu d'acide aspartique



TABLEAU X

Composition centésimale et molaire en glucides des pics I, II et III de l'hydrolysat trypsique et pepsique des IgA

	Pic I	Pic II	Pic III
<u>Composition centésimale</u>			
Oses neutres	7,7	5,6	21,5
Osamines	7,25	6,5	13,4
Acide N-acétylneuraminique	0,36	1,3	2,7
Oses totaux	15,31 %	13,4 %	37,6 %
<u>Composition molaire</u>			
Fucose	0,45	0,8	1
Galactose	1,84	1,2	1,65
Mannose (*)	0	1	3
N-acétylglucosamine	0,73	1	3,86
N-acétylgalactosamine (*)	1	1	0
Acide N-acétylneuraminique	0,1	0,3	0,4

(\*)

Les résultats sont calculés sur la base d'un résidu de GalNAc pour le pic I et le pic II et de 3 résidus de mannose pour le pic III.

### 3 - DETERMINATION DU TYPE DE LIAISON DANS LES DIFFERENTS PICS

L'action de la soude et réduction a été effectuée dans les conditions décrites à la p. 81, sur les pics I, II et III.

Le pic I correspond à la fraction alcali-labile, les glycannes libérés contiennent du N-acétyl galactosaminitol. La fraction glycannique et la fraction peptidique du pic III ne subissent aucune modification au cours du traitement alcalin, elle représente la fraction alcali-stable et correspond aux glycopeptides liés N-glycosidiquement à la chaîne polypeptidique. La fraction II est un mélange de ces deux fractions. Après  $\beta$ -élimination et réduction nous avons libéré un oligosaccharide réduit contenant un résidu de galactose et un résidu de N-acétylgalactosaminitol. La fraction glycopeptidique restante a été analysée, c'est une fraction alcali-stable.

### B - PRÉPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES

La préparation des glycannes alcali-labiles à partir du pic I, qui correspond à la "hinge region" est schématisée dans la Fig. 34 p. 105.

#### 1 - FRACTIONNEMENT DE LA "HINGE REGION"

Le fractionnement de la "hinge region" sur colonne de Biogel P-30 dans les conditions décrites à la p. 78, donne 2 pics phénol positifs : fraction I et fraction II. 650 mg de fraction alcali-labile donnent 260 mg environ de fraction I, soit un rendement de 42 % et 120 mg environ de fraction II, soit un rendement de 19 %.

Le dosage chromatographique effectué après méthanolyse et trifluoroacétylation de ces 2 fractions montre que la fraction I est plus riche en glucides, elle renferme 25 % environ de glucides, tandis que la fraction II ne renferme que 12 % environ de glucides.

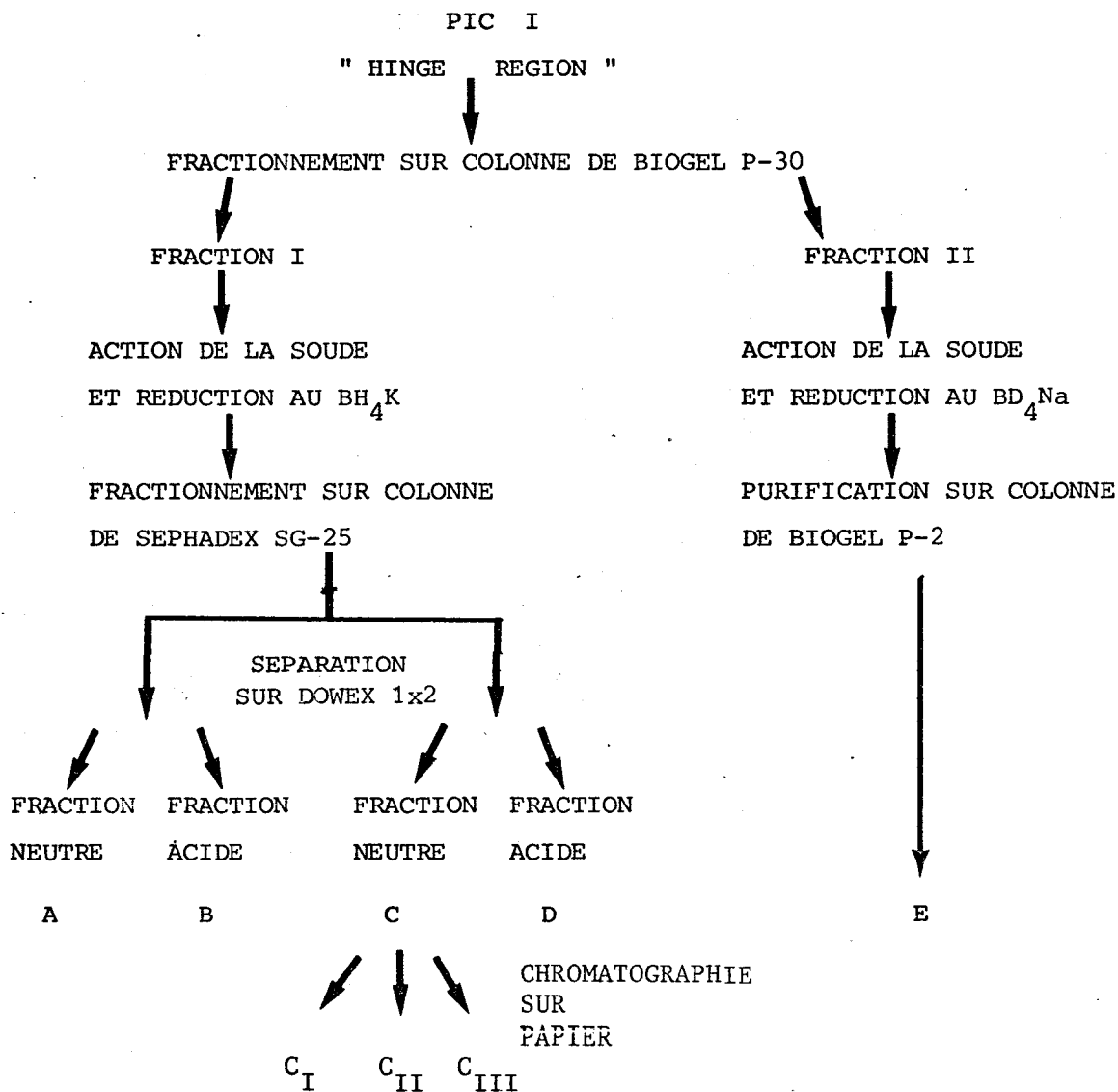


FIGURE 34

SEPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES REDUITS  
A PARTIR DU PIC I OU "HINGE REGION" .



Les compositions molaires en glucides et en acides aminés de ces 2 fractions sont rassemblées dans le Tableau XI p.107. Nous pouvons remarquer que la fraction I a une composition en glucides beaucoup plus complexe que la fraction II. En effet, la fraction II renferme essentiellement du galactose et de la N-acétylgalactosamine dans les rapports 1 : 1. Par contre, sa composition en acides aminés est plus complexe ; nous pouvons remarquer la richesse en sérine et thréonine, mais surtout celle en proline, ainsi que la présence d'un résidu de cystine.

## 2 - SEPARATION DES GLYCANNES REDUITS A PARTIR DE LA FRACTION I

La fraction glycanique réduite obtenue à partir de la fraction I, dans les conditions décrites à la p. 81, est chromatographiée sur colonne de SG-25, dans les conditions décrites à la p. 82. Lors du fractionnement nous obtenons 2 fractions phénol positives.

Chacune de ces 2 fractions est chromatographiée séparément sur colonne de Dowex 1 x 2. Dans les 2 cas, nous obtenons une fraction : "fraction neutre" et une fraction: "fraction acide", qui est éluée de la colonne par du tampon acétate de pyridine 95 mM à pH 5. Ces quatre fractions glycaniques sont appelées A, B, C et D.

Les quantités totales obtenues indiquent un rendement d'environ 46 %. Les fractions glycaniques A et C représentent les fractions majeures.

## 3 - HOMOGENEITE DES GLYCANNES ALCALI-LABILES PRESENTS DANS LA FRACTION I

Une chromatographie couche mince a été effectuée sur les deux fractions neutres selon la méthode décrite p. 82. Le dépôt est de 10 µg environ et après une migration d'environ 6 heures et séchage à l'étuve

TABLEAU XI

Composition molaire en glucides et en acides aminés des fractions I et II isolées à partir de la " hinge region ".

Composition molaire en glucides

	Fraction I	Fraction II
Fucose	0,5 (0-1)	0,1
Galactose	2,5 (2-3)	0,84 (1)
N-acétyl glucosamine	2,03 (2)	0,26
N-acétyl galactosamine	1 (1)	1 (1)
Acide N-acétyl neuraminique	0,2	0,2

Composition molaire en acides aminés

	Fraction I	Fraction II
Asp	0,22	0,28
Thr	0,74 (1)	1,25 (1 à 2)
Ser	0,7 (1)	1,3 (1 à 2)
Glu	0,1	0,3
Pro	1,09 (1)	2,6 (2-3)
Gly	0,4 (0-1)	0,37 (0-1)
Cys	0	1
GlcNH <sub>2</sub>	1,75 (2)	0,22
GalNH <sub>2</sub>	1	1
Val	0,35	0,7 (1)
Leu	traces	0,5 (0-1)
Tyr	0	0,2
Lys	traces	0,1
His	0,15	0,24
Arg	traces	0,3

• Résultats calculés sur la base d'un résidu de N-Acétyl galactosamine



pendant 2 minutes à 100°C, la révélation avec le réactif à l'orcinol montre, (Fig. 35 p.109) que la 1ère fraction neutre : glycanne A est homogène alors que la 2ème fraction neutre se sépare en 3 composés. L'oligosaccharide qui migre le moins vite représente le composé majeur.

#### 4 - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER

La purification de la fraction C a été réalisée par chromatographie dans les conditions décrites à la p. 82. Elle permet d'obtenir 3 oligosaccharides C<sub>I</sub>, C<sub>II</sub> et C<sub>III</sub>.

#### 5 - PURIFICATION DES GLYCANNES REDUITS A PARTIR DE LA FRACTION II ALCALI-LABILE

La fraction II réduite dans les conditions décrites à la p. 81, est purifiée sur colonne de Biogel P-2 tel que nous l'avons décrit à la p. 82. Nous obtenons un glycanne alcali-labile, le glycanne E. Le rendement d'une telle purification est de 60 % environ.

#### C - PRÉPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES

La préparation des glycopeptides alcali-stables à partir du pic I est schématisée dans la Fig. 36 p. 110.

##### 1 - HYDROLYSE PRONASIQUE ET PURIFICATION DE L'HYDROLYSAT

L'hydrolyse pronasique du pic III ou fraction glycopeptidique alcali-stable a été effectuée dans les conditions décrites à la p. 79. 3,5 g du pic III donnent après pronase 1,8 g environ de fraction glycopeptidique totale, soit un rendement de 50 % environ.

L'hydrolyse pronasique est purifiée sur colonne de Biogel P-30, dans les conditions décrites à la p. 79. Un pic phénol positif est obtenu ; les fractions phénol positives sont rassemblées et lyophilisées. Nous récupérons environ 1,12 g soit un rendement de 62 %.



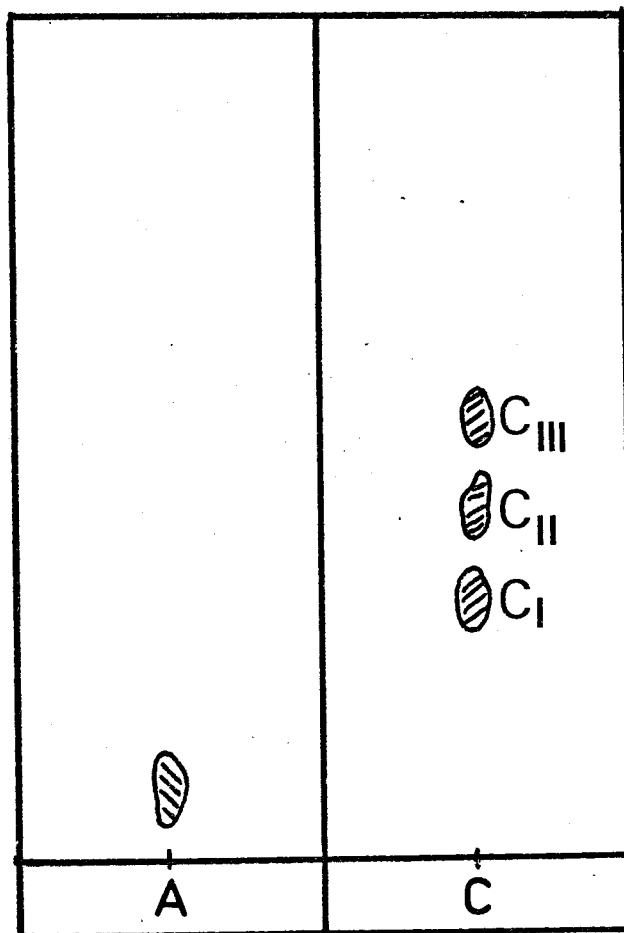


FIGURE 35

Chromatographie sur couche mince des glycanes A et C. Solvant :  
n-butanol/éthanol/acide acétique/eau/pyridine (10 : 100 : 3 : 30 : 10)  
Révélation : réactif à l'orcinol sulfurique



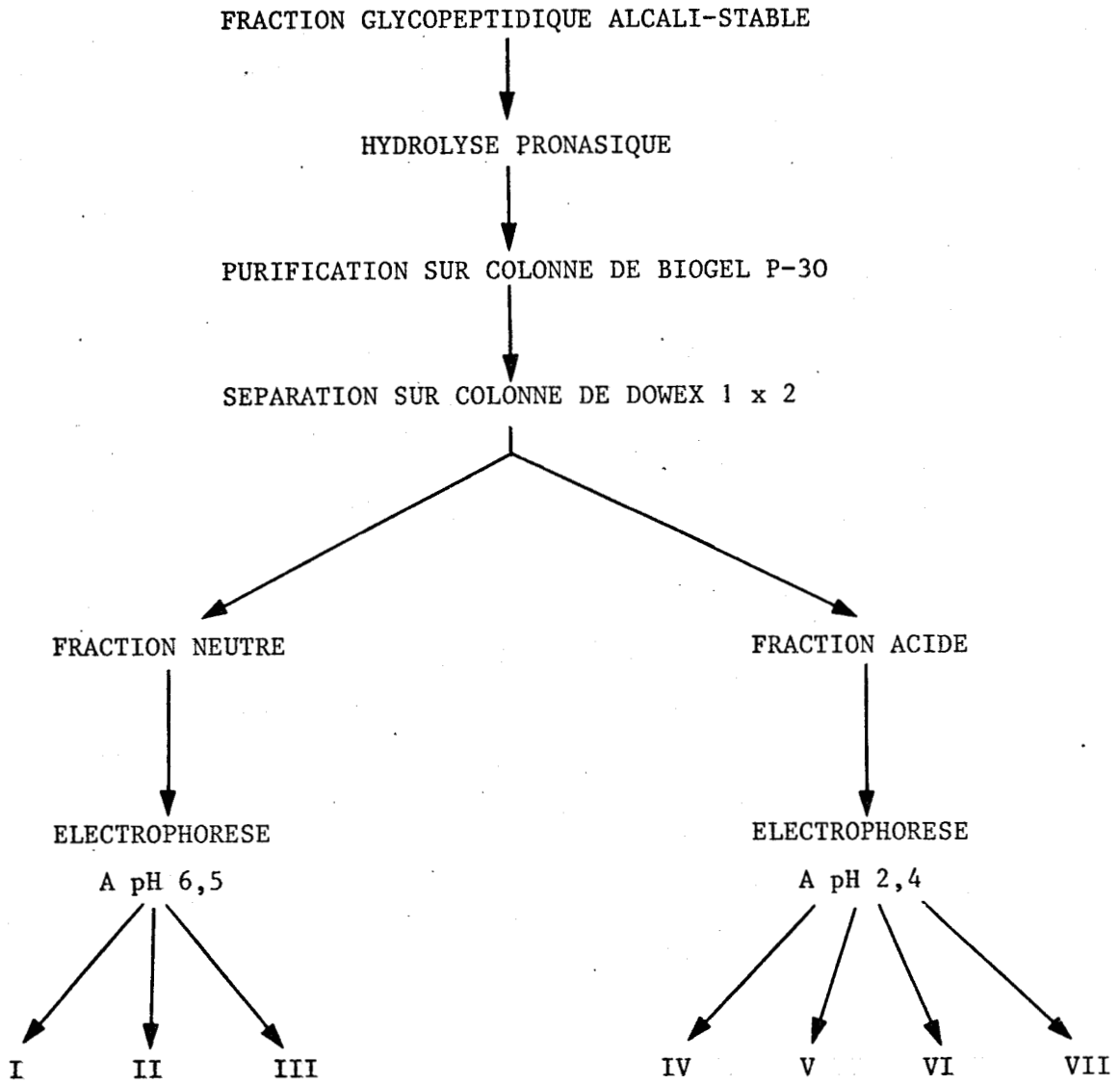


FIGURE 36

Séparation des glycopeptides alcali-stables des IgA de lait de Femme



## 2 - ETUDE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE TOTALE

### a - Composition en acides aminés

L'hydrolyse des acides aminés de la fraction glycopeptidique totale montre qu'elle n'est pas riche en acides aminés. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau XII p. 112.

### b - Composition en glucides

La fraction glycopeptidique totale renferme 65 % environ de glucides, d'après le dosage chromatographique. Les rapports molaires obtenus par chromatographie en phase gazeuse sont donnés dans le Tableau XII p.112 et montre que les glycopeptides peuvent se distinguer en deux groupes : les sialo- et les asialoglycopeptides.

## 3 - SEPARATION DES GLYCOPEPTIDES ALCALI-STABLES

### a - Sur colonne de résine Dowex 1 x 2

Le mélange de glycopeptides est chromatographié sur colonne de Dowex 1 x 2, selon les conditions décrites antérieurement à la p. 80, qui permet d'obtenir deux fractions. La première fraction éluée est la fraction neutre. La fraction acide est éluée par un tampon acétate de pyridine 350 mM. Les deux fractions sont recueillies séparément et lyophilisées.

### b - Par électrophorèse sur papier

L'ensemble de la fraction neutre est séparée à pH 6,5. Trois fractions sont obtenues, les fractions I et III sont majoritaires, elles représentent 45 % et 37% environ, respectivement. La fraction glycopeptidique acide est séparée en 4 fractions par électrophorèse en toit à pH 2,4 (Fig. 37 p.113) dans l'acide acétique molaire. La migration est réalisée de la cathode vers l'anode. Elle permet d'obtenir 4 fractions glycopeptidiques majeures révélables au réactif à la ninhydrine et au réactif à l' $\text{IO}_4^-$ -benzidine.

TABLEAU XII

Composition molaire en glucides et en acides aminés de la fraction glycopeptidique totale alcali-stable, de la fraction acide et de la fraction neutre

<u>Composition molaire en glucides</u> *	<u>FGPT</u>	<u>F.A.</u>	<u>F.N.</u>
Fucose	1,17	1,46	0,95
Galactose	2,03	2,22	1,67
Mannose	3	3	3
N-acétylglucosamine	3	3,09	2,57
Acide N-acétylneuraminique	0,16	0,78	0

Composition en acides aminés<sup>∞</sup> de la fraction glycopeptidique totale

Asp	1
Thr	0,33
Ser	0,28
Glu	0,34
Pro	0,33
Glu	0,28
Ala	0,26
GlcNH <sub>2</sub>	3
Val	0,14

\* Résultats exprimés sur la base de 3 résidus de mannose

∞ Résultats exprimés sur la base d'1 résidu d'acide aspartique

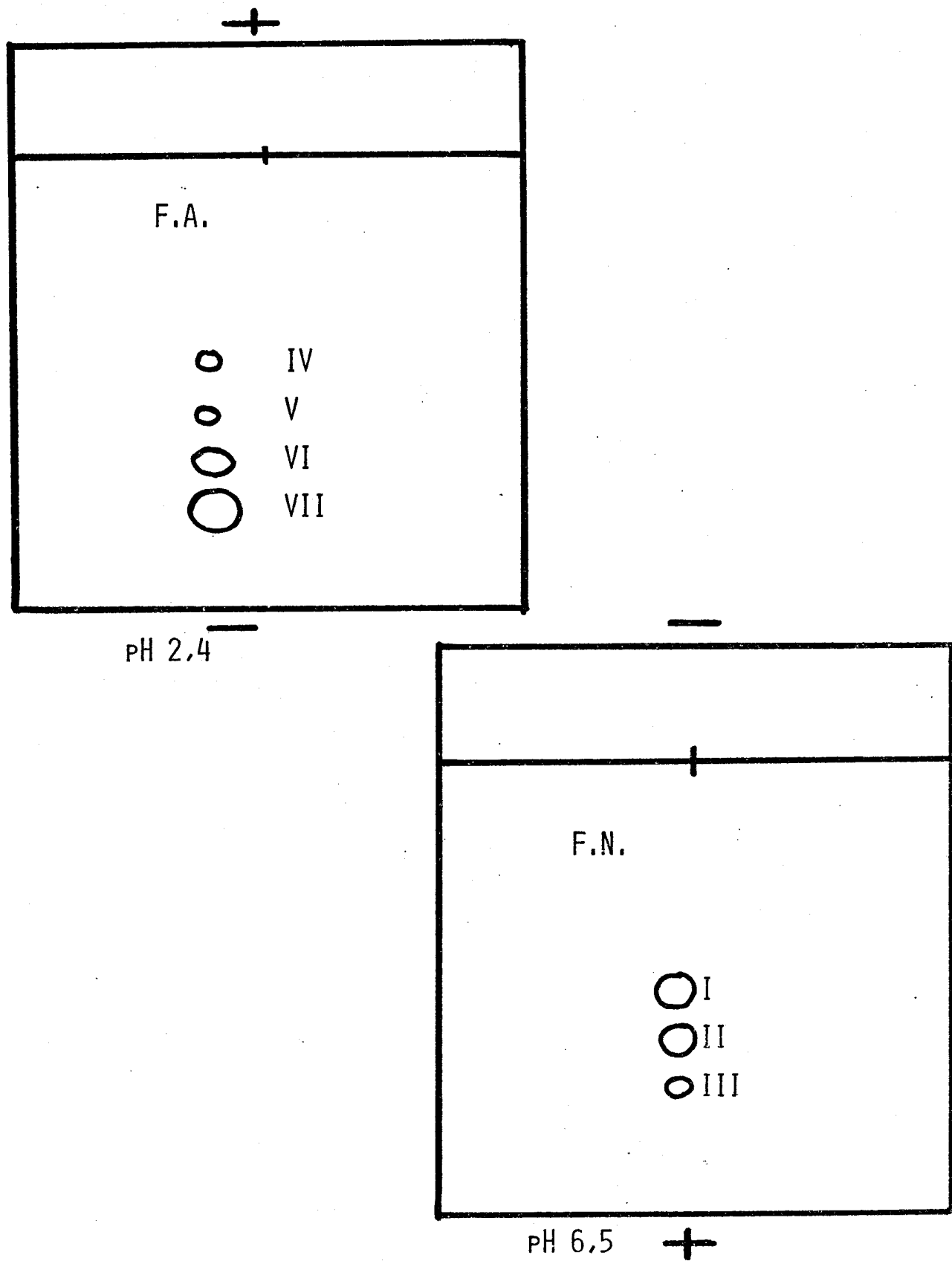


FIGURE 37

Electrophorèse en toit de la fraction glycopeptidique alcali-stable des IgA.



## IV - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DES sIgA

### A - ÉTUDE DES GLYCANNES ALCALI-LABILES

#### 1 - COMPOSITION MOLLAIRE EN GLUCIDES

Les compositions molaires en glucides des glycanes alcali-labiles réduits sont donnés dans le Tableau XIII p.115. Il faut remarquer que le N-acétylgalactosaminitol est dosé en général par défaut.

Ces résultats montrent que les glycanes A et B sont très complexes. En effet, ils renferment des résidus de fucose, galactose, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosaminitol dans les rapports : 1 : 4 : 3 : 1. Le glycanne B possède, en outre, un résidu d'acide sialique supplémentaire. Le glycanne C<sub>I</sub> renferme du galactose, de la N-acétylglucosamine et du N-acétylgalactosaminitol dans les rapports : 2 : 1 : 1 et le glycanne C<sub>II</sub> dans les rapports : 1 : 1 : 1. Les glycanes E et D renferment du galactose et du N-acétylgalactosaminitol dans les rapports : 1 : 1. Le glycanne D possède, en outre, un résidu d'acide sialique supplémentaire. Les glycanes réduits E et C<sub>III</sub> ont la même composition molaire.

#### 2 - ETUDE DE LA STRUCTURE

La structure des glycanes alcali-labiles a été établie sur les résultats de méthylation, spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire.

##### a - Etude du glycanne A

###### $\alpha$ - Méthylation

Les résultats concernant la méthylation du glycanne A sont rassemblés dans le Tableau XIV p. 116. La présence de 2,3,4-tri-O-méthyl fucoside et de 2 résidus de 2,3,4,6-tétra-O-méthyl galactoside indique qu'ils sont en position externe. La présence de 2,4-di-O-méthyl galactoside

TABLEAU XIII

Composition molaire en glucides des glycanes alcali-labiles réduits dans les IgA lactées

Nature des oses	A	B	C <sub>I</sub>	C <sub>II</sub>	C <sub>III</sub>	D	E
Fuc	0,93	1,2	0	0	0	0	0
Gal	4	4	2	1	1	1	1
GlcNAc	2,8	3,1	1	1	0	0	0
GalNac <sup>itol</sup>	0,5(1)	0,6(1)	0,5(1)	0,7(1)	0,5(1)	0,89(1)	0,6(1)
ANAN	0	0,91	0	0	0	0,76	0

Les résultats sont calculés sur la base de 4 résidus de galactose pour les glycanes A et B ; d'un résidu de N-acétylglucosamine pour les glycanes C<sub>I</sub> et C<sub>II</sub> ; et d'un résidu de galactose pour les glycanes C<sub>III</sub>, D et E.



TABLEAU XIV

Nature des O-méthyl osides	Glycannes				
	A	C <sub>I</sub>	C <sub>III</sub>	D	E
2,3,4-triOMe Fuc	0,65	0	0	0	0
2,3,4,6-tétraOMe Gal	1,85	2	1	0	1
2,4,6-triOMe Gal	1	0	0	1	0
2,4-diOMe Gal	1,3	0	0	0	0
2 acétamido 3,4,6-triOMe Glc	0	0	0	0	0
2 acétamido 3,6-diOMe Glc	1,05	1	0	0	0
2 acétamido 4,6-diOMe Glc	1,2	0	0	0	0
2 acétamido 6-monoOMe Glc	0,66	0	0	0	0
2 acétamido 4-monoOMe Glc	traces	0	0	0	0
1,4,5,6-tétraOMe GalNAcitol	0	0	0,6	0,8	0,5
1,4,5-triOMe GalNAcitol	0,4	0,8	0	0	0
4,7,8,9-tétraOMe sialoside	0	0	0	1	0

Le glycanne B n'a pas été analysé, les quantités dont nous disposions étaient insuffisantes

Le glycanne C<sub>II</sub> a été analysé directement en spectrométrie de masse après méthylation.





indique que le glycanne A possède une structure branchée. En ce qui concerne les dérivés méthylés des osamines, le 3,6-di-O-méthylglucosamine et le 4,6-di-O-méthylglucosamine sont dans les rapports 1 : 1. De plus, nous avons caractérisé la présence de la 6-mono-O-méthylglucosamine, de la 4-mono-O-méthylglucosamine et de N-acétylgalactosaminitol, qui est substituée en 3 et en 6.

### β - Spectrométrie de masse

De masse moléculaire élevée, ce glycanne a du être analysé sur un spectrographe de masse LKB 9000. Cette étude a été effectuée dans le laboratoire du Professeur EGGE (Bonn). L'analyse du spectre de masse (Fig. 38 p.118) du glycanne A révèle l'existence de deux types d'ions, ceux qui dérivent de l'extrémité non réductrice de la molécule et ceux qui dérivent de l'extrémité réduite de la molécule.

#### - Etude de l'extrémité non réductrice :

Les monosaccharides terminaux non réducteurs sont le galactose (m/e 219 ; 187) et le fucose (m/e 189 ; 157). D'une part m/e 464 ; 228 représentent l'ion disaccharidique Gal (1 → 3) GlcNAc<sup>+</sup> et m/e 393 ; 361 représentent l'ion Fuc - Gal<sup>+</sup>.

Dans la région des trisaccharides m/e 638 représentent l'ion Gal 1 - 3 GlcNAc<sup>+</sup> qui après élimination du galactose lié en 3 fournit

$$\begin{array}{c} | \\ \text{1,4} \\ \text{Fuc} \end{array}$$

l'ion 402. Dans un second ion trisaccharidique Gal 1 - 3 GlcNAc - Gal<sup>+</sup> le galactose terminal peut aussi être lié en 3 (m/e 432).

De façon similaire deux ions tétrasaccharidiques sont observés ; un contenant du fucose (m/e 842 et m/e 606) et l'autre contenant une hexosamine en plus (m/e 913 et m/e 677 après élimination du galactose lié en 3).

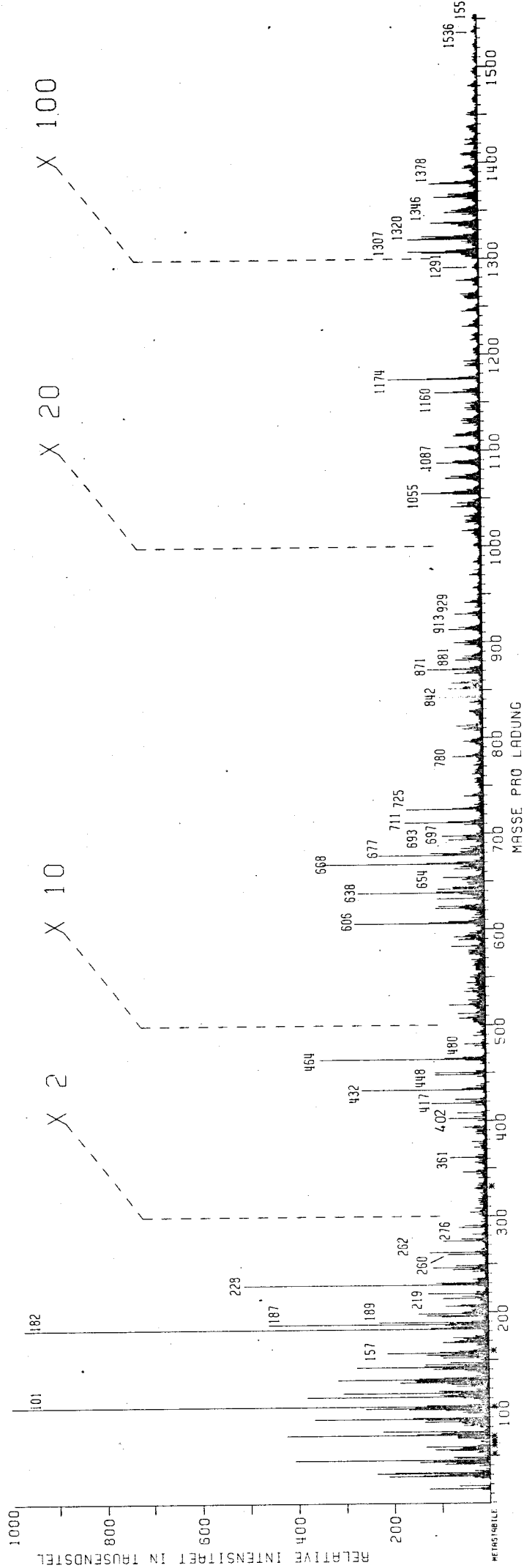
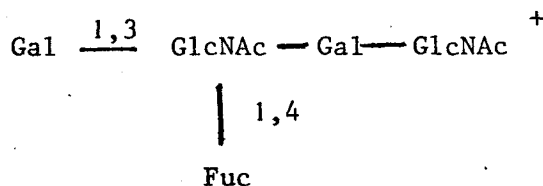


FIGURE 38

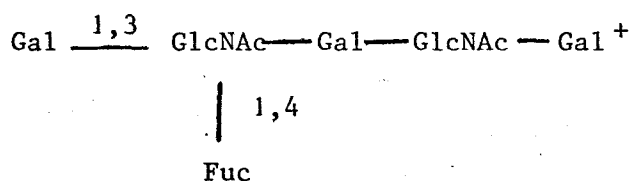
Spectre de masse du glycanne A obtenu après méthylation et introduction directe sur l'appareil LKB 9000



Les ions penta- et hexasaccharidiques contiennent du fucose dérivent tous de l'extrémité non réductrice de la molécule. En premier lieu l'ion pentasaccharidique m/e 1087 a la structure suivante :



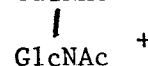
Après la perte du résidu de galactose terminal l'ion 851 est observé. En second lieu, l'ion hexasaccharidique de masse m/e 1291 a la structure suivante :

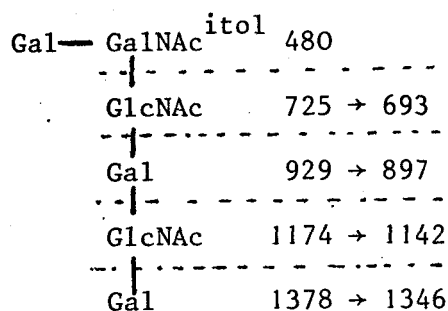


De même, un ion de basse intensité de masse m/e 1536 représente un heptasaccharide terminal. Cet ion possède une hexosamine supplémentaire.

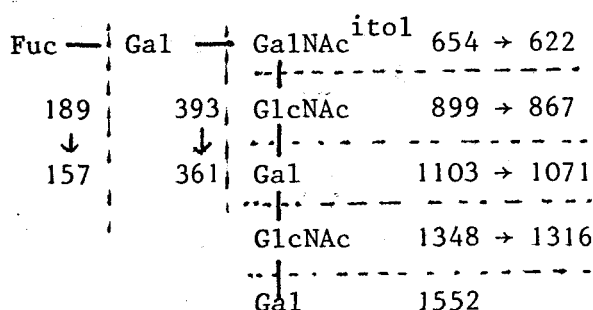
- Etude de l'extrémité réduite

L'ion m/e 276 représentant le galactosaminitol et l'ion m/e 480 représentant le fragment Gal - GalNAc<sup>itol</sup> sont présents avec une très faible intensité, par compte l'ion trisaccharidique Gal - GalNAc<sup>itol</sup> de masse m/e 725 est très intense. Les ions m/e 929, 1174 et 1378 peuvent être expliqués par l'addition au trisaccharide d'hexosamines et d'hexoses, pour obtenir une unité tétra, penta ou hexasaccharidique. Ainsi l'ion m/e 1378 a la structure suivante :





L'ion 1552 possède un fucose supplémentaire et possède la structure suivante :



Le fragment tétrasaccharidique Fuc—Gal—GalNAc<sup>itol</sup> est très souvent retrouvé.

|  
GlcNAc +

En conclusion de cette étude, une grande variété de formule peut être proposée, cependant en tenant compte des résultats de la méthylation (Tableau XIV p.116) une structure branchée peut être présente. Le point de branchement étant un résidu de galactose. L'ensemble de ces données permet de proposer 3 types de structures oligosaccharidiques possibles dont le schéma est donnée à la fig. 39 p.121.

b - Etude du glycanne B

Compte tenu des quantités faibles de ce glycanne que nous disposions, seule l'analyse de ce glycanne par méthanolyse a été réalisée. Les résultats donnés dans le Tableau XIII p.115, montre qu'il possède une composition molaire identique à celle du glycanne A avec la présence supplémentaire d'un résidu d'acide N-acétylneuraminique. Il est possible de prévoir une structure voisine de celle du glycanne A mais sialylée.

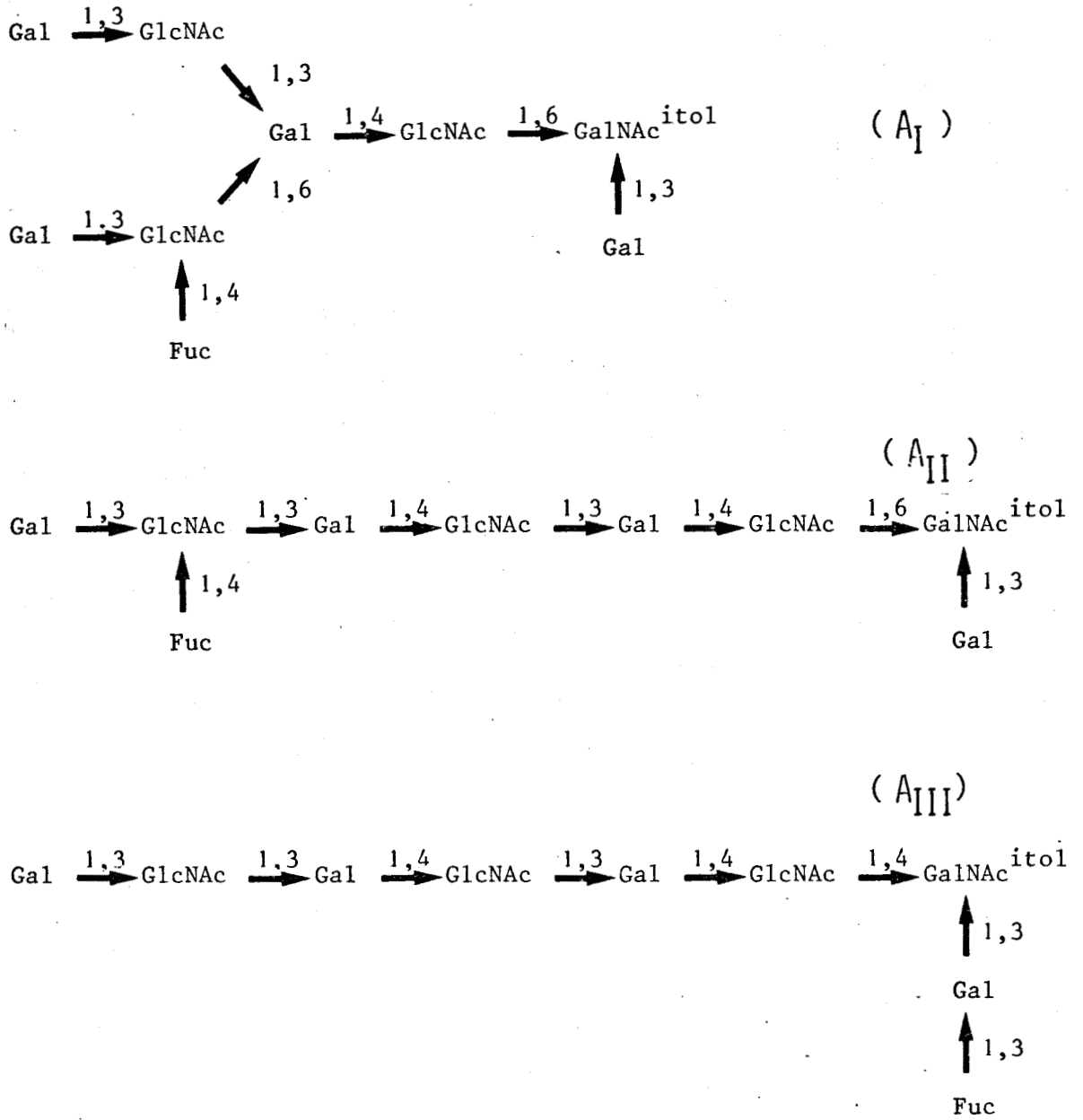


FIGURE 39

Le glycanne A est le mélange de 3 glycanes isomères A<sub>I</sub>, A<sub>II</sub> et A<sub>III</sub>



c - Etude du glycanne C

α - Séparation des constituants du glycanne C

L'analyse en couche mince de ce glycanne (Fig. 35 p.109) a montré qu'il s'agissait en fait d'un mélange de 3 constituants : C<sub>I</sub>, C<sub>II</sub>, C<sub>III</sub>. Ces 3 composés ont été isolés séparément après chromatographie sur papier dans les conditions décrites à la page .

β - Méthanolyse

L'analyse de ces 3 glycannes en chromatographie phase gazeuse (Tableau XIII p.115) montre que le glycanne C<sub>I</sub> renferme du galactose, de la N-acétylglucosamine, et du N-acétylgalactosaminitol dans les rapports 2 : 1 : 1, que le glycanne C<sub>II</sub> renferme les mêmes monosaccharides dans les rapports 1 : 1 : 1 et que le glycanne C<sub>III</sub> possède un résidu de galactose pour un résidu de N-acétylgalactosaminitol.

γ - Méthylation

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau XIV p. 116.

En conclusion le glycanne C<sub>III</sub> a la structure suivante :



δ - Spectrométrie de masse

L'analyse des spectres de masse des composés C<sub>I</sub> et C<sub>II</sub> (Fig. 40 et 41 p.123 et p.126) après méthylation a été faite.

- Etude du spectre du glycanne C<sub>I</sub> (Fig. 40 p.123)

L'étude du spectre de masse du glycanne C<sub>I</sub> a permis de dégager les éléments suivants : l'absence de l'ion m/e 276 (correspondant à un hexosaminitol terminal) permet de conclure à une structure branchée. Le fragment m/e 480 correspond à la séquence hexose - hexosaminitol,

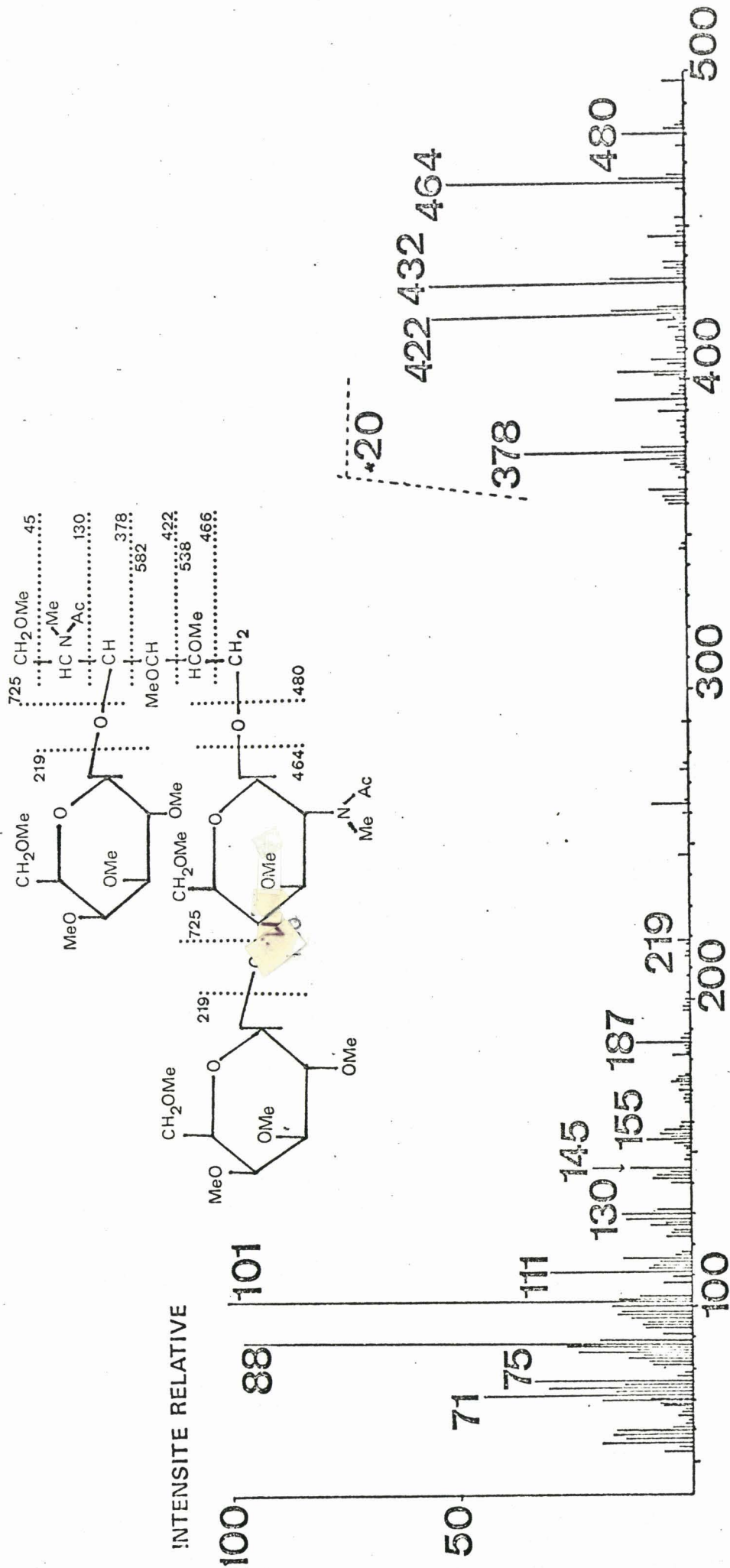
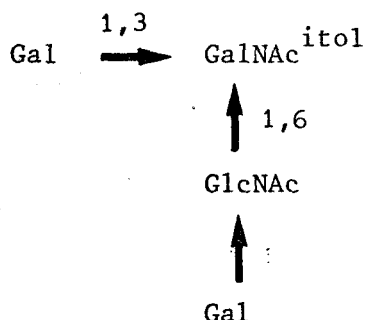


FIGURE 40

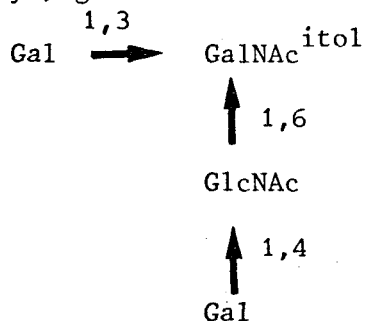
Spectre de masse du glycanne C<sub>1</sub> après méthylation obtenu sur l'appareil Riber MAG GCMS R10-10



tandis qu'aucun fragment caractéristique de la seconde branche n'est visible sur le spectre. Les fragments m/e 378 et 480 permettent d'autre part de préciser la longueur de la première branche, qui se résume à la liaison d'un hexose en (1 → 3) sur l'hexosaminitol. La seconde branche est caractérisée par les fragments m/e 464 et 432, qui démontrent donc l'existence de séquences hexose → hexosamine ou hexosamine → hexose. Les ions m/e 260 et 228 sont ici très faibles et résultent probablement d'une contamination du trisaccharide C<sub>II</sub>. La séquence hexose - hexosamine est donc déduite de l'étude du spectre. L'ion m/e 422 montre que le carbone 4 de l'hexosaminitol est libre, ce qui permet de conclure à la structure suivante :



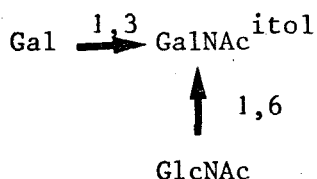
Ces résultats sont confirmés par l'analyse des dérivés méthylés après méthanolyse. La caractérisation de 1,4,5-tri-méthyl 3,6-diacétyl N-acétyl(méthyl) hexosaminitol et de 3,6-di-méthyl 4-monoacétyl N-acétyl(méthyl) glucosamine mène à la structure suivante :





- Etude du spectre du glycanne C<sub>II</sub> (Fig. 41 p.126)

L'oligosaccharide C<sub>II</sub> a été identifié sur la base des résultats suivants : l'absence du fragment m/e 276 correspondant à l'hexosaminitol terminal, montre qu'il s'agit d'une structure branchée, confirmée par la présence des fragments m/e 260 (N-acétylhexosamine externe) et m/e 213 (hexose externe). En outre, les séquences hexosamine -hexosaminitol (m/e 521) et hexose-hexosaminitol (m/e 480) permettent de préciser qu'il s'agit d'un trisaccharide. La liaison hexose (1 → 3) hexosaminitol est précisée par le fragment m/e 378. L'existence du fragment m/e 422 montre en outre que le carbone n° 4 de l'hexosaminitol est libre, ce qui implique une liaison N-acétylhexosamine (1 → 6) hexosaminitol. L'absence de l'ion m/e 290, caractéristique des hexosaminitols substitués en 3 et 4 confirme cette analyse. La structure du trisaccharide C<sub>II</sub> est donc la suivante :



ε - Résonance magnétique nucléaire

D'autre part, l'analyse en résonance magnétique nucléaire du glycanne C (C<sub>I</sub>, C<sub>II</sub> et C<sub>III</sub>) a permis de préciser que l'anomérisation de toutes les liaisons présentes est de type β. Ces structures sont rassemblées dans la Fig. 42 p.127.

d - Etude du glycanne D

α - Méthylation

Les résultats de la méthylation du glycanne D sont rassemblés dans le Tableau XIV p.116.

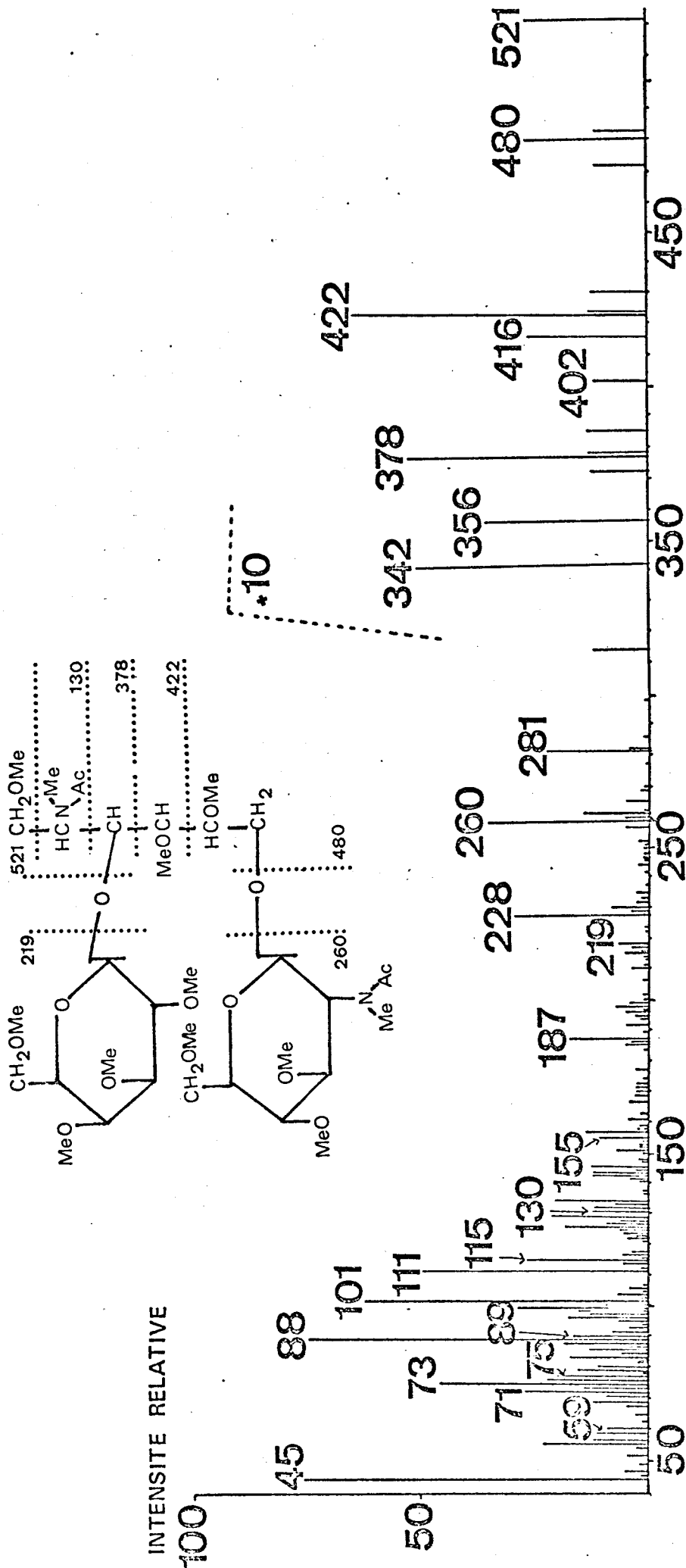


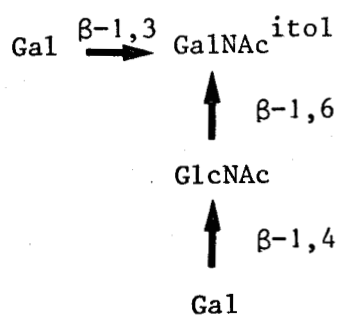
FIGURE 41

Spéctre de masse du glycanne C<sub>II</sub> après méthylation obtenu sur

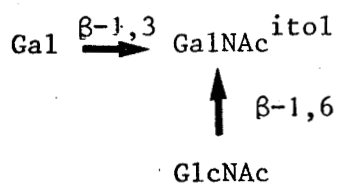
l'appareil Ribier MAG GCMS R10-10



Glycane C<sub>I</sub>



Glycane C<sub>II</sub>



Glycane C<sub>III</sub>

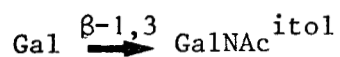


FIGURE 42

Structure des glycanes C<sub>I</sub>, C<sub>II</sub> et C<sub>III</sub>, déterminée sur la base des résultats de méthylation, de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire.



La méthylation du glycanne D suivie d'une méthanolyse et d'une N-réacétylation a conduit à la caractérisation de 3 éthers méthyliques. Leur étude a été complétée en spectrométrie de masse.

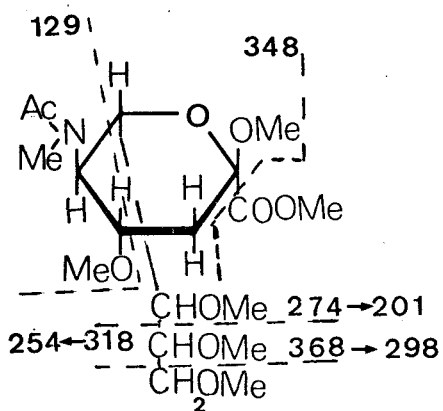
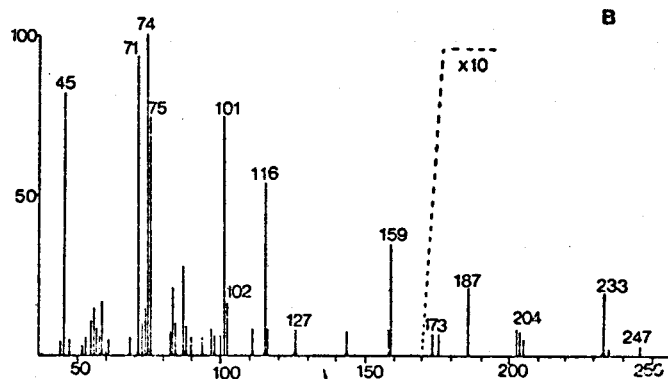
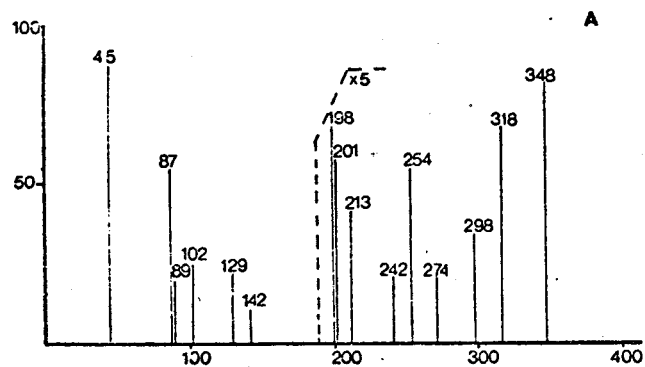
#### β - Spectrométrie de masse

L'éther méthylique B, Fig. 43 p. 129 a été identifié au méthyl 2,4,6-tri-O-méthyl-3-mono-O-acétyl galactoside sur la base de la mesure de son temps de rétention et de l'analyse de son spectre de masse. Les principaux fragments ayant servi à son identification sont décrits dans la Fig. 44 p.130. Le fragment m/e 247 ( $A_1$ ) est caractéristique d'un triméthyl-mono-acétyl glycoside. Le fragment m/e 233 obtenu par perte du  $C_6$  porteur d'un groupement O-méthyl ( $\cdot CH_2 OMe$ ) précise la présence d'un groupement O-méthyl en  $C_6$ .

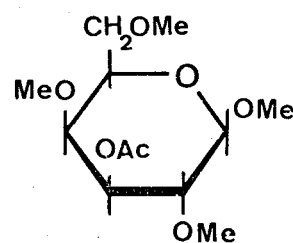
La présence de l'ion m/e 102 ( $CH_3-O-CH_2-\cdot CH-CH = \overset{+}{O}Me$ ), montre que le  $C_6$  est lui même O-méthylé. Le fragment m/e 101 ( $Me-O-\underset{4}{CH}=\underset{3}{CH}-\underset{2}{CH}=\overset{+}{O}Me$ ) est ici très intense, indiquant une méthylation sur les carbones 2 et 4. Le radical acétyl se trouve donc en position 3. Ce fait est confirmé par l'absence de l'ion m/e 149 et la teneur relativement faible de l'ion  $J_1$  (m/e 75).

L'éther méthylique C, Fig. 43 p. 129 a été identifié au 1,4,5,6-tétra-O-méthyl-3-O-acétyl-N-méthyl acétamido galactosaminitol sur la base de l'analyse de son spectre de masse : le fragment m/e 133 indique que les carbones 4,5,6 sont méthylés. Les fragments m/e 246 et 290 confirment que le radical acétyl substitue le carbone 3. L'intense fragment m/e 88 provient de l'ion m/e 130 par perte d'une molécule de cétène.

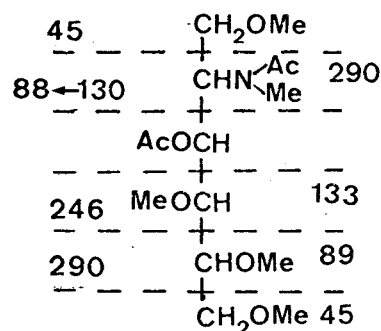
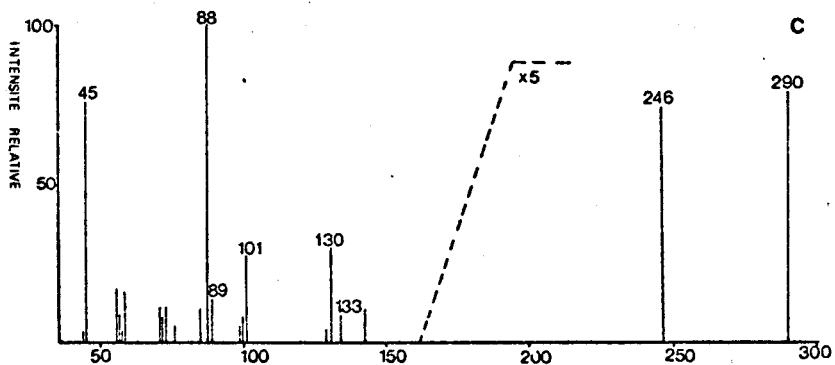
L'éther méthylique A correspond au méthyl 4,7,8,9-tétra-O-méthyl sialoside dont le schéma de fragmentation est décrit dans la Fig. 43 p.129.



4,7,8,9-tétra-OMe sialoside



2,4,6-tri-OMe galactoside



4,5,6-tri-OMe galactosaminitol

FIGURE 43

Spectres de masse des dérivés méthylés et  
méthanolysés du glycanne D (Riber Mag GCMS R10-10)



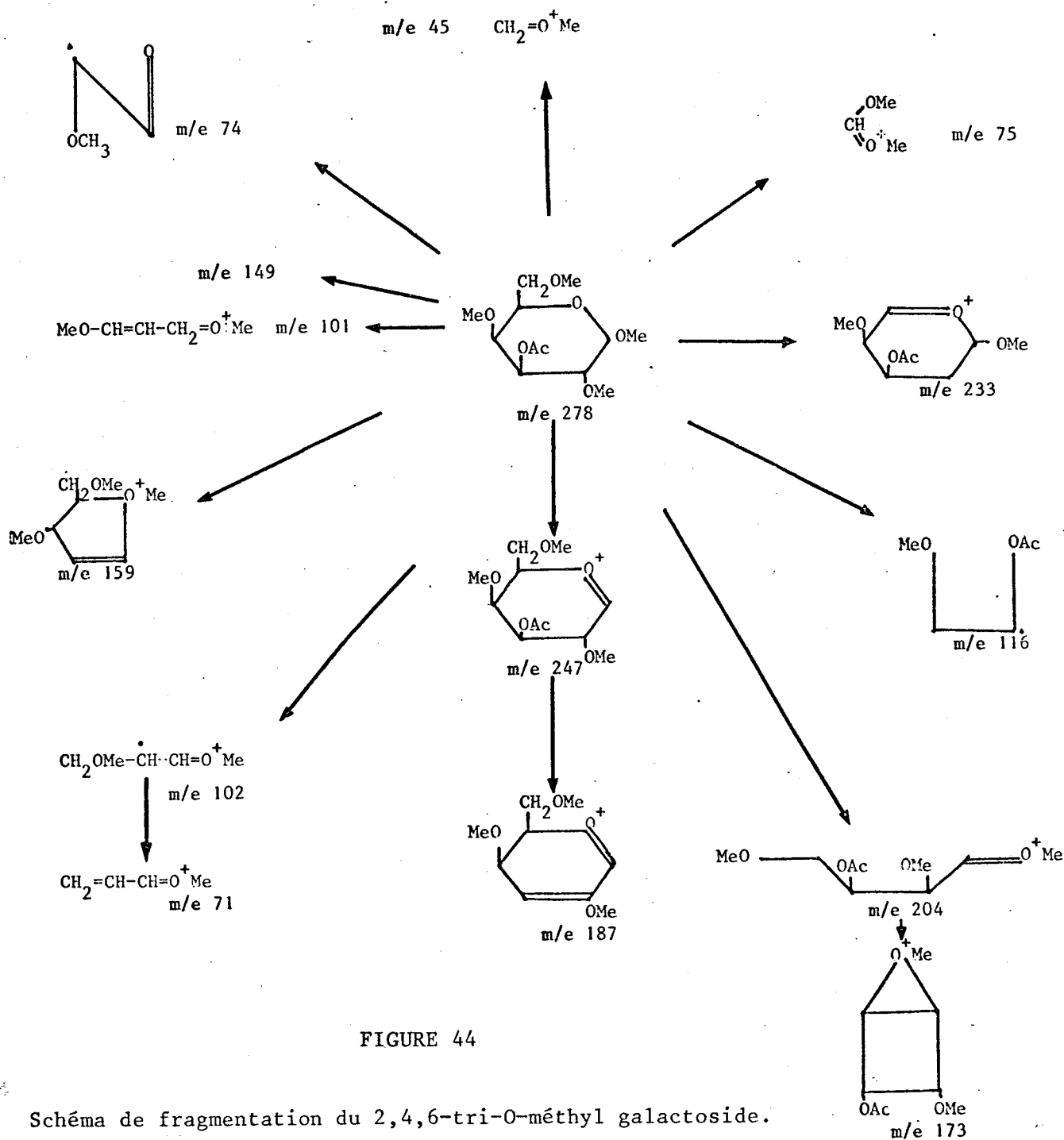


FIGURE 44

Schéma de fragmentation du 2,4,6-tri-O-méthyl galactoside.  
 (FOURNET et al., 1979)



L'ensemble de ces résultats conduit à la structure donnée dans la Fig. 45 p.132.

e - Etude du glycanne E

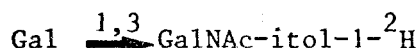
α - Méthanolyse. Méthylation

Les résultats de la méthanolyse et de la méthylation du glycanne E donnés dans les Tableaux XIII et XIV p.115 et p.116 démontrent la présence d'un seul résidu de galactose et d'un seul résidu de N-acétylgalactosaminitol substitué en 3.

La nature de la liaison du galactose sur le N-acétylgalactosaminitol a été confirmée par spectrométrie de masse.

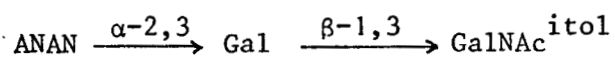
β - Spectrométrie de masse

Le glycanne E réduit au  $BD_4Na$  est méthylé et analysé en introduction directe par spectrométrie de masse. Le spectre de masse est représenté dans la Fig. 46 p.133. Les fragments m/e 219 ( $A_1$ ), 187 ( $A_1$  moins  $CH_3OH$ ) et 155 ( $A_1$  moins 2 ( $CH_3OH$ )) sont caractéristiques de l'hexose terminal non réducteur. Le fragment m/e 277 correspond à l'hexosaminitol. Les fragments m/e 89 et 133 permettent de conclure à une substitution portant sur le carbone 3. La nature de cette liaison est confirmée par la présence des fragments m/e 379, 423 et 467. Sur la base de l'analyse de son spectre de masse, la structure du glycanne E a été établie comme suit :



L'étude par résonance magnétique nucléaire du glycanne E a confirmé la structure du glycanne E donnée par la méthylation et la spectrométrie de masse et a permis de préciser la nature de

Glycane D



Glycane E

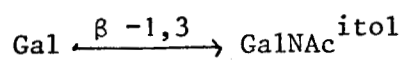


FIGURE 45

Structure des glycanes D et E établie sur la base des résultats de méthylation, de spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire.





Intensité  
relative

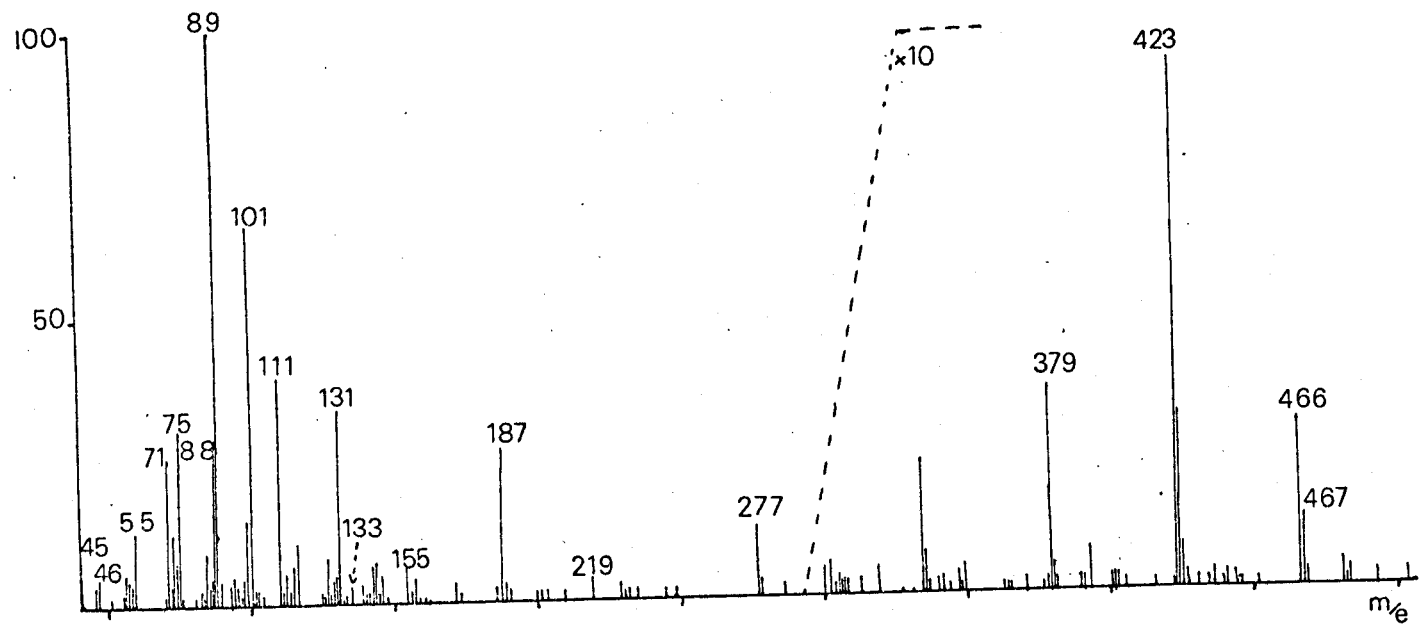
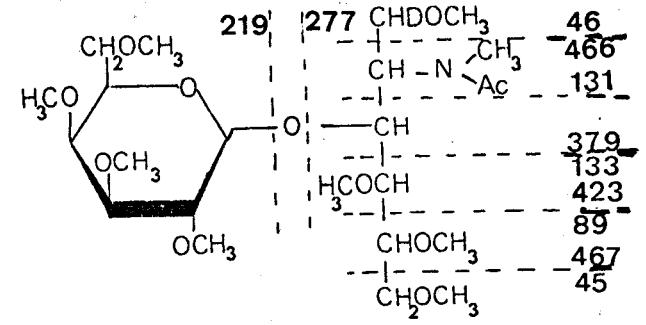


FIGURE 46

Spectre de masse du glycanne E isolé des sIgA obtenus sur l'appareil  
RIBER MAG GCMS R 10-10.



l'anomérisation  $\beta$  de la liaison. La structure complète de l'oligosaccharide E est donnée dans la Fig. 45 p. 132.

La sialylation de ce glycanne doit fort probablement conduire au glycanne D. Le glycanne E est identique au glycanne C<sub>III</sub> dont la structure a été déterminée précédemment.

## B - ÉTUDE DES GLYCOPEPTIDES N-GLYCOSIDIQUES NEUTRES

### 1 - COMPOSITION MOLLAIRE EN ACIDES AMINES ET EN GLUCIDES

#### a - Composition en acides aminés

L'hydrolyse des acides aminés effectuée sur les fractions glycopeptidiques I à III, Tableau XV p. 135 montre que les compositions en acides aminés des glycopeptides sont très voisines et que l'acide aminé majeur est l'acide aspartique.

#### b - Composition en glucides

La fraction glucidique des différents glycopeptides a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse, Tableau XVI p. 136. Ces résultats montrent la présence de résidus de fucose, galactose, mannose et de N-acétylglucosamine. Il faut remarquer l'absence de résidus de N-acétylgalactosamine.

Les asialoglycopeptides possèdent tous de 1 à 2 résidus de fucose, 1 à 2 résidus de galactose, 3 résidus de mannose et 3 à 5 résidus de N-acétylglucosamine. Les rapports molaires trouvés pour chacun d'entre eux semblent indiquer qu'ils sont des fractions glycopeptidiques hétérogènes.

La présence dans la fraction glycopeptidique totale (Tableau XVII p. 138) de 2,3,4,6-tétra-O-méthyl mannoside, 2-mono-O-méthyl mannoside et du 3,4,6 tri-O-méthyl glucosamine laisse prévoir des structures plus complexes que celle d'une structure biantennée classique.

TABLEAU XV

Composition en acides aminés des glycopeptides I à III alcali-stables neutres isolés des IgA de sécrétion.

	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
Asp	1	1	1
Thr	0	0,4	0,4
Ser	0	0,3	0,5
Glu	0	0,6	0,3
Pro	0	0	traces
Gly	0	0,4	0,25
Ala	0	0,2	0,2
GlcNH <sub>2</sub>	4,6	4,4	4,4
Val	0	0	0,2

● Les résultats sont calculés sur la base d'un résidu d'acide aspartique.



TABLEAU XVI

Composition molaire en glucides des glycopeptides I à III alcali-stables isolés des IgA de sécrétion.

	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
Fucose	0,5	1,8	1
Galactose	0,8	2,1	1,4
Mannose ●	3	3	3
N-acétyl glucosamine	3,3	4,7	4,3
N-acétyl galactosamine	0	0	0
Acide N-acétyl neuraminique	0	0	0

● Les résultats sont calculés sur la base de 3 résidus de mannose.



## 2 - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES NEUTRES

La structure des glycopeptides a été établie en nous fondant sur les résultats de méthanolyse, méthylation, spectrométrie de masse, et sur la comparaison des valeurs des déplacements chimiques du proton des différents monosaccharides analysés en  $^1\text{H}$  Résonance magnétique nucléaire à 360 MHz.

### a - Etude du glycopeptide I

Les résultats de la méthylation du glycopeptide I sont rassemblés dans le Tableau XVII p. 138. La présence des dérivés méthylés tels que le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl mannoside, le 2-mono-O-méthyl mannoside et le 2-acétamido-3,4,6 glucoside indique qu'il s'agit d'une structure plus complexe. De plus, les rapports molaires de tous les dérivés méthylés montrent que le glycopeptide I est hétérogène. Nous avons entrepris leur séparation par utilisation de méthodes différentes de celles de l'électrophorèse sur papier.

### b - Etude du glycopeptide II

#### $\alpha$ - Méthylation

Les résultats de la méthylation du glycopeptide II sont rassemblés dans le Tableau XVII p. 138. Ils montrent l'existence de 2 résidus de fucose en position externe, ainsi que la présence de 2 résidus de galactose non substitués. De plus, la présence de 2-mono-O-méthyl mannoside et de 2-acétamido-3,4,6-tri-O-méthyl glucoside semble indiquer que le glycopeptide II est un mélange de deux glycopeptides.

TABLEAU XVII

Détermination des rapports molaires des éthers méthyliques des monosaccharides présents dans les glycopeptides I à III des IgA avant et après séparation électrophorétique, à pH 6,5 .

Nature des O-méthyl osides	F GPT	GLYCOPEPTIDES		
		I	II	III
2,3,4-triOMe Fuc	0,42	0,7	1,6	0,8
2,3,4,6-tétraOMe Gal	0,5	1,2	1,7	1,1
2,3,4-triOMe Gal	traces	0	0	0
2,4,6-triOMe Gal	0	0	0	0
2,3,4,6-tétraOMe Man	0,24	0,7	0	0,13
3,4,6-triOMe Man	1	2	2	1,5
2,4-diOMe Man	1	1	1	1
2,monoOMe Man	0,6	1	traces	0,45
2 acétamido 3,4,6-triOMe Glc	1,7	1	traces	3
2 acétamido 3,6-diOMe Glc	3	2,7	3,1	3,6
2 acétamido 3-monoOMe Glc	traces	traces	traces	0
2 acétamido 6-monoOMe Glc	traces	0	0	0,4

OMe = O-méthyl ; FGPT = fraction glycopeptidique totale.

• Les résultats sont calculés sur la base d'un résidu de 2,4-diOMe Man



### $\beta$ - Résonance magnétique nucléaire

La structure du glycopeptide II a été confirmée par résonance magnétique nucléaire (Fig. 47 p. 140). En effet, il s'agit d'un mélange de glycopeptides, que nous appelons : forme A et forme B.

La présence d'un deuxième résidu de fucose, qui avait été déterminé par méthanolyse et méthylation, n'a pas été détectée sur le spectre de résonance magnétique nucléaire.

### c - Etude du glycopeptide III

L'étude du glycopeptide III par méthanolyse et méthylation montre qu'il s'agit d'un mélange. D'après les résultats de méthylation (Tableau XVII p. 138) nous pouvons constater, d'une part la nature variée des dérivés méthylés et d'autre part, le taux élevé en dérivés méthyliques de la N-acétylglucosamine.

L'analyse en résonance magnétique nucléaire du glycopeptide III donne un spectre très complexe difficilement interprétable. Néanmoins, il faut signaler la présence de 6 signaux de N-acétylglucosamine.

Vue la complexité de ce glycopeptide, sa purification est en cours d'étude.

## C - ÉTUDE DES GLYCOPEPTIDES N-GLYCOSIDIQUES ACIDES

### 1 - COMPOSITION MOLLAIRE EN ACIDES AMINES ET EN GLUCIDES

#### a - Composition en acides aminés

L'hydrolyse d'acides aminés effectués sur les fractions glycopeptidiques IV à VII sont rassemblés dans le Tableau XVIII p. 141. L'acide aspartique est l'acide aminé majeur.





TABLEAU XVIII

Composition en acides aminés des glycopeptides acides IV à VII isolés des IgA de sécrétion

	IV	V	VI	VII
Asp*	1	1	1	1
Thr	0,6	0,5	0,5	0,4
Ser	0,3	0,4	0,2	0,5
Glu	0,3	0,1	0,2	0,3
Pro	0	0,1	0	traces
Gly	0,3	0,3	0,2	0,25
Ala	0,4	0,3	0	0,2
GlcNH <sub>2</sub>	4,2	3,9	3,5	4,4
Val	0,3	0,1	0,1	0,2

\* Les résultats sont calculés sur la base d'un résidu d'acide aspartique



b - Composition molaire en glucides

Les résultats de l'analyse chromatographique sont rassemblés dans le Tableau XIX p. 143. Les sialoglycopeptides possèdent de 1 à 2 résidus de fucose, de 2 à 3 résidus de galactose, 4 résidus de N-acétylglucosamine et 1 à 2 résidus d'acide N-acétylneuraminique.

2 - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ACIDES

La structure des glycopeptides a été établie sur les résultats de méthanolyse, méthylation, spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire et de l'hydrazinolyse et diazotation.

a - Etude du glycopeptide IV

Le glycopeptide IV est le glycopeptide mineur de la fraction sialoglycopeptidique. Les quantités obtenues de ce glycopeptide ont été insuffisantes et n'ont pas permis d'effectuer une étude complète. La méthanolyse nous révèle qu'il est disialilé et que les rapports molaires des monosaccharides suggèrent qu'il s'agit d'un glycopeptide de structure biantennée classique.

b - Etude du glycopeptide V

Les résultats de méthylation sont rassemblés dans le TABLEAU XX p. 145. La présence du 2,4 di O-méthyl mannoside indique que la structure est biantennée, un résidu de galactose est terminal, l'autre est substitué en 6 par de l'acide N-acétylneuraminique. La présence de traces de 2-acetamido 6-mono O-méthyl glucoside semble indiquer que le glycopeptide V est souillé par un glycopeptide possédant deux résidus de fucose ( Fig. 47 bis p.144) Ces glycopeptides sont retrouvés dans la fraction mineure du glycopeptide VII (Fig. 54 p.156).

c - Etude du glycopeptide VI

L'étude des dérivés méthylés du glycopeptide VI montre que l'enchaînement des monosaccharides est identique à celui du glycopeptide V.

TABLEAU XIX

Composition molaire en glucides des glycopeptides acides alcali-stables  
II à VII isolés des IgA de sécrétion

	IV	V	VI	VII
Fucose	1,08	0,84	1,25	1,53
Galactose	2,65	2,00	2,2	2,75
Mannose *	3	3	3	3
N-acétylglucosamine	3,92	4,07	4,04	3,89
Acide N-acétylneuraminique	1,94	0,82	0,89	0,68

\* Les résultats sont calculés sur la base de 3 résidus de mannose

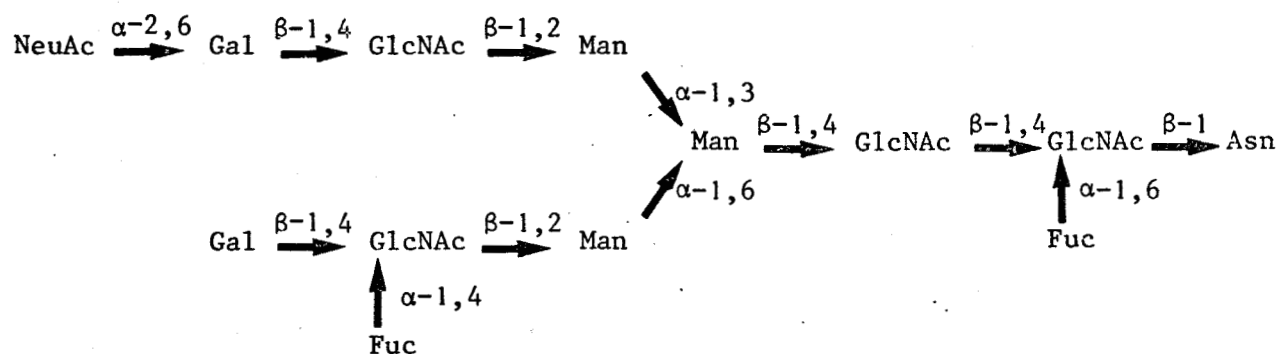
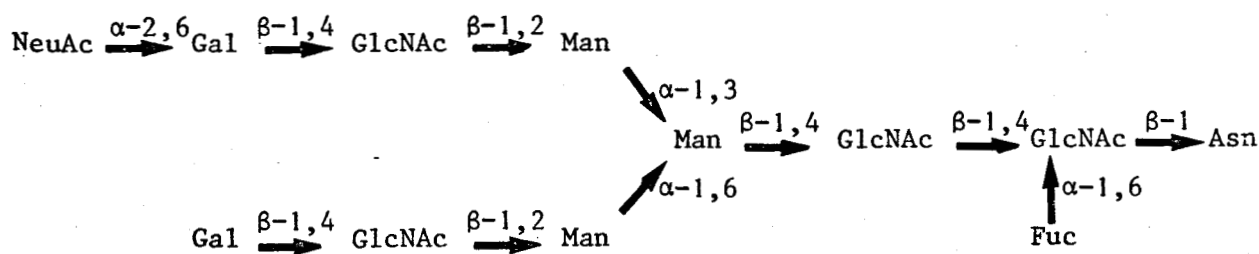


FIGURE 47 bis

Structures proposées pour les glycopeptides V et VI sur les résultats de la méthylation



TABLEAU XX

Détermination des rapports molaires des éthers méthyliques des monosaccharides présents dans les glycopeptides V, VI, VII des sIgA

Nature des O-Methyl osides	V	VI	VII
2,3,4-triOMe Fuc	1,2	0,7	0,81
2,3,4,6-tétraOMe Gal	0,9	0,98	1
2,3,4-triOMe Gal	1,2	1	0,98
2,4,6-triOMe Gal	0	0	0,22
2,3,4,6-tétraOMe Man	0	0	0
3,4,6-triOMe Man	2	2	2
2,4-diOMe Man	1,19	1	1
2-monoOMe Man	0	0	0
2 acétamido 3,4,6-triOMe Glc	0	0	0
2 acétamido 3,6-diOMe Glc	2,65	2,75	3,2
2 acétamido 3-monoOMe Glc	n.d.	n.d.	0,68
2 acétamido 6-monoOMe Glc	0,27	n.d.	0,20

OMe = O-méthyl

\* Les résultats sont calculés sur la base d'un résidu de 2,4-diOMe Man  
Le glycopeptide IV n'a pas été analysé. Les quantités dont nous disposions étaient insuffisantes



d - Etude du glycopeptide VII

$\alpha$  - Méthylation \*

La nature des dérivés méthylés (Tableau XX p. 145) des monosaccharides présents dans le glycopeptide VII nous donne des renseignements très précieux concernant sa structure. Si nous nous rapportons à un modèle structural classique, la présence d'un résidu de 2,4 di-O-méthyl mannoside et de 2 résidus de 3,4,6 tri-O-méthyl mannoside indique l'existence du "core" trimannosidique. La présence d'un résidu de 2,3,4 tri-O-méthyl fucoside et d'un résidu de 2,3,4,6 tétra-O-méthyl galactoside indique qu'ils sont en position externe. La présence de 2,3,4-tri-O-méthyl galactoside indique qu'il existe un résidu d'acide sialique branché en 2,6 : de plus, la présence de traces de 2,4,6-tri-O-méthyl galactoside est en faveur de l'existence d'un résidu supplémentaire branché en 2,3. La méthylation nous donne une indication sur l'enchaînement des monosaccharides présents dans le glycopeptide VII, mais elle ne nous permet pas de positionner le fucose, ni l'acide sialique.

$\beta$  - Spectrométrie de masse \*\*

L'identification des dérivés 2,4,6 et 2,3,4-tri-O-méthyl galactoside a été confirmée par spectrométrie de masse après hydrolyse, réduction et réacétylation. L'analyse du spectre de masse est présenté dans la Fig. 49 p. 147.

---

\* Nous remercions Yves Leroy pour les analyses chromatographiques en phase gazeuse.

\*\* Nous remercions G. Ricart et Y. Leroy pour les analyses en spectrométrie de masse et G. Strecker pour l'interprétation des spectres.

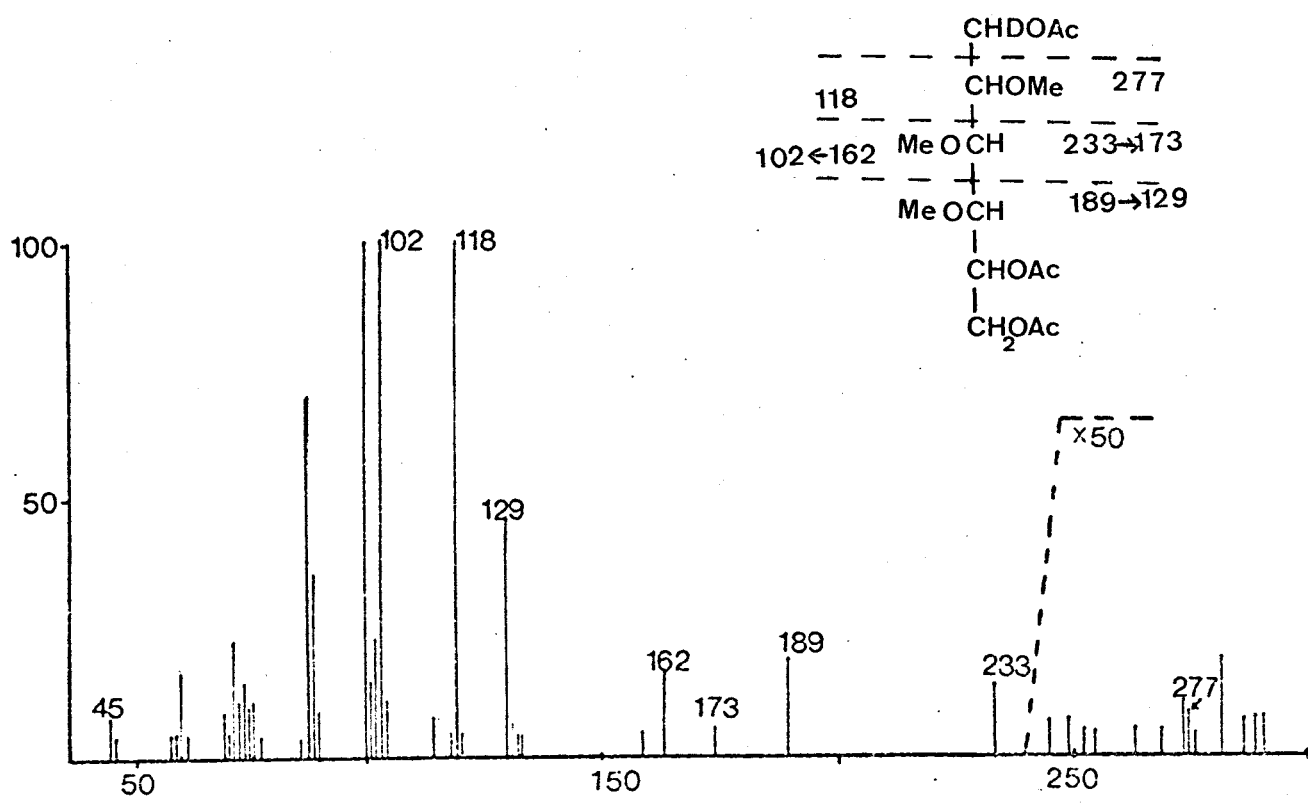
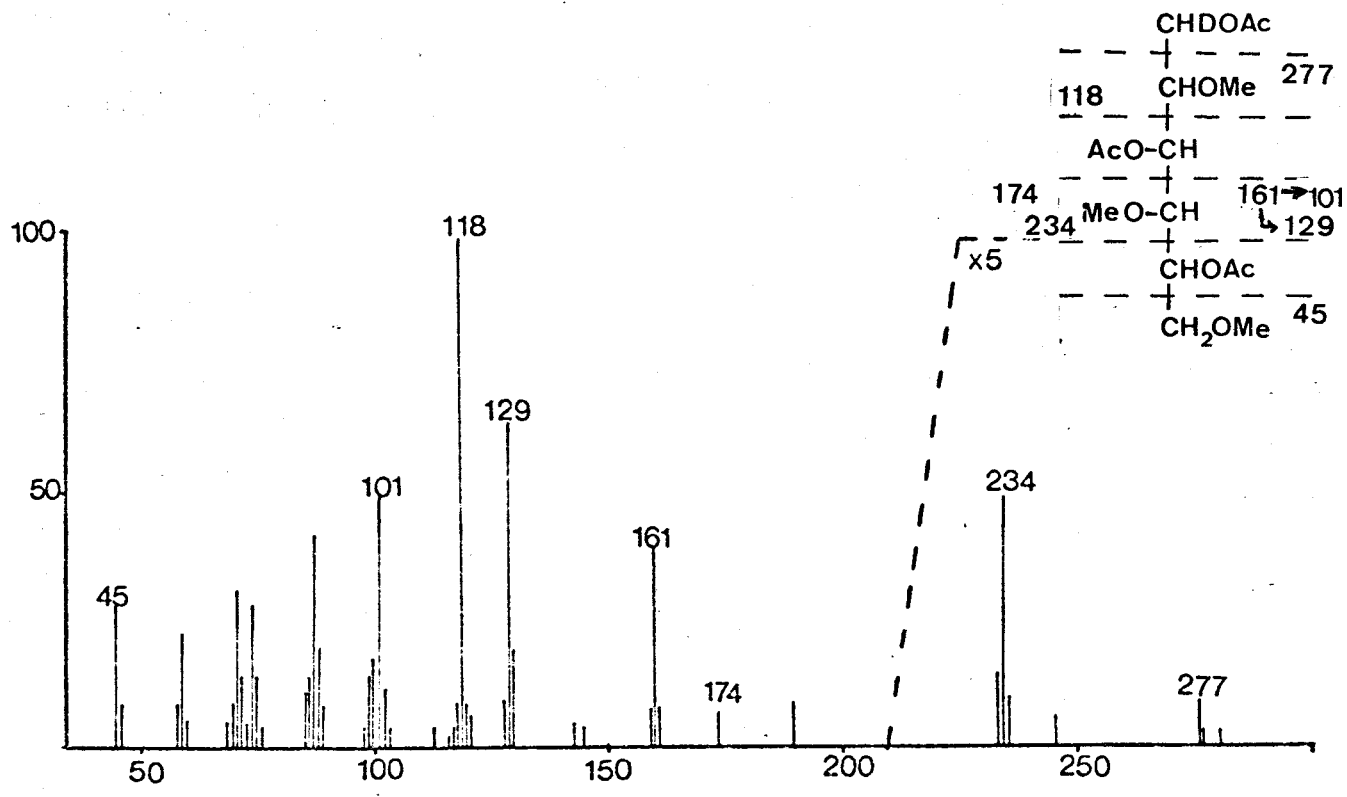


FIGURE 49

Spectres de masse des dérivés méthylés et réduits du glycopeptide VII:

En haut : 2,4,6-tri-O-méthyl galactoside

En bas : 2,3,4-tri-O-méthyl galactoside.



### $\gamma$ - Résonance magnétique nucléaire \*

Des études spectrales  $^1\text{H}$  en résonance magnétique nucléaire à 360 MHz réalisées au laboratoire du Professeur Vliegthart d'Utrecht en collaboration avec notre laboratoire sur un très grand nombre de structures glycopeptidiques ont permis de mettre en évidence que les déplacements chimiques et les constantes de couplage des protons anomériques sont caractéristiques de la nature du monosaccharide, de la configuration de la liaison glycosidique et de la position du monosaccharide dans la chaîne polypeptidique.

L'analyse en résonance magnétique nucléaire du glycanne VII a permis de préciser l'anomérisation des liaisons glycosidiques : toutes les N-acétylglucosamines possèdent une anomérisation  $\beta$  ( $J_{1,2} \approx 9,8$  Hz). Deux résidus de mannose possèdent une anomérisation  $\alpha$  ( $J_{1,2} \approx 1,4$  Hz) ; un troisième résidu de mannose possède une anomérisation  $\beta$  ( $J_{1,2} \approx 1$  Hz). Les résidus de galactose ont une anomérisation  $\beta$  ( $J_{1,2} \approx 7,5$ ).

D'autre part, les déplacements chimiques des protons anomériques des mannose 4 ( $\delta = 5,13$  ppm) et 4' ( $\delta = 4,93$  ppm) sont caractéristiques de 2 résidus  $\alpha$  mannose d'un noyau trimannosidique des glycanes de type N-acétyllactosaminique. En outre, la valeur observée pour le mannose 4 indique que la branche correspondante possède un acide sialique lié en 2,6 (valeur correspondante à une branche non sialylée ou sialylée en 2,3 : 5,12 ppm).

Le déplacement chimique des protons H-3 de l'acide sialique en position équatoriale ( $\delta = 2,67$  ppm) et axiale ( $\delta = 1,72$  ppm) correspond à l'acide sialique lié en 2,6. Les valeurs correspondantes

---

\* Nous remercions l'équipe du Professeur Vliegthart pour les études en résonance magnétique nucléaire.



à l'acide sialique lié en 2,3 ( $\delta = 2,76$  et  $1,80$  ppm) sont difficilement observables sur le spectre, bien que la méthylation et la spectrométrie de masse aient confirmé la présence d'une liaison ( $\rightarrow 3$ ).

Le spectre de résonance magnétique nucléaire est présenté dans la Fig. 50 p. 150. Il reste à trouver la nature du monosaccharide qui substitue le galactose sur la branche en ( $\alpha$ -1,6). Pour cela nous avons effectué l'hydrazinolyse et la diazotation.

#### $\delta$ - Hydrazinolyse et diazotation

Après hydrazinolyse et diazotation le glycopeptide VII a été méthylié et analysé en chromatographie phase gazeuse (Fig. 51 (A) p. 151). Les oligosaccharides obtenus sont séparés. Chacun des pics est analysé en spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie phase gazeuse. La reconstitution des ions est faite à la figure 51 (B) p. 151.

Les scans 160, 185, 201, 357 et 362 sont donnés dans la Figure 52 p. 152, et les scans 413, 438, 451, 498 et 597 sont donnés à la Figure 53 p. 153.

1°) Les spectres 160 et 185 correspondent au motif structural Fuc (1-6) N-acétylglucosamine. Le spectre 185 est caractéristique du disaccharide Fuc (-2,5) anhydro-mannitol mais son analyse toute fois ne permet pas de préciser le type de liaison. La liaison du fucose sur la première osamine peut cependant être établie par l'étude du spectre 160 qui correspond à un produit mineur formait au cours de la désamination nitreuse. La conversion de la glucosamine en 2-désoxyglucose et l'étude du spectre de masse de l'oligosaccharide Fuc  $\rightarrow$ 2-désoxyglucitol permet de préciser une liaison 1  $\rightarrow$  6 du Fucose sur l'osamine grâce à la présence des ions 103, 147, 191 et 307.

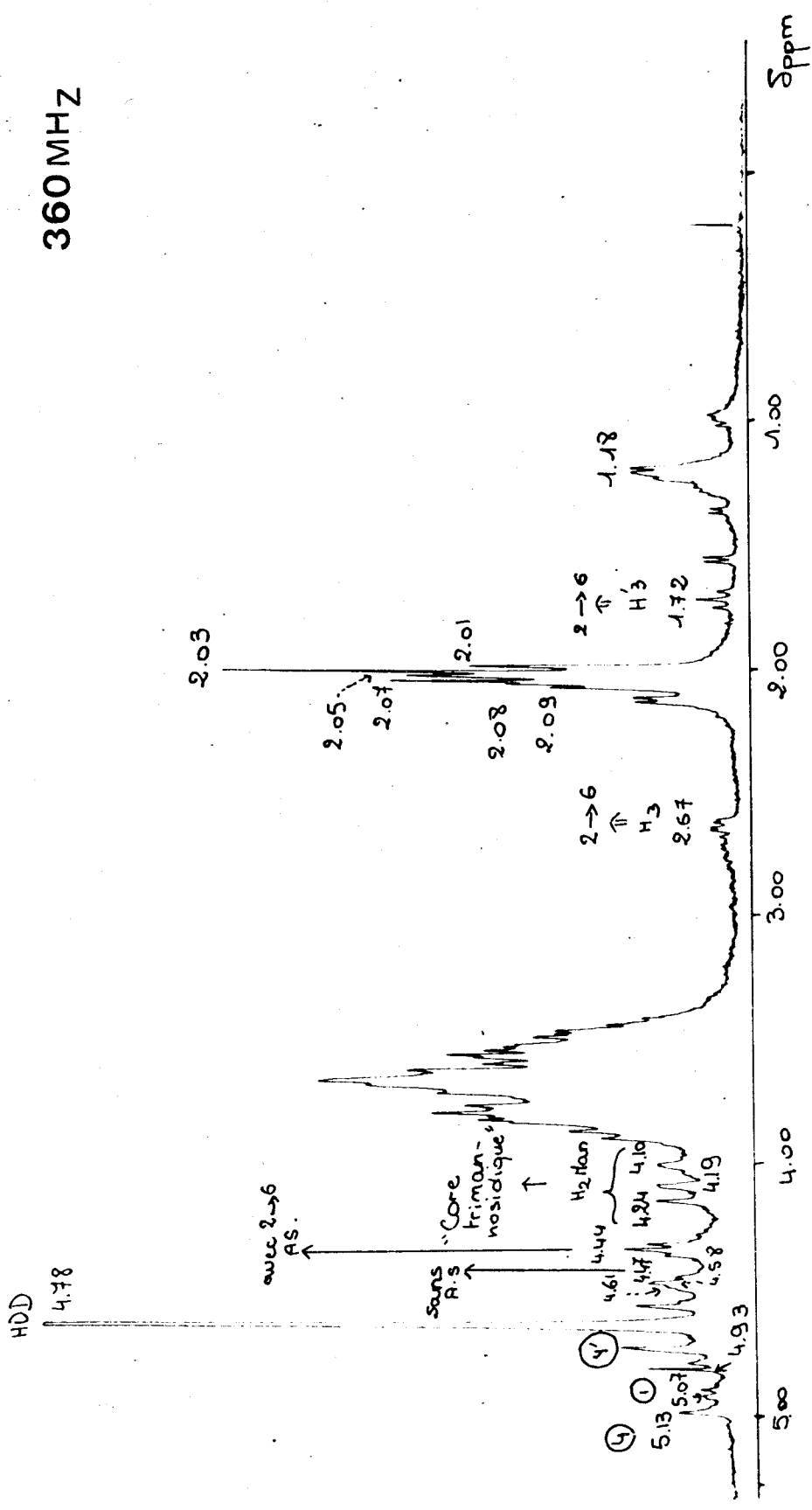
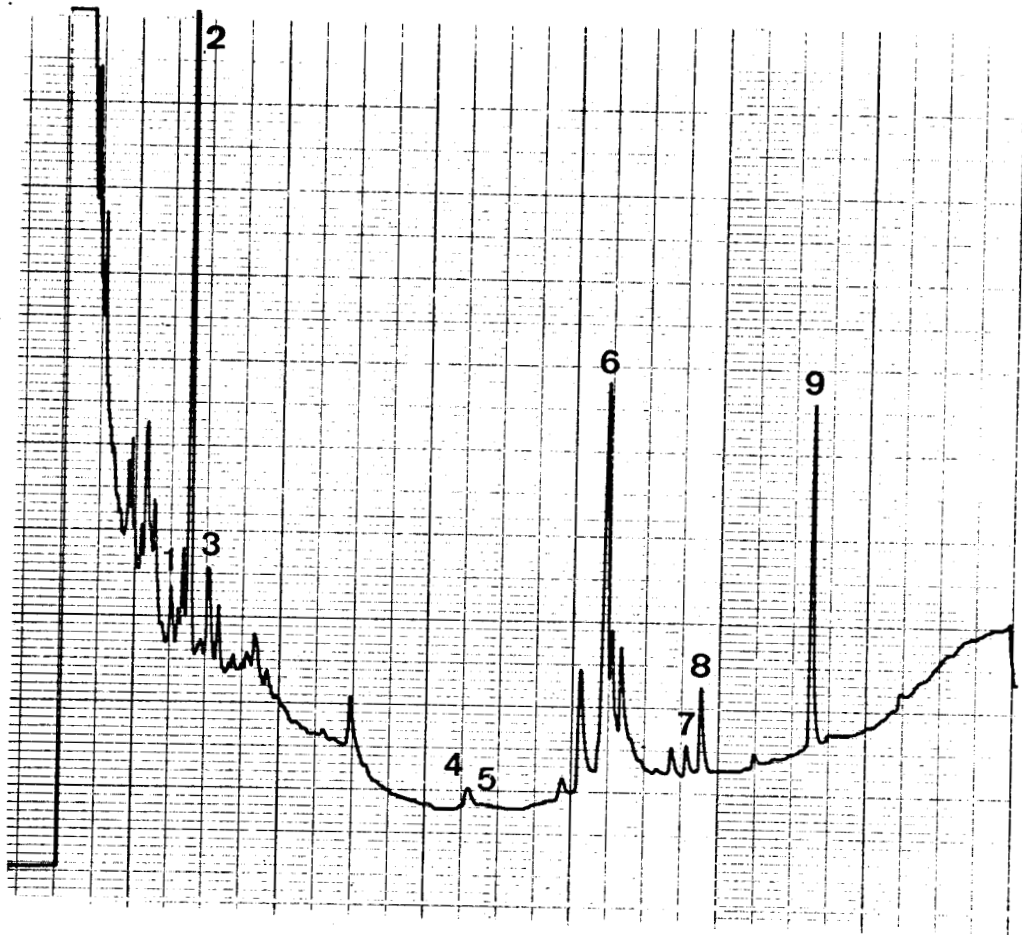


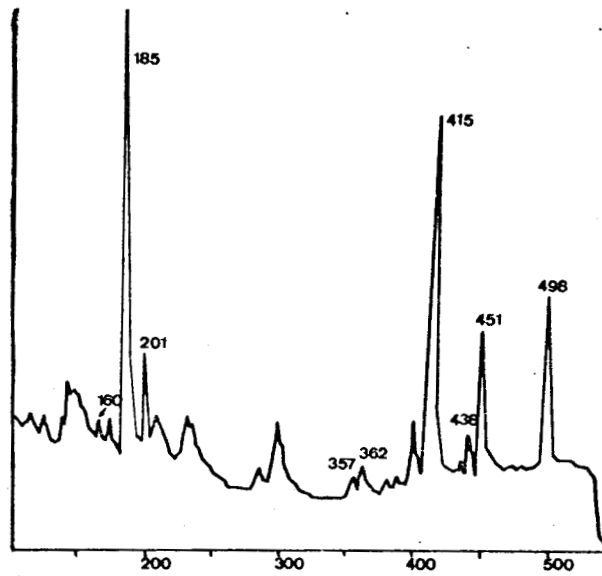
FIGURE 50

· Spectre de résonance magnétique nucléaire du glycopeptide VII des IgA du lait de Femme.





A



B

FIGURE 51

A Séparation en chromatographie phase gaz des oligosaccharides du glycopeptide VII obtenus après hydrazinolyse et diazotation

B : Reconstitution des ions.



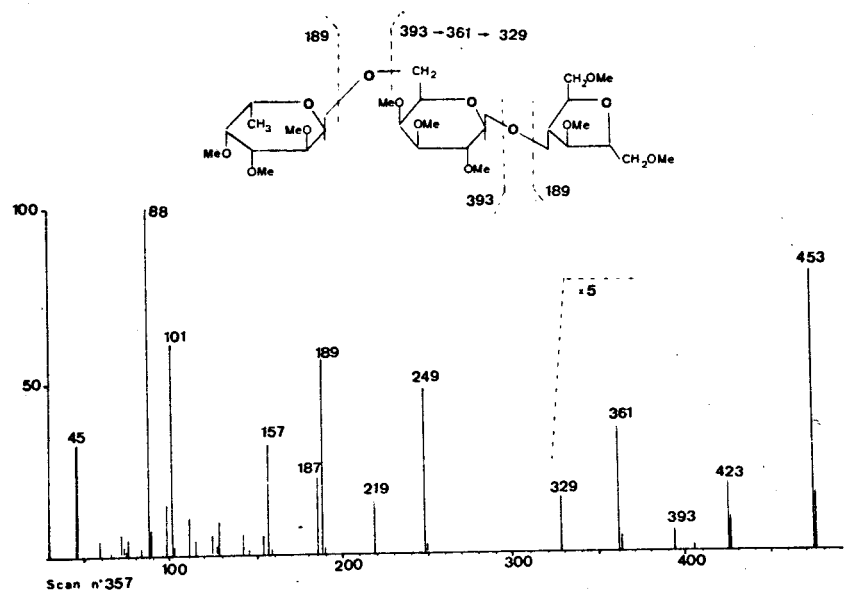
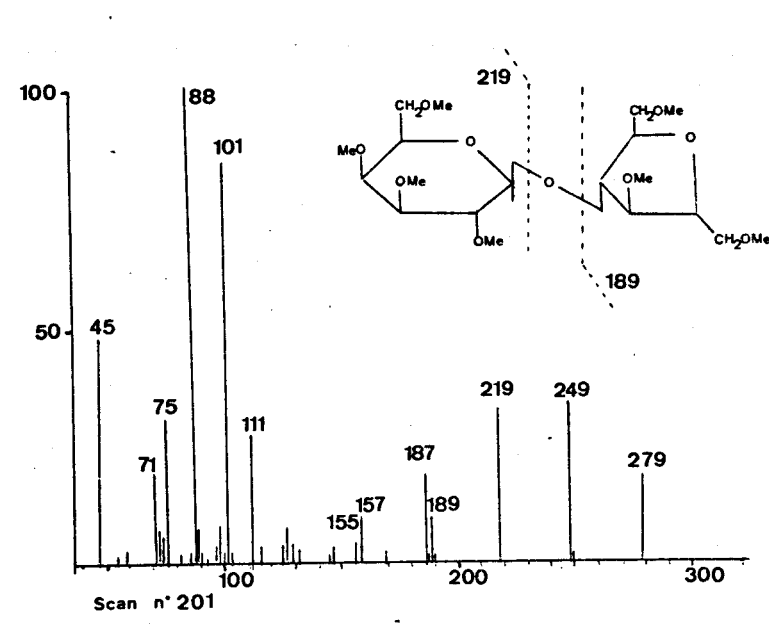
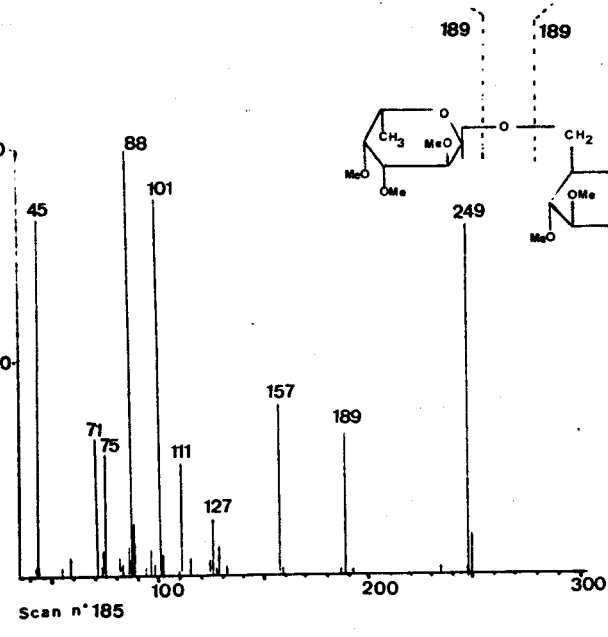
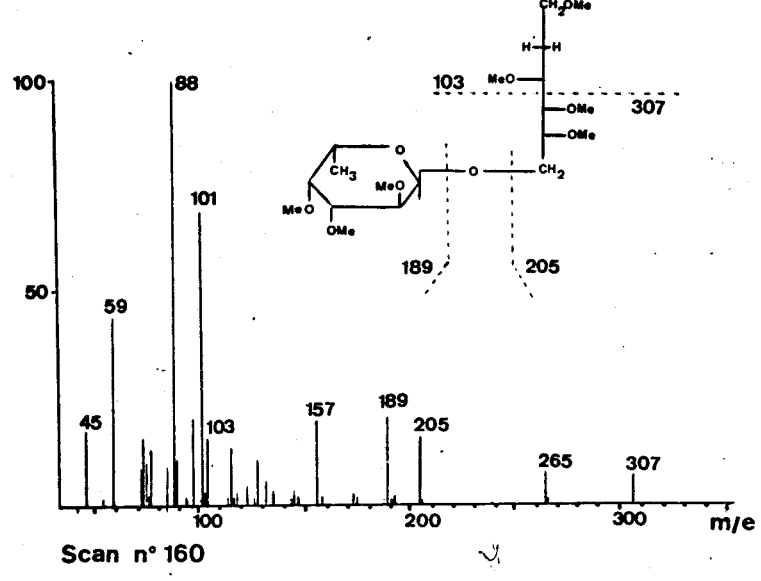


FIGURE 52

Spectre de masse des oligosaccharides obtenus après hydrazinolyse et diazotation du glycopeptide VII



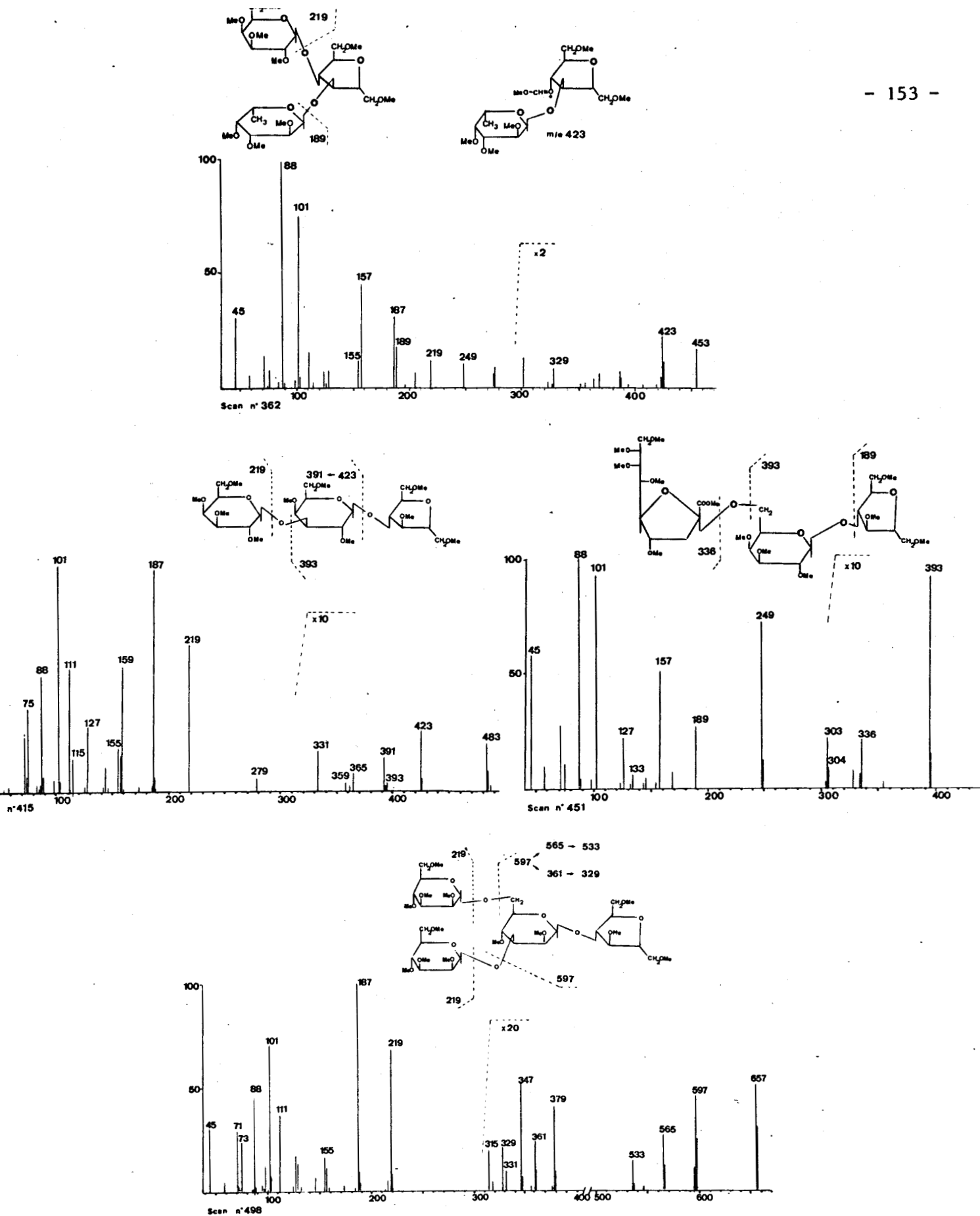


FIGURE 53

Spectre de masse des oligosaccharides obtenus après hydrazinolyse et diazotation du glycopeptide VII .



2°) Le spectre 201 correspond au disaccharide Gal → 2-5 anhydromannitol. (Fig. 52 p. 152) correspond à la structure n° 2.

3°) Les spectres 357 et 362 sont à peu près identiques et résultent de la mauvaise séparation des 2 isomères voisins. L'analyse des spectres confirme qu'il s'agit d'un mélange de 2 trisaccharides dont les structures sont proposées dans la Fig. 53 p. 153.

Le spectre de masse 362 correspond essentiellement à la structure n° 3 et le spectre de masse 357 correspond à la structure n° 4.

4°) La structure n° 4 qui est linéaire est fondée sur la présence des ions 393, 361 et 329. La présence de l'ion 249 permet de préciser que le fucose n'est pas lié en 1-3. Les proportions relatives des ions 393, 361 et 329 sont en faveur d'une liaison 1-6 : résultat confirmé par le fait que la perméthylation du glycanne intact n'a fournit que du 2,3,4 et du 2,4,6 triOMe galactose.

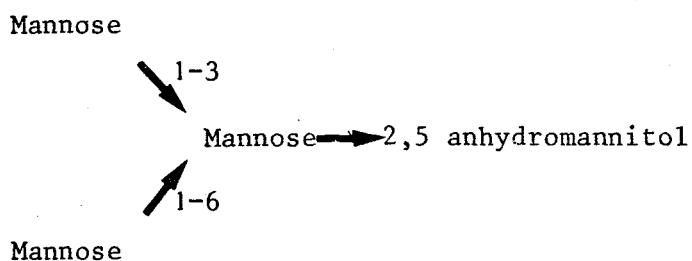
5°) La structure ramifiée n° 3 est fondée sur la présence de l'ion 423. La présence de cette structure mineure est également confirmée par l'obtention de 6 monoMe glucosamine au cours de l'expérience de perméthylation du glycanne intact.

6°) L'analyse du spectre 415 a permis de conclure à une structure trisaccharidique linéaire hexose → hexose → 2,5 anhydromannitol.

7°) L'absence de l'ion 249 (scan 415 fig. 53 p.153) permet de conclure à une liaison hexose (1 → 3) hexose. En rapprochant ce résultat de ceux obtenus à partir de la méthylation nous pouvons conclure à la structure Gal (1 → 3) Gal → N-acétylglucosamine (structure n° 1).

8°) Les spectres 438 et 451 correspondent à la séquence AcNeu → Galactose → 2,5 anhydromannitol. L'obtention de ces 2 isomères correspond au mécanisme de substitution nucléophile 1 et 2 décrit dans la Fig. 55 p. 157.

9°) Le spectre 498 correspond à un tétrasaccharide ramifié comme le montre la présence de l'ion 597. L'absence de l'ion 249 montre que l'ose précédant le 2,5 anhydromannitol est substitué en 1-3. Cet oligosaccharide a été interprété comme étant le



Les résultats précédents montrent que le glycanne VII est hétérogène. Compte tenu de l'intensité relative des différents oligosaccharides obtenus par hydrazinolyse et désamination nitreuse, nous pouvons conclure à la présence des structures VII<sub>1</sub> à VII<sub>4</sub>. La structure VII<sub>1</sub> constitue plus de 80 % du mélange, les 3 autres structures constituent des produits mineurs (Fig. 54 p. 156).

#### D - DISCUSSION

A partir des IgA du lait de Femme, 6 fractions oligosaccharidiques alcali-labiles et 7 glycopeptides renfermant des liaisons N-glycosidiques ont été isolés. La structure de ces fractions a pu être déterminée grâce à l'application de différentes méthodes chimiques et physiques.

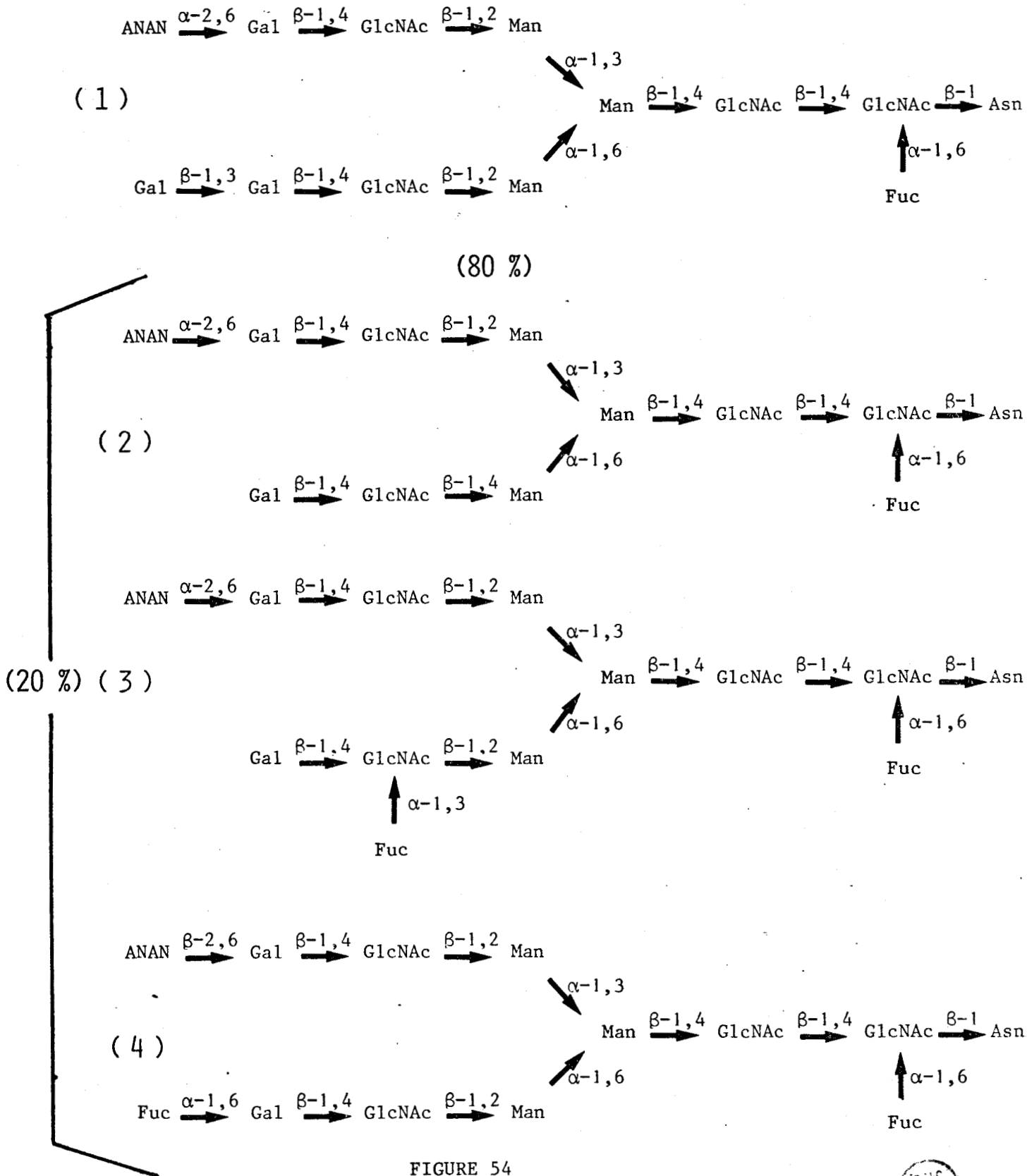


FIGURE 54



Structure des glycopeptides obtenus à partir de la fraction VII.  
Le pourcentage relatif de chacun des glycopeptides est donné entre parenthèse.



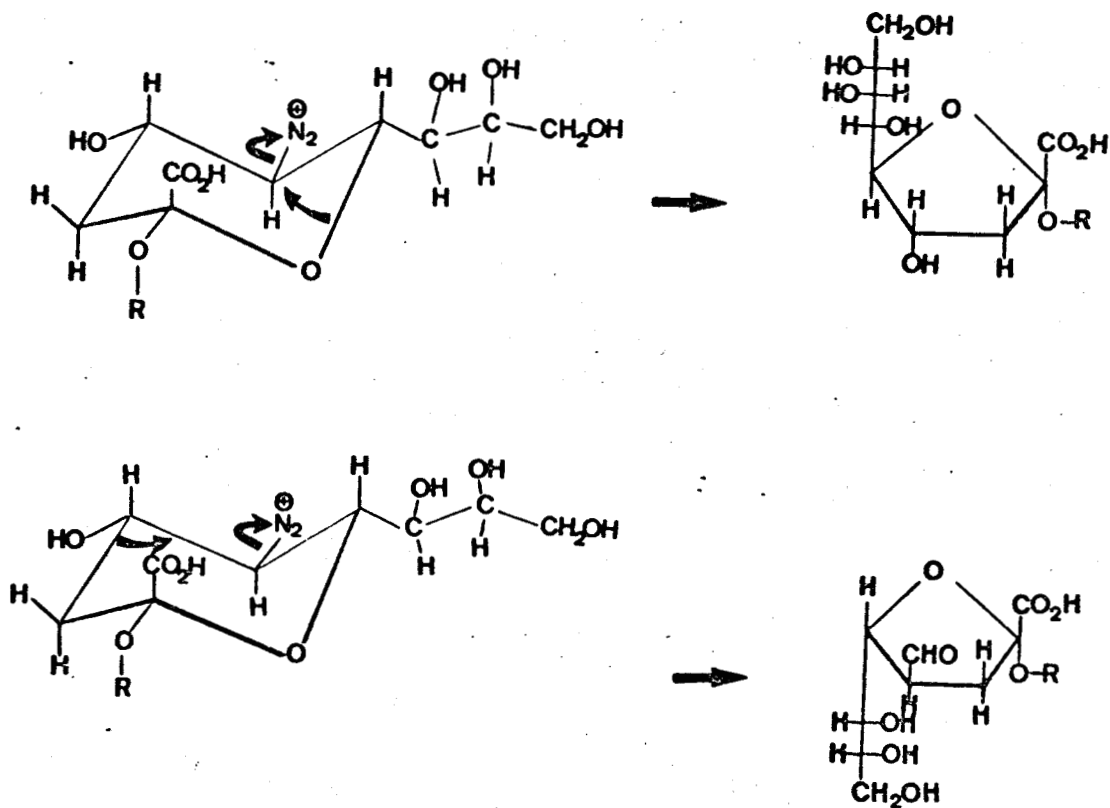


FIGURE 55

Mécanisme de désamination nitreuse de l'acide  
N-acétyl-neuraminique (STRECKER et al., 1979)

1°) Les glycanes alcali-labiles renferment un "core" commun constitué par l'unité disaccharidique Gal  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) GalNAcitol sur laquelle peuvent venir se greffer d'autres monosaccharides en particulier du galactose, de la N-acétylglucosamine et du fucose, donnant lieu à des tri, tétra, nona et décasaccharide. Dans ces différentes structures le N-acétylgalactosaminitol se trouve substitué. Ces structures se rapprochent de celles de nombreuses autres glycoprotéines. Ainsi, la structure disaccharidique Gal  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) GalNAcitol a été mise en évidence dans la glycoprotéine "antifreeze" du poisson de l'Antarctique, dans la sous-unité  $\beta$  de la gonadotrophine chorionique humaine, dans la kératane sulfate (voir les revues générales de KORNFIELD et KORNFIELD, 1976 et de STRECKER et MONTREUIL, 1978). La structure disaccharidique substituée sur le galactose par un acide N-acétylneuraminique en 3 a été également trouvée dans la  $\kappa$  caséine de Vache (FOURNET et al. 1975) dans l'épiglycannie des cellules TA-3 (CODINGTON et al. en 1975), dans la membrane des globules gras du lait de Vache (FARRAR et HARRISSON en 1978). Elle se retrouve partiellement dans la structure de la fétuine (SPIRO et al. en 1974), dans la structure de la glycophorine humaine (THOMAS et al. en 1974) et dans l'antigène tissulaire M (SPRINGER et DESAI en 1975) qui renferme, en outre, un résidu d'acide N-acétylneuraminique lié en  $\alpha$ -2,6. La structure du tétrasaccharide C<sub>I</sub> fait, elle, partie intégrante d'un glycopeptide isolé des mucines humaines (OATES et al. en 1974). Le schéma de structure que nous proposons pour le glycanne A présente de grandes analogies avec les oligosaccharides à activité de groupes sanguins isolés par LLOYD et KABAT (1968) à partir du kyste ovarien et avec ceux décrits dans la revue générale de HAKOMORI et KOBATA (1974).

2°) Les glycanes liés N-glycosidiquement sont toujours de type N-acétyllactosaminique. Ces glycanes, comme ceux de nombreuses glycoprotéines possèdent un "core" commun pentasaccharidique (MONTREUIL, 1975), sur lequel vient se greffer des résidus N-acétyllactosaminiques, des résidus de fucose. Des séquences classiques se trouvent dans certains glycopeptides que nous avons étudié, cependant des structures nouvelles ont pu être caractérisées. En particulier, le glycopeptide II possède 2 résidus de fucose, l'un lié sur la N-acétylglucosamine du point d'attache en  $\alpha$ -1,6, l'autre en  $\alpha$ -1,3 sur un résidu de N-acétylglucosamine externe. Quant au glycopeptide VII, il possède un chaînon supplémentaire Gal (1  $\rightarrow$  3) Gal lié sur la N-acétyllactosamine de la branche inférieure. Jusqu'à présent seuls KORNFIELD (1978) a isolé et caractérisé cette liaison dans des glycopeptides de membranes plasmiques non purifiées de thymocyte de Veau, et STRECKER et al. (1979) dans des urines de patients atteints de gangliosidose à GM<sub>1</sub>. Pour les glycopeptides de type N-glycosidiques les structures sont en général semblables, notamment à celle de nombreuses autres immunoglobulines : IgA<sub>1</sub> sériques myélomateuses (BAENZIGER et KORNFIELD en 1974) ; IgG et IgE humaines (KORNFIELD et al. en 1971), IgG bovines (TAI et al. en 1975) ; IgG<sub>1</sub> du colostrum de Vache (CHERON et al. en 1976) et IgG humaines (BAENZIGER en 1975).

En résumé de cette étude des glycanes et glycopeptides isolés des sIgA de sécrétion, nous avons montré que les structures alcali-labiles sont très hétérogènes et beaucoup plus complexes que les structures des IgA sériques myélomateuses décrites par BAENZIGER et KORNFIELD (1974). Deux points sont à expliquer. Le premier point

concerne l'hétérogénéité des glycanes. En effet, l'hétérogénéité peut provenir du fait que nous travaillons sur un "pool" de lait. Il faudrait vérifier l'hétérogénéité des glycanes alcali-labiles des IgA d'une seule Femme.

Par la suite, donc, il serait très intéressant d'étudier les glycanes provenant d'un lot de lait d'une seule Femme, en relation avec le groupe sanguin du sujet. Nous avons commencé cette étude mais la faible quantité de lait obtenu ne nous a pas permis de poursuivre une étude complète.

Le second point concerne la complexité des glycanes et glycopeptides des sIgA du lait de Femme vis-à-vis des IgA sériques, qui proviennent d'un myélome, c'est-à-dire de la prolifération rapide de cellules monoclonales. Il est, cependant, difficile de parler de biosynthèse incomplète puisque les glycopeptides liés N-glycosidiquement sur les IgA sériques sont complexes et hétérogènes.

La complexité et l'hétérogénéité des structures posent donc le problème de la glycosylation des sIgA et le problème du rôle de ces glucides dans l'interaction avec les cellules et avec d'autres protéines telles que la lactotransferrine et le lysozyme.

En dernier lieu il serait intéressant dans le cadre relation structure, rôle des sucres, de localiser les glycopeptides N-glycosidiques sur les différentes chaînes de la molécule des sIgA, les glycanes O-glycosidiques étant eux, uniquement localisés sur la "hinge region" des IgA de type IgA<sub>1</sub>.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur la structure des groupements glycaniques des IgA du lait de Femme sont les suivantes :

1 - La méthode de préparation que nous avons utilisée nous a permis d'isoler des IgA dans un état de pureté satisfaisant. Cette préparation consiste en un fractionnement rapide du lactosérum puisqu'il permet en 2 étapes d'obtenir le précipité  $P_2-P_4$ . Ensuite différentes chromatographies nous ont permis de purifier les IgA et de les obtenir en grande quantité. L'absence de contamination glucidique a été vérifiée.

2 - Les études physico-chimiques effectuées sur cette préparation d'IgA ont montré qu'elle possède des propriétés caractéristiques des IgA de sécrétion. Elle a, en effet, un coefficient de sédimentation de 11S, une masse moléculaire de 370.000 et elle renferme environ 12 % de glucides.

3 - Les compositions molaires et centésimales en glucides montrent la présence de fucose, galactose, mannose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine et d'acide N-acétylneuraminique.

4 - L'hydrolysate tryptique et pepsique des IgA totales a été fractionné par gel filtration. Deux fractions majeures ont été isolées : une fraction glycopeptidique de masse moléculaire élevée correspondant à la "hinge region" et renfermant les glycannes liés O-glycosidiquement à la protéine. La deuxième fraction, alcali-stable, renferme les glycannes liés N-glycosidiquement.

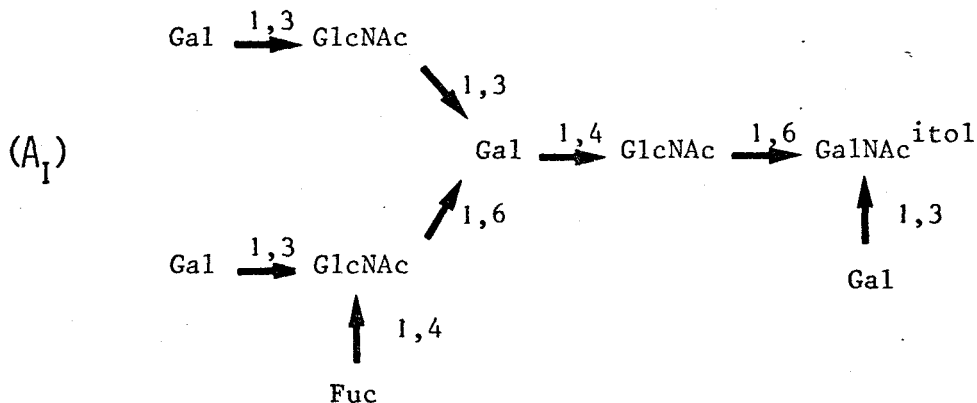
5 - La purification de la fraction alcali-stable après l'action de la soude et la réduction nous a fournit 6 oligosaccharides. L'étude structurale a montré que ces oligosaccharides sont complexes et très hétérogènes.

Le plus simple des glycanes est l'unité de base oligosaccharidique Gal  $\beta(1 \rightarrow 3)$  GalNAcitol. Ce disaccharide est présent dans de nombreuses glycoprotéines. C'est sur cette structure que viennent se greffer les autres oligosaccharides. Le greffage d'un résidu d'acide N-acétylneuraminique par une liaison  $\alpha-2,3$  amène au glycanne D : ANAN  $\xrightarrow{\alpha-2,3}$  Gal  $\xrightarrow{\beta-1,3}$  GalNAcitol

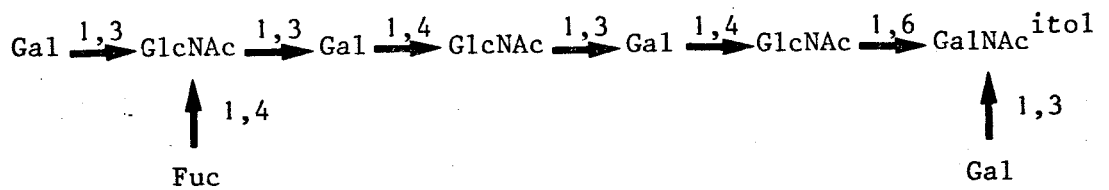
Un résidu de N-acétylglucosamine supplémentaire en  $\beta-1,6$  sur le N-acétylgalactosaminitol fournit le glycanne C<sub>II</sub> : Gal  $\xrightarrow{\beta-1,3}$  GalNAcitol  
 $\uparrow \beta-1,6$   
 GlcNAc

Le glycanne C<sub>I</sub> possède un résidu de galactose supplémentaire et sa structure est la suivante : Gal  $\xrightarrow{\beta-1,4}$  GlcNAc  $\xrightarrow{\beta-1,6}$  GalNAcitol  
 $\uparrow \beta-1,3$   
 Gal

Le glycanne A est un nonasaccharide. Son étude en spectrométrie de masse s'est révélée complexe. En fait il s'agit d'un mélange de 3 nonasaccharides isomères :



(A<sub>II</sub>)



(A<sub>III</sub>) voit son fucose branché sur le résidu de galactose qui substitue le résidu de N-acétylgalactosaminitol.

Certaines de ces structures ont été déjà identifiées dans les mucines, mais elles n'ont pas été jusqu'à présent caractérisées dans les immunoglobulines.

6 - La purification de la fraction glycopeptidique alcali-stable nous a conduit à la séparation de 2 fractions. Les glycopeptides ont pu être séparés en asialoglycopeptides et en sialoglycopeptides. La fraction asialoglycopeptidique a pu être séparée en 3 fractions. La première fraction et la troisième sont hétérogènes et complexes.

L'analyse de la fraction II par méthylation et résonance magnétique nucléaire a conduit à l'obtention de 2 structures, existant en mélange dans cette fraction. Les structures sont de type N-acétyllactosaminique classique avec le fucose branché en  $\alpha$ -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache.

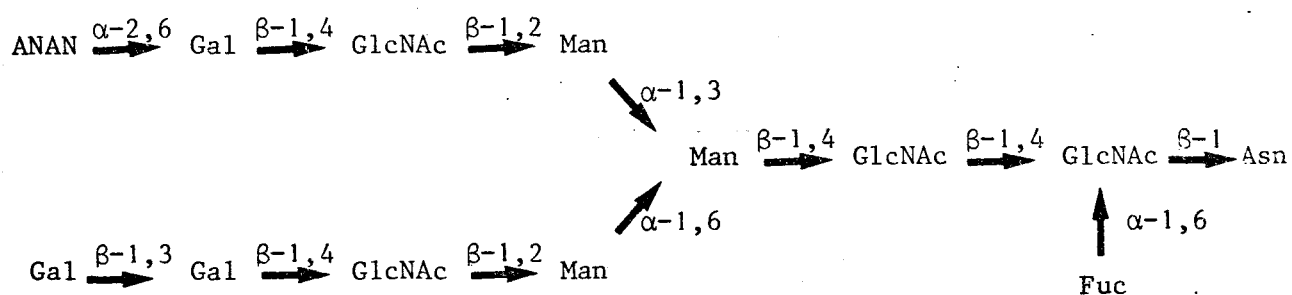
La deuxième structure du glycopeptide II possède un résidu de N-acétylglucosamine supplémentaire sur le résidu de mannose déjà branché, par une liaison  $\beta$ -1,4. La présence du deuxième fucose n'a pu être mise en évidence par la résonance magnétique nucléaire.

La fraction sialoglycopeptide renferme 4 glycopeptides différents. L'étude des 3 premières fractions est assez incomplète. Ces glycopeptides ne possèdent qu'un seul résidu d'acide N-acétylneuraminique, sauf le glycopeptide VI qui en possède 2.



L'étude du glycopeptide VII est très complète. La méthylation, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire ont conduit aux conclusions suivantes : le glycopeptide est de type N-acétyllactosaminique classique avec un résidu d'acide N-acétylneuraminique située sur la branche en  $\alpha$ -1,3 et un résidu de fucose lié à la N-acétylglucosamine du point d'attache. De plus la spectrométrie de masse a mis en évidence l'existence d'un galactose substitué en 3. Ces techniques n'ayant pu nous donner la nature du monosaccharide substituant, nous avons eu recours à l'hydrazinolyse et diazotation suivie de méthylation et d'analyse spectrométrique, qui a mis en évidence l'hétérogénéité du glycopeptide VII et surtout l'existence du fragment Gal (1  $\rightarrow$  3) Gal.

La structure du composé majeur du glycopeptide VII est la suivante :



Les autres structures sont très minoritaires et également très particulières. Elles possèdent des résidus de fucose supplémentaires. Il a même été mis en évidence l'existence d'un résidu de fucose substituant par une liaison  $\alpha$ -1,6 le résidu de galactose terminal.

En conclusion de cette étude, nous pouvons dire que les IgA du lait de Femme possèdent des glycanes alcali-labiles et alcali-stables hétérogènes et très complexes. Certaines de ces structures, surtout en ce qui concerne les glycopeptides liés N-glycosidiquement possèdent des chaînons structuraux rarement identifiés.

BIBLIOGRAPHIE

*(Les nombres entre parenthèses renvoient à la page du mémoire)*

- ADINOLFI M., GLYNN A.A., LINDSAY M., MILNE C.M., *Immunology*, 1966, 10, 517 (68)
- AREND W.P., MANNIK M., *J. Exp. Med.*, 1972, 136, 514 (61)
- AUGENER W., GREY H.M., COOPER N.R., MULLER-EBERHARD H.J., *Immunochemistry*, 1971, 8, 1011 (61)
- AXELSSON H., JOHANSSON B.G., RYMO L., *Acta Chem. Scand.*, 1966, 20, 2339 (5,10)
- BAENZIGER J.U., PhD. thesis, Univ. St. Louis, Washington, 1975, 136 pp. (159)
- BAENZIGER J.U., *J. Biol. Chem.*, 1979, 254 n° 10, 4069-4072 (43,44,46)
- BAENZIGER J.U., KORNFELD S., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249 n° 2, 7260-7281 (2,25, 26,27,29,82,159)
- BAUER J., *Z. Exp. Pathol. Therap.*, 1910, 7, 417 (5)
- BAYARD B., MONTREUIL J., *Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci. n° 221*, 1974, 209-218, CNRS éd., Paris (86)
- BAZIN H., In Ferguson A. et Mc Sween RNM éd. : *Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract*. MTP Press Ltd Lancaster, 1976, 33-82 (7)
- BELCHER R., NUTTEN A.J., SAMBROOK C.M., *Analyst.*, 1954, 79, 201 (77)
- BENNICH H., Von BAHR-LINDSTROM H., *Prog. Immunol. (II) I*, 1974, 49-58. Ed. L. Brent and J. Holborow. Amsterdam (29)
- BENNICH H., NATVIG J.B., TURNER M.W., *Scand. J. Immunol.*, 1974, 3, 107-115 (52)
- BJORK I., KARLSSON F.H., BERGGARD I., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1701-1710 (53)
- BJORNSON A.B., BJORNSON H.S., *The journal of infectious diseases n° 3*, 1978, 138, 351-358 (68)
- BOACKLE R.J., PRUITT K.M., MESTECKY J., *Immunochemistry*, 1974, 11, 543-548 (68)

- BOURGOIS A., FOUGEREAU M., Eur. J. Biochem., 1970, 12, 558 (50)
- BRANDTZAEG P., Immunochemistry, 1970, 7, 127 (34)
- BRANDTZAEG P., J. Immunol., 1971, 106, 318 (6,34)
- BRANDTZAEG P., Immunology, 1974a, 26, 1101 (31)
- BRANDTZAEG P., Scand. J. Immunol., 1974b, 3, 579-588 (33)
- BRANDTZAEG P., Adv. Exp. Med. Biol., 1974c, 45, 87 (34)
- BRANDTZAEG P., Scand. J. Immunol., 1974d, 3, 707 (36)
- BRANDTZAEG P., J. Immunol., 1974e, 112, 1553 (38)
- BRANDTZAEG P., Nature, 1974f, 252, 418-419. (44)
- BRANDTZAEG P., Immunology, 1975, 29, 559 (33)
- BRANDTZAEG P., La Ricerca Clin. Lab., 1976, 6, Suppl. 3, 15 (40)
- BRANDTZAEG P., Immunochemistry, 1977, 14, 179-188 (33)
- BRANDTZAEG P., FJELLANGER I., GJERULDSSEN S.T., Sciences, 1968, 160, 789 (33)
- BRANDTZAEG P., FJELLANGER I., GJERULDSSEN S.T., Scand. J. Haematol., Suppl., 1970, 12, 3 (36,39)
- BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEIGH L., Br. Med. J., 1972, 8, 69 (69)
- CAPRA J.D., KEHOE J.M., Advances Immunol., 1975, 20, 1-40 (7)
- CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M., BAZIN H., Nature, 1975, 253, 474 (61)
- CARLSON D.M., J. Biol. Chem., 1966, 241, 2984-2986 (81)
- CATHOU R.E., DORRINGTON K.J., In biological Macromolecules. Subunits in Biological Systems (Ed. S.N. Timasheff and G.D. Fasman) New York Dekker, 1974 (53)
- CEBRA J.J., ROBBINS J.B., J. Immunol., 1966, 97, 12 (7)
- CEBRA J.J., SMALL P.A., Biochemistry, 1967, 6, 503 (18)
- CEDERBLAD G., JOHANSSON B.G., RYMO L., Acta Chem. Scand., 1966, 20, 2349 (5,9)
- CHAPUIS R.M., KOSHLAND M.E., Biochemistry, 1975, 14, n° 6, 1320 (40,65)
- CHARET P., TETAERT D., HAN K.K., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1973, 276 D, 1629-1630 (76)

- CHERON A., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J., *Biochimie*, 1976, 58 n° 8, 927-942 (159)
- CHERVENKA C.H., *Anal. Biochem.*, 1970, 34, 24-29 (76)
- CLAMP J.R., *In the plasma proteins*, Ed. Putnam F.W. (Acad. Press, New York) Vol. II, 2nd éd. pp 163-211 (31)
- CODINGTON J.F., LINSLEY K.B., JEANLOZ R.W., IRIMURA T., OSAXA T., *Carbohydr. Res.*, 1975, 40, 171-182 (158)
- CRAIG S.W., CEBRA J.J., *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 188-200 (63)
- CUNINGHAM-RUNDLES C., LAMM M.E., FRANKLIN E.C., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 5654 (36)
- DAWSON G., CLAMP J.R., *Biochem. J.*, 1968, 107, 341-352 (22,24)
- DELLA CORTE E., PARKHOUSE R., *Biochem. J.*, 1973, 136, 589-596 (67)
- DE PREVAL C., *Dans Immunoglobuline*, J.F. Bach, 1976, pp. 139-202, Flammarion Medecine, Sciences, Paris (9)
- DE PREVAL C., FOUGEREAU M., *Eur. J. Biochem.*, 1972, 24, 446 (50)
- DESCAMPS J., Thèse d'Etat, Lille n° 294, 1974 (2,7,10,11,25,28,72)
- DESCAMPS J., MONSIGNY M., MONTREUIL J., *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1968, 266 D, 1775-1778 (25)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., *FEBS-Lett.*, 1977, 77, 15-20 (88)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., STRECKER G., MICHALSKI J.C., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J., *Eur. J. Biochem.*, 1978, 87, 323-329 (88)
- DORRINGTON K.J., *Canad. J. Biochem.*, 1978, 56 n° 12, 1087-1101 (58,63)
- DORRINGTON K.J., PAINTER R.H., *Prog. Immunol. III*, 1974, 298 (62)
- DORRINGTON K.J., ROCKEY J.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 200, 584 (18)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350 (79)
- DU PAN M.R., SCHEIDEGGER J.J., PONGRATZ E., ROULET H., *Arch. Franç. Pediat.*, 1955, 12, 243 (5)

- EDELMAN G.M., Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 1971, 190, 5-25 (52)
- EDELMAN G.M., CUNNINGHAM B.A., GALL W.E., GOTTLIEB P.D., RUTISHAUSER U., WAXDAL M.J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 63, 78-85 (13,14,29,52,58)
- EDELMAN G.M.; GALL W.E., A rev. Biochem., 1969, 38, 415-466 (52)
- EDMUNSON A.B., ELY K.R., ABOLA E.E., SCHIFFER M., PANAGIOTOPOULOS N., Biochemistry, 1975, 14, 3953-3961 (55,57)
- ELLERSON J.R., YASMEEN D., PAINTER R.H., DORRINGTON K.J., FEBS-Lett., 1972, 24, 318 (53)
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824 (77)
- ENGSTROM J.F., ARVANITAKIS C., SAGAWA A., ABDOU N.I., Gastroenterology, 1978, 74 n° 4, 749-751 (69)
- ESKELAND T., BRANDTZAEG P., Immunochemistry, 1974, 11, 161-163 (44)
- FAIR D.S., SLEDGE C., KRUEGER R.G., MANN K.G., HOOD L.E., Biochemistry, 1975, 14, 5561 (13)
- FARRAR G.H., HARRISON R., Biochem. J., 1978, 171, 549-557 (158)
- FEINSTEIN D., FRANKLIN E.C., Nature, 1966, 121, 1496 (18)
- FERRI R.G.; TUTIYA T., Hospital (Rio de Janeiro), 1959, 55, 265 (5)
- FILIPE DA SILVA J.A., MONTEIRO C.C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 1707 (5)
- FISCHER F.G., NEBEL H.G., Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 1955, 302, 10-18 (82)
- FISHER M.M., NAGY B., BAZIN H., UNDERDOWN B.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76 n° 4, 2008-2012 (38)
- FOURNET B., MONTREUIL J., J. Chromatog., 1973, 75, 29-37 (85)
- FOURNET B., FIAT A-M., MONTREUIL J., JOLLES P., Biochimie, 1975, 57, 161-165 (158)
- FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J., Biochimie, 1979, sous presse (130)
- FRANGIONE B., WOLFENSTEIN-TODEL C., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69 n° 12, 3673-3676 (22,23,77)

- GALLY J.A., EDELMAN G.M., *Ann. Rev. Genetics*, 1972, 6, 1-46 (7)
- GHOSE A.C., JIRGENSONS B., *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 251, 14-20 (53)
- GOLDBLUM R.M., AHLSTEDT S., CARLSSON B., HANSON L.A., JODAL V., LIDEN-JANSON G., SUHL-AKERLUND A., *Nature*, 1975, 257, 797-799 (63)
- GOWANS J.L., KNIGHT E.J., *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)*, 1964, 159, 257-282 (63)
- GRABAR P., WILLIAMS C.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, 17, 65 (75)
- GREEN N.M., *Adv. Immun.*, 1969, 11, 1-30 (54)
- GREY H.M., ABEL C.A., YOUNT W.J., KUNKEL H.G., *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 1223 (18)
- GUGLER E., BOKELMANN G., DATWYLER A., Von MURALT G., *Schweiz. Med. Wochschr*, 1958, 88, 1264 (5)
- GUY-GRAND D., GRISCELLI C., VASSALLI P., *Eur. J. Immun.*, 1974, 4, 435 (38)
- HAKOMORI S.I., *J. Biochem.*, 1964, 55, 205 (83,87)
- HAKOMORI S.I., KOBATA A., *In the Antigens*. Ed. M. Sela, Vol. II, Acad. Press Inc., 1974, 80 (158)
- HALPERN M.S., KOSHLAND M.E., *Nature*, 1970, 228, 1276 (6,38)
- HALPERN M.S., KOSHLAND M.E., *J. Immunol.*, 1973, 111, 1653-1680 (40)
- HANSON L.A., *Experientia.*, 1959, 15, 473 (5)
- HANSON L.A., *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 1960, 17, 45 (5)
- HANSON L.A., JOHANSSON B.G., *Proc. Nobel. Symp.*, 3rd, 1967, 141-151 (11,31)
- HANSON L.A., AHLSTEDT S., CARLSSON B., FALLSTROM S.P., KAUSER B., LINDBLAD B.S., AKERLUND A.S., EDEN C.S., *Acta Paediatr. Scand.*, 1978, 67, 577-582 (70)
- HAVEZ R., MUH J.P., ROUSSEL P., DEGAND P., CARLIER C., *C.R. Acad. Sci.*, 1966, 262, 1379 (6,11,31)
- HEIMBURGER N., HEIDE K., HAUPT H., SCHULTZE H.E., *Clin. Chim. Acta*, 1964, 10, 293 (10,11)
- HEREMANS J.F., *Arschia*, Brussels and Masson, Paris, 1960 (11)
- HEREMANS J.F., *In the Antigens*, Ed. M. Sela, Acad. Press Inc., Vol. II, 1974, 365-522 (7,50,51)



- HICKMAN S., KULCZYCKI A., LYNCH R.G., KORNFELD S., The Journal of Biological Chemistry, 1977, 252 n° 12, 4402-4408 (67)
- HILL R.L., DELANEY R., FELLOWS REJR., LE BOVITZ H.E., Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 1966, 56, 1792 (52)
- HOPF U., BRANDZAEG P., HUTTEROTH T.H., BUSCHENFELDE KHMZ, Scand. J. Immunol., 1978, 8, 543-549 (70)
- HOPF U., MUTSCHALL C., MEYER ZUM BUSCHENFELDE K.M., Z. für Gastroenterologie, 1979, 1 (17) 18-27 (70)
- HOPPER J.E., NISONOFF A., Adv. Immunol., 1971, 13, 57-99 (7)
- HUBSCHER T., BOOTELLO A., EISEN H.N., J. Allergy Clin. Immunol., 1974, 53, 150 (61)
- HURLIMAN J., WALDES BÜHL M., ZUBER C., Biochim. Biophys. Acta, 1969, 181, 393 (8)
- ISCAKI S., GENESTE C., PILLOT J., Immunochemistry, 1978, 15, 401-408 (38)
- JERRY L.M., KUNKEL H.G., J. Immunol., 1972, 109 n° 5, 981-982 (34)
- JERRY L.M., KUNKEL H.G., ADAMS L., J. Immunol., 1972, 109 n° 2, 275-283 (18,19)
- KABAT E.A., WU T.T., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 190, 382 (12)
- KAJI H., PARKHOUSE RME., Nature, 1974, 249, 45-47 (44)
- KARTE H., Monatsschr.Kinderheilk, 1959, 107, 265 (5)
- KEHOE J.M., TOMASI T.B., ELLOUZ F., CAPRA J.D., J. Immunol., 1972, 109, 59-64 (40)
- KENNY J.F., BOESMAN M.I., MICHAELS R.H., Pediatrics, 1967, 39, 202 (9)
- KNOP J., BREU H., WERNET P., ROWLEY D., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1971, 49, 405 (68)
- KOBAYASHI K., Immunochemistry, 1971, 8, 785-800 (7,33,34,35,36,37)
- KÖHLER H., SHIMIZU A., PAUL C., PUTNAM F.W., Science, 1970, 169 n° 3940, 56-59 (13)
- KORNFELD R., Biochemistry, 1978, 17, 8, 1415-1423 (159)

- KORNFELD R., KELLER J., BAENZIGER J., KORNFELD S., J. Biol. Chem., 1971, 246, 3259-3268 (159)
- KORNFELD S., KORNFELD R., Adv. Biochem., 1976, 45, 217-238 (158)
- KORTT K., RUBAN E., SCHOLZ R., KRATZIN H., GOTZ H., HILSCHMANN N., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, 359, 1681-1745 (19)
- KOWNATZKI E., BAHR B., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1974, 355, 600-602 (41)
- KRATZIN M., ALTEVOGT P., RUBAN E., KORTT A., STAROSCIK K., HILSCHMANN N., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1975, 356, 1337-1342 (52)
- KUNG A., HUDSON C.S., J. Amer. Chem. Soc., 1978, 48, 1926 (86)
- KUNKEL H.G., PRENDERGAST R.A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 122, 910 (18)
- KUNKEL H.G., SMITH W.K., JOSLIN F.G., NATVIG J.B., LITWIN S.D., Nature, 1969, 223, 1247 (18)
- LABIB R.S., CALVANICO N.J., TOMASI T.B., J. Biol. Chem., 1976, 251, 1969 (36)
- LAINE A., HAYEM A., LEBAS J., ROMON A., Clin. Chim. Acta, 1977, 79, 541-548 (76)
- LAMM M.E., Cellular aspects of IgA, 1976, 223-289 (7,65)
- LAMM M.E., GREENBERG J., Biochemistry, 1972, 11 n° 15, 2744-2750 (33,34,35,36)
- LAMM M.E., JOHNSTONE A.P., MOLE L.E., MURKOFKY N., CUNNINGHAM-RUNDLES C., Immunochemistry, 1977, 14, 467-469 (36,37)
- LAURELL A.B., Vox sanguinis, 1957, 2, 312 (75)
- LINDH E., J. Immun., 1975, 114, 284 (38)
- LIU Y.S.V., LOW T.L.K., INFANTE A., PUTMAN F.W., Science, 1976, 193, 1017-1020 (13,15,19,29)
- LLOYD K.O., KABAT E.A., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1968, 61, 1470 (158)
- LOOS M., BORSOS T., RAPP H.J., J. Immun., 1972, 108, 683 (67)
- LUBIN B., BOESMAN M.I., MICHAELS R.H., KENNY J.F., GITLIN D., J. Pediat., 1964, 65, 1103 (5)

- LUNDFORD J., DEUTSCH H.F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 96, 742 (5)
- MAGNUSSON K.E., STENDAHL O., SJERNSTROM I., EDEBO L., Immunology, 1979, 36 n° 3, 439-448 (68)
- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., Immunochemistry, 1965, 2, 235 (90)
- MARSHALL R.D., Annu. Rev. Biochem., 1972, 41, 673-702 (31)
- MEINKE G.S., SPIEGELBERG H.L., Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 1971, 30, 468 (40)
- MESTECKY J., KULHAVY R., KRAUS F.W., J. Immun., 1972, 108, 738 (40,43)
- MESTECKY J., SCHROHENLOHER R., KULHAVY R., WRIGHT G.P., TOMANA M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71 n° 2, 544-548 (42,44,47)
- MESTECKY J., WINCHESTER R.J., HOFFMAN T., KUNKEL H.G., J. Exp. Med., 1977, 145, 760-765 (44)
- MESTECKY J., ZIKAN J., BUTLER W.T., Science, 1971, 171, 1163-1165 (35)
- MILSTEIN C., PINK J.R.L., Progr. Biophys. Biol. Mol., 1970, 21, 209 (12)
- MOLE J.E., BHOWN A.S., BENNETT J.C., Biochemistry, 1977, 16 n° 16, 3507-3513; (44,45)
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 857 (79)
- MONTGOMERY P.C., DORRINGTON K.J., ROCKEY J.H., Biochemistry, 1969, 8, 1247 (18)
- MONTGOMERY R., WU Y.C., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547 (80)
- MONTREUIL J., Pure Appl. Chem., 1975, 42, 431-477 (159)
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R., MULLET S., Compt. Rend., 1960, 154, 732-736 (5,7,11,72)
- MONTREUIL J., SPIK G., "Méthodes colorimétriques de dosage de glucides totaux". Lab. Chimie Biologique, Fac. Sci. éd., Lille, 1963 (77)
- MONTREUIL J., VLIEGENTHART J.F.G., Proc. 4th. Int. Symp. Glycoconjugates, 19<sup>e</sup>, Woods Hole, Acad. Press éd., New York, 1978 (88)

- MORO E., Wien. Klin. Wochschr., 1901, 14, 1073 (5)
- MORRISSON S.L., KOSHLAND M.E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 124  
(40,42)
- MOTA G., Revue Roumaine de Biochimie, 1977, 14 n° 1, 39-42 (6,8)
- MUH J.P., Thèse Méd. Lille, 1966 (10)
- NATVIG J.B., KUNKEL H.G., Adv. Immunol., 1973, 16, 1-59 (7)
- NEWCOMB R.W., ISHIZAKA K., DE VALD B.L., J. Immunol., 1969, 103, 215 (33)
- NEWCOMB R.W., NORMANSELL D., STANWORTH D., J. Immunol., 1968, 101, 905 (8,33)
- NIAZI S., STATE D., Cancer Research, 1948, 8, 653 (77)
- NIEDERMEIER W., TOMANA M., MESTECKY J., Biochim. Biophys. Acta, 1972, 257,  
527-530 (43)
- NISONOFF A.N., HOPPER J.E., SPRING S.B., The antibody molecule, New York,  
Acad. Press., 1975 (7,53)
- NISONOFF A., WISSLER F.C., LIPMAN L.N., WOERNLEY D.L., Archs. Biochem.  
Biophys., 1960, 89, 230-244 (53)
- OATES M.D., ROSBOTTON A.C., SCHRAGER J., Carbohydr. Res., 1974, 34, 115-137  
(158)
- O'DALY J.A., CEBRA J.J., Biochemistry, 1971a, 10, 3843 (36,40,42)
- O'DALY J.A., CEBRA J.J., J. Immunol., 1971b, 107, 436 (40)
- PADLAN E.O., DAVIES D.R., Proc. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 819-823 (61)
- PARKHOUSE R.M.E., Nature, 1972, 236, 9 (40)
- PATRONE F., DALLEGRI F., SACCHETTI C., Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 1978,  
57 n° 2, 204-207 (69)
- PIERCE N.F., GOWANS J.L., J. Exp. Med., 1975, 142, 1550-1563 (63)
- PINK J.R.L., BUTTERY S.H., DE VRIES G.M., MILSTEIN C., Biochem. J., 1970,  
117, 33-47 (13)
- PITTARD W.B., POLMAR S.H., FANAROFF A.A., J. Reticulendothel. Soc., 1977, 22,  
597 (62)

- POGER M.E., LAMM M.E., J. Exp. Med., 1974, 139, 629 (31)
- POKROVSKIL V.I., DEMINA A.A., CEND N., DEBYATKINA N.V., ZHAMBA G., SEMINA N.A. OCHIRVAAN G., CEREN S., J. Hyg. Epid. Micro. Immunol., 1978, 22 n° 2, 230-236 (68)
- POLJAK R.J., AMZEL L.M., AVEY H.P., CHEN B.L., PHIZACKERLEY R.P., SAUL F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 3305-3310 (54,61)
- POLJAK R.J., AMZEL L.M., PHIZACKERLEY R.P., Prog. Biophys. Molec. Biol., 1976, 31, 67 (61)
- PORTER R.R., Biochem. J., 1959, 73, 119-126 (53)
- PUTNAM F.W., Prog. Immunol. (II), 1974, 1, 25-37 (52)
- PUTNAM F.W., In the plasma proteins, Ed. Putnam F.W., (Acad. Press, New York) Vol. III, 2nd éd., 1977 (18,31)
- PUTNAM F.W., FLORENT G., PAUL C., SHINODA T., SHIMIZU A., Science, 1973, 182, 287-291 (29,52)
- RAAM S.V., INMAN F.P., J. Immunol., 1973, 110, 1044-1050 (38)
- REMINGTON J.S., SCHAFFER I.A., Nature, 1968, 217, 364 (31)
- RICARDO M.J., BREWER J.M., INMAN F.P., Biochem. J., 1974, 137, 71-77 (41)
- RIESEN W.F., HUSER H., SKVARIL F., FEBS-Lett., 1976, 61 n° 2, 243-246 (6)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062 (77)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (77)
- RUDZIK O., CLANCY R.L., PEREY D.Y.E., DAY D.P., J. Immunol., 1975, 114, 1599-1604 (63)
- SANDFORD P.A., CONRAD H.E., Biochemistry, 1966, 5, 1508 (83)
- SCHEIDEGGER J.J., Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103 (75)
- SCHLOSSMAN A., MORO E., Munch. Med. Wochschr., 1903, 1, 597 (5)
- SCHOUB B.D., PROZESKY O.W., LECATSAS G., OOSTHUIZEN R., J. Med. Microbiol., 1977, 11, 25-31 (69)
- SCHWICK G., ESSER H.O., KOCH F., Behring werk-Mitt., 1959, 37, 11 (5)

- SHIMIZU A., PUTNAM F.W., PAUL C., CLAMP J.R., JOHNSON I., Nature New Biol., 1971, 231, 73-76 (29)
- SHINODA T., TITANI K., PUTNAM F.W., J. Biol. Chem., 1970, 245, 4475 (13)
- SILVERTON E.W., NAVIA M.A., DAVIES D.R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1977, 5142 (31,32)
- SKVARIL F., REJNEK I., Cesk. Pediat., 1958, 13, 793 (5)
- SLETTEN K., CHRISTENSEN T.B., BRANDTZAEG P., Immunochemistry, 1975, 12, 783-785 (35,36,37)
- SOCKEN D.J., UNDERDOWN B.J., Immunochemistry, 1978, 15, 499-506 (33)
- SOUTH M.A., COOPER M.D., WOLLHEIM F.A., HONG R., GOOD R.A., J. Exp. Med., 1966, 123, 615 (31,38)
- SOX H.C., HOOD L., Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 66 n° 3, 975-982 (13)
- SPACKMAN P.H., STEIN W.H., MOORE S., Anal. Chem., 1958, 30, 1190 (76)
- SPIEGELBERG H.L., Adv. Immun., 1974, 19, 259 (61)
- SPIEGELBERG H.L., GOTZE O., Fed. Proc., 1972, 31, 655 (68)
- SPIK G., CHERON A., MONTREUL J., DOLBY J.M., Immunology, 1978, 35, 663-671 (69)
- SPIRO R.G., BHOYROO B.D., J. Biol. Chem., 1974, 249 n° 18, 5704-5717 (82,158)
- SPRINGER G.F., DESAI P.R., Carbohydr. Res, 1975, 40, 183-192 (158)
- STANDFORD P.A., CONRAD H.E., Biochemistry, 1966, 5, 1508 (83)
- STOLIAR O.A., GREEN E.K., PELLEY R.P., KLAUS M.H., CARPENTER C.C.J., The Lancet, 1976, 1258-1261 (69)
- STOTT D.I., Immunochemistry, 1976, 13, 157-163 (44)
- STRECKER G., CRETEL A., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J., Biochimie, 1979 (sous presse) (157)
- STRECKER G., MONTREUIL J., Biochimie, 1979 (sous presse) (158)

- STRECKER G., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G., FONTAN R., *Biochimie*, 1979 (sous presse) (159)
- STROBER W., KRAKAUER R., KLAEVEMAN H.L., REYNOLDS H.Y., NELSON D.L., *New Engl. J. Med.*, 1976, 294, 351 (38)
- SVANBORG-EDEN C., SVENNERHOLM A.M., *Infect. Immunol.*, 1978, 22 n° 3, 790-797 (69)
- TAI T., ITO S., YAMASHITA K., MURAMATSU T., KOBATA A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 65, 968-974 (159)
- THOMAS D.B., WINZLER R.J., *Eur. J. Biochem.*, 1974, 49, 77-86 (158)
- THOMPSON R.A., ASQUITH P., *Clin. Exp. Immunol.*, 1970, 7, 491 (6)
- THOMPSON R.E., REYNOLDS H.Y., WAXDAL M.J., *Biochemistry*, 1975, 14 n° 13, 2853 (36)
- THOMSEN O., *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1909, 3, 539 (5)
- TILLMANS J., PHILIPPI K., *Biochem. Z.*, 1929, 215, 36 (77)
- TOMANA M., NIEDERMEIER W., MESTECKY J., HAMMACK W.J., *Immunochemistry*, 1972, 9, 933-940 (16,37)
- TOMANA M., NIEDERMEIER W., MESTECKY J., SKVARIL F., *Immunochemistry*, 1976, 13, 325-328 (25)
- TOMASI T.B., Thesis Rockefeller University, New York, 1965 (6,33)
- TOMASI T.B., Englewood Cliffs, 1976 (7)
- TOMASI T.B., BIENENSTOCK J., *Adv. Immunol.*, 1968, 9, 1-96 (7,8,10,11,33,34,48, 49)
- TOMASI T.B., CALVANICO N., *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 1968, 27, 617 (8)
- TOMASI T.B., CZERWINSKI D.S., *Immunol. Deficiency Diseases in Man "Third developmental immunology workshop, Florida, 1967, Birth defect original articles series"*, 1968, 4 n° 1, 270 (9)
- TOMASI T.B., GREY H.M., 1972, *Progr. Allergy*, 16, 81-213 (7)

- TOMASI T.B., TAN E.M., SOLOMON A., PRENDERGAST R.A., J. Exp. Med., 1965, 121, 101 (36,37)
- TOMASI T.B., ZIGELBAUM S., J. Clin. Invest., 1963, 42, 1552 (5)
- TORANO A., PUTNAM F.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 966-969 (18)
- TORANO A., TSUZUKIDA Y., LIU Y.S.V., PUTNAM F.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74 n° 6, 2301-2305 (19,30)
- TREVELYAN W.E., HARRISSON J.S., Biochem. J., 1952, 50, 298 (82)
- TSUZUKIDA Y., WANG C.C., PUTNAM F.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76 n° 3, 1104-1108 (20,21)
- UNDERDOWN B.J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 62 n° 1, 54-61 (48)
- UNDERDOWN B.J., KOCZEKAN K., SOCKEN D., WEICKER J., Immunochemistry, 1977, 14, 111-118 (33)
- VAERMAN J.P., Res. Immunobiol. Immunochem., 1973, 3, 91 (7,8)
- VAERMAN J.P., HEREMANS J.F., Science, 1966, 153, 647 (18)
- VAN LOGHEM E., DE LANGE G., KOINSTINEN J., Scand. J. Immunol., 1976, 5, 161-164 (19)
- VAN MUNSTER P.J., STOELINGA G.B.A., POELS-ZANDERS S., Immunology, 1969, 17, 165 (36)
- VAN MUNSTER P.J., STOELINGA G.B.A., POELS-ZANDERS S., Immunochemistry, 1971, 8, 471-477 (33,35,36,37)
- VON MURALT G., GUGLER E., ROULET D.L.A., In Protides of the biological fluids Proceedings of the 8th Colloquium, Brugge, 1960, p. 166, Elsevier, Amsterdam (5)
- VYAS G.N., FUDENBERG H.H., Proc. Nat. Acad. Sci., 1969, 64, 1211 (18)



- WALDMAN R.H., MACH J.P., STELLA M.M., ROWE D.S., J. Immunol., 1970, 105, 43 (6)
- WATANABE S., BARNIKOL H.U., HORN J., BERTRAM J., HILSCHMANN N., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1973, 354, 1505-1509 (52)
- WEICKER J., UNDERDOWN B.J., J. Immunol., 1975, 114 n° 4, 1337-1344 (33)
- WEINHEIMER P.F., MESTECKY J., ACTON R.T., J. Immunol., 1971, 107, 1211 (40)
- WERNER I., ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (77)
- WILLIAMS R.C., GIBBONS R.J., Science, 1972, 177 n° 4050, 697 (69)
- WINKELHAKE J.I., Immunochemistry, 1978, 15, 695-714 (60)
- WOLFENSTEIN-TODEL C., PRELLI F., FRANGIONE B., FRANKLIN E.C., Biochemistry, 1973, 12 n° 25, 5195-5197 (22)
- YAOITA H., J. Invest. Dermatol., 1978, 71, 213-216 (68)
- YAMASHINA I., MAKINO M., J. Biochem., 1952, 51, 359 (79)
- YPHANTIS D.A., Biochemistry, 1964, 3, 297-314 (76)
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENTON G., J. Chromatog., 1972, 69, 291-304 (77,83,86)
- ZIKAN J., Immunochemistry, 1973, 10, 351-354 (40,42)
- ZIKAN J., MESTECKY J., SCHROHENLOHER R.E., TOMANA M., KULHAVY R., Immunochemistry, 1972, 9, 1185-1193 (9,18)