

N° d'ordre : 595

50376
1983
175

50376
1983
175

THÈSE

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ES SCIENCES

par
Annick PIERCE-CRETEL

**ETUDE STRUCTURALE DES GLYCANNES DES
IMMUNOGLOBULINES A (sIgA) DU LAIT DE FEMME**



Présentée le 20 septembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président :	J.	MONTREUIL
Rapporteurs :	H.	EGGE
	M.	MONSIGNY
	G.	SPIK
Examineurs :	R.W.	JEANLOZ
	J.F.G.	VLIEGENTHART

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSÉLET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

Ce travail a été réalisé sous la Direction de
Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire de
Chimie Biologique (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de
l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire
Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure-fonction des
constituants membranaires).

A mes parents,

avec toute mon affection et ma profonde gratitude

A mon frère,

A Ray,

avec tout mon amour

A Geneviève,

J'ai toujours trouvé auprès de vous une large compréhension jointe à une extrême gentillesse et à de précieux conseils. Je vous remercie de m'avoir accueillie il y a 7 ans dans votre équipe et de m'avoir, durant toutes ces années, fait découvrir les joies de la recherche. Votre ardeur au travail et votre enthousiasme ont été pour moi un exemple. Croyez en ma sincère reconnaissance et en mon amitié.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Vous avez bien voulu m'accepter et m'intégrer dans votre Laboratoire. En me confiant ce travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir, vous m'avez permis de partager la vie du C-9 et de bénéficier, non seulement de la clarté de votre enseignement mais aussi de votre dynamisme et de votre haute compétence scientifique. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée, en particulier en favorisant mon intégration dans un organisme de recherche. Permettez-moi de joindre à ma profonde reconnaissance mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur H. EGGE,

Vous avez suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur M. MONSIGNY,

Malgré vos nombreuses occupations, vous me faites l'honneur de bien vouloir être rapporteur de cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur R.W. JEANLOZ,

Je suis honorée de votre présence dans ce jury et vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur J.F.G. VLIEGENTHART,

Je vous remercie vivement ainsi que tout votre groupe pour la diligence et l'efficacité avec lesquelles vous avez toujours réalisé les analyses de RMN. Je suis heureuse que vous ayez bien voulu accepter de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur D. MIRELMAN,

"Chico", mon unique regret est que tu sois absent de ce jury. Je te remercie encore de m'avoir accueillie dans ton Laboratoire et d'avoir, par tes conseils et tes encouragements, contribué à ces recherches.

Mes remerciements s'adressent également à

Mercedes PAMBLANCO, " por los formidables años que hemos pasado juntas, por su dinamismo, por su vitalidad y sobretodo por su amistad".

Messieurs G. STRECKER, H. DEBRAY, B. FOURNET et H. van HALBEEK pour leur amicale et fructueuse collaboration.

Mesdames C. ALONSO, B. CODDEVILLE, M. CONIEZ, R. DEBRAY et à Messieurs Y. LEROY et G. RICARD pour leur précieuse collaboration technique.

Gisèle TINEL qui a participé à la réalisation de ce travail en effectuant avec compétence la frappe et la mise en page de ce mémoire ainsi qu'à Jo CELEN pour tous les travaux de reliure.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à J.P. DECOTTIGNIES, D. LEGER et J. MAZURIER pour les conseils qu'ils m'ont prodigués et pour l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée et au "103" pour l'ambiance chaleureuse qui y règne.

A tous ceux qui m'ont accordé leur collaboration, leur aide et leur amitié.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	5
MECANISMES DE DEFENSE DE L'INTESTIN DU NOURRISSON	5
I - ACTION DE LA FLORE BIFIDE	10
A - CARACTERISTIQUES DE LA FLORE FECALE DU NOURRISSON .	10
1 - <i>La flore du nourrisson alimenté au sein</i>	10
2 - <i>La flore du nourrisson alimenté au biberon</i>	11
3 - <i>Conclusions</i>	11
B - ROLE DE LA FLORE BIFIDE	11
C - MECANISME D'ACTION DU BIFIDE	12
D - LES FACTEURS BIFIDIGENES	12
1 - <i>Le lactose</i>	12
2 - <i>Le lactulose de Petuely</i>	12
3 - <i>Le facteur bifide de Gyorgy</i>	13
4 - <i>Les oligosaccharides du lait</i>	15
5 - <i>Les glycoprotéines et glycopeptides du lait</i> ...	15
6 - <i>Autres composés doués d'activité bifidigène</i> .	15
II - INHIBITION DE L'ADHERENCE BACTÉRIENNE	15
A - COMMENT LES BACTERIES ADHERENT AUX CELLULES ?	15
1 - <i>L'adhérence</i>	16
2 - <i>La reconnaissance spécifique</i>	16
B - COMMENT PREVENIR L'ADHERENCE BACTERIENNE ?	18
1 - <i>Les constituants du mucus</i>	18
2 - <i>Les immunoglobulines de sécrétion</i>	19
3 - <i>Les glycoconjugués et les oligosaccharides</i> <i>du lait de Femme</i>	20

III - INHIBITION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE	p. 21
A - ACTION BACTERIOSTATIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE DES MILIEUX BIOLOGIQUES	21
1 - <i>Caractères généraux</i>	21
2 - <i>Localisation</i>	23
3 - <i>Rôle</i>	23
B - ACTION LYTIQUE DU LYSOZYME	24
1 - <i>Caractères généraux</i>	24
2 - <i>Localisation</i>	26
3 - <i>Rôle</i>	26
C - ACTION BACTERICIDE DU SYSTEME LACTOPEROXYDASIQUE	27
1 - <i>Caractères généraux</i>	28
2 - <i>Localisation</i>	28
3 - <i>Rôle</i>	29
D - ACTION DES AUTRES FACTEURS MOLECULAIRES	31
1 - <i>Le complément</i>	31
2 - <i>Les lipides</i>	31
3 - <i>Les autres substances inhibitrices</i>	32
IV - PROTECTION DES MUQUEUSES PAR LES SIGA	32
A - ACTIVITE ANTICORPS	33
1 - <i>La neutralisation des virus</i>	33
2 - <i>L'agglutination des bactéries</i>	33
3 - <i>La neutralisation des parasites</i>	35
4 - <i>Inhibition de l'absorption digestive des antigènes</i>	38
5 - <i>Activation du complément par la voie alterne</i>	38
B - INHIBITION DU ROLE ANTICORPS PAR LES PROTEASES BACTERIENNES	39

1 - Les protéases bactériennes	p. 40
2 - Rôle des IgA ₁ -protéases	40
C - AUGMENTATION DE LA PROTECTION DES MUQUEUSES PAR LA VACCINATION	42
1 - Y-a-t-il une réponse secondaire du système sécrétoire ?	43
2 - Quelle est la meilleure voie d'immunisation ?	43
 V - SYNERGIE D'ACTION DES CONSTITUANTS SOLUBLES DU LAIT MATERNEL	45
A - SYNERGIE LYSOZYME - sIgA - COMPLEMENT	45
B - SYNERGIE LYSOZYME - LACTOTRANSFERRINE	45
C - SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE - sIgA	47
D - SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE - COMPLEMENT	50
 VI - ACTION DES CELLULES DU LAIT	50
A - CARACTERES GENERAUX	51
B - ROLE	52
1 - Les macrophages	52
2 - Les lymphocytes	52
C - ORIGINE DES CELLULES DE LA GLANDE MAMMAIRE	53
1 - Le cycle lymphatico-sanguin	53
2 - Migration vers la glande mammaire	53
 VII - CONCLUSIONS	54
 ETUDE STRUCTURALE DES sIgA	59
I - PREPARATION DES sIgA	61

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SIGA	p.	61
A - PROPRIETES PHYSIQUES		61
B - PROPRIETES CHIMIQUES		62
III - ETUDE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DES SIGA .		64
A - ETUDE DES CHAINES LEGERES		64
1 - <i>Propriétés physico-chimiques</i>		64
2 - <i>Etude structurale</i>		64
a - <i>Etude de la partie peptidique</i>		67
α) <i>Etude de la chaîne κ</i>		67
β) <i>Etude de la chaîne λ</i>		67
b - <i>Etude de la partie glycanique</i>		69
c - <i>Mode de liaison des chaînes légères aux chaînes lourdes</i>		69
3 - <i>Rôle des chaînes légères</i>		71
B - ETUDE DES CHAINES LOURDES		73
1 - <i>Propriétés physico-chimiques</i>		73
2 - <i>Etude structurale</i>		73
a - <i>Etude de la partie peptidique</i>		73
α) <i>Structure primaire des chaînes α</i>		74
β) <i>Structure de la "hinge region"</i>		76
γ) <i>Structure du peptide de "queue"</i>		76
δ) <i>Structure secondaire des chaînes α</i> ...		78
b - <i>Etude de la partie glycanique</i>		78
α) <i>Nature de la partie glycanique</i>		78
β) <i>Localisation de la partie glycanique</i>		80
3 - <i>Rôle des chaînes lourdes</i>		83
a - <i>Rôle de la partie peptidique</i>		83
b - <i>Rôle de la partie glucidique</i>		85

C - ETUDE DE LA PIECE DE JONCTION	p.	85
1 - Preparation de la chaîne de jonction		87
2 - Propriétés physico-chimiques		88
3 - Etude structurale		88
a - Etude de la partie peptidique		88
b - Etude de la partie glycanique		88
c - Etude conformationnelle		88
4 - Rôle de la pièce de jonction.....		91
D - ETUDE DE LA PIECE DE JONCTION		95
1 - Localisation, caractérisation et propriétés physico-chimiques		96
a - Etude de la pièce de sécrétion libre des milieux biologiques		96
a) Préparation de la pièce de sécrétion libre		96
b) Propriétés physico-chimiques		97
c) Etude structurale de la partie pepti- dique		97
d) Etude structurale de la partie gluci- dique		99
b - Etude de la pièce de sécrétion membranaire		99
a) Préparation de la pièce de sécrétion membranaire		101
b) Propriétés physico-chimiques		101
c - Etude de la pièce de sécrétion liée aux immunoglobulines de sécrétion		101
a) Préparation de la pièce de sécrétion liée		101
b) Propriétés physico-chimiques		102
c) Etude des déterminants antigéniques ..		102
d) Etude de l'affinité pièce de sécrétion- immunoglobulines polymérisées		103

2 - Rôle de la pièce de sécrétion	p.	104
a - Protection des sIgA		104
b - Transport des IgA au travers des cellules épithéliales		104
α) Transfert actif des IgA dimériques ...		105
β) Transfert passif		107
c - Passage des IgA dimériques vers la bile .		108
α) Par l'intermédiaire de la pièce de sécrétion		108
β) Par l'intermédiaire du récepteur des asialoprotéines		111
IV - CONFORMATION DES IMMUNOGLOBULINES		111
A - NOTION DE DOMAINE		112
1 - Concept de base		112
2 - Définitions des domaines		112
B - MISE EN EVIDENCE DES DOMAINES		114
1 - Structure des domaines		114
2 - Structure des inter-domaines		116
3 - Localisation des unités glycaniques		116
C - CONTACT INTER-DOMAINES		116
D - ROLE DES DOMAINES		118
1 - Rôle des domaines de la région variable		119
2 - Rôle des domaines de la région constante		119
E - CONCLUSION		120
V - MODELES STRUCTURAUX DES sIgA		120
1 - Modèle de TOMASI et BIENENSTOCK		121
2 - Modèle de HEREMANS		121

1 - Méthodes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques	p.	134
a - Electrophorèse sur acétate de cellulose		134
b - Immunoélectrophorèse sur gélose		134
c - Immunodiffusion radiale		135
d - Technique d'immunodiffusion d'Ouchterlony ...		135
2 - Etude de la masse moléculaire		135
a - Coefficient de sédimentation		135
α) Par ultracentrifugation analytique		135
β) Par chromatographie de gel filtration sur couche mince		135
b - Masse moléculaire		136
II - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES		136
A - PREPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES		136
B - PREPARATION DES GLYCANNES ALCALI-STABLES		137
III - MÉTHODOLOGIES DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES		137
A - COMPOSITION EN ACIDES AMINES		138
B - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES		138
C - COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDES		138
D - METHYLATION DES GLYCANNES		139
1 - Préparation de la base de microméthylation		139
2 - Microméthylation		140
a - Matériels utilisés		140
b - Mode opératoire		140

E - HYDRAZINOLYSE - DESAMINATION NITREUSE	142
F - HYDRAZINOLYSE	156
G - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	156
 RESULTATS	 157
 I - PRÉPARATION DES IGA.....	 158
A - PREPARATION DES IGA ₁ SERIQUES MYELOMATEUSES	158
B - PREPARATION DES IGA SERIQUES NORMALES	158
C - PREPARATION DES IGA DE SECRETION	160
1 - <i>Chromatographie sur colonne de QAE-Sephadex</i>	160
2 - <i>Chromatographie sur colonne de SP-Sephadex</i>	160
3 - <i>Chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA-34</i> ..	161
D - CONTROLE DE L'HOMOGENEITE DES FRACTIONS	161
E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES	162
F - COMPOSITION EN GLUCIDES	162
G - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION ET MASSE MOLECULAIRE ..	165
1 - <i>Coefficient de sédimentation</i>	165
- <i>Par ultracentrifugation analytique</i>	165
- <i>Par chromatographie de gel filtration sur</i> <i>couche mince</i>	165
2 - <i>Masse moléculaire</i>	166
H - CONCLUSIONS	166
 II - ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE DES GLY- CANNES LIÉS O-GLYCOSIDIQUEMENT AUX IGA	 167

A - ETUDE DE LA FRACTION O-GLYCANNIQUE DES IgA SÉRIQUES	167
B - ETUDE DE LA FRACTION O-GLYCANNIQUE DES IgA DE SECRETION DU LAIT HUMAIN	169
1 - <i>Etude des glycanes des fractions F-I et F-II</i>	169
a - Méthylation	170
b - Spectrométrie de masse	170
α) <i>Etude de l'extrémité non réductrice</i> ..	174
β) <i>Etude de l'extrémité réductrice</i>	176
2 - <i>Etude des glycanes de la fraction F-III</i>	178
C - CONCLUSIONS	189
III - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES LIÉS N-GLYCOSIDIQUEMENT AUX IgA	192
A - MISE EN EVIDENCE D'UNE HOMOGENEITE STRUCTURALE DES FRACTIONS N-GLYCANNIQUES DES IgA SÉRIQUES ...	192
B - ETUDE DES GLYCANNES LIÉS N-GLYCOSIDIQUEMENT AUX sIgA	194
1 - <i>Etude de la structure primaire des sialoglycopeptides</i>	194
2 - <i>Etude de la structure primaire des asialoglycopeptides</i>	203
a - Fractionnement sur colonne de Bio-Gel P-30	203
b - Fractionnement sur colonne de Con A Sepharose	205
c - Fractionnement sur colonne de LCA-Sepharose	205
d - Structure primaire des asialoglycopeptides	207
C - CONCLUSIONS	250

IV - RECHERCHES PRÉLIMINAIRES SUR LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES D'ACTION DES GLYCANNES DANS LA PROTECTION INTESTINALE LORS DE L'INFECTION PAR LES SHIGELLES	253
A - MATÉRIELS ET MÉTHODES	254
1 - <i>Les bactéries</i>	254
a - Croissance des bactéries	254
b - Fixation des bactéries à la glutaraldéhyde	255
2 - <i>L'agglutinine</i>	255
a - Préparation des cellules coloniques de Cobaye	255
b - Préparation de l'agglutinine soluble de Cobaye	256
3 - <i>Les oligosaccharides et les glycopeptides</i>	256
a - Matériel	p. 256
b - Dégalactosylation	257
c - Désialylation	257
4 - <i>Test d'agglutination</i>	258
B - RESULTATS ET DISCUSSION	258
C - CONCLUSIONS	263

CONCLUSIONS GÉNÉRALES	266
-----------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Depuis plus d'un siècle le lait de Femme a fait l'objet de recherches très actives en raison même de son importance dans l'alimentation du nouveau-né. En effet, les nourrissons alimentés au lait maternel sont beaucoup mieux protégés contre les agressions bactériennes et virales que les nourrissons alimentés au lait de Vache. Cette protection est liée à la présence dans le lait de Femme, d'une part, de cellules immuno-compétentes et, d'autre part, de nombreux facteurs solubles. Parmi ceux-ci, trois protéines jouent un rôle prépondérant : les immunoglobulines IgA de sécrétion (sIgA), la lactotransferrine (LTF) et le lysozyme. Elles agissent par différents mécanismes en inhibant la croissance de souches bactériennes responsables de diarrhées infantiles infectieuses.

Depuis leur isolement, les IgA de sécrétion (MONTREUIL *et al.*, 1960a) et la lactotransferrine (MONTREUIL *et al.*, 1960b) ont fait, au Laboratoire, l'objet de nombreuses recherches. En particulier, les études ont porté sur la détermination de la structure de ces glycoprotéines et sur la connaissance des mécanismes moléculaires de leur action. Notre travail s'inscrit dans le cadre général des recherches entreprises dans le groupe de G. SPIK sur la protection de la muqueuse intestinale et sur la maternisation des laits et a porté plus spécifiquement sur l'étude de la structure des glycanes des immunoglobulines sIgA isolées du lait de Femme.

Les travaux antérieurement effectués sur les IgA de sécrétion par DESCAMPS (1974) ont porté sur la purification et la caractérisation de ces composés. En outre, les résultats préliminaires obtenus par le même auteur ont montré que les sIgA du lait de Femme possédaient 12 groupements glycaniques conjugués à la chaîne

polypeptidique par des liaisons de type asparaginy-N-acétyl glycosaminique et 7 groupements glycaniques alcali-labiles conjugués par des liaisons O-glycosidiques impliquant des résidus de N-acétylgalactosamine et des résidus de sérine et de thréonine.

C'est cette étude que nous avons reprise. 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 (1974a, b) avait montré qu'il existait de profondes différences entre ces deux catégories d'anticorps. Notre travail a dans un premier temps, consisté à isoler les glycopeptides des sIgA du lait de Femme, dans le but de définir leur structure. Afin de préciser si l'hétérogénéité que nous avons observée à propos des IgA sécrétoires était ou non particulière à ces dernières, nous nous sommes ensuite attachée à l'étude de la fraction des glycanes liés O-glycosidiquement à la région charnière des IgA sériques normales et de deux IgA sériques myélomateuses. Dans un second temps, les structures glycaniques des sIgA ayant été déterminées nous avons essayé de préciser la participation de ces glycanes aux différents rôles biologiques des IgA de sécrétion.

Nous présenterons, en premier lieu, dans un chapitre de généralités, l'état actuel de nos connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de défense de l'intestin du nourrisson et sur les propriétés physico-chimiques et la conformation des sIgA. Nous présenterons ensuite nos travaux personnels relatifs, d'une part, à la structure des glycanes des sIgA et, d'autre part, à leur rôle biologique, en particulier à leur intervention, en association avec les oligosaccharides du "gynolactose" et avec des glycopeptides provenant de la dégradation de diverses glycoprotéines du lait de Femme, dans les mécanismes d'inhibition de l'adhésion bactérienne à la paroi intestinale.

Jusqu'à présent, nos travaux ont fait l'objet des publications suivantes :

Mémoires parus

- 1 - A. CRETEL, M. PAMBLANCO, H. EGGE, G. STRECKER, J. MONTREUIL and G. SPIK
Heterogeneity of the glycans O-glycosidically linked to the hinge region of secretory IgA isolated from human milk
Proc. Vth Intern. Symp. Glycoconjugates, Kiel, 1979, G. Thieme éd., Stuttgart, p. 26-27.
- 2 - A. PIERCE-CRETEL, M. PAMBLANCO, G. STRECKER, J. MONTREUIL and G. SPIK
Heterogeneity of the glycans O-glycosidically linked to the hinge region of sIgA isolated from human milk
Eur. J. Biochem. (1981) 114, 169-178
- 3 - G. STRECKER, A. PIERCE-CRETEL, B. FOURNET, G. SPIK and J. MONTREUIL
Gas liquid chromatography-Mass spectrometry of 2,5-anhydro-mannitol-containing oligosaccharides obtained by hydrazinolysis nitrous acid deamination of glycopeptides
Anal. Biochem, (1982) 111, 17-26.
- 4 - A. PIERCE-CRETEL, M. PAMBLANCO, G. STRECKER, J. MONTREUIL and G. SPIK
Primary structure of the N-glycosidically linked sialoglycans of secretory immunoglobulins A from human milk
Eur. J. Biochem., (1982) 125, 383-388
- 5 - A. PIERCE-CRETEL et G. SPIK
Structure des glycanes des immunoglobulines sIgA du lait de Femme
Le Lait, 62, 409-414

- 6 - H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, G. SPIK and J. MONTREUIL
Affinity of ten insolubilized lectins towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides
(1983) in "Lectins" (T.C. Bøgg-Hansen and G.A. Spengler eds.) Vol. III, pp. 335-350, Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York.

Mémoires sous presse

- 1 - A. PIERCE-CRETEL, H. DEBRAY, J. MONTREUIL and G. SPIK, H. van HALBEEK, J.H.G.M. MUTSAERS and J.F.G. Vliegenthart
Primary structure of the N-glycosidically linked asialoglycans of secretory immunoglobulins A from human milk
Eur. J. Biochem., 1983
- 2 - H. DEBRAY, A. PIERCE-CRETEL, P. DELANNOY and J. MONTREUIL
Affinity of four immobilized lectins with the α -D-mannose as dominant monosaccharide. Application to the fractionation of N-glycosidically linked glycopeptides.
Eur. J. Biochem., 1983
- 3 - A. PIERCE-CRETEL, M. IZHAR, Y. NUHAMOWITZ, G. STRECKER, J. MONTREUIL, G. SPIK and D. MIRELMAN.
Oligosaccharide structural specificity of the soluble agglutinin released from guinea pig colonic epithelial cells
FEMS Microbiol. Lett., 1983

GENERALITES

MECANISMES DE DEFENSE DE L'INTESTIN DU NOURRISSON

La diarrhée infectieuse affecte près de 500 millions d'enfants par an dans le monde (ROHDE et NORTHROP, 1976). C'est la cause principale de la mortalité chez les enfants de moins de 4 ans (PUFFER et SERRANO, 1973) et la cause essentielle de la malnutrition (MARTORELL *et al.*, 1975). Bien qu'elle soit en nette diminution en Europe, la diarrhée continue d'être la cause de l'hospitalisation d'un enfant sur quatre (OAKLEY *et al.*, 1976).

La diarrhée résulte d'une augmentation de la fréquence de la fluidité et du volume des selles. Il en existe deux types : la diarrhée chronique et la diarrhée infectieuse. Cette dernière est la seule dont nous discuterons. Elle est causée par des agents bactériens, viraux ou parasitaires. Elle peut être due aux entérotoxines libérées par les micro-organismes pathogènes non-envahisseurs (Fig. 1 ; p. 6). La cellule épithéliale possède des récepteurs de la toxine. L'adhésion de cette dernière à la membrane épithéliale stimule l'action de l'adényl cyclase. La production d'AMP cyclique provoque la sécrétion massive d'ions Cl^- et d'eau et bloque l'absorption des ions Na^+ . De nombreuses souches d'*E. coli*, de *Clostridium* et de *Vibrio cholerae* agissent de la même manière.

La diarrhée est provoquée également lors de l'invasion et de la colonisation des tissus profonds par des organismes patho-

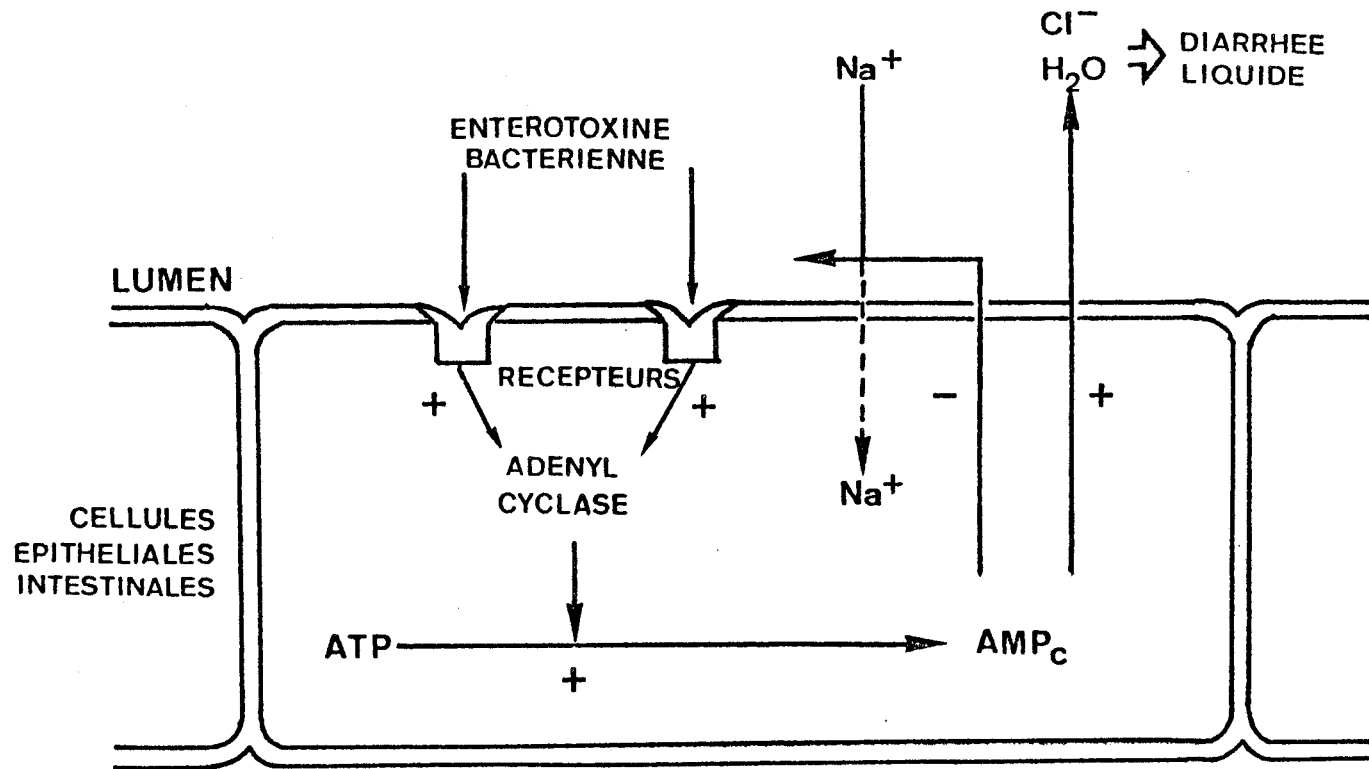


Figure 1 : Mécanisme de la diarrhée due à la présence d'entérotoxines bactériennes (KRONBORG et HOWARD, 1980)



gènes dits "envahisseurs" (Fig. 2 ; p. 8). Deux cas se produisent : la bactérie ou l'organisme envahisseur reconnu par le système immunitaire de l'hôte va être rapidement phagocyté ou alors non reconnu, il va se multiplier et créer une maladie infectieuse systématique (OFEK et BEACHEY, 1980). L'ulcération des muqueuses entraîne une diarrhée "sanguine". Les Shigelles, les *E. coli* envahissantes et les Salmonelles agissent par ce mécanisme.

Des études cliniques ont établi que les nourrissons alimentés au lait maternel souffraient moins de troubles digestifs et de diarrhées infectieuses et qu'ils présentaient un taux moindre de morbidité et de mortalité que les nouveau-nés alimentés aux laits artificiels (GYORGY, 1964). Des études épidémiologiques réalisées par CHANDRA (1979) ont révélé que la protection du lait de Femme vis-à-vis des différentes infections pathogènes était effective dans un pays du Tiers-Monde comme dans un pays industrialisé (Tableau I ; p. 9). La protection du tractus gastro-intestinal du nourrisson par le lait maternel est un phénomène complexe qui fait intervenir à la fois des cellules : macrophages et lymphocytes, des facteurs solubles spécifiques : les immunoglobulines de sécrétion : sIgA et sIgM, des facteurs solubles non spécifiques : la lactotransferrine, le lysozyme, la lactoperoxydase, le mucus, le complément et des bactéries saprophytes : les Bifides.

Ces différents constituants du lait :

- empêchent l'implantation des germes pathogènes,
- inhibent leur adhésion à la membrane épithéliale,
- inhibent leur croissance et
- entraînent leur disparition.

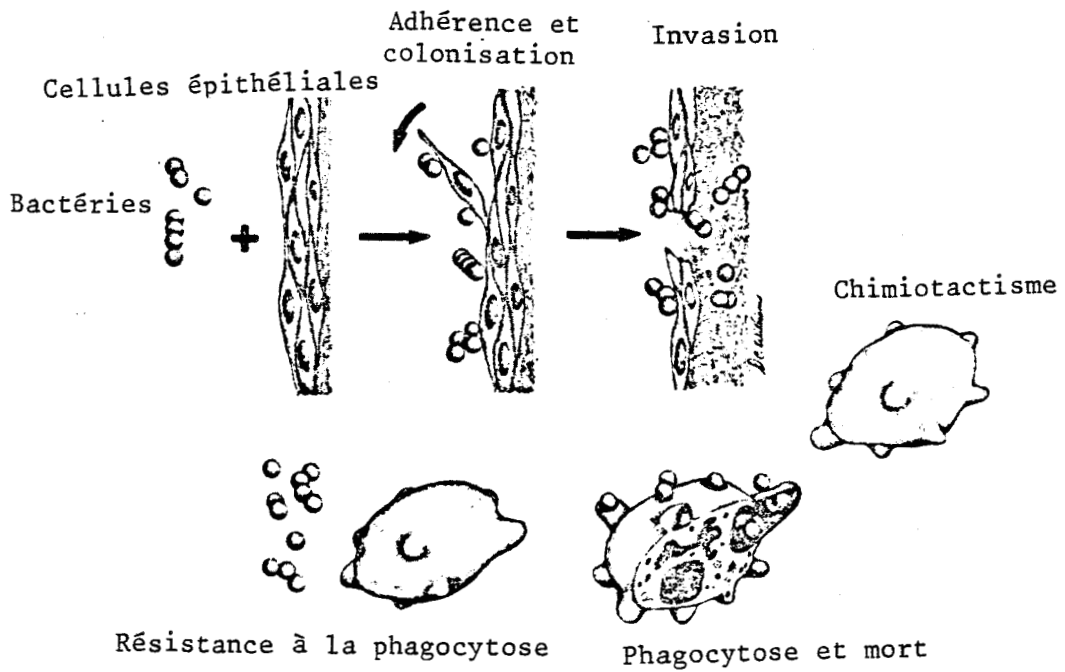


Figure 2 : Mécanisme de la diarrhée due à l'entéro-invasion par des bactéries (OFEK et BEACHEY, 1980)

TABEAU I

INCIDENCE DU MODE D'ALIMENTATION SUR LE TAUX DES INFECTIONS
BACTERIENNES CHEZ DES NOURRISSONS PROVENANT SOIT D'UN PAYS
INDUSTRIALISE SOIT D'UN PAYS DU TIERS-MONDE (CHANDRA, 1979)

Désordre	Morbidité au Canada		Morbidité en Inde	
	Nourrissons au sein n = 30	Nourrissons au biberon n = 30	Nourrissons au sein n = 35	Nourrissons au biberon n = 35
Infection respiratoire	42	98	57	109
Otite	9	86	21	52
Diarrhée	5	13	70	211
Deshydratation	0	3	3	14
Pneumonie	-	-	2	8

Les chiffres du tableau représentent le nombre de fois où les enfants d'un même groupe sont malades, ceci sur une période de 2 ans.

n = nombre d'enfants dans chaque groupe.



I - ACTION DE LA FLORE BIFIDE

A - CARACTERISTIQUES DE LA FLORE FECALE DU NOURRISSON

Dans sa période prénatale, le fœtus se trouve dans un environnement stérile où les contacts avec les micro-organismes sont exclus. Dès les trois premiers jours après la naissance, une flore commensale s'installe (TISSIER, 1900 ; MORO, 1900 ; GYLLENBERG, et ROINE, 1957 ; SMITH et CRABB, 1961). Cette flore diffère selon le mode d'alimentation du nourrisson.

1 - La flore du nourrisson alimenté au sein : Les selles et la flore intestinale du nourrisson sont influencées par le régime alimentaire. L'enfant nourri au sein élimine des matières fécales liquides, à "odeur de fromage" et à pH acide (pH 5) dont la population microbienne est essentiellement constituée de micro-organismes Gram (+) (BULLEN et WILLIS, 1971). Il s'agit de *Bifidobacterium* (10^{10} germes/g de selles) et, plus particulièrement, de *Bifidobacterium bifidum* (MITSUOKA *et al.*, 1974 ; BULLEN *et al.*, 1976 ; NEUT *et al.*, 1980). Le nombre des *Enterobacteriaceae* est beaucoup plus faible (10^8 germes/g de selle).

BULLEN et WILLIS (1971) et LEVESQUE (1959) pensent que les *B. bifidum* ne sont pas responsables des conditions particulières de l'intestin des nourrissons élevés au sein, mais que c'est le tube digestif qui offre un biotope tel, qu'il se produit une sélection des *Bifidobacterium*. Ils suggèrent que le taux élevé en lactose, la faible teneur en protéines et le pouvoir tampon inférieur du lait maternel donnent des conditions plus favorables au développement des *Bifidobacterium*. LEVESQUE *et al.* (1959) confirment que la bonne adaptation du métabolisme du lait de Femme au tube digestif du nourrisson est responsable de la flore bifide.

2 - La flore fécale du nourrisson alimenté au biberon :

Dans les deux jours qui suivent le sevrage, la flore microbienne intestinale se modifie et devient à prédominance Gram (-). Le nombre des Enterobactéries, des Bactéroïdes, des Clostridies est considérablement augmenté. Le taux de *B. bifidum* diminue ou reste constant (BULLEN et WILLIS, 1971). En outre, le *B. bifidum* disparaît au profit de *B. infantis*, *breve* et *adolescentis* (NEUT et al., 1980). D'autre part, le changement d'alimentation rend le caractère des selles voisin de celui des adultes : consistance ferme, odeur fécale et pH compris entre 6,0 et 7,0.

3 - Conclusions : Il ressort de cette opposition entre les deux types d'allaitement que :

- le bifide se multiplie jusqu'à devenir l'hôte prédominant des selles en cas d'allaitement maternel ;
- l'allaitement artificiel ou mixte empêche son développement.

B - ROLE DE LA FLORE BIFIDE

D'après les constatations faites par TISSIER en 1900 chez les nourrissons au sein, la flore bifide s'oppose au développement des autres germes. En effet, la colonisation de l'intestin par des bactéries acidophiles, analogues à la flore bifide, inhibent l'action des bactéries putréfiantes responsables d'infections intestinales (TISSIER, 1905). TASSOVATZ et KRAGOUYEVITCH (1964) réalisent le traitement de l'entéro-colite aiguë par ingestion de culture lyophilisée de *B. bifidum*. La flore bifide aurait un rôle préventif des infections bactériennes (TASSOVATZ et KOTSICH, 1961 ; MATA et al., 1969) et virales (MATA et al., 1969).

Il existe des controverses autour de la question des bifides (PETUELY et LYNAU, 1956 ; LEVESQUE, 1959 ; WAGNER et STARR,

1969). En effet, la flore bifide serait instable lors de diverses affections gastro-intestinales. Le bifide n'aurait pas forcément un rôle protecteur de l'intestin en inhibant la prolifération des germes pathogènes, mais pourrait être simplement le témoin de la bonne santé de l'enfant.

C - MECANISME D'ACTION DU BIFIDE

Le *B. bifidum* métabolise une grande variété de sucres en produisant d'importantes quantités d'acides organiques : acide lactique, acétique, formique, succinique et propionique (DITTMAN *et al.*, 1967 ; SMITH et HOLDEMAN, 1968 ; MOORE *et al.*, 1970 ; BULLEN *et al.*, 1976) qui abaissent le pH des selles (NORTON et SHOHL, 1926) à 4. L'environnement acide inhibe *in vitro* la croissance des Shigelles (HENTGES, 1967a), des Salmonelles (MEYNELL, 1963 ; BOHNHOFF *et al.*, 1964), des *E. coli* (KUHN, 1957), des Bacilles typhiques et paratyphiques et des levures (BERGHEIM, 1940 ; HENTGES, 1967b).

En outre, le *B. bifidum* serait un agent de synthèse des vitamines B₁, B₂ et K (LEVESQUE, 1959), il favoriserait l'assimilation du calcium et des vitamines liposolubles (NEIMANN *et al.*, 1965).

D - LES FACTEURS BIFIDIGENES

Différents facteurs favorisant la croissance du *B. bifidum* ont été trouvés non seulement dans le lait humain, mais également dans de nombreuses substances biologiques.

1 - Le lactose : Son action bifidigène est très controversée (MAIYOTH, 1949 ; MANCIAUX, 1958 ; PETUELY et LYNAU, 1956 ; MAYER, 1956 ; MONTREUIL, 1971).

2 - Le lactulose de PETUELY : Le lactulose Gal(β1-4) Fru augmente la croissance du bifide, cependant ce composé n'existe pas

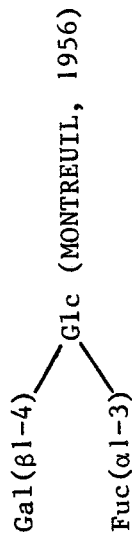
à l'état libre dans le lait maternel (PETUELY, 1957). Ce facteur provoque, en outre, des troubles du transit intestinal.

3 - Le facteur bifide de Gyorgy : En 1954b,c, GYORGY *et al.* isolent une souche mutante de *B. bifidum* la variété *Pennsylvaniens* ayant la propriété de ne proliférer qu'en présence de lait maternel. Cette activité biologique persiste après passage à l'autoclave du lait. Poursuivant leurs travaux GYORGY *et al.* (1954a) montrent que le "gynolactose" de POLONOVSKI et LESPAGNOL (1933) est le support de l'activité bifide du lait maternel. Par la suite GAUHE *et al.* (1954) observent que seuls les oligosaccharides azotés sont des facteurs de croissance *in vitro*. Le composé azoté est donc la N-acétyl-glucosamine. ROSE *et al.* en 1954 montrent que la méthyl-N-acétyl- β -D-glucosamine est active alors que l'anomère α ne l'est pas. La bactérie mutante n'étant pas capable de métaboliser une quantité suffisante de N-acétylglucosamine doit probablement recourir à des apports exogènes.

4 - Les oligosaccharides du lait : Les oligosaccharides du lait sont classés en 3 familles (Fig. 3 ; p. 14) et sont rassemblés dans la revue générale de KOBATA (1977). Ils possèdent tous du lactose en position réductrice terminale. Ils sont neutres ou sialylés, azotés ou non. Les oligosaccharides non azotés n'ont aucune activité bifidigène, de même que les composés azotés et sialylés. L'élimination des résidus d'acide sialique régénère cette activité (GYORGY *et al.*, 1974). KUHN et KIRSCHENLOHR (1956) parviennent à synthétiser un composé très actif, il s'agit de la N-acétyllactosamine. Ceci explique que le lacto-N-néotétraose possède une activité supérieure à celle du lacto-N-tétraose (Fig. 3 ; p. 14). Les travaux récents de ROMOND *et al.* et de BEERENS *et al.*, en 1980, ont confirmé que seul le lait maternel frais permettait la croissance de *B. bifidum*, que le "gynolactose" était une source de facteurs bifidigènes et que la N-acétyllactosamine était bien le composé le plus actif (STRECKER G., communication personnelle, 1983). La N-acétyllactosamine n'existant pas à l'état libre dans le lait, il restait à démontrer que la bactérie était capable d'hydrolyser les oligosaccharides azotés neutres du lait maternel. MONTREUIL *et al.* (1983) montrent que le *B. bifidum* possède tout l'équipement enzymatique nécessaire pour obtenir le disaccharide.

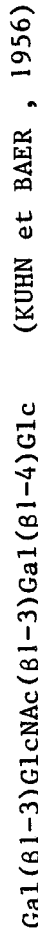
Oligosaccharide neutre non azoté

Lacto-fucotétraose

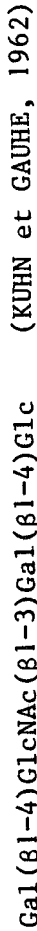


Oligosaccharides neutres azotés

Lacto-N-tétraose



Lacto-N-néo-tétraose



Oligosaccharide acide

Dialyl-lacto-N-tétraose



Figure 3 : Structures caractéristiques de quelques oligosaccharides libres du lait humain.

5 - Les glycoprotéines et glycopeptides du lait de Femme :

HIRANO *et al.* (1966) montrent que des glycopeptides isolés de colostrum humain (masse moléculaire comprise entre 1900 et 18000) présentent une activité bifidigène. En 1973, NICHOLS et BEZKOROVAINY isolent des glycoprotéines du colostrum humain (MM 30.000) possédant 22 % d'hexosamines. D'autres protéines sont isolées par la suite (NICHOLS et BEZKOROVAINY, 1974 ; BEZKOROVAINY et NICHOLS, 1976). Elles contiennent toutes de la N-acetylglucosamine et sont toutes actives. La caséine a également été étudiée. La caséine humaine n'est active qu'après digestion enzymatique (BEZKOROVAINY *et al.*, 1979). L'activité est retrouvée dans la fraction glucidique détachée par β -élimination (BERKOROVAINY et TOPAUZIAN, 1981 a,b), elle est proportionnelle à la teneur en hexosamine. Pour ces auteurs la caséine bovine ne présente pas d'activité. Ces résultats sont en accord avec ceux de FOURNET *et al.*, 1979 qui montrent que la copule glucidique de la caséine de Vache ne contient pas de N-acétyl-glucosamine.

6 - Autres composés doués d'activité bifidigène : D'autres composés sont bifidigènes :

- le facteur II de RAYNAUD : il s'agit d'une substance de nature peptidique qui prend naissance sous l'influence de protéases (RAYNAUD, 1959 ; RAYNAUD et BIZZINI, 1971).

- des dérivés de l'acide panthothénique (TAMURA *et al.*, 1972).

II - INHIBITION DE L'ADHERENCE BACTÉRIENNE

A - COMMENT LES BACTERIES ADHERENT AUX CELLULES ?

La plupart des infections naturelles débutent par l'attachement d'un agent pathogène : bactéries, virus ou parasites, aux muqueuses des voies respiratoires, digestives et urino-génitales (OFEK

et BEACHEY, 1980). Cet attachement protège l'envahisseur contre son expulsion par les mécanismes naturels de nettoyage : toux, éternuement, mouvements péristaltiques de l'intestin ou flux urinaire (OFEK et SHARON, 1983).

1 - L'adhérence : Il existe une relation étroite entre l'adhérence et la pathogénicité d'une bactérie. En 1975, SELLWOOD *et al.* montraient que lors d'une infection par une souche virulente d' *E. coli* (K88), des porcelets devenaient diarrhétiques. Les cellules épithéliales des porcelets résistants ne fixaient pas la bactérie *in vitro*. L'adhérence n'est pas le seul facteur de l'infection, il faut que l'agent pathogène puisse se multiplier, sécréter des toxines et envahir les tissus profonds de l'hôte (OFEK et SHARON, 1983).

2 - La reconnaissance spécifique : L'adhérence dans la plupart des cas met en jeu des adhésines présentes à la surface des bactéries, dans des appendices de type fibrilles, *pili* ou flagelles. (DUGUID et GILLIES, 1957) qui reconnaissent spécifiquement les glycoconjugués membranaires des tissus de l'hôte (OFEK *et al.*, 1977 ; SHARON *et al.*, 1981). Cette adhérence est inhibée par l'addition du monosaccharide reconnu (Fig. 4 ; p. 17). Il s'agit d'un mannose dans le cas de nombreuses Entérobactéries (ESHDAT *et al.*, 1978). Le fucose peut également intervenir dans l'adhérence de *Vibrio cholerae* (JONES et FRETER, 1976) et de *Shigella flexneri* 1b (IZHAR *et al.*, 1982). Dans ce dernier cas le système de reconnaissance est totalement différent. La bactérie ne possédant pas de *pili* est incapable de reconnaître la cellule hôte, par contre, cette dernière sécrète en présence de la bactérie une "lectine" emprisonnée dans le mucus capable de reconnaître la bactérie, de l'agglutiner et de l'éliminer. L'acide sialique intervient dans le cas des mycoplasmes (RAZIN, 1978). Les monosaccharides ne sont pas les seuls à intervenir dans la reconnaissance bactérie-hôte. L'acide lipotéichoïque produit par les Streptocoques est responsable de la fixation de ces organismes aux cellules épithéliales (BEACHEY et SIMPSON, 1982). Le récepteur cellulaire qui fixe l'acide gras, consti-

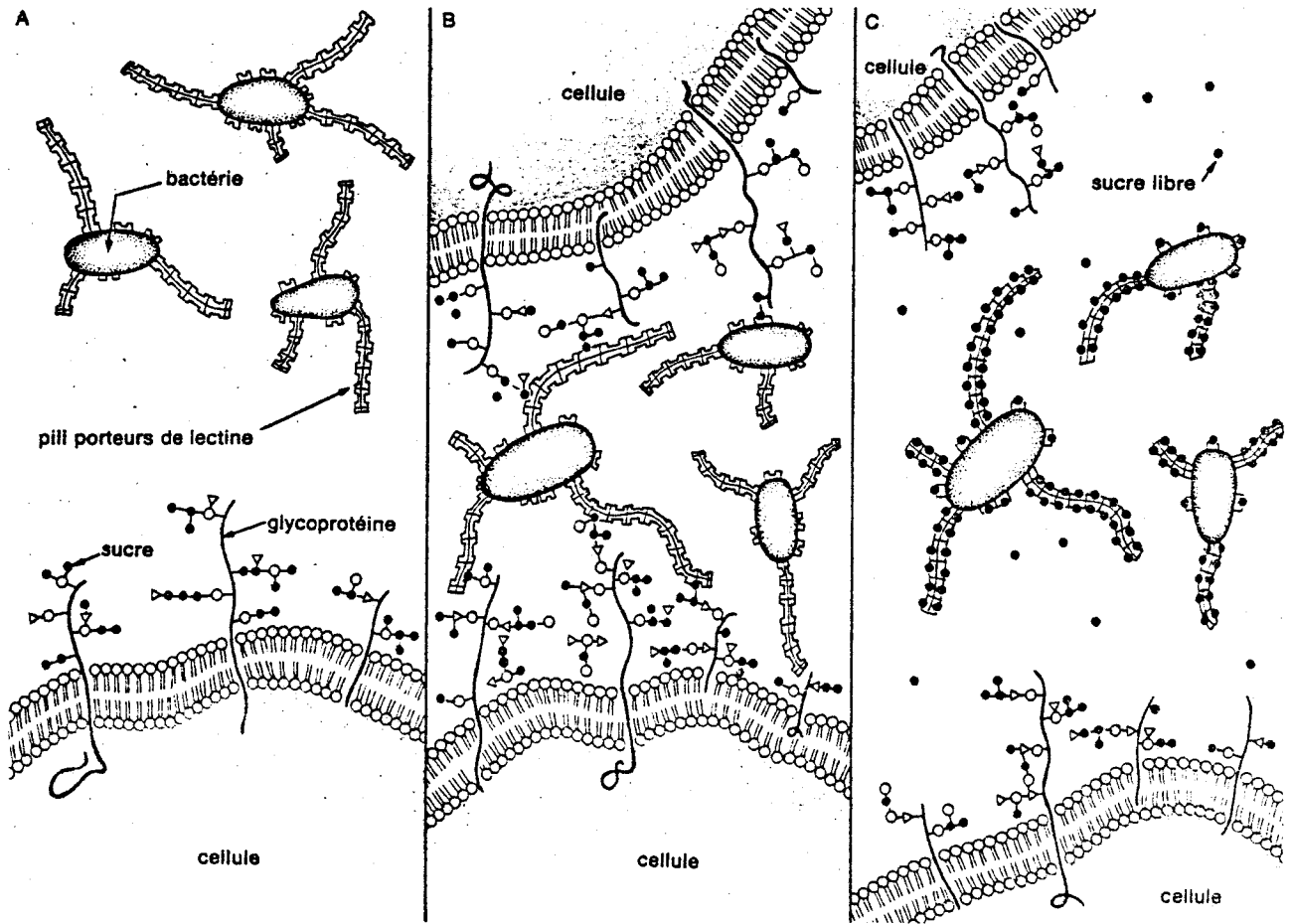


Figure 4 : L'adhérence bactérienne (OFEK et SHARON, 1983)

A : La bactérie, ici *E. coli*, porte en surface des pili porteurs de lectines, agents de la fixation du micro-organisme aux récepteurs de la cellule hôte. Ces récepteurs sont des unités glucidiques (de type oligomannosidique) liées aux glycoprotéines membranaires.

B : La reconnaissance par les lectines bactériennes des unités de mannose provoque l'adhérence et l'infection.

C : La présence de mannose libre dans le milieu entraîne la saturation des sites de reconnaissance de la lectine bactérienne et empêche le phénomène d'adhérence.

tuant de l'acide lipotéichoïque agent de l'adhérence, appartient à la famille des fibronectines qui sont des protéines adhésives présentes à la surface de la plupart des cellules et en particulier des cellules épithéliales (BEACHEY et SIMPSON, 1982). L'adhérence bactérienne inhibée *in vitro* par des sucres a été récemment étudiée *in vivo* (ARONSON *et al.*, 1979 ; FADER et DAVIS, 1980 ; ANDRADE, 1980) et semble donner des résultats très prometteurs.

B - COMMENT PREVENIR L'ADHERENCE BACTERIENNE ?

La bactérie, avant de rencontrer la cellule épithéliale, est d'abord en contact avec le mucus et les immunoglobulines de sécrétion qui tapissent le tractus gastro-intestinal et entravent sa pénétration.

1 - Les constituants du mucus : Le mucus est un gel hydraté qui tapisse les épithelia des tractus gastro-intestinal, respiratoire et génito-urinaire. Il est composé de glycoprotéines de masse moléculaire élevée ou mucine, d'eau, d'électrolytes, d'enzymes, d'hormones et d'anticorps. Les mucines contiennent 50 à 80 % de glycannes uniquement liés O-glycosidiquement aux résidus de sérine et de thréonine. Elles sont synthétisées par les cellules caliciformes et empêchent la pénétration de corps étrangers (HOLLANDER, 1954 ; FLOREY, 1955). Elles lubrifient et imperméabilisent les muqueuses, les protègent contre les changements de pression osmotique, contre les agents corrosifs tels que l'acide chlorhydrique, la pepsine et les sels biliaires (ALLEN et GARNER, 1980). Elles empêchent ou retardent l'adhésion des bactéries (BERTSCHINGER *et al.*, 1972 ; GIBBONS *et al.*, 1976) quoique parfois les bactéries sécrètent des glycosidases ou des protéases capables d'attaquer la couche de mucines. Les bactéries commensales ne seraient quant à elles jamais en contact avec la surface épithéliale mais resteraient emprisonnées dans la couche de mucines (PLAUT *et al.*, 1967 ; SAVAGE *et al.*, 1968). Les mucines empêchent également la pénétration des toxines, notamment celle du choléra (STROMBECK et HARROLD, 1974 ; GUENTZEL *et al.*,

1977). Elles peuvent prévenir l'attaque de certains virus comme le virus de l'influenza (DI GIROLAMO *et al.*, 1977) et permettre l'élimination de parasites (MILLER et NAWA, 1979 ; LEE et OGILVIE, 1982). Les mucines peuvent aussi servir de facteur de croissance. Il a été montré que dans le colon les bactéries anaérobies étaient capables pour croître d'utiliser les mucines (HOSKINS et BOULDING, 1976a ; 1976b ; SAVAGE, 1978). Elles peuvent interagir avec d'autres composés et notamment les anticorps (HAVEZ *et al.*, 1970 ; 1973). WALKER et ISSELBACHER en 1977 ont montré que les IgA de sécrétion pouvaient être liées de manière covalente à la mucine. En effet, après le transport de la *lamina propria* à la surface intestinale les anticorps sont retenus dans le mucus à la surface des cellules épithéliales par des interactions covalentes avec les résidus de cystéine contenus dans les mucines présentes dans le glycocalyx. Cette adhérence des anticorps est pressentie lors d'expérience de perfusions intestinales. L'activité anticorps est réduite seulement lorsque les lavages sont réalisés en présence de dithiotreitol (WALKER et ISSELBACHER, 1974).

2 - Les immunoglobulines de sécrétion : Les IgA de sécrétion, glycoprotéines formées d'un dimère d'IgA joint par une pièce de jonction et insérant une pièce de sécrétion sont connues pour limiter l'adsorption des bactéries, des virus et des antigènes solubles aux muqueuses (WILLIAMS et GIBBONS, 1972 ; HEREMANS, 1974 ; FRETER, 1974). En 1972, WILLIAMS et GIBBONS examinant les propriétés adhérentes de Streptocoques (*Streptococcus salivarius*) ont observé une réelle diminution du nombre des bactéries adhérentes aux cellules épithéliales parotidiennes après exposition de cette bactérie à des anticorps sIgA spécifiques. Ils concluent que les anticorps bloquent les sites de fixation spécifiques de la paroi bactérienne et interfèrent avec le phénomène d'adhésion donc avec la colonisation des tissus.

En 1976, LAMM montre que les sIgA empêchent l'adhésion de *Vibrio cholerae* aux cellules intestinales. Douze heures après avoir reçu du lait de leur mère préalablement immunisée contre *E. coli* 0149 K88, des Marcassins sont infectés oralement par la même souche bacté-

rienne (NAGY *et al.*, 1976). L'étude de sections intestinales de ces animaux montre que les bactéries n'ont pas adhéré aux tissus. L'adhérence de nombreuses autres bactéries est inhibée en présence d'anticorps IgA du lait ou du colostrum (SVANBORG-EDEN et SVENNERHOLM, 1978 ; LILJEMARK *et al.*, 1979 ; TRAMONT, 1977).

Les sIgA peuvent réduire la phagocytose, l'hydrophobicité de surface et la charge de bactéries comme *Salmonella typhimurium* (MAGNUSSON *et al.*, 1979). La liaison des IgAs à la surface bactérienne entraîne l'hydrophilie, l'anti-adhésivité et sert à exclure l'antigène de la muqueuse (MAGNUSSON et STJERNSTROM, 1982). L'action des sIgA est surtout mécanique. Les sIgA se comportent en anticorps agglutinant et le fait de posséder quatre fragments Fab par dimère accroît probablement ce pouvoir d'agglutination (MICHEL *et al.*, 1977). La formation de complexes antigène-anticorps non absorbables et éliminés avec le mucus joue probablement un rôle important dans les mécanismes de défense immunitaire (LAMM, 1976).

Les états pathologiques associés à l'absence d'IgA sécrétoire (AMMANN et HONG, 1971) témoignent de leur importance. Cependant le déficit isolé en sIgA n'est pas constamment associé à des manifestations pathologiques, ce qui prouve l'intervention d'autres facteurs de défense immunitaire parmi lesquels nous pouvons citer les IgM sécrétoires pentamériques. En effet, en cas de déficience sélective en sIgA, les cellules productrices d'IgA sont quantitativement remplacées par des cellules productrices d'IgM (CRABBE et HEREMANS, 1966 ; EIDELMAN et DAVIS, 1968 ; HEREMANS et CRABBE, 1967 ; SAVILAHTI, 1973). Il apparaît ensuite une quantité appréciable d'IgM dans les sécrétions (BRANDTZAEG, 1971a ; BRANDTZAEG *et al.*, 1968 ; HEREMANS et CRABBE, 1967 ; SAVILAHTI, 1973).

3 - Les glycoconjugués et les oligosaccharides du lait de Femme : Des premiers résultats ont souligné l'importance des groupements glycaniques des glycoprotéines du lait de Femme. En effet, les glycopeptides fucosylés et non sialylés (Fig. 5 ; p. 22) isolés

de la lactotransferrine humaine inhibent l'adhésion de *Shigella flexneri* 1b au mucus intestinal du Cobaye (IZHAR *et al.*, 1982). Il semble que le monosaccharide impliqué soit le fucose.

III - INHIBITION DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE

Le lait maternel contient de nombreux facteurs solubles capables d'interférer sur la croissance bactérienne et d'entraîner dans certains cas la mort du microorganisme. Les principaux éléments de cette lutte anti-bactérienne sont : la lactotransferrine, le lysozyme, le système lactoperoxydasique.

A - ACTION BACTERIOSTATIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE DES MILIEUX BIOLOGIQUES

Isolée simultanément par MONTREUIL *et al.* (1960b) et JOHANSSON (1960), la lactotransferrine est présente dans le lait humain à un taux variant de 1 à 2 g/l.

1 - Caractères généraux : La lactotransferrine est une glycoprotéine monocaténaire de masse moléculaire 80.000 ± 5.000 . Elle est capable de fixer réversiblement deux ions ferriques en prenant une coloration rose saumon possédant un maximum d'absorption à 460 nm. Sa séquence peptidique est en cours d'achèvement (MAZURIER *et SPIK*, 1974 ; MAZURIER *et al.*, 1974 ; JOLLES *et al.*, 1976 ; METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1980 ; 1981). Elle est composée de 2 domaines : le domaine Nt fixant l'ion ferrique sur un site acido-labile, le domaine Ct fixant le deuxième ion ferrique sur un site acido-stable (MAZURIER, 1980). Elle possède 2 glycannes répartis sur chaque domaine et liés à la protéine par une liaison de type N(β aspartyl)-N-acétylglucosamine (SPIK *et al.* 1982b). (Fig. 5 ; p. 22).

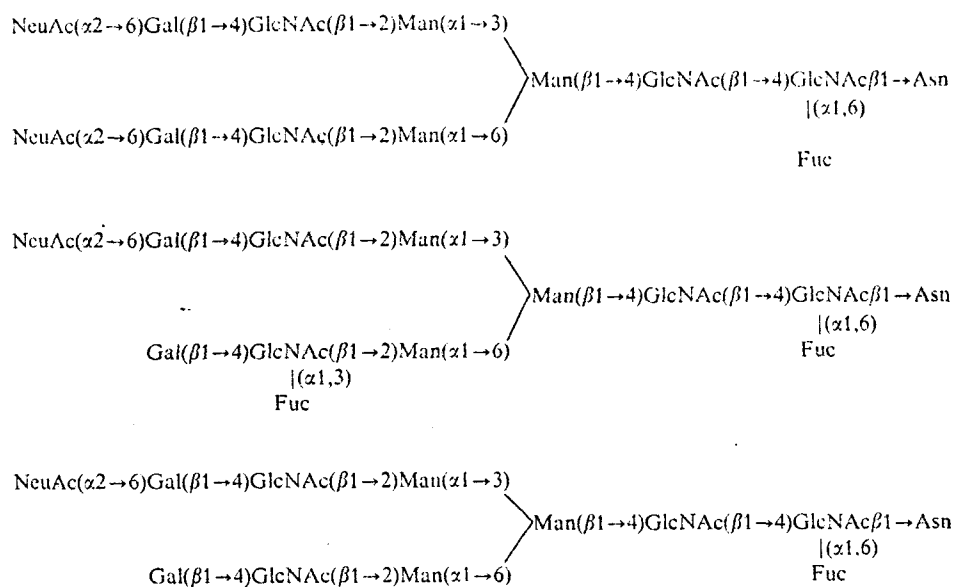


Figure 5 : Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine (SPIK et al., 1982b).



2 - Localisation : La lactotransferrine est largement répartie dans l'organisme. Elle est présente dans de nombreux liquides et milieux biologiques (MASSON, 1970) et principalement dans les liquides et milieux d'excrétion dont le lait (MONTREUIL *et al.*, 1960b), les larmes (BROEKHUYSE, 1974) et la salive (MASSON, 1970). Elle connaît également une localisation cellulaire (MASSON *et al.*, 1969) en particulier dans les granules secondaires spécifiques des leucocytes polymorphonucléaires. Elle existe à l'état de traces dans les monocytes (BENNETT et KOKOCINSKI, 1978).

SPIK *et al.* (1982a) montrent que la lactotransferrine partiellement hydrolysée est retrouvée dans les selles de nourrissons alimentés au lait maternel. La coprolactotransferrine a gardé sa propriété de fixer le fer, et vraisemblablement son activité bactériostatique.

3 - Rôle : Longtemps cette glycoprotéine fut considérée comme la source de fer la plus importante pour le nourrisson. Elle intervient non seulement dans l'apport du fer mais également dans la lutte contre l'infection. Son rôle protecteur au niveau de muqueuses a fait l'objet de nombreuses revues générales dont la plus récente est celle de SPIK et MONTREUIL (1983).

Depuis les travaux de SCHADE et CAROLINE (1944), l'activité bactériostatique des transferrines est bien établie. Comme l'addition de fer libre (WEINBERG, 1966) à de la lactotransferrine diminue son activité anti-microbienne, nous pouvons souligner l'importance du degré de saturation en fer. Les transferrines dans l'organisme ne sont que partiellement saturées en fer (WINTROBE, 1967). La lactotransferrine est bactériostatique, c'est-à-dire qu'elle inhibe la croissance de la bactérie sans "tuer" cette dernière. Cette inhibition de croissance réside en un mécanisme de ferriprivation (FEENEY, 1951 ; SCHADE et CAROLINE, 1944) qui serait en fait influencé par la présence de chélateurs bactériens (MILES et KHIMJI, 1975 ; NEILANDS, 1980). La compétition pour le fer entre l'entérochiline (sidérophore produit

par *E. coli*) et la sérotransferrine a été bien étudiée (CARRANO et RAYMOND, 1979) contrairement à celle de l'entérochiline et de la lactotransferrine. Un complexe entérochiline-lactotransferrine a cependant été mis en évidence (SPIK et MONTREUIL, 1983). Cette interaction dépend du taux de saturation en fer (POLLACK *et al.*, 1976), du pH du milieu (BULLEN *et al.*, 1957), du rapport molaire entre transferrines et sidérophores, de la présence d'ions citrates ou bicarbonates (REITER *et al.*, 1975). Si l'activité bactériostatique de la lactotransferrine native est annulée par addition de fer, il semble que celle de l'apotransferrine ne le soit pas (ARNOLD *et al.*, 1982). La lutte contre l'agresseur pourrait se résumer par une compétition entre les chélateurs du fer de l'hôte et ceux des parasites. En réalité, l'hôte infecté peut mettre en jeu différents mécanismes pour limiter la disponibilité du fer indispensable à la croissance des microorganismes (Tableau II ; p. 25).

B - ACTION LYTIQUE DU LYSOZYME

Le lysozyme a été découvert pour la première fois en 1909 dans le blanc d'oeuf de Poule par LASHCHENKO puis redécouvert en 1922 par FLEMING dans le mucus nasal. C'est une mucopeptide N-acétyl-muramoylhydrolase.

1 - Caractères généraux : Le lysozyme humain est une protéine basique de masse moléculaire 15.000, thermostable à 100°C et à pH acide, et plus actif que le lysozyme du blanc d'oeuf de Poule. Sa thermostabilité est due à sa teneur en cystine (JOLLES *et al.*, 1966). C'est la seule protéine lactée dont la concentration augmente en cours de lactation (GOLDMAN *et al.*, 1982). Au 5ème mois de lactation son taux varie entre 300 à 400 mg/l (CHANDAN *et al.*, 1964 ; Mc CLELLAND *et al.*, 1978). D'après GOLDMAN *et al.* (1982) le taux de lysozyme est maintenu la première année de la lactation et peut-être même la seconde année. Cristallisé en 1939 par ABRAHAM et ROBINSON le lysozyme du blanc d'oeuf de Poule a été entièrement séquencé (JOLLES *et al.*, 1963 ; CANFIELD, 1963).

TABLEAU II

MECANISMES MIS EN OEUVRE PAR L'HOTE POUR DIMINUER LA
DISPONIBILITE DU FER INDISPENSABLE A LA CROISSANCE
DES MICRO-ORGANISMES PARASITES D'APRES WEINBERG (1974)

- 1 - AUGMENTATION DE L'EXCRETION DU FER
- 2 - BAISSSE DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER
- 3 - DIMINUTION DU FER PLASMATIQUE ET AUGMEN-
TATION DU FER DE RESERVE
- 4 - PRESENCE DES PROTEINES DE TRANSPORT DU
FER AU NIVEAU DE L'AGRESSION
- 5 - AUGMENTATION DE LA SYNTHESE DES PROTEINES
DE TRANSPORT DU FER
- 6 - INHIBITION DE LA SYNTHESE DES SIDEROPHORES
BACTERIENS



Il semble qu'il existe de nombreuses homologues structurales entre les lysozymes de différentes origines (JOLLES *et al.*, 1963 ; HERMANN et JOLLES, 1970 ; JOLLES et JOLLES, 1971 ; JOLLES et JOLLES, 1972).

2 - Localisation : Chez l'homme, le lysozyme est trouvé dans toutes les sécrétions, dans le sang, dans certaines cellules : monocytes, macrophages, cellules de PANETH (SYREN et RAESTE, 1971 ; KLOCKARS et OSSERMAN, 1974). Le lysozyme est retrouvé dans les selles de nourrisson (ROSENTHAL et LIBERMAN, 1931 ; BRAUN, 1958 ; GOLDBACH *et al.*, 1964 ; GRIFFITH et HUMPHREYS, 1978 ; LODINOVA et JOUJA, 1977 ; ISAACSON, 1982), il n'est pas dégradé au cours du transit intestinal. Après 3 jours de lactation, il est retrouvé intact et fonctionnel dans les selles (HANEBERG et FINNE, 1974).

3 - Rôle : Le lysozyme est une glycosidase capable d'hydrolyser la muréine, principal constituant des parois bactériennes. Il s'attaque à la paroi des bactéries Gram (+) et à la membrane la plus interne des bactéries Gram (-). Cependant le lysozyme humain ne lyse pas les bactéries lactiques (VAKIL *et al.*, 1969).

En cas d'inflammation le taux de lysozyme augmente. Cela est dû à la migration des leucocytes (MEYER *et al.*, 1948). Les leucocytes relarguent l'enzyme dans le fluide intestinal qui passe ensuite dans les selles. Des biopsies de patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse montrent une augmentation de la concentration en lysozyme (KRAWCZUK *et al.*, 1978 ; FALCHUK *et al.*, 1975). Cette augmentation du taux de lysozyme ne serait pas entièrement due à l'infiltration des leucocytes. En effet, il y aurait une synthèse *de novo* de lysozyme (Mc CLELLAND et van FURTH, 1975). Dans la muqueuse intestinale de Souris une partie du lysozyme proviendrait des cellules de Paneth (HYSLOP *et al.*, 1974 ; ISAACSON, 1982 ; DECKX *et al.*, 1967 ; PEETERS et VANTRAPPA, 1975). Le lysozyme intervient sur la flore intestinale pathogène en lysant les parois bactériennes. La libération des glycanes de ces parois pourrait servir de facteurs de croissance à la flore bifide (REITER, 1981). Ainsi le lysozyme pourrait

jouer un rôle actif dans la défense contre l'infection en intervenant sur l'équilibre des différentes espèces bactériennes.

En plus de son rôle anti-bactérien le lysozyme pourrait avoir un rôle immunomodulateur (JOLLES, 1976). LODINOVA et JOUJA (1977) montrent que le taux des sIgA retrouvées dans les selles d'enfants nourris par un lait complétement en lysozyme est augmenté alors que le taux des anticorps sériques reste inchangé. Ils suggèrent que l'activité du lysozyme sur les parois bactériennes peut stimuler la réponse immune locale. NAMBA *et al.* (1981) montrent que le lysozyme peut accroître le taux d'anticorps dans le sérum. Des Cobayes dont la nourriture contient du lysozyme voient leur réponse immune primaire à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B augmentée. Le taux des anticorps circulants est plus élevé dans le groupe des animaux ainsi traités. L'immunité cellulaire est également augmentée de manière significative. Ces auteurs confirment l'hypothèse de JOLLES (1976) et suggèrent que l'action du lysozyme sécrété naturellement dans l'intestin peut être augmentée par l'ingestion de lysozyme additionnel.

Finalement le lysozyme humain, en agissant sur les leucocytes, augmenterait leur activité protectrice. Il stimulerait la phagocytose des cellules de levure en l'absence de facteurs sériques. Il n'aurait pas de pouvoir opsonisant (KLOCKERS et ROBERTS, 1976).

C - ACTION BACTERICIDE DU SYSTEME LACTOPEROXYDASIQUE

Le système lactoperoxydasique a une activité bactéricide qui a été décrite pour la première fois en 1894 par HESSE. La bactéricidie est détruite par chauffage du lait à 100°C. Le système lactoperoxydasique est constitué en fait de 3 composés : la lactoperoxydase (WRIGHT et TRAMER, 1957), l'eau oxygénée (JAGO et MORRISSON, 1962) et le thiocyanate (REITER et MOLLER-MADSEN, 1963 ; REITER *et al.*,

1963 ; REITER *et al.*, 1964). De nombreuses revues générales traitent de ce sujet (REITER et ORAM, 1967 ; REITER, 1976 ; 1978 ; 1979 ; 1981).

1 - Caractères généraux :

La lactoperoxydase : Le taux de lactoperoxydase est élevé dans le lait de Vache, il est de l'ordre de 30 mg/ml (POLIS et SHMUKLER, 1953). Il est vingt fois moindre dans le lait humain. La lactoperoxydase est formée d'une seule chaîne polypeptidique de masse moléculaire comprise entre 77.000 et 100.000.

Le thiocyanate est un métabolite endogène produit lors de la réaction de détoxification entre le thiosulfate et les cyanates. Il peut provenir de l'ingestion de l'anion même, de ses esters ou d'autres précurseurs comme les nitrites, les isothiocyanates et les cyanates.

Le peroxyde d'oxygène est absent du lait. KORHONEN (1981) a montré qu'il provient des leucocytes qui, en phagocytant les micelles de caséine en produisent de grandes quantités (RUSSEL et REITER, 1975 ; RUSSEL *et al.*, 1977). *In vivo*, les bactéries lactiques sont source d' H_2O_2 (REITER *et al.*, 1980).

2 - Localisation :

La lactoperoxydase se trouve dans le lait (MORRISSON *et al.*, 1957 ; MORRISSON *et al.*, 1961) mais aussi dans la salive, les larmes, le mucus gastro-intestinal, cervical et dans certaines cellules leucocytaires : les éosinophiles. Elle est retrouvée dans les selles et semble donc résister au bas pH et à la digestion (GOTHEFORS et MARKLUND, 1975 ; REITER *et al.*, 1980).

L'anion thiocyanate SCN⁻ est présent de façon permanente dans tous les tissus animaux et les sécrétions (AUNE et THOMAS, 1977 ; BALLANTYNE, 1977 ; RUDEL *et al.*, 1977) dans les fluides synovial et cérébrospinal et dans les lymphocytes.

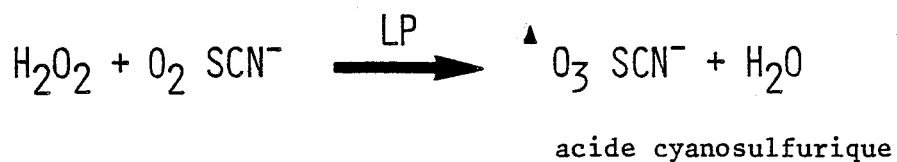
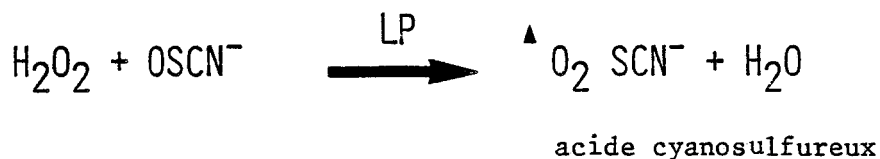
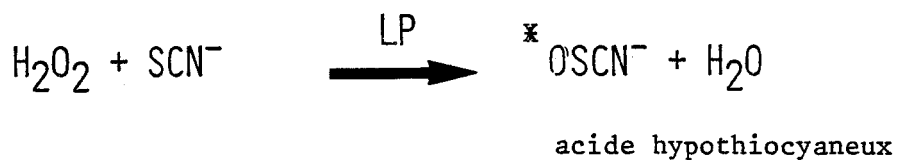
3 - Rôle :

Mode d'action : L'interaction de ces trois composés (Tableau III ; p. 30), a été décrite par THOMAS (1983). La lactoperoxydase en présence d' H_2O_2 oxyde le thiocyanate. Les métabolites possèdent des activités antibactériennes. Le premier produit formé est l'acide hypothiocyaneux, dont l'action est bactériostatique vis-à-vis des bactéries. Les métabolites très fortement oxydés comme l'acide cyanosulfureux et cyano-sulfurique sont bactéricides (HOGG et JAGO, 1970 ; HOOGENDORN *et al.*, 1977 ; BJORCK *et al.*, 1979 ; AUNE et THOMAS, 1977 ; PRUITT et TENOVUO, 1982 ; ORAM et REITER, 1966a et b ; BJORCK et CLAEISSON, 1980). Les produits finals de l'oxydation : CO_2 , NH_4^+ , $SO_4^{=}$ n'ont aucun effet sur les bactéries (ORAM et REITER, 1965).

Activité anti-bactérienne : En 1958, WRIGHT et TRAMER montrent que des Streptocoques croissent très difficilement en présence de lactoperoxydase sous des conditions d'aérobiose. L'anaérobiose ou l'introduction d'agents de réduction renversent cette inhibition. En effet les bactéries lactiques qui sont catalase négatives, métabolisent suffisamment d' H_2O_2 sous des conditions d'aérobiose pour être inhibées en présence de lactoperoxydase et de thiocyanate (HOGG et JAGO, 1970 ; HOOGENDORN, *et al.*, 1977 ; MICKELSON, 1966 ; MICKELSON, 1977 ; ORAM et REITER, 1966a et b ; REITER *et al.*, 1963 ; REITER *et al.*, 1964). Les organismes catalase-positifs comme les Pseudomonas, les Coliformes, les Salmonelles, les Shigelles nécessitent un apport exogène de H_2O_2 (BJORCK *et al.*, 1975 ; REITER *et al.*, 1973-1974 ; REITER, 1976 ; REITER, 1978) pour activer le système lactoperoxydasique. C'est le système glucose oxydase/glucose qui fournit l'eau oxygénée dans ce cas. Les organismes Gram (+) comme les bactéries lactiques sont temporairement inhibées, tandis que des bactéries Gram (-) sont tuées (REITER, 1976 ; REITER, 1978 ; REITER, 1981). Leur croissance, leur production d'acide lactique et les enzymes de la glycolyse sont affectés, ainsi que la paroi interne, dont les dommages se traduisent par une fuite des ions potassium, des acides aminés, des monosaccharides et éventuellement par une lyse (MARSHALL et REITER, 1976 ; 1980). Il existe cependant de nombreuses souches bactériennes résistantes, elles possèdent un facteur qui permet d'inverser

TABLEAU III

OXYDATION DU THIOCYANATE PAR LE SYSTEME LACTOPEROXYDASIQUE (LP)
(THOMAS, 1983)



* Effet bactériostatique :



▲ Effet bactéricide

Produits finals de l'oxydation :

CO_2
 NH_4^+
 SO_4



l'inhibition de la glycolyse (ORAM et REITER, 1966a). Le système lactoperoxydasique, de plus, semble empêcher les bactéries d'adhérer aux muqueuses. SELLWOOD *et al.* (1975) montrèrent que des *E. coli* entéropathogènes du Porc, n'étaient plus capables d'adhérer aux cellules épithéliales après traitement par la lactoperoxydase. Ce phénomène n'a cependant pas été vérifié *in vivo*.

D - ACTION DES AUTRES FACTEURS MOLECULAIRES

1 - Le complément : Les composants C_3 et C_4 du complément existent dans le lait humain (ANDRE *et al.*, 1964) mais en moins grande concentration que dans le sérum. Un C_3 proactivateur a été décrit (GOTZE et MÜLLER-EBERHARD, 1971), il est stimulé par les IgA et par les IgE (ISHIZAKA *et al.*, 1972). Le C_3 dans le lait humain pourrait avoir une activité importante, il est connu pour ses propriétés opsonisante, anaphylactique et chimiotactique, mais son activité dans la défense de l'intestin du nourrisson n'a jamais été mise en évidence.

2 - Les lipides : GYORGY *et al.* en 1962 observent que le lait humain a un effet thérapeutique sur les infections à Staphylocoques chez de jeunes Souris. Il démontrent la présence dans le lait d'un facteur thermostable antistaphylococcique. Ce facteur semble être un acide gras en $C_{18:2}$, différent de l'acide linoléique. En outre, la couche lipidique ou "crème" de lait humain a une activité anti-virale contre plusieurs souches : Alphavirus, des Flavivirus et le virus de l'Herpès (SABIN et FIELDSTEEL, 1962). Des études récentes ont montré que les lipides du lait réduisaient l'infection *in vivo* (FIELDSTEEL, 1974) et *in vitro* (WELSH *et al.*, 1978; FALKLER *et al.*, 1975) des Flavivirus et des Alphavirus entourés d'une couche lipidique. D'autres virus ont également été inactivés après traitement avec de la "crème" de lait humain (FIELDSTEEL, 1974 ; SARKAR *et al.*, 1973). Une étude des composants lipidiques de la "crème" montre qu'il s'agit surtout d'acides gras insaturés et de monoglycérides responsables de cet effet non spécifique (WELSH *et al.*, 1978). En 1982, OTNAESS et SVENNERHOLM met-

tent en évidence dans le lait humain une fraction de masse moléculaire élevée ne contenant pas d'immunoglobulines et capable d'inhiber chez le Lapin la toxine du choléra et celle thermolabile d'*E. coli* de structure très voisine (SACK, 1975). Le composé inconnu jusqu'à présent, serait de nature lipidique (OTNAESS et ØRSTAVIK, 1981).

3 - Autres substances inhibitrices : La properdine, la conglutine et des protéines basiques comme l'ubiquinine peuvent intervenir dans le colostrum et le lait, mais leur activité n'a pas encore été bien définie, (REITER, 1976). Des protéines couplant la vitamine B₁₂ et l'acide folique auraient une activité bactériostatique analogue à celle de la lactotransferrine (FORD *et al.*, 1975). En effet le couplage aux protéines empêche l'utilisation de ces vitamines par la bactérie. L'interféron libre a été détecté dans le lait humain, il est synthétisé vraisemblablement par les lymphocytes du lait (LAWTON et SHORTRIDGE, 1977). Il reste cependant à savoir si l'interféron peut jouer un rôle protecteur au niveau du tractus intestinal du nourrisson. Une fraction macromoléculaire non lipidique et non immunologique posséderait une activité anti-virale contre le virus de la Stomatite vésiculaire (MATTHEWS *et al.*, 1976) et contre le Rotavirus (OTNAESS et ØRSTAVIK, 1980).

IV - PROTECTION DES MUQUEUSES PAR LES sIgA

Le rôle protecteur des sIgA a fait l'objet de nombreuses revues générales (WELSH et MAY, 1979 ; MESTECKY *et al.*, 1980a ; HANSON *et al.*, 1980 ; BIENENSTOCK et BEFUS, 1980 ; Mc NABB et TOMASI, 1981).

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.

Les propriétés bien établies des sIgA consistent en :

- la limitation de l'adsorption des bactéries aux muqueuses (chapitre I, paragraphe II, p. 19)
- l'agglutination des virus
- la neutralisation des bactéries
- l'inhibition de l'absorption digestive des antigènes
- l'activation du complément par la voie alterne.

A - ACTIVITE ANTICORPS

1 - La neutralisation des virus : Le lait humain et le colostrum humain contiennent de nombreux anticorps dirigés contre les virus (Tableau IV ; p. 34). Le virus le plus étudié fut le Poliovirus car la vaccination est faite par administration orale et le lait humain chez des enfants nourris au sein pouvait interférer avec la séroconversion en empêchant le virus de pénétrer les muqueuses (TOMASI, 1972). Cette étude a fait l'objet de nombreuses controverses. Il a été suggéré chez les nourrissons de suspendre l'alimentation naturelle 4 à 6 h avant et après l'administration du vaccin (PLOTKIN et KATZ, 1974). Cependant, des études ultérieures ont montré que l'administration de lait maternel chez des enfants âgés de 6 semaines n'interférait pas avec la séroconversion (JOHN *et al.*, 1976). Puisqu'il n'y a pas de chimiothérapie antivirale significative, la présence d'anticorps anti-virus dans le lait maternel apporte au nourrisson une sécurité vis-à-vis de ces organismes (WELSH et MAY, 1979).

2 - L'agglutination des bactéries : L'agglutination des bactéries consiste à former des complexes stables non absorbables qui sont facilement éliminés. L'agglutination est complémentaire du rôle des sIgA dans la limitation de l'absorption des bactéries aux muqueuses (p. 19). STOLIAR *et al.* (1976) montrent que le colostrum des Femmes

TABLEAU IV

ANTICORPS PRESENTS DANS LE COLOSTRUM OU
DANS LE LAIT HUMAIN DIRIGES CONTRE LES VIRUS

Anticorps	Références
Coxsackie A ₉ , B ₃ , B ₅	DEBRE <i>et al.</i> 1930
	MICHAELS 1965
Flavivirus Poliovirus	FALKLER <i>et al.</i> 1975
	SABIN 1950
	LEPOW <i>et al.</i> 1961
	WARREN <i>et al.</i> 1961
	SABIN <i>et</i> FIELDSTEEL 1962
	GONZAGA <i>et al.</i> 1963
	HODES <i>et al.</i> 1962
	MICHAELS 1965
	KENNY <i>et al.</i> 1967
	MATA <i>et</i> WYATT 1971
Rotavirus	SCHOUB <i>et al.</i> 1977
	YOLKEN <i>et al.</i> 1978
	SIMHON <i>et al.</i> 1979
	OTNAESS <i>et</i> ØRSTAVIK 1980
	MAASS <i>et</i> BARCKHAUS 1980
Alphavirus	WELSH <i>et al.</i> 1978
Cytomegalovirus	PINKU <i>et al.</i> 1982
Hepatite B	NAMBA <i>et al.</i> 1981
Virus syncytial	LAMPRECHT <i>et al.</i> 1976
	DOWNHAM <i>et al.</i> 1976
ECHO virus 6 <i>et</i> 9	MICHAELS 1965

BUS
LILLE

du Guatemala inhibe chez le Lapin l'action pathogène de *V. cholerae* et de *E. coli*. Cette activité inhibitrice est supportée par les sIgA. ROWLAND *et al.* (1980) remarquent qu'en Gambie, les enfants nourris avec un lait maternel très hautement bactériostatique étaient mieux protégés contre les infections diarrhéiques que les enfants recevant du lait faiblement actif. Ceci est en corrélation avec le titre anticorps des sIgA dans ces mêmes laits (DOLBY *et al.*, 1980). Les IgA de sécrétion sont agglutinantes vis-à-vis de nombreuses bactéries pathogènes (Tableau V ; p. 36), de leurs toxines (Tableau VI ; p. 37).

L'action des sIgA reste effective après passage dans l'estomac. Des copro-anticorps (DAVIES, 1922 ; BURROWS *et al.*, 1947) sont présents dans les selles de patients atteints d'entérite. Les copro-anticorps sont toujours capables d'agglutiner les bactéries et de neutraliser les virus chez l'Homme et chez les animaux. Les études de KENNY *et al.* (1967) montrent que les IgA de sécrétion sont plus résistantes que les IgA sériques à la digestion.

En effet, ces copro-anticorps sont toujours capables de protéger lors d'infection par *Vibrio cholerae* (FRETER, 1964 ; FRETER, 1970 ; FRETER *et al.*, 1965 ; FUBARA et FRETER, 1972 ; PIERCE *et al.*, 1978). Ils ne réduisent pas le nombre de micro-organismes dans la lumière intestinale, mais réduisent le nombre de bactéries adhérees aux microvillosités intestinales (FRETER, 1970 ; FRETER et GANGAROSA, 1963 ; FUBARA et FRETER, 1973). STEELE *et al.* (1974) montrent que l'administration orale de *Vibrio cholerae* préalablement en contact avec des anticorps : sIgA, IgM et IgG à des Souriceaux les protège de l'action létale du micro-organisme ; les sIgA étant les plus efficaces dans la protection.

3 - La neutralisation des parasites : récemment les sIgA ont été impliquées dans la défense anti-parasitaire des muqueuses. Elles agissent contre un protozoaire qui infeste le Poulet (DAVIS *et al.*, 1978). Le lait d'une Souris immunisée contre *Giardia muris* protège les Souriceaux de l'infection (ANDREWS et HEWLETT, 1981). Les sIgA sont impliquées

TABLEAU V

ANTICORPS PRESENTS DANS LE COLOSTRUM OU
DANS LE LAIT HUMAIN DIRIGES CONTRE LES BACTERIES

Anticorps	Références
Bacille de Koch	ADAMS <i>et al.</i> 1947
Diplococcus pneumoniae	MOUTON <i>et al.</i> 1970
Staphylococcus aureus	ESPERSEN <i>et SCHIØTZ</i> 1981
Bacille diphtérique	LEMETAYER <i>et al.</i> 1950
Bacille typhique	TIMMERMAN 1931
	SCHUBERT <i>et GRUNBERG</i> 1949
Bacille méningococcique	POKROVSKII <i>et al.</i> 1978
Hemophilis influenzae	PICHICHERO <i>et al.</i> 1980
Vibrio cholerae	HOLMGREN <i>et al.</i> 1976
	SVENNERHOLM <i>et al.</i> 1978
Colibacille	ARNON <i>et al.</i> 1959
	KENNY <i>et al.</i> 1967
Shigella dysenteriae 2	WYATT <i>et al.</i> 1972
Shigella flexneri 1a,6	MATA <i>et al.</i> 1971
Escherichia coli	GOTHEFORS <i>et al.</i> 1976
Escherichia coli 06,0119	DOLBY <i>et al.</i> 1980
	ROWLAND <i>et al.</i> 1980
Escherichia coli 0127	MICHAEL <i>et al.</i> 1971
O et K antigènes des Enterobacteriaceae	AHLSTEDT <i>et al.</i> 1977
	CARLSSON <i>et al.</i> 1976
	GINDRAT <i>et al.</i> 1972
	Mc CLELLAND <i>et al.</i> 1972
Chlamydia trachomatis	SKAUG <i>et al.</i> 1982



TABLEAU VI

ANTICORPS PRESENTS DANS LE COLOSTRUM OU
DANS LE LAIT HUMAIN DIRIGES CONTRE LES TOXINES BACTERIENNES

Anticorps	Références
Toxine tétanique	DEBRE <i>et al.</i> 1930 LEMETAYER <i>et al.</i> 1950
Antistaphylolysine	NORDBRING 1957
Antistreptolysine	NORDBRING 1957
Agglutinine dysentérique	WONG <i>et WONG</i> 1930
Toxine cholérique	KAUR <i>et al.</i> 1972 HOLMGREN <i>et al.</i> 1976 STOLIAR <i>et al.</i> 1976 SIMHON <i>et al.</i> 1979
Entérotoxine d' <i>E. coli</i>	STOLIAR <i>et al.</i> 1976
Toxine diphtérique	NEWCOMB <i>et al.</i> 1969



également dans le transfert passif de l'immunité contre le ver solitaire *Taenia taeniaformis* (MUSOKE *et al.*, 1975 ; LLOYD et SOULSBY, 1978). Cependant les mécanismes d'action contre les parasites ne sont pas très connus (WAKELIN, 1978), et les contributions relatives des différents composants de la réponse immune pas claires.

4 - Inhibition de l'absorption digestive des antigènes :

Les anticorps du lait humain sont aussi dirigés contre les antigènes alimentaires. Tous les enfants de moins d'un an nourris au lait de Vache possèdent des anticorps contre les protéines lactées bovines (LIPPARD *et al.*, 1936). En 1977 AHLSTEDT *et al.* décrivent l'existence de sIgA humaines dirigées contre la β -lactoglobuline et les caséines α et β de Vache. Il existe beaucoup d'autres antigènes solubles contre lesquels les anticorps du lait humain peuvent être dirigés : métabolites secondaires bactériens ou chimiques, matériels inhalés ou ingérés incluant des carcinogènes potentiels (Mc NABB et TOMASI, 1981). Les anticorps sécrétoires ont un rôle important dans la régulation de l'absorption de ces antigènes (WALKER et ISSELBACKER, 1977). WALKER *et al.* (1972) ont examiné la capacité des anticorps intestinaux à altérer l'absorption de certaines macromolécules. En utilisant des sacs inversés de jéjunum et d'iléum de Rats qui ont préalablement été nourris avec de la peroxydase de raifort, ces auteurs comparent le transport de protéines marquées chez ces animaux immunisés ou non. Une diminution significative de l'absorption intestinale est notée, de plus elle est spécifique de l'antigène. Les animaux immunisés oralement par la peroxydase de raifort montrent une diminution de l'absorption antigénique, tandis que l'absorption de la sérum albumine bovine chez ces mêmes animaux n'est pas affectée. Des sIgA contre des protéines du blé ont également été détectées (WALKER et ISSELBACKER, 1977 ; WALKER *et al.*, 1980).

5 - Activation du complément par la voie alterne :

Les IgA contrairement aux autres anticorps ne fixent pas le complément par la voie classique, mais par la voie alterne (BURTON, 1973). Les IgA sont capables de transformer le C_3 pro-activateur en C_3 activa-

teur permettant ainsi le clivage du C_3 et entraînant l'activation de la séquence terminale C_5-C_9 du complément (SPIEGELBERG et GÖTZE, 1972). Cette réaction de "by pass" est initiée par la partie $F(ab)_2$ de la molécule d'IgA. Les sIgA sont capables d'éliminer l'activité hémolytique de sérum frais de Cobaye utilisé comme source de complément (BOACKLE *et al.*, 1973). Si les sIgA peuvent réagir avec le complément il n'y a pas de preuve actuellement quant à leur rôle biologique vis-à-vis de l'opsonisation ou de la lyse. Les sIgA ne semblent pas être opsonisantes : des érythrocytes exposés à des sIgA (HUBER *et al.*, 1971 ; ZIPURSKY *et al.*, 1973) n'ont été ni fixés ni ingérés par des macrophages. Pourtant, KAPLAN *et al.* (1972) rapportent la phagocytose d'érythrocytes B humains entourés de sIgA purifiées de colostrum humain de même que KNOP *et al.* (1971) montraient la phagocytose d'*E. coli* exposés aux IgA colostrales de Truie par les macrophages péritonéaux de Souris. Il est à noter cependant que la présence de traces de sIgM dans la fraction sIgA peut fausser tous les résultats. L'activité lytique des sIgA en présence de complément est également mise en doute. Les sIgA ne sont pas (ADINOLFI *et al.*, 1966a) ou très peu (ISHIZAKA *et al.*, 1965) lytiques. Il a été écrit par ADINOLFI *et al.* (1966b) que les IgA colostrales étaient capables de lyser *E. coli* en présence de complément et de lysozyme. Ces résultats n'ont jamais pu être reproduits par EDDIE *et al.* (1971) qui avaient utilisé des IgA colostrales de Lapin sans IgM et sans IgG. Les résultats de BURTON (1973) sur l'activité bactéricide des IgA sont également très discutables. Par contre HILL et PORTER (1974) reproduisent les résultats de ADINOLFI *et al.* (1966a). La coopération entre les sIgA et le complément a toujours été très discutée et les sIgA ne sont vraisemblablement ni opsonisantes, ni lytiques (HEREMANS, 1974 ; WELSH et MAY, 1979).

B - INHIBITION DU ROLE ANTICORPS PAR LES PROTEASES BACTERIENNES

Les IgA présentes dans les sécrétions sont exposées aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal aussi bien qu'aux protéases produites par les bactéries. L'activité IgA protéas-

sique a été décrite pour la première fois en 1973 par MEHTA *et al.* Des fragments Fc_{α} étaient retrouvés intacts dans les selles de patients. Il existait donc une enzyme capable de cliver les chaînes α et de libérer un fragment Fc non hydrolysé. Ces enzymes sont synthétisés par 6 bactéries : *Streptococcus sanguis* (PLAUT *et al.*, 1974 ; GENCO *et al.*, 1975), *Streptococcus mitior* (KILIAN et HOLMGREN, 1981) *Streptococcus pneumoniae* (MALE, 1979 ; KILIAN *et al.*, 1979), *Hemophilus influenzae* (MALE, 1979 ; KILIAN *et al.*, 1979), *Neisseria meningitidis* (PLAUT *et al.*, 1975 ; MULKS et PLAUT, 1978), *Neisseria gonorrhoeae* (PLAUT *et al.*, 1975).

1 - Les protéases bactériennes : Les bactéries synthétisent leurs protéases durant la phase logarithmique de croissance (PLAUT *et al.*, 1978a ; PLAUT *et al.*, 1974 ; PLAUT *et al.*, 1978b). Les protéases bactériennes sont des enzymes métallo-dépendants, extracellulaires ayant une activité optimale aux pH neutres (PLAUT *et al.*, 1975 ; MALE, 1979 ; KILIAN *et al.*, 1980). Toutes ces protéases montrent une très grande spécificité pour les IgA_1 humaines (PLAUT, 1978). Elles ne clivent pas les chaînes légères, la pièce de sécrétion et la pièce de jonction mais clivent la chaîne α des IgA de sécrétion (KILIAN *et al.*, 1980). Les autres anticorps ne sont pas sensibles à la protéolyse, de même que les IgA_1 de Lapin, de Rat, de Souris, de Chien et de 20 espèces de Primates (PLAUT *et al.*, 1974 ; KORNFELD et PLAUT, 1981).

Les IgA_1 protéases clivent des liaisons prolyl-thréonine ou prolyl-sérine (Fig. 6 ; p. 41) au niveau de la zone charnière des IgA_1 humaines libérant des fragments Fc et Fab intacts. Les IgA_2 ne sont pas coupées, la délétion de 13 acides aminés dans la zone charnière des chaînes α_2 les rend résistantes.

2 - Rôle des IgA_1 -protéases : Après exposition 2 h à 37°C avec les IgA protéases de *S. sanguis* et de *N. gonorrhoeae*, les IgA_1 perdent plus de 90 % de leur capacité à fixer un antigène (PLAUT *et al.*, 1977). La création de fragments Fab monomériques réduit la ca-

pacité de l'anticorps par diminution de sa multivalence. Les IgA protéases réduisent également le titre anticorps des sIgA, mais toutes les sIgA ne sont pas clivées (KILIAN *et al.*, 1979 ; PARDO *et al.*, 1979). Ce phénomène peut s'expliquer par :

- la plus grande proportion de sIgA₂ que de sIgA₁
- la présence de la pièce de sécrétion
- l'existence d'anticorps anti-IgA protéases (PLAUT *et al.*, 1979).

La libération de fragments Fc interfère avec les fonctions immunologiques du Fc_α (van EPPS et WILLIAMS, 1976 ; GRIFFISS et BERTRAM, 1977 ; van EPPS *et al.*, 1978 ; LUM *et al.*, 1979 ; MORETTA *et al.*, 1978), mais permet l'augmentation de la réponse immune aux microorganismes car le Fc_α serait mitogène pour les lymphocytes B (BERMAN *et al.*, 1979).

Actuellement , il est difficile de relier la pathogénicité des bactéries et leur fonction IgA₁ protéases (KILIAN *et al.*, 1979 ; MALE, 1979 ; MULKS et PLAUT, 1978). De même, il est assez difficile de savoir si les glycannes présents dans la zone charnière des IgA₁ jouent un rôle dans l'interaction IgA-bactéries. La désialylation de la zone charnière ne prévient pas la protéolyse. Le clivage par les IgA protéases de *S. sanguis* et *N. gonorrhoeae* n'est pas inhibé en présence de galactose et de N-acetylgalactosamine 50 mM. Le site actif de l'enzyme n'est pas bloqué par des sucres. En outre, KILIAN *et al.* (1979) n'ont trouvé des glycosidases capables de déglycosyler les IgA₁ que dans les cultures de *S. pneumoniae*.

C - AUGMENTATION DE LA PROTECTION DES MUQUEUSES PAR LA VACCINATION

Ces dernières années de nombreuses équipes se sont intéressées à l'immunisation orale comme moyen rapide et utile d'immunisation des masses contre les agressions bactériennes ou virales. De nom-

breuses questions se posent :

1 - Y-a-t-il une réponse secondaire du système sécrétoire ? Une condition nécessaire à la vaccination est que le système immunitaire des muqueuses soit capable d'exprimer une réponse mémoire. DAYTON *et al.* (1971) et PORTER *et al.* (1978) sont en faveur d'une perte de la mémoire du système immunitaire des muqueuses. Par contre GERBRANDY et van DURAN (1972) fournissent des résultats en faveur d'une mémoire des systèmes immunitaires du tractus respiratoire lors d'une immunisation intranasale. PIERCE et REYNOLDS (1975) parlent de réponse immunitaire secondaire brève à l'administration locale d'un antigène. En 1982 KEREN *et al.* démontrent que dans les sécrétions intestinales il y a une réponse mémoire à sIgA après l'administration orale d'antigènes de *Shigella flexneri*. La démonstration d'une réponse mémoire locale a été faite pour les cellules contenant des IgA dans les ganglions lymphoïdes mésentériques (BAZIN *et al.*, 1970), dans la rate (HURME et KONTIAINEN, 1976 ; LALLY *et al.*, 1978) et dans la lamina propria (PIERCE, 1978 ; ROBERTSON et COOPER, 1973 ; HUSBAND et GOWANS, 1978). La controverse sur la mémoire immunologique du système sécrétoire est difficile à trancher, en effet, les espèces immunisées, le protocole d'immunisation et les tests sont trop variés (BIENENSTOCK et BEFUS, 1980).

2 - Quelle est la meilleure voie d'immunisation ? De nombreuses voies d'immunisation ont été étudiées. L'utilisation de la voie parentérale peut conduire à la production d'IgA : l'immunisation sous-cutanée conduit à l'obtention de cellules productrices d'IgA chez le Rat (BEH *et al.*, 1979) et chez l'Homme (SVENNERHOLM *et al.*, 1977) où des IgA sécrétoires spécifiques ont été retrouvées dans le lait, la salive et les autres sécrétions. De même la vaccination d'enfants contre la toxine de *Clostridium welchii* réduit l'incidence des entérites nécrosantes durant au moins deux ans (LAWRENCE *et al.*, 1979). L'immunisation par voie orale induit une réponse des muqueuses sans qu'il y ait des anticorps IgA présents dans le sérum (MICHALEK *et al.*, 1976 ; MONTGOMERY *et al.*, 1979 ; EVANS *et al.*, 1980). Ces

anticorps sont retrouvés dans le lait (PORTER *et al.*, 1974 ; EVANS *et al.*, 1980), dans la salive (MICHALEK *et al.*, 1976). L'immunisation orale a été utilisée ainsi dans la vaccination contre les virus : l'Adénovirus type 4 (EDMONDSON *et al.*, 1966 ; SMITH *et al.*, 1970) et le virus de l'Herpes simplex types I et II (STURN et SCHNEWEIS, 1978). Il existe cependant des cas particuliers où l'immunisation orale est sans effet. Les sIgA de femmes pakistanaïses ont leur titre anticorps contre le Poliovirus qui augmente lors d'une immunisation sous-cutanée par le virus tué et qui diminue lors d'une immunisation orale par le virus vivant. Cette diminution est encore plus accentuée lorsque ces femmes reçoivent les deux types d'immunisation simultanément (SVENNERHOLM *et al.*, 1981). La cause de l'échec de l'immunisation orale n'est pas connue et il peut s'agir d'une tolérance amenée par les cellules suppressives lors de la double immunisation (MATTINGLY et WAKSMAN, 1978 ; RICHMAN *et al.*, 1978). Pour HAMILTON *et al.* (1979) et PIERCE et KOSTER (1980) l'immunisation parentérale peut-être suppressive de la réponse immune locale dans certaines conditions. Une tolérance systémique après ingestion d'antigènes est également possible (CHALLACOMBE et TOMASI, 1980).

En résumé, il est possible de vacciner l'Homme et les animaux contre les infections des muqueuses. Les mécanismes précis impliqués et les voies les plus efficaces d'immunisation restent encore à être déterminés. Il est possible de protéger d'autres sites que l'intestin lors d'une immunisation orale. Il semble y avoir un équilibre entre l'activité suppressive concomitante au processus d'immunisation et l'immunisation. Cet équilibre semble être légèrement en faveur de l'immunisation (PIERCE et KOSTER, 1980 ; SWARBRICK *et al.*, 1979 ; BIENENSTOCK et BEFUS, 1980).

V - SYNERGIE D'ACTION DES CONSTITUANTS SOLUBLES DU LAIT MATERNEL

Les protéines que nous venons de décrire sont capables d'agir seules, mais souvent elles agissent en synergie.

A - SYNERGIE LYSOZYME - sIgA - COMPLEMENT

Le lysozyme peut agir en synergie avec les sIgA et avec le complément dans la lyse bactérienne des Gram (-) (WARDLAW, 1962). Les études de HILL et PORTER (1974) effectuées sur le colostrum de Truie montrent que seules les IgA sécrétoires sont capables d'être lytiques avec le lysozyme et le complément. Les IgA sériques n'ont aucune action (Tableau VII ; p. 46). Ces résultats confirment ceux d'ADINOLFI *et al.* (1966a). Des études effectuées avec des composants purifiés de la voie alterne du complément en présence de lysozyme ont montré qu'il y avait bactériolyse (SCHREIBER *et al.*, 1979). MAJUMBAR et GHOSE (1981) purifient les anticorps du sérum et du lait de patients convalescents du choléra. Les IgM et les IgG ont des propriétés agglutinantes et vibriocides tandis que les sIgA bien qu'agglutinantes et anti-adhérentes ne sont pas vibriocides même en présence de lysozyme.

Cette synergie soulève de nombreuses controverses. Il semble en effet que les fractions de sIgA très purifiées ne soient pas lytiques alors que les fractions de sIgA accompagnées de traces d'IgG ou d'IgM le soient.

B - SYNERGIE LYSOZYME - LACTOTRANSFERRINE

Le lysozyme s'associe également à la lactotransferrine. Dans le lait maternel les associations lysozyme-lactotransferrine existent dans les rapports molaires 2 : 1' (SPIK *et al.*, 1983).

TABLEAU VII

ACTIVITE LYTIQUE DES IgA SECRETOIRES ET SERIQUES
VIS-A-VIS DE DEUX SOUCHES D' *E. coli* (HILL et PORTER, 1974)

IgA	Supplémentation	Activité bactériolytique (en % apparent de cellules tuées)	
		<i>E. coli</i> 0141	<i>E. coli</i> 08
6,4 S non sécrétoires	Témoin	3	0
	Complément	1	4
	Lysozyme	0	1
	Lysozyme + Complément	2	1
9,3 S non sécrétoires	Témoin	1	2
	Complément	3	1
	Lysozyme	1	0
	Lysozyme + Complément	1	1
11 S sécrétoires	Témoin	0	0
	Complément	1	0
	Lysozyme	2	1
	Lysozyme + Complément	60	52



In vitro, le lysozyme associe son activité lytique vis-à-vis des bactéries Gram (+) l'action bactériostatique de la lactotransferrine. En effet, PERRAUDIN et PRIEELS en 1982 ont montré que les protoplastes de *Micrococcus luteus* obtenus par l'action du lysozyme humain étaient agglutinés par l'addition, au milieu, de lactotransferrine aussi bien humaine que bovine. Cette agglutination serait due à des interactions ioniques puisque la succinylation des résidus de lysine de la lactotransferrine abolit son pouvoir agglutinant. Il reste à savoir si cet effet est reproductible *in vivo* et si cette agglutination signifie quelque chose dans la protection du tractus intestinal.

C - SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE - sIgA

Les premiers travaux concernant la potentialisation de la lactotransferrine ont été effectués par BULLEN *et al.* (1972). Ils ont montré que des anticorps IgG spécifiques d'une bactérie *E. coli* O₁₁₁B₄ étaient capables d'agir en synergie avec de la lactotransferrine humaine. En effet, en état de ferriprivation la bactérie synthétise un chélateur : l'entérochiline qui est capable d'entrer en compétition avec la lactotransferrine pour le fer et de transporter ce fer jusqu'à des récepteurs membranaires spécifiques. Des anticorps dirigés contre le site récepteur de l'entérochiline (BULLEN *et al.*, 1974) en se fixant sur la bactérie inhiberaient le passage du fer (Fig. 7 ; p. 48).

En 1978, SPIK *et al.* et ROGERS et SYNGE montrent que la lactotransferrine est potentialisée par un anticorps du lait humain et qu'il s'agit d'immunoglobulines sIgA. Les IgA sécrétoires seules n'ont aucune action bactériostatique, de plus la saturation en fer annule l'activité de la lactotransferrine (BULLEN *et al.*, 1972 ; ROGERS, 1976 ; SPIK *et al.*, 1978). Les travaux de STEPHENS *et al.* (1980) montrent que la forte activité bactériostatique du lait maternel contre *E. coli* ne peut être expliquée par la lactotransferrine ou par les sIgA qui seules ont une activité inhibitrice faible (Fig. 8 ; p. 49) mais par leur

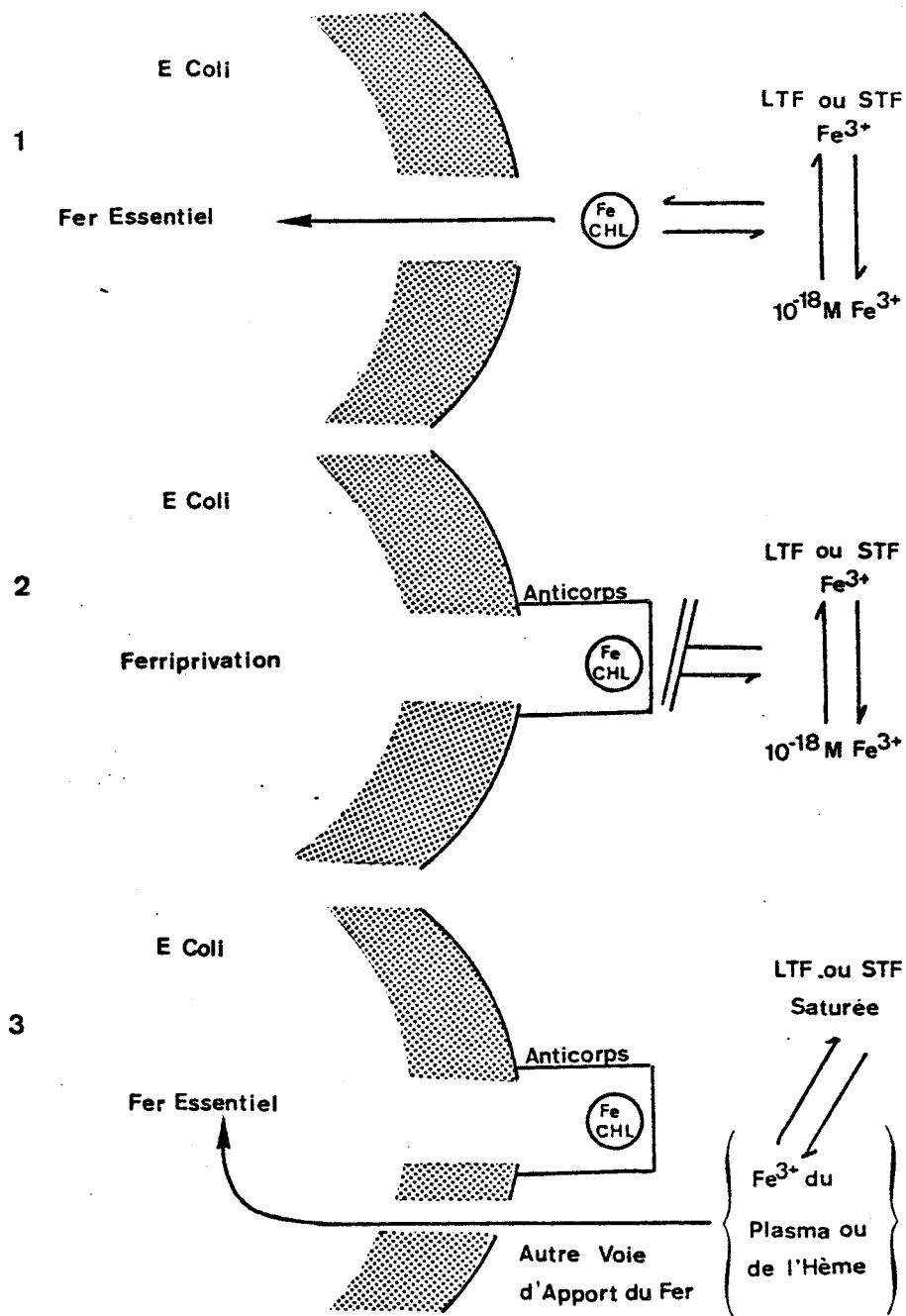


Figure 7 : Hypothèse concernant le mécanisme d'action bactériostatique de la lactotransferrine et des anticorps dirigés contre E. coli O₁₁₁B₄/B₂ (BULLEN et al., 1974).



- (1) Compétition pour le fer du milieu entre les transferrines et les chélateurs bactériens (CHL).
- (2) Ferriprivation de la bactérie augmentée par la formation d'un complexe anticorps-chélateur.
- (3) Mise en place d'une voie annexe d'apport du fer.

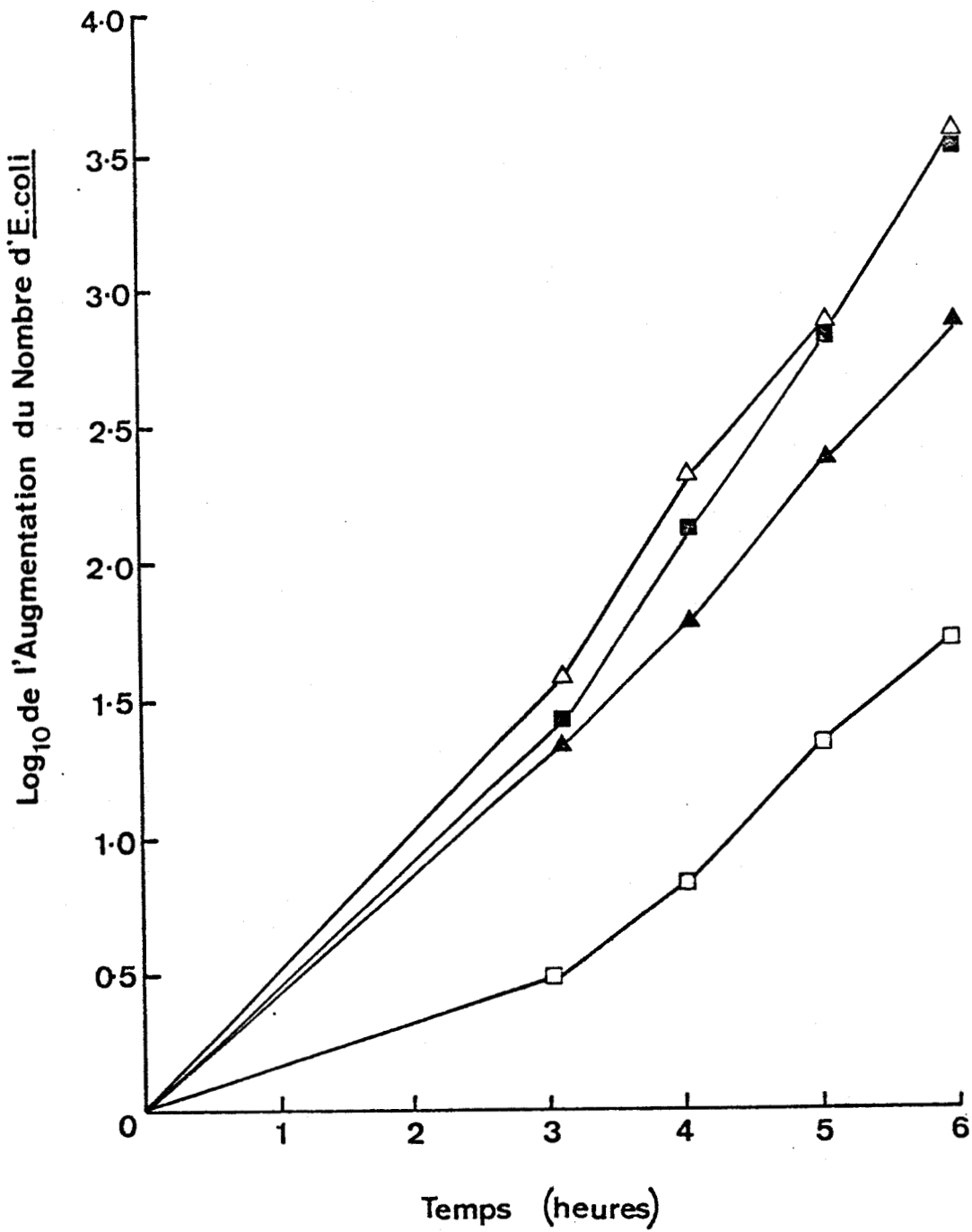


Figure 8 : Potentialisation de l'activité bactériostatique de la lacto-transferrine par les immunoglobulines sIgA (STEPHENS *et al.* 1980)

Δ Contrôle *E. coli* 0111 B4

\blacksquare sIgA (1 mg/ml)

\blacktriangle LTF (1 mg/ml)

\square LTF + sIgA



synergie d'action. Cependant, l'action des anticorps a été remise en question par SAMSON *et al.* (1979) qui trouvent une activité bactériostatique à un lait sans immunoglobuline. Ce résultat est infirmé par ceux obtenus par DOLBY et HONOUR (1979). Ces auteurs ont montré que l'activité bactériostatique d'un lait est diminuée considérablement par précipitation de la fraction anticorps par des anti-sIgA. L'action potentialisatrice des sIgA sur la lactotransferrine aurait lieu quand les anticorps sont spécifiques de la bactérie (Mc CLELLAND *et al.*, 1972 ; GINDRAT *et al.*, 1972 ; ROGERS et SYNGE, 1978). En outre, la synergie d'action entre la lactotransferrine et les anticorps n'est effective que sur des bactéries pathogènes et ne se manifeste pas avec des bactéries commensales (STEPHENS *et al.*, 1980). Des anticorps spécifiques de ces bactéries ont cependant été détectés dans le lait (DOLBY et STEPHENS, 1982).

D - SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE - COMPLEMENT

La lactotransferrine posséderait suivant sa concentration une activité tantôt inhibitrice et tantôt activatrice du complément (MORGAN *et al.*, 1975 ; VEERHUIS et KYLSTRA, 1982). En utilisant le système hémolytique des hématies de Mouton, MORGAN *et al.* (1975) ont montré que la lactotransferrine activait le complément. Cette activité était augmentée d'un facteur 6. Cependant, quand BULLEN *et al.* (1972) ajoutent un anticorps spécifique d' *E. coli* O₁₁₁ pour accroître l'activité de la lactotransferrine, ils inactivent le complément en chauffant 30 min à 56°C. Il est donc assez difficile de savoir si cette synergie d'action peut avoir lieu dans le lait humain. Une synergie d'action semble également avoir lieu entre le complément et d'autres transporteurs de fer : la sérotransferrine humaine, les sidéphores bactériens (RIVIER *et al.*, 1983).

VI - ACTION DES CELLULES DU LAIT

Le lait et le colostrum humains contiennent de nombreuses cellules viables capables d'assurer l'immunité de la glande mammaire

et d'assurer une immunité passive à l'enfant tout comme le font les sIgA (SMITH et GOLDMAN, 1968 ; LASCELLES *et al.*, 1969 ; PARMELY et BEER, 1977).

Des revues récentes traitent de l'immunité de la glande mammaire (ROUX *et al.*, 1977 ; KLEINMAN et WALKER, 1979 ; WATSON, 1980 ; OPDEBEECK, 1982 ; HANSON, 1982).

A - CARACTERES GENERAUX

Le lait contient des macrophages, des lymphocytes, des polymorphonucléaires, des corpuscules colostraux de DONNE (DONNE, 1844-1845 ; MAYER et KLEIN, 1961) qui sont probablement des macrophages chargés de graisse et des cellules épithéliales (SMITH et GOLDMAN, 1968 ; DIAS-JOUANEN et WILLIAMS, 1974 ; EMODI et JUST, 1974 ; CRAGO *et al.*, 1979 ; BROOKER, 1980). La maintenance du taux des cellules immunocompétentes (environ $2 \text{ à } 4 \times 10^6$ cellules par ml de colostrum : LASCELLES *et al.*, 1969 ; PITT, 1976 ; PUSKAS *et al.*, 1982) se fait pendant les deux premières semaines de la lactation puis leur nombre décroît tandis que le volume de la lactation augmente, ce qui fait que le nourrisson reçoit approximativement 10^8 cellules viables par jour (FISHAUT *et al.*, 1981). Il apparaît en fin de lactation des fragments cytoplasmiques avec des cellules épithéliales qui constitueront l'essentiel des facteurs cellulaires (HO *et al.*, 1979). 80 à 90 % des cellules sont des monocytes et des polymorphonucléaires, 10 à 12 % des lymphocytes (PITT, 1976 ; PUSKAS *et al.*, 1982). Les cellules B et les cellules T ont été identifiées dans la population lymphocytaire (DIAZ-JOUANEN et WILLIAMS, 1974 ; PARMELY *et al.*, 1976 ; PARMELY et BEER, 1977), 50 % d'entre elles sont des lymphocytes T, 34 % d'entre elles des lymphocytes B (DIAZ-JOUANEN et WILLIAMS, 1974). Plus de la moitié des lymphocytes B portent des IgA en surface (MURRILO et GOLDMAN, 1970 ; PUSKAS *et al.*, 1982).

B - ROLE

La fonction des cellules colostrales n'est que partiellement élucidée. En culture, elles synthétisent des facteurs solubles antibactériens : lysozyme, lactotransferrine, composants C₃ et C₄ (GOLDMAN et SMITH, 1973) et des anticorps qui correspondent à 40 % des protéines excrétées (PUSKAS *et al.*, 1982).

1 - Les macrophages : Le pouvoir phagocytaire des cellules colostrales est comparable à celui des leucocytes circulants (HO et LAWTON, 1978), mais leur capacité à tuer des microorganismes est beaucoup moins grande. Ils sont capables de phagocyter des billes de latex, des particules de carbone, du fer colloïdal, des levures (MOHR *et al.*, 1970), des Staphylocoques, des *E. coli* (MAGNUSSON *et al.*, 1978). Les travaux de PITTARD *et al.* (1977) montrent que des cultures mixtes de macrophages du lait humain et de cellules B relarguent plus d'IgA que n'en synthétiseraient les lymphocytes B seuls et pendant un temps plus long. Le macrophage ne synthétise probablement pas d'anticorps mais est sûrement capable de les transporter et de les stocker. Les macrophages sont également impliqués dans la protection contre l'entérococolite nécrosante. De jeunes Rats infectés par des Klebsielles résistent à l'action bactérienne s'ils sont nourris au lait frais. 75 % des rats meurent lorsqu'ils sont nourris avec du lait qui a subi une congélation (PITT *et al.*, 1977). La conservation et le stockage du lait interfèrent sur l'activité des cellules colostrales.

2 - Les lymphocytes : Les lymphocytes T pourraient conférer une immunité cellulaire à l'enfant (PORTER, 1969 ; BRAMBELL, 1970 ; MOHR, 1973 ; PARMELY *et al.*, 1977 ; OGRA *et al.*, 1977 ; SCHLESINGER et COVELLI, 1977 ; OGRA et OGRA, 1978 ; RUBÉN *et al.*, 1982). Les lymphocytes T seraient capables de transférer des médiateurs au nouveau-né (MOHR *et al.*, 1970).

Les lymphocytes B sont impliqués dans la production d'IgA (MURRILLO et GOLDMAN, 1970) principalement. Les cellules B se

trouvent accumulées dans le parenchyme mammaire bien avant la lactation et continuent d'être présentes ensuite (WEISZ-CARRINGTON *et al.*, 1977 ; ROUX *et al.*, 1977) ; leur localisation et leur activation seraient probablement hormono-dépendantes (WEISZ-CARRINGTON *et al.*, 1978 ; FRANKLIN *et al.*, 1978).

C - ORIGINE DES CELLULES DE LA GLANDE MAMMAIRE

1 - Le cycle lymphatico-sanguin : Les plasmocytes à IgA du système sécrétoire proviennent des grands lymphocytes ou blastes circulants. C'est au niveau des agrégats lymphoïdes muqueux et plus particulièrement des Plaques de Peyer que se situe la stimulation de ces blastes circulants. Les antigènes particulaires peuvent pénétrer à ce niveau où l'épithélium est mince et dépourvu de villosités. La plupart des cellules précurseurs, porteuses d'IgA de membrane, empruntent la circulation lymphatique, passent par les ganglions mésentériques et le canal thoracique où elles subissent une maturation et une différenciation plasmocytaire progressive avec apparition d'IgA intracytoplasmique, puis migrent vers la circulation générale et sont attirées préférentiellement vers la *lamina propria* intestinale. Ce cycle dure environ 6 jours et aboutit à la formation de plasmocytes mûrs qui sécréteront des IgA (ROUX *et al.*, 1977 ; Mc GHEE *et al.*, 1978 ; OGRA et DAYTON, 1979 ; BIENENSTOCK et BEFUS, 1980 ; HANSON *et al.*, 1980 ; MESTECKY *et al.*, 1980a).

2 - Migration dans la glande mammaire : L'ecotaxie des cellules à IgA peut aussi se faire vers les bronches, les glandes salivaires et vers le tissu mammaire (LAMM *et al.*, 1979 ; WEISZ-CARRINGTON *et al.*, 1978). A la fin de la gestation et au début de la lactation, les alvéoles mammaires se peuplent de lymphocytes et deviennent bientôt engorgées par ces cellules (KLEINMAN et WALKER, 1979). Cette augmentation du nombre des lymphocytes est due à une stimulation hormonale : insuline, aldostérone, progestérone, oestrogène et prolactine (TOPPET et OKA, 1974). Après une migration vers le pôle apical de la cellule,

les lymphocytes^{IgA} peuvent être excrétés (SEELIG et BEER, 1978). La synthèse des IgA se fait donc localement chez la Souris, le Rat, l'Homme (GOLDBLUM *et al.*, 1975 ; BIENENSTOCK, 1975 ; PARROT, 1978) et HALSEY *et al.* (1982) montrent que si la production locale d'anticorps au bout de 8 jours de lactation est majoritaire, les IgA dimériques au début de la lactation proviennent d'autres sites et sont transférés par le sang (Fig. 9 ; p. 55). Puisque ces lymphocytes sont dérivés de cellules précurseurs qui migrent du tractus intestinal, ROUX *et al.* (1977) montrent que les IgA du lait sont spécifiques des antigènes de l'intestin de la mère.

VII - CONCLUSIONS

Durant la grossesse, l'enfant acquiert passivement des anticorps de type IgG qui sont les seuls à passer la barrière placentaire. Le nouveau-né ne possède ni sIgA, ni immunocytes à IgA à sa naissance. A partir de la deuxième semaine des sIgA sont retrouvées dans la salive et les larmes, dès la fin du troisième mois, la concentration en sIgA est équivalente à celle retrouvée chez un adulte. De plus, l'intestin du nouveau-né à la naissance est immature et est très perméable. Pour palier à la carence immunitaire et protéger ses muqueuses contre les agressions bactériennes et virales et contre les antigènes alimentaires, l'enfant doit donc recourir à une source exogène d'anticorps avant d'assurer lui-même le relais de sa propre protection par un système immunitaire local efficace. Le colostrum et le lait maternel comme nous venons de le voir, apportent au nourrisson à la fois des facteurs de protection humoraux et cellulaires spécifiques et des facteurs non spécifiques.

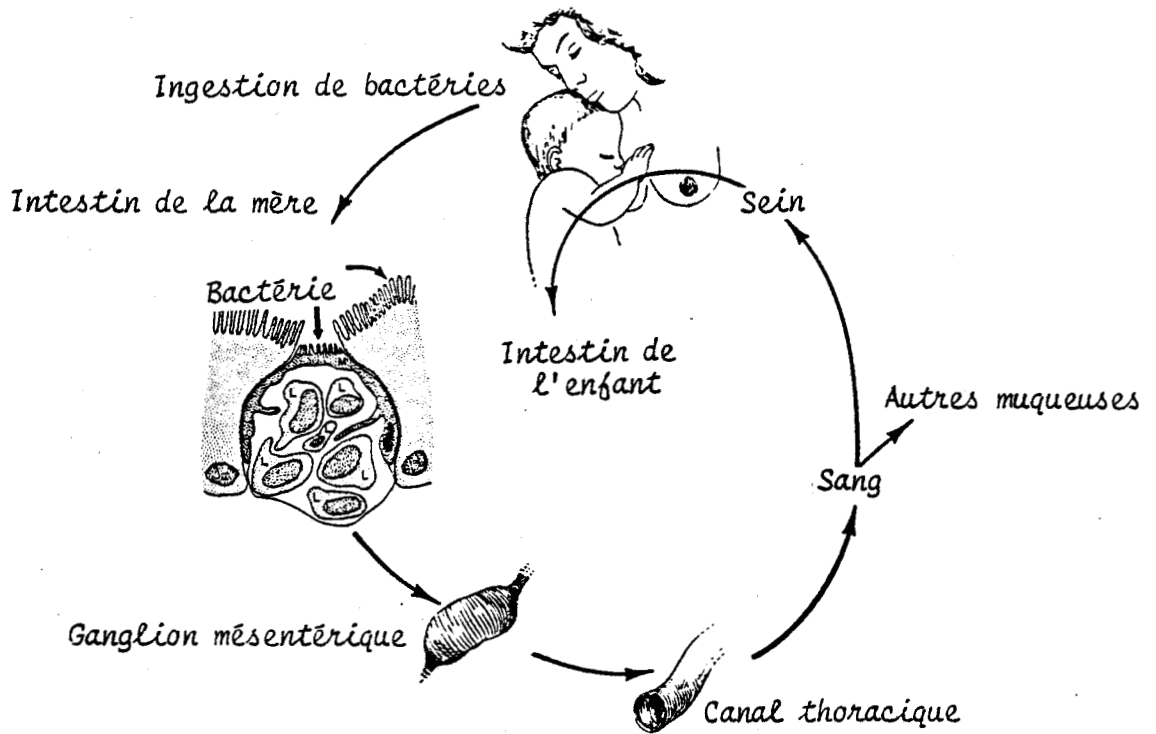


Figure 9 : Cycle des lymphocytes de la mère à l'enfant
(KLEINMAN et WALKER, 1979).



Les facteurs humoraux sont surtout représentés par les IgA de sécrétion.

L'IgA sécrétoire arrivée au pôle apical des cellules épithéliales intestinales est "prisonnière" des mucines du glycocalyx et adhère de ce fait à l'épithélium. Elle a des activités anticorps dirigées contre des bactéries, des virus, des toxines, des antigènes protéiques et non protéiques. Le mécanisme d'action de cet anticorps consiste en :

- L'agglutination des bactéries qui est due vraisemblablement au fait que la molécule dimérique de sIgA possède 4 sites de fixation de l'antigène.

- La neutralisation des virus qui est une propriété bien établie des sIgA et se fait probablement par l'intermédiaire de complexes antigène-anticorps dirigés contre les protéines de l'enveloppe des virus.

- L'élimination d'antigènes alimentaires qui est due à la formation de complexes antigène-anticorps non absorbables qui sont éliminés avec le mucus.

- L'inhibition de l'adhésion bactérienne : les sIgA empêchent l'adhésion des bactéries, des virus et de leurs toxines et réduisent l'absorption des antigènes solubles aux cellules épithéliales intestinales. L'altération de l'adhésion des organismes pathogènes entraîne leur non-prolifération et la non-colonisation donc la non-invasion des tissus.

Les sIgA assurent la première ligne de défense de l'organisme et ont été comparées, par HEREMANS (1974), à une "peinture antiseptique" car elles tapissent toutes les surfaces des muqueuses. Cette protection a lieu dans les premiers temps lors de l'alimentation du nourrisson

au lait maternel et peut être également effective ensuite, après vaccination orale et stimulation de la production des sIgA.

Les facteurs immunologiques cellulaires sont principalement des macrophages et des lymphocytes. Les cellules du lait peuvent intervenir activement dans les propriétés protectrices du lait et elles participent à la synthèse d'anticorps de type sIgA et de facteurs solubles non spécifiques comme la lactotransferrine et le lysozyme.

Les facteurs non spécifiques qui contribuent à la défense intestinale du nourrisson sont :

- La flore bifide qui retarde l'implantation des microorganismes pathogènes en créant des conditions particulières d'environnement et dont la croissance est maintenue par l'apport de composés tels que les oligosaccharides et les glycopeptides du lait maternel.

- Les mucines qui empêchent mécaniquement l'accès de certains organismes et antigènes aux cellules épithéliales et qui agissent en association avec les sIgA.

- Le lysozyme, la lactotransferrine et le système lactoperoxydasique qui sont des substances bactériostatiques ou bactéricides présentes en quantité importante dans le lait. Ces protéines sont également synthétisées localement au niveau des tractus épithéliaux et contribuent ainsi à la protection de toutes les muqueuses.

La plupart des protéines lactées : sIgA, lysozyme et lactotransferrine sont retrouvées dans les selles en partie intactes ou partiellement dégradées mais avec une activité biologique conservée. Elles résistent aux enzymes protéolytiques de l'intestin du nourrisson et peuvent être efficaces lors la protection intestinale.

Toutes ces protéines agissent non seulement indépendamment les unes des autres mais également en coopération. La plus importante est la synergie lactotransferrine-sIgA qui a lieu lorsque les anticorps sont spécifiques de la bactérie pathogène.

Nous pouvons donc conclure avec RIBADEAU-DUMAS (1983) :
"Pendant les premiers mois de la vie, le lait maternel est le seul aliment réellement adapté aux besoins du nouveau-né. Il joue un rôle de premier plan dans la prévention des troubles gastro-intestinaux et la protection vis-à-vis d'un certain nombre d'agressions extérieures".

ETUDE STRUCTURALE DES sIgA

C'est en 1901 que MORO décrit pour la première fois les 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 ; FERRI et TUTIYA, 1959 ; HANSON, 1959 ; KARTE 1959 ; SCHWICK *et al.*, 1959 ; MONTREUIL *et al.*, 1960a ; von MURALT *et al.*, 1961 ; TOMASI *et al.*, 1965 ; LUBIN *et al.*, 1964 ; AXELSSON *et al.*, 1966 ; CEDERBLAD *et al.*, 1966.

Les immunoglobines IgA ont été isolées à partir du lait humain par MONTREUIL *et al.* pour la première fois en 1960a. 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 sIgA. 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.* (1966a) 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 : $(\text{IgA})_2 \cdot \text{SC} \cdot \text{J}$.

Les IgA sériques représentent 20 % de la population des immunoglobulines. Leur taux est de 1 à 4 g/l. Elles sont monomériques chez l'Homme et souvent dimériques et sans pièce de sécrétion chez la plupart des autres mammifères. Cependant, selon BRANDTZAEG (1971b), THOMPSON et ASQUITH (1970) et WALDMAN *et al.* (1970) 1,5 % des IgA sériques possèderaient une pièce de sécrétion. Dans les sécrétions, le taux des IgA est de 2 g/l dans le lait humain.

Les sIgA 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_1 et IgA_2 . Elles sont différenciées par la nature antigénique spécifique des chaînes lourdes α_1 et α_2 . Le rapport IgA_1 : IgA_2 varie suivant l'origine des immunoglobulines. Il est de 2 pour 1 (GREY *et al.*, 1968) ou de 1 pour 3 (MOTA, 1977) dans le colostrum 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 ; TOMASI, 1976 ; HUBER, 1980 ; STOTT et WILLIAMSON, 1982, MARQUART et

DEISENHOFER, 1982). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux IgA de sécrétion, à leur structure et à leur conformation.

I - PREPARATION DES sIgA

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'origines diverses (HEREMANS, 1974). Les IgA lactées ont été isolées pour la première fois en 1960a par MONTREUIL *et al.* 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 Sephadex G-200 (MOTA, 1977). Les sIgA ont été récemment purifiées sur colonne d'héparine-Sepharose suivie d'une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose et une gel filtration sur Sephadex G-200 (BOESMAN-FINKELSTEIN et FINKELSTEIN, 1982).

II - PROPRIÉTÉS 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 ; HURLIMAN *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 0,723 pour TOMASI et BIENENSTOCK (1968). Ces valeurs sont retrouvées par CEBRA et ROBBINS (1966) pour les IgA de sécrétion de Lapin.

B - PROPRIETES CHIMIQUES

Les IgA de sécrétion sont très résistantes aux enzymes protéolytiques et aux agents de réduction. En particulier, les IgA₂ 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, 1968).

Il n'existe pas de différences appréciables dans la composition en acides aminés des IgA sériques et des IgA de sécrétion (Tableau VIII ; p. 63).

Le taux de glucides (Tableau VIII ; p. 63) 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.

TABLEAU VIII

COMPARAISON DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES
ET EN GLUCIDES DES IgA LACTEES ET DES IgA SERIQUES

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

Composition centisémale en glucides	IgA de sécrétion	IgA sérique
	DESCAMPS (1974)	HEIMBURGER <i>et al.</i> (1964)
Oses neutres	5,6	3,42
Hexoses	4,65	3,2
Fucose	0,95	0,22
Hexosamines	4,05	2,9
GlcNAc	3,53	-
GalNAc	0,52	-
NeuAc	-	1,80
Méthode Dische	1,8	-
Méthode Warren	1,2	-
TOTAL		8,12

8113
LITE

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 DIFFÉRENTS 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 disulfures.

A - ETUDE DES CHAINES LEGERES

1 - Propriétés physico-chimiques : Les chaînes légères sont de nature peptidique (214 acides aminés), 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. Elles sont de type κ ou λ . Les deux types de chaînes n'ont pas de déterminant antigénique commun et leur structure primaire est très différente, bien que de nombreuses homologues soient retrouvées et qu'une origine commune soit évidente (DE PREVAL, 1976). Les chaînes κ représentent 66 % des chaînes légères des IgA sériques humaines (FAHEY, 1963).

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

2 - Etude structurale : La chaîne légère est constituée d'une région constante (CL) et d'une région variable (VL). Il y a peu de différences d'une protéine à l'autre dans la moitié C terminale de la chaîne. Cette partie constante renferme les résidus d'acides aminés 108 à 214. La comparaison n'est évidemment valable qu'au sein du même

type antigénique κ ou λ car les parties constantes de ces deux types sont extrêmement différentes l'une de l'autre. Dans les chaînes κ , les acides aminés 153 et 191 peuvent être, selon les individus, soit une leucine, soit une valine. Il s'agit de marqueurs allotypiques génétiquement transmis : Km_1 , Km_2 , Km_3 . Au contraire, tous les individus possèdent 3 types différents de chaînes λ en ce qui concerne la partie constante déterminés par deux permutations indépendantes et ponctuelles : une sérine ou une glycine en position 153 (facteur Kern - et Kern +) (GIBSON *et al.*, 1971) et une lysine ou un arginine en position 191 (facteur Oz + et Oz -) (EIN, 1968). Il est à noter que les substitutions allotypiques et isotypiques ont lieu aux mêmes endroits (STOTT et WILLIAMSON, 1982). En revanche les 107 premiers acides aminés diffèrent fortement d'une protéine à l'autre : c'est la zone variable. La comparaison de la séquence de régions variables d'une même famille de chaînes montre que ces dernières peuvent être divisées en groupes et sous-groupes. Selon les définitions de notion de groupe, la chaîne κ peut être subdivisée en 3 sous-groupes et la chaîne λ en 5. La répartition peut également se faire comme chez la Souris sur la base de la séquence du peptide N-terminal ne concernant que les 23 premiers acides aminés. Sur cette base, 30 groupes différents ont été établis (POTTER, 1977) ainsi que de nombreux sous-groupes : $V_{\kappa 21}$ est divisé par exemple en $V_{\kappa 21A}$, $V_{\kappa 21B}$ et $V_{\kappa 21C}$. La chaîne λ peut être également subdivisée sur cette même base. Cette répartition sur la base de la séquence Nt peut être appliquée aux chaînes légères humaines. Il y a des équivalences entre les groupes de la Souris et de l'Homme (STOTT et WILLIAMSON, 1982). KABAT *et al.* (1976) étudient le degré de variabilité des 100 premiers acides aminés des chaînes légères humaines et des chaînes lourdes humaines à une position donnée. Ils rassemblent les données en 2 diagrammes : l'un pour les chaînes λ et κ (Fig. 10a ; p. 66) et l'autre pour l'ensemble des chaînes lourdes (Fig. 10b ; p. 66). Ils démontrent clairement que l'hypervariabilité n'est pas répartie anarchiquement mais qu'il existe des zones bien définies qui coïncident à la fois sur les chaînes lourdes et sur les chaînes légères. Ces zones sont séparées par des régions où la séquence peptidique

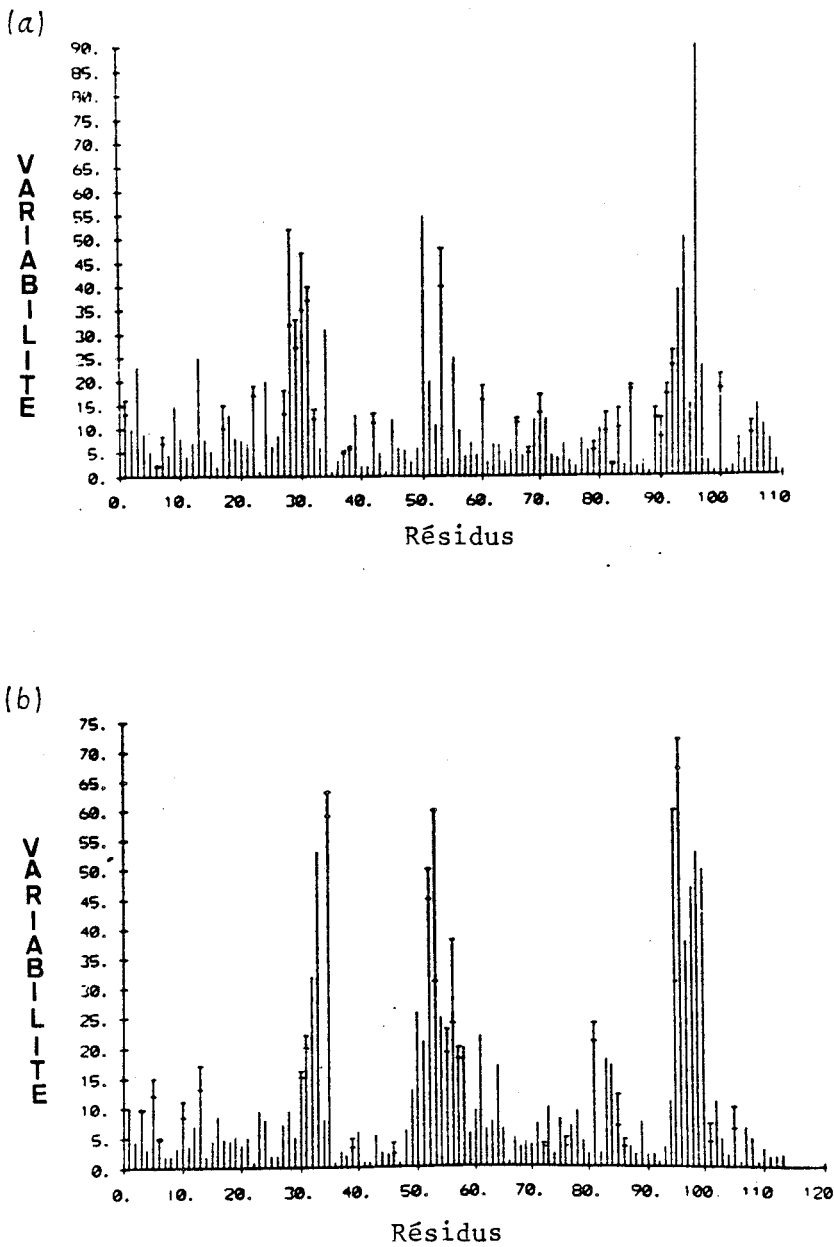


Figure 10 : Histogramme de variabilité ^(v) des acides aminés dans la région variable des immunoglobulines d'après KABAT et al. (1976).

(a) Chaînes légères λ et κ

(b) Chaînes lourdes α , γ , μ , δ , ϵ .

$$v = \frac{\text{Nombre d'acides aminés différents à une position donnée}}{\text{Fréquence de l'acide aminé le plus commun à cette position}}$$



est conservée. Il y a 3 zones hypervariables pour les chaînes légères aux positions 25-34 ; 50-55 et 89-97. Les différences de séquences sont dues à des permutations d'acides aminés mais dans de nombreux cas, il y a conservation des propriétés physico-chimiques des résidus modifiés. Ces résultats n'ont été obtenus que grâce à la détermination complète de la séquence peptidique des chaînes.

a - Etude de la partie peptidique :

α) *Etude de la chaîne κ :*

L'analyse des 2 chaînes légères κ 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 chymotryptiques, séquences des 40 premiers résidus d'acides aminés situés en position N-terminale (FAIR *et al.*, 1975).

La structure primaire complète d'une chaîne κ d'IgG₁ humaine (Fig. 11 ; p. 68) a été déterminée par EDELMAN *et al.* en 1969, celle d'une IgG₄ humaine par PINK *et al.* en 1970. Ces structures, comparées avec celle d'une chaîne κ 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.

β) *Etude de la chaîne λ :*

La structure primaire d'une chaîne légère de type λ d'IgA sériques myélomateuses a été déterminée partiellement par SHINODA *et al.*, 1970).

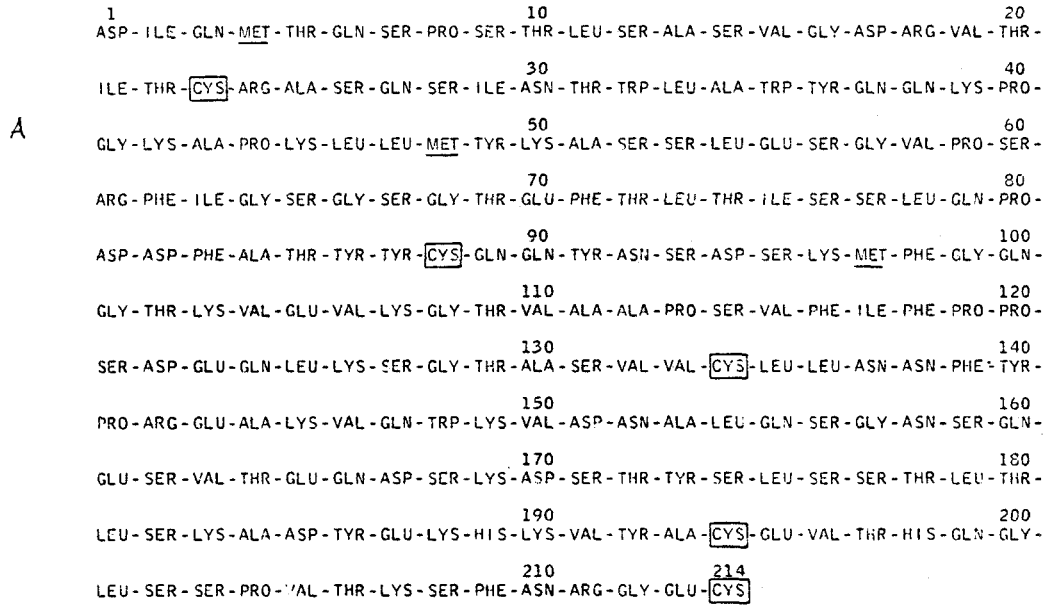


Figure 11 : A : Structure primaire d'une chaîne κ d'IgG₁ humaine d'après EDELMAN et al. (1969)
 B : Structure primaire complète d'une chaîne légère de type λ d'une IgA₁ sérique myélomateuse d'après LIU et al. (1976).



LIU *et al.* (1976) donnent la structure complète d'une chaîne légère λ (BUR) d'une IgA₁ myélomateuse : la chaîne légère possède 213 acides aminés 2 ponts disulfures intrachânes, elle est liée à la chaîne α par 1 pont disulfure au niveau de l'avant-dernier acide aminé (Fig. 11 ; p. 68).

b - Etude de la partie glycanique :

Il n'y a glycosylation des chaînes légères que dans des cas pathologiques. Les chaînes légères d'immunoglobulines sériques myélomateuses et les protéines de Bence Jones correspondantes excrétées dans l'urine contiennent des glucides (CLAMP *et al.*, 1964 ; PORTER et WEIR, 1966 ; MELCHERS *et al.*, 1966 ; GRAY *et al.*, 1967 ; EDMUNDSON *et al.*, 1968). SOX et HOOD (1970) et SPIEGELBERG *et al.* (1970) trouvent environ 15 % de glucides sur les chaînes légères de patients atteints de myélomes multiples. Dans les 5 cas étudiés (SOX et HOOD, 1970), le glycanne se trouve fixé au niveau d'une séquence Asn-X-Ser dans la zone variable des chaînes légères. L'acide aspartique n'est pas le même. Il s'agit d'un résidu 107 dans le cas d'une chaîne κ myélomateuse (SAVIDOU *et al.*, 1981) et du résidu 25 dans le cas d'une chaîne λ myélomateuse (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1981). Il existe de plus sur cette chaîne λ un site de glycosylation alcali-labile sur la sérine 21. Ces deux glycannes (Fig. 12 ; p. 70) sont localisés dans la zone hypervariable.

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 l'isotype et l'allotype de l'immunoglobuline (KUNKEL *et al.*, 1969 ; VYAS et FUDENBERG, 1969 ; TORANO et PUTNAM, 1978). En effet, pour les IgA₁ et certaines IgA₂ d'allotype A_{2m} (2), des liaisons ponts disulfures relient les chaînes légères aux chaînes lourdes et les chaînes lourdes entre elles (JERRY *et al.*, 1970). Par contre, dans certaines IgA₂ d'allotype A_{2m} (1) ces liaisons relient les chaînes légères entre elles et les chaînes

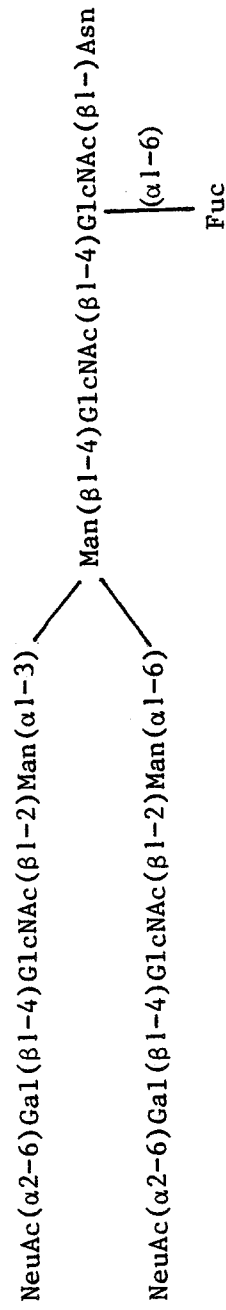
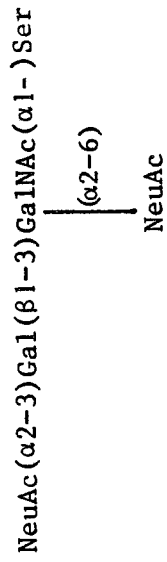


Figure 12 : Structures des glycanes d'une chaîne λ myéломateuse
(CHANDRASEKARAN *et al.*, 1981)



lourdes entre elles (Fig. 13 ; p. 72) (GREY *et al.*, 1968). L'absence de ponts disulfures est compensée par une augmentation de la force des liaisons non covalentes. Dans l'urée molaire et à pH 3, 74 % des chaînes κ et 67 % des chaînes λ d'IgA₁ réduites sont libérées alors que dans les mêmes conditions 25 % des chaînes κ et 19 % des chaînes λ des IgA₂ le sont (ZIMMERMAN et GREY, 1971).

Ces deux mêmes types de molécules existent chez d'autres mammifères : le Mouton (HEIMER *et al.*, 1969), le Chien (VAERMAN, 1970 ; HURVITZ *et al.*, 1971), le Cheval et le Porc (VAERMAN, 1970), le Lapin (CEBRA et SMALL, 1967), la Souris (ABEL et GREY, 1968).

3 - Rôle des chaînes légères : 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.

Libres dans le sang, les chaînes légères servent de marqueurs à certains désordres pathologiques (COOPER et BLUESTONE, 1968 ; EPSTEIN et TAN, 1968 ; SPRINGGS et EPSTEIN, 1974 ; SOLLING *et al.*, 1981). La concentration en chaînes légères serait en corrélation avec la gravité des désordres (SOLLING *et al.*, 1981). Elles servent de marqueurs également lors de déficience immunologique (HANNAM-HARRIS et SMITH, 1981 ; GORDON et SMITH, 1978 ; GORDON *et al.*, 1978 ; HANNAM-HARRIS *et al.*, 1980). HIBI *et al.* (1982) montrent que des plasmocytes ne synthétisant pas de chaînes légères peuvent sécréter des tétramères de chaînes α incapables de se lier au composant sécrétoire et d'être internalisés dans les cellules épithéliales.

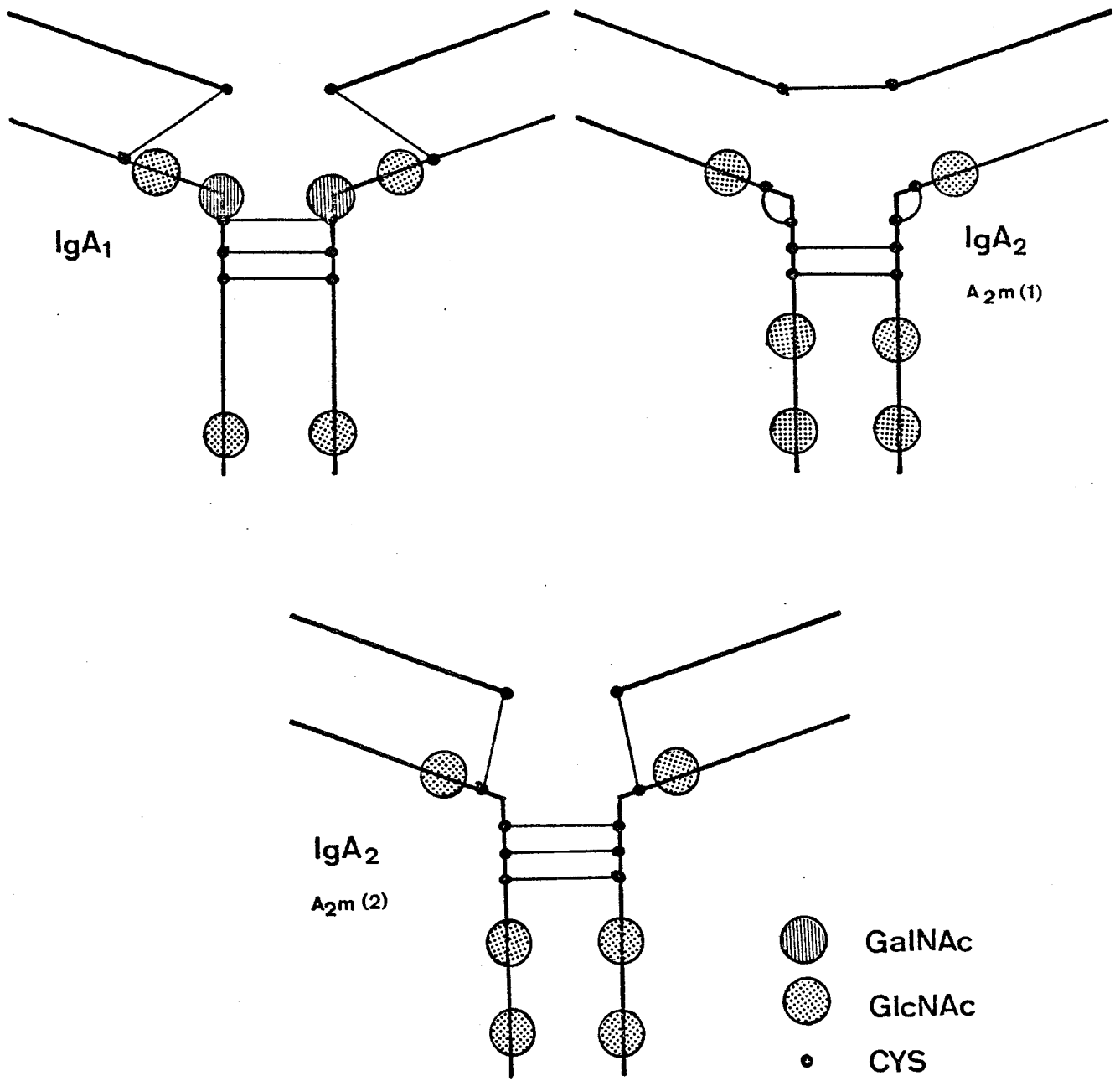


Figure 13 : Mode de liaison des chaînes légères sur les chaînes lourdes dans les deux sous-classes d'IgA. Le nombre et la position des ponts disulfures sont arbitraires (HEREMANS, 1974).



B - ETUDE DES CHAINES LOURDES

1 - Propriétés physico-chimiques : Les chaînes lourdes sont de nature glycoprotéinique. Il existe 4 chaînes lourdes dans les IgA de sécrétion de type α . La masse moléculaire des chaînes α 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 α des différents mammifères, par contre, les chaînes α libres ou associées aux membranes semblent différentes. KIKUTANI *et al.* (1981) comparent la synthèse des chaînes α de deux lignées cellulaires chez la Souris : un lymphome de cellules B exprimant des chaînes α en surface et un hybridome sécrétant des chaînes α . Ces auteurs montrent que le point isoélectrique et la masse moléculaire des deux polypeptides obtenus varient. Le polypeptide de masse moléculaire 62.000 serait le précurseur des chaînes α associées aux membranes et celui de 59.000 le précurseur des chaînes α excrétées.

2 - Etude structurale :

a - Etude de la partie peptidique :

Contrairement aux chaînes légères qui sont communes à l'ensemble des 5 isotypes, les chaînes lourdes sont différentes d'un isotype à l'autre. Les trois quarts de la chaîne (côté Ct) ont une structure relativement invariante : c'est la zone constante. Les modestes différences notées d'une chaîne à l'autre correspondent à des marqueurs allotypiques différenciant les individus entre eux. En revanche le quart restant (côté Nt) est très variable, et de même que pour les chaînes légères 3 à 4 régions hypervariables sont retrouvées situées sensiblement aux mêmes endroits que les régions hypervariables des chaînes légères (Fig. 10 ; p. 66).

La chaîne possède environ 470 acides aminés répartis en 4 domaines : le domaine V_H ou variable (110 acides aminés) et 3

domaines constants CH₁, CH₂, CH₃. Les domaines CH₁ et CH₂ sont séparés par une zone charnière ou "hinge region". Les études de ces différents domaines sont faites dans le chapitre concernant l'étude conformationnelle des sIgA.

Les différences chimiques et la présence de déterminants antigéniques spécifiques au niveau des chaînes α ont permis la subdivision en deux groupes α_1 et α_2 (KUNKEL et PRENDERGAST, 1966 ; FEINSTEIN et FRANKLIN, 1966 ; VAERMAN et HEREMANS, 1966 ; PUTNAM, 1977). Le taux des IgA₂ est plus élevé dans le colostrum que dans le sérum. Ce taux varie entre 32 % (GREY *et al.*, 1968) et 75 % (MOTA, 1977) dans le lait humain. Les travaux de ANDRE *et al.* (1978) confirment les résultats de GREY *et al.* (1968). Il y a en effet environ 35 % de plasmocytes à IgA₂ dans les muqueuses. Il y a de plus une plus grande proportion d'IgA₂ dans les IgA dimériques que dans les IgA monomériques (DELACROIX *et al.*, 1982). Deux variants allotypiques ont été caractérisés pour les chaînes α_2 : A_{2m}(2) et A_{2m}(1). La forme A_{2m}(2) prédomine dans le colostrum (JERRY *et al.*, 1972).

a) Structure primaire des chaînes α :

Ces études sont effectuées sur des IgA sériques myélomateuses. La structure primaire d'une IgA₁ a été réalisée par LIU *et al.*, 1976 ; KORTT *et al.*, 1978 et YANG *et al.*, 1979 ; d'une IgA₂ d'allotype A_{2m}(1) par TORANO *et al.*, 1977 et TSUZUKIDA *et al.*, 1979 ; d'une IgA₂ d'allotype A_{2m}(2) par TORANO et PUTNAM (1978). L'étude comparative de ces 3 chaînes α est rassemblée Fig. 14 ; p. 75. 14 résidus d'acides aminés diffèrent entre l'allotype A_{2m}(1) et la chaîne α_1 . Ces résidus sont conservés dans l'allotype A_{2m}(2). Les chaînes α_2 diffèrent par 6 résidus d'acides aminés cependant communs à la chaîne α_1 et à la chaîne α_2 de l'allotype A_{2m}(2). Les deux premiers changements sont situés dans le domaine CH₁ et les quatre autres dans le domaine CH₃. La chaîne A_{2m}(1) apparaît être une chaîne hybride ayant une identité du domaine CH₃ avec la chaîne α_1 et une identité des domaines CH₁ et CH₂ et de la zone charnière avec l'allotype A_{2m}(2) (TSUZUKIDA *et al.*, 1979).

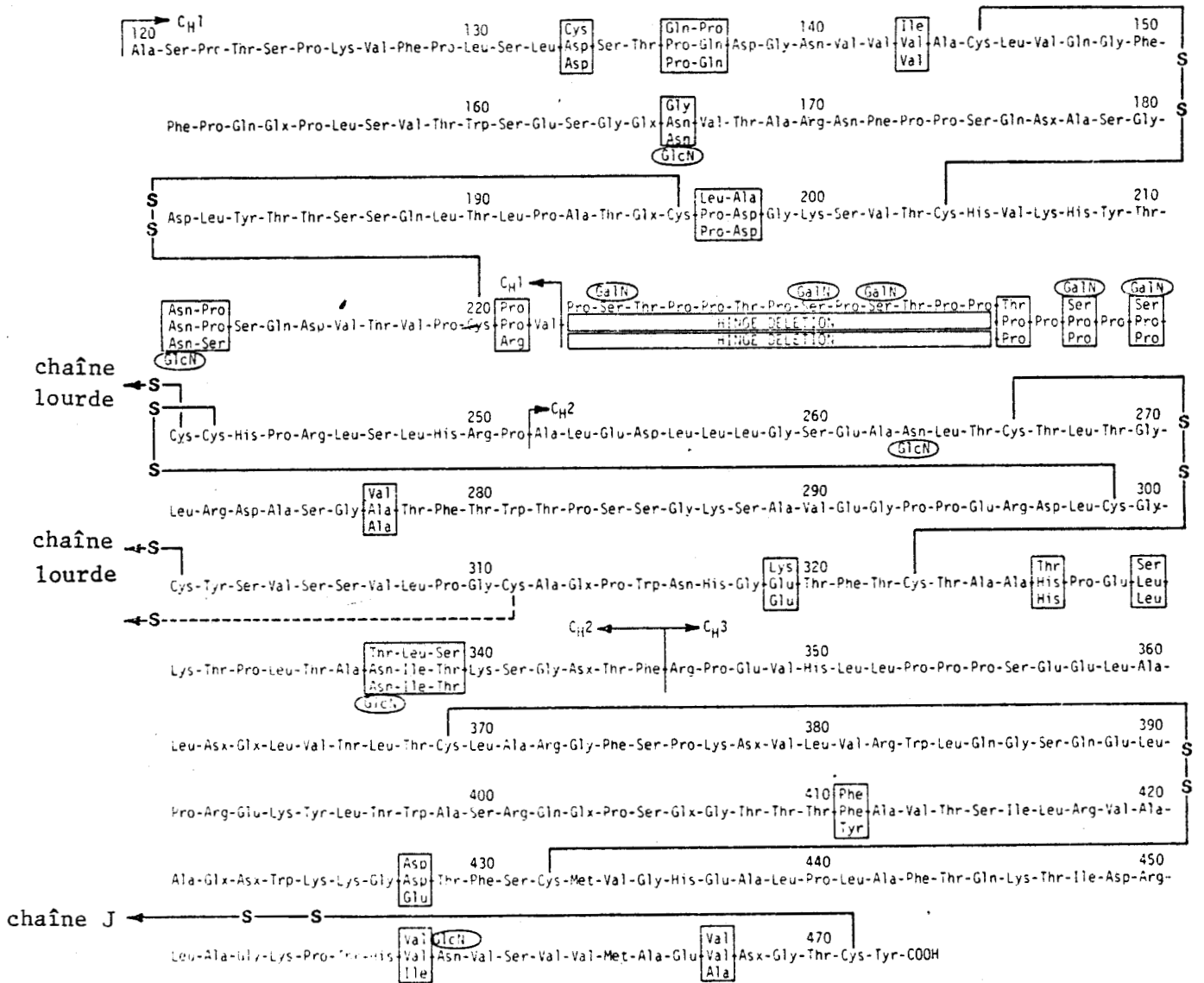


Figure 14 : Structure primaire d'une chaîne α_2 (IgA₂ allotype $A_{2m}(2)$), d'une chaîne α_1 comparée à une chaîne α_2 (IgA₂ allotype $A_{2m}(1)$), d'après TSUZUKIDA et al. (1979).

BMS
LILLE

De plus, le polymorphisme des IgA apparaît être restrictif. Les deux allotypes $A_{2m}(2)$ et $A_{2m}(1)$ s'excluent mutuellement comme le montre Van LOGHEM *et al.* (1976). Cette hétérogénéité des molécules d'IgA a été étudiée, deux modèles de l'évolution des chaînes α ont été proposés par MOTA en 1979.

β) Structure de la "hinge region" :

Les études structurales effectuées par FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) sur des IgA₁ et IgA₂ sériques myélomateuses, nous fournissent des renseignements très intéressants sur la structure primaire des chaînes α_1 et α_2 . Ainsi, ils isolent un fragment qui contient la "hinge region" ou zone charnière, cette région est constituée par environ 30 acides aminés situés au centre de la chaîne α . Elle renferme de nombreux résidus de proline concentrés dans cette zone qui lui confèrent une grande flexibilité et permettent la mobilité des fragments Fab (antigen-binding), de plus c'est à ce niveau que se situent les ponts disulfures qui relient les chaînes α entre elles (Fig. 15 ; p. 77).

L'étude comparée de la séquence en acides aminés de la "hinge region" d'une IgA₁ et une IgA₂, effectuée par ces auteurs, montre qu'il existe une délétion importante à ce niveau dans la chaîne α_2 . Il manque, en effet, 12 à 13 acides aminés en particulier des résidus de sérine et de thréonine, Fig. 15 ; p. 77. Les études de WOLFENSTEIN-TODEL *et al.* (1973) montrent que ces acides aminés de la zone charnière participent à la formation des 2 ponts disulfures intracaténaires. La zone charnière des chaînes α_1 comporte une double séquence identique de 8 acides aminés, ce qui suggérerait qu'elle résulte de l'insertion d'un segment génétique partiellement dupliqué ou même tripliqué d'après FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) et MULKS *et al.* (1980).

γ) Structure du peptide de "queue" :

Il existe dans les chaînes α et μ une séquence de 20 acides aminés C terminaux faisant défaut sur les autres immunoglobu-

lines, appelées "peptide de queue" (HEREMANS, 1974). L'octapeptide C-terminal des chaînes α_1 et α_2 est identique et contient comme avant-dernier acide aminé la 17ème cystéine impliquée dans la polymérisation.

δ) Structure secondaire des chaînes α :

La chaîne α renferme un grand nombre de résidus de cystéine qui permet la formation de ponts disulfures intrachânes et interchânes (Fig. 16 ; p. 79). La séquence complète de 2 myélomes à α_1 (KRATZIN *et al.* ., 1975 ; LIU *et al.*, 1976) a permis de localiser l'emplacement des résidus cystéinyles qui sont au nombre de 17. Huit correspondent à 4 ponts S-S formant les 4 domaines : V_H (1-2) ; CH_1 (4-6) ; CH_2 (10-14) et CH_3 (15-16). Le cystéinyl n° 3 (acide aminé 130) est responsable de la liaison chaîne légère - chaîne lourde, les cystéinyles 8 et 12 relient les deux chaînes lourdes entre elles. Il existe, de plus 2 ponts S-S intracaténaux supplémentaires (5-7) et (9-11) qui relient la région charnière au fragment Fab et au domaine CH_2 . Les résidus 13 (situés entre CH_2 et CH_3) et 17 (situés en pénultième position du côté C-terminal) seraient impliqués dans la fixation covalente des monomères au composant sécrétoire ou à la chaîne de jonction.

b - Etude de la partie glycanique :

α) Nature de la partie glycanique :

Les premières études effectuées sur la partie glycanique des IgA ont été faites sur les IgA sériques myélomateuses. Les sIgA 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-acétylglucosamine, 6 résidus de N-acétylgalactosamine et 5 résidus d'acide N-acétylneuraminique. Tous ces résidus sont distribués en oligosaccharides fixés sur la chaîne α , répartis en deux types de glycannes : les alcali-labiles liés à la sérine et les alcali-stables liés à l'asparagine.

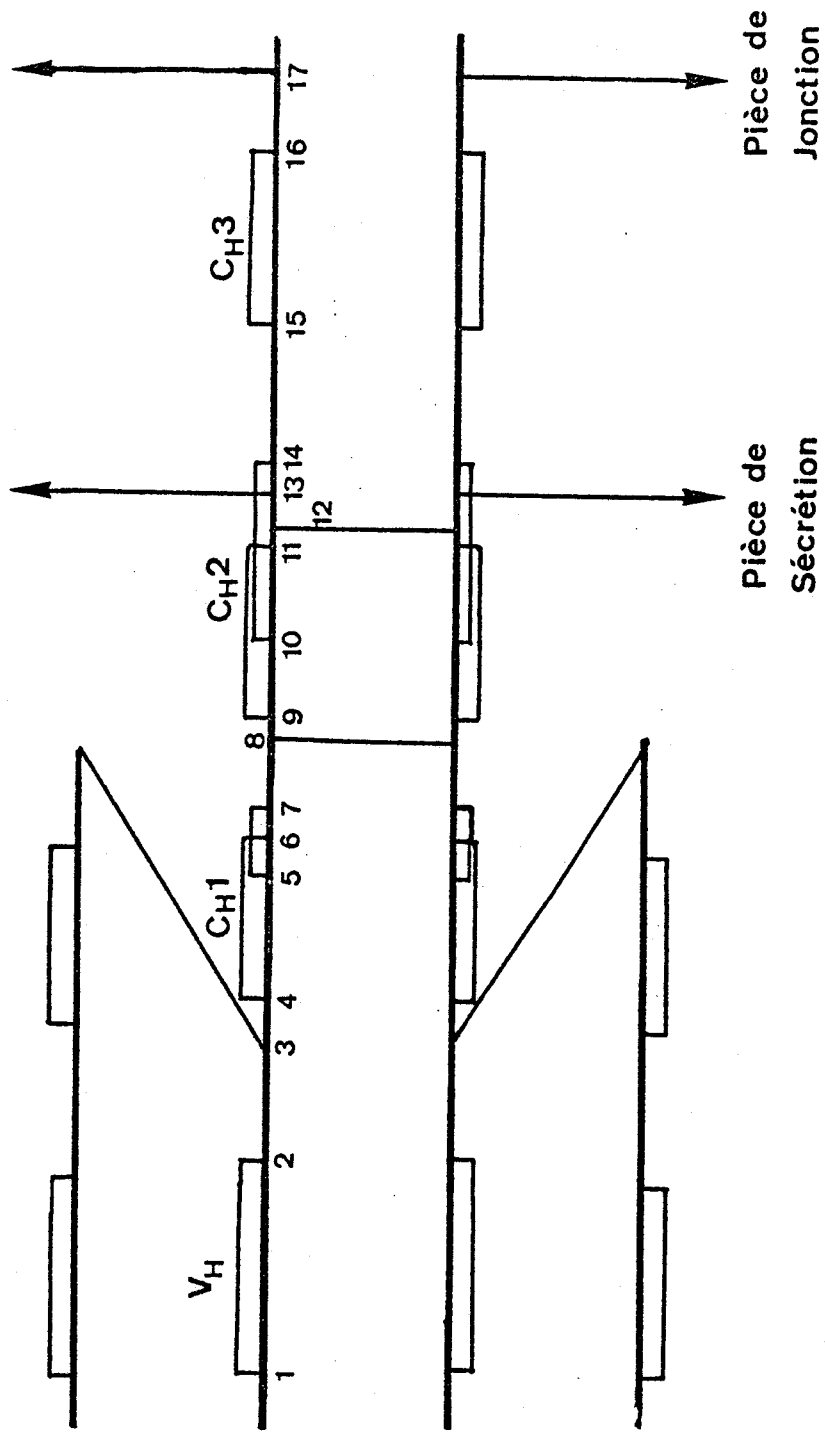


Figure 16 : Position des ponts disulfures sur la molécule d'IgA₁
(KRATZIN *et al.*, 1975 ; LIU *et al.*, 1976).

En 1974 (a et b), BAENZIGER et KORNFELD notent l'existence de 5 glycanes de type O-glycosidique dans des IgA₁ sériques myélomateuses. 4 d'entre eux ont la structure suivante : Gal(β1-3)GalNAc, le cinquième ne possède qu'un résidu de N-acétylgalactosamine (Fig. 17 ; p. 81). Ils décrivent, d'autre part, la structure des glycanes liés N-glycosidiquement à la protéine (Fig. 17 ; p. 81), seule la structure du glycopeptide II_A a été établie avec certitude.

Les études statistiques de TOMANA *et al.* (1976) sur les sous-classes IgA₁ et IgA₂ montrent que dans les IgA₁ le nombre de résidus de galactose est identique à celui d'acide N-acétyl neuraminique. Pour les IgA₂, il est différent, quand le nombre de résidus de galactose augmente, celui de l'acide N-acétyl neuraminique diminue.

La fraction glucidique des IgA de sécrétion a été beaucoup moins étudiée. En 1968, DESCAMPS *et al.* effectuent leurs travaux sur des IgA lactées humaines. Ils mettent en évidence l'existence de 7 glycanes environ de masse moléculaire 1.800 liés O-glycosidiquement à la protéine, 3 à des résidus de sérine et 4 à des résidus de thréonine. Les autres glycanes de masse moléculaire moyenne 3.000 sont liés N-glycosidiquement à la protéine. En 1974, DESCAMPS donne les compositions molaires moyennes des glycanes alcali-labiles et alcali-stables. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau IX ; p. 82).

Il faut signaler les différences importantes qui existent au niveau de la fraction alcali-labile des IgA sériques et de celle des IgA du lait de Femme. Les résultats de DESCAMPS (1974) laissent prévoir l'existence de structures O-glycosidiques beaucoup plus complexes que celles décrites par BAENZIGER et KORNFELD (1974a) (Fig. 17 ; p. 81).

β) 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

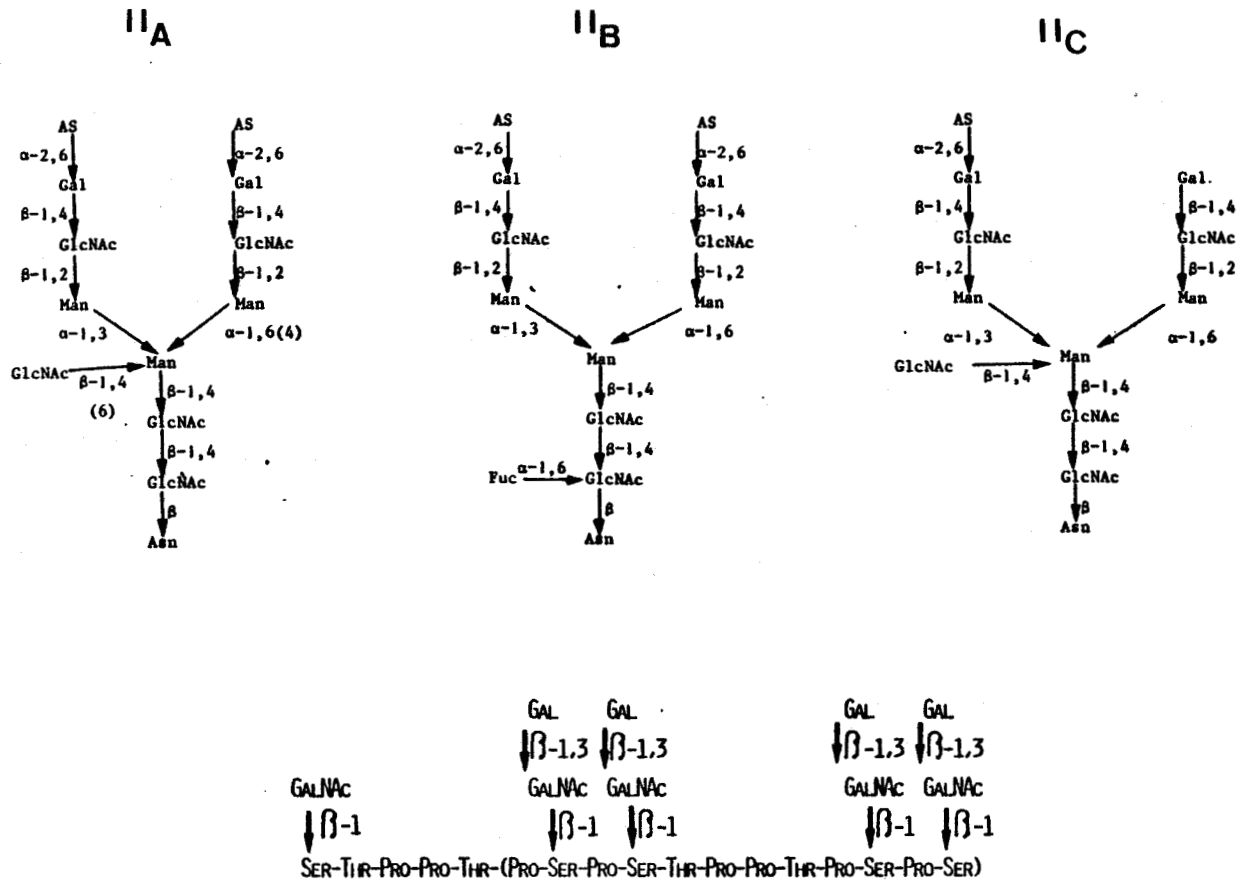


Figure 17 : Structures des glycopeptides II_A, II_B, II_C et site de glycosylation des 5 glycannes liés O-glycosidiquement à la zone charnière des IgA₁ sériques myélomateuses (BAENZIGER et KORNFIELD, 1974a, 1974b).



TABLEAU IX

COMPOSITIONS MOLAIRES MOYENNES DES GLYCANNES A LIAISONS ALCALI-STABLES
ET ALCALI-LABILES DES IgA LACTEES D'APRES DESCAMPS (1974).

Nature des oses	Glycannes à liaisons	
	alcali-stables	alcali-labiles
Fuc	1	1
Gal	1 à 2	4
Man	5	0
GlcNAc	6	1 à 2
GalNAc	0	1
NeuAc	1	1 à 2
Masse moléculaire	3.000	1.800



IgA₁ est la seule à posséder à la fois des liaisons N- et O-glycosidiques. Pour les IgA₁ (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 α_2 l'allotype A_{2m}(2) (protéine BUT) et l'allotype A_{2m}(1) (protéine LAN) la délétion au niveau de la "hinge region" entraîne l'absence des O-glycanes. Deux des N-glycanes présents dans la chaîne α_1 subsistent. Il existe, d'autre part, en plus, trois oligosaccharides pour A_{2m}(2) et deux de plus pour A_{2m}(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. 18 ; p. 84. La localisation des oligosaccharides sur les chaînes α est étudiée de manière comparative pour une chaîne γ d'une IgG humaine (EDELMAN *et al.*, 1969), une chaîne μ d'une IgM humaine (SHIMIZU *et al.*, 1971 ; PUTNAM *et al.*, 1973), une chaîne ϵ d'une IgE humaine (BENNICH et BAHR-LINDSTROM, 1974) et une chaîne δ d'une IgD humaine (DEBUIRE et PUTNAM, 1982).

3 - Rôle des chaînes lourdes

a - Rôle de la partie peptidique :

Le comportement différent des IgA aux attaques protéolytiques peut être dû aux différences structurales existantes entre les chaînes α_1 et α_2 . La perte de la zone charnière chez les IgA₂ pourrait rendre cette molécule plus résistante. La délétion pourrait entraîner un changement de configuration qui diminuerait l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Ce changement de conformation pourrait également être en relation avec l'absence de ponts disulfures

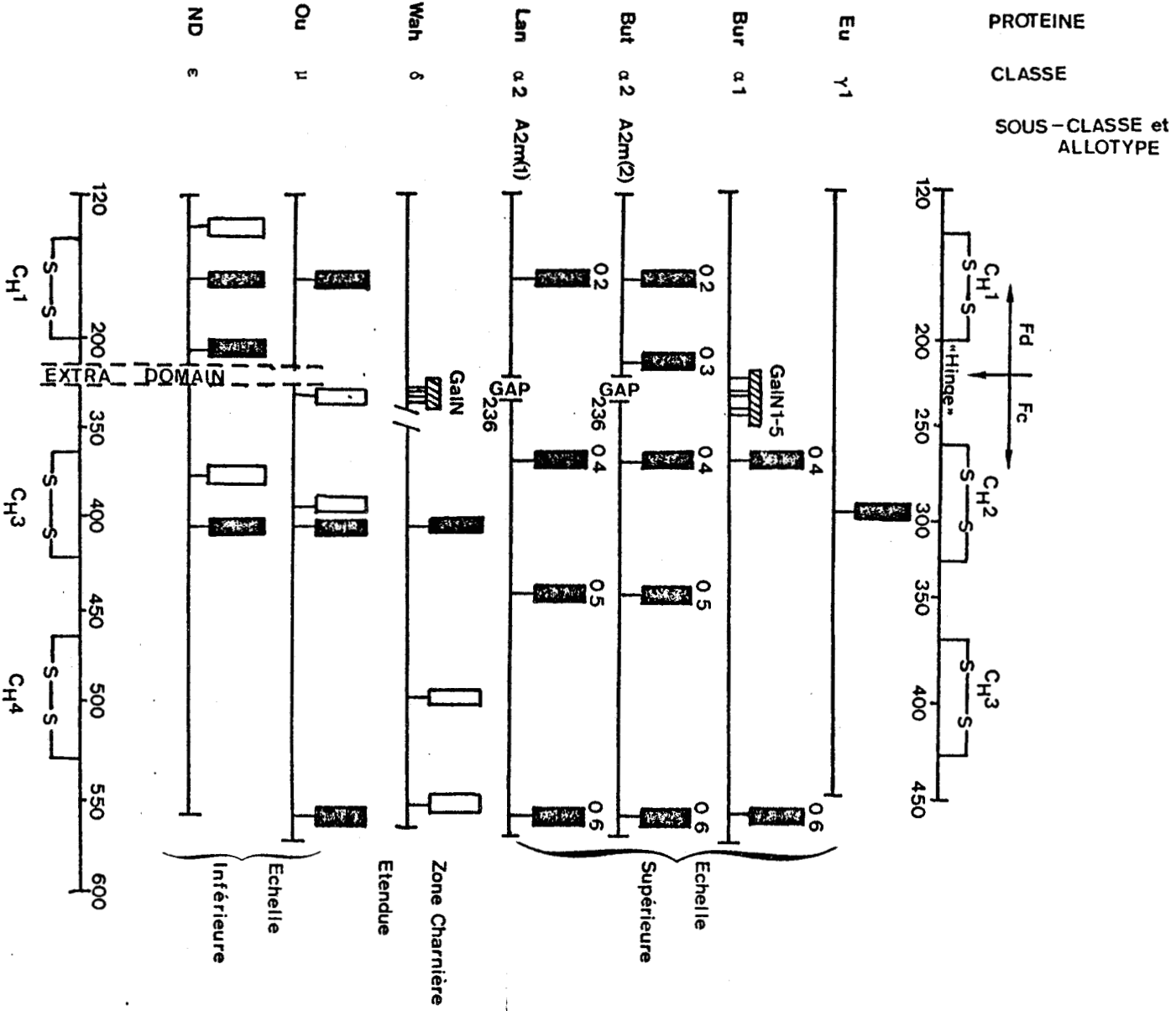


Figure 18 : Localisation des glycanes sur la chaîne lourde d'une IGM, d'une IGE, d'une IGD, d'une IGG et de 3 IGA : IGA₁, IGA₂ (A2m(1)) et IGA₂ (A2m(2)) selon TORANO et al. (1977) et DEBUIRE et PUTNAM (1982).

RHS
LITE

Glycane dont la position est conservée dans 2 ou plusieurs chaînes.

interchaînes (MOTA, 1977). De plus, la zone charnière permet la grande flexibilité de la molécule. Elle délimite sur la molécule d'IgA, deux fragments : le premier (Fab) qui participe avec la chaîne légère à la formation du site anticorps et le second cristallisable (Fc) qui possède de nombreuses autres fonctions dont 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 et jouent un rôle d'espaceur entre les domaines (Fig. 19 ; p. 86). Ils seraient impliqués dans les mouvements intracellulaires des glycoprotéines et dans leur sécrétion (MELCHERS, 1973 ; WEITZMAN et SCHARFT, 1976 ; HICKMAN *et al.*, 1977). L'hydrophilie des sIgA due à leur forte teneur glucidique pourrait être impliquée dans le phénomène de non-précipitabilité de cet anticorps (HEREMANS, 1974).

La présence des glycanes à des positions homologues dans les immunoglobulines humaines et animales (Fig. 18 ; p. 84) n'indique pas seulement que la séquence acceptrice a été conservée en face des grands changements de la structure primaire des immunoglobulines des différentes classes et espèces, mais suggère aussi que le maintien de leur position a une signification structurale et fonctionnelle.

C - ETUDE 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 (PARKHOUSE, 1972 ; HALPERN et COFFMAN, 1972 ; RAAM et INMAN, 1973) et ne présente aucune homologie structurale avec les chaînes légères et les chaînes lourdes.

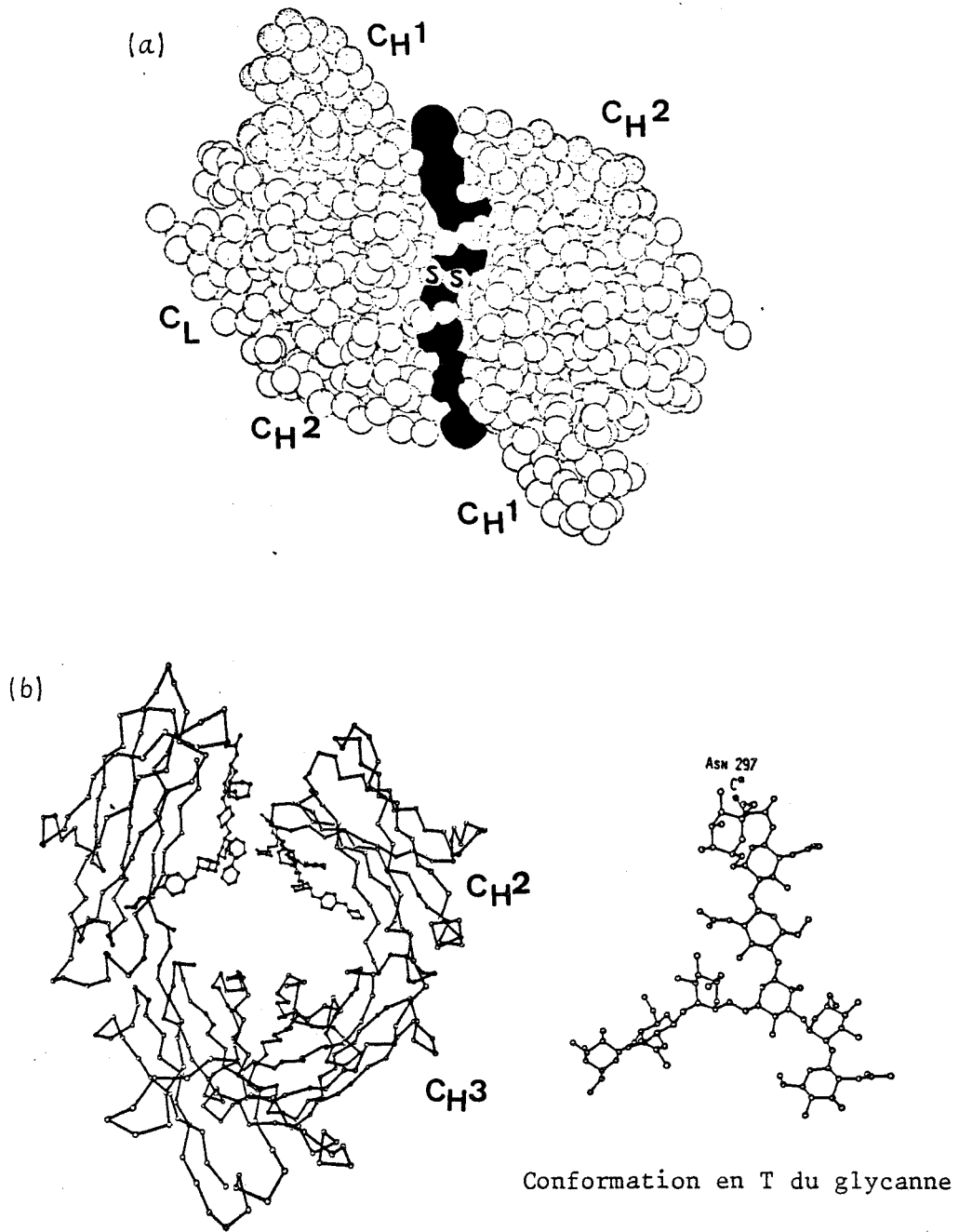


Figure 19 : Les glycannes ont un rôle d'espaceurs entre les domaines :

(a) SILVERTON et al. (1977)

(b) HUBER (1980)



Elle est appelée "J chain" (joining chain) car de nombreux auteurs lui ont attribué un rôle dans la polymérisation (MORRISON et KOSHLAND, 1972 ; HALPERN et COFFMAN, 1972 ; PARKHOUSE et DELLA CORTE, 1973 ; DELLA CORTE et PARKHOUSE, 1973 ; CHAPUIS et KOSHLAND, 1974 ; 1975 ; HAUPTMAN et TOMASI, 1975).

Elle est associée covalamment 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 b 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).

Les travaux de BRANDTZAEG (1976a) 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. Les immuns séra anti-chaîne J humaine réagissent fortement avec les chaînes J provenant de toutes les espèces animales ce qui implique une inhabituelle stabilité dans l'évolution de ce polypeptide.

1 - Préparation de la chaîne de jonction : Les méthodes d'isolement de la chaîne J commencent évidemment par la coupure des ponts disulfures qui lient cette chaîne au polymère. Ceci est fait par réduction-alkylation ou bien par sulfitolyse (FRANEK et ZIKAN, 1964). 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.*, 1972b ; 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 - Propriétés physico-chimiques : 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 d'autres auteurs : KOWNATZKI et BAHR (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. Son coefficient d'extinction est de $E \frac{1\%}{280} = 6,35$.

3 - Etude structurale :

a - Etude de la partie peptidique :

La chaîne J renferme 129 acides aminés. Le résidu N-terminal est bloqué comme dans la plupart des chaînes lourdes. Elle ne contient pas de tryptophane, son taux élevé d'acides aspartique et glutamique lui confère un caractère acide. La chaîne J contient 8 cystéines dont 2 sont reliées aux chaînes lourdes (MORRISSON et KOSHLAND, 1972 ; ZIKAN, 1973 ; MESTECKY *et al.*, 1974). La structure primaire complète d'une chaîne J provenant d'une IgM a été réalisée par MOLE *et al.* (1977) (Fig. 20 ; p. 89).

b - Etude de la partie glycanique :

La chaîne J renferme 7,5 % de glucides (NIEDERMEIER *et al.*, 1972 ; MESTECKY *et al.*, 1972a) répartis en une seule chaîne glycanique de type N-acétyllactosaminique (BAENZIGER, 1979) (Fig. 21 ; p. 90) qui existe sous trois formes et qui diffère par la quantité d'acide sialique. Le glycanne est localisé sur l'acide aspartique 43 conférant à cette portion de la molécule un caractère hydrophile.

c - Etude conformationnelle :

En 1974, MESTECKY *et al.*, isolent à partir de la chaîne J

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



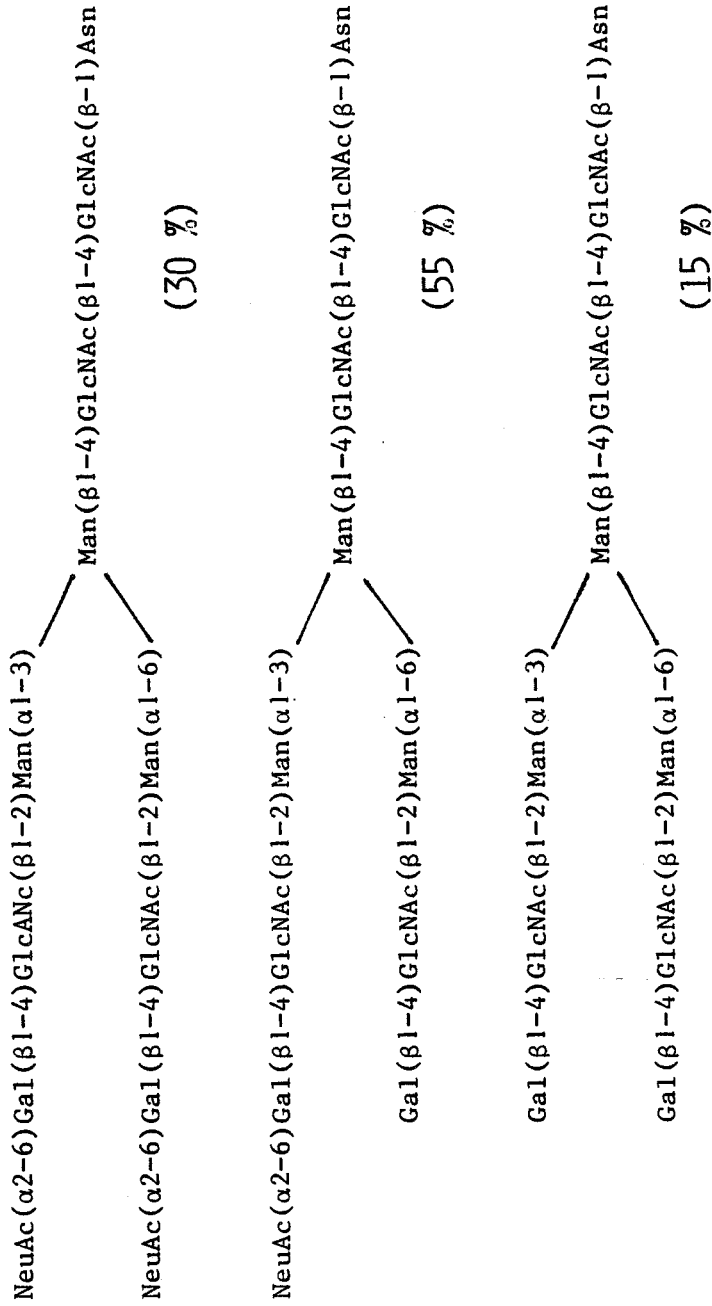


Figure 21 : Structure des trois variants glycaniques de la chaîne J d'une IgM (BAENZIGER, 1979). Le pourcentage relatif à chacun des glycanes est donné entre parenthèses.



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 α . La chaîne J est liée à l'avant-dernier acide aminé de l'octapeptide. Le site d'attachement de la chaîne J aux IgA est représenté à la figure 22 ; p. 92. L'étude structurale de la pièce de jonction isolée d'anticorps de Souris (CANN *et al.*, 1982) montre de nombreuses homologues avec la pièce J humaine. La pièce de jonction serait composée de deux domaines. Le domaine Nt contenant le glycanne serait hydrophile et posséderait une structure β plissée sur 3 zones et une portion de structure inorganisée. Le second domaine (Ct) contient de nombreux acides aminés hydrophobes, 2 ponts disulfures intracaténaires. Il posséderait 3 segments ayant une structure hélicoïdale (Fig. 23 ; p. 93).

4 - Rôle de la pièce de jonction : La pièce de jonction pourrait intervenir lors de la polymérisation des immunoglobulines. Elle n'est présente que dans les anticorps polymériques, elle est synthétisée par les plasmocytes produisant les IgA et les IgM polymériques, elle est covalamment attachée à l'avant dernier résidu de cystéine des chaînes α et μ . Ce rôle est discuté car l'existence de molécules pentamériques d'IgM sans chaîne J montre qu'elle ne serait pas nécessaire à la polymérisation (STOTT, 1976). Les expériences de repolymérisation *in vitro* des monomères en présence ou en absence de chaîne J n'ont pas été concluantes (KOWNATSKI, 1973 ; BEALE, 1974 ; ESKELAND, 1974), bien que PARKHOUSE et DELLA CORTE (1973) montrent que la polymérisation des IgA et des IgM peut s'effectuer en présence de la chaîne J et d'un enzyme du foie qui permet l'échange des ponts disulfures.

La chaîne J serait impliquée dans l'assemblage des molécules d'anticorps à partir des chaînes lourdes et légères. Le fait que la pièce J soit présente dans le compartiment intracellulaire des plasmocytes produisant des anticorps monomériques (BRANDTZAEG, 1974 a ; KAJI

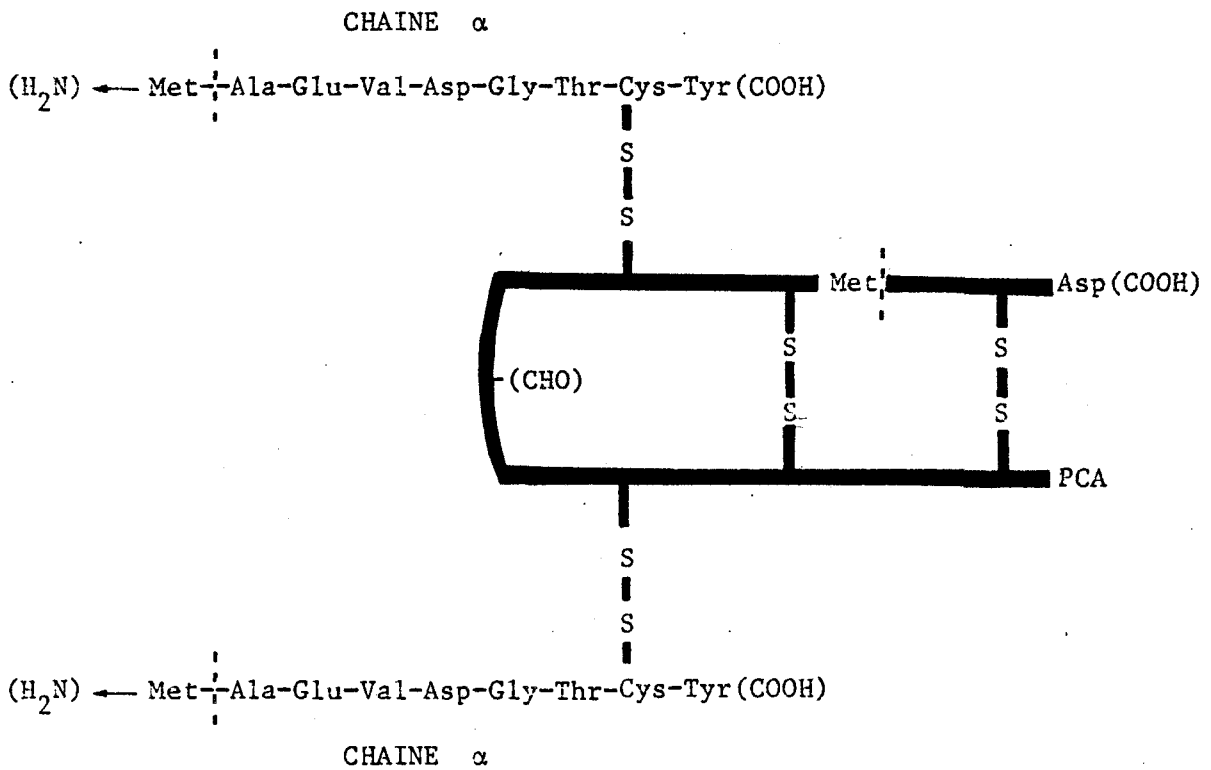


Figure 22 : Site d'attachement de la chaîne J à la molécule polymérique d'IgA humaine, d'après MESTECKY et al. (1974).



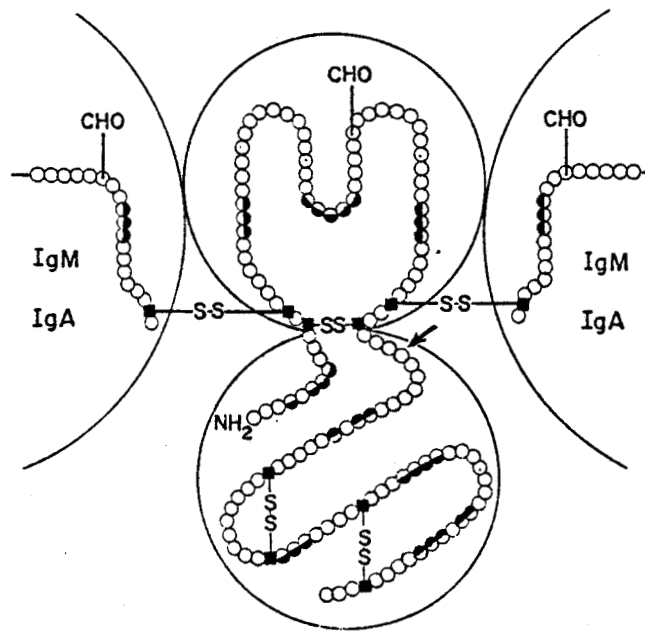


Figure 23 : Modèle structural de la chaîne J proposant l'existence de 2 domaines : un domaine hydrophile N-terminal et un domaine hydrophobe C-terminal (CANN et al., 1982).

- Acides aminés hydrophobes
- Résidus de cystéine
- ➔ Liaison peptidique hypersensible à la subtilisine



et PARKHOUSE, 1974 ; BRANDTZAEG et BERDAL, 1975 ; BRANDTZAEG, 1976a ; MESTECKY *et al.*, 1977 ; SARASOMBATH *et al.*, 1977 ; MOSMANN *et al.*, 1978 ; BRANDTZAEG *et al.*, 1979), et qu'elle ne soit jamais présente dans les immunoglobulines de surface suggère pour cette protéine un rôle dans l'assemblage des anticorps (MESTECKY *et al.*, 1977). Ces auteurs ont montré qu'une molécule d'IgA₁ monoclonale sans pont disulfure interchaîne avait été synthétisée par des cellules qui ne semblaient pas contenir de chaîne J.

La chaîne J pourrait également jouer un rôle lors de l'externalisation des anticorps (MESTECKY *et al.*, 1980b). En effet, la pièce de jonction serait additionnée peu avant ou durant la sécrétion. Il a cependant été décrit que les cellules de patients atteints de myélome non-sécréteur synthétisaient la pièce de jonction. Enfin, KAJI et PARKHOUSE (1975) décrivent l'existence de protéines monoclonales excrétées bien que les plasmocytes ne soient pas capables de produire la chaîne J.

La seule fonction bien établie de la pièce de jonction concerne la formation des immunoglobulines de sécrétion à partir d'un polymère d'IgA ou d'IgM et de la pièce de sécrétion (ESKELAND et BRANDTZAEG, 1974 . RADL *et al.*, 1974 ; BRANDTZAEG, 1976b), la quantité de pièce de sécrétion fixée est d'ailleurs en relation directe avec la quantité de chaîne J présente (BRANDTZAEG, 1976b). L'association covalente de la chaîne J aux chaînes lourdes modifie probablement la conformation des chaînes α permettant l'accès à la pièce de sécrétion (MESTECKY *et al.*, 1974). Des altérations de la conformation des chaînes α pourraient expliquer pourquoi certaines IgA dimériques sans pièce de jonction se lient au composant sécrétoire (TOMASI et CZERWINSKI, 1976).

La pièce de jonction pourrait contrôler l'immunité humorale ou la différenciation des cellules B. Des expériences *in vitro* indiquent que l'activation des cellules B inclue un signal de la syn-

thèse *de novo* des chaînes J (MATHER et KOSHLAND, 1977 ; MESTECKY *et al.*, 1977 ; RASCHKE *et al.*, 1979). L'expression cytoplasmique de la chaîne J a lieu bien avant celle des immunoglobulines (NAGURA *et al.* (1979). La pièce J de sécrétion est présente dans tous les lymphocytes normaux sécrétant des IgM et des IgA polymériques. Elle est retrouvée dans des plasmocytomes de Souris (PARKHOUSE, 1972), dans les plasmocytes normaux humains synthétisant des IgG, IgA, IgM et IgD (BRANDTZAEG, 1974a ; 1976c ; BRANDTZAEG *et al.*, 1979 ; KORSRUD et BRANDTZAEG, 1980a) dans les cellules blastiques activées des centres germinatifs des follicules de l'amygdale produisant des IgG (BRANDTZAEG et BERDAL, 1975) et dans les cellules malignes productrices d'IgG (BRANDTZAEG et BERDAL, 1975). La synthèse de la chaîne J serait déclenchée dans les lymphocytes B immatures à partir de la phase précoce de la stimulation antigénique (BRANDTZAEG, 1976c). La pièce J, non sécrétée des plasmocytes à IgG, serait stockée puis dégradée (MOSMANN *et al.*, 1978). La pièce de jonction semble donc bien être un marqueur des lymphocytes B dans les premiers stades de la différenciation (KORSRUD et BRANDTZAEG, 1981). Il ressort de cette étude que la production de monomères et de dimères représente un stade différent du développement de la même population cellulaire (BRANDTZAEG, 1976c ; BRANDTZAEG *et al.*, 1979 ; KORSRUD et BRANDTZAEG, 1981b). MASON et STEIN (1981) ont trouvé des cellules de lymphomes qui synthétisent de la chaîne J sans produire d'anticorps. Ceci semble confirmer que les lymphocytes B peuvent synthétiser la chaîne J sans produire simultanément des immunoglobulines, contrairement aux observations de MESTECKY *et al.* en 1977.

D - ETUDE DE LA CHAÎNE DE SECRETION

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, 1974b ; FOGER et LAMM, 1974).

Elle existe sous trois formes : libre dans les milieux biologiques, intégrée aux membranes des cellules épithéliales ou de l'hépatocyte, conjuguée aux IgA ou aux IgM polymériques. Elle est le récepteur membranaire des anticorps polymériques.

1 - Localisation, caractérisation, propriétés physico-chimiques :

a - Etude de la pièce de sécrétion libre des milieux biologiques :

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

Le taux le plus élevé de pièce de sécrétion libre se trouve dans le colostrum. En effet, pour 100 ml de milieu biologique, il existe 1,2 ; 3 ; 40 et 209 mg de pièce de sécrétion respectivement dans la sécrétion parotidienne, dans la salive, dans le lait de Femme et dans le colostrum humain.

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, 1974c ; WEICKER et UNDERDOWN, 1975 et UNDERDOWN *et al.*, 1977. Les derniers auteurs utilisent la chromatographie d'affinité sur colonne d'IgM-Sepharose. Il faut signaler qu'un des principaux contaminants des préparations de pièce de sécrétion est la lactotransferrine, de masse moléculaire très voisine qui forme de nombreux complexes.

La dernière étape de purification est souvent une chromatographie d'affinité sur IgA polymérisées immobilisées (UNDERDOWN et SOCKEN, 1978).

β) *Propriétés physico-chimiques :*

Elle a un coefficient de sédimentation $S_{20,w}^{\circ}$ d'environ 4,3 ; et un coefficient d'extinction molaire $E_{280}^{1\% \text{ p. } 100 \text{ nm}}$ d'environ 12,66 (KOBAYASHI, 1971). Sa masse moléculaire est d'environ 80.000. Elle présente, en effet, une hétérogénéité de masse (ALTAMIRANO *et al.*, 1980 ; KÜHN et KRAEHEBUHL, 1981) : 65.500 - 70.800 dans la bile de Rat ; 55.000 - 83.000 dans la sécrétion lactée du Lapin ; 73.200 - 80.400 dans le lait humain et une hétérogénéité de charge : le pHi varie de 4,25 (bile de Rat) à 4,12 (lait humain).

γ) *Etude structurale de la partie peptidique*

L'étude comparative de la composition en acides aminés des chaînes sécrétoires libres ou liées est rassemblée dans le Tableau X ; p. 98. Elle montre que ces deux protéines sont identiques. La pièce de sécrétion ne possède pas de méthionine, cette absence est intéressante et peut servir de critère de pureté. Le nombre de groupements thiols est élevé, il permet une stabilisation par covalence de la molécule avec le dimère d'IgA (BRANDTZAEG, 1974d). D'après LAMM et GREENBERG (1972), il n'y aurait pas de SH libre mais un pont disulfure labile grâce auquel cette molécule se fixerait aux IgA dimériques. Le taux de glyco-colle très élevé (10 % des acides aminés totaux) confère à la pièce de sécrétion une structure flexible.

La séquence NH_2 terminale de la pièce de sécrétion de nombreux mammifères est identique (KOBAYASHI, 1971 ; Van MUNSTER *et al.*, 1971 ; LAMM et GREENBERG, 1972 ; BRANDTZAEG, 1974e ; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 1974 ; SLETTEN *et al.*, 1975 ; THOMPSON *et al.*, 1975 ; LABIB *et al.*, 1976). Il s'agit de la séquence suivante :

Lys-X-Pro-Ile-Phe-Gly-Pro-Glu-Glu-Val

TABLEAU X

COMPOSITION EN ACIDES AMINES
DE LA PIECE DE SECRETION LIBRE ET LIEE

Acides aminés	Moles p. 100	Pièce de sécrétion libre	Pièce de sécrétion liée
		SLETTEN <i>et al.</i> 1975	LAMM et GREENBERG 1972
Asp		10,7	9,9
Thr		5,6	6,1
Ser		8,0	9,8
Glu		11,0	10,9
Pro		5,3	5,4
Gly		9,8	9,6
Ala		6,1	5,4
Cystine/2		3,3	2,5
Val		8,7	9,1
Met		0	0
Ile		3,9	3,1
Leu		9,1	9,2
Tyr		4,0	3,5
Phe		3,2	3,0
Trp		N.D.	2,0
Lys		5,5	4,8
His		0,9	1,0
Arg		4,9	4,6



N.D. : non déterminé

δ) *Etude structurale de la partie glucidique :*

La pièce de sécrétion de masse moléculaire 80.000 daltons renferme environ 20 % de glucides (LAMM et GREENBERG, 1972 ; SLETTEN *et al.*, 1975 ; PURKAYASTHA *et al.*, 1979). 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 7 à 8 glycannes par pièce de sécrétion. Les résultats de la composition molaire montrent l'absence de résidus de N-acétylgalactosamine (KOBAYASHI, 1971 ; van MUNSTER *et al.*, 1971 ; PURKAYASTHA *et al.*, 1979). Récemment MIZOGUCHI *et al.* (1982) ont décrit les structures des glycannes présents dans la pièce de sécrétion. Ce sont tous des glycannes de type N-acétyllactosaminique sialylés ou non, fucosylés ou non, biantennés possédant parfois des résidus de fucosyl N-acétyllactosamine supplémentaires (Fig. 24 ; p.100).

b - Etude de la pièce de sécrétion membranaire :

La pièce de sécrétion est localisée au niveau de la membrane basolatérale de nombreuses cellules épithéliales : l'entérocyte (BROWN *et al.*, 1976 ; 1977 ; BRANDTZAEG et BAKLIEN, 1976 ; ISOBE *et al.*, 1977 ; CRAGO *et al.*, 1978), le mammocyte (KRAEHEBUHL *et al.*, 1975 ; HALSEY *et al.*, 1980), les cellules des muqueuses bronchique (MARTINEZ-TELLO *et al.*, 1968 ; TOURVILLE *et al.*, 1969 ; GOODMAN *et al.*, 1981), colonique (CRAGO *et al.*, 1978 ; HARRIS et SOUTH, 1981 ; HUANG *et al.*, 1976 ; NAGURA *et al.*, 1979), urinaire (TOURVILLE *et al.*, 1969 ; LEMAITRE-COELHO *et al.*, 1977), génitale (OGRA *et al.*, 1972 ; TOURVILLE *et al.*, 1970), dans les cellules des glandes exocrines (LAMM, 1976 ; TOMASI et GREY, 1972 ; FRANKLIN *et al.*, 1973). Elle est trouvée également dans la membrane hépatocytaire de Rat (HOPF *et al.*, 1978 ; ORLANS *et al.*, 1978 ; JACKSON *et al.*, 1978 ; ZEVENBERGEN *et al.*, 1980), de Lapin (MOSTOV *et al.*, 1980). Le taux de pièce de sécrétion dans les membranes est difficilement appréciable. Il y aurait de 260 à 7000 sites sur la cellule mammocytaire de Lapin (KÜHN et KRAEHEBUHL, 1979a) et au moins 200.000 sur l'hépatocyte de Lapin (KÜHN et KRAEHEBUHL, 1981).

BUS
LILLE

α) Préparation de la pièce de sécrétion membranaire :

La pièce de sécrétion a été isolée des membranes plasmiques d'hépatocytes et de mammocytes de Lapin par solubilisation dans le désoxycholate de sodium et par immuno-adsorption (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1981).

β) Propriétés physico-chimiques :

La pièce de sécrétion membranaire de Lapin isolée par KÜHN et KRAEHENBUHL (1981) est très hétérogène du point de vue de la masse moléculaire. Il existe 4 formes transmembranaires de masse apparente 120.000 ; 116.000 ; 95.000 et 91.000. Ces masses sont plus élevées que celles rapportées par MOSTOV *et al.* (1980) lors de la traduction *in vitro* du mRNA de mammocyte et de l'hépatocyte de Lapin. Toutes ces molécules sont codées par un mRNA distinct. Le polymorphisme génétique existe, il a déjà été décrit par KNIGHT *et al.* en 1974 pour la pièce de sécrétion de Lapin. La carte peptidique révèle une homologie structurale entre les deux formes membranaires de masse moléculaire élevée et la pièce de sécrétion libre tendant à prouver qu'elles sont les précurseurs de la pièce de sécrétion libre (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1981). La pièce de sécrétion proviendrait d'un clivage enzymatique de la pièce de sécrétion membranaire, un peptide de 35.000 resterait inséré dans la couche lipidique. Le devenir de ce peptide n'est pas encore connu.

c - Etude de la pièce de sécrétion liée aux immunoglobulines de sécrétion

La pièce de sécrétion se trouve associée aux IgA dimériques (TOMASI *et al.*, 1965) et aux IgM pentamériques (BRANDTZAEG, 1975) dans les sécrétions externes.

α) 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 (1971c) permettent d'isoler la pièce de sécrétion avec 3 déterminants antigéniques intacts.

β) *Propriétés physico-chimiques :*

L'étude comparée des propriétés physico-chimiques de la pièce de sécrétion libre et liée montre qu'elles sont identiques. Leur composition en acides aminés (Tableau X ; p. 98) confirme ces données. La masse moléculaire est d'environ 80.000 dans les IgA humaines et de 60.000 chez les IgA de Lapin (O'DALY et CEBRA, 1971a) car elle présente une délétion de 10.000 dans la portion NH₂-terminale (LAMM et GREENBERG, 1972). La pièce de sécrétion est liée covalamment à l'un des deux monomères qui constituent le dimère d'IgA, par deux ponts disulfures (CUNNINGHAM-RUNDLES et LAMM, 1975 ; LINDH et BJORK, 1976 ; UNDERDOWN *et al.*, 1977 ; GARCIA-PARDO *et al.*, 1979 ; GARCIA-PARDO *et al.*, 1981), au fragment Fc (MEHTA *et al.*, 1973).

γ) *Etude des déterminants antigéniques :*

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 au dimère 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 (Fig. 30 ; p. 123).

Le déterminant "A" qui est accessible existe toujours dans la molécule. Il se divise en 2 groupes : le déterminant A₁ sensible aux agents réducteurs et le déterminant A₂ 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.

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. Les derniers travaux de ISCAKI *et al.* (1981) dénombrent au moins 16 déterminants antigéniques différents sur la pièce de sécrétion libre et 12 sur la pièce de sécrétion liée aux sIgA. Il y existe donc bien un certain nombre de déterminants cachés dans la molécule d'sIgA. Ces résultats semblent établir qu'au moins un quart de la molécule de pièce de sécrétion est impliqué dans la liaison avec les IgA.

8) Etude de l'affinité pièce de sécrétion - immunoglobulines polymérisées

D'après WEICKER et UNDERDOWN (1975), la pièce de sécrétion a 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. Les IgA dimériques se lient de la même façon aux 4 différentes formes de la pièce de sécrétion membranaire (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1981) de Lapin. La constante d'affinité apparente des IgA dimériques pour la pièce de sécrétion des membranes mammocytaires de Lapin est de 1 nM (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1979a), ce paramètre diffère de ceux rapportés lors de l'interaction IgA dimérique-pièce de sécrétion libre (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1979 b). La capacité de fixation des IgA dimériques aux membranes est en relation directe avec la quantité de pièce de sécrétion liée aux membranes. Après purification de la pièce de sécrétion membranaire, la constante d'affinité est de l'ordre de 10 nM (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1981),

soit très semblable à la constante d'affinité mesurée lors de l'interaction avec la pièce de sécrétion libre (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1979b).

2 - Rôle de la pièce de sécrétion : 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 (1974f) ; le transport des IgA polymériques du sérum vers la bile (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).

a - Protection des sIgA :

La pièce de sécrétion protège les IgA d'enzymes protéolytiques (TOMASI et CZERWINSKY, 1968). Les sIgA sont plus résistantes que les IgA sériques aux enzymes : trypsine et chymotrypsine (BROWN *et al.*, 1970), pepsine (SHUSTER, 1971), papaïne (GHETIE *et al.*, 1971 ; GHETIE et MOTA, 1973). Le traitement enzymatique des IgA de sécrétion et des IgA dimériques montre que la pièce de sécrétion augmente la résistance de la molécule à la protéolyse (LINDH, 1975).

b - Transport des IgA au travers des cellules épithéliales :

L'immunité des muqueuses est essentiellement due à la présence d'anticorps polymériques sécrétoires protégeant les surfaces épithéliales vulnérables à la pénétration d'antigènes. Ces anticorps sont sélectivement et vectoriellement transportés au travers des cellules épithéliales par un récepteur spécifique. Ce récepteur est finalement sacrifié par protéolyse et une partie reste associée à l'immunoglobuline pour la protéger des protéases présentes dans l'environnement mucosal (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1982). Ce phénomène constamment sollicité au niveau des cellules épithéliales des tractus gastro-intestinal, respiratoire et autres est effectif en fin de grossesse et pendant la lactation dans le mammaryote (ROUX *et al.*, 1977 ; LAMM *et al.*, 1977 ; HALSEY *et al.*, 1980). Les modèles de transport trans-épithélial des

anticorps décrits ces quinze dernières années sont rassemblés dans la revue générale de BRANDTZAEG (1981).

a) *Transfert actif des IgA dimériques :*

La pièce de sécrétion agit comme un récepteur convoyeur membranaire. Les étapes successives du transfert sont les suivantes (Fig. 25 ; p. 106) :

- 1 - Accumulation de la pièce de sécrétion dans le reticulum endoplasmique rugueux, glycosylation dans les sacs de Golgi (KRAEHENBUHL *et al.*, 1975 ; CRAGO *et al.*, 1978 ; SOCKEN *et al.*, 1979).
- 2 - Insertion de la pièce de sécrétion dans la membrane basolatérale (NAGURA *et al.*, 1979 ; KÜHN et KRAEHENBUHL, 1979b). La pièce de sécrétion est une protéine amphiphilique dont la partie hydrophobe est insérée dans la couche lipidique membranaire.
- 3 - La pièce de sécrétion arrive au niveau de la membrane basale où elle agit comme récepteur des IgA dimériques.
- 4 - Les IgA polymériques synthétisées par les cellules plasmatiques de la *lamina propria* ou dérivant de la circulation se fixent par des interactions non-covalentes au composant sécrétoire (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1979b).
- 5 - Le complexe est internalisé par endocytose et une stabilisation par des liaisons covalentes peut avoir lieu. La participation lors de l'endocytose des "coated pits" est discutée. Le transfert est inhibé par la colchicine suggérant que la tubuline ou les microtubules sont impliqués (NAGURA *et al.*, 1979 ; MULLOCK *et al.*, 1980).
- 6 - Le clivage de la pièce de sécrétion membranaire se fait durant le transfert, un peptide de 35.000 reste ancré. Son devenir n'est pas connu, il semble cependant, puisqu'il n'est pas accumulé, qu'il soit catabolisé par les lysosomes. La pièce de sécrétion est donc

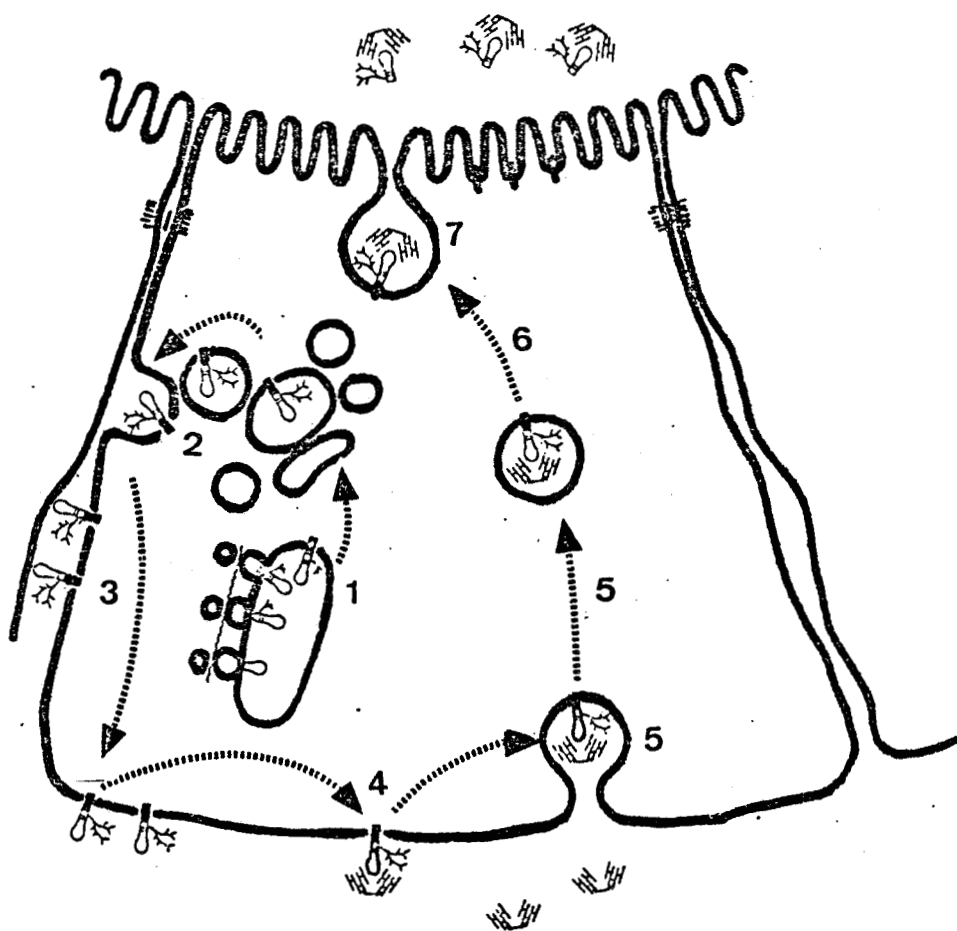


Figure 25 : Modèle de KÜHN et KRAEHENBUHL (1982) montrant la synthèse de la pièce de sécrétion, son passage à la membrane, son transfert avec les IgA dimériques dans la cellule épithéliale (les numéros correspondent aux explications données p. 105 et 107).

BUS
LILLE

un "récepteur sacrifié" (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1982) puisqu'elle n'est pas recyclée et qu'elle est définitivement exclue de la membrane épithéliale en faisant partie intégrante des molécules d'IgA et d'IgM de sécrétion.

- 7 - Les vésicules de pinocytose fusionnent à la membrane apicale des cellules et déversent leur contenu : les immunoglobulines de sécrétion se retrouvent libérées ainsi que de la pièce de sécrétion libre. La présence de pièce de sécrétion libre s'explique par le fait que la navette des vésicules de pinocytose pôle basal - pôle apical ne dépend pas des interactions ligand - récepteur. La molécule de pièce de sécrétion non liée aux IgA sera excisée malgré tout et déversée (MULLOCK *et al.*, 1980). Puisque les récepteurs ont une demi-vie très courte et que beaucoup de sIgA sont synthétisées, il sera nécessaire d'en produire de grandes quantités. Ainsi, durant la lactation, la glande mammaire produit 1 gramme de pièce de sécrétion en 24 heures, ce qui correspond à la synthèse d'environ 10^{13} récepteurs par seconde (KÜHN et KRAEHENBUHL, 1982).

β) *Transfert passif :*

Une possibilité supplémentaire, particulièrement applicable au tractus gastro-intestinal, serait l'apport d'immunoglobulines dans le lumen intestinal, au cours de l'exfoliation normale des cellules épithéliales. Ces dernières se divisent dans les cryptes de Lieberkuhn et migrent en 2 à 4 jours, jusqu'au sommet des villosités, où elles s'exfolient dans le lumen en libérant leurs contenus inter- et intracellulaires. C'est ce mécanisme qui est probablement responsable de la présence de faibles quantités d'anticorps monomériques IgG et IgA, toujours trouvés dans les sécrétions intestinales (TOMASI, 1976).

Il est probable que les deux mécanismes interviennent simultanément, le premier rendant compte du passage des anticorps de sécrétion, l'autre de la présence d'anticorps monomériques non sécrétoires.

c - Passage des IgA dimériques dans la bile :

a) *Par l'intermédiaire de la pièce de sécrétion :*

Il existe un transfert hépatique des IgA dimériques de Rat (ORLANS *et al.*, 1978 ; LEMAITRE-COELHO *et al.*, 1978 ; JACKSON *et al.*, 1978 ; FISHER *et al.*, 1979) et humaines (FISHER *et al.*, 1979 ; VAERMAN et LEMAITRE-COELHO, 1979) par les hépatocytes de Rat. Ce transfert se fait du plasma à la bile contre un gradient de concentration (VAERMAN *et al.*, 1978 ; JACKSON *et al.*, 1978 ; LEMAITRE-COELHO *et al.*, 1978 ; ORLANS *et al.*, 1978). Les hépatocytes de Rat synthétisent de la pièce de sécrétion libre (VAERMAN et LEMAITRE-COELHO, 1979 ; ZEVENBERGEN *et al.*, 1980 ; ALTAMIRANO *et al.*, 1980). La pièce de sécrétion synthétisée reste fixée sur la partie interne de la vésicule de Golgi, laquelle migre vers, puis fusionne avec la membrane cytoplasmique, exposant ainsi la pièce de sécrétion aux IgA sériques présentes dans l'espace de Disse. Avant l'endocytose, elle serait amassée dans un domaine membranaire particulier (COURTOY *et al.*, 1982) appelé "coated pits" (régions spécialisées de la membrane plasmique recouvertes sur la face cytoplasmique par un réseau protéinique formé de clathrine : PEARSE, 1975 ; 1976 ; 1978). L'endocytose aurait lieu par l'intermédiaire de ces "coated pits" (LIMET *et al.*, 1980), mais aucune donnée actuelle ne permet d'expliquer pourquoi les "receptosomes" (WILLINGHAM et PASTAN, 1980) provenant du bourgeonnement des "coated" vésicules ne fusionnent pas aux lysosomes lors de leur trajet intracytoplasmique, lorsqu'ils contiennent des IgA de sécrétion (LIMET *et al.*, 1982). Ces vésicules, dont la formation est ininterrompue, transportent du composant sécrétoire libre ou combiné à l'IgA et migrent vers les canaux biliaires où elles fusionnent avec la membrane canaliculaire. L'effet détergent des sels biliaires détacherait alors la pièce de sécrétion de la membrane, ce qui expliquerait les hautes concentrations de ces protéines dans la bile (RENSTON *et al.*, 1980 ; MULLOCK *et al.*, 1979 ; SOCKEN *et al.*, 1979 ; ORLANS *et al.*, 1979).

Les IgA dimériques proviennent de la lymphe mésentérique qui les véhicule des plasmocytes intestinaux à la circulation générale (VAERMAN *et al.*, 1973 ; KAARTINEN *et al.*, 1978). En effet, les IgA dimériques synthétisées au niveau des muqueuses sont produites localement sous forme d'IgA de sécrétion. Les IgA restantes collectées dans les canaux lymphatiques et convoyées via le canal thoracique aux grandes veines, deviennent circulantes jusqu'à ce qu'elles trouvent la veine porte où rapidement elles sont reconnues et fixées par les pièces de sécrétion membranaires hépatocytaires (HALL et ANDREW, 1980) (Fig. 26 ; p. 110). Ce système de transport existe également chez le Lapin (DELACROIX *et al.*, 1982). La bile hépatique humaine contient également beaucoup d'IgA et peut-être aussi des IgA monomériques et des IgA dimériques (DIVES et HEREMANS, 1974 ; NAGURA *et al.*, 1981). La source de ces IgA n'est pas connue. La bile pourrait servir à l'élimination des IgA polymérisées sériques (TOMASI et GREY, 1972 ; HEREMANS, 1974 ; KUTTEH *et al.*, 1980). Cependant, aucune preuve n'a étayé cette hypothèse (BROWN *et al.*, 1982 ; DOOLEY *et al.*, 1982). Pour BROWN *et al.* (1982), ni le canal thoracique, ni la veine porte, ni le sang aortique ne contiennent des IgA dimériques en grande quantité, le transport hépatique n'aurait pas lieu chez l'Homme et les sIgA biliaires humaines proviendraient probablement d'une synthèse locale par les tissus hépatobiliaires. Pour DOOLEY *et al.* (1982) si 21 à 32 % des IgA dimériques et 3 à 4,6 % des IgA monomériques sont transportées de la lymphe à la bile chez le Rat, seulement à 0,2 à 0,8 % des IgA polymériques et 0,1 à 0,2 % des IgA monomériques sont transportées dans les mêmes conditions chez l'Homme. Les IgA biliaires pour ces auteurs dériveraient également d'une synthèse locale. L'élimination des IgA dimériques de la lymphe par la bile permettrait de maintenir le taux de ces IgA circulantes constant. Le transport hépatobiliaire des IgA servirait à éliminer les immuns complexes de la circulation (PEPPARD *et al.*, 1981, RUSSEL *et al.*, 1981 ; SOCKEN *et al.*, 1981a ; 1981b ; HARMATZ *et al.*, 1982). L'élimination des complexes IgA-antigènes serait spécifique des hépatocytes (RUSSEL *et al.*, 1982).

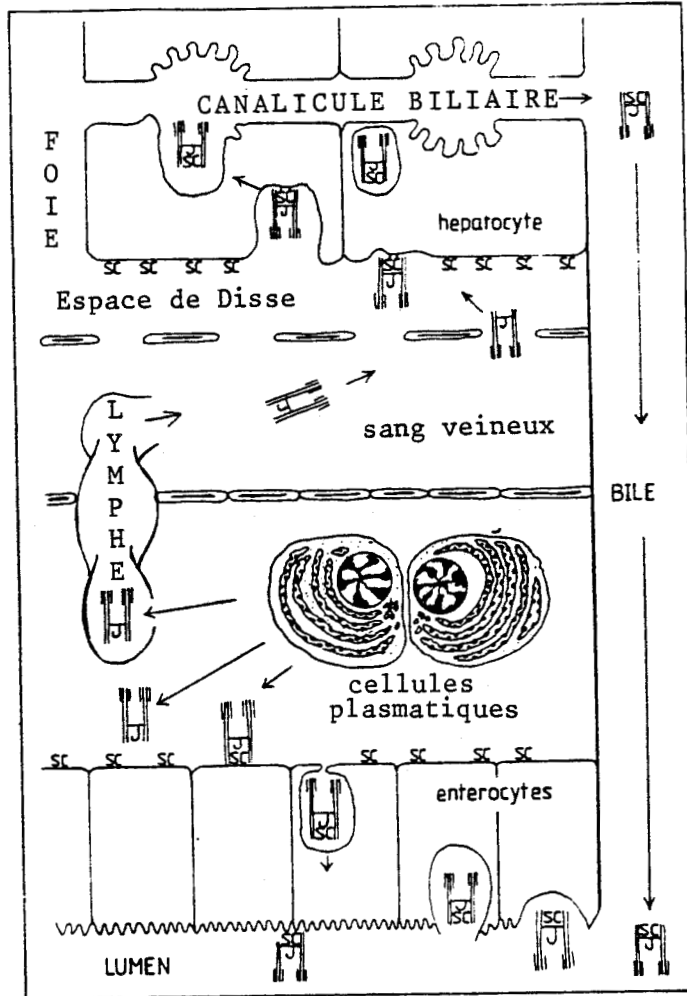


Figure 26 : Les différentes voies d'enrichissement des sécrétions en sIgA chez le Rat (HALL et ANDREW, 1980).



β) Par l'intermédiaire du récepteur des asialoprotéines :

Les IgA sériques catabolisées au niveau du foie sont reconnues par le récepteur spécifique des asialoglycoprotéines (ASHWELL et MORELL, 1971). Le site de reconnaissance du récepteur semble être les glycannes alcali-labiles de la zone charnière des IgA₁ (STOCKERT *et al.*, 1982). Les IgA₁ polymériques sont mieux reconnues (50 fois plus) que les IgA₁ monomériques. Ceci peut être dû à un changement de conformation lors de la polymérisation qui exposerait les glycannes ou simplement à une augmentation de la concentration de ces derniers. La démonstration de la reconnaissance spécifique des IgA, *in vitro*, par ce récepteur hépatique suggère que l'endocytose des IgA dimériques par l'hépatocyte décrite précédemment, peut s'effectuer également *in vivo* par l'intermédiaire du récepteur des asialoprotéines (STOCKERT *et al.*, 1982).

IV - CONFORMATION DES IMMUNOGLOBULINES

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.

Nous ne possédons que peu d'information sur la structure tertiaire des IgA de sécrétion. Les sIgA, cependant, contiennent peu d'hélice α en solution aqueuse et un maximum de 40 % d'hélice α dans le 2-chloroéthanol, un solvant dans lequel la plupart des autres protéines possèdent 100 % d'hélicité (TOMASI et GREY, 1972). La molécule peut prendre la forme d'un Y ou d'un T et l'angle entre les deux bras Fab varier de 30 à 60°C. Cependant, ces études ont été jusqu'à présent bien établies dans le cas des IgG. Comme il existe des relations étroites 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) ont montré que les chaînes légères de type κ ou λ comprennent deux ponts disulfures intracaténaire formant une boucle de 60 résidus d'acides aminés, disposés de la même manière dans les moitiés NH_2 et COOH terminales. Les chaînes lourdes λ 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 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 al.* (1966) ont observé des homologies internes dans la structure primaire du fragment Fc des chaînes λ de Lapin et deux zones d'homologie 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 λ en possède 4 : V_H , C_H1 , C_H2 et C_H3 . Le même nombre de domaines a été caractérisé dans la chaîne α des IgA par PUTNAM en 1974 et par KRATZIN *et al.* en 1975. Par contre les études de la séquence de la chaîne μ d'une IgM par WATANABE *et al.* (1973) et par PUTNAM *et al.* (1973) et de la chaîne ϵ d'une IgE par BENNICH *et al.* (1974) ont révélé l'existence d'un domaine constant supplémentaire : $C\epsilon_4$ et $C\epsilon_4$. Tous les domaines sont arrangés en paires (sauf le C_H2) par des liaisons non covalentes (Fig. 26 ; p. 113).

2 - Définition 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 expli-

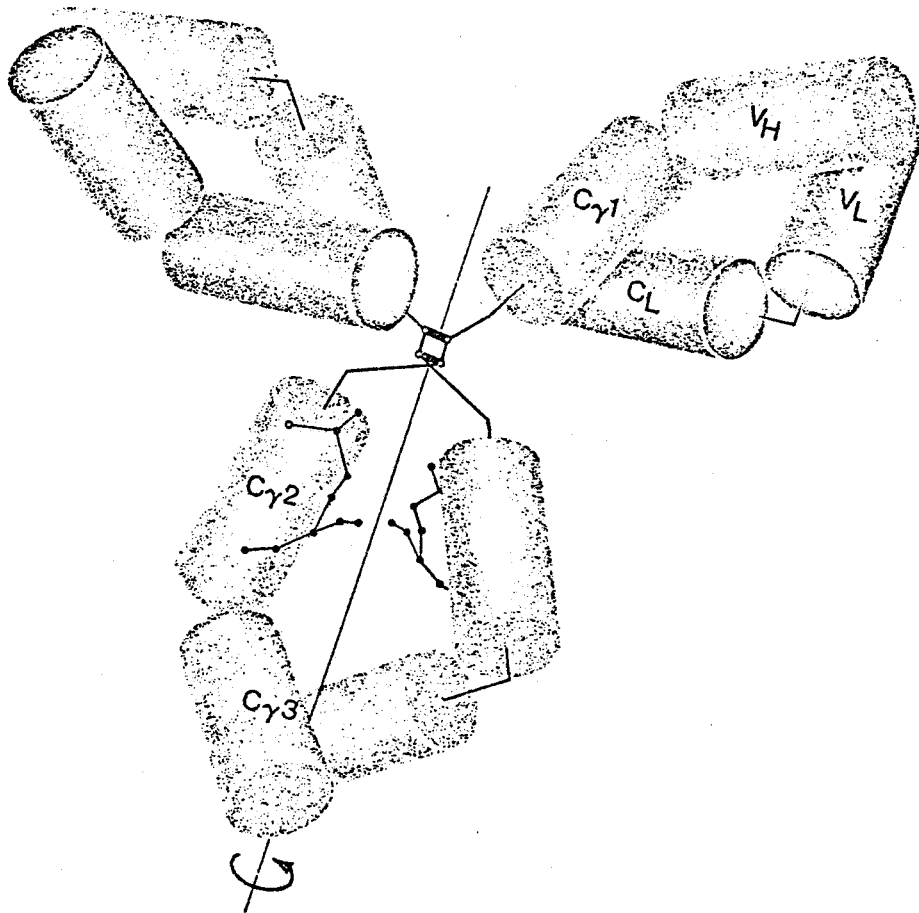


Figure 26 : Un modèle de molécule d'IgG, basé sur des données de diffraction des rayons X. Chaque cylindre représente un domaine compact (DORRINGTON, 1978).

querait que la sélection puisse favoriser l'acquisition de fonctions différentes par une même molécule (EDELMAN, 1970). Les domaines ont une masse moléculaire de 12.000 (HUBER, 1980).

B - MISE EN EVIDENCE DES DOMAINES

Les méthodes d'approche de la mise en évidence des domaines ont été des méthodes chimiques, physiques et biologiques. Les clivages protéolytiques de la zone charnière ont permis l'étude conformationnelle et biologique des fragments Fab et Fc (PORTER, 1959 ; NISONOFF *et al.*, 1960). Les méthodes physiques les plus utilisées ont été le dichroïsme circulaire (BJORK *et al.*, 1971 ; GHOSE et JIRGENSONS, 1971 ; RIESEN *et al.*, 1976), la microscopie électronique (GREEN, 1969 ; VALENTINE et GREEN, 1967) et surtout la diffraction aux rayons X (POLJAK, 1975 ; 1978 ; DAVIES *et al.*, 1975 ; BEALE et FEINSTEIN, 1976).

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.

1 - Structure des domaines : POLJAK *et al.* (1973) ont établi que chacun des domaines de la région Fab d'une immunoglobuline de type IgG₁ peut être inclus dans un parallélépipède de 40 x 25 x 25 Å. Chaque domaine (Fig. 27 ; p. 115) est composé de 7 segments à peu près linéaires ($fx_{1,2,3,4}$ et $fy_{1,2,3}$) qui forment une structure β 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 inorganisée. A la fin de la séquence de chaque domaine, il y a quelques résidus (e_1 et e_2) qui ne possèdent pas de structure β -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 allongée d'une boucle supplémentaire (E) qui établit le contact entre

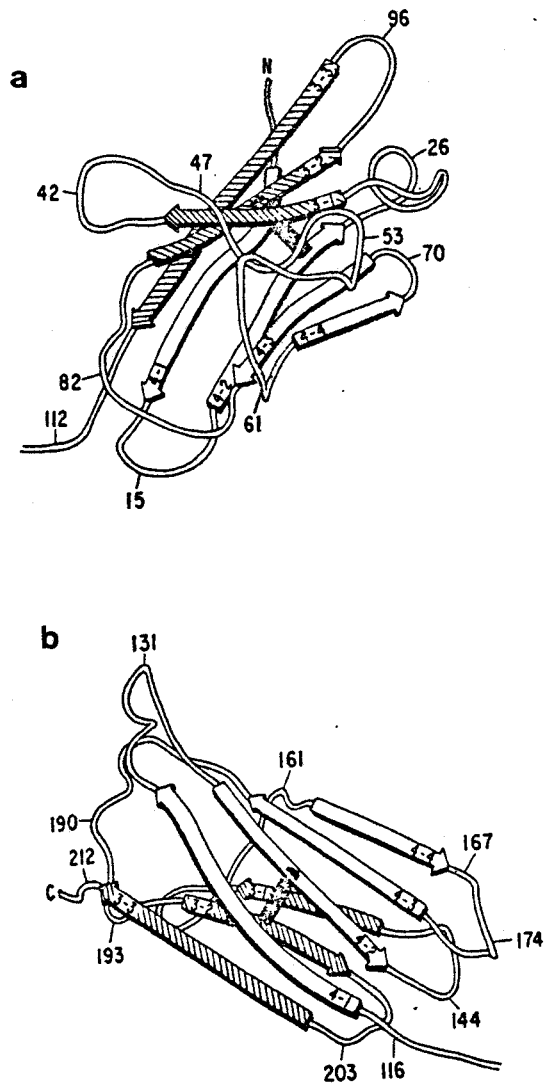


Figure 27 : Structure tridimensionnelle d'un domaine d'immunoglobuline établie par diffraction des rayons X (EDMUNDSON et al., 1975).

(a) domaine variable

(b) domaine constant



les domaines. De nombreuses liaisons ponts disulfures se forment entre les couches β plissées. Les résidus d'acides aminés situés à l'intérieur des deux faces sont hydrophobes. L'un d'entre-eux, le tryptophane est toujours retrouvé près de 2 résidus de cystéine et contribue ainsi, à l'établissement d'un pont disulfure intracaténaire.

2 - Structure des inter-domaines : La zone charnière qui est liée covalamment aux fragments Fc et Fab, a une structure primaire et tertiaire particulière. Cette région centrale consiste en 2 hélices de poly-L-proline parallèles reliées par deux ponts disulfures (COLMAN *et al.*, 1976 ; MARQUART *et al.*, 1980). Cette double hélice est courte chez les IgG₁ et très longue chez les IgG₃ (MICHAELSON *et al.*, 1977) où elle pourrait atteindre 100 Å de long. Ce segment de poly-L-proline est rigide, mais il est accolé de chaque côté de segments flexibles (MARQUART *et al.*, 1980 ; DEISENHOFER, 1981). Cette rigidité due à l'hélice permet un mouvement indépendant des bras Fab de la partie Fc. L'importance de la zone charnière dans la flexibilité de la molécule d'anticorps est évidente (MARQUART et DEISENHOFER, 1982).

3 - Localisation des unités glycaniques : Toutes les chaînes lourdes possèdent des oligosaccharides. Leur localisation est représentée dans la Fig. 28 ; p. 117).

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

C - CONTACTS INTER-DOMAINES

La molécule d'immunoglobuline possède un axe central de symétrie et deux axes latéraux au niveau des fragments Fab (Fig. 26 ; p. 110). Le schéma de DORRINGTON (1978) montre les interactions qui peuvent exister : interactions protéine-protéine, interactions protéine-glycane. Les interactions protéine-protéine sont soit des interac-

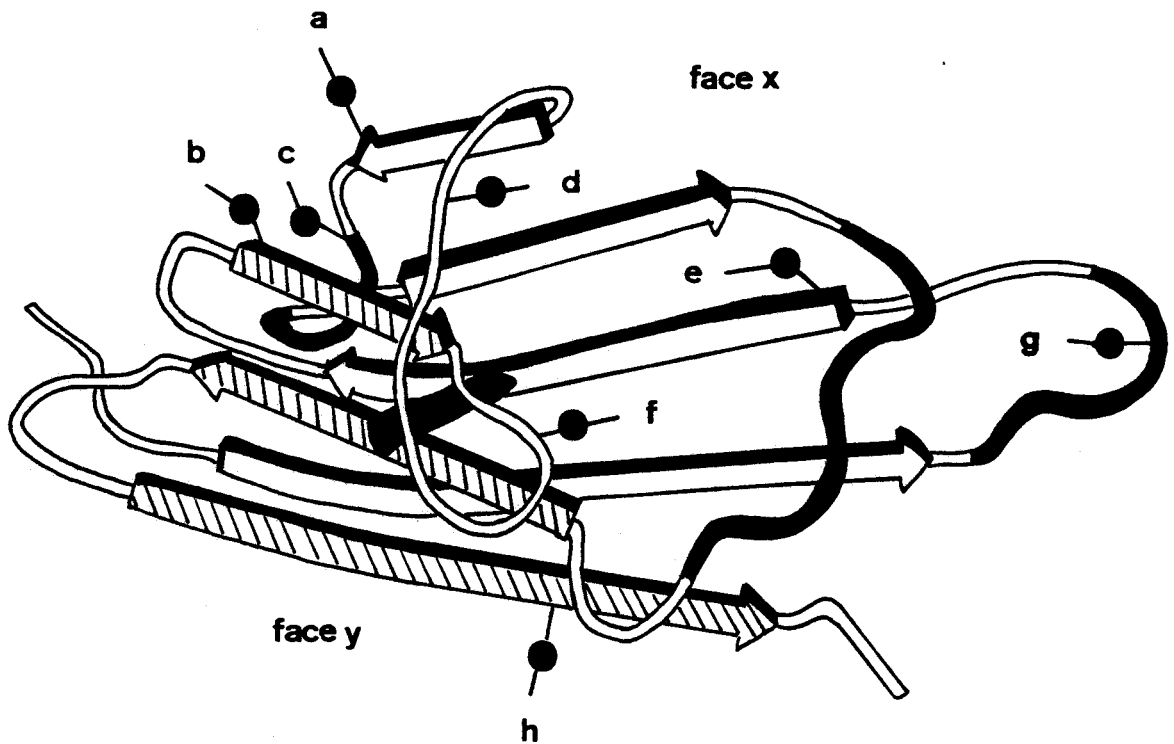


Figure 28 : Localisation des glycanes à l'intérieur d'un domaine (EDMUNDSON *et al.*, 1975) pour les différentes classes d'immunoglobulines. Les IgG ont un site de fixation pour l'oligosaccharide en (c) dans le domaine $C\gamma_2$. Les IgM ont un site de fixation dans le domaine $C\mu_1$ (f) et dans 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.

UNIVERSITÉ
LILLE

tions mineures longitudinales entre les domaines C_L et V_L de la chaîne légère ou entre les domaines $C_{\gamma 1}$ et V_H et $C_{\gamma 2}$ et $C_{\gamma 3}$ de la chaîne lourde, soit d'interactions majeures latérales entre les domaines V_H et C_L , C_L et $C_{\gamma 1}$ et entre les 2 domaines $C_{\gamma 3}$ (Fig. 26 ; p. 110). Les interactions longitudinales (ou cis) font intervenir des liaisons hydrogène tandis que les interactions latérales (ou trans) font intervenir des liaisons de Van der Waals (MARQUART et DEISENHOFER, 1982). Les résidus participant aux contacts latéraux des domaines variables et constants sont soit invariants soit remplacés par des résidus homologues dans les différentes classes d'anticorps et même chez des espèces différentes. Il existe, de plus, des interactions protéine-glycane. Les glucides occupent une position fixe dans la molécule. Il existe dans le domaine $C_{\gamma 2}$ quelques liaisons hydrogène entre le domaine et la chaîne hydrocarbonée, mais les interactions dominantes sont de nature hydrophobe. La chaîne glycanique prend une conformation en "T" et couvre, en effet, une partie hydrophobe de la molécule composée de résidus de phenyl-alanine 241, de valine 243 et 262, tyrosine 296, thréonine 260 et arginine 301 (Fig. 19 ; p. 86). 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 CH_2 ni avec la chaîne glycanique (Fig. 19 ; p. 86 et Fig. 26 ; p. 110).

D - ROLE 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 les revues de WINKELHAKE, 1978 ; DORRINGTON 1978 ; DORRINGTON et KLEIN, 1982 et MARQUART et DEISENHOFER, 1982. Approximativement les deux tiers de la molécule d'anticorps sont impliqués dans le site de reconnaissance de l'antigène, le tiers restant correspondant à la région Fc contient les sites responsables des activités effectives non spécifiques de l'antigène.

1 - Rôle des domaines de la région 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 rainure superficielle (POLJAK *et al.*, 1973) plutôt que dans une enclave profonde (PADLAN et DAVIES, 1975).

2 - Rôle des domaines de la région 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 quelle soit la classe des immunoglobulines (Fig. 18 ; p. 84). D'autre part, le nombre de résidus d'acides aminés hydrophobes 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} (CONNELL et PORTER, 1971 ; ELLERSON *et al.*, 1972). Cette fixation se fait sur les deux segments β plissés anti-parallèles C-terminaux du $C_{\gamma 2}$ (BURTON *et al.*, 1980).
- b - Le cytotropisme a lieu au niveau du fragment Fc et particulièrement dans les domaines $C_{\gamma 3}$ et $C_{\gamma 4}$. Les anticorps se lient aux surfaces membranaires des lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophiles, plaquettes, basophiles, mastocytes par leurs fragments Fc.

Chez le Lapin, un récepteur pour le $Fc\alpha$ a été découvert dans les lymphocytes isolés des plaques de Peyer et de la rate. Ce récepteur se lierait préférentiellement aux IgA_2 et aux IgA polymériques. Le site d'interaction récepteur $Fc\alpha$ - IgA est le domaine $C_{\alpha 2}$ (STAFFORD *et al.*, 1982).

- 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 (GITLIN *et al.*, 1964), ainsi que leur transport du sérum maternel vers le colostrum (PITTARD *et al.*, 1977).
- e - Les domaines C_H1 et C_L 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 commencent à être bien connus. 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 - MODELES STRUCTURAUX DES SIgA

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

1 - Modèle de TOMASI et BIENENSTOCK : Le premier modèle décrit par TOMASI et BIENENSTOCK (1968) montre les IgA de sécrétion formées de 2 unités de 7 S superposées, reliées entre elles par la chaîne J et insérant la pièce de sécrétion (Fig. 29 ; p. 122). Ce modèle a l'avantage de donner une schématisation simple de la molécule de sIgA. Cependant, il n'est pas satisfaisant car il ne met pas en évidence les différentes propriétés des sIgA.

2 - Modèle de HEREMANS : La présence de nombreux liens non covalents faibles, répartis sur une grande surface entre la pièce de sécrétion et les fragments Fc des deux monomères d'IgA, la flexibilité du composant sécrétoire, les images en double "Y" apparaissant sur les photos de microscopie électronique pour l'sIgA (BLOTH et SVEHAG, 1971) aussi bien que pour le dimère sérique (MUNN *et al.*, 1971) ont conduit à la représentation de la Fig. 30 ; p. 123. Dans ce modèle, la molécule de pièce de sécrétion est enroulée autour des deux fragments Fc, dont les plans de symétrie sont disposés à 90° l'un par rapport à l'autre ; l'extrémité du composant sécrétoire portant la spécificité "I" se fixe de façon covalente en dernier lieu. Cette structure rend compte de la grande flexibilité des sIgA à l'endroit de la jonction entre les deux monomères, ce qui leur permet de se replier l'un sur l'autre pour n'en former qu'un seul, comme cela a été parfois observé en microscopie électronique par SVEHAG et BLOTH (1970). L'estimation du rayon de Stokes par CHANDY *et al.* (1980) des sIgA conduit à la valeur de 8.99 nm et à la conclusion par ces auteurs que cette valeur est compatible avec un modèle structural étendu des sIgA.

3 - Modèle de BRANDTZAEG : Un premier modèle de cet auteur en 1970 a été complété à la suite de ses travaux sur la chaîne J pour donner le modèle représenté sur la Fig. 31 ; p. 124. Nous voyons que la pièce J présente sous la forme d'un dimère est liée à l'IgA dimérique, sous sa forme native, sa configuration constitue un site de combinaison ayant une affinité spécifique non covalente pour la pièce de sécrétion. Le complexe moléculaire est ultérieurement stabilisé par des réactions d'échanges de ponts disulfures entre les chaînes α et le

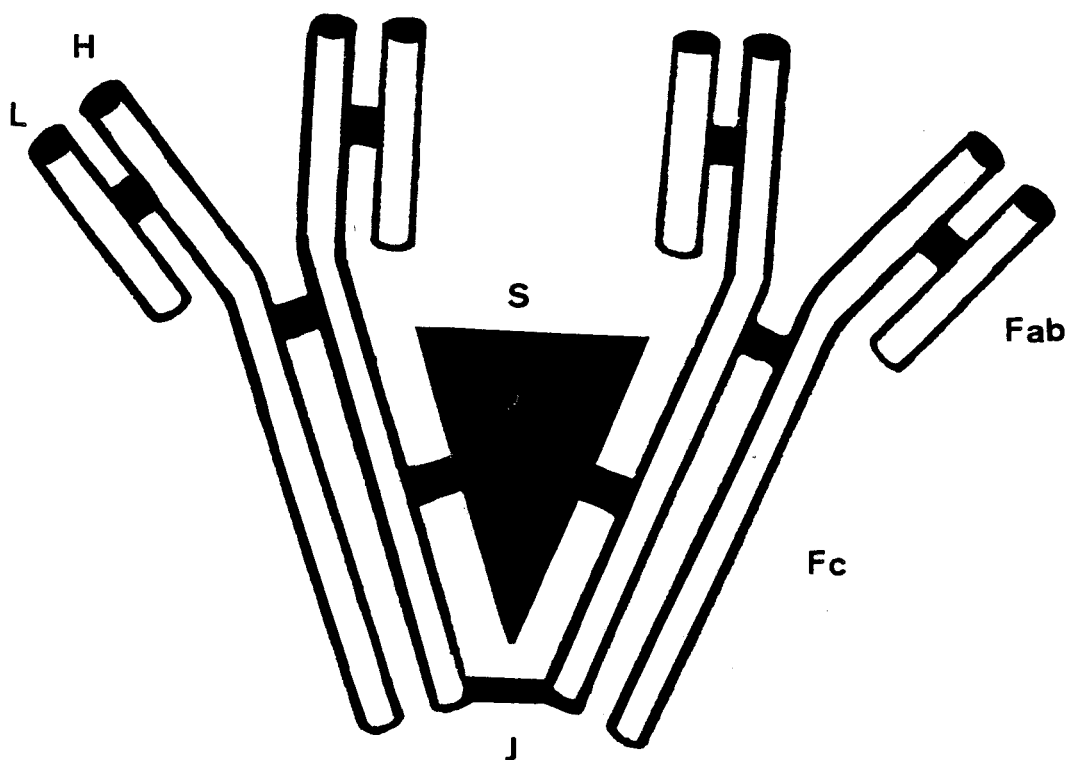


Figure 29 : Schéma d'une molécule d'IgA de sécrétion, selon TOMASI et BIENENSTOCK (1968).

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



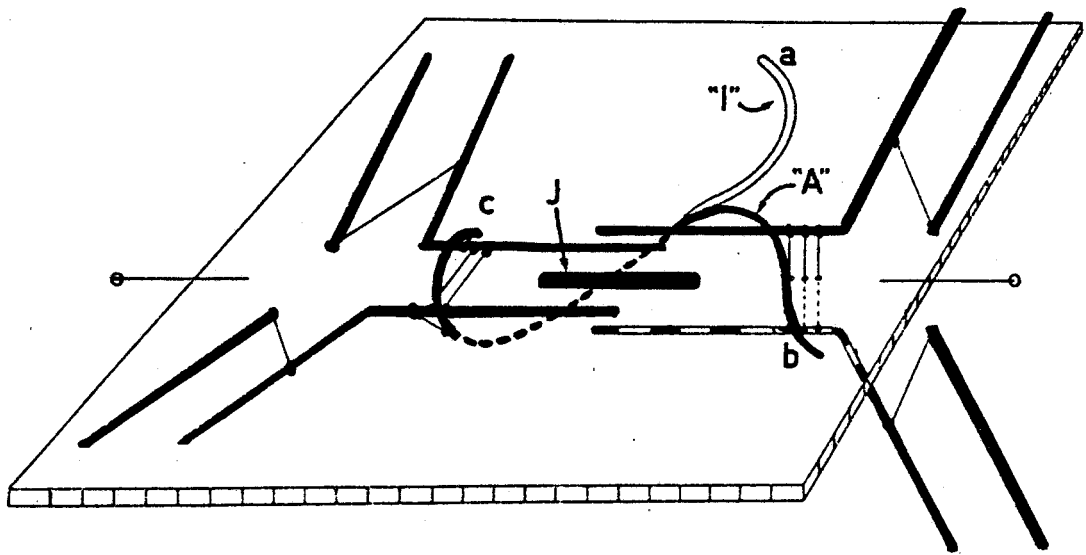


Figure 30 : Schéma d'une molécule d'IgA de sécrétion selon
HEREMANS en 1974.



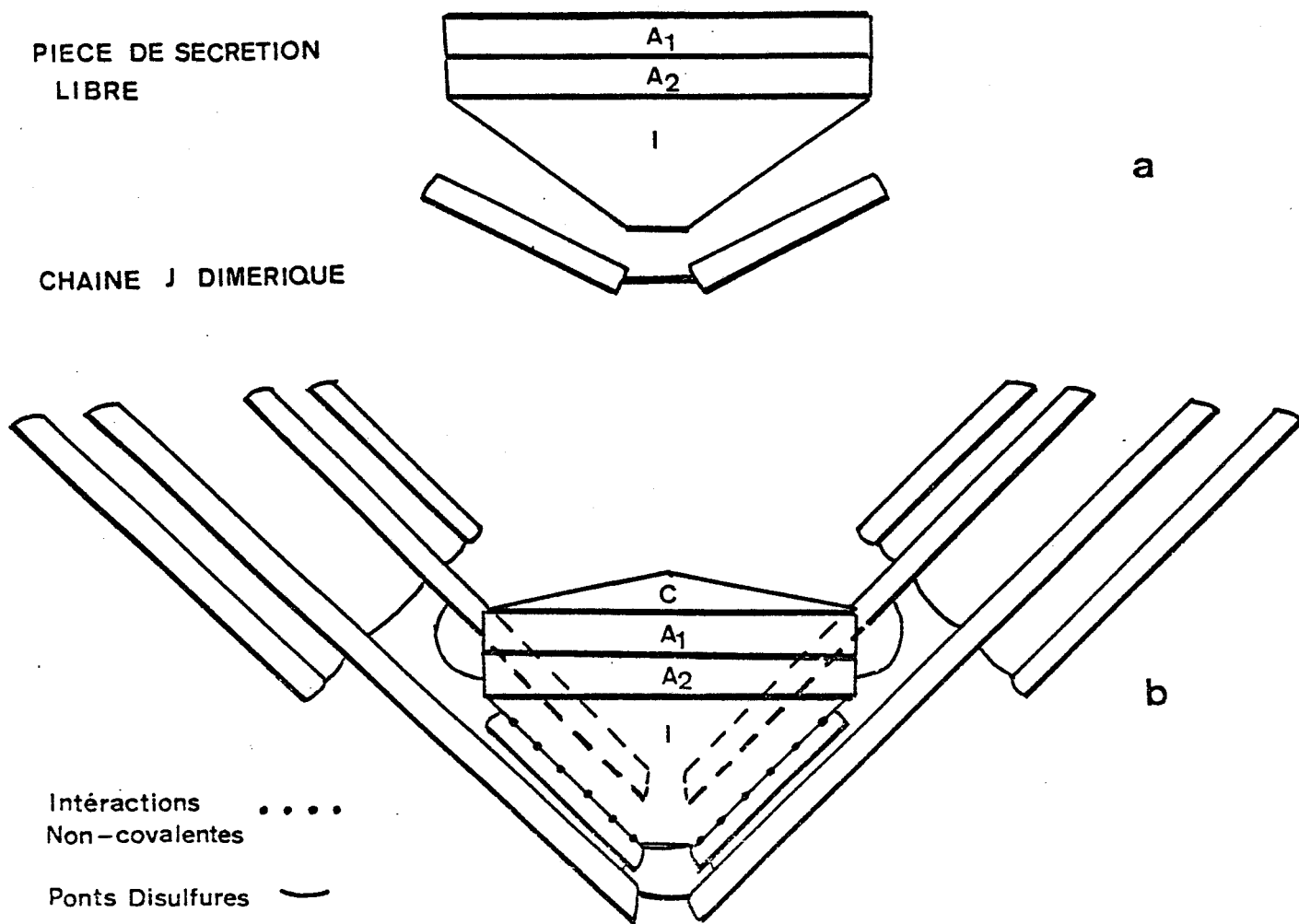


Figure 31 : Modèle structural des sIgA d'après BRANDTZAEG en 1976b.

composant sécrétoire. Un déterminant antigénique conformationnel "C" apparaît et le déterminant "I" est rendu inaccessible à la suite de la stabilisation finale des sIgA par les ponts disulfures. Le modèle de BRANDTZAEG (1976b) n'explique pas l'aspect en double "Y" obtenu par les études de microscopie électronique (BLOTH et SVEHAG, 1971 ; MUNN *et al.*, 1971) mais fait apparaître les spécificités antigéniques.

4 - Modèle de GARCIA-PARDO *et al.* (1981) : La pièce de sécrétion est liée covalamment à un seul monomère d'IgA (CUN-NIGHAM-RUNDLES et LAMM, 1975 ; LINDH et BJORK, 1976 ; UNDERDOWN *et al.*, 1977 ; GARCIA-PARDO *et al.*, 1979). Le site d'attachement se trouve sur le fragment Fc (MEHTA *et al.*, 1973). GARCIA-PARDO *et al.* en 1981 ont montré sur la base des résultats obtenus lors de la chromatographie de la molécule de sIgA en milieu dissociant, que les deux monomères devaient être liés covalamment par la pièce de jonction et par un pont disulfure interchaîne faisant intervenir l'avant-dernier résidu de cystéine (Fig. 32 ; p. 126).

Quoiqu'il en soit, chaque modèle décrit a ses avantages et ses inconvénients et il est évident que la "vraie" structure des sIgA n'a pas encore été élucidée.

VI - CONCLUSIONS

Dans les sécrétions les IgA existent sous la forme d'un dimère joint par l'intermédiaire d'une pièce de jonction insérant une pièce de sécrétion.

La pièce de jonction synthétisée avec les immunoglobulines par les lymphocytes B est associée aux IgA dans le rapport stoechiométrique d'une mole de chaîne de jonction pour une mole d'IgA.

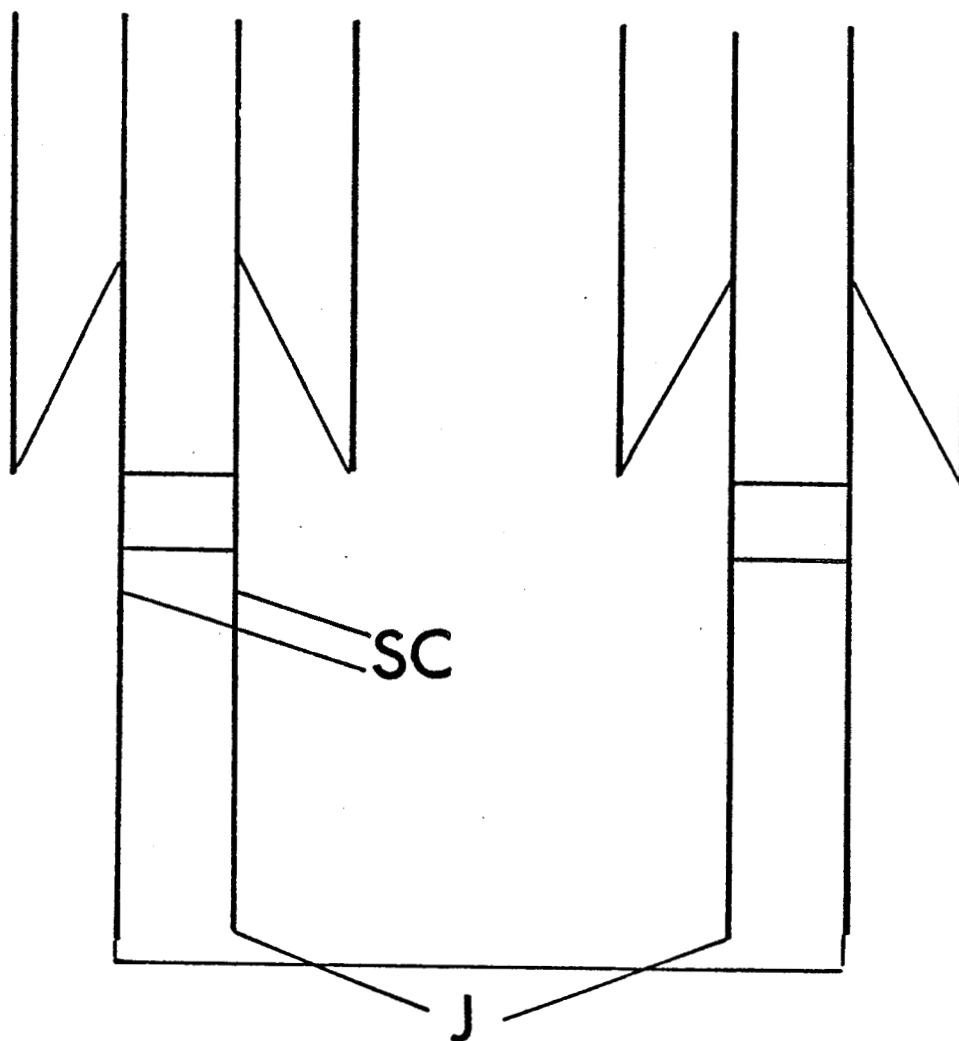


Figure 32 : Modèle d'IgA de sécrétion proposé par GARCIA-PARDO et al. (1981).



Elle intervient dans la polymérisation et l'externalisation du dimère d'IgA, favorise l'approche du dimère d'IgA à son récepteur qui est la pièce de sécrétion membranaire et peut intervenir dans la différenciation des lymphocytes B.

Sécrétée par les cellules épithéliales, la pièce de sécrétion est le récepteur membranaire des IgA dimériques. Elle permet le transport des sIgA au travers de la membrane épithéliale vers le lumen et au travers de l'hépatocyte chez le Rat et le Lapin vers la bile. Conjugué à la membrane, ce récepteur, une fois internalisé, est libéré vers le pôle apical des cellules qu'il traverse sous une forme libre ou conjuguée aux IgA après perte d'un fragment peptidique de 35.000 au devenir inconnu. La pièce de sécrétion est vraisemblablement constituée de différents domaines : domaine hydrophobe responsable de l'insertion à la membrane basolatérale et hydrophile renfermant les sites de glycosylation.

A l'exception des chaînes légères toutes les autres chaînes ou pièces sont de nature glycoprotéinique. Si la structure primaire de la pièce de jonction est élucidée il n'en est pas de même pour la structure primaire des autres composants de la molécule d'IgA. Cependant, la connaissance de la structure primaire des chaînes α des IgA sériques myélomateuses (chaîne protéique et glycannique) et de la pièce de sécrétion libre du lait humain (structure glycannique) apporte une aide précieuse à l'étude de la structure primaire des sIgA et plus particulièrement à l'étude de sa copule glucidique.

Deux types de glycanes existent dans la molécule d'IgA :

- Les glycanes liés O-glycosidiquement qui le sont exclusivement sur la zone charnière des chaînes α_1 . En effet, une délétion d'environ 15 résidus d'acides aminés dans cette zone sur la chaîne α_2 entraîne la perte des sites de glycosylation. Les glycanes sont au nombre de cinq et possèdent une composition molaire

en monosaccharides telle qu'elle laisse prévoir l'existence de structures beaucoup plus complexes (DESCAMPS, 1974) que celles décrites par BAENZIGER et KORNFELD (1974) pour les IgA sériques myélomateuses.

- Les glycanes liés N-glycosidiquement sont localisés sur la chaîne de jonction au niveau de l'acide aminé 43, sur les chaînes lourdes à raison de trois glycanes pour les chaînes α_1 , cinq pour les chaînes α_2 A_{2m}(2) et quatre pour les chaînes α_2 A_{2m}(1) et sur la pièce de sécrétion. De masse moléculaire 80.000 environ la pièce de sécrétion qui renferme 20 % des glucides totaux portera environ huit glycanes dont la localisation est encore inconnue. Les glycanes décrits pour la pièce de sécrétion libre, les chaînes lourdes α_1 et la pièce de jonction sont biantennés possédant un nombre de résidus de fucose et d'acide N-acétylneuraminique variable ils peuvent également être poly N-acétyllactosaminiques et posséder des résidus de fucosyl N-acétyllactosamine supplémentaires.

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 la participation de ces glycanes dans les différents rôles biologiques des sIgA.

TRAVAUX PERSONNELS

1 - MATERIELS ET METHODES

I - PRÉPARATION DES IgA

II - PRÉPARATION DES GLYCOPEPTIDES

III - MÉTHODOLOGIES DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES.

I - PRÉPARATION DES IgA

A - MATERIELS

Le matériel utilisé lors de cette étude est constitué d'immunoglobulines de classe IgA sériques normales ou myélomateuses et d'IgA sécrétoires.

Les IgA sériques normales ont été purifiées à partir de la Fraction III de Cohn obtenu au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (*).

Les IgA₁ myélomateuses sont un don du Centre de Transfusion de Liège (*).

Les IgA sécrétoires ont été isolées de mélanges de lait provenant du Lactarium de Lille (*).

B - METHODES DE PURIFICATION

1 - Purification des IgA₁ sériques myélomateuses :

Nous avons utilisé le procédé décrit par FINE et STEINBUSCH (1970) qui nécessite trois étapes de purification :

a - Précipitation au sulfate d'ammonium :

Le sérum centrifugé pour éliminer les caillots de fibrine 1 h à 9000 tours/min (rotor JA 10, J 21 Beckman) est filtré

* Nous tenons à remercier ces différents organismes pour leur contribution à ce travail.

et les immunoglobulines sont précipitées à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium par addition d'une solution de sulfate d'ammonium saturée. Le précipité recueilli par centrifugation est redissous dans du sérum physiologique (NaCl 0,15 M) et reprécipité comme précédemment. Le lavage du précipité se poursuit jusqu'à ce que la densité optique mesurée à 280 nm du surnageant soit identique à celle de la solution de sulfate d'ammonium. Le précipité enrichi en immunoglobulines est redissous dans le sérum physiologique et dialysé 3 h contre de l'eau distillée puis une nuit contre du sérum physiologique à 4°C.

b - Précipitation à l'acide caprylique :

A l'adialysable est ajoutée une solution d'acétate de sodium 0,06 M pH 4,8 (1 : 2 ; v/v). La précipitation des protéines contaminantes a lieu à température ambiante, sous agitation, par addition de 4 gouttes d'acide caprylique par ml de protéines. Le surnageant filtré sur laine de verre est dialysé une nuit contre le tampon d'acétate de sodium 0,015 M pH 5,7, la concentration en protéine étant de l'ordre de 10 mg/ml.

c - Chromatographie sur DEAE-cellulose :

La dernière étape de purification consiste en une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose (Whatman, Chemical Co., Maidstone, U.K.). La DEAE-cellulose est équilibrée dans le tampon acétate de sodium 0,015 M pH 5,7 et mélangée peu à peu au surnageant caprylique. Le tout est laissé en contact 30 min, puis l'élution est effectuée en "batch" dans un premier temps par le tampon initial puis par l'acétate de sodium 0,09 M pH 5,7. Chacune des fractions est ensuite dialysée contre du sérum physiologique et lyophilisée.

2 - Purification des IgA sériques normales : Le procédé de purification utilisé dans le cas de ces immunoglobulines comporte quelques modifications. En effet, le rapport IgA/IgG dans les sérums normaux étant de 1 pour 12, il a fallu améliorer la dernière étape de purification.

a - Précipitation éthanolique :

La précipitation s'effectue selon la méthode de COHN (1945). Un gradient d'éthanol est associé à des variations de température, de pH, de force ionique et de concentration en protéines.

b - Procédé de FINE et STEINBUSCH (1970) :

La fraction III de COHN dialysée contre du sérum physiologique est purifiée selon le protocole décrit p. 128¹²⁰. La seule modification a consisté à remplacer la DEAE-cellulose par de la DEAE-trisacryl dont le pouvoir résolutif est supérieur à celui de la DEAE-cellulose.

c - Chromatographie sur DEAE-trisacryl :

Le fractionnement sur DEAE-trisacryl (IBF, France) est effectué selon le protocole proposé par la firme IBF. La colonne de DEAE-trisacryl (3 x 19 cm) est équilibrée en tampon Tris 0,025 M - NaCl 0,035 M pH 8,8. Le débit est de 15 ml/h et les fractions recueillies de 5 ml. L'élution se fait dans un premier temps, par le tampon de départ puis par un gradient de pH associé à un gradient de NaCl (tampon II : Tris 0,025 M - NaCl 0,075 M pH 8,5 : tampon III : Tris 0,025 M - NaCl 0,15 M pH 7,5). Les différentes fractions sont rassemblées et dialysées contre du sérum physiologique puis lyophilisées.

3 - Purification des sIgA du lait humain : Nous utilisons dans les grandes lignes le procédé de fractionnement du lait maternel, mis au point par MONTREUIL *et al.* (1960a) 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 est délipidé par centrifugation à 10.000 tours/min 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 conditions décrites précédemment. Le lactosérum ainsi obtenu est amené à pH 7 par NH_4OH 4N et lyophilisé. Le lactosérum lyophilisé est redissous dans un volume d'eau distillée afin d'obtenir une solution à 3 % (p/v) en protéines. Ensuite, le lactosérum subit une série de précipitations au sulfate d'ammonium. Le précipité P_2 est obtenu par précipitation à 33 % de saturation en sulfate d'ammonium et à pH 4,6. Le précipité P_4 est obtenu à pH 7 et à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. Les précipités sont redissous dans une solution de NaCl 0,15 M dialysés quatre jours et lyophilisés. Le reste du lactosérum est conservé il ne contient pas de sIgA.

b - Purification des précipités P_2 et P_4 :

La purification des précipités P_2 et P_4 s'effectue par chromatographie d'échange d'ions et par gel filtration.

α) Chromatographie sur colonne de QAE-Sephadex :

La purification des précipités P_2 et P_4 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. Les précipités dissous et dialysés contre ce tampon pendant 24 h à + 4°C sont réajustés à pH 8 avec une solution de NH_4OH 4 N. La concentration finale en protéine injectée sur la colonne 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 éluées par addition de NaCl au tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8 : la première fraction par addition de NaCl 0,1 M et la seconde par addition de NaCl 1 M. Le débit de l'élution est de 60 ml/h et les fractions recueillies sont de 20 ml.

β) Chromatographie sur colonne de SP-Sephadex :

La fraction non retenue sur QAE-Sephadex est chromatographiée sur colonne de SP-Sephadex (Pharmacia) (3 x 40 cm) stabilisée

dans l'eau. Le débit de la colonne est de 40 ml/h et les fractions recueillies sont de 15 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.

γ) Chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA-34 :

La purification de la fraction non retenue sur SP-Sephadex est effectuée par chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA-34 (LKB, IBF). Nous utilisons deux colonnes couplées de type Pharmacia (5 x 100 cm). Le gel est stabilisé dans le tampon d'éluion : Tris-HCl 0,1 M NaCl 1 M pH 8. Le débit utilisé est de 30 ml/h. Les fractions recueillies sont de 10 ml.

C - METHODES D'ANALYSE

1 - Méthodes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques : La pureté des préparations d'IgA a été analysée par l'application de différentes méthodes.

a - Electrophorèse sur acétate 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 de l'Amidoschwartz.

b - Immunoélectrophorèse sur gelose :

Les immunoélectrophorèses sont effectuées selon la méthode de GRABAR et WILLIAMS (1955), modifiée par SCHEIDEGGER (1955). L'électrophorèse sur gelose, 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-protéines lactées et un sérum de Cheval anti-protéines sériques. La révélation des protéines est réalisée par le réactif à l'Amidoschwartz.

c - Immunodiffusion radiale (MANCINI *et al.*, 1965)

La quantification des protéines se fait par cette technique. L'immunodiffusion radiale est effectuée dans l'agarose préalablement fondue contenant l'immunsérum (la température ne dépassant pas 60°C). 15 ml de gel sont coulés sur une plaque de 10 x 10 cm. Après refroidissement du gel, des puits de dépôts (2 mm de diamètre) sont pratiqués. Une prise d'essai de 3 μ l est déposée dans chaque puits. La diffusion se fait en chambre humide pendant 48 heures. Après lavage du gel et coloration, les diamètres des cercles de précipitation sont mesurés. Une courbe d'étalonnage est toujours incluse dans la plaque.

d - Technique d'immunodiffusion (OUCHTERLONY, 1949)

La méthode d'immunodiffusion double permet de déterminer les relations antigéniques qui peuvent exister entre différents constituants. Dans ce cas les solutions antigéniques sont introduites dans des puits et diffusent 48 heures en chambre humide contre un immusérum déposé dans un puits central. L'immusérum utilisé étant ici généralement un sérum de Cheval anti-IgG ou anti-IgM.

2 - Etude de la masse moléculaire :

a - Coefficient de sédimentation :

α) *Par ultracentrifugation analytique* :

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

β) *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.

II - PRÉPARATION DES GLYCOPEPTIDES

Nous utilisons la méthode décrite par FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) qui consiste à séparer la "hinge region" ou région charnière renfermant les glycannes liés O-glycosidiquement des autres glycannes liés N-glycosidiquement. La zone charnière qui est très riche en proline, sérine et thréonine n'est pas sensible à l'hydrolyse par la trypsine et la pepsine et peut être isolée intacte. Les procédés utilisés sont décrits p. 180.

Après ces deux hydrolyses successives, les glycopeptides sont séparés sur colonne de Bio-Gel P-30 en deux fractions. La première fraction de masse moléculaire élevée contient la région charnière et les glycannes alcali-labiles, la seconde ne contient que la fraction glycopeptidique alcali-stable.

A - PRÉPARATION DES GLYCANNES ALCALI-LABILES :

La zone charnière est soumise à l'action de la soude en milieu réducteur. Les conditions de β -élimination utilisées sont celles de CARLSON (1966). Le protocole expérimental de la β -élimination ainsi que de la séparation des glycannes est décrit en détail p. 180.

B - PREPARATION DES GLYCANNES ALCALI-STABLES

La fraction II obtenue après chromatographie sur Bio-Gel P-30 de l'hydrolysate trypsique pepsique des sIgA est soumise ensuite à une hydrolyse par la pronase. L'hydrolysate pronasique est purifié par chromatographie de gel filtration. La fraction glucidique est purifiée dans un premier temps par chromatographie d'échange d'ions sur Dowex 1 X 2 (voir les détails expérimentaux p. 197). Deux fractions qui se distinguent par leur contenu en acide N-acétylneuraminique sont ainsi obtenues.

La fraction des glycopeptides sialylés a été fractionnée par électrophorèse préparative en toit selon le protocole décrit p. 198. La fraction asialoglycopeptidique très hétérogène a été soumise à une gel filtration sur colonne de Bio-Gel P-30 et à une chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavalline A et de *Lens culinaris* immobilisée (DEBRAY et MONTREUIL, 1981 ; DEBRAY *et al.*, 1981 ; 1983). Le protocole expérimental du fractionnement est décrit p. 203 et 205.

III - MÉTHODOLOGIES DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

La détermination de la composition en acides aminés et de la composition centésimale et molaire en glucides est appliquée à l'étude des sIgA. La structure primaire des glycanes a été déterminée en appliquant les méthodes classiques de détermination des structures.

A - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

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 150°C.

B - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES

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

Les osamines sont dosées par la méthode colorimétrique d'ELSON et MORGAN (1933), modifiée par BELCHER *et al.* (1954), après avoir été libérées par une hydrolyse effectuée en présence de l'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).

C - COMPOSITION MOLLAIRE EN GLUCIDES

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

FOURNET *et al.* (communication personnelle) est appliquée aux dosages des microquantités. 5 μg d'oligosaccharides sont introduits dans une pipette Pasteur bouchée extrêmement propre. 1 à 2 μg de mésoinositol sont ajoutés. Le tout est lyophilisé dans un tube à méthanololyse. Le méthanol/HCl 0,5 M est additionné au produit dès l'ouverture du lyophilisateur et à l'extérieur de la pipette Pasteur dans le tube à méthanololyse. La méthanololyse est conduite 24 heures à 80°C. Le méthanol/HCl est ensuite séché sous azote après refroidissement du tube. 20 μl de dichlorométhane et 20 μl d'anhydride trifluoro-acétique sont ajoutés à l'aide d'une pipette Corning et d'un aspirateur automatique. L'extérieur de la pipette est saturé avec le dichlorométhane et l'anhydride trifluoro-acétique. La trifluoro-acétylation se fait 4 h à 6 h à 37°C ou une nuit à température ambiante. Le tube contenant les monosaccharides et la seringue d'injection sont refroidis avant l'analyse. La détermination des rapports molaires des dérivés trifluoro-acétylés est effectuée classiquement.

D - METHYLATION DES GLYCANNES

La méthylation des oligosaccharides est réalisée suivant la méthode d'HAKOMORI (1964). Les dérivés méthylés sont ensuite méthanolysés et peracétylés. Leur analyse est effectuée en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon le protocole décrit par FOURNET *et al.* (1981). Pour permettre l'analyse de microquantités une méthode de microméthylation a été mise au point par PAZ PARENTE *et al.* (1983).

1 - Préparation de la base de microméthylation :

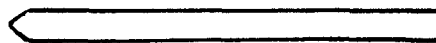
La base de méthylation est le méthyl sulfinyl potassium carbanion (FINNE *et al.*, 1980). Le potassium tert-butoxide est dissous rapidement pour donner une proportion de méthylsulfinyl carbanion importante en équilibre avec l'anion tert-butoxide (BRAUMAN *et al.*, 1970).

2 - Microméthylation :

a - Matériels utilisés :

La microméthylation nécessite l'emploi d'un matériel particulier simple fabriqué à partir de pipettes Pasteur. Il s'agit de :

pipette de réception



pipette de filtration



pipette de base



Des précautions élémentaires sont nécessaires pour la bonne marche de l'expérimentation. Afin d'éviter un bruit de fond dû à des acides gras contaminants il est conseillé de :

- n'utiliser qu'une vaisselle rigoureusement propre et lavée au sulfochromique chaud, la rincer à l'eau permutée puis à l'eau milli Q et la sécher complètement à l'étuve.
- que le produit à méthyler soit sec (il est conseillé de commencer la méthylation dès que le produit sort de lyophilisation).
- n'utiliser que de l'eau milli Q lors des extractions.
- que le bain de sonication soit à la température de la pièce.

b - Mode opératoire :

Le produit à méthyler est lyophilisé dans une pipette de réception introduite dans un tube à méthanolysé.

La base de méthylation (conservée à 4°C) est chauffée à 40°C jusqu'à liquéfaction. Dès l'arrêt du lyophilisateur 50 à 100 µl de DMSO (diméthyl sulfoxyde) sont ajoutés sous azote avec une pipette Pasteur adaptée à une pipette automatique. L'atmosphère du tube est saturée en azote. Le flacon de DMSO est remis sous saturation d'azote et gardé à l'abri de l'air.

Le méthyl sulfinylpotassium carbanion est ensuite ajouté (50 à 100 µl) avec la pipette de base sous atmosphère d'azote. Les deux tubes sont saturés en azote, du parafilm est mis sur les bouchons. Le produit est mélangé à la base grâce à un vortex et mis à soniquer au moins 1 heure. La réaction terminée, le tout est mis à congeler. Le flacon d'iodure de méthyle froid et le tube à méthyler sont essuyés afin d'éviter une condensation d'eau sur la pipette de prélèvement. L'iodure de méthyle (100 à 200 µl) ne s'ajoute pas sous azote. Une deuxième sonication est réalisée pendant 1 heure.

La manipulation suivante consiste à extraire le produit méthylé. Les différentes étapes d'extraction sont les suivantes :

- destruction de la base par addition de 500 µl d'eau milli Q froide (+ 4°C) en présence de quelques cristaux de thiosulfate de sodium ;

- Extraction du produit méthylé par 3 fois 500 µl de chloroforme. La phase chloroformique est récupérée dans un tube à méthanolyse et lavée 5 fois par 500 µl à 1 ml d'eau milli Q jusqu'à ce que la phase inférieure soit devenue limpide ;

- élimination des traces d'eau de la phase chloroformique par addition de sulfate de sodium jusqu'à ce que de petites aiguilles cristallines apparaissent à la surface de l'agglomérat formé. La phase chloroformique est filtrée sur laine de verre (Glass wool DMCS treated). La laine de verre est introduite avec une pince dans la pipette de filtration puis poussée avec une pipette propre. Le filtrat est recueilli dans une pipette de réception, évaporé à sec sous azote, introduit dans un tube à méthanolyse et lyophilisé pour

éliminer les traces de DMSO (le lyophilisateur devant être nettoyé à l'acétone).

Le produit méthylé est ensuite méthanolysé. 100 µl de CH₃OH/HCl 0,5 M sont ajoutés à l'intérieur de la pipette de réception et 200 µl à l'extérieur dans le tube à méthanolyse. Le tout est placé dans une étuve 24 h à 80°C. Le tube est séché sous azote à sec (sauf dans le cas où des résidus perméthyl-mannose et des résidus de perméthyl-fucose sont présents, dans ces conditions il faut laisser une goutte à peine au fond du tube).

Les monosaccharides méthylés sont acétylés en présence de 20 µl de pyridine, et de 50 µl d'anhydride acétique. Le tout est mélangé au vortex et laissé 24 h à température ambiante. Les dérivés méthylés et acétylés séchés sous azote sont injectés en présence de méthanol en spectrométrie de masse (FOURNET *et al.*, 1981).

E - HYDRAZINOLYSE - DESAMINATION NITREUSE

L'hydrazine anhydre coupe spécifiquement les liaisons amides et esters en libérant les acides dont le carboxyle est conjugué sous la forme d'hydrazides. Ce principe a tout d'abord été appliqué à l'identification des amino-acides C-terminaux des protéines (AKABORI *et al.*, 1952). Son emploi a été ensuite étendu aux glycanes conjugués aux protides par une liaison asparaginy-N-acétylglucosamine (KAVERZNEVA et DE-FAN, 1961 ; YOSIZAWA *et al.*, 1966). La coupure sélective des liaisons N-acétylglucosaminy est ensuite réalisée par une désamination nitreuse des hexosamines (MATSUSHIMA et FUJII, 1957). La désamination nitreuse des glycanes obtenus par hydrazinolyse provoque en effet une coupure spontanée des liaisons glucosaminy et galactosaminy par un réarrangement intramoléculaire qui conduit à la formation d'une structure semi-acétalique très labile. La N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine sont transformées en 2,5 anhydromannose et 2,5 anhydrotalose respectivement (Fig. 33 ; p. 141).

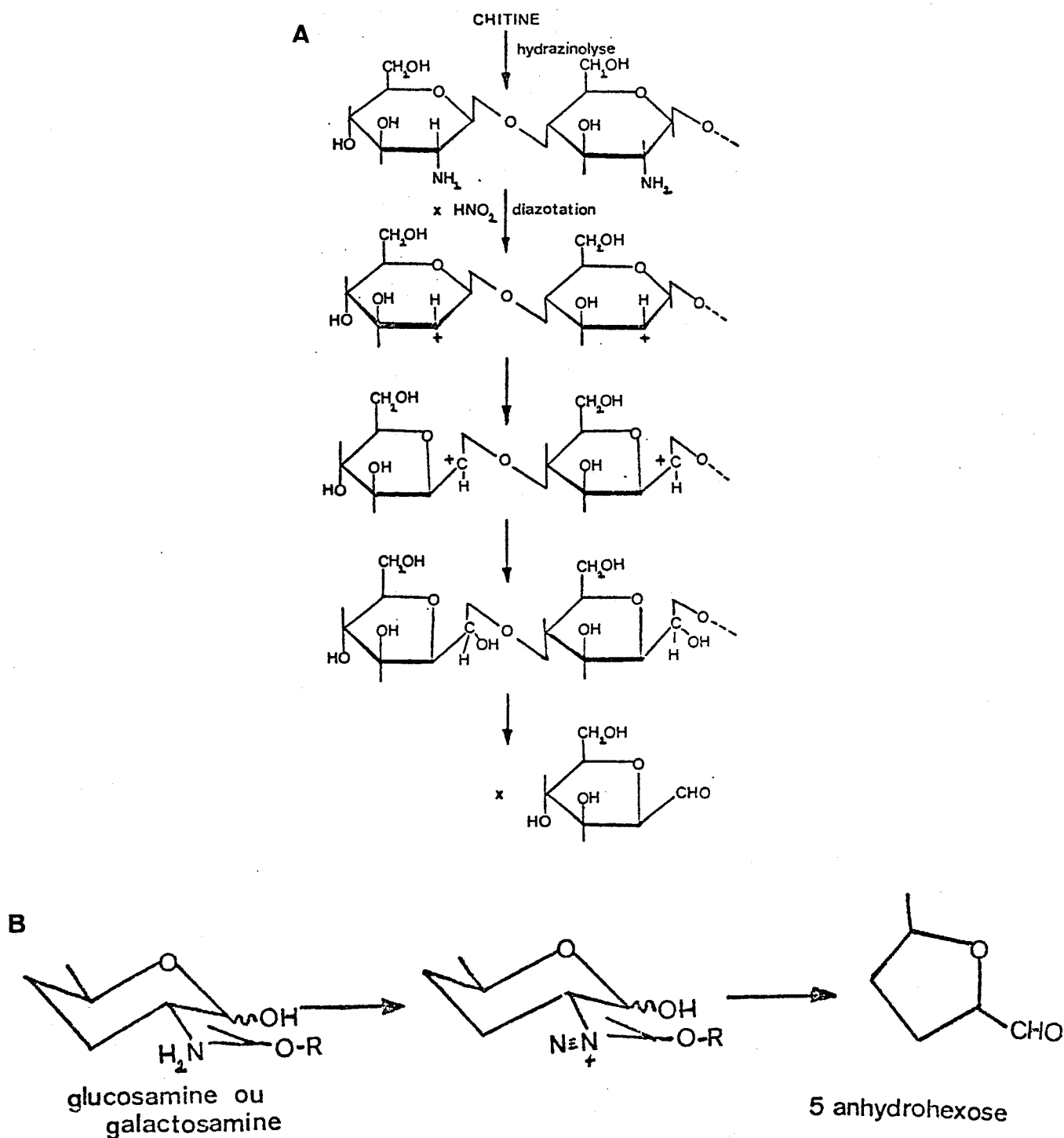


Figure 33 : (A) Hydrazinolyse et désamination nitreuse de la chitine. Coupure sélective des liaisons glucosaminidyl par désamination nitreuse (MATSUSHIMA et FUJII, 1957).

(B) Transformation de la glucosamine en 2,5 anhydromannose (HASE et MATSUSHIMA, 1969).

BUS
LILLE

L'application aux glycopeptides desialylés et non fucosylés de l'hydrazinolyse suivie de désamination nitreuse a permis à BAYARD et MONTREUIL (1974), BAYARD et ROUX (1975) et BAYARD et FOURNET (1976) après séparation des oligosaccharides (A, B et C, Fig. 34 ; p. 145) par chromatographie sur papier de démontrer l'existence d'un core commun à toutes les glycoprotéines : le mannotriosido-di-N-acétylchitobiose (oligosaccharide B). Par la suite quelques uns des oligosaccharides contenant du 2,5-anhydromannose ont été caractérisés par chromatographie phase gazeuse et analysés en spectrométrie de masse (KRUSIUS et FINNE, 1978 ; STRECKER *et al.*, 1978). Comme l'exacte position du fucose dans les glycoprotéines est souvent difficile à déterminer par l'application de méthodes chimiques, nous avons par spectrométrie de masse étudié les oligosaccharides obtenus par hydrazinolyse-désamination nitreuse des fucosylglycopeptides des sIgA. Le mode opératoire ainsi que la nature des fragments obtenus sont décrits dans la publication n° 1 p. 146. L'application à l'étude des structures des glycopeptides des sIgA est discutée p. 195.

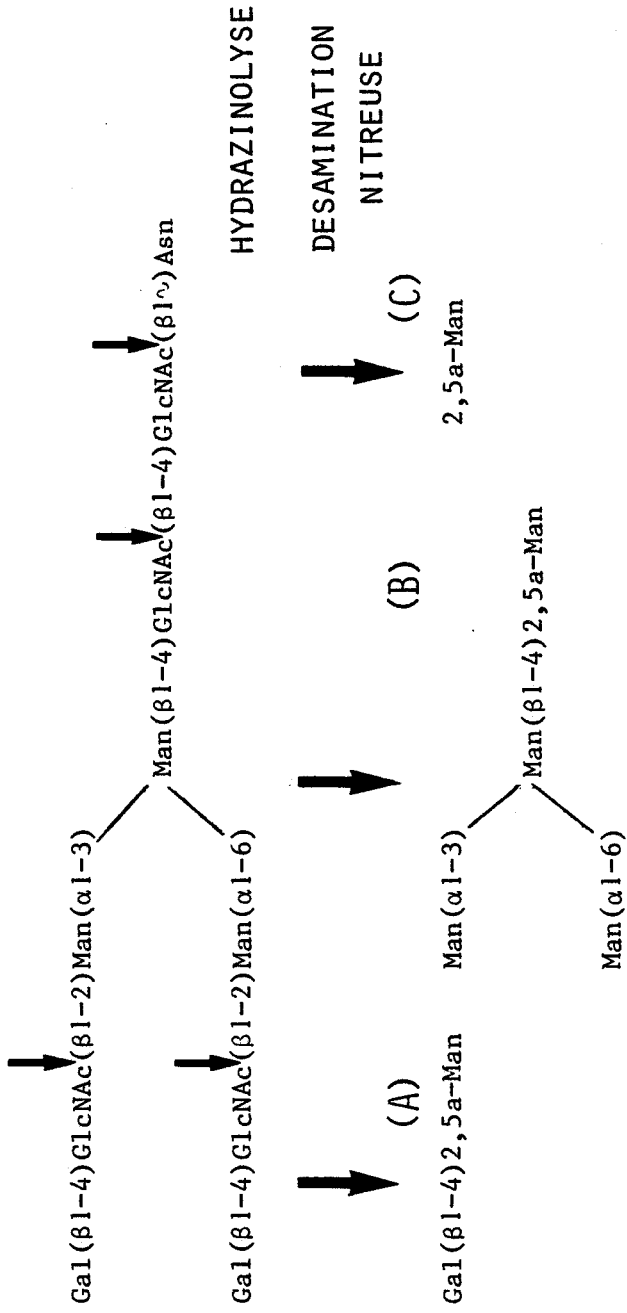


Figure 34 : Rupture des liaisons N-acétylglucosaminyle d'un glycane biantenné (BAYARD et MONTREUIL, 1974).



Characterization by Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Oligosaccharides Resulting from the Hydrazinolysis-Nitrous Acid Deamination Reaction of Glycopeptides

GÉRARD STRECKER,¹ ANNICK PIERCE-CRETEL, BERNARD FOURNET,
GENEVIÈVE SPIK, AND JEAN MONTREUIL

Laboratoire de Chimie Biologique and Laboratoire Associé au CNRS n° 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655-Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Received July 10, 1980

The hydrazinolysis-nitrous acid deamination of glycopeptides leads to the specific cleavage of *N*-acetylglucosamine linkages. The 2,5-anhydro-mannose containing oligosaccharides obtained by this way are reduced by sodium borohydride, methylated, and analyzed by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Here we report the characterization of 11 oligosaccharides obtained from various fucosyl-glycoasparagines and glycopeptides. In addition, the structure of a partially characterized glycopeptide isolated from human milk *sigA* was investigated as an application of the present method.

N-Glycosylproteins of the *N*-acetylglucosaminic type (or "complex type") have been recently described as possessing a general scheme of structure based on the presence of a trimannosido-di-*N*-acetylchitobiose core (1). The two, three, or four molecules of *N*-acetylglucosamine which are linked to this core are themselves substituted by a varying number of *N*-acetylneuraminic acid or fucose. An additional fucose may also be linked to the first *N*-acetylglucosamine.

The exact position of these molecules of fucose is often difficult to determine, since several *N*-acetylglucosamine or galactose residues may be involved in this linkage. In order to find easily the position of fucose in the glycan, we used the hydrazinolysis-nitrous acid deamination procedure (2,3) which leads to the specific cleavage of *N*-acetylglucosamine linkage. This re-

action was first applied to glycoproteins by Isemura and Schmid (4). Bayard *et al.* (5-7) investigated a number of glycoproteins and demonstrated the presence of the core of mannosido-di-*N*-acetylchitobiose in all glycans studied. Some 2,5-anhydro-mannose containing oligosaccharides were characterized by paper chromatography (5-7) or by *glc*-*ms*² (8,9). The analysis of oligosaccharides by tagging the reducing end with a fluorescent compound was recently performed (10). Although this method has been successfully used in the investigation of several glycoproteins, it has not yet been widely applied in this field. Here, we report the characterization by *glc*-*ms* of 11 oligosaccharides obtained from various fucosyl-glycoasparagines and glycopeptides.

² Abbreviations used: *glc*-*ms*, gas-liquid chromatography coupled with mass spectrometry; Gal, galactose; Fuc, fucose; Man, mannose; 2,5-aMan-ol, 2,5-anhydro-mannitol; 2-dGlc, 2-deoxyglucose.

¹ Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique.

STRECKER ET AL.

MATERIAL AND METHODS

The structures of the glycopeptides and glycoasparagines which were used in this work are given in Fig. 1. Glycoasparagines, GP-I and GP-II, were isolated from the urine of a patient with fucosidosis (9). In the previous paper, the nomenclature of glycoasparagines, GP-I and GP-II, were, respectively, GP-8 and GP-7 (9). Glycopeptide GP-III was isolated from the chymotrypsin hydrolysates of human lactotransferrin (11). In addition, the structure of a partially characterized glycopeptide (GP-IV), isolated from human milk sIgA (12), was investigated as an application of the present method.

For hydrazinolysis, 0.2 to 1 mg of glycopeptide was dissolved in 0.2 ml of anhydrous hydrazine (Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.) and heated at 105°C for 24 h. The hydrazinolysates were then dried under nitrogen and traces of hydrazine were eliminated under vacuum, in the presence of sulfuric acid. Deamination by nitrous acid was carried out as follows: the dried residue was dissolved in 1 ml of 0.5 N acetic acid and 5 mg of NaNO₂ was then added. The solution was allowed to stand at room temperature for 3 h. After destroying the excess of HNO₂ with ethylamine, the reaction was degassed under nitrogen and then adjusted to pH 9 with 1 N NaOH. The 2,5-anhydro-mannose containing oligosaccharides were reduced by the addition of 5 mg of sodium borodeuteride or borohydride (in the case of GP-IV). After 2 h of reaction, the mixture was neutralized with Dowex 50 X8 (25-50 mesh: H⁺) and boric acid distilled with methanol. Finally the reaction mixture was lyophilized, dried on P₂O₅, and methylated (13,14).

Gas-liquid chromatography of methylated oligosaccharides was performed by using columns of 3% SE-30 on Chromosorb W-HMDS (3 m × 0.2 cm; 140 to 310°C, 4°C/min) and capillary columns of OV-101 (60 m × 0.4 mm; 140 to 320°C, 5°C/min).

The carrier gas was helium and the flow rate was about 30 ml/min for packed column and 5 ml/min for capillary column.

Oligosaccharides were detected by total ionization current and mass fragmentography at *m/e* 189, 190, 250, 424, 454, and 598 (Riber-Mag 10-10 mass spectrometer, Rueil-Malmaison, France), under the experimental conditions: electron energy: 70 eV; ionization current: 0.2 mA; ionization chamber temperature: 190°C.

Mass spectra of oligosaccharides were interpreted according to the data of the literature (general review: see (15)).

RESULTS

The reactions involved in hydrazinolysis-nitrous acid deamination are illustrated by Fig. 2. The total ionic current obtained from the glycopeptides GP-I to GP-IV and the ms charts for peaks A-K are given in Figs. 3 to 5.

Mass Spectrometry of the Oligosaccharides Resulting from the Hydrazinolysis-Nitrous Acid Deamination Reaction (Figs. 4 and 5)

1. *Fuc-(1 → 6)-2,5-aMan-ol (spectrum A)*
This oligosaccharide was obtained in the four cases studied. Its characterization was carried out on the basis of the presence of fragments *m/e* 189 (fucose) and 190 (2,5 aMan-ol). The fragment *m/e* 250 was interpreted as possessing the structure CH₃-O-CH=O⁺-(2,5-aMan-ol) (15-16). The (1 → 6) linkage was not deduced from the analysis of the spectrum, but because of the occurrence of two minor components accompanying the formation of Fuc-(1 → 6)-2,5-aMan-ol and identified as Fuc-(1 → 6)-2-dGlc-ol and Fuc-(1 → 6)-Glc-ol, according to their mass spectra (Figs. 4B and C).

2. *Fuc-(1 → 6)-2-dGlc-ol (spectrum B)*
The oligosaccharide Fuc-(1 → 6)-2-dGlc-ol was identified on the basis of the presence of fragments *m/e* 189, 206, 266, and 104 as shown in the inset diagram of Fig. 4. More-

OLIGOSACCHARIDE CHARACTERIZATION

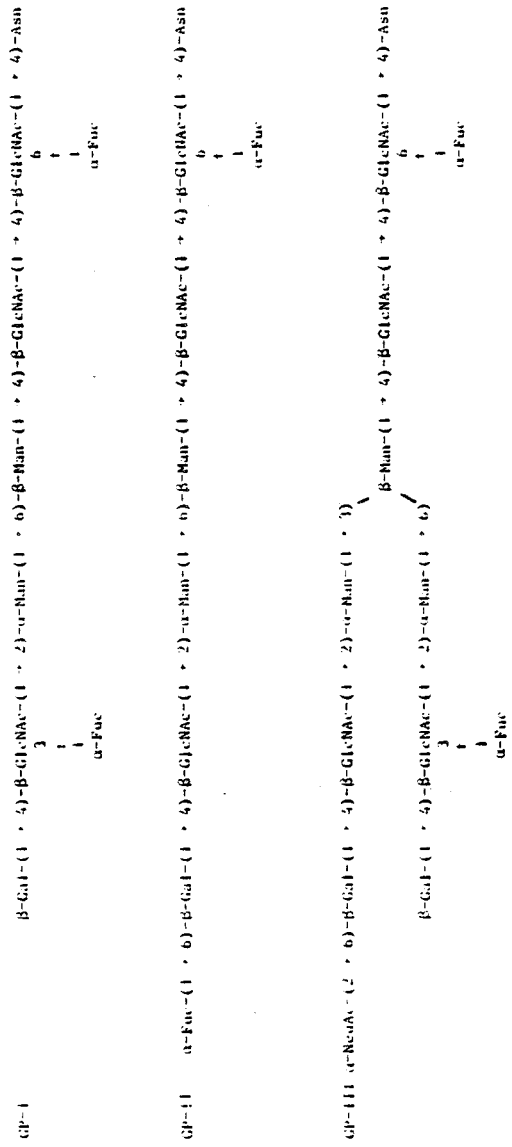


Fig. 1. Structure of GP-I to GP-III.



STRECKER ET AL.

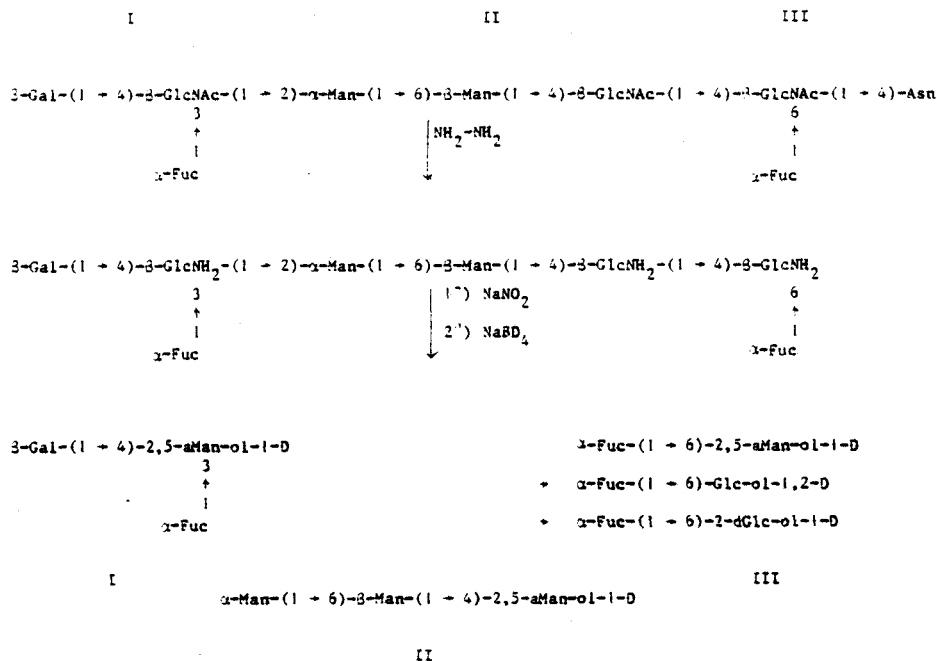


FIG. 2. Reactions involved in hydrazinolysis-nitrous acid deamination of GP-I.

over, the occurrence of ions *m/e* 104 and 307 indicates that the fucose is linked in the C-6 position, since carbons 3 and 4 are not substituted.

3. *Fuc-(1 → 6)-Glc-ol (spectrum C)*. This oligosaccharide was identified on the basis of the presence of fragments *m/e* 189, 237, 91, and 135 (Fig. 4C). The occurrence of ions *m/e* 46, 91, and 135 shows a double labeling of glucitol by deuterium on carbons 1 and 2. The (1 → 6) linkage was deduced from the presence of ions *m/e* 135, 223, and 307, which indicate that carbons 2, 3, and 4 are methylated (Fig. 4C).

4. *Gal-(1 → 4)-2,5-aMan-ol (spectrum D)*. This oligosaccharide was obtained from GP-IV. As sodium borohydride was used in this case, the values of *m/e* corresponding to 2,5-aMan-ol are 189 and 249. The (1 → 4) linkage of galactose to the polyol was not deduced from the spectrum analysis, but by the observation that GP-IV furnished only 3,6-di-methyl-N-acetylglucosamine as dimethyl derivatives (11).

5. *Gal-(1 → 4) [Fuc-(1 → 3)] 2,5-aMan-ol (spectrum E)*. This oligosaccharide was obtained from GP-I, GP-III, and GP-IV. Its identification was confirmed by the concurrence of ion *m/e* 189 (fucose) and 219 (hexose). The branched structure was shown by the absence of fragments *m/e* 190 and 250 and confirmed by the presence of ions *m/e* 424 and 454, whose structures are given in spectrum E. The analysis of the mass spectrum did not allow the definition of the relative position of fucose and galactose linked in (1 → 3) and (1 → 4) on 2,5-anhydromannitol. The (1 → 4) linkage of galactose was obtained by the methylation analysis of defucosylated GP-I, which led to the characterization of 3,6-dimethyl-N-acetylglucosamine (9).

6. *Fuc-(1 → 6)-Gal-(1 → 4)-2,5-aMan-ol (spectrum F)*. This oligosaccharide was obtained from GP-II and GP-IV. The structure is linear, due to the presence of fragments *m/e* 189, 393, 394, and 190 (Fig. 4F). The (1 → 6) linkage of galactose was de-

OLIGOSACCHARIDE CHARACTERIZATION

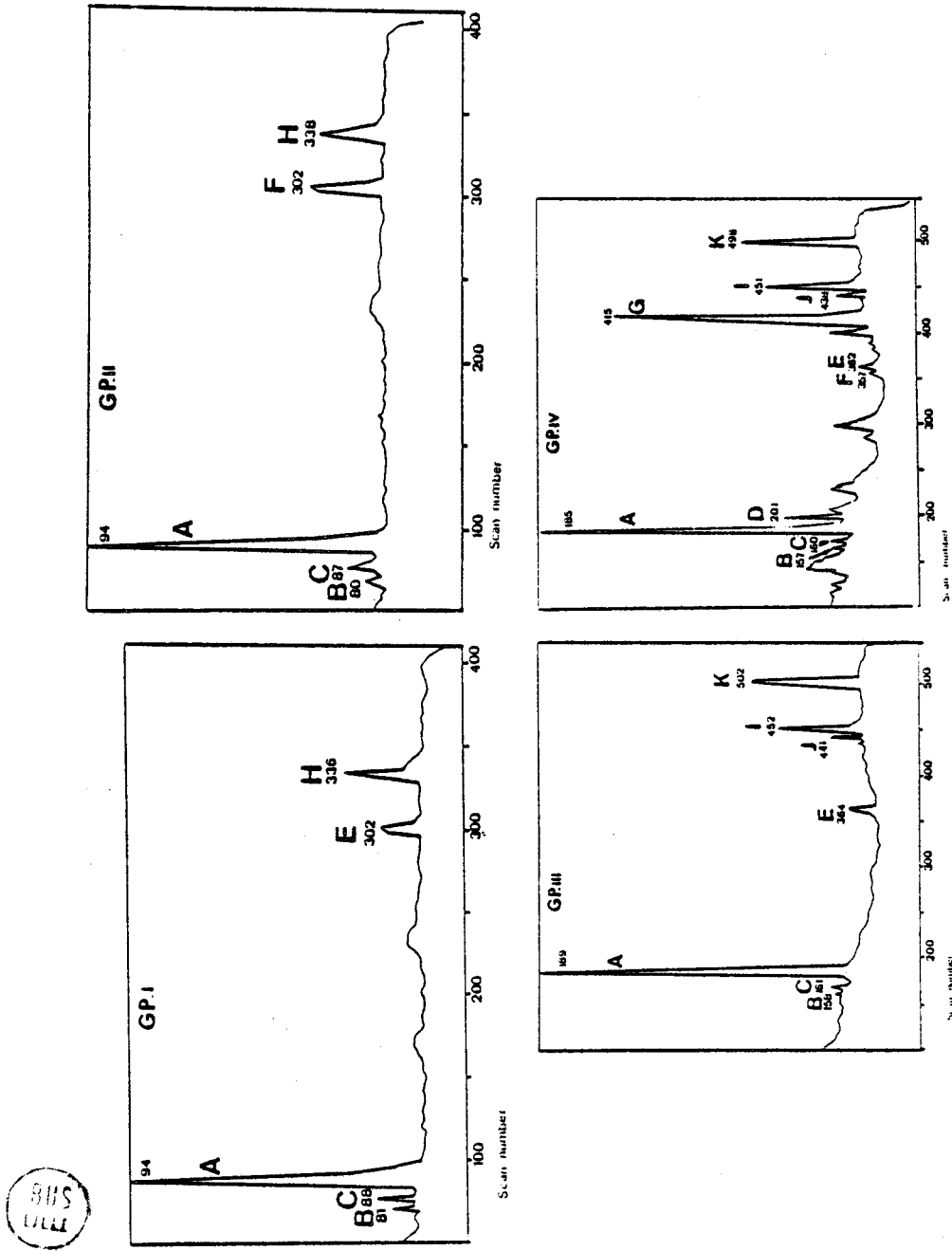


Fig. 3. Gas-liquid chromatography (total ionic current) of the oligosaccharides obtained by hydrazinolysis-nitrous deamination of GP-I to GP-IV. GP-I and GP-II: Column of 3% SE-30; GP-III and GP-IV: capillary columns of OV-101.

8115
LILLE

STRECKER ET AL.

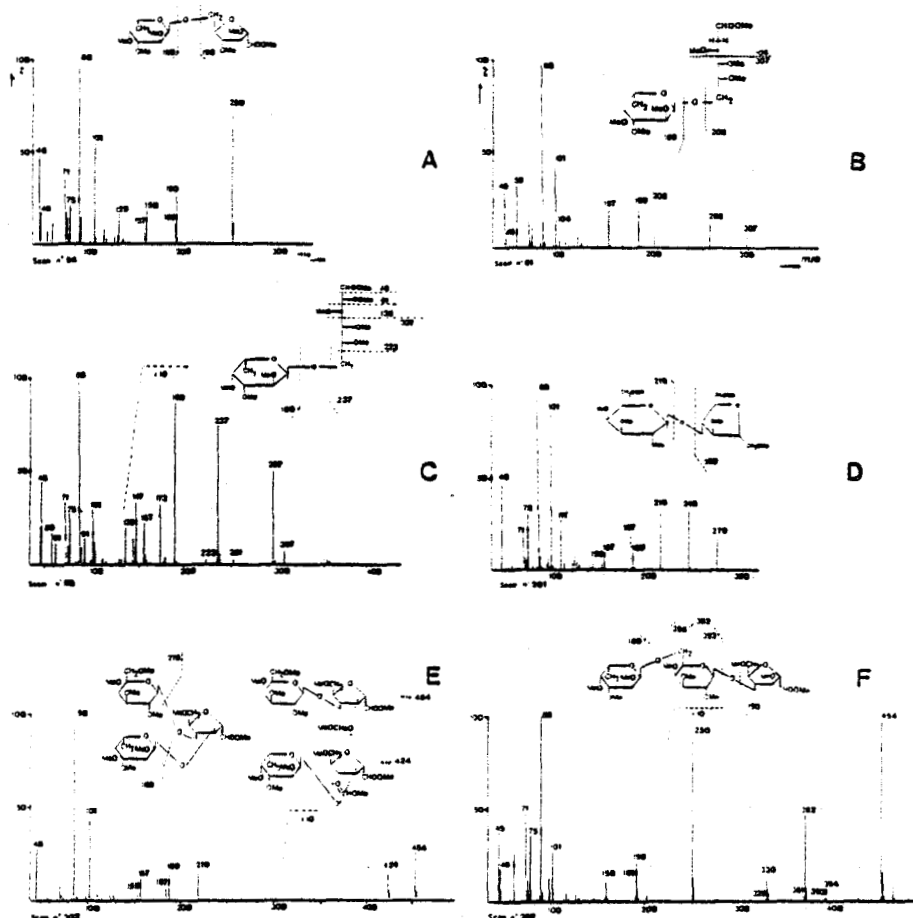


FIG. 4. Mass spectra of oligosaccharides A to F.

duced from the methylation analysis of GP-II and GP-IV which led to the identification of 2,3,4-trimethyl-galactose.

7. *Gal-(1 → 3)-Gal-(1 → 4)-2,5-aMan-ol* (spectrum G). This oligosaccharide was obtained from GP-IV. The fragments *m/e* 423 and 391 are indicative of the sequence hexose → hexose, while the fragment *m/e* 393 corresponds to the sequence hexose → 2,5-anhydro-mannitol (here reduced with KBH_4). The absence of *m/e* 189 and 249 indicates that the second hexose is substituted in (1 → 3) position. As GP-IV contains an excess of galactose (11) (2.8 instead of 2), and furnishes, after desialylation and methylation, 2,4,6-trimethylgalactose,

the structure *Gal-(1 → 3)-Gal-(1 → 4)-2,5-aMan-ol* was proposed as corresponding to the spectrum G.

8. *Man-(1 → 6)-Man-(1 → 4)-2,5-aMan-ol* (spectrum H). This oligosaccharide was obtained from GP-I and GP-II. A linear structure was deduced from the presence of fragments *m/e* 219 (hexose), 190 (2,5-aMan-ol), and 394 (Man → 2,5-aMan-ol). The fragment *m/e* 454 corresponds to the structure $\text{CH}_3\text{-O-CH=O}^+$ -(hexose → 2,5-aMan-ol). According to the known structures of GP-I and GP-II, the structure *Man-(1 → 6)-Man-(1 → 4)-2,5-aMan-ol* was given as corresponding to spectrum H.

9. *2-Keto-3-deoxy-nonulosic acid-(2 → 6)-*

OLIGOSACCHARIDE CHARACTERIZATION

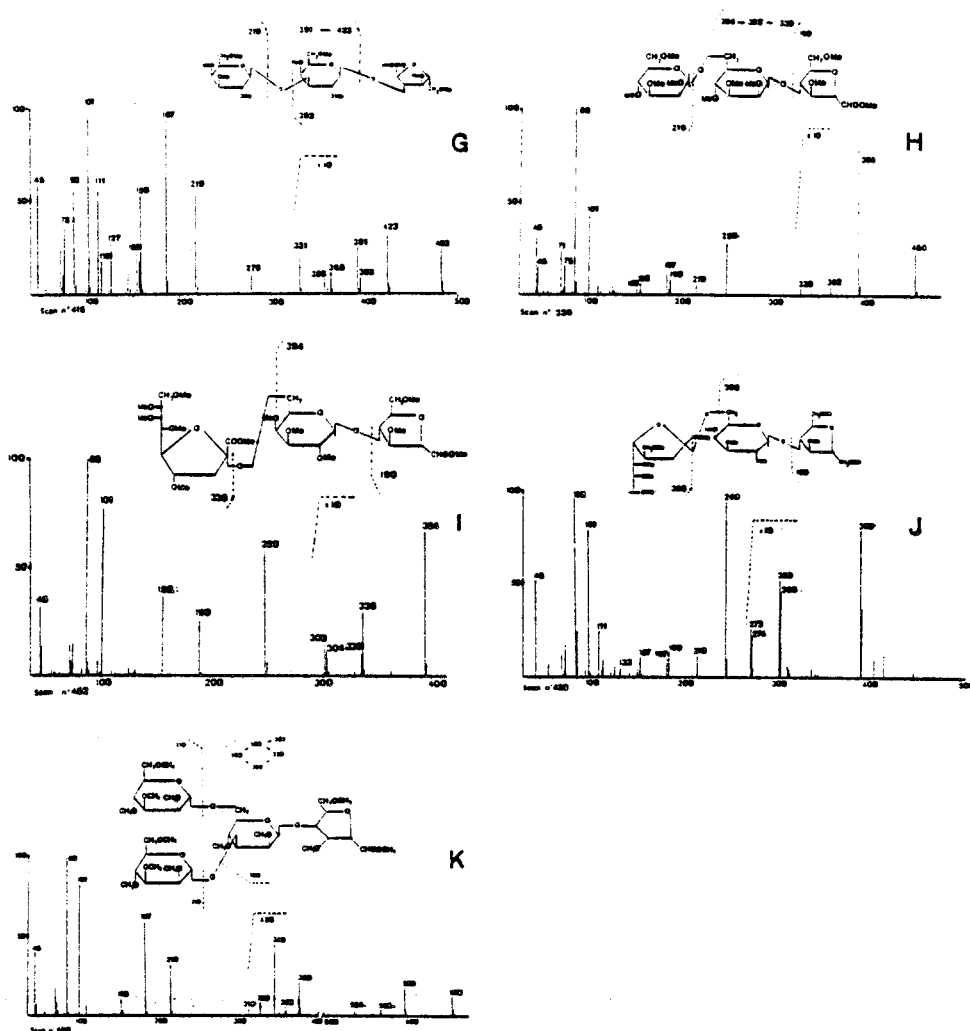


FIG. 5. Mass spectra of oligosaccharides G to K.

Gal-(1 → 4)-2,5-aMan-ol (spectrum I). This oligosaccharide was obtained from GP-III and GP-IV. The occurrence of fragments *m/e* 190 and 394 indicates a linear structure, while no fragments at *m/e* 189 and 219 are observed. New ions (*m/e* 336 and 304) are present and may be interpreted as corresponding to a 2-keto-3-deoxy-nonulosic acid residue (Fig. 6) resulting from the nitrous deamination of neuraminic acid.

10. *2 Keto-3-deoxy-4-hydromethyl-octulosonic acid-(2 → 6)-Gal-(1 → 4) 2,5-aMan-ol (spectrum J)*. This oligosaccharide was

obtained from GP-III and GP-IV. This minor component was interpreted as deriving from a second pathway of nitrous deamination of neuraminic acid, according to the hypothesis given in Fig. 6. Its characterization was deduced from the occurrence of fragments *m/e* 306 and 274.

11. *Man-(1 → 3) [Man-(1 → 6)] Man-(1 → 4)-2,5-aMan-ol (spectrum K)*. This oligosaccharide, obtained from GP-III and GP-IV, was identified on the basis of the presence of fragments *m/e* 598 and 658 ($\text{CH}_3\text{-O-CH=O}^+$ -598). The absence of

STRECKER ET AL.

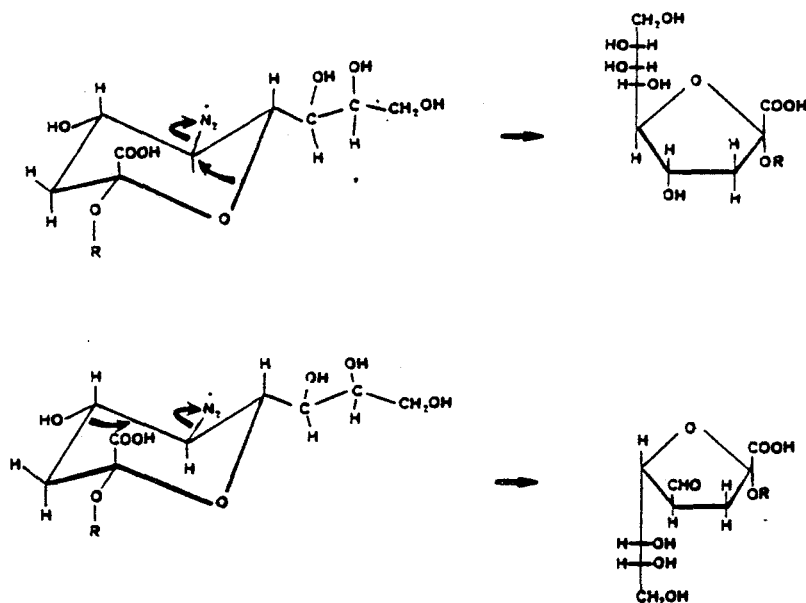


Fig. 6. Possible mechanism of nitrous acid deamination reaction of neuraminic acid according to that proposed for glucosamine (17).

ions *m/e* 190 and 250 is due to the (1 → 3) linkage of mannose. Nevertheless, the corresponding fragment *m/e* 190 is included in the value of ion *m/e* 598.

DISCUSSION

The interest of the nitrous acid deamination reaction resides in the low number of oligosaccharides obtained. The *N*-deacetylation step may be carried out by alkali treatment (4), or by hydrazinolysis (5,6). In these two cases, success is only ensured when the reducing part of the glycan does not contain alkali-labile linkages, as occur in *O*-glycosyl proteins. In the latter case, the presence of successive (1 → 3) linkages leads to a peeling reaction which destroys the glycan. In contrast the glycans deriving from *N*-glycosyl proteins contain a terminal *N*-acetylchitobiose residue protected against a peeling reaction by a resistant (1 → 4) linkage.

The most important result obtained by applying this method is the ability to deter-

mine easily the position of the fucose molecules attached to the di-*N*-acetylchitobiose or *N*-acetyllactosamine residues. Moreover, the fact that in the case of GP-III and GP-IV, the sequences 2-keto-3-deoxy-nonulosic acid → Gal → 2,5-aMan-ol and Fuc [Gal] → 2,5-aMan-ol can be characterized proves that *N*-acetylneuraminic acid and fucose are not located on the same *N*-acetylglucosamine. In the same way, the characterization of the two oligosaccharides (Man)₃ → 2,5-aMan-ol and Fuc → 2,5-aMan-ol demonstrates that fucose is linked to the terminal *N*-acetylglucosamine. This procedure also allows the identification of unusual structures, such as Gal → Gal → GlcNAc in GP-IV. Two minor oligosaccharides Fuc-(1 → 6)-2-dGlc and Fuc-(1 → 6)-Glc were identified. The mechanism of formation is not clear, but their occurrence is directly related to the attachment of a residue of fucose to the terminal *N*-acetylglucosamine.

The application of this method to the study of a glycopeptide isolated from milk sIgA

STRECKER ET AL.

(11) allowed the demonstration that it was in fact a mixture on several components. As the ¹H-nmr analyses (11) have demonstrated that the upper branch of N-acetyl-lactosamine was totally sialylated on C-6 of galactose, the results we obtained may be interpreted according to Fig. 7, where the relative proportions of each glycopeptide are indicated.

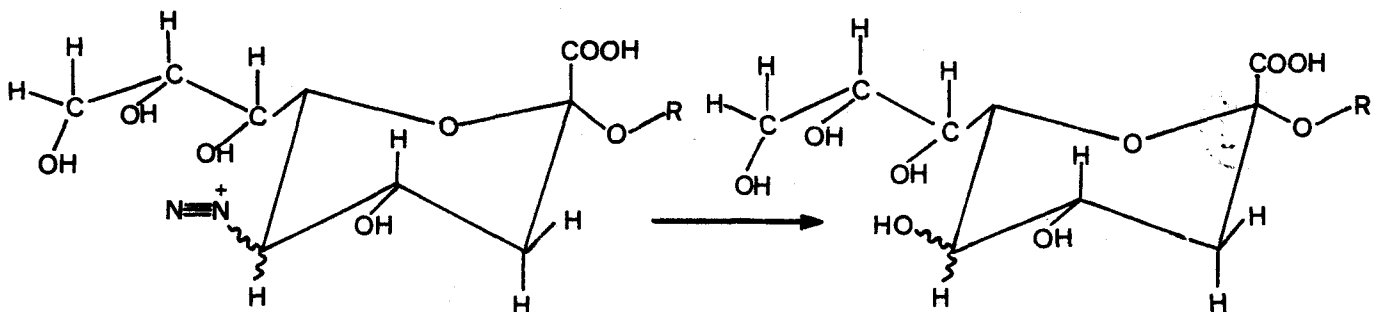
ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of M. Yves Leroy (CNRS Technicien) and Guy Ricart with gas chromatography-mass spectroscopy. This work was supported in part by the CNRS (L.A. n° 217: Relations structure-fonction des constituants membranaires), by the DGRST (A.C. Cancérogénèse et Pharmacologie du Cancer, Contrat n° 79-7-0669) and INSERM (Contract 78-1-052-3).

REFERENCES

1. Montreuil, J. (1974) *Pure Appl. Chem.* **42**, 431-477.
2. Foster, A. B., Martlew, E. F., and Stacey, M. (1953) *Chem. Ind. (London)* 823-828.
3. Matsushima, Y., and Fujii, N. (1957) *Bull. Chem. Soc. Jap.* **30**, 48-50.
4. Isemura, M., and Schmid, K. (1971) *Biochem. J.* **124**, 591-604.
5. Bayard, B., and Montreuil, J. (1974) in *Methodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués* (Montreuil, J., ed.), pp. 209-218, Editions du CNRS, Paris.
6. Bayard, B., and Roux, D. (1975) *FEBS Lett.* **55**, 206-214.
7. Bayard, B., and Fournet, B. (1976) *Carbohydr. Res.* **46**, 75-86.
8. Krusius, T., and Finne, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* **84**, 394-403.
9. Strecker, G., Fournet, B., Montreuil, J., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., and Dubeset, D. (1978) *Biochimie* **60**, 725-734.
10. Hase, S., Ikenaka, T., and Matsushima, Y. (1979) *J. Biochem.* **85**, 989-994.
11. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., and Montreuil, J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, in press.
12. Pierce-Créteil, A., Pambianco, M., Strecker, G., Montreuil, J., and Spik, G. (1981) *Eur. J. Biochem.*, in press.
13. Hakomori, S. (1964) *J. Biochem.* **55**, 205-208.
14. Lindberg, B., and Lönnngren, J. (1978) *Methods in Enzymology* (Ginsburg, V., ed.), Vol. 50, pp. 3-33, Academic Press, New York.
15. Lönnngren, J., and Svensson, S. (1974) *Advan. Carbohydr. Chem.* **29**, 41-106.
16. Kovacic, V., Bauer, S., and Rosik, J. (1968) *Carbohydr. Res.* **8**, 291-294.
17. Lindberg, B., Lönnngren, J., and Svensson, S. (1975) *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* **31**, 185-240.

Addendum : Le mécanisme de désamination nitreuse de l'acide neuraminique proposé ci-dessus était hypothétique et fondé sur le mécanisme intra-moléculaire décrit par LINDBERG *et al.* (1975) à propos de la N-acétylglucosamine. Récemment MONONEN et KRUSIUS (1983) ont démontré que cette désamination nitreuse procédait en fait d'une solvolysse de l'ion diazonium conduisant à l'acide fonulosonique.



F - HYDRAZINOLYSE

Les glycopeptides sont débarrassés de leur chaîne peptidique par rupture de la liaison amide en présence d'hydrazine. La réaction est effectuée dans les conditions décrites p. 147. Comme les résidus de N-acétylglucosamine sont transformés en glucosamine nous procédons ensuite à une N-réacétylation. Le glycanne libéré est séparé des acides aminés libres par passage sur une colonne de Bio-Gel P-2 (1 x 45 cm) dans l'eau distillée. Il est ensuite dissous dans une solution de bicarbonate de sodium saturée et N-réacétylé par addition de 20 µl d'anhydride acétique toutes les 10 min pendant 2 heures à température ambiante. La purification du glycanne N-réacétylé est effectuée sur la même colonne de Bio-Gel P-2. Les conditions expérimentales concernant la réduction du glycanne et sa purification sont données p. 147. Cependant, une dernière étape de purification est réalisée avant l'étude du glycanne sur une colonne de Bio-Gel P-2 (1 x 72 cm) dans l'acide acétique à 1 %. La fraction glycanne est repérée par la réaction à l'orcinol-sulfurique.

Les glycannes réduits ainsi libérés de leur chaîne peptidique peuvent être chromatographiés en couche mince. Deux systèmes solvants sont employés :

- n-butanol, éthanol, acide acétique, eau, pyridine (10, 100, 3, 30, 10 ; v/v).
- n-butanol, acide acétique, eau (2, 1, 1 ; v/v).

G - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

La dernière technique utilisée est la résonance magnétique nucléaire du proton à 360 MHz ou à 500 MHz. L'étude de la résonance magnétique nucléaire du proton a été réalisée sur les oligosaccharides préalablement traités par l'eau lourde (D₂O) 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 et sur un appareil Bruker WM 500 à 500 MHz opérant en transformées de FOURIER. Les détails expérimentaux sont décrits dans les revues générales suivantes : VLIEGENTHART *et al.* (1981) et VLIEGENTHART *et al.* (1983).

2 - RESULTATS

- I - PRÉPARATION DES IGA
- II - ÉTUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE DES
GLYCANNES LIÉS O-GLYCOSIDIQUEMENT AUX IGA
- III - ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES LIÉS
N-GLYCOSIDIQUEMENT AUX sIGA
- IV - RECHERCHES PRÉLIMINAIRES SUR LES MÉCANISMES
MOLÉCULAIRES D'ACTION DES GLYCANNES DANS LA
PROTECTION INTESTINALE LORS DE L'INFECTION
PAR LES SHIGELLES

I - PRÉPARATION DES IgA

A - PREPARATION DES IgA₁ SERIQUES MYELOMATEUSES :

Deux sérums myélomateux (LAB) et (DEJ) ont été analysés. Ils contenaient respectivement 47 g/l et 12 g/l d'IgA (Tableau XI p. 159). Le dosage des autres immunoglobulines a montré que l'augmentation du taux d'IgA s'accompagnait d'une très nette diminution de la teneur en IgG et en IgM.

400 ml de sérum (DEJ) et 100 ml de sérum (LAB) ont été fractionnés. La précipitation au sulfate d'ammonium permet un enrichissement de la fraction immunoglobulinique. La précipitation à l'acide caprylique conduit à l'élimination de protéines autres que les immunoglobulines. Les immunoglobulines sont récupérées dans le surnageant caprylique. La chromatographie sur DEAE-cellulose, effectuée en "batch" permet de séparer les différents isotopes. Ainsi la fraction éluée à pH 5,7 et à 0,09 M en acétate de sodium contient essentiellement les IgA. Le fractionnement du sérum (DEJ) fournit 2,6 g d'IgA₁ avec un rendement de 54 p. 100. La purification du sérum (LAB) a conduit à l'obtention de 2,8 g d'IgA₁ avec un rendement de 60 p. 100.

B - PREPARATION DES IgA SERIQUES NORMALES

La fraction III de COHN contient la presque totalité des IgA sériques (environ 90 p. 100) mais contient également de grandes quantités d'IgG et d'IgM.

250 g de Fraction III de COHN correspondant à environ 6 l de sérum sont fractionnés sur colonne de DEAE-trisacryl après avoir subi une précipitation au sulfate d'ammonium et une solubilisation par l'acide caprylique. Trois fractions sont obtenues, la fraction 1 contient les IgG, la fraction 2 les IgA et la fraction 3 de

TABLEAU XI

TAUX DES IMMUNOGLOBULINES PRESENTES DANS LE SERUM DE PATIENTS
ATTEINTS DE MYELOME à IgA₁.

(Les résultats sont exprimés en g/l).

Nature des Ig	Sérum normal	Sérum DEJ	Sérum LAB
IgG	12,2	1,82	2,42
IgA	2,44	12	47
IgM	1,06	0,20	0,15



la sérumalbumine et des α et β -globulines. Le fractionnement nous a fourni 1,5 g d'IgA sériques normales équivalant à un rendement de 11 p. 100.

C - PREPARATION DES IgA DE SECRETION

Le relargage au sulfate d'ammonium des protéines du lactosérum dans les conditions précisées à la p. 132 conduit à l'obtention d'environ 4 g de précipité P_2 et de 1 g de précipité P_4 par litre de lactosérum. Le précipité P_4 est fortement enrichi en immunoglobulines IgA, en effet une valeur de 80 p. 100 de sIgA a pu être déterminée par immunodiffusion simple selon MANCINI *et al.* (1965), tandis que le précipité P_2 renferme environ 30 p. 100 de sIgA.

1 - Chromatographie sur colonne de QAE-Sephadex :

40 g de P_2 ou de P_4 sont dissous dans 800 ml de tampon Tris-HCl 0,01 M pH 8 et fractionnés selon le principe décrit à la p. 133. 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' α -lactalbumine et du lysozyme. La dernière fraction qui correspond à l'élution par le 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 :

La fraction I récupérée après chromatographie sur colonne de QAE-Sephadex est chromatographiée 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 éluee 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 de sIgA et 3 g de lactotransferrine sont ainsi obtenus à partir du précipité P_4 . Le précipité P_2 permet d'obtenir 6 g de sIgA.

La présence dans les sIgA d'une contamination en IgG et IgM nous a conduit à chromatographier cette fraction sur colonne d'Ultrogel AcA-34.

3 - Chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA-34 :

Afin d'éliminer les traces d'immunoglobulines contaminantes, les sIgA sont chromatographiées sur une colonne d'Ultrogel AcA-34 dans un tampon Tris 0,1 M NaCl M pH 8. Un seul pic est obtenu lors de la gel filtration. Cependant les analyses par la méthode d'OUCH-TERLONY (1949) des immunoglobulines contaminantes ont montré que le début de la partie ascendante et la fin de la partie descendante du pic renfermaient des IgM et des IgG respectivement. Les tubes renfermant ces immunoglobulines sont éliminés. Ce fractionnement permet de récupérer les sIgA avec un rendement de 78 %.

D - CONTROLE DE L'HOMOGENEITE DES FRACTIONS

L'application des techniques décrites p. 134 aux IgA de différentes sources montre que :

- l'électrophorèse sur acétate de cellulose ne donne qu'une seule bande révélabale à l'Amidoschwarz.

- l'immunoélectrophorèse des IgA sériques ne donne qu'un seul arc de précipitation en présence d'un sérum de Cheval anti-protéines sériques humaines totales. Il en est de même pour la fraction renfermant les IgA sécrétoires. Elle ne donne qu'un seul arc de précipitation en présence d'un sérum de Lapin anti-protéines lactées totales et d'un sérum de Cheval anti-protéines sériques humaines totales.

L'immunodiffusion radiale (MANCINI *et al.*, 1965) permet de quantifier les traces d'IgG (0,3 %) et d'IgM (0,6 %) contaminant la fraction sIgA.

E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés de la molécule d'IgA provenant soit du sérum de sujets sains ou atteints de myélome soit 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 VIII ; p. 63).

F - COMPOSITION EN GLUCIDES

Les compositions centésimales et molaires des IgA sériques normales et myélomateuses sont données dans le Tableau XII ; p. 163. Les IgA sériques renferment 8 % de glucides totaux. Les rapports molaires des monosaccharides présents dans les IgA sériques normales et myélomateuses sont similaires. La présence de N-acétylgalactosamine, monosaccharide marqueur des glycanes liés O-glycosidiquement, confirme le fait que les IgA sériques myélomateuses sont des IgA₁.

Les compositions centésimale et molaire en glucides obtenues pour les sIgA du lait humain provenant soit du précipité P₂ soit du précipité P₄ sont rassemblées dans le Tableau XIII ; p. 164.

L'application des méthodes de dosage colorimétrique décrites à la p. 138, permet de dire que les IgA provenant du précipité P₂ sont plus riches en glucides que celles provenant du précipité P₄. Le taux de glucides diminue lorsque les sIgA provenant du précipité P₂ sont reprécipitées 2 fois consécutives à 33 % de saturation en sulfate d'ammonium et à pH 7, et devient comparable à celui des sIgA isolées à partir du P₄. Ces résultats sont en accord avec ceux de DESCAMPS (1974), il semblerait que cette différence de contenu glucidique ne soit pas due seulement à la présence de glycopeptides provenant du P₁₀ adsorbés sur la molécule d'IgA, mais aussi à la présence de chaîne de sécrétion libre.

TABLEAU XII

COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN OSES
DES IgA SERIQUES NORMALES ET MYELOMATEUSES

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

	IgA LAB	IgA DEJ	IgA normales
<u>Composition centésimale</u>			
Oses neutres	4,20	3,80	3,90
Osamines	3,10	3,00	3,20
Acides sialiques	1,0	1,20	1,10
Oses totaux	8,3 %	8 %	8,20 %
<u>Composition molaire</u>			
Fuc	0,61	0,40	0,22
Gal	3,90	3,42	3,40
Man *	3	3	3
GlcNAc	3,86	3,98	3,84
GalNAc	1,69	1,40	1,59
NeuAc	1,73	2,04	1,86





TABLEAU XIII

COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES DES IgA LACTEES TOTALES ISOLEES
DES PRECIPITES P₂ ET P₄ (Les résultats sont calculés sur la base de 3 résidus de mannose).

	IgA de P ₂		IgA de P ₄
	Avant précipitation au sulfate d'ammonium	Après précipitation au sulfate d'ammonium	
<u>Composition centésimale</u>			
Oses neutres	6,41	5,54	5
Osamines	5,6	3,85	4,78
Acides sialiques	2,41	2,23	2,1
Oses totaux	14,42 %	11,62 %	11,88 %
<u>Composition molaire</u>			
Fuc	0,96	0,83	0,83
Gal	3,57	2,44	2,36
Man	3	3	3
GlcNAc	5,09	4,39	4,29
Gal) GlcNAc	1,17	0,88	0,83
NeuAc	1,16	0,99	1

La préparation de sIgA à partir du précipité P₄ conduit après 2 chromatographies d'échange d'ions à l'obtention d'un lot d'immunoglobulines à 99 % de pureté. Les IgA provenant du précipité P₂ nécessitent une étape supplémentaire de purification afin d'éliminer tout apport glucidique.

G - COEFFICIENT DE SEDIMENTATION ET MASSE MOLECULAIRE

L'étude de la masse moléculaire et du coefficient de sédimentation n'a été faite que sur les IgA de sécrétion. En effet, la masse moléculaire des IgA sériques normales a fait l'objet de nombreuses études.

1 - Coefficient de sédimentation :

- *Par ultracentrifugation analytique :*

L'étude préliminaire par ultracentrifugation a montré que notre préparation d'IgA renferme environ 80 % d'un composé ayant un S[°]_{20,w} de 10,1 S et 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.

- *Par chromatographie de gel filtration sur couche mince**

L'étude du rapport IgA 7 S - 11 S et hauts polymères effectuée sur notre préparation d'IgA provenant à la fois des précipités P₂ et P₄ 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 plus ne seraient-ils pas détectables par cette méthode.

∞ Nous remercions A. VERBERT et M. CONIEZ pour les études effectuées à l'aide de l'ultracentrifugeuse analytique.

* Nous remercions également Mme HAYEM pour l'étude chromatographique en couche mince.

2 - Masse moléculaire : La masse moléculaire de la préparation d'IgA isolée du P₄ a été déterminée selon le procédé décrit à la p. 136. Elle est égale à 331.000 ± 16.550 daltons. Cette valeur est en accord avec celles déjà citées dans la littérature.

H - CONCLUSIONS

La préparation des IgA sériques normales et des IgA sériques myélomateuses fournit des quantités appréciables d'immunoglobulines extrêmement pures. La préparation des IgA de sécrétion à partir du précipité P₄ fournit des IgA pures à 99 % après deux chromatographies d'échange d'ions et une chromatographie de gel filtration. Les IgA provenant du précipité P₂ nécessitent une étape supplémentaire de purification afin d'éliminer les oligosaccharides libres présents dans le lait de Femme adsorbés à la fraction immunoglobulinique. Cette fraction repurifiée est également utilisée lors de l'étude de la fraction glycanique des sIgA.

L'étude de la composition glycanique des IgA montre que les IgA sériques contiennent 8 % de glucides totaux et que les IgA sécrétoires en contiennent 12 %. Cet apport supplémentaire en glucides s'explique par la présence dans les sIgA de la pièce de sécrétion et la pièce de jonction qui renferment aussi des glycannes. La caractérisation dans toutes les IgA de résidus de N-acétylgalactosamine est en faveur de la présence de la sous-classe des IgA₁. Aucune différence notable n'apparaît entre la composition centésimale et molaire des oses présents dans les IgA sériques normales et celles isolées de sérums myélomateux.

II - ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES LIÉS O-GLYCOSIDIQUEMENT AUX IGA

L'étude des glycanes des sIgA a révélé une grande hétérogénéité de la structure de ces derniers. Afin de vérifier si cette hétérogénéité est due au fait que nous travaillons sur des sIgA isolées à partir d'un mélange de lait ou si elle est intrinsèque à la molécule même des sIgA, nous avons étudié d'une manière comparative la structure des fractions O-glycanniques des IgA sériques myélomateuses, des IgA sériques normales et des IgA de sécrétion.

A - ETUDE DE LA FRACTION O-GLYCANNIQUE DES IGA SERIQUES

Le fractionnement sur Bio-Gel P-30 de l'hydrolysate tryptique-pepsique conduit à l'obtention de deux fractions. L'analyse des glucides du pic I (IgA DEJ), du pic I (IgA LAB) et du pic I (IgA normale) montre que les glycanes présents dans la zone charnière des IgA₁ sériques myélomateuses et normales sont composés exclusivement d'acide N-acétylneuraminique, de galactose et de N-acétylgalactosamine (Tableau XIV ; p. 168).

La β -élimination en milieu réducteur de ces trois pics libère dans le cas des IgA sériques myélomateuses deux glycanes et dans le cas des IgA sériques normales trois glycanes. Les glycanes libérés des IgA (LAB) et (DEJ) possèdent en chromatographie sur couche mince une vitesse de migration identique, de plus leur position coïncide avec celle de deux des glycanes isolés des IgA sériques normales. La chromatographie d'échange d'ions permet la séparation de ces fractions glycanniques en une fraction neutre constituée d'un résidu de galactose pour un résidu de N-acétylgalactosaminitol et en une fraction acide qui possède en plus un résidu d'acide N-acétylneuraminique.

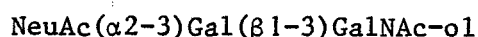
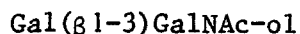
TABLEAU XIV

COMPOSITION MOLAIRES DES OSES PRESENTS DANS LA ZONE CHARNIERE
DES IgA₁ SERIQUES MYELOMATEUSES ET DES IgA SERIQUES NORMALES

Monosaccharides	Fractionnement de l'hydrolysate trypsique-pepsique		
	Pic I DEJ	Pic I LAB	Pic I IgA normale
Gal	0,94	1,10	0,80
GalNAc	1	1	1
NeuAc	0,11	0,10	0,10



La méthylation de ces deux fractions ainsi que l'emploi d'un mélange de glycosidases provenant de *Bacteriobifidum bifidum* * permettent l'identification des deux glycannes aux structures suivantes :



L'étude de la fraction O-glycannique des IgA sériques normales fournit un troisième glycanne uniquement composé du monosaccharide GalNAc-ol.

B - ETUDE DE LA FRACTION O-GLYCANNIQUE DES IgA DE SECRETION
DU LAIT HUMAIN

Le fractionnement de l'hydrolysat trypsique-pepsique des sIgA sur colonne de Bio-Gel P-30 fournit une première fraction (GP-I) renfermant du fucose, du galactose, de la N-acétylglucosamine, de l'acide N-acétylneuraminique et de la N-acétylgalactosamine. Cette fraction, plus complexe que la fraction glycannique isolée des IgA sériques est soumise à la β -élimination en milieu réducteur puis chromatographiée sur Sephadex G-25 en trois fractions (F-I à F-III) (Fig. 3 ; article 2 ; p. 183).

1 - Etude des glycannes des fractions F-I. et F-II :

La fraction F-I soumise à la chromatographie sur Dowex 1 x 2 se sépare en deux constituants, un neutre (N-4) et un acide (A-4) (voir p. 183).

* Nous tenons à remercier le Prof. S. BOUQUELET pour le don de ce mélange d'enzymes bactériens extrait de *B. bifidum*.

La fraction F-II dans les mêmes conditions conduit à l'isolement de deux fractions acides : A₂ et A₃ (voir p. 183). Seule la fraction N-4 qui existait en quantité suffisante a fait l'objet d'études ultérieures. Ce glycanne contient un résidu de fucose, quatre de galactose, trois de N-acétylglucosamine et un de N-acétylgalactosaminitol.

a - Méthylation :

Le profil obtenu par chromatographie phase gazeuse du composé N-4 sur colonne capillaire est donné à la Fig. 35 ; p. 171. Les résultats concernant la méthylation du glycanne N-4 sont rassemblés dans le Tableau XV ; p. 172. La présence de 2,3,4-Me₃-Fuc et de deux résidus de 2,3,4,6-Me₄-Gal indique qu'ils sont en position externe. La présence de 2,4-Me₂-Gal indique que le glycanne N-4 possède une structure branchée. Deux résidus de triméthyl galactose sont également présents : le 2,4,6-Me₃-Gal et le 3,4,6-Me₃-Gal. En ce qui concerne les dérivés méthylés des osamines le 3,6- et le 4,6-Me₂-GlcNAc(Me) sont trouvés dans les rapports 1 : 1. De plus, la caractérisation de 6-Me₁-GlcNAc(Me) est en faveur de la substitution de cette N-acétylglucosamine à la fois par du galactose et du fucose. Des traces de 1,4,5,6-Me₄-GalNAc(Me)ol et la présence à la fois de 1,4,5-Me₃-GalNAc(Me)ol et de 1,4,5-Me₃-3,6aGalNAc(Me)ol (lors de la méthanolyse, le N-acétylgalactosaminitol possédant deux groupements O-acétyl en C-3 et C-6 se cyclise pour donner un 3,6 anhydro-N-acétylgalactosaminitol en accord avec les résultats de KAMERLING *et al.* (1982) montre que la N-acétylgalactosamine est substituée à la fois en C-3 et C-6.

b - Spectrométrie de masse :

De masse moléculaire élevée, ce glycanne a pu être analysé sur un spectromètre de masse LKB 9000. Cette étude a été effectuée dans le laboratoire du Professeur H. EGGE, à l'Université de Bonn.

L'examen du spectre de masse (Fig. 36 ; p. 173) démon-

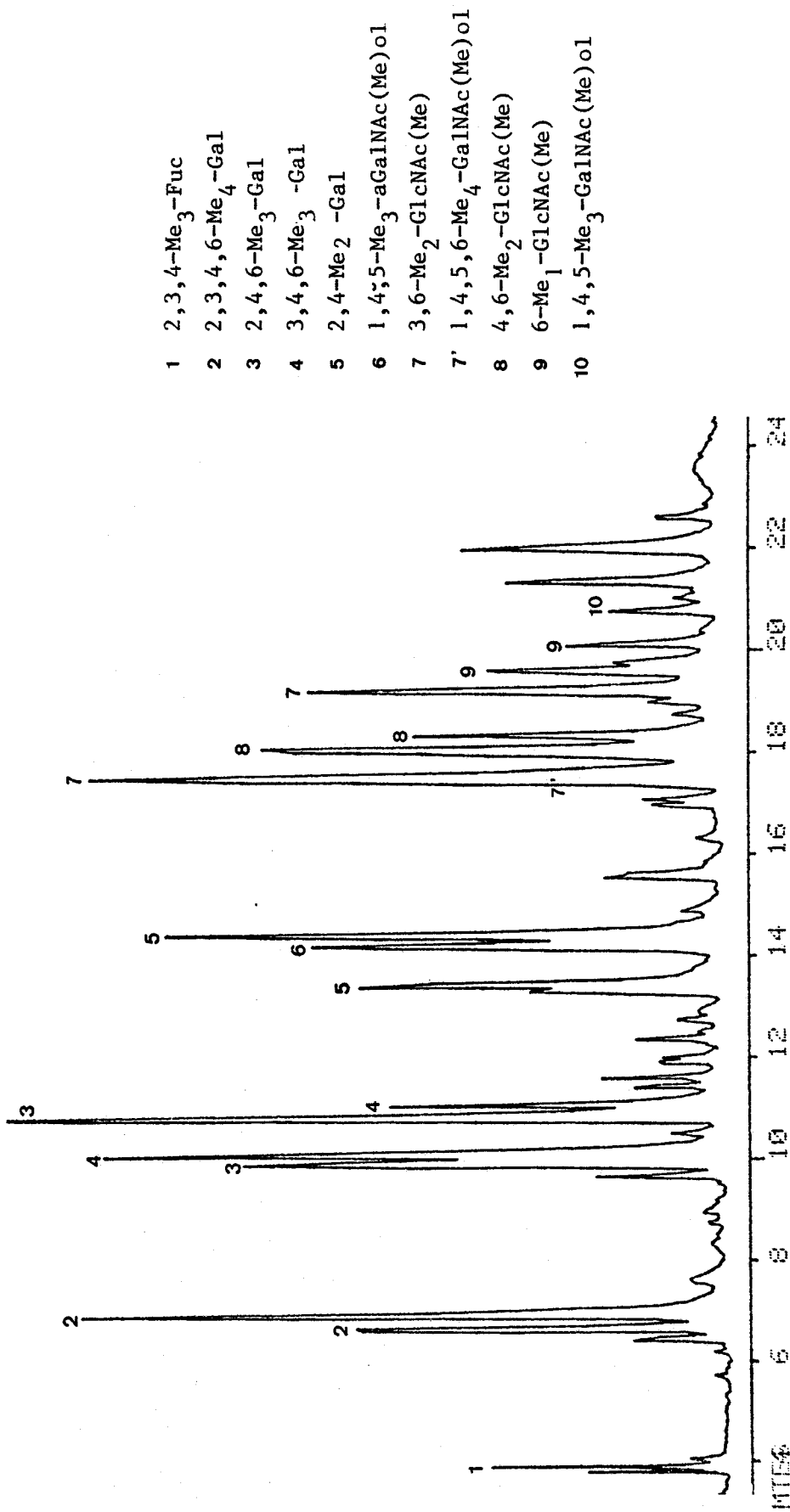


Figure 35 : Profil chromatographique des dérivés méthylés de la fraction nonasaccharidique N-4 sur colonne capillaire OV 101 (100 à 240°C ; 5°C/min).



TABLEAU XV

COMPOSITION MOLLAIRE DES DERIVES METHYLES
ET ACETYLES PRESENTS DANS LE NONASACCHARIDE N-4

Nature du dérivé méthylé	Rapport molaire
2,3,4-Me ₃ -Fuc	0,65
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,85
2,4,6-Me ₃ -Gal	0,55
3,4,6-Me ₃ -Gal	0,30
2,4-Me ₂ -Gal	0,80
3,6-Me ₂ -GlcNAc(Me)	0,95
4,6-Me ₁ -GlcNAc(Me) *	1
6-Me ₁ -GlcNAc(Me)	0,66
1,4,5,6-Me ₄ -GalNAc(Me)-ol	Traces
1,4,5-Me ₃ -GalNAc(Me)-ol	0,85
1,4,5-Me ₃ -aGalNAc(Me)-ol	

* Les calculs sont effectués sur la base d'un résidu de
4,6-Me₂-GlcNAc(Me).



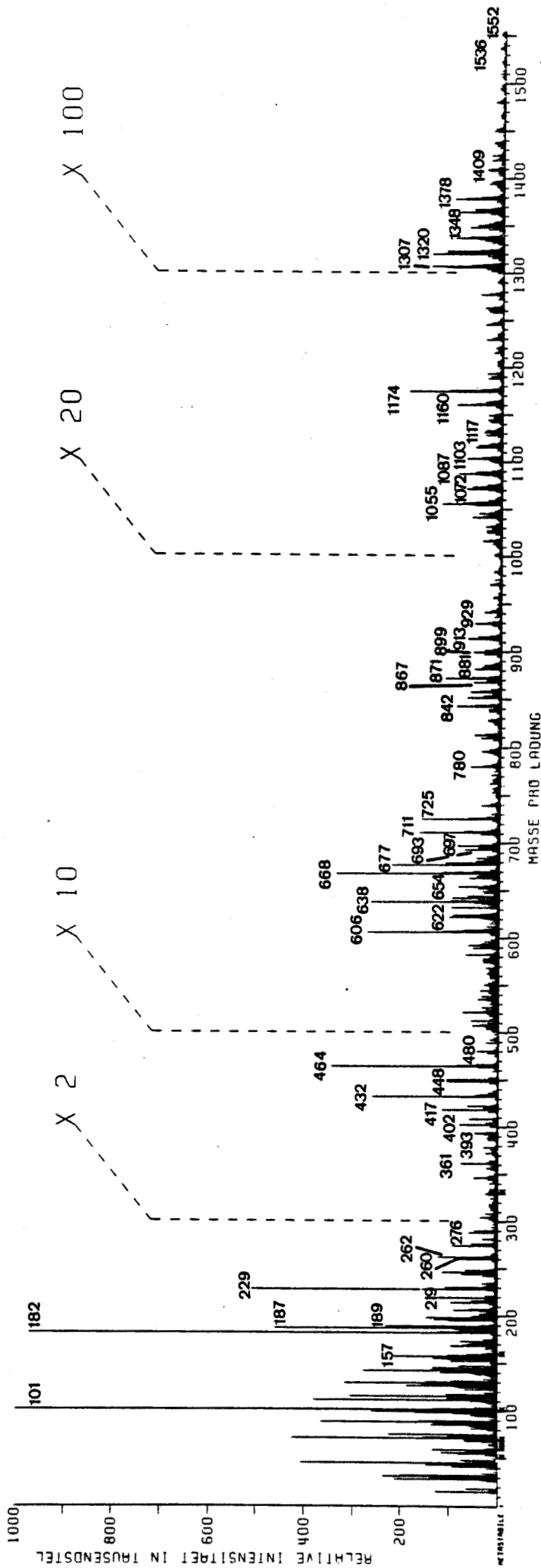


Figure 36 : Spectre de masse du glycanne N-4 après méthylation et introduction directe dans l'appareil LKB 9000. (température de l'échantillon : 300°C ; température de la source d'ionisation : 350°C ; voltage d'accélération : 2,33 kV ; énergie d'ionisation : 20 eV)



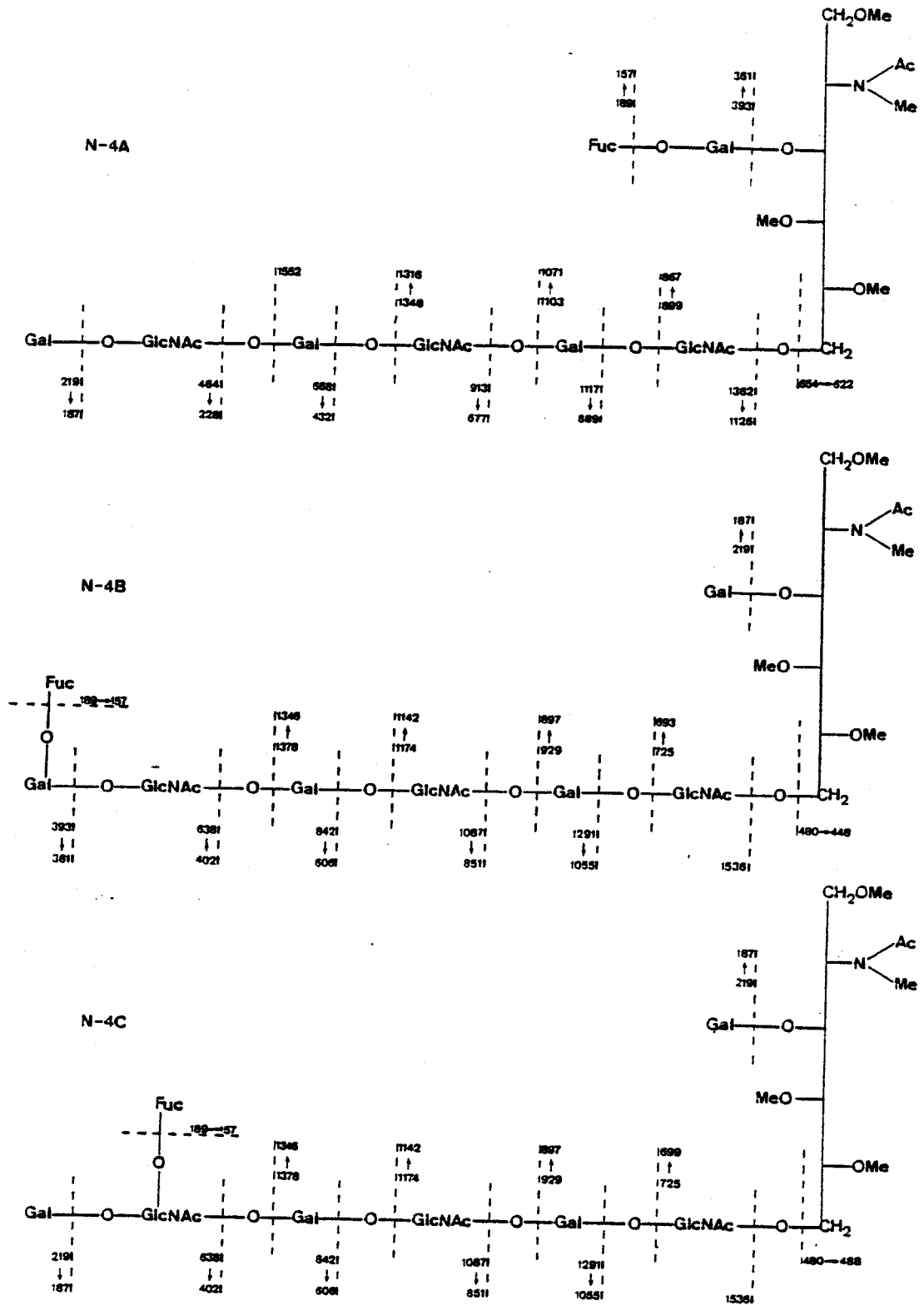
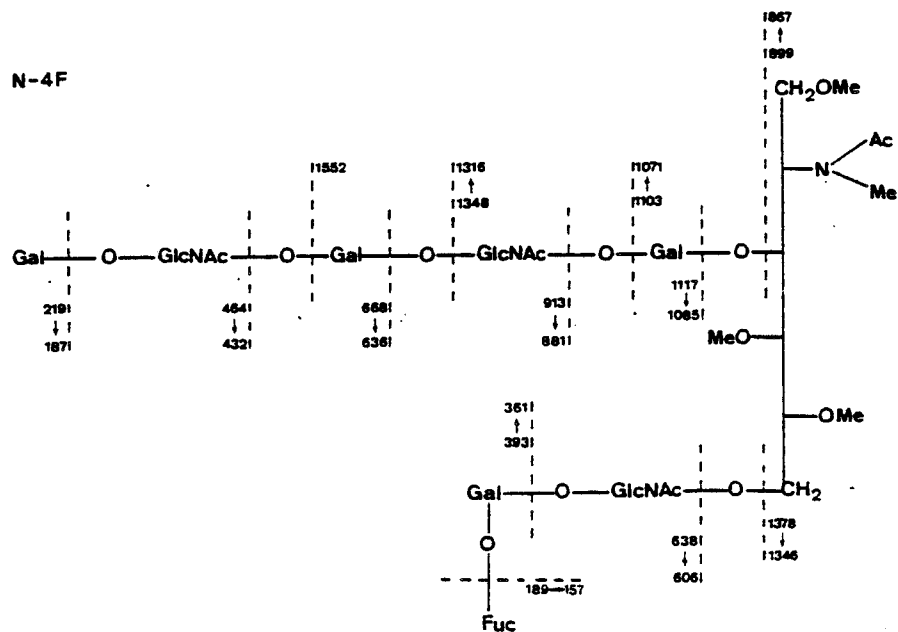
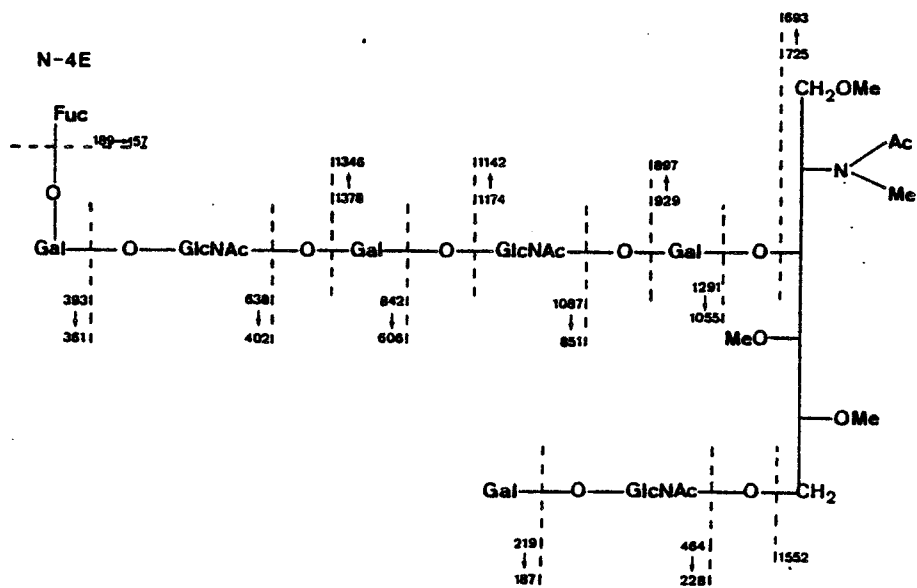
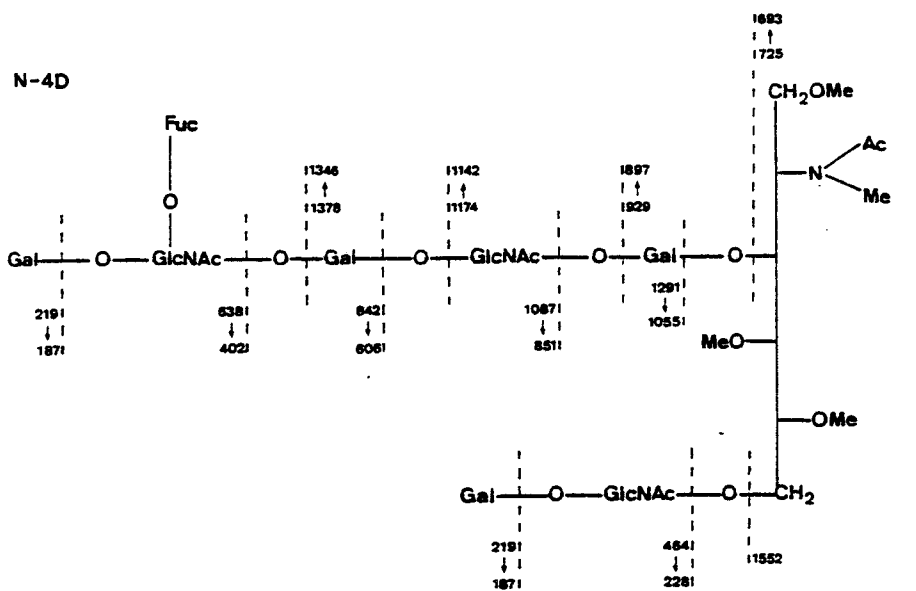


Figure 37 : Structures envisagées du nonasaccharide N-4 sur la base des résultats obtenus en spectrométrie de masse.





RUS
LILLE

Figure 37 (suite)

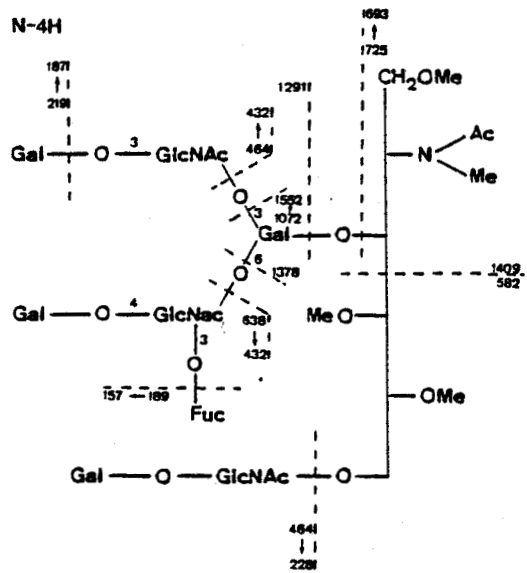
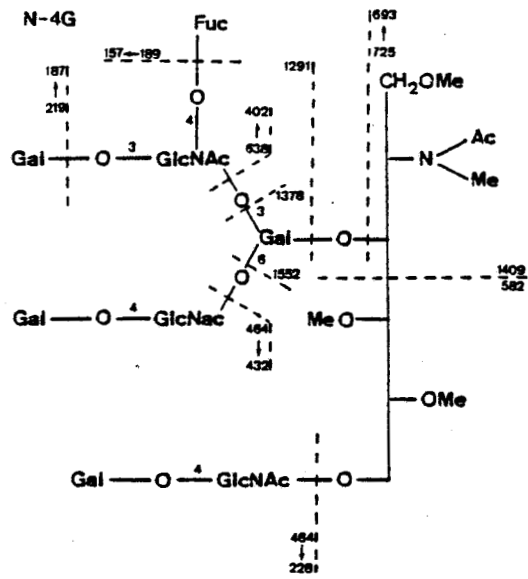
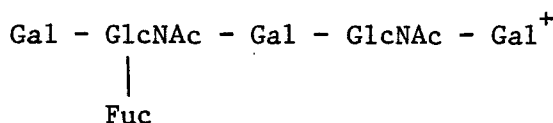
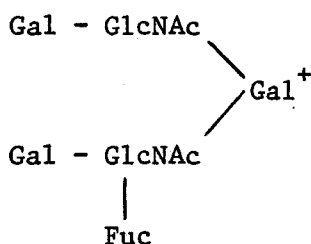


Figure 37 (suite)



ou

m/e 1299



m/e 1536

(3 Gal ; 3 GlcNAc ; 1 Fuc)⁺

β) Etude de l'extrémité réductrice :

Les ions représentant l'extrémité réductrice sont m/e 276 (→ GalNAc-ol) ; m/e 480 (Gal → GalNAc-ol) ; m/e 654 (Fuc → Gal GalNAc-ol) et 725 (Gal → GlcNAc → GalNAc-ol).

Sur la base de l'étude du spectre de masse du glycanne N-4, huit structures différentes peuvent être proposées (N-4A à N-4H) (Fig. 37 ; p. 175). Les structures N-4A à N-4C et N-4D à N-4F présentent un enchaînement linéaire des résidus de N-acétyllactosamine substituant la N-acétylgalactosamine en C-6 (N-4A à N-4C) ou en C-3 (N-4D à N-4F). La variation majeure qui existe dans chaque groupe est fonction essentiellement de la position du résidu de fucose. Les structures N-4G et N-4H sont des structures branchées qui diffèrent aussi par l'emplacement du résidu de fucose.

Toutes sont conformes au modèle général de structure O-glycosidique le plus généralement observé. Compte tenu des résultats de la méthylation qui fournit principalement du 2,4-Me₂-Gal les structures N-4G et N-4H seront les constituants majeurs du mélange (Fig. 38 ; p. 177).

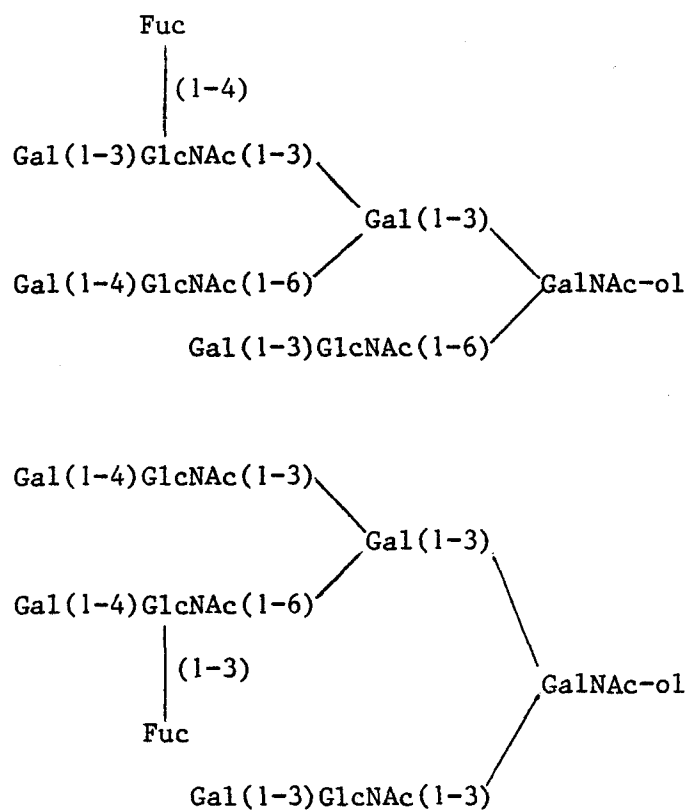


Figure 38 : Structures majeures du nonasaccharide N-4

BUS
LILLE

2 - Etude des glycanes de la fraction F-III : La fraction F-III est soumise dans un premier temps à une chromatographie d'échange d'ions, deux fractions sont obtenues : une fraction neutre (N-1 à N-3) et une fraction acide (A_1) (voir p. 183). Les glycanes neutres sont ensuite séparés par chromatographie sur papier en trois glycanes N_1 , N_2 et N_3 . La fraction F-III renferme un disaccharide, deux trisaccharides et un tétrasaccharide. Ils dérivent tous de la structure de base Gal(β 1-3)GalNAc par l'addition de galactose, d'acide N-acétylneuraminique et de N-acétylglucosamine. L'établissement de ces structures a fait l'objet de l'article n° 2 p. 179.

Heterogeneity of the Glycans *O*-Glycosidically Linked to the Hinge Region of Secretory Immunoglobulins from Human Milk

Annick PIERCE-CRETEL, Mercedes PAMBLANCO, Gérard STRECKER, Jean MONTREUIL, and Geneviève SPIK

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I

(Received July 14/October 13, 1980)

Pure secretory immunoglobulin A was isolated from human milk by fractionation in gradients of pH and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration followed by gel filtration. The hinge region containing all the *O*-glycosidically linked oligosaccharides was isolated *en bloc* after trypsin and pepsin hydrolysis and separated by gel filtration. The mixture of *O*-glycosidically linked oligosaccharides contained *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc), fucose (Fuc), galactose (Gal), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) in the molar ratio of 0.2:0.5:2.5:2:1 respectively. After β -elimination several oligosaccharides were separated by a combination of ion-exchange chromatography and gel-filtration chromatography. The complete structure of four of these oligosaccharides was determined by methanolysis, methylation and mass spectrometry.

The structure of the four oligosaccharides which are linked to serine or threonine residues of the hinge region are as follows: β -Gal-(1 \rightarrow 3)-GalNAc-ol; α -NeuAc-(2 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 3)-GalNAc-ol; β -Gal-(1 \rightarrow 3)-[β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]-GalNAc-ol; β -Gal-(1 \rightarrow 3)-[β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]-GalNAc-ol.

These oligosaccharides are more complex and heterogenous than the oligosaccharides linked to serine residues of the hinge region from myeloma serum immunoglobulin A₁.

Human milk represents an important source of secretory immunoglobulins A first identified by immunoelectrophoretic methods by several authors (see [1]) and isolated by Montreuil et al. [2]. This form differs from plasma IgA in predominantly being present as the dimer with a sedimentation coefficient of 11S [3], in possessing the secretory component [4], and being relatively rich in carbohydrates compared to serum IgA [5].

Until now, the most extensive results described concern the structures of the oligosaccharide moieties of human plasma IgA [6, 7].

Less data are available however, on the structure of secretory IgA. The presence of different monosaccharides was demonstrated by Montreuil et al. [2] and confirmed by Tomasi et al. [3]. The results

obtained by Descamps et al. [8] showed that the glycans of secretory IgA were divided into two groups on the basis of the nature of the sugar-peptide linkage.

In addition the *O*-glycosidically linked oligosaccharides differ from those of plasma IgA, in molar-carbohydrate composition and in being linked via *N*-acetylgalactosamine to both serine and threonine residues.

The differing structures, roles and localisation of these two types of IgA have led us to determine the oligosaccharide structures of secretory IgA with a view to comparing them to those obtained for myeloma serum IgA. Since these oligosaccharide structures could play an important part in interactions with cellular receptors and/or in the conformation of secretory IgA molecules we were interested in the determination of their structures. In the present paper we describe the results of the study of *O*-glycosidically linked oligosaccharides which we isolated from pure secretory IgA from human milk. Preliminary results have been given in [9]. The results concerning the *N*-glycosidically linked oligosaccharides will be published at a later date.

Abbreviations. Fuc, L-fucose; Gal, D-galactose; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine; GalNAc-ol, *N*-acetylgalactosaminitol; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; sIgA, secretory immunoglobulins IgA; NMR, nuclear magnetic resonance.

Enzymes. Trypsin (EC 3.4.21.4); pepsin (EC 3.4.23.1); neuraminidase (EC 3.2.1.18).

MATERIALS AND METHODS

Materials

SP-Sephadex C-50 was obtained from Pharmacia Fine Chemicals A.B. (Uppsala, Sweden). Biogel P-30 (200–400 mesh), Dowex 1X2 (200–400 mesh), Dowex 1X8 (25–50 mesh) and Dowex 50X8 (25–50 mesh) were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Ultrogel AcA-44 was from IBF (Clichy, France). Trypsin treated with diisopropylfluorophosphate was from Worthington (Biochemical Corporation (Freehold, NJ, USA). Pepsin (Merck, Darmstadt, FRG) and Silicagel thin-layer chromatography plates (Kieselgel 60 F 254) were from Merck.

Antisera to human serum proteins and to human IgA were from Behring Institut Laboratories (Marburg/Lahn, FRG). Rabbit antiserum to human milk proteins was prepared using the method of Vaitukatis et al. [10].

Preparation and Purification of Secretory IgA

Samples of human milk collected from a local milk bank were mixed and frozen at -20°C until use. After thawing, milk was delipidated by centrifuging at 10000 rev./min for 30 min in a Spinco 'Batch' rotor at 4°C and then dialysed against distilled water for 4 days. After adjustment to pH 4.6 with 0.1 M HCl the precipitate of casein formed was eliminated by centrifugation as above. The proteins of the lactosera were then fractionated by a concentration gradient of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ associated with a pH gradient as described by Montreuil et al. [2]. The precipitate P_4 obtained at 50% saturation in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and at pH 7 which contains the secretory IgA was then subjected to gel filtration on a column of Ultrogel AcA-44 in the conditions described in the legend to Fig. 1.

The quantity of secretory IgA present in the P_4 precipitate was measured by radial immunodiffusion [11] in the presence of anti-IgA serum. The purity of preparations of secretory IgA was verified by immunoelectrophoresis in the presence of the rabbit antiserum to human milk proteins and of the antiserum to human serum proteins.

Properties of Secretory IgA

The coefficient of sedimentation of purified secretory IgA was determined by analytical ultracentrifugation (Beckman model E ultracentrifuge) in 0.1 M Tris/HCl, 1 M NaCl buffer pH 8 at a concentration of 10 mg/ml of secretory IgA. The presence of 7-S monomer, 11-S dimer and polymers was also studied by thin-layer gel-filtration chromatography [12]. The molecular weight of secretory IgA was measured by equilibrium-sedimentation using the same buffer but at a concentration of 1 mg/ml of

secretory IgA for 82000 rev./min in an SW-50E type rotor according to the method of Yphantis [13] modified by Chervenka [14].

Amino-acid composition was performed using a Beckman multichrom autoanalyser [15]. The centesimal carbohydrate composition was determined using the techniques described by Montreuil and Spik [16] and the molar ratio of monosaccharide by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation [17]. Hexosamines were measured after hydrolysis (4 M HCl, 4 h, 100°C), transformation into polyol acetate derivatives and gas-liquid chromatography analysis according to Fournet (personal communication) by using a glass capillary column packed with OV-101; temperature gradient of $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from 130 to 230°C ; carrier gas: nitrogen.

Preparation of Glycopeptides

The method of Frangione and Wolfenstein-Todel which permits the isolation of the hinge region containing all the *O*-glycosidically linked oligosaccharides was used [18]. The secretory IgA was hydrolysed by trypsin and pepsin and the hinge region containing the *O*-glycosidically linked glycans separated *en bloc* from low molecular weight glycopeptide containing *N*-glycosidically linked glycans. The trypsin-pepsin hydrolysate was fractionated on a column of Biogel P-30 under the conditions described in the legend to Fig. 2.

Isolation of the Glycans

Glycans were liberated by β -elimination in reductive conditions: 0.1 M NaOH in the presence of 1 M NaBH_4 for 78 h at 45°C in the dark [19]. The reaction was stopped by placing the solution in an ice bath and adding Dowex 50X8 (25–50 mesh, H^+ form) until pH 4.5 was obtained.

After filtration the resin was washed with water, the filtrate and washings were combined and the boric acid removed as methyl borate *in vacuo*, by several additions of methanol.

The reduced glycans were separated by gel filtration on a column of Sephadex G-25 (1.8×125 cm) eluted with 0.1 M pyridine/acetic acid buffer pH 5.0 at a flow rate of 12 ml/h. Detection of neutral sugars was achieved using a phenol/sulphuric acid reagent [20]. The carbohydrate-containing fractions were lyophilised and submitted to ion-exchange chromatography on Dowex 1X2 (200–400 mesh, acetate form) stabilized in 2 mM pyridine/acetic acid pH 5. Elution was performed according to Spiro et al. [21] using a continuous gradient of ionic strength of pyridine/acetic acid buffer from 2 mM to 350 mM at 25 ml/h and 2.5-ml fractions were collected. Visualization of neutral sugars was achieved using the phenol/sulfuric acid reagent. Further separation of low-molecular-

weight glycans was realized by descending paper chromatography for 18 h in the solvent system pyridine:ethyl acetate/acetic acid/water (5:5:1:3, by volume) [22]. Lateral bands were revealed using the silver nitrate method [23]. The homogeneity of the purified glycans was verified by silicagel thin-layer chromatography in a solvent system: *n*-butanol/ethanol/acetic acid/water/pyridine (10:100:3:30:10, by volume) [24]. Staining was by the orcinol/sulphuric acid technique using a solution of orcinol (0.1%, w/v) in sulphuric acid/water (20:80, by volume) followed by heating to 105°C for 10 min.

Studies of the Reduced Glycans

The identification and estimation of 2-acetamido-2-deoxy-galactitol and of the other monosaccharides were performed simultaneously by gas-liquid chromatography under the conditions described above.

Exhaustive methylation was carried out according to Hakomori [25]. The methylated oligosaccharides were purified and treated with 0.5 M methanol/HCl for 24 h at 80°C. The obtained mixture of methylglycosides was analyzed by gas-liquid chromatography before (for neutral monosaccharides) and after (for neutral monosaccharides and hexosamines) peracetylation according to Fournet et al. [26]. Oligosaccharide methyl ethers were identified by gas-liquid chromatography coupled to mass spectrometry under the following experimental conditions: Girde (model 30) apparatus (Suresne, France), glass column packed with 3% OV17 operated with a temperature gradient of 4°C/min from 150 to 240°C; Riber-Mag 10-10 mass spectrometer (Rueil-Malmaison, France), electron energy 70 eV, ionisation current 0.2 MA, chamber temperature 190°C. The study of these oligosaccharides was completed by the determination of the anomeric configuration which was kindly performed by J. F. G. Vliegthart and L. Dorland, using 360 MHz ¹H NMR spectroscopy.

RESULTS

Preparation of Secretory IgA

After treatment with (NH₄)₂SO₄, 1 g of precipitate P₄ containing 80% of secretory IgA was obtained per liter of lactoserum. The contaminating proteins present in peak II, consisting essentially of α -lactalbumin, were eliminated by gel filtration on Ultrogel Aca-44 as shown in Fig. 1. The secretory IgA thus obtained at a yield of 60% was immunologically pure.

Properties of Secretory IgA

The secretory IgA purified from the P₄ precipitate had a coefficient of sedimentation of 11 S and was not

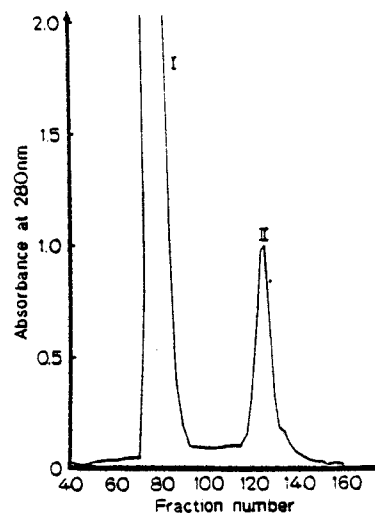


Fig. 1. Gel filtration of precipitate P₄. 800 mg of P₄ precipitate dissolved in 20 ml of 0.1 M Tris/HCl buffer pH 8 containing 1 M NaCl were fractionated on a column (200 × 5 cm) of Ultrogel Aca-44 stabilised in the same buffer. Elution was at 32 ml/h and 16-ml fractions were collected. Peak I contains the secretory IgA; peak II contains α -lactalbumin

contaminated by 7-S IgA or by polymers as was shown by ultracentrifugation and thin-layer gel filtration. The molecular weight at the sedimentation equilibrium was 350 000.

The centesimal and molar carbohydrate compositions are given in Table 1. The results we obtained show that secretory IgA contains 11.94% total sugar and is characterized by the presence of 1 residue of *N*-acetylgalactosamine for 3.5 of *N*-acetylglucosamine when determined by classical methanolysis. By the polyol acetate method (see Materials and Methods) a ratio of 1 to 5 was obtained. This latter method allows the complete separation of the derivatives of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine and the results obtained were thus used in the calculation of molar ratios and numbers of glycans.

Preparation and Study of the Glycopeptides from Secretory IgA

The treatment of 1 g of secretory IgA by trypsin and pepsin followed by fractionation on a column of Biogel P-30 led to the isolation of two glycopeptide fractions GP-I and GP-II (Fig. 2) in the relative proportions of 43 mg of fraction GP-I to 240 mg of fraction GP-II. Tables 1 and 2 respectively give the carbohydrate and amino acid compositions of glycopeptides GP-I and GP-II. The results show that fraction GP-I contains no mannose which is the characteristic marker of *N*-glycosidically linked glycans, but does contain all the *N*-acetylgalactosamine residues present in secretory IgA, *N*-acetylgalactosamine being the characteristic marker of glycans

Table 1. Centesimal and molar carbohydrate composition of native human milk sIgA and of glycopeptide fractions GP-I and GP-II.

Molar ratios were calculated on the basis of 3 mannose residues for sIgA and GP-II glycopeptides and of one N-acetylgalactosamine residue for the GP-I glycopeptides.

	sIgA	GP-I	GP-II
<i>Centesimal composition</i>			
Neutral monosaccharides	5.4	7.7	21.5
Hexosamines	5.01	7.25	13.4
N-Acetylneuraminic acid	1.53	0.56	2.7
Total sugars	11.94	15.31	37.6
<i>Molar ratios</i>			
Fucose	1.47 (21) ^(a)	0.45	1.10
Galactose	3.62 (52)	1.94	1.85
Mannose	3 (43)	0	3
N-Acetylglucosamine	5.27 (90)	0.73	3.86
N-Acetylgalactosamine	1.42 (18)	1	0
N-Acetylneuraminic acid	1.18 (19)	0.2	0.8

(a) Numbers in brackets refer to the number of residues per mole of sIgA

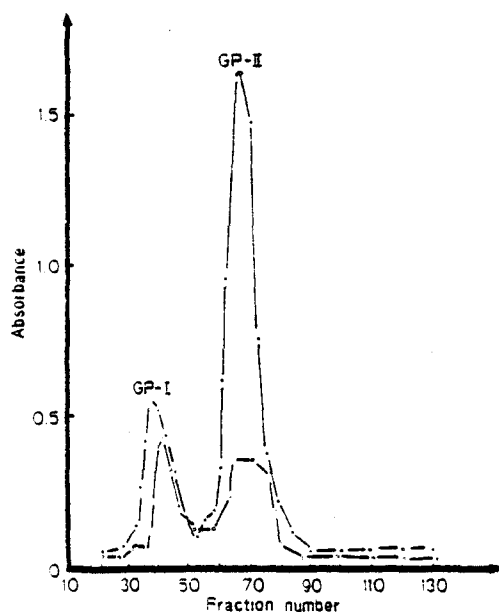


Fig. 2. Fractionation of the trypsin-pepsin hydrolysate of secretory IgA on Biogel P-30. 1 g of secretory IgA after successive treatment with trypsin and pepsin (see text) were lyophilised, redissolved in 10 ml of 1 M acetic acid and loaded into a column (4 x 130 cm) of Biogel P-30 stabilized in 1 M acetic acid. The flow rate was 23 ml/h and 7.5-ml fractions were collected. Visualization of neutral sugars was achieved using the phenol/sulphuric acid reagent and determining the absorbance at 492 nm (●) and of proteins by the absorbance at 280 nm (○)

O-glycosidically linked to serine or threonine. In addition it contains a large quantity of proline residues and three times more serine and threonine residues than fraction GP-II. Only the study of the

Table 2. Amino acid composition of native glycopeptide fractions GP-I and GP-II

The molar ratios are calculated on the basis of one aspartic acid residue.

	GP-I	GP-II
Asx	1	1
Thr	2.7	1.1
Ser	2.6	0.68
Glx	0.8	0.8
Pro	4.8	0.7
Gly	1.4	0.84
Ala	1.9	0.7
Val	1.8	0.6
Leu	0.5	0.72
His	0.75	0
Arg	0.6	0

oligosaccharides liberated by β -elimination from the glycopeptide fraction GP-I is reported in this paper.

Isolation of the Oligosaccharides from Fraction GP-I

The scheme of isolation of the oligosaccharides liberated from fraction GP-I is given in Fig. 3. After gel filtration on a column of S ephadex G-25, the remaining modified polypeptide chain of the hinge region was analysed by gas-liquid chromatography after methanolysis and the results show that the sugar residues were quantitatively removed by the β -elimination. Analysis of the amino acid composition

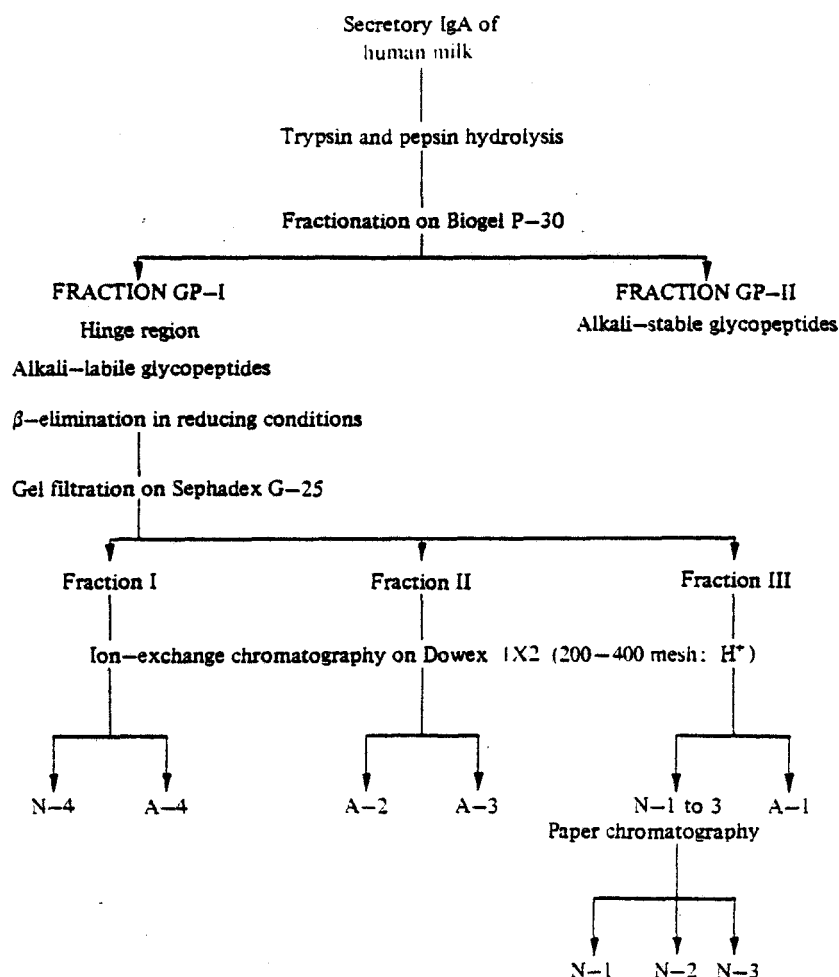


Fig. 3. Preparation scheme of oligosaccharides from secretory IgA of human milk

of this hinge region after β -elimination shows a decrease of two serine and three threonine residues for five residues of *N*-acetylgalactosamine indicating that both hydroxyamino acids are involved in the glycan linkage. The three oligosaccharide fractions (F-I, F-II and F-III) which were eluted successively from the Sephadex G-25 column were submitted to ion-exchange and paper chromatography and separated into four neutral fractions, called N-1, N-2, N-3 and N-4, and four acidic fractions, called A-1, A-2, A-3 and A-4. These fractions, except the high-molecular-weight oligosaccharides N-4 and A-4, were homogeneous when analyzed by thin-layer chromatography. The oligosaccharide fractions A-2 and A-3 were, however, obtained in too low amounts to allow the determination of their primary structure.

Primary structure of the Oligosaccharides N-1, N-2, N-3 and A-1

The molar carbohydrate composition of the different reduced oligosaccharides is given in Table 3. All the oligosaccharides contain one residue of *N*-ace-

tylgalactosaminitol, although the values we obtained by gas-liquid chromatography are less than unity. This low recovery has also been reported by other authors and is attributed to a competition between the rate of degradation and the reduction of *N*-acetylgalactosamine residues during the β -elimination process.

The primary structures of the four major reduced oligosaccharides N-1, N-2, N-3 and A-1 were completely established applying methylation (Table 4), mass spectrometry and analysis of the anomeric linkages by ^1H NMR, and are reported in Fig. 4.

Oligosaccharide N-1. The structure of oligosaccharide N-1 was determined on the basis of the following results: (a) galactose and *N*-acetylgalactosaminitol are in the molar proportion 1:0.5; (b) the methylation analysis shows that the galactose residue is in terminal non-reducing position and that the *N*-acetylgalactosaminitol is 3-*O*-substituted; (c) the mass spectrum of the methylated oligosaccharide N-1 is shown in Fig. 5. The fragments *m/e* 219, 187 and 155 are characteristic of a terminal non-reducing hexose. The fragment *m/e* 276 corresponds to hexosaminitol.

Table 3. Carbohydrate composition of the reduced alkali-labile oligosaccharides isolated from the hinge region of human milk sIgA.

The molar ratios were calculated on the basis of 1, 2, 3 or 4 galactose residues. The nearest integral numbers are given in brackets.

	Neutral oligosaccharides				Acidic oligosaccharides			
	N-1	N-2	N-3	N-4	A-1	A-2	A-3	A-4
Fuc	0	0	0	0.9(1)	0	0	0	1.2(1)
Gal	1	1	2	4	1	3	3	4
GlcNAc	0	1.0	0.95(1)	2.8(3)	0	1.78(2)	1.08(1)	3.1(3)
GalNAc-ol	0.5(1)	0.7(1)	0.5(1)	0.5(1)	0.8(1)	0.5(1)	0.79(1)	0.6(1)
NeuAc	0	0	0	0	0.9(1)	0.64(1)	1.68(2)	0.9(1)
Total number of monosaccharides	2	3	4	9	3	7	7	10
Percentage of total oligosaccharide	20 %	12 %	32 %	16 %	4 %	4 %	4 %	8 %

Table 4. Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated reduced oligosaccharides derived from the hinge region of sIgA[§]

Monosaccharide methyl ethers	Oligosaccharides			
	N-1	N-2	N-3	A-1
2,3,4,6-Me-Gal	1	1	2	0
2,4,6-Me-Gal	0	0	0	1
1,4,5,6,-Me-GalN(Me)Ac-ol	0.6	0	0	0.8
1,4,5-Me-GalN(Me)Ac-ol	0	0.8	0.7	0
3,4,6-Me-GlcN(Me)Ac	0	1.21	0	0
3,6-Me-GlcN(Me)Ac	0	0	0.93	0
4,7,8,9-Me-Neu(Me)Ac	0	0	0	0.75

[§] The molar ratios were calculated on the basis of 1 or 2 residues of 2,3,4,6-Me-Gal (N-1, N-2 and N-3) or 1 residue of 2,4,6-Me-Gal (A-1).

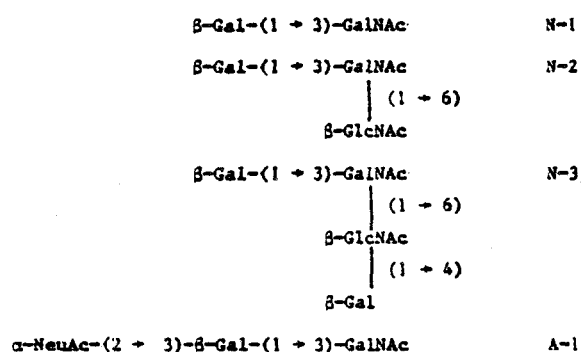
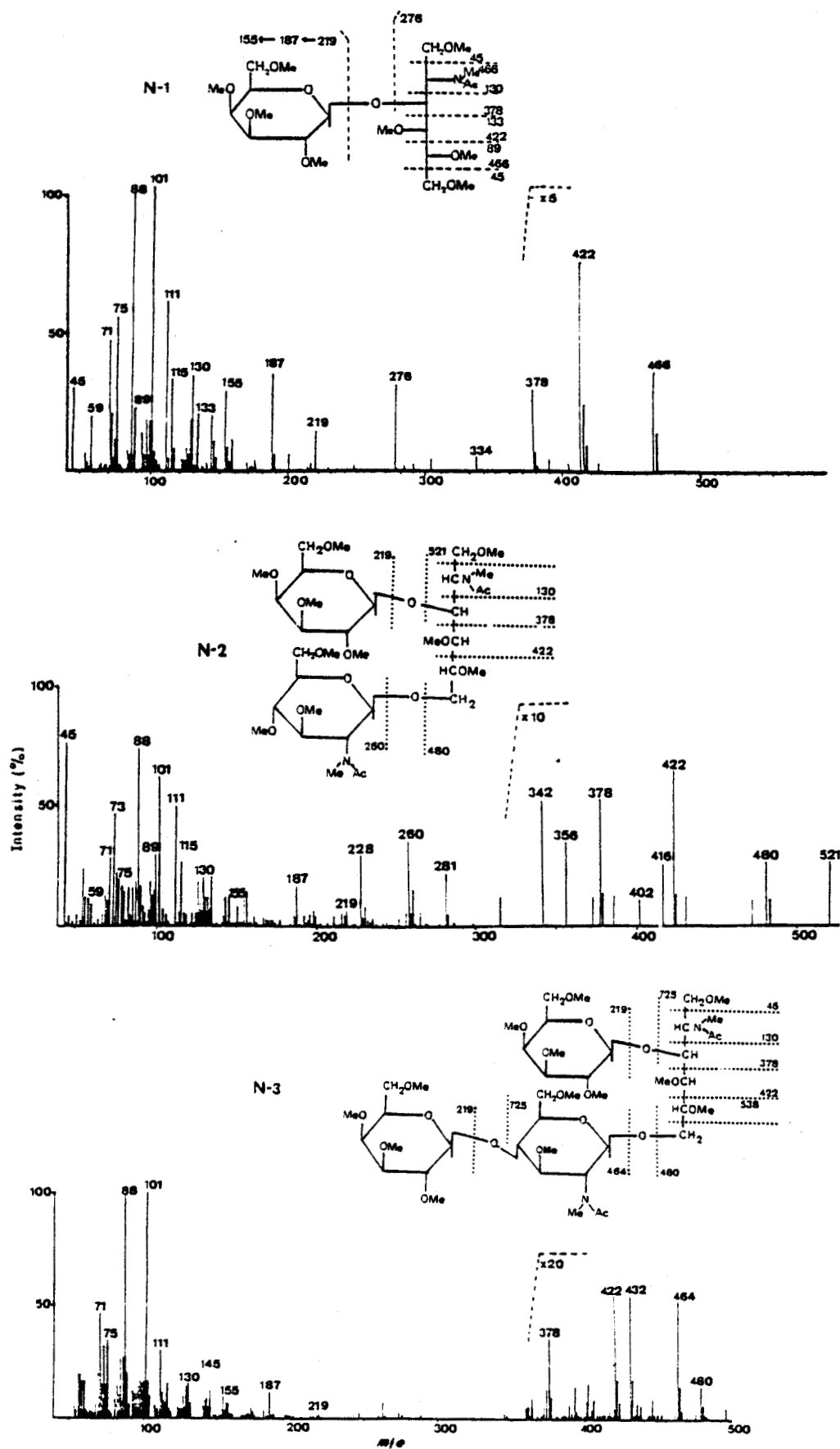


Fig. 4. Structures of oligosaccharides N-1, N-2, N-3 and A-1 isolated from secretory IgA of human milk

A 3-O substitution is indicated by fragments *m/e* 89 and 133 and the nature of the linkage is confirmed by the presence of ions *m/e* 378, 422 and 466. Our results are in good agreement with those obtained by several authors [27-29]. The anomeric configuration of the galactose residue in the compound β -Gal-(1 \rightarrow 3)-GalNAc-ol was concluded from the analysis by NMR which shows a chemical shift of the H-1 of galactose residue ($\delta = 4.480$ ppm), together with a coupling constant $J_{12} \approx 8$ Hz. This simple disaccharide is the basic structure found in all glycans bound to the peptide chain by an *N*-acetyl- α -D-galactosaminyl-(1 \rightarrow 3)-L-serine or L-threonine linkage (for recent reviews see [30,31]).



BUS
LIFE

Fig. 5. Mass spectra of oligosaccharides N-1, N-2 and N-3 after methylation

Oligosaccharide N-2. The structure of oligosaccharide N-2 was determined as follows: (a) the molar proportions of galactose, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosaminitol are 1:1:0.7 respectively; (b) methylation analysis showed the presence of *N*-acetylgalactosaminitol substituted in positions C-3 and C-6, galactose and *N*-acetylglucosamine were permethylated indicating that both were in terminal non-reducing position; (c) the mass spectrum (Fig. 5) lacks the fragment *m/e* 276, indicating the presence of a branched structure. Fragments *m/e* 260 (external *N*-acetylhexosamine) and *m/e* 219 (external hexose) confirm the branched structure. The sequences hexosamine-hexosaminitol (*m/e* 521) and hexose → hexosaminitol (*m/e* 480) show that the structure is that of a trisaccharide. The hexose-(1→3)-hexosaminitol linkage is defined by the fragment *m/e* 378. Fragment *m/e* 422 shows in addition that carbon C-4 of hexosaminitol is free, implying an *N*-acetylhexosamine-(1→6)-hexosaminitol linkage. The absence of ion *m/e* 290, characteristic of C-3 and C-4 substituted hexosaminitols confirms this analysis.

Oligosaccharide N-3. The structure of oligosaccharide N-3 was defined by the following results: (a) the molar ratio of galactose, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosaminitol was 2:1:0.5 respectively (b) after methylation and hydrolysis the *N*-acetylgalactosaminitol residue was shown to be C-3 and C-6 substituted, both galactose residues were in terminal non-reducing positions and the *N*-acetylglucosamine residue was C-4 substituted; (c) the mass spectrum is characterized by the following elements (Fig. 5): the absence of the ion *m/e* 276, corresponding to a terminal hexosaminitol, implies a branched structure; the fragment *m/e* 480 corresponds to the sequence hexose → hexosaminitol, the fragments *m/e* 378 and 480 define the length of the first branch which contains a hexose (1 → 3)-linked to hexosaminitol. The second branch is characterized by the fragments *m/e* 464 and 432 which demonstrate the existence of sequences hexose → hexosamine or hexosamine → hexose. The sequence hexose → hexosamine is thus deduced from the spectrum and the ion *m/e* 422 shows that the carbon C-4 of the hexosaminitol is free; (d) the anomeric configuration of the different linkages present in a mixture of oligosaccharides N-1, N-2 and N-3 was determined by the analysis of the NMR spectrum. The results show that the β -anomeric region of the NMR spectrum contains some doublets with coupling constants of ≈ 8 Hz, corresponding to *N*-acetyl- β -D-glucosamine and β -D-galactose, no α -anomers being observed. The absence of signals in the α -anomeric region indicates that the compounds of the sample have only β -anomeric linkages.

Oligosaccharides A-1. The structure of oligosaccharide A-1 was confirmed by the following data: (a) *N*-acetylneuraminic acid, galactose and *N*-acetyl-

galactosaminitol are in the molar ratio 1:1:1; (b) methylation analysis shows that *N*-acetylneuraminic acid is in a terminal non-reducing position and that galactose and *N*-acetylgalactosaminitol residues are mono-substituted in position C-3; (c) the nature of three methyl ethers present in this oligosaccharide A-1 was confirmed by mass spectrometry (Fig. 6). The *N*-acetylneuraminyl linkage was designated in the α -anomeric form in view of the known specificity of the neuraminidase which leads to a mixture of free *N*-acetylneuraminic acid and of an oligosaccharide which comigrates in paper and thin-layer-chromatography with oligosaccharide N-1.

This acidic trisaccharide structure has also been described in numerous glycoproteins (for recent reviews see [30, 31]).

DISCUSSION

The existence of *O*-glycosidic linkages in the secretory IgA from human milk demonstrates the presence of the sub-class secretory IgA₁ in human milk.

Accordingly to Mota [32] the ratio IgA₁:IgA₂ is 1:3 in human milk whilst in serum it is 9:1 [33]. This ratio explains why the quantity of *O*-glycosidically linked oligosaccharides was clearly inferior to that of those linked *N*-glycosidically. The presence of 18 residues of *N*-acetylgalactosamine per mole of secretory IgA which are all transformed into *N*-acetylgalactosaminitol by reductive β -elimination of the isolated hinge region, and the absence of any carbohydrate residues associated with the polypeptide chain after β -elimination demonstrate the statistical presence of four to five glycans linked *O*-glycosidically to the hinge region of each heavy chain. Five glycans were also found by Baenziger and Kornfeld [7] for myeloma serum IgA₁.

The determination of the peptide sequence of the hinge region of secretory IgA from human milk should give an answer to the question of the existence of homologies of peptide sequences with the serum IgA hinge region.

The most important differences between the structures of secretory IgA and serum IgA nevertheless manifest themselves in the oligosaccharide structures. For both the *N*-glycosidically linked oligosaccharides (unpublished work) and the *O*-glycosides we have shown a high degree of structural heterogeneity, possibly due to the fact that the sIgA were isolated from a mixture of human milk. As shown in Table 3 all the intermediate stages between a disaccharide β -Gal-(1 → 3)-GalNAc and a nonasaccharide are possible. These different structures arise from a chain lengthening from either galactose or *N*-acetylgalactosamine, or both.

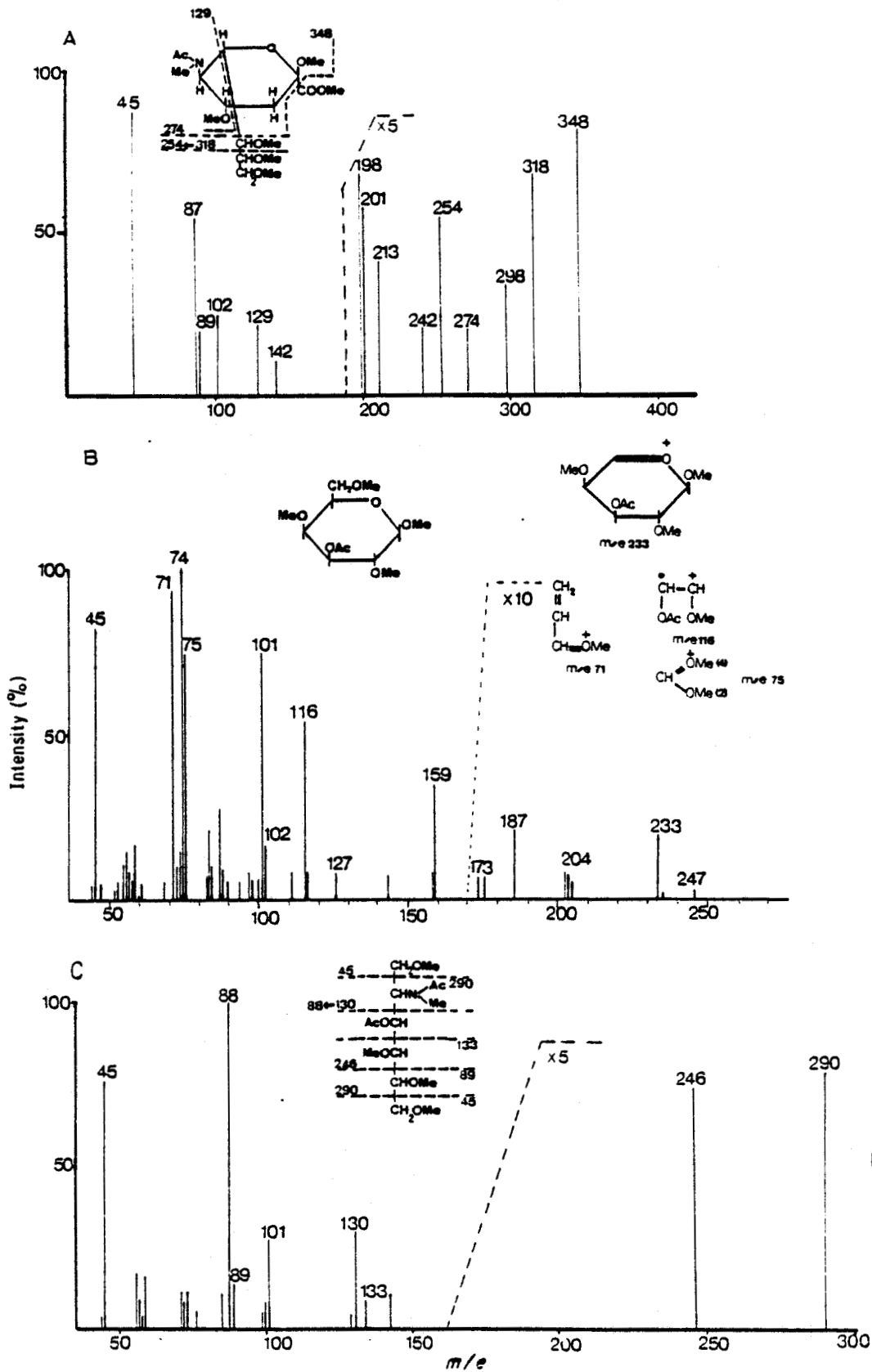


Fig. 6. Mass spectra of oligosaccharide A-1 after methylation and methanolysis. (A) Mass spectrum of methyl-4.7.8.9-tetra-O-methyl-N-acetylneuraminic acid. (B) Mass spectrum of methyl-2,4,6-tri-O-methylgalactose. (C) Mass spectrum 1,4.5.6-tetra-O-methylgalactosaminitol



This heterogeneity does not exist in the hinge-region glycans from myeloma serum IgA [7]. However, in another type of myeloma serum IgA, Dawson and Clamp [34] showed the presence of a heptasaccharide containing one *N*-acetylneuramic acid, three galactose and three *N*-acetylgalactosamine residues. The partial structure proposed by these authors leaves the possibility of heterogeneity.

The incomplete biosynthesis of the hinge region oligosaccharides of secretory IgA from human milk could be explained by a variation in the activity of glycosyltransferases as a function either of the time of passage through the endoplasmic reticulum before secretion or of the period of lactation.

The *O*-glycosidically linked oligosaccharides of the hinge region of secretory IgA₁ are very similar in structure to those found in a variety of glycoproteins and represent the precursors of oligosaccharides possessing a blood-group activity [35]. Since the degree of glycosylation appears to be variable the question can be put as to whether the *O*-glycosidic glycans play a role in the conformation of the IgA molecule or if the biological role of secretory IgA is affected by a more or less complete glycosylation. These problems are the basis for continuing work on the determination of glycan structures of secretory IgA and the structure-function relationship.

This investigation was supported in part by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (C.N.R.S.) (*Laboratoire Associé 217: Relations structure-fonction des constituants membranaires*). A.C. received a grant from the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique*. G.St. is *Maire de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique*. The authors are obliged to Prof. J. F. G. Vliegthart's group of the University of Utrecht for the determination of the anomeric linkages by NMR analysis, to Dr B. Fournet for helpful discussions about the gas-liquid chromatography analysis of monosaccharides and derivatives, and to Mrs Hayem for the analysis of secretory IgA by thin-layer gel filtration chromatography. The authors are also grateful to Y. Leroy (C.N.R.S. technician), G. Ricart, J. P. Decottignies, C. Alonso (C.N.R.S. technician) and M. Coniez (C.N.R.S. technician) for their skilful technical assistance.

REFERENCES

- Hanson, L. Å (1961) *Immunological Studies of Human Milk with Special Reference to Immunoglobulins*, pp. 7-32, Gothenburg University, Gothenburg.
- Montreuil, J., Chosson, A., Havez, R. & Mullet, S. (1960) *C. R. Soc. Biol.* 154, 732-736.
- Tomasi, T. B. & Bienenstock, J. (1968) *Adv. Immunol.* 9, 1-96.
- Hanson, L. Å. & Johansson, B. G. (1967) *Nobel. Symp.* 3, 141-151.
- Clamp, J. R. & Putnam, F. W. (1967) *Biochem. J.* 103, 225-229.
- Baenziger, J. U. & Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7260-7269.
- Baenziger, J. U. & Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7270-7281.
- Descamps, J., Monsigny, M. & Montreuil, J. (1968) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 266D, 1775-1778.
- Cretel, A., Pamblanco, M., Egge, H., Strecker, G., Montreuil, J. & Spik, G. (1979) in *Proc. 5th Int. Symp. Kiel* (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M. F., Vliegthart, J. F. G. & Wiegandt, H., eds) pp. 26-27, Georg Thieme, Stuttgart.
- Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieschlag, E. & Ross, G. T. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* 33, 988-991.
- Mancini, G., Carbonara, A. D. & Heremans, J. F. (1965) *Immunochemistry*, 2, 235-254.
- Laine, A., Hayem, A., Lebas, J. & Romon, A. (1977) *Clin. Chim. Acta.* 79, 541-548.
- Yphantis, D. A. (1964) *Biochemistry*, 3, 297-317.
- Chervenka, C. H. (1970) *Anal. Biochem.* 34, 24-29.
- Charet, P., Tetaert, D., Han, K. K. & Montreuil, J. (1973) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 276D, 1629-1630.
- Montreuil, J. & Spik, G. (1963) in *Méthodes Colorimétriques de Dosage de Glucides Totaux*, Lab. Chimie Biologique Fac. Sci. éd., Lille.
- Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304.
- Frangione, B. & Wolfenstein-Todel, C. (1972) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 69, 3673-3676.
- Carlson, D. M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2984-2986.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Spiro, R. G. & Bhoyroo, V. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5704-5717.
- Fischer, F. G. & Nebel, H. G. (1955) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 302, 10-18.
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P. & Harrison, J. S. (1950) *Nature (Lond.)* 166, 444-445.
- Bayard, B., Kerckaert, J. P., Roux, D. & Strecker, G. (1979) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq. Bruges*, 27, 153-156.
- Hakomori, S. I. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 205-208.
- Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry*, 17, 5206-5214.
- Mononen, I., Finne, J. & Kärkkäinen, J. (1978) *Carbohydr. Res.* 60, 371-375.
- Nilsson, B. & Svensson, S. (1979) *Carbohydr. Res.* 72, 183-190.
- Fournet, B., Fiat, A. M., Alais, C. & Jollès, P. (1979) *Biochem. Biophys. Acta.* 576, 339-346.
- Montreuil, J. (1980) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37, 157-223.
- Strecker, G. & Montreuil, J. (1979) *Biochimie (Paris)* 61, 1199-1246.
- Mota, G. (1977) *Rev. Roum. Biochim.* 14, 39-42.
- Riesen, W. F., Huser, H. & Skvaril, F. (1976) *FEBS Lett.* 61, 243-246.
- Dawson, G. & Clamp, J. R. (1968) *Biochem. J.* 107, 341-352.
- Lloyd, K. O. & Kabat, E. A. (1968) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 61, 1470-1477.

A. Pierce-Cretel, M. Pamblanco, G. Strecker, J. Montreuil, and G. Spik*. Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

* To whom correspondence should be addressed.

C - CONCLUSIONS

Les IgA possèdent des glycanes liés O-glycosidiquement aux chaînes α_1 . Une délétion de 15 résidus d'acides aminés entraîne la perte sur les chaînes α_2 , des sites de glycosylation (Fig. 15 ; p. 77).

L'étude des glycanes effectuée sur l'ensemble des IgA : IgA₁ et IgA₂ conduit à l'obtention d'une plus grande quantité de O-glycanes pour les IgA sériques normales, car il y a 9 molécules d'IgA₁ pour une molécule d'IgA₂ (RIESEN *et al.*, 1976) et d'une proportion beaucoup plus faible de ces mêmes glycanes pour les sIgA car le rapport s'inverse dans le lait de Femme et devient : une molécule d'sIgA₁ pour trois molécules de sIgA₂ (MOTA, 1977). La faible proportion des O-glycanes des sIgA ainsi que leur grande diversité a rendu leur étude difficile.

Cinq sites de glycosylation ont été décrits par chaîne lourde (BAENZIGER et KORNFELD, 1974a) (Fig. 17 ; p. 81). La composition en acides aminés de la zone charnière semble montrer que la séquence peptidique des sIgA est homologue à celles des IgA sériques myélomateuses (FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL, 1972 ; BAENZIGER et KORNFELD, 1974a). Cependant la liaison entre la N-acétylgalactosamine et la protéine se fait exclusivement par des résidus de sérine dans les IgA₁ sériques myélomateuses (BAENZIGER et KORNFELD, 1974a) alors qu'elle se fait soit par l'intermédiaire de la sérine soit par l'intermédiaire de la thréonine dans les IgA de sécrétion du lait humain (DESCAMPS, 1974).

Les glycanes détachés par β -élimination des sIgA présentent un haut degré d'hétérogénéité. Tous les glycanes dérivent du chaînon disaccharidique suivant Gal(β 1-3)GalNAc par l'addition de résidus de fucose, galactose, N-acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique. L'allongement de la chaîne peut aller jusqu'à l'obtention

d'un décasaccharide. Tous les intermédiaires entre le tétrasaccharide et le décasaccharide semblent exister (Tableau 3, article 2 ; p. 184).

Cette hétérogénéité n'existe pas dans la fraction O-glycannique des IgA₁ sériques myélomateuses (BAENZIGER et KORNFELD, 1974a). Ceci est confirmé par l'étude que nous avons réalisée sur deux autres molécules d'IgA₁ (LAB) et (DEJ). Elle montre que la fraction glycannique se résume au disaccharide de base qui peut parfois être sialylé. Aucune différence structurale de la fraction O-glycannique des IgA sériques normales n'est à noter. Le processus de cancérisation ne semble pas interférer dans la glycosylation des glycanes de la zone charnière des IgA sériques.

L'étude comparative de la fraction O-glycannique des IgA sériques et sécrétoires (Fig. 39 ; p. 191) est intéressante car elle confirme que l'hétérogénéité et la complexité des glycanes présents dans les sIgA sont dues au phénomène de sécrétion et peuvent être reliées à l'existence de glycosyltransférases actives spécifiques des protéines d'excrétion ou simplement au fait que les deux molécules d'IgA sont totalement différentes. Il serait intéressant dans ce cas de connaître la structure primaire des chaînes α des IgA de sécrétion.

Le degré élevé de l'hétérogénéité des glycanes présents dans la zone charnière de la chaîne α_1 pose le problème du rôle possible de ces glycanes dans la conformation de la molécule. En effet, l'intérêt et l'importance de ces structures résident non seulement dans leur hétérogénéité mais également dans leur localisation. La zone charnière des IgA est impliquée lors de l'attaque bactérienne. En effet, des bactéries (KORNFELD et PLAUT, 1981) pour se défendre contre les immunoglobulines, synthétisent des IgA₁ protéases capables de cliquer sélectivement la zone charnière (Fig. 6 ; p. 41). La plus grande résistance des IgA₁ sécrétoires pourrait être due à la présence de ces structures glycanniques complexes. La participation effective des glycanes dans ce rôle de protection vis-à-vis de certaines bactéries reste encore à être démontrée.

IgA sériques humaines

GalNAc-ol
Gal(β1-3)GalNAc-ol
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc-ol

IgA de sécrétion du lait humain

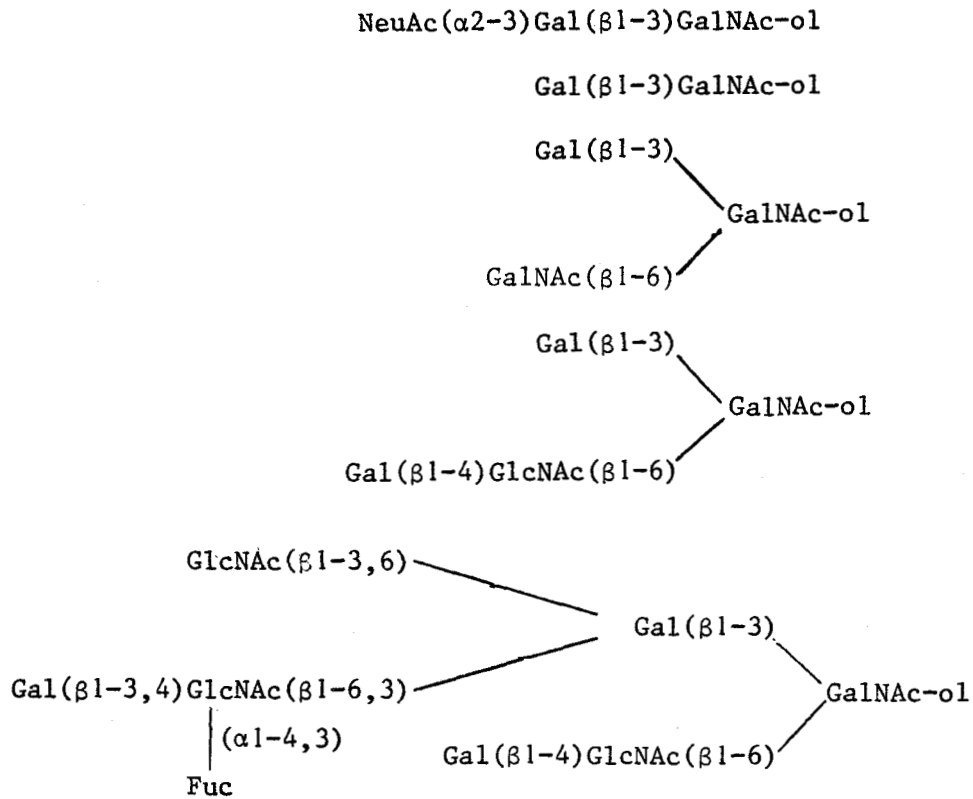


Figure 39 : Etude comparative des O-glycannes présents dans les IgA sériques et dans les IgA de sécrétion humaines.

III - ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES LIÉS N-GLYCOSIDIQUEMENT AUX IgA

L'étude comparative des fractions glycaniques des IgA sériques et sécrétoires humaines a été effectuée sur la fraction N-glycanique également. L'hétérogénéité structurale de la fraction O-glycanique étant inhérente à la molécule de sIgA, nous avons essayé de savoir s'il en était de même pour la fraction N-glycanique.

Les études de BAENZIGER et KORNFELD (1974b) avaient montré que la fraction N-glycanique des IgA sériques myélomateuses était assez homogène (Fig. 17 ; p. 81). Les trois glycopeptides isolés sont biantennés, mono- ou disialylés, mono- ou difucosylés et renferment un résidu de N-acétylglucosamine lié sur le β -mannose. Cette N-acétylglucosamine est encore appelée "la N-acétylglucosamine intercalaire". Les structures des glycanes des IgA sériques ayant été démontrées précédemment, nous ne nous sommes pas attachée à définir leur structure d'une manière précise, mais à comparer leur hétérogénéité à celle des sIgA.

A - MISE EN EVIDENCE D'UNE HOMOGENEITE STRUCTURALE DES FRACTIONS N-GLYCANNIQUES DES IgA SERIQUES

L'étude des fractions N-glycaniques totales des IgA humaines sériques et sécrétoires révèle l'existence d'une forte proportion de sialoglycopeptides. La comparaison des compositions molaires en glucides de ces fractions ne montre pas de différences notables (Tableau XVI ; p. 193). IL semble qu'il y ait un taux plus faible en fucose et une légère augmentation du taux de galactose dans les IgA sériques alors que le taux de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique sont constants dans les deux populations d'immunoglobulines.

TABLEAU XVI

COMPARAISON DE LA COMPOSITION MOLLAIRE EN OSES DE LA FRACTION
N-GLYCANNIQUE DES IgA SERIQUES MYELOMATEUSES (DEJ) et (LAB)
ET DES IgA DE SECRETION DU LAIT HUMAIN.

Nature des monosaccharides	Fraction N-glycannique totale		
	IgA sériques mélomateuses (DEJ)	IgA sériques mélomateuses (LAB)	IgA de sécrétion
Fuc	0,66	0,40	1,10
Gal	2,27	2,63	1,85
Man	3	3	3
GlcNAc	4,01	3,91	3,86
NeuAc	0,74	0,77	0,80



L'hydrazinolyse des fractions glycopeptidiques (p. 156) permet d'obtenir des glycannes que nous avons séparés en chromatographie couche mince. De plus une désialylation a été effectuée afin d'éliminer l'hétérogénéité due à la présence de l'acide N-acétylneuraminique. Dans ces conditions la fraction N-glycannique des sIgA révèle une douzaine de taches tandis que la fraction N-glycannique des IgA sériques se décompose en trois ou quatre taches. Leur migration effectuée en présence de témoins bi-, di- et tétraantenné montre que les glycannes des IgA sériques appartiennent à la famille des biantennés. Les sIgA semblent posséder des structures glycanniques beaucoup plus complexes.

B - ETUDE DES GLYCANNES LIES N-GLYCOSIDIQUEMENT AUX sIgA

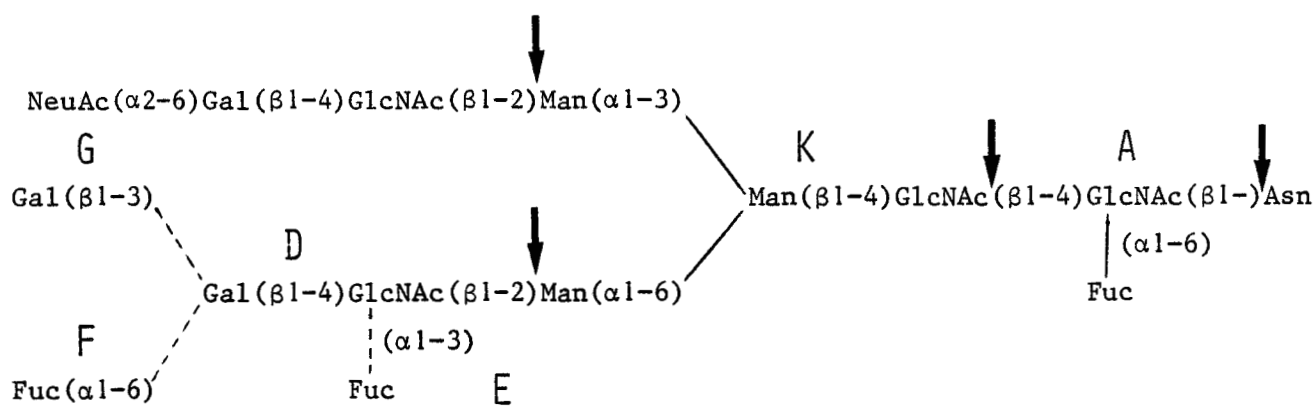
Les sIgA après hydrolyse trypsique et pepsique sont fractionnées sur Bio-Gel P-30. La seconde fraction (GP-II) contient uniquement la fraction N-glycannique (voir p. 182). Les monosaccharides présents sont le fucose, le galactose, le mannose, la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylneuraminique dans les rapports suivants : 1,1 : 1,85 : 3 : 3,86 : 0,8.

Après une hydrolyse pronasique qui a éliminé la plus grande partie des acides aminés la fraction glycopeptidique purifiée ne contient plus qu'un résidu d'acide aspartique pour quatre résidus de N-acétylglucosamine, et des traces de thréonine, sérine, acide glutamique, glycolle, alanine et valine. Les glycopeptides ont été séparés selon leur charge sur une colonne d'échange d'ions et se subdivisent en deux familles : les sialoglycopeptides (GP-A) et les asialoglycopeptides (GP-N).

1 - Etude de la structure primaire des sialoglycopeptides : La fraction sialoglycopeptidique comparée à la fraction des asialoglycopeptides est la fraction glycopeptidique majeure (78 %),

elle est beaucoup moins hétérogène. La fraction acide dont le nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique varie de 1 à 2, est séparée par électrophorèse en trois fractions distinctes (GP-A1 à GP-A3). La fraction GP-A3 s'est avérée être un mélange de quatre glycopeptides dont la structure a pu être précisée après libération d'oligosaccharides par le procédé d'hydrazinolyse-désamination nitreuse et analyse de ces derniers par spectrométrie de masse (Article n° 1 ; p. 146). Sept oligosaccharides sont obtenus (Fig. 40 ; p. 196) correspondant soit à des chaînons classiques (A : le fucose substituant l'asparaginyl N-acétylglucosamine, K : le core trimannosidique, D : la N-acétyllactosamine et I la sialyl N-acétyllactosamine) soit à des chaînons particuliers (E , F , G) correspondant à la substitution d'un résidu de N-acétyllactosamine par du galactose (G) par du fucose sur le résidu de galactose (F) ou par du fucose sur le résidu de N-acétylglucosamine (E). La présence d'oligosaccharides I et E dans la fraction GP-A3 confirme l'exclusion mutuelle du fucose et de l'acide N-acétylneuraminique sur le même résidu de N-acétyllactosamine.

Ces différentes structures ainsi que les moyens utilisés pour les déterminer sont décrits en détail dans l'Article n° 3 ; p. 197.



- A . $\text{Fuc}(\alpha 1-6)$ 2,5 aMan-ol
- D $\text{Gal}(\beta 1-4)$ 2,5 aMan-ol
- E $\text{Gal}(\beta 1-4)$ [$\text{Fuc}(\alpha 1-3)$] 2,5 aMan-ol
- G $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)$ 2,5 aMan-ol
- F $\text{Fuc}(\alpha 1-6)$ $\text{Gal}(\beta 1-4)$ 2,5 aMan-ol
- I $\text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)$ 2,5 aMan-ol

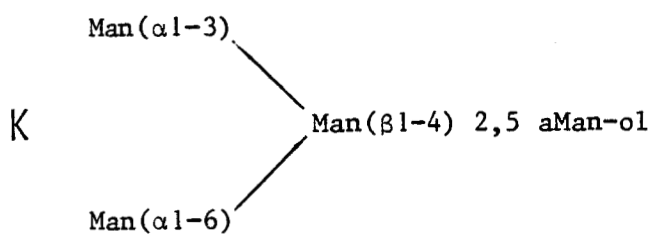


Figure 40 : Etude de la fraction GP-A3 par hydrazinolysé-désamination nitreuse.

(GP-A) with a 500 mM pyridine:acetic acid buffer pH 5. All the fractions were desalted on a column containing Sephadex G-50 (2.2 × 45 cm) equilibrated in water, at a flow rate of 18.5 ml/h. The sialoglycopeptides (GP-A) were fractionated by preparative paper electrophoresis at pH 2.4 (acetic acid 1 M), for 12 h at 10 V/cm.

Determination of the Structure of the Sialoglycopeptides

The molar carbohydrate composition of the glycopeptides was determined by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation [13]. Exhaustive methylation was carried out according to Hakomori [14] and the methylglycosides were separated by gas-liquid chromatography before (for neutral monosaccharides) and after (for neutral monosaccharides and hexosamines) peracetylation according to Fournet et al. [15]. The identification of the methyl derivatives of glucosamine residues was carried out after hydrolysis (4 M HCl, 4 h, 100°C) of the permethylated glycopeptides and after peracetylation, reduction with NaBD₄, purification on Dowex 50X8 (25–50 mesh, H⁺) followed by peracetylation [16]. The sialoglycopeptide GP-A3 was submitted to hydrazinolysis–nitrous acid deamination [17] and the liberated oligosaccharides were methylated and analyzed by gas-liquid chromatography–mass spectrometry [18]. For ¹H-NMR spectroscopic analysis the neutralized glycopeptides were repeatedly exchanged in D₂O (100% D, Aldrich, Milwaukee, USA) at room temperature with intermediate lyophilization. The 360-MHz ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker HX-360 spectrometer, operating in the Fourier transform mode at a probe temperature of 25°C. Chemical shifts are given relative to sodium-4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate (indirectly to acetone in D₂O: δ = 2.225 ppm) with an accuracy of 0.003 ppm.

RESULTS

Preparation of the Sialoglycopeptides

From the trypsin-pepsin hydrolysate of 1 g of sIgA, two fractions were isolated by gel filtration on Bio-Gel P-30 [3]: GP-I (43 mg) and GP-II (240 mg). The structures of four *O*-glycosidically linked glycans present in the GP-I fraction were previously determined [3]. Fraction GP-II, containing the *N*-glycosidically linked glycopeptides, was separated by ion-exchange chromatography into a neutral fraction GP-N (17.5 mg) which was extremely heterogeneous. The mixture of sialylated glycopeptides GP-A (61 mg) was separated into three fractions by preparative paper electrophoresis. The proportions of these fractions were 8% for glycopeptide GP-A1; 42% for GP-A2 and 50% for GP-A3.

Primary Structure of the Sialoglycopeptides

The amino acid composition of the three sialoglycopeptides (GP-A1 to GP-A3) shows the presence in all of the glycopeptides of one aspartic acid residue for four *N*-acetylglucosamine residues. Threonine, serine, glutamic acid, glycine, alanine and valine residues were characterized in trace amounts. The three glycopeptides were essentially differentiated by their *N*-acetylneuraminic acid, fucose and galactose content (Table 1). The primary structure of the different glycans was established by determination of the carbohydrate composition, methylation analysis, mass spectrometry and 360-MHz ¹H-NMR spectroscopy.

Table 1. Carbohydrate composition of the glycopeptide fraction GP-A and of the glycopeptide sub-fractions GP-A1 to GP-A3 isolated from human milk secretory IgA

The molar ratios were calculated on the basis of three mannose residues

Nature of the monosaccharides	Molar ratio in			
	mixture of sialo-glycopeptides GP-A	GP-A1	GP-A2	GP-A3
Fuc	1.46	1.08	1.25	1.33
Gal	2.22	2.05	2.09	2.50
Man	3	3	3	3
GlcNAc	4.09	3.92	4.04	3.49
NeuAc	0.78	1.94	0.88	1.39

Table 2. Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated glycopeptides isolated from human milk secretory IgA

The molar ratios were calculated on the basis of two residues of (3,4,6)-Me₃Man

Monosaccharide methyl ethers	Molar ratio in		
	GP-A1	GP-A2	GP-A3
(2,3,4)Me ₃ Fuc	1.00	1.2	0.81
(2,3,4,6)Me ₄ Gal	0	0.9	1.00
(2,3,4)Me ₃ Gal	2.02	1.2	0.98
(2,4,6)Me ₃ Gal	0	0	0.49
(3,4,6)Me ₃ Man	2	2	2
(2,4)Me ₂ Man	0.98	1.19	1.00
(3,6)Me ₂ GlcNAc(Me)	2.90	2.65	3.20
(6)Me ₁ GlcNAc(Me)	0	0.27	0.20
(3)Me ₁ GlcNAc(Me)	0.40	0.28	0.30

Structure of the Glycopeptide Fraction GP-A1

The carbohydrate composition of glycopeptide fraction GP-A1 is presented in Table 1. The results suggest the sample to be homogeneous. The identification of the different methylated derivatives (Table 2) and particularly the identification of the methylated derivatives of mannose led to the conclusion that a biantennary structure of the *N*-acetylglucosamine type is present. The 360-MHz ¹H-NMR spectral data of glycopeptide fraction GP-A1 point to a bi(α2–6)-sialo biantennary *N*-acetylglucosamine type of structure. This can be deduced from the chemical shifts of the H-1 of Man-4 (δ = 5.133 ppm) and Man-4' (δ = 4.940 ppm) in combination with those of the H-2 of Man-3 (δ = 4.259 ppm), Man-4 (δ = 4.196 ppm) and Man-4' (δ = 4.116 ppm). Independent evidence for the (α2–6) type of linkage between *N*-acetylneuraminic acid and galactose stems from the chemical shifts of the structural reporter group signals of the *N*-acetylneuraminic acid residues (δH-3ax = 1.725 ppm, δH-3eq = 2.672 ppm and δNac = 2.030 ppm) and from the chemical shift of the H-1 of the galactose residues (δH-1 = 4.447 ppm) [19]. The (α1–6) type of linkage of fucose to GlcNAc-1 is characterized by the positions of the structural reporter group signals of fucose (δH-1 = 4.88 ppm, δH-5 = 4.12 ppm and δCH₃ = 1.20 ppm) and by the chemical shift of the *N*-acetyl signal of GlcNAc-2 (δNac = 2.096 ppm) [19]. This result is in accordance with the characterization of 3-*O*-methyl derivative of *N*-acetylglucosamine. The low

Glycan A

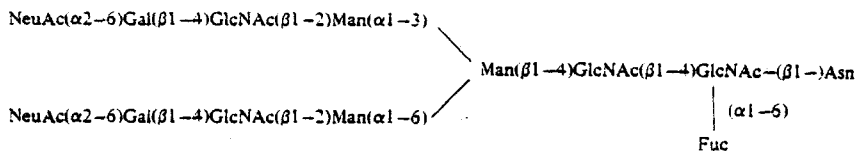
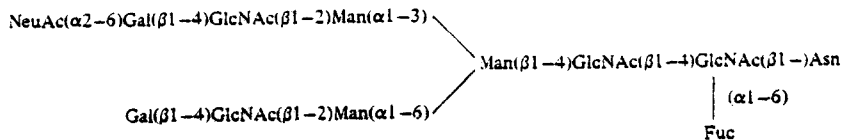


Fig. 1. Structure of the disialylated glycan A from human milk slgA

Glycans B and F



Glycans C and G

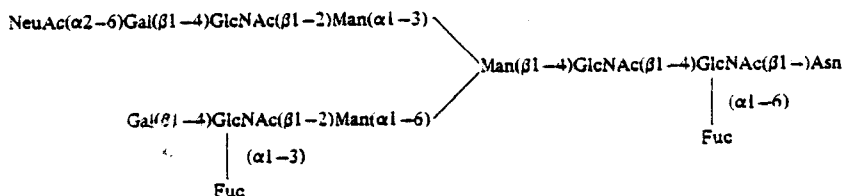


Fig. 2. Structure of the glycans B and C constituting the glycopeptide fraction GP-A2

amount of this component (Table 1) is due to the fact that, in the conditions of hydrolysis we used, the linkage between GlcNAc-1 and the asparagine residue has not been completely hydrolysed [16].

Structure of the Glycopeptide Fraction GP-A2

The glycopeptide fraction GP-A2 is a mixture of two glycopeptides (glycopeptides B and C) of the *N*-acetylglucosamine type. Both glycans possess one *N*-acetylneuraminic acid residue but they differ in their fucose content. This conclusion was reached on the basis of the following results. (a) The carbohydrate composition shows that the fucose residues were not present in an integer number of residues (Table 1); (b) methylation analysis demonstrates the presence of mono 3-*O*-methyl and 6-*O*-methyl derivatives of *N*-acetylglucosamine (Table 2); (c) the 360-MHz ¹H-NMR spectrum of the glycopeptide fraction GP-A2 shows that it consists of a mixture of closely related biantennary glycans of the *N*-acetylglucosamine type. The kind of branching is evident from the chemical shift values of the mannose H-2 signals (δ H-2 Man-3 = 4.258 ppm, δ H-2 Man-4 = 4.195 ppm and δ H-2 Man-4' = 4.105 ppm) [19]. In all glycopeptides present in this mixture the upper branch contains *N*-acetylneuraminic acid (α 2-6)-linked to Gal-6. This conclusion is based on the chemical shift values of H-3ax and H-3eq of *N*-acetylneuraminic acid (δ = 1.725 ppm and 2.667 ppm, respectively), in combination with that of H-1 of Man-4 (δ = 5.133 ppm). The presence of fucose (α 1-6)-linked to GlcNAc-1 is proved by the positions of the structural reporter group signals of fucose: δ H-1 = 4.88 ppm, δ H-5 = 4.12 ppm and δ CH₃ = 1.21 ppm. For the *N*-acetyl signal of GlcNAc-2 two singlets

are observed at δ = 2.080 ppm and δ = 2.094 ppm with a relative intensity ratio 1:1. For the H-1 of GlcNAc-2 two doublets are found at δ = 4.626 ppm and δ = 4.699 ppm, in a similar intensity ratio as observed for the *N*-acetyl signals of this residue. The set of signals at 2.080 ppm and 4.626 ppm belongs to a glycopeptide devoid of fucose (α 1-6)-linked to GlcNAc-1 whereas the other set, at δ = 2.094 ppm and δ = 4.699 ppm, belongs to a glycopeptide bearing Fuc in an (α 1-6) linkage to GlcNAc-1 [19]. The occurrence of a second fucose residue (α 1-3)-linked to a peripheral *N*-acetylglucosamine residue is obvious from the set of chemical shifts of the fucose structural reporter group protons: δ H-1 = 5.12 ppm and δ CH₃ = 1.17 ppm. This fucose residue is located in the asialo lower branch as can be inferred from the chemical shift value of H-1 of Man-4': δ = 4.909 ppm [20]. The occurrence of two signals for the *N*-acetyl protons of GlcNAc-5' at δ = 2.048 ppm and δ = 2.042 ppm in an intensity ratio of 1:1 indicates that the (α 1-3)-linked fucose is only partly present [20, 21]. The structure of the glycans B and C present in the glycopeptide fraction GP-A2 are given in Fig. 2.

Structure of the Glycopeptide Fraction GP-A3

The results obtained by methanolysis (Table 1) and by methylation analysis (Table 2) of the glycopeptide fraction GP-A3 indicate that the monosaccharides and the methyl derivatives of these monosaccharides were not present in a ratio of integer numbers. Consequently, fraction GP-A3 is a mixture of glycopeptides. In fact, the glycopeptide fraction GP-A3 differs from the two others by an excess of galactose. After methylation, hydrolysis, reduction with sodium boro-

BUS
LILLE

chemical shift data of the structural reporter signals of fucose in such a type of linkage are not yet available. It cannot be excluded that they coincide with structural reporter group signals of fucose in other linkage types. The more so since in glycopeptide GP-A3 it is expected to be present in a small amount.

Concerning the Gal(1-3)Gal moiety, which was traced by mass spectrometry [18]. The ¹H-NMR spectrum is not conclusive. Previously, we observed that the attachment of a galactose residue in (β1-3) linkage to another galactose residue gives rise to a downfield shift of the H-4 signal of the 3-substituted galactose residue from δ = 3.92 ppm to δ = 4.19 ppm [22]. If such a structural element occurs in glycopeptide GP-A3 in a relatively low amount it cannot be excluded that the H-4 signal of the penultimate galactose residue is hidden under the H-2 signal of Man-4. Regarding the anomeric proton signals of the involved galactose residues, it is interesting to compare those with the signals of Gal(β1-3)Gal(β1-4)Xyl(β1-0)Ser, a reference compound possessing the Gal(β1-3)Gal moiety. In this reference compound the H-1 signal of the terminal galactose is found at δ = 4.610 ppm (H. van Halbeek, unpublished results). The H-1 signal of the terminal galactose in glycopeptide GP-A3 may coincide at δ = 4.61 ppm with the H-1 signal of GlcNAc-2 for that portion of the glycopeptide fraction that does not bear a fucose in (α1-6) linkage to GlcNAc-1. However, an H-1 signal for the penultimate galactose at δ = 4.52 ppm is missing, suggesting that if the Gal(1-3)Gal moiety is present, the amount is less than 5%.

DISCUSSION

The *O*-glycosidically and *N*-glycosidically conjugated glycans of sIgA have been separated by gel filtration in two fractions, the main one being constituted of the *N*-glycosidically linked glycans. The preponderance of these latter could be explained by the fact that the sIgA₂ population, devoided of the *O*-glycosylated hinge region, is present in human milk in an amount three times higher than that of sIgA₁ which possess the hinge region [23].

The sialylated *N*-glycosidically linked glycans represent the major and less heterogeneous fraction, in contrast to the neutral glycopeptides. The sub-fractionation of the acidic fraction has led to the isolation of five oligosaccharides the structure of which are described in the present paper. All have in common a biantennary basic structure of the *N*-acetylglucosamine type and possess an *N*-acetylneuraminic acid residue (α2-6)-linked to the terminal galactose of the 'Man(α1-3) branch'. Most of the compounds possess a fucose residue (α1-6)-linked to the asparagine-conjugated *N*-acetylglucosamine. The heterogeneity of the structures is essentially due to the presence of additional Gal(β1-3) or Fuc(α1-6) linked to the terminal galactose residue, or of Fuc(α1-3) linked to the *N*-acetylglucosamine taking part of the *N*-acetylglucosamine residue present in the 'Man(α1-6) branch'.

The sequence Fuc(α1-6)Gal(β1-4)-R represents a novel type of oligosaccharide structure, while Gal(β1-3)Gal(β1-4)-R has been previously demonstrated in glycopeptides from calf thymocyte plasma membranes [24], in angiotensin-converting enzyme [25] and in bovine glycoporphin [26]. The location of these structures on the different polypeptide chains of sIgA has not yet been established. However, it may be noted that the structure of the oligosaccharides from the

J-chain of Waldenström macroglobulin [8] shows strong homologies with those from sIgA here described. The major difference, however, is the absence of fucose in the former. On the other hand, the structure of a glycan from the free secretory piece isolated from human milk has been proposed [9]. However, we have not characterized this structure in the acidic glycopeptide fraction we isolated.

The *N*-glycosidically linked glycans from human milk sIgA, together with those from human serum immunoglobulins such as IgM [27], IgE [28], IgA [4, 5] and IgG [29], from bovine serum immunoglobulins [30, 31] and from bovine colostrum IgG₁ [32] show a relative unity of structure. They are biantennary and of the *N*-acetylglucosamine type with a fucose residue linked to the *N*-acetylglucosamine of the protein attachment point. However they differ by the presence of particular oligosaccharide sequences like: Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc, Fuc(α1-6)Gal and Gal(β1-3)Gal(β1-4)-GlcNAc. Moreover, in human serum IgA₁ [5] and IgG [29], an additional intersecting *N*-acetylglucosamine residue linked to the Man(β1-4) has been demonstrated. This residue is absent in the acidic glycopeptides from human milk sIgA, but has been recently identified in practically all the neutral glycopeptides of the *N*-acetylglucosamine type (A. Pierce, unpublished results).

The biological significance, if any, of the structural specificity of human milk sIgA glycans remains to be established.

This investigation was supported in part by the *Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé no. 217: Relations structure-fonction des constituants membranaires)* and by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organisation for the Advancement of Pure Research (ZWO) and by Grand UUKC-OC 79-13 from the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF). A. Pierce received a grant from the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique*. G. Strecker is *Maitre de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique*. The authors are obliged to Dr B. Fournier for helpful discussions about the gas-liquid chromatography analysis of monosaccharides and derivatives. The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of Y. Leroy (C.N.R.S. technician) and of G. Ricart in gas chromatography-mass spectrometry analysis, of C. Alonso (C.N.R.S. technician), B. Coddeville and J. P. Decottignies in the preparation of sIgA.

REFERENCES

1. Montreuil, J., Chosson, A., Havez, R. & Mullet, S. (1960) *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 154, 732-736.
2. Descamps, J., Monsigny, M. & Montreuil, J. (1968) *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 266D, 1775-1778.
3. Pierce-Crétel, A., Pamblanco, M., Strecker, G., Montreuil, J. & Spik, G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 114, 169-178.
4. Dawson, G. & Clamp, J. R. (1968) *Biochem. J.* 107, 341-352.
5. Baenziger, J. & Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7270-7281.
6. Crétel, A., Pamblanco, M., Egge, J., Strecker, G., Montreuil, J. & Spik, G. (1979) in *Proc. 5th Int. Symp. Kiel* (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M. F., Vliegthart, J. F. G. & Wiegandt, H., eds) pp. 26-27, Georg Thieme, Stuttgart.
7. Torano, A., Tsuzukida, Y., Liu, Y. S. V. & Putnam, F. W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2301-2305.
8. Baenziger, J. U. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4063-4071.
9. Purkayastha, S., Rao, C. V. N. & Lamm, M. E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6583-6587.
10. Monsigny, M., Adam-Chosson, A. & Montreuil, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 857-886.
11. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356.
12. Spiro, R. G. & Bhoyroo, V. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5704-5717.
13. Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304.

14. Hakomori, S. I. (1964) *J. Biochem (Tokyo)* 55, 205-208.
15. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry*, 17, 5206-5214.
16. Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502.
17. Bayard, B. & Montreuil, J. (1974) *Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci.* 221, 209-218.
18. Strecker, G., Pierce-Crétel, A., Fournet, B., Spik, G. & Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 111, 17-26.
19. Vliegthart, J. F. G., van Halbeek, H. & Dorland, L. (1981) *Pure Appl. Chem.* 53, 45-77.
20. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419.
21. Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Montreuil, J., Fournet, B. & Schmid, K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5588-5590.
22. Vliegthart, J. F. G., van Halbeek, H. & Dorland, L. (1980) in *IUPAC 27th International Congress of Pure and Applied Chemistry* (Varmavuori, A., ed.) pp. 253-263, Pergamon Press, Oxford.
23. Mota, G. (1977) *Rev. Roum. Biochim.* 14, 39-42.
24. Kornfeld, R. (1978) *Biochemistry*, 17, 1415-1423.
25. Hartley, J. L. & Soffer, R. L. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1545-1552.
26. Fukuda, K., Tomita, L. & Hamada, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* 677, 462-470.
27. Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C. K. & Kornfeld, S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 2156-2163.
28. Baenziger, J., Kornfeld, S. & Kochwa, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1897-1903.
29. Kornfeld, R., Keller, J., Baenziger, J. U. & Kornfeld, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3259-3268.
30. Ito, S., Muramatsu, T. & Kobata, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 938-944.
31. Tai, T., Ito, S., Yamashita, K., Muramatsu, T. & Kobata, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 968-974.
32. Chéron, A., Fournet, B., Spik, G. & Montreuil, J. (1976) *Biochimie (Paris)* 58, 927-942.

A. Pierce-Crétel, M. Pamblanco, G. Strecker, J. Montreuil, and G. Spik.
Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire associé au Centre National de la Recherche Scientifique 217,
Université des Sciences et Techniques de Lille I,
F-59655 Villeneuve-d'Ascq, Cedex, France

L. Dorland, H. van Halbeek, and J. F. G. Vliegthart, Afdeling Bioorganisch-Chemie, Rijksuniversiteit te Utrecht,
Croesestraat 79, NL-3522-AD Utrecht, The Netherlands

La fraction glycanique principale des sIgA est constituée de glycannes alcali-stables, qui proviennent de la chaîne J, de la pièce de sécrétion et des chaînes lourdes. Séparée sur chromatographie d'échange d'ions cette fraction a été subdivisée en sialo- et asialoglycopeptides. La fraction majeure est constituée de disialo- et monosialoglycopeptides au nombre de 5 qui diffèrent, en outre, par leur contenu en fucose et en galactose.

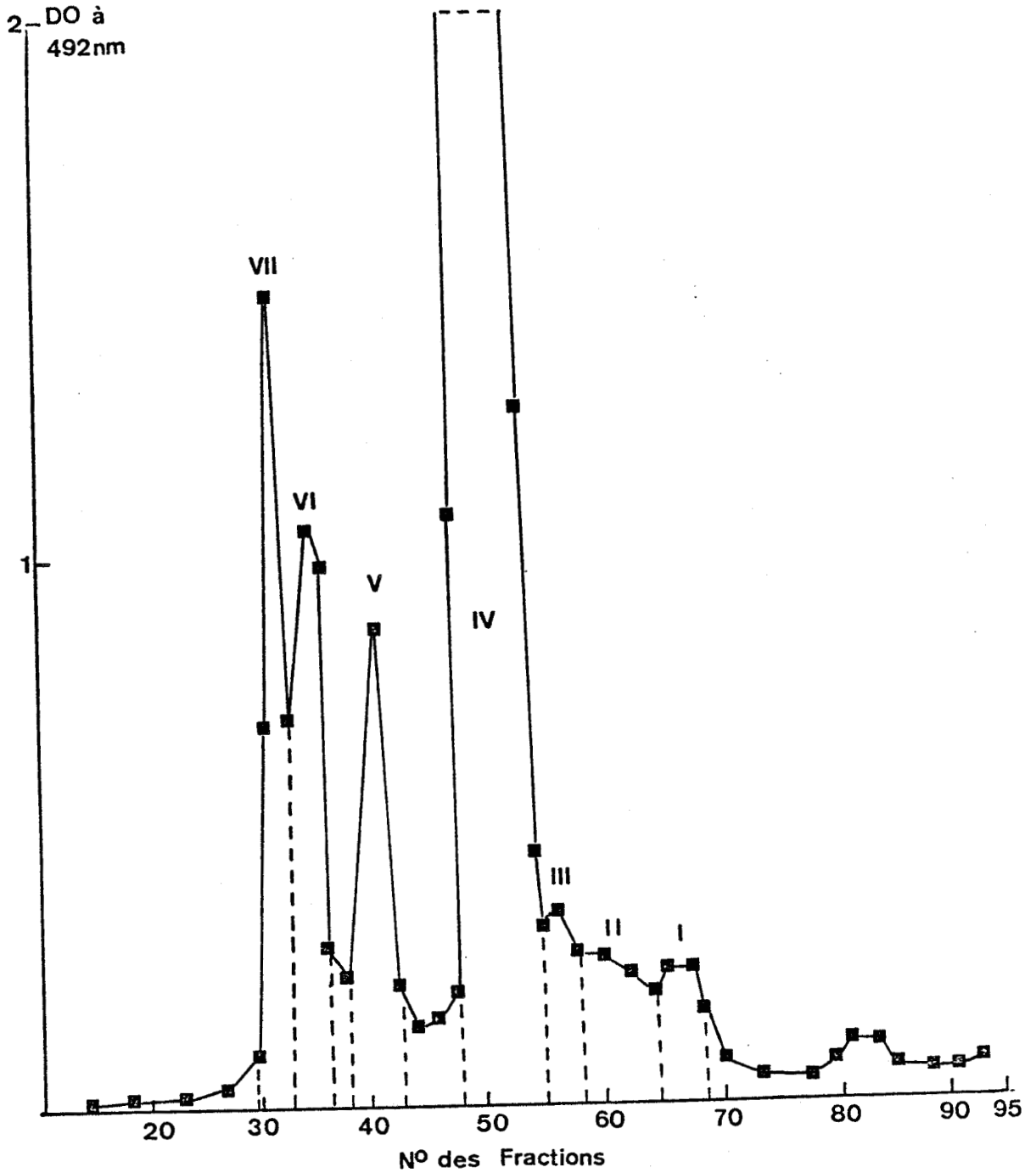
Deux d'entre eux sont intéressants, ils possèdent soit le chaînon $\text{Fuc}(\alpha 1-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{R}$ qui à notre connaissance a été identifié pour la première fois dans la structure des glycoprotéines soit le chaînon $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{R}$. Ce dernier a été caractérisé précédemment dans les membranes plasmiques de thymocyte de Veau (KORNFELD, 1978), dans l'enzyme qui hydrolyse l'angiotensine (HARTLEY et SOFFER, 1978) et dans la glycophorine bovine (FUKUDA *et al.*, 1981). Les trois autres glycannes possèdent des structures plus classiques rencontrées chez de nombreuses glycoprotéines et notamment dans une autre protéine lactée : la lactotransferrine (SPIK *et al.*, 1982b) (Fig. 5 ; p. 22).

2 - Etude de la structure primaire des asialoglycopeptides : La fraction mineure N-glycopeptidique GP-N (22 %) s'est révélée être la fraction la plus hétérogène et la plus complexe.

Nous avons, dans un premier temps, séparé les différents constituants de la fraction GP-N par chromatographie de gel filtration.

a - Fractionnement sur colonne de Bio-Gel P-30 :

Le fractionnement sur colonne de Bio-Gel P-30 dans les conditions décrites p. 212, fournit sept fractions qui diffèrent par leur contenu en fucose, galactose et N-acétylglucosamine. Le schéma du fractionnement donné dans la Fig. 41 ; p. 204, montre qu'en fait la séparation fournit seulement deux groupes distincts de glycopeptides (I à IV et V à VII ; le glycopeptide le plus simple est appelé



BUS
LILLE

Figure 41 : Fractionnement sur colonne de Bio-Gel P-30 (2 x 120 cm) de la fraction asialoglycopeptidique totale (GP-N). L'élution est réalisée par une solution d'acide acétique 0,1 M.

glycopeptide I). La fraction glycopeptidique IV majeure encore très hétérogène est fractionnée sur colonne d'affinité. La présence d'un taux variable de fucose et l'existence d'une cinquième N-acétylglucosamine nous a fait choisir le fractionnement sur Concanavalline A-Sepharose qui ne retient pas les glycanes triantennés (KORNFELD *et al.*, 1981) et sur les *Lens culinaris* immobilisée qui présente une grande affinité pour les glycopeptides possédant un résidu de fucose substituant l'asparaginyl N-acétylglucosamine.

b - Fractionnement sur colonne de Con A-Sepharose :

La fraction IV est en premier lieu N- [¹⁴C] acétylée par de l'anhydride acétique radioactif. Elle est ensuite chromatographiée dans les conditions décrites p. 213 sur colonne de Con A-Sepharose. Le profil d'élution est donné Fig. 42 ; p. 206. Deux comportements chromatographiques différents sont obtenus : fractions éluées par le tampon de départ et fractions éluées par l' α -méthyl glucopyranoside (10 mM) correspondant à quatre fractions retardées et une fraction éluee. Les fractions retardées 1 et 4 qui représentent moins de 0,5 % de la fraction asialoglycopeptidique totale n'ont pas été analysées en détails. La fraction éluee Con A (5) contient plus de 91 % de la fraction asialoglycopeptidique IV totale.

L'hétérogénéité due au fucose substituant les fractions séparées par Con A-Sepharose, a été éliminée par chromatographie sur colonne de LCA-Sepharose.

c - Fractionnement sur colonne de LCA-Sepharose :

Chaque fraction séparée sur Con A-Sepharose a été chromatographiée sur LCA-Sepharose dans les conditions décrites p. 213. Le profil d'élution (Fig. 42 ; p. 206) montre qu'il existe deux sortes de fractions : la fraction non retenue LCA correspond aux glycopeptides ne possédant pas de fucose au point d'attache tandis que la fraction retenue sur colonne LCA correspond aux glycopeptides possédant du fucose substituant le résidu d'asparaginyl N-acétylglucosamine

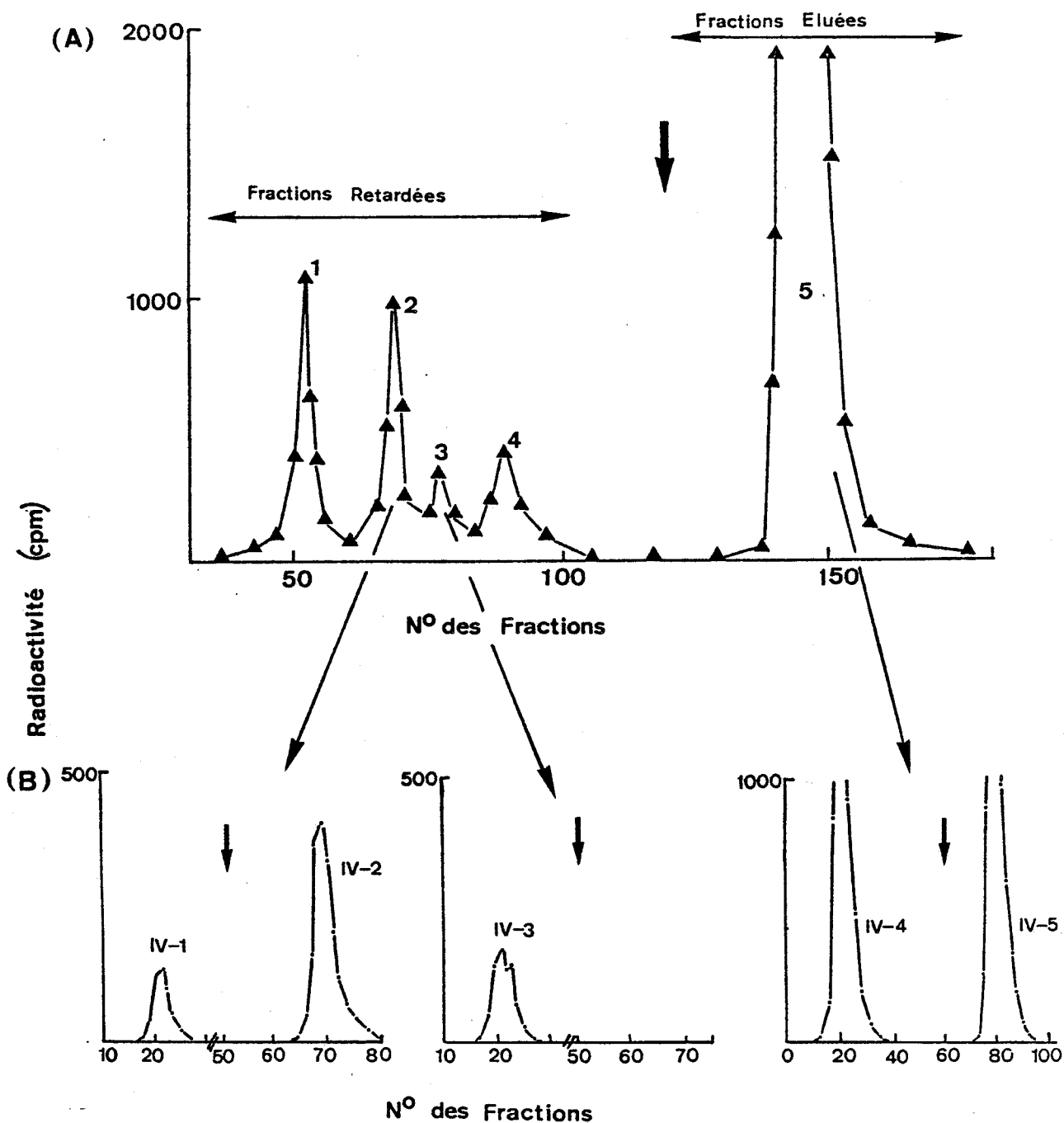


Figure 42 : (A) Profil d'élution du fractionnement de la fraction IV sur colonne de Con A-Sepharose.

(B) Profil d'élution du fractionnement des fractions 2, 3 et 5 sur colonne de LCA-Sepharose.

→ α -méthylglucopyranoside

BUS
LILLE

en α -1,6. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de DEBRAY *et al.* (1981) et DEBRAY et MONTREUIL (1981) concernant la spécificité de reconnaissance de la LCA.

Le couplage des deux chromatographies d'affinité a permis d'obtenir cinq fractions appelées (IV-1 à IV-5) qui diffèrent principalement par le nombre de résidus de fucose et de galactose.

d - Structure primaire des asialoglycopeptides :

Tous les asialoglycopeptides ont été analysés par les méthodes classiques de détermination des structures (p. 137). Ils font l'objet de l'article n° 4 p. 208.

PRIMARY STRUCTURE OF N-GLYCOSIDICALLY LINKED ASIALOGLYCANS OF
SECRETORY IMMUNOGLOBULINS A FROM HUMAN MILK.

Annick PIERCE-CRETEL, Henri DEBRAY, Jean MONTREUIL and Geneviève SPIK

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au Centre
National de la Recherche Scientifique n° 217, Université des Sciences
et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Herman van HALBEEK, Johanna H.G.M. MUTSAERS and Johannes F.G. VLIE-
GENTHART.

Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht, Utrecht,
The Netherlands.

Address to which correspondence should be sent :

G. SPIK

Laboratoire de Chimie Biologique

Université des Sciences et Techniques de Lille I .

F - 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Full postal addresses

A. PIERCE-CRETEL, H. DEBRAY, J. MONTREUIL and G. SPIK

Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au Centre National de la Recherche Scientifique n° 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F - 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

H. van HALBEEK, J.H.G.M. MUTSAERS and J.F.G. Vliegenthart

Afdeling Bio-Organische Chemie, Rijksuniversiteit Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522 AD Utrecht, The Netherlands.

Abbreviations

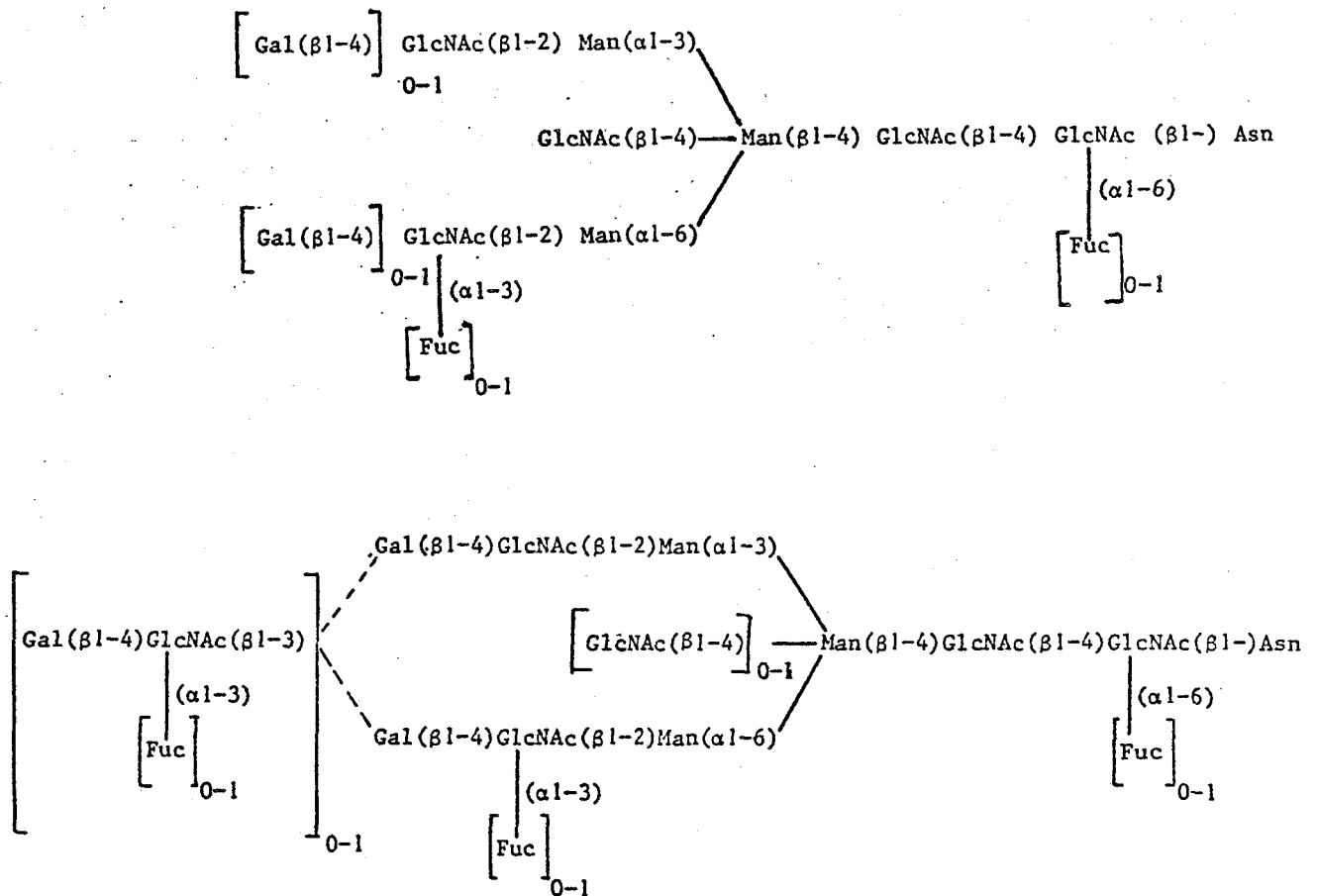
Fuc, L-fucose ; Gal, D-galactose, Man, D-mannose ; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine, Asn, L-asparagine ; Con A, Concanavalin A ; LCA, Lens culinaris agglutinin ; sIgA, secretory immunoglobulins A ; NMR, nuclear magnetic resonance.

Enzymes

Endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase D (EC : 3.2.1.96).

SUMMARY

The asialoglycopeptides obtained from secretory immunoglobulines A from human milk have been separated by gel filtration and affinity chromatography on Concanavalin A-Sepharose and Lens culinaris agglutinin-Sepharose columns. The structures have been determined on the basis of the results obtained by methanolysis, methylation-mass spectrometry and 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy. The glycans were of the biantennary N-acetylactosamine type differing in their degree of extension by fucosyl-N-acetylactosamine residues. The general scheme of the glycopeptides was as follows :



Most of the asialoglycopeptide structures possessing an intersecting GlcNAc residue are suggested to be located on the α chain of the human milk sIgA. The methodology applied to the structural analysis adequately coped with the extremely high degree of heterogeneity shown by the structures.

INTRODUCTION

Human milk secretory immunoglobulins A (sIgA) present an exceptional diversity in the structure of the sugar moieties attached to the polypeptide chains. O-glycosidically linked glycans are present at the hinge region of the α chains, the structures of which have been described previously (1,2). The N-glycosidically-linked glycans present on the α -chains and the junction and secretory pieces (3-5) can be divided into two categories according to the presence or absence of sialic acid residues. The structures of the sialic acid containing glycans (acidic fraction) were reported in a previous paper (6). The neutral fraction is extremely heterogeneous necessitating the use of lectin affinity chromatography (7,8) to achieve the separation of the different glycan structures. In this paper we describe the separation of the N-glycosidic glycans present in the neutral fraction and their structural analysis. The latter was performed by methylation analysis, mass spectrometry and high-resolution 500-MHz ^1H -NMR spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

Methyl- α -D-glucopyranoside was purchased from Koch-Light Laboratories Ltd (Colnbroock, England). Endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase from Diplococcus pneumoniae was from Seikagaku Kogyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Silicagel thin-layer chromatography plates (Kieselgel 60 F 254) were from Merck (Darmstadt, FRG). Bio-Gel P-30 (200-400 mesh) and Bio-Gel P-2 (200-400 mesh) were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). $^2\text{H}_2\text{O}$ was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Sepharose 4B was obtained from Pharmacia Fine Chemicals A.B. (Uppsala, Sweden). Lens culinaris agglutinin (Pharmindustrie, Clichy, France) was purified by affinity chromatography (9) and immobilized on activated Sepharose 4B according to March et al. (10) at a concentration of 5 mg of lectin per ml of gel (7).

Preparation of the Asialoglycopeptides

Human milk sIgA were purified to 99.3 % (1). They contained a small amount of IgG (less than 0.1 % ; w/w) and IgM (about 0.6 % ; w/w). They were successively hydrolyzed by trypsin, pepsin and pronase. Subsequently the neutral (GP-N) and acidic (GP-A) fractions were separated by ion-exchange chromatography (6). The asialoglycopeptides (GP-N) were fractionated on a Bio-Gel P-30 column (2 x 120 cm) equilibrated in 0.1 M acetic acid at a flow rate of 7.5 ml/h. The carbohydrate fractions were visualized by a phenol-sulfuric acid reagent (11). The major glycopeptide fraction IV was N $\left[\text{}^{14}\text{C} \right]$ acetylated according to KOIDE et al. (12) and chromatographed on an immobilized Con A-

Sephacrose column. After dissolution in 5 mM sodium acetate buffer pH 5.2 containing 0.1 M NaCl and CaCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 (1 mM each), fraction IV (10 mg) was applied to a column of Con A-Sephacrose (1.7 x 20 cm). Elution was carried out first with buffer and then with buffer containing 10 mM methyl- α -D-glucopyranoside. Fractions of 1 ml were collected and samples of 5 μ l analyzed for radioactivity. All the Con A fractions were chromatographed on an immobilized LCA (1 x 12 cm) column (8) equilibrated in 0.17 M NaCl - 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.2. Elution was carried out first with the above buffer and then with the same buffer containing 0.15 M methyl- α -D-glucopyranoside. Fractions of 500 μ l were collected and samples of 5 μ l analyzed for radioactivity. All the obtained fractions were desalted on a Bio-Gel P-2 column (1.2 x 46 cm) equilibrated in 0.1 M acetic acid at a flow rate of 4.5 ml/h (750 μ l per fraction).

Determination of the Structure of the Asialoglycopeptides

The molar carbohydrate content of each fraction was determined by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation (13). Methylation analysis was done according to FINNE et al. (14) as modified by PAZ PARENTE et al. (15) allowing the methylation of microquantities. The methyl derivatives were identified after gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis according to FOURNET et al. (16). Hydrolysis of the glycopeptide fraction I by endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase D was performed according to TAI

et al. (17). The detection of hydrolysed compounds was as previously described (18). The determination of Lewis^b activity was done as follows : total serum (0.1 ml) was incubated for 2 h at room temperature with 0.1 ml of a serial two-fold dilutions of a solution of compound VI (0.33 mg/ml). A second incubation was then performed after addition of 0.1 ml human red blood cells (3 % in NaCl 0.9 %) for 1 h at 22°C.

Before NMR analysis, the asialoglycopeptides were treated repeatedly with $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,96 atom % ^2H) with intermediate lyophilization. The 500-MHz ^1H -NMR spectra were recorded on a Bruker WM-500 spectrometer (SON hf-NMR facility, Department of Biophysics, Nijmegen University, The Netherlands) operating in the Fourier transform mode and equipped with a Bruker Aspect-2000 computer. For experimental details see (19, 20). The probe temperature was 27°C. Solvent peak suppression for dilute samples was achieved by a water elimination Fourier transform (WEFT) pulse sequence (composite, non-selective 180° pulse-delay τ - 90° pulse-acquisition) (21). Chemical shifts (δ) are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate but were actually measured by reference to internal acetone (δ 2.225 in $^2\text{H}_2\text{O}$, 27°C) with an accuracy of 0.002 ppm.

RESULTS

Preparation of the Asialoglycopeptides

The trypsin, pepsin and pronase hydrolysis of 1 g of sIgA led to the isolation of 17.5 mg of the neutral fraction GP-N (6). The amino acid composition of GP-N showed the presence of one aspartic acid residue for 4.6 N-acetylglucosamine residues. Threonine, serine, glutamic acid, glycine and valine residues were characterized in trace amount. After Bio-Gel P-30 chromatography of GP-N, 7 glycopeptide fractions (I to VII) were obtained. Their relative abundances are given in Table 1. The major fraction (fraction IV) was $\underline{\text{N}}\text{-} \left[\text{}^{14}\text{C} \right]$ acetylated and subfractionated by lectin affinity chromatography (Fig. 1). Fraction IV was resolved on immobilized Con A-Sepharose into three peaks. The first two were eluted with the starting buffer while the third peak was eluted with 0.01 M methyl- α -D-glucopyranoside.

Subsequently each subfraction was submitted to immobilized LCA chromatography (Fig. 1). The first retarded Con A fraction was separated into non-retained (IV-1) and retained (IV-2) glycopeptide fractions. The LCA chromatography of the Con A eluted fraction led to two subfractions IV-4 (non-retained) and IV-5 (retained). No improved separation was obtained from glycopeptide IV-3 which was non-retained on LCA. The relative abundances of fractions IV-1 to IV-5 have been listed in Table 2.



Table 1. *Relative abundance and molar carbohydrate composition of the asialoglycopeptide fraction isolated from human milk sIgA.*

The molar ratios were calculated on the basis of 3 mannose residues

Asialoglycopeptide fractions								
	GPN	I	II	III	IV	V	VI	VII
Yields (in p. cent)	-	15	9	11	38	13	5	9
Monosaccharides								
Fuc	0.8	0.29	0.16	0.40	0.80	2.20	3.50	3.07
Gal	1.65	0.58	0.49	0.43	1.05	3.00	3.93	4.83
Man	3	3	3	3	3	3	3	3
GlcNAc	4.98	3.07	4.29	4.88	4.98	4.87	5.40	6.84

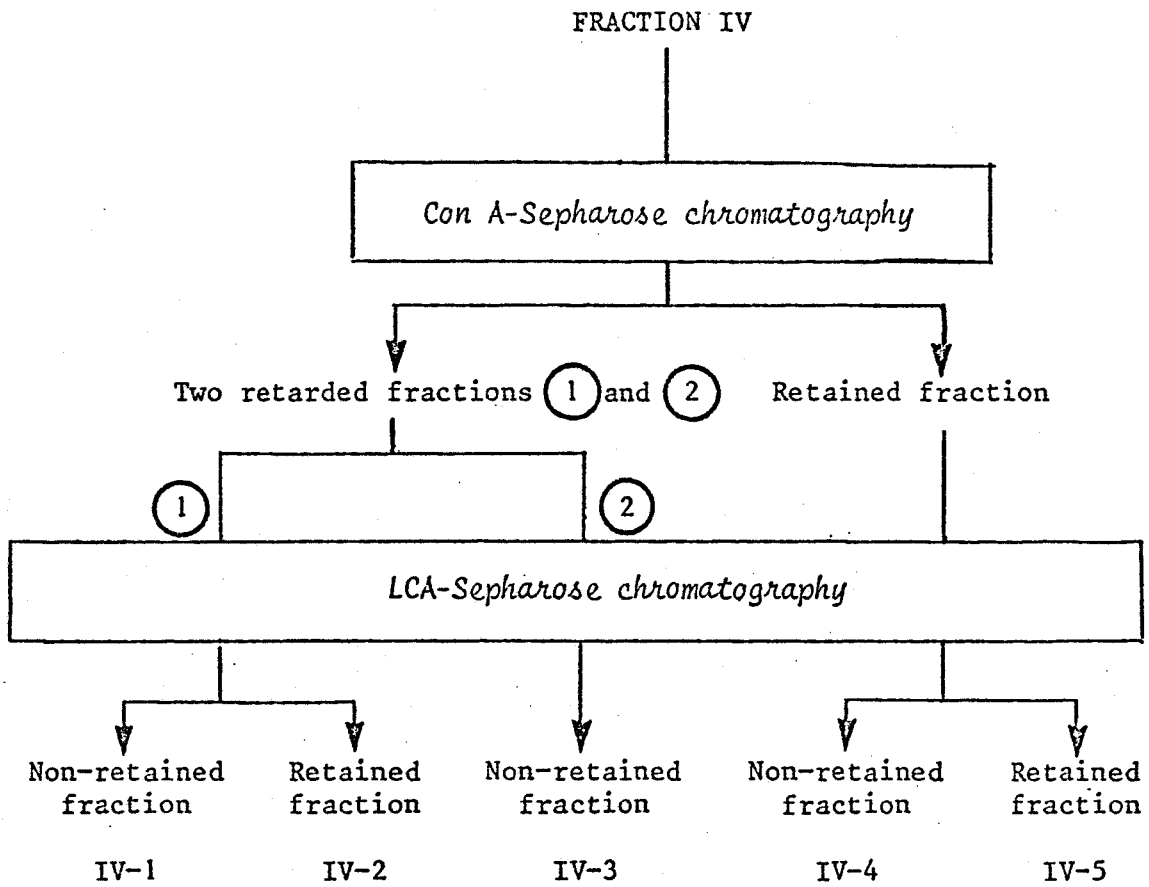


Fig. 1 : Subfractionation of GP-N fraction IV from human milk sIgA by Con A- and LCA-Sepharose affinity chromatography





Table 2. *Relative abundance and molar carbohydrate composition of the asialo-glycopeptide subfractions isolated from GP-N fraction IV after Con A- and LCA-Sepharose affinity chromatography.*

The molar ratios were calculated on the basis of 3 mannose residues

Fraction IV	Glycopeptides fractions				
	IV-1	IV-2	IV-3	IV-4	IV-5
Yields (in p. cent)	0.6	7	0.9	43.5	48
Monosaccharides					
Fuc	0	0.92	0.18	0.13	1.47
Gal	1.12	1.01	1.08	0.86	1.04
Man	3	3	3	3	3
GlcNAC	4.95	5.07	4.91	4.89	4.98

Primary Structure of the Asialoglycopeptides

The primary structure of the glycopeptides present in GP-N fractions I to VIII was completely established applying a combination of methanolysis, methylation-mass spectrometry and 500-MHz ^1H -NMR spectroscopic analysis.

Methanolysis

The carbohydrate compositions of the GP-N glycopeptide fractions I to VII were given in Table 1 and those of subfractions IV-1 to IV-5 in Table 2. Since in most of the fractions the ratios of the monosaccharides, particularly Fuc and/or Gal to Man, are not integers, it is apparent that these fractions are still heterogeneous. The majority of the eleven studied fractions are characterized by the presence of 5 GlcNAc residues (except VI and VII) ; they differ from each other with respect to their Fuc and Gal content implying that these glycans possess incomplete structures. The fractions (V, VI and VII) containing the larger glycopeptides are characterized by relatively large amounts of GlcNAc (5 to 7), Gal (3 to 4) and Fuc (2 to 3.5) residues. They may be considered as polyantennary or extended biantennary N-acetyllactosamine structures.

Methylation analysis

The molar ratio of the different methylated derivatives of the monosaccharides present in the GP-N glycopeptide fractions are described in Table 3. The identification and the quantification

Table 3. Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated neutral glycopeptides isolated from human milk sIgA.



The molar ratios were calculated on the basis of 2 residues of 3,4,6-Me₃Man (= 3,4,6-tri-O-methyl mannose)

Monosaccharide methyl ethers	Asialoglycopeptide fractions (a)								
	I	II	III	IV-2	IV-4	IV-5	V	VI	VII
2,3,4-Me ₃ -Fuc	0.05	0.36	0.10	0.60	0	1.37	1.34	1.59	2.84
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	0.21	0.28	0.34	0.80	0.92	0.97	1.64	2.13	1.72
2,4,6-Me ₃ -Gal	0	0	0	0	0	0	0.84	1.79	1.53
3,4,6-Me ₃ -Gal	0	0	0	0	0	0	0.05	0.39	0.26
2,3,4-Me ₃ -Gal	0	0	0	0	0	0	0	0.20	0
2,3,4,6-Me ₄ -Man	0.92	0.30	0	0	0	0	0	0	0
3,4,6-Me ₃ -Man	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2,4-Me ₂ -Man	0.78	0.75	0.28	0	0.31	0.15	1.13	1.09	0.97
2-Me ₁ -Man	0.42	0.22	0.70	0.90	0.63	0.70	0.44	0	Traces
3,4,6-Me ₃ -GlcNAc (Me)	1.43	2.10	2.62	2.00	1.78	1.89	0.29	0	Traces
3,6-Me ₂ -GlcNAc (Me)	1.33	1.26	1.36	1.85	2.15	1.31	2.42	3.28	2.37
6-Me-GlcNAc (Me)	0	0	0	0	0	0.37	1.43	0.88	1.63
3-Me-GlcNAc (Me) (b)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Me-GlcNAc (Me)	0	0	0	0	0	0	0	0.31	0

(a) IV-1 and IV-3 obtained in trace amounts were not methylated. The available quantities were used for 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy analysis.

(b) n.d. : not determined : the methylated derivative of this GlcNAc residue could not be quantified after methanolysis (17) due to the fact that under the applied conditions of methanolysis the linkage between GlcNAc-1 and the asparagine residue is not completely hydrolysed.

of 3,4,6-Me₃-Man and 2,4-Me₂-Man or 2-Me₁-Man as the only methylated derivatives of mannose led to the conclusion that all GP-N fractions possessed a biantennary type of branching. The presence of 2-Me₁-Man instead of 2,4-Me₂-Man in glycans I, II, III, IV and V in conjunction with that of permethylated GlcNAc indicated that an intersecting GlcNAc was present in these glycans. The presence of either 3-Me₁-GlcNAc(Me) or 6-Me₁-GlcNAc(Me) or both derivatives points to the substitution of these GlcNAc residues by Fuc in C-3 and C-6 position respectively, besides a substitution at C-4.

500-MHz ¹H-NMR spectroscopy

To arrive at a more definite evaluation of the heterogeneity that appeared to occur in the GP-N fractions from the data of sugar and methylation analyses (see Tables 1-3), high-resolution ¹H-NMR spectroscopy was applied. First, 500-MHz ¹H-NMR spectra of the main fractions I to VII were recorded, after dissolution of the material in ²H₂O, at 27°C. The spectrum of fraction V, as a typical example of the larger-size glycopeptides, is depicted in Fig. 2. This figure gives an impression of how structural heterogeneity manifests itself in an NMR spectrum. Fraction III, the spectrum of which is given in Fig. 3, is representative for the smaller-size glycopeptides. The NMR-spectra of most of the fractions I to VII, like Figs. 2 and 3, showed a number of signals in the structural-reporter-group regions, having non-integral intensity ratios, thereby clearly indicating the samples to be mixtures of two or more components (see also legend to Fig. 2) (19, 20). After Con A and LCA chromatography of the

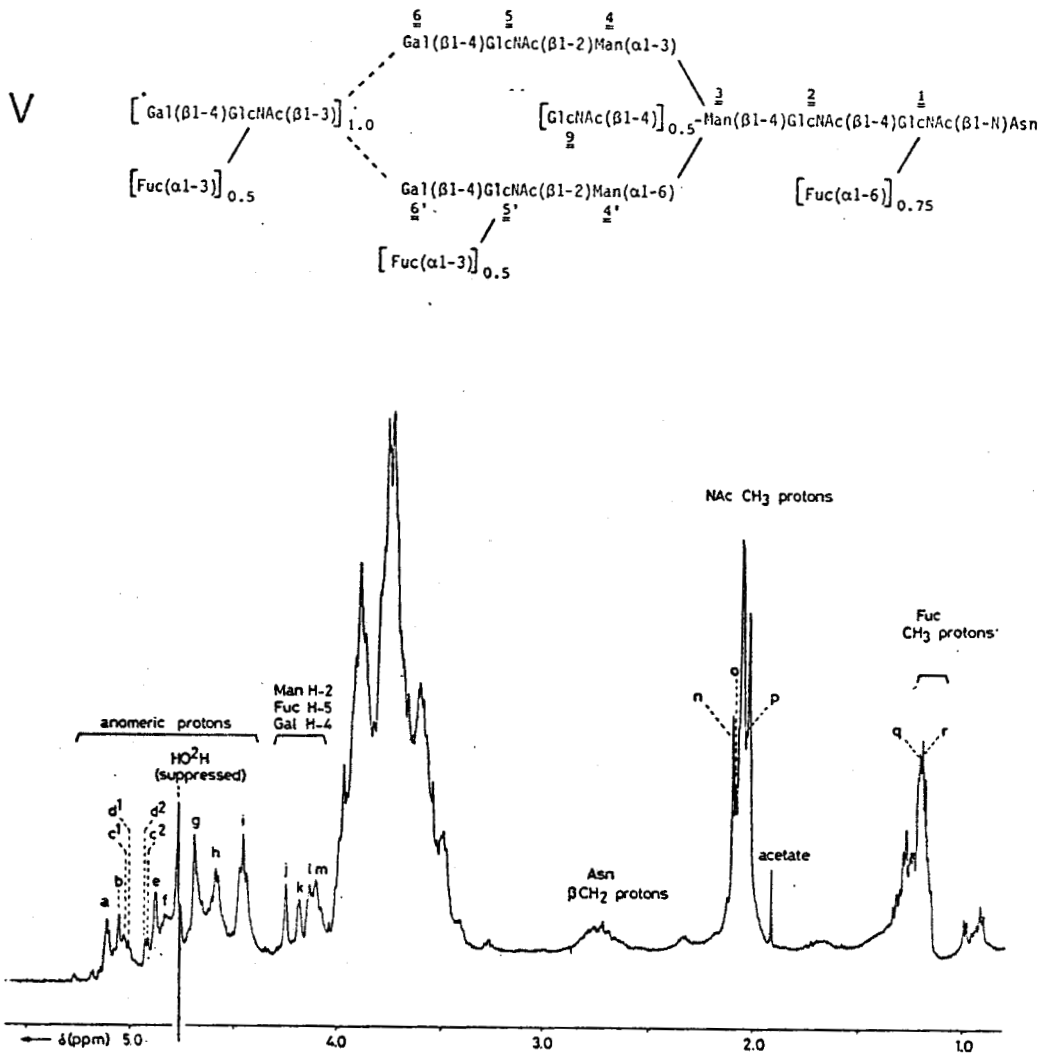


Fig. 2 : 500-MHz 1H -NMR spectrum of glycopeptide fraction V obtained from the neutral carbohydrate portion of sIgA, by Bio-Gel P-30 chromatography. Measuring conditions : 2H_2O ; 27°C ; $p^2H \approx 7$; suppressing of the HO²H signal by a WEFT pulse sequence ; spectral width 2600 Hz ; 16 K data points.

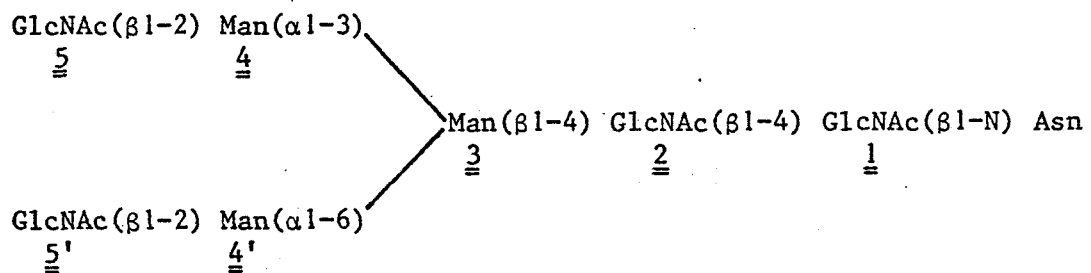
- a.. H-1 of Fuc($\alpha 1-3$) ; and H-1 of Man-4 (the latter only without GlcNAc-9 being present).
- b.. H-1 of Man-4 (with GlcNAc-9 present) and part of the H-1 doublet of GlcNAc-1.

- c¹. H-1 of Man-4' (with GlcNAc-9 and with Fuc(α 1-3) linked to GlcNAc-5').
- d¹. H-1 of Man-4' (with GlcNAc-9 but without Fuc(α 1-3) linked to GlcNAc-5'),
- c². H-1 of Man-4' (without GlcNAc-9 but with Fuc(α 1-3) linked to GlcNAc-5'),
- d². H-1 of Man-4' (without GlcNAc-9 and without Fuc(α 1-3) linked to GlcNAc-5').
- e. H-1 of Fuc(α 1-6) and H-1 of Man-4' (the latter only in absence of GlcNAc-9).
- f. H-5 of Fuc(α 1-3).
- g. H-1 of Man-3 (with GlcNAc-9 present) ; and, at the right wing, H-1 of GlcNAc(β 1-3), and H-1 of GlcNAc-2 (if Fuc(α 1-6) at GlcNAc-1).
- h. H-1 of GlcNAc-2 (without Fuc at GlcNAc-1), GlcNAc-5 and -5'.
- i. H-1 of Gal-6, -6' the additional Gal(β 1-4), and of GlcNAc-9.
- j. H-2 of Man-3 (without 9) and H-2 of Man-4 (with 9).
- k. H-2 of Man-4 (without 9) and H-2 of Man-3 (with 9).
- l. H-4 of Gal-6 and/or -6', bearing an additional N-acetyllactosamine in (β 1-3) linkage.
- m. H-2 of Man-4' and H-1 of Fuc(α 1-6).
- n. NAc of GlcNAc-2 in the presence of Fuc(α 1-6) at GlcNAc-1.
- o. NAc of GlcNAc-2 in the absence of Fuc(α 1-6) at GlcNAc-1.
- p. NAc of GlcNAc(β 1-3) in the presence of Fuc(α 1-3) at this residue.
- q. CH₃ of Fuc(α 1-6).
- r. CH₃ of Fuc(α 1-3).

The heterogeneity indicated in the overall structure on top of the spectrum, is illustrated by the multiplicity of several signals (for example, site A : n/o ; site B : c¹ + d¹ / c² + d²) or by typically affected signals (site E : l ; site F : p) (compare Table 4).

major fraction IV, the resulting subfractions, IV-1 to IV-5, were also investigated by 500-MHz ^1H -NMR spectroscopy. The spectrum of the most abundant namely IV-4, is depicted in Fig. 4. The spectra of these subfractions showed considerably less complex patterns, indicating that the extent of heterogeneity was less than that of total fraction IV.

Notwithstanding the difficulties that are encountered in the interpretation of an NMR spectrum of a complex mixture of components, primary structures could be deduced for the constituents of all GP-N fractions, including the sites of heterogeneity, by ^1H -NMR spectroscopy, utilizing the information available from (Tables 1-3) sugar and methylation analyses. In general, it could be concluded from the spectra of the various GP-N fractions, that their glycopeptide components (except the minor, oligomannoside-type constituents of I and II, see later) have in common the following heptasaccharide :



Several sites of heterogeneity in extensions of this structure were observed among the various fractions :

A. A variable amount of Fuc was present at GlcNAc-1 in ($\alpha 1-6$) linkage

IV-4

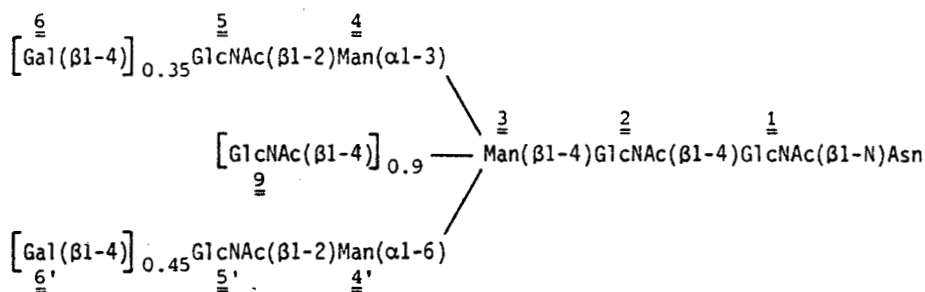


Fig. 4.: Structural-reporter-group regions of the resolution-enhanced 500-MHz ^1H -NMR spectrum of glycopeptide subfraction IV-4, obtained from sIgA GP-N fraction IV by lectin affinity chromatography (see Fig. 1). The spectrum was recorded under the conditions described in the legend to Fig. 2. The numbers in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The relative-intensity scale of the N-acetyl proton region deviates from that of the other part of the spectrum.

in the main fractions (indicated by mole fraction A, in which $0 \leq A \leq 1$).

B. The intersecting GlcNAc-9 residue, (β 1-4) linked to Man-3, was present in many but not in all structures forming part of the GP-N main fractions (that is : $0 \leq B \leq 1$).

Going from fraction I to VII, the molar amount of GlcNAc-9 gradually decreased, whereas the aforementioned common element was found to be more and more elongated at the GlcNAc-5 and/or -5' residues.

C. Some fractions were found to contain additionnal Gal-6 and/or -6' ; (β 1-4)-linked to GlcNAc-5 and -5', respectively ($0 \leq C \leq 1$).

D. Gal being present, an additional Fuc residue was encountered in some of the components, in particular of the larger-size fractions, in (α 1-3)-linkage to GlcNAc ($0 \leq D \leq 1$).

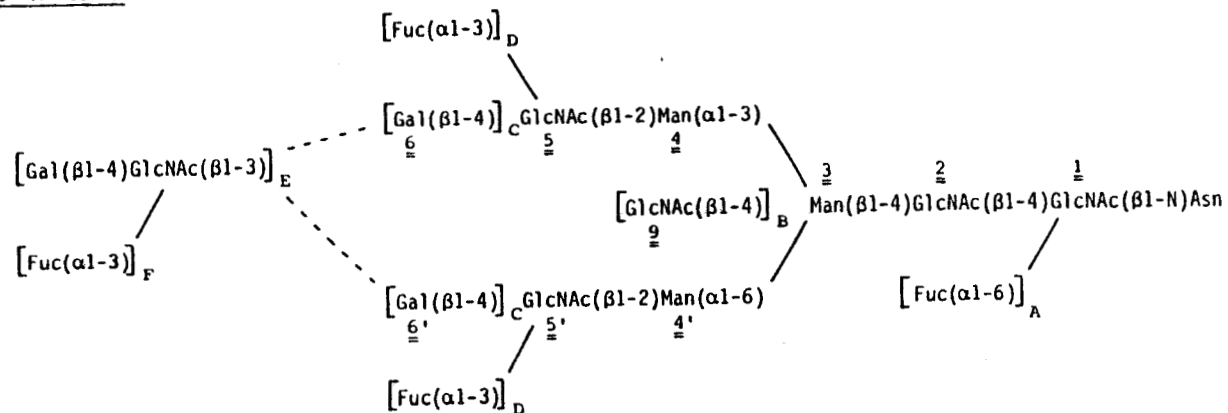
E. In fractions V to VII, part of the Gal-6 and/or Gal-6' residues bore an additional N-acetyllactosamine unit in (β 1-3)-linkage ($0 \leq E \leq 2$), which in turn might be extended (see F).

F. A Fuc residue was present in some cases in (α 1-3)-linkage to the GlcNAc residue of this unit ($0 \leq F \leq 1$).

The detailed structural elements listed above, and their designations are summarized in the heading of Table 4.

Employing 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, for each of the GP-N (sub)fractions, the sites of heterogeneity could be defined in terms of the mole fractions of the elements at the extreme values of their index. For index = 0, a certain element is considered to be present as a "fundamental" element ; for index = 1, it is denoted as an "extended" element. Discrimination between the pairs of each set could be achieved on the

Table 4. ¹H-NMR characteristics of the structural elements of the neutral carbohydrate moiety of human milk sIgA; heterogeneity has been found to occur at sites A to F



Site	Fundamental element	¹ H Chemical shift ^a ppm	Reporter group	¹ H Chemical shift ^a ppm	Extended element
A	$\begin{array}{c} \text{--(4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn} \\ \begin{array}{cc} \underline{2} & \underline{1} \end{array} \end{array}$	5.07 ^b	GlcNAc- $\underline{1}$ H-1	5.07 ^b	$\begin{array}{c} \text{--(4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn} \\ \begin{array}{cc} \underline{2} & \underline{1} \\ \text{Fuc(α1-6)} \end{array} \end{array}$
		2.01 ^b	GlcNAc- $\underline{1}$ NAc	2.01 ^b	
		4.610	GlcNAc- $\underline{2}$ H-1	4.68	
		2.080	GlcNAc- $\underline{2}$ NAc	2.093	
		-	Fuc(α1-6) H-1	4.87 ^b	
		-	Fuc(α1-6) H-5	4.12	
		-	Fuc(α1-6) CH ₃	1.20 ^b	
B	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} \underline{4} \\ \text{--(2)Man(α1-3)} \\ \text{Man(β1-4)GlcNAc} \dots \\ \underline{2} \end{array} \\ \begin{array}{c} \underline{4'} \\ \text{--(2)Man(α1-6)} \\ \text{Man(β1-4)GlcNAc} \dots \\ \underline{2} \end{array} \end{array}$	5.12	Man- $\underline{4}$ H-1	5.05	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} \underline{4} \\ \text{--(2)Man(α1-3)} \\ \text{GlcNAc(β1-4)-Man(β1-4)GlcNAc} \dots \\ \underline{2} \end{array} \\ \begin{array}{c} \underline{4'} \\ \text{--(2)Man(α1-6)} \\ \text{Man(β1-4)GlcNAc} \dots \\ \underline{2} \end{array} \end{array}$
		4.19	Man- $\underline{4}$ H-2	4.245	
		4.77	Man- $\underline{3}$ H-1	4.695	
		4.250	Man- $\underline{3}$ H-2	4.175	
		-	GlcNAc- $\underline{9}$ H-1	4.465	
		-	GlcNAc- $\underline{9}$ NAc	2.066	
		-	"triplet" ^c	3.27	
		4.920	Man- $\underline{4'}$ H-1	5.00	
4.11	Man- $\underline{4'}$ H-2	4.145			

C		4.552	GlcNAc- <u>5</u> H-1	4.582	
		2.058	GlcNAc- <u>5</u> NAc	2.052	
		-	Gal- <u>6</u> H-1	4.467	
		4.543	GlcNAc- <u>5'</u> H-1	4.582	
		2.049	GlcNAc- <u>5'</u> NAc	2.046	
-	Gal- <u>6'</u> H-1	4.472			
D		5.12	Man- <u>4</u> H-1 ^d	5.11	
		2.052	GlcNAc- <u>5</u> NAc	2.044	
		4.467	Gal- <u>6</u> H-1	4.445	
		-	Fuc(α1-3) H-1	5.11	
		-	Fuc(α1-3) H-5	4.83	
		-	Fuc(α1-3) CH ₃	1.17	
		4.922	Man- <u>4'</u> H-1 ^d	4.908	
		2.046	GlcNAc- <u>5'</u> NAc	2.038	
4.472	Gal- <u>6'</u> H-1	4.445			
E		4.47	Gal- <u>6</u> H-1	4.48 ^e	
		3.92	Gal- <u>6</u> H-4	4.15 ^e	
		-	GlcNAc(β1-3) H-1	4.72 ^e	
		-	GlcNAc(β1-3) NAc	2.039	
		-	Gal(β1-4) H-1	4.47 ^e	
F		4.48 ^e	Gal- <u>6</u> H-1	4.47 ^e	
		2.039	GlcNAc(β1-3) NAc	2.028	
		4.47 ^e	Gal(β1-4) H-1	4.445	
		-	Fuc(α1-3) H-1	5.11	
		-	Fuc(α1-3) H-5	4.83	
-	Fuc(α1-3) CH ₃	1.17			

^a Chemical shifts are mean values given in ppm downfield from DSS for neutral, ²H₂O solutions at 27°; all data were acquired at 500 MHz. Accuracy = 0.003 ppm. Standard deviation = 0.005 ppm.

^b Precise value depends mainly on the composition of the peptide moiety; heterogeneity of the latter is reflected in the multiplicity of this signal.

^c The emergence of a triplet-like signal at δ = 3.27 ppm out of the bulk signal of sugar skeleton is known to be associated with the occurrence of the intersecting GlcNAc-9. So far, this "triplet" has not been assigned to a particular proton, yet [22,23].

^d In case of an intersected diantennary structure, H-1 of Man-4 shifts upfield from δ = 5.05 ppm to δ = 5.03 ppm, whereas surprisingly, H-1 of Man-4' shifts downfield from δ = 5.00 ppm to δ = 5.02 ppm, upon fucosylation of GlcNAc-5 and -5', respectively.

^e Chemical shift values for reporter groups of additional N-acetylglucosamine units, and for those affected by their attachment, could not be determined more accurately (± 0.015 ppm), due to the complexity of the spectra of fractions V, VI, VII (see Fig. 2).



basis of the characteristic NMR features of sites A to F, which have been compiled in Table 4. They are largely in agreement with those mentioned for similar structural elements (19,20).

For the determination of the molar ratios of a fundamental and its corresponding extended structural element, mainly the intensity ratio of signals affected in chemical shift by this extension, is very useful. The relative intensities of the reporter groups of the extending residue(s) itself (themselves), might be of help, if separately observable. It should be noted that the effects of all extensions listed in Table 4 on the $^1\text{H-NMR}$ parameters of structural-reporter groups of neighbouring residues are independent from each other. This implies, that it can only be deduced from the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a given fraction, to which extent each of the elongations occurs, but not whether they occur together in one compound. Furthermore, it is worth mentioning that for reliable spectral integration only the non-disturbed spectra can be used (that is not the WEFT-spectra (21) and, most importantly, not the spectra resolution-enhanced by computer-techniques. A sufficient resolution in conjunction with comparable linewidth (resulting in similar distortions by the WEFT-technique and the Lorentzian-to-Gaussian transformation) made the following reporter groups most suited for determination of rough ($\pm 10\%$) centesimal proportions :

A. The amount of Fuc ($\alpha 1-6$)-linked to GlcNAc-1 relative to the unsubstituted GlcNAc-1 could be deduced unambiguously from the intensity ratio of the N-acetyl signals of GlcNAc-2 at δ 2.093 and δ 2.080, respectively. In most spectra, also the H-1 signals of GlcNAc-2 at

δ 4.68 and δ 4.61 were undisturbed. This is illustrated by signals n and o in Fig. 2, and also in Fig. 3.

B. The presence of GlcNAc-9 is expressed in a vast number of well-established (20) shift effects, in particular on the H-1 and H-2 signals of the Man residues 3, 4 and 4'. The ratio of the signals at δ 5.12 to δ 5.05 (that is, H-1 of Man-4) as well as that of the signals at δ 4.92 to δ 5.00 (H-1 of Man-4') turned and appears to be useful for estimation of the relative amount of GlcNAc-9 present in a mixture (see Fig. 2, signals (c+d) as compared to (c₂+d₂); and Fig. 4).

C. In structures that end in GlcNAc-5 and -5', the H-1 signals of their residues were observed separately (see for example Fig. 6), at δ 4.552 and δ 4.543 ppm, respectively. Also, the N-acetyl protons resonated clearly apart from each other, at δ 2.058 and δ 2.048, respectively. The assignment of these H-1 and N-acetyl signals to either GlcNAc-5 or -5' was based upon comparison with the spectral data of a hexa- and a heptasaccharide isolated from the urine of a patient with Sandhoff's disease (20), having structures similar to the aforementioned common element of GP-N glycopeptides and its extension with GlcNAc-9, but missing the GlcNAc(β 1-N) Asn moiety. In the spectra of the reducing oligosaccharides, only the high-field signals within each set were doubled in the anomeric intensity ratios (α : β = 2:1) and were therefore attributed to GlcNAc-5' (20).

This provided us with two useful criteria to determine the location of an extending Gal residue in a certain branch, in addition to the difference in chemical shifts between the H-3 signals of Gal-6 and -6' themselves (see Table 4) : the chemical shifts of the couple of

H-1 and N-acetyl signal which were not affected by the presence of a Gal residue, were decisive for the terminal GlcNAc residue to be 5 or 5'. Recognition of the reporter-group signals of these terminal residues was facilitated by their relatively sharp lines (see Figs. 3 and 4). It may be mentioned that, in the case that both branches are galactosylated, the H-1 atoms of GlcNAc-5 and -5' became equivalent, while the difference in chemical shifts of their N-acetyl signals remained.

The amount of localizable Gal present could be estimated in all spectra most readily from the ratio of the signals at δ 4.54 and δ 4.58. Fig. 3 gives an illustration of the difference in linewidth of both signals, induced by the attachment of Gal ; this difference in linewidth makes accurate integration of the spectrum impossible after computer resolution enhancement, because signals with different linewidths are treated differently in this procedure.

D. The effects of the attachment of a Fuc residue in (α 1-3)-linkage to GlcNAc of a peripheral N-acetylactosamine unit (see Table 4) were in accord with those described previously (19,20,24,25). Most indicative of the relative amount of this type of Fuc present at a certain GlcNAc residue, was the intensity ratio of the N-acetyl signals of the GlcNAc with and without attached Fuc, respectively. These signals were sufficiently separated ($\Delta\delta \approx 0.01$ ppm (24)) to be observed apart from each other, even without resolution enhancement. Independently, the intensity ratio of the α -Man H-1 signal affected by fucosylation of the neighbouring GlcNAc, and the corresponding α -Man H-1 signal of the unsubstituted branch

($\Delta\delta \approx 0.012$ ppm) (cf. (26)), was, in some of the spectra, a useful means of quantifying the amounts of (α 1-3)-linked Fuc (see, for example, Figs. 2 and 3).

- E. The larger-size glycopeptides comprising fractions V to VII contained one or more additional N-acetylglucosamine units in (β 1-3)-linkage to Gal-6 and/or -6'. The latter are characterised by a GlcNAc H-1 signal at $\delta \approx 4.70$, an N-acetyl signal at $\delta \approx 2.040$ and, most significantly, by the H-4 signal of the substituted Gal residue, emerged from the bulk of skeleton protons ($\delta \approx 3.92$) to $\delta 4.15$. These chemical shifts and shift effects are in complete agreement with those described for a similar extension of an N-acetylglucosamine unit, observed for glyco-asparagine isolated from the urine of patients with aspartyl-glucosaminuria (27). Unfortunately, none of the above mentioned signals provided a suitable criterion for localization of an additional N-acetylglucosamine unit on a certain branch. Moreover, quantification of the number of units present was not easy since in many spectra, the aforementioned signals could not be observed free from other resonances (see Fig. 2). The H-4 signal of Gal at $\delta 4.15$ is in most cases of some use for this purpose.
- F. The NMR features of the attachment of Fuc in (α 1-3)-linkage to GlcNAc forming part of such an additional N-acetylglucosamine unit, could be treated in the same way as described above for site D (see Table 4). The upfield shift, introduced by the Fuc attachment, upon the N-acetyl signal of the (β 1-3)-linked GlcNAc ($\Delta\delta \approx - 0.01$ ppm) results in a rather highfield position of the latter ($\delta \approx 2.026$)

which makes this signal clearly observable in most cases (see Fig. 2, signal p).

Using the decisive features mentioned above, the abundances of extended elements relative to their fundamental counterparts could be derived from the 500-MHz ^1H -NMR spectra of the various neutral glycopeptide fractions obtained from sIgA. However, it should be emphasized again that, since more than one type of heterogeneity was concerned in almost any spectrum, the procedure of arriving at the molar ratios was not as straight forward as might appear from the "rules" A-F, due to overlap of resonances necessary for integration (see Fig. 2).

The estimated compositions of the glycopeptide preparations, based on integration of the appropriated parts of the NMR spectra, have been compiled in Table 5.

The overall structures, resulting from a combination of the results of sugar analysis, methylation-mass spectrometry and NMR spectroscopy are listed in Figs. 5 and 6.

The following features of some fractions deserve special mention since they could not be incorporated in Figs. 5 and 6, nor in Tables 4 and 5.

In addition to the structure for fraction I included in Fig. 5, about 40 to 50 % of this fraction consisted of oligomannoside type glycopeptides varying in chain length from $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ to $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$. This was evident from the presence of a Man H-1 signal in the NMR spectrum at a position characteristic for this type of structure (e.g. at

Table 5. Relative abundance of fundamental and extended structural elements at heterogeneity sites A to F in the neutral glycopeptide fractions derived from human-milk sIgA

Glycopeptide (sub)fraction	Relative abundance ^a (%) of element at site ^b													
	A		B		C				D				E + F ^c	
	fund./ext.		fund./ext.		upper branch fund./ext.	lower branch fund./ext.	upper branch fund./ext.	lower branch fund./ext.	upper branch fund./ext.	lower branch fund./ext.	fund./ext.		fund./ext.	
I ^d	80	20	-	100	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-
II	70	30	-	100	100	-	85	15	-	-	-	100 ^e	-	-
III	70	30	-	100	100	-	80	20	-	-	50	50	-	-
IV	40	60	10	90	80	20	70	30	100	-	-	100	-	-
IV-1	100	-	-	100	-	100	100	-	100	-	-	-	-	-
IV-2	-	100	-	100	-	100	100	-	100	-	-	-	-	-
IV-3	100	-	-	100	-	100	100	-	100	-	-	-	-	-
IV-4	100	-	10	90	65	35	55	45	100	-	100	-	-	-
IV-5	-	100	-	100	75	25	65	35	100	-	10	90	-	-
V	25	75	50	50	-	100	-	100	95	5	50	50	50	50
VI ^f	30	70	95	5	-	100	-	100	90	10	50	50	n.d.	n.d. ^g
VII ^f	30	70	95	5	-	100	-	100	100	-	50	50	-	100

^a Relative abundances are based on NMR spectral integration (for signals that are decisive for each particular element, see text). Estimated accuracy is about 10%.

^b For designation of structural elements, see Table 4 (heading)

^c In the glycopeptides listed here, no additional N-acetylglucosamine units without Fuc linked to GlcNAc were found; therefore, they are considered together in this column.

^d Fraction I consisted of 50% oligomannoside-type glycopeptides, and 50% of the N-acetylglucosamine-type glycopeptides; only the latter are considered in this Table. This ratio of 50:50 is based on the intensity of the Man-3 H-2 signals for both types of compound at δ 4.23 and δ 4.17, respectively.

^e In column D, the percentage of extension of the Gal(β 1-4)GlcNAc units mentioned at column C is given; therefore, if only 15% of GlcNAc-5' is bearing a Gal but at the same time a Fuc residue, column D contains 100% proportion of extension.

^f Fraction VI and VII were found to be contaminated with structures containing the Le^b-bloodgroup determinant, that is a type-I structure, namely Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1- \cdot) (see text).

^g Exact numbers could not be determined, due to the presence of a frequently occurring nonprotein, noncarbohydrate contaminant giving rise to i.a. a quartet at 4:08 < δ < 4.12.

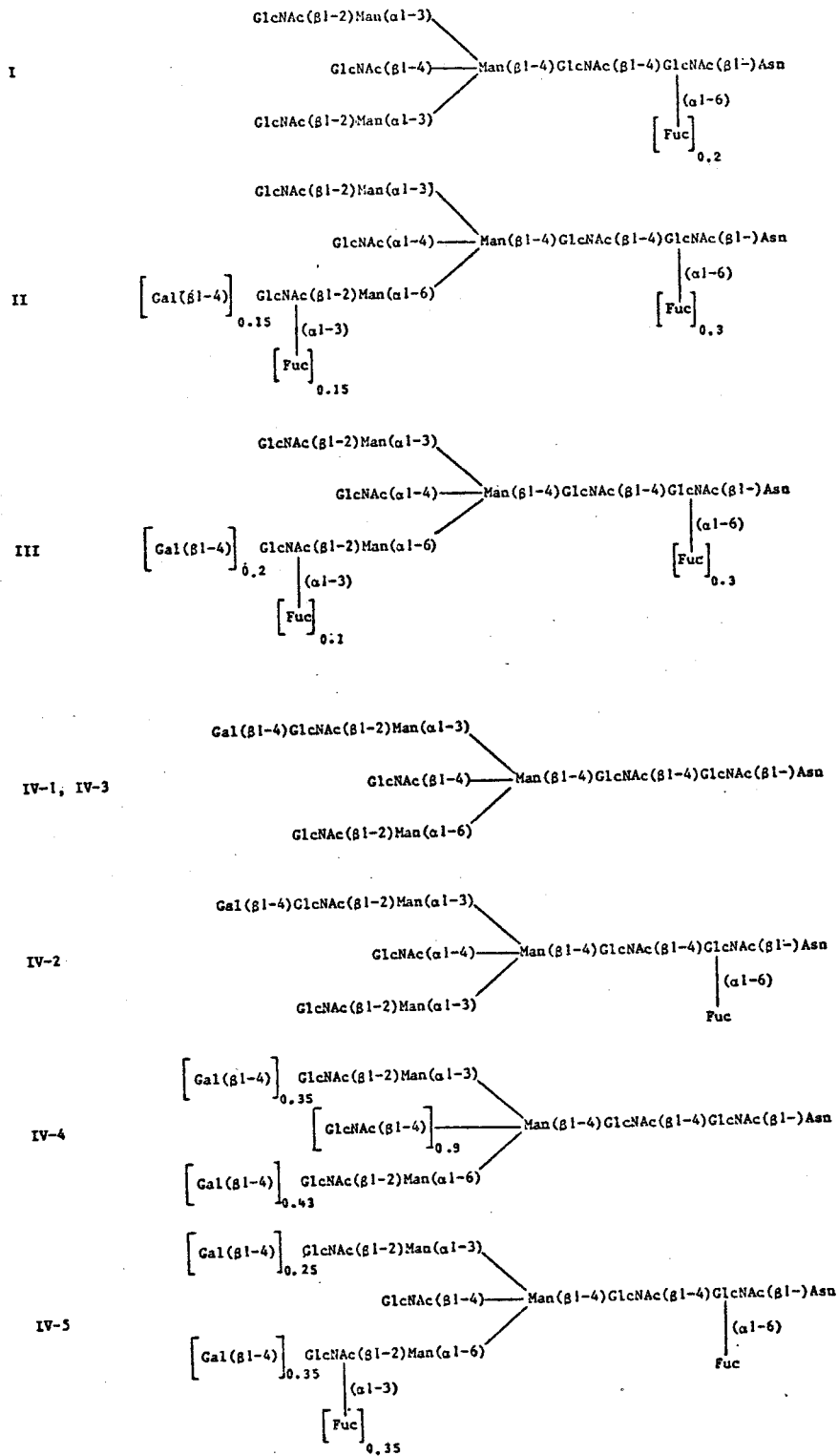


Fig. 5 : Structures of the N-acetylglucosamine type asialoglycopeptides from human milk sIgA. Values associated to brackets refer to the relative abundance of the structural motif (see Table 5).

δ 5.402, for H-1 of Man-A bearing Man-D₂; at δ 5.346, for Man-4 bearing Man-C and at δ 5.335 for Man-4 bearing the C-D, disaccharide unit ; at δ 5.303 for Man-C, substituted by Man-D and δ 5.142 for Man-B, bearing Man-D₃) (20). This observation was in line with the results from methylation analysis, showing the presence of permethylated (2,3,4,6-Me₄ Man) mannose (Table 3) in glycopeptide fraction I. The latter pointed to the occurrence of terminal Man residues. Treatment of this fraction with endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase D followed by thin-layer chromatography showed that about 40 % of the material was hydrolyzed. The fractionation of glycopeptide I on a Con A-Sepharose column (under the same conditions as described above) also confirmed the NMR results. Three peaks were obtained. The first was eluted with the starting buffer and contained Fuc ; Gal ; Man and GlcNAc in the molar ratios : 0.3 ; 0.5 ; 3 ; 5 respectively. The amount of the second peak eluted with 0.01 M methyl- α -D-glucopyranoside was too small to allow sugar analysis. The third peak eluted with 0.3 M methyl- α -D-glucopyranoside contained 6 to 8 Man for 2 GlcNAc residues.

As for glycopeptide fraction IV-5, it may be mentioned that the absence of a 4,6-Me₂-GlcNAc derivative in the methylation analysis (Table 3) led independently to the conclusion that glycopeptide IV-5 possessed a second Fuc residue in the same branch as where Gal was located.

The presence of one 2,4,6-Me₃-Gal residue after permethylation of glycopeptide V and of two for glycopeptides VI and VII (see Table 3) demonstrated that 1 and 2 supplementary units of N-acetyllactosamine respectively would be substituting the Gal residues 6 and/or 6' at the C-3 position. This is supported by the results of quantification by NMR (Table 5).

Mass spectrometry led to the detection of a small amount of 3,4,6-Me₃-Gal in the methylation analysis of glycopeptides VI and VII showing that structures containing a C-2-substituted Gal residue were present in each of the mixtures in relative amounts of ~ 10 %.

The 500-MHz ¹H-NMR spectra of fractions VI and VII revealed low-intensity H-1 signals at δ 5.189 and at δ 5.151, which are known to be characteristic for Fuc in the structural moiety Fuc(α1-2) Gal(β1-3) GlcNAc(β1-3) with and without an additional Fuc(α1-4) linked to GlcNAc (the latter was characterized by its H-1 signal at δ 5.032). The corresponding Fuc(α1-2) H-5 signal was found at δ 4.29, whereas Fuc CH₃ doublets were observed at δ 1.28, 1.26 and 1.24. These values showed close resemblance to those observed for milk oligosaccharides containing the blood group H (type I), and the Lewis^b blood group determinants, respectively (unpublished results) : Fraction VI indeed contained Lewis^b activity. Haemagglutination was obtained with about 80 μg of fraction VI confirming the presence of a Fuc(α1-2)Gal(β1-3) [Fuc (α1-4)] GlcNAc-R component.

DISCUSSION

Whilst being less abundant than the sialoglycopeptides in human milk sIgA, the asialoglycopeptide fraction is far more heterogeneous. Nevertheless, this heterogeneity could be fairly well characterized in terms of primary structures by applying a combination of sugar analysis high-resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, and permethylation analysis on glycopeptide fractions separated according to their size and, partly, according to their binding affinity for some lectins (see Figs. 5 and 6).

Regarding the applied fractionation procedures, it may be concluded that it was possible to separate structures differing by two or more monosaccharide units adequately by Bio-Gel P-30 gel filtration. However, structures that differed by just one additional monosaccharide, and structural isomers, could not be resolved. The Lens culinaris lectin again proved (7,8,28) to be extremely specific for Fuc(α 1-6)-linked to GlcNAc-1, as can be concluded from Tables 2 and 5 (column A). The separation on Con A was less simple. For instance, fractions IV-1 and IV-3 were separated on Con A but had identical glycan structures (Fig. 5). The separation was probably due to differences in their attached peptide chain since hydrophobic amino acid residues have been shown to interfere with Con A fractionation (29). It is also interesting to note that not only GlcNAc-8 but also the presence of Gal-6 or 6' apparently influences the Con A binding affinity of the glycopeptides, giving rise to separation on the basis of the location of the Gal residue (see Fig. 5).

Most of the fractions analyzed were heterogeneous as was apparent from non-integral ratios in sugar analysis methylation as well as intensities of reporter-group-signals in the NMR spectra- high resolution ^1H -NMR spectroscopy has proved to be capable of elucidating primary structures even in complex mixtures. Besides the usual parameters, namely chemical shifts, coupling constants and line-widths, differing position and pattern of structural-reporter group signals, their relative-intensity appeared to be invaluable for mixture analysis. The latter parameter could be successfully translated into the quantitative characterization of structural elements, occurring at the sites of heterogeneity.

Oligomannoside structures that are present in very small quantities in fraction I as shown by NMR spectroscopy, methylation analysis, the action of endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase and Con A-Sepharose chromatography, are ascribed to the contamination of the sIgA preparation by a small amount of sIgM (6 mg of sIgM for 1 g of sIgA). IgM contains 11 % of total sugars and about 40 % of its glycan structures are of the oligomannosidic type (30).

In glycopeptide fractions VI and VII a more complex contaminating structure was found (about 20 % of fraction VI) possessing numerous additional fucose residues substituting one galactose residue at C-2 and one N-acetylglucosamine at C-3. The structure $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3) [\text{Fuc}(\alpha 1-4)]\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal-R}$ is part of one of the free milk oligosaccharides (31, 32) and should in this case be terminated by one glucose residue. However, the presence of glucose was never demonstrated, whether by methanolysis, methylation after reduction of fraction VI or by NMR. The labelling of this fraction and its subsequent chromatography on lectins having differing specificities for fu-

cose may give an answer as to the origin of this molecule. It is either an integral part of sIgA or a contaminant. In the latter case it would have to be considered that it absorbed only onto the neutral glycopeptide fraction. Sialylated free oligosaccharides exist in human milk but were not found contaminating the acid glycopeptides of sIgA (6).

Both biantennary N-acetyllactosamine-type and extended biantennary N-acetyllactosamine type structures extended by additional fucosyl N-acetyllactosamine residues were present in the GP-N fraction. Most of the former possessed an intersecting N-acetylglucosamine residue whereas it is striking that the extended-type structures were practically devoid of this additional N-acetylglucosamine. The intersecting N-acetylglucosamine residue does not figure in the free secretory piece (5) but is present on the α_1 chains of serum IgA (3) and thus would seem to be specific for the α chains. In addition, we have demonstrated that the neutral glycopeptide fraction is not derived from the acid fraction by the loss of sialic acid during the purification procedure as no sialoglycopeptides were found possessing the intersecting N-acetylglucosamine residue (6).

The extended biantennary N-acetyllactosamine type structures described here were not found in the sialoglycopeptide fraction of human milk sIgA (6), nor in the N-glycosidic glycan fractions of serum IgA (3) but were, on the contrary, demonstrated in the glycan fraction of the free secretory piece isolated from human milk (5). This suggests that they are only present on the secretory piece bound to the IgA dimers in human milk.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) (Laboratoire Associé n° 217. Relations structure-fonction des constituants membranaires), and by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) with financial aid from the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (ZWO) and by Grant UUKC-OC 79-13 from the Netherlands Foundation for Cancer Research (KWF). A.P. received a grant from the Fondation Nationale pour la Recherche Médicale. The authors are obliged to Mme L. MANNESSIEZ and the C.R.T.S. (Centre Régional de Transfusion Sanguine) for blood group activity analysis, and to B. FOURNET and J. PAZ PARENTE for his advice given for the micromethylation analysis. They wish to thank O. KOL for the endo- β -N-acetylglucosaminidase hydrolysis. The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of Y. LEROY (C.N.R.S. technician), G. RICART with mass spectrometry and J.P. DECOTTIGNIES with the sIgA preparation.

REFERENCES

- 1 - PIERCE-CRETEL, A., PAMBLANCO, M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1981) Eur. J. Biochem. 114, 169-178.
- 2 - CRETEL, A., PAMBLANCO, M., EGGE, H., STRECKER, G., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1979) in Proc. 5th Int. Symp. Kiel (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M.F., Vliegenthart, J.F.G. & Wiegandt, H., eds) pp 26-27, Georg Thieme, Stuttgart.
- 3 - BAENZIGER, J. & KORNFELD, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7270-7281.
- 4 - BAENZIGER, J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4063-4071.
- 5 - MIZOGUCHI, A., MIZUOCHI, T. & KOBATA, A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9612-9621.
- 6 - PIERCE-CRETEL, A., PAMBLANCO, M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. & SPIK, G., DORLAND, L., van HALBEEK, H. & VLIEGENTHART, J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem., 125, 383-388.
- 7 - DEBRAY, H. & MONTREUIL, J. (1981) in Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry (T.C. Bøg-Hansen, ed.) Vol. 1, pp 221-230.
- 8 - DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. & MONTREUIL, J. (1981) Eur. J. Biochem., 117, 41-55.
- 9 - TOYOSHIMA, S., OSAWA, T. & TONOMURA, A. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221, 514-521.

- 10 - MARCH, S.C., PARIKH, I. & CUATRECASAS, P. (1974) Anal. Biochem. 60, 149-152.
- 11 - DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956) Anal. Biochem. 28, 350-356.
- 12 - KOIDE, N. & MURAMATSU, T. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 411-416.
- 13 - TAI, T., YAMASHITA, K., OGATA-ARAKAWA, M., KOIDE, N., MURAMATSU, T., IWASHITA, S., INOUE, Y. & KOBATA, A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8569-8575.
- 14 - ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C. & VINCENDON, G. (1972) J. Chromatogr. 69, 291-304.
- 15 - FINNE, J., KRUSIUS, T. & RAUVALA, H. (1980) Carb. Research 80, 336-339.
- 16 - PAZ PARENTE, J., LEROY, Y., MONTREUIL, J. & FOURNET, B. (1982) Anal. Biochem. (in press).
- 17 - FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. & MONTREUIL, J. (1981) Anal. Biochem. 116, 489-502.
- 18 - BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J. & SPIK, G. (1980) Biochimie, 62, 43-49.
- 19 - VLIEGENTHART, J.F.G., Van HALBEEK, H. & DORLAND, L. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 45-77.
- 20 - VLIEGENTHART, J.F.G., DORLAND, L. & Van HALBEEK, H. (1983) Adv. Carb. Chem. Biochem. 41, 209-374.

- 21 - Van HALBEEK, H. Vliegenthart, J.F.G., Winterwerp, H., Blanker, W.M. & van den Eijnden, D.H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 124-131.
- 22 - Carver, J.P., Grey, A.A., Winnik, F.M., Hakimi, J., Ceccarini, C. & Atkinson, P.H. (1981) *Biochemistry* 20, 6600-6606.
- 23 - Bruch, R.C. & Whitte III, H.B. (1982) *Biochemistry* 21, 5334-5341.
- 24 - Van HALBEEK, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Montreuil, J., Fournet, B. & Schmid, K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5588-5590.
- 25 - Endo, M., Suzuki, K., Schmid, K., Fournet, B., Karamanos, Y., Montreuil, J., Dorland, L., Van HALBEEK, H. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8755-8760.
- 26 - Spik, G., Streckler, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van HALBEEK, H. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419.
- 27 - Michalski, J.C., Montreuil, J., Streckler, G., Van HALBEEK, H., Dorland, L. & Vliegenthart, J.F.G. (Unpublished results cited in Ref. 20).
- 28 - Kornfeld, K., Reitman, M.L. & Kornfeld, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6633-6640.
- 29 - Loontjens, F.G., Van Wauwe, J.P., De Gussem, R. & De Bruyne, C.K. (1973) *Carbohydr. Res.* 30, 51-62.
- 30 - Chapman, A. & Kornfeld, R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 816-823.
- 31 - Kobata, A., Yamashita, K. & Tachibana, Y. (1978) in "Methods in Enzymology" (Ginsburg V. ed.) Vol L, part C, pp 216-220, Academic Press, New York.
- 32 - Smith, D.F., Zopf, D.A. & Ginsburg, V. (1978) in "Methods in Enzymology" (Ginsburg V. ed.) Vol L, part C, pp 221-226, Academic Press, New York.

La fraction asialoglycopeptidique totale est la plus complexe et la plus hétérogène des fractions. Le fractionnement sur Bio-Gel P-30 suivie de la chromatographie sur colonne d'affinité a permis de fractionner les glycopeptides selon leur masse.

La purification de la fraction asialoglycopeptidique des IgA de sécrétion du lait humain par chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavoline A-Sepharose a permis de fractionner les glycopeptides selon le nombre et la position des résidus de galactose et de préciser la spécificité de cette lectine. En effet pour de nombreuses lectines et en particulier pour la Con A la structure de base qui interagit avec les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique est bien définie (OGATA *et al.*, 1975 ; DEBRAY et MONTREUIL, 1981). Cependant, l'interaction des structures biantennées des sIgA possédant une N-acétylglucosamine intercalaire substituant l' α -mannose avec la Con A conduit à l'obtention de fractions soit retardées soit faiblement retenues (Tableau XVII ; p. 248). La condition requise à cette séparation semble être la présence d'une séquence GlcNAc(β 1-2)Man non masquée. De plus, il semble au vu des résultats concernant la structure primaire des asialoglycopeptides des sIgA que la position du galactose interfère avec l'affinité. Les fractions retardées Con A possèdent leur résidu de galactose sur la branche supérieure. Le comportement chromatographique de la fraction éluée Con A est plus difficilement compréhensible. En effet, les fractions IV-4 et IV-5 hétérogènes du point de vue du nombre de résidus de galactose peuvent être analysées comme étant le mélange de résidus de glycopeptides différents ayant le galactose positionné soit sur la branche (α 1-6) soit absent et dans ce cas le comportement chromatographique de ces modèles est compatible avec les données de la littérature : structure (6) (DEBRAY *et al.*, 1983) ou avec l'hypothèse émise par H. DEBRAY (1981) sur l'interaction différente du chaînon non substitué GlcNAc(β 1-2)Man avec la Con A selon la position de ce chaînon dans le glycanne. Par contre, l'existence de deux résidus de galactose sur les glycanes IV-4 et IV-5 n'est pas compatible avec leur comportement chromogra-

TABLEAU XVII

INTERACTION DES GLYCOPEPTIDES ET DES GLYCANNES POSSEDANT UNE N-ACETYL-GLUCOSAMINE SUPPLEMENTAIRE SUR COLONNE DE CON A ET LCA IMMOBILISEES.

	Structures	Con A	LCA
(1) IV-1,3		FR	FNR
(2) IV-2		FR	FE
(3) IV-4		FE	FNR
(4) IV-5		FE	FE
(5)		FNR	FNR
(6)		FE	FNR

FR = fraction retardée
 FNR = fraction non retenue
 FE = fraction élue

△ GlcNAc
 ■ Man
 ▲ Fuc

□ Gal
 ▲ Fuc



phique sur Con A puisque ces glycannes auraient dû être non retenus (glycanne (5) DEBRAY *et al.*, 1983). Le fucose (α 1-3) n'interfère pas avec l'affinité des glycopeptides sur Con A puisque les structures (3) et (4) sont toutes deux éluées Con A. Le comportement des glycopeptides sur *Lens culinaris*-Sepharose est en parfait accord avec les résultats obtenus par DEBRAY *et al.*, 1981 ; DEBRAY et MONTREUIL, 1981.

Deux sortes de structures sont rencontrées lors de ce fractionnement. Elles sont de type :

- biantenné poly N-acétyllactosaminique avec 1 à 2 résidus de fucosyl-N-acétyllactosamine supplémentaires

- biantenné N-acétyllactosaminique dont plus de 70 % d'entre elles possèdent un résidu de N-acétylglucosamine supplémentaire substituant le β -mannose. La plupart de ces structures ne possède qu'un seul résidu de galactose localisé tantôt sur la branche inférieure, tantôt sur la branche supérieure. Des structures sans galactose sont présentes conduisant à des glycannes n'ayant que de la N-acétylglucosamine en position terminale non-réductrice. Des structures à activité de groupe sanguin Lewis^b de masse moléculaire élevée sont également mises en évidence. Les techniques employées basées sur la recherche d'un résidu de glucose en position terminale réductrice n'ont pu dire s'il s'agissait de structures faisant partie intégrante de la molécule des sIgA ou de contaminants oligosaccharidiques libres provenant du lait de Femme. De plus, la présence de structures oligosaccharidiques sialylées du lait humain n'a jamais été mise en évidence dans la fraction sialoglycopeptidique des sIgA. En résumé, la fraction neutre des sIgA diffère de la fraction acide par l'existence de structures à "N-acétylglucosamine intercalaire" et de structures poly-N-acétyllactosaminiques, et ne peut donc dériver de celle-ci par perte des résidus d'acide N-acétylneuraminique lors des fractionnements.

C - CONCLUSIONS

Les travaux de BAENZIGER et KORNFELD (1974a, b), BAENZIGER (1979) et MIZOGUCHI *et al.* (1982) concernant les structures glycaniques des chaînes α_1 d'IgA sériques myélomateuses, des chaînes de jonction et de sécrétion ainsi que nos résultats sur la chaîne glycanique des sIgA nous permettent de conclure que :

- Les structures biantennées poly N-acétyllactosaminiques semblent provenir de la pièce de sécrétion. Il est à noter cependant qu'aucune structure sialylée de ce type n'est présente dans la fraction sialoglycopeptidique des sIgA alors qu'elle existe dans la pièce de sécrétion libre (MIZOGUCHI *et al.*, 1982). Ce fait semble signaler qu'il peut y avoir des différences structurales importantes notamment au niveau de la sialylation, de la pièce de sécrétion quand elle existe sous forme libre ou conjuguée.

- Les structures N-acétyllactosaminiques neutres possédant un résidu de N-acétyl glucosamine intercalaire seraient localisées plus particulièrement sur les chaînes lourdes. En effet l'existence de ce cinquième résidu de N-acétylglucosamine substituant le β -mannose a été décrit pour les IgA₁ myélomateuses humaines (BAENZIGER et KORNFELD, 1974b) et pour les IgG humaines (KORNFELD *et al.*, 1971).

- Les structures sialylées des sIgA montrent de grandes homologies de structure avec le glycanne localisé sur la chaîne de jonction (BAENZIGER, 1979). La différence majeure consiste en l'absence de résidu de fucose dans le glycanne de la chaîne J. Ces structures sialylées sont également rencontrées dans les chaînes α (BAENZIGER et KORNFELD, 1974b) et dans la pièce de sécrétion libre (MIZOGUCHI *et al.*, 1982). Il semble donc qu'à une chaîne polypeptidique donnée il corresponde une structure glycanne différente qui pourra servir de "marqueur" soit d'une biosynthèse particulière soit d'une fonction particulière (Fig. 43 ; p. 251).

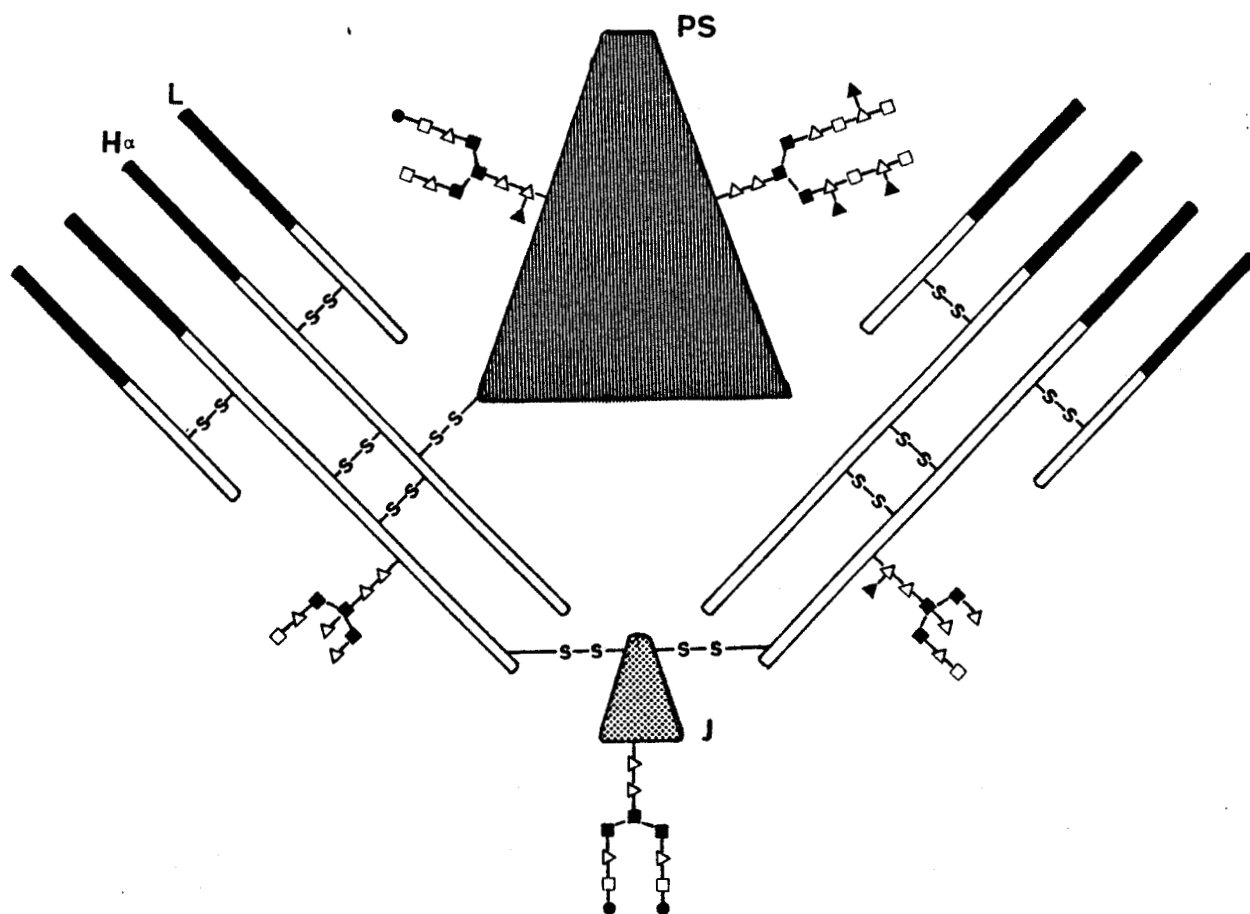


Figure 43 : Localisation hypothétique des différents glycanes obtenus sur les différentes chaînes de la molécule d'IgA sécrétoires.

- Man
- △ GlcNAc
- Gal
- ▲ Fuc
- NeuAc



Si la signification biologique de la spécificité de structure des glycanes des sIgA du lait humain reste encore à être établie, il est cependant intéressant de noter que les glycanes liés N-glycosidiquement aux sIgA du lait humain avec les N-glycanes des autres immunoglobulines sériques humaines : IgM (HICKMAN *et al.*, 1972) ; IgE (BAENZIGER *et al.*, 1974b), IgG (KORNFELD *et al.*, 1971) et IgA (BAENZIGER et KORNFELD, 1974) ou bovine : IgG (ITO *et al.*, 1975 ; TAI *et al.*, 1975 ; CHERON *et al.*, 1976) gardent une unité de structure relative ainsi qu'une position bien définie sur leurs chaînes lourdes respectives (Fig. 18 ; p. 84). Le fait que la position et la spécificité de structure des glycanes soient gardées, renforce l'idée d'une fonction particulière et importante des glycanes des immunoglobulines.

IV - RECHERCHES PRÉLIMINAIRES SUR LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES
D'ACTION DES GLYCANNES DANS LA PROTECTION INTESTINALE
LORS DE L'INFECTION PAR LES SHIGELLES

Les Shigelles sont des agents infectieux responsables chez l'Homme, le Singe Rhésus (MÜLDER, 1971) et chez le Cobaye (FORMAL *et al.*, 1958) de deux types de syndromes : la diarrhée liquide et la dysenterie, selon que leur action pathogène s'exerce au niveau du petit intestin ou du colon. Elles sont connues pour sécréter une enterotoxine qui possède une activité cytotoxique (GEMSKI *et al.*, 1972 ; KEUSCH et JACEWICZ, 1977). Une des clés de la pathogénicité de *S. flexneri* qui a lieu plusieurs heures après l'infection, est la pénétration de la bactérie dans les cellules mucosales du colon (GEMSKI *et al.*, 1972).

La souche de *S. flexneri* non piliée adhère avidement aux cellules coloniques et notamment à celles de Cobaye, principalement dans les sections transversales et descendantes du colon (MIRELMAN *et al.*, 1983).

L'adhérence des bactéries aux cellules des Mammifères est la première condition requise à la colonisation des tissus et à l'infection systémique (cf. p. 15). Cette adhérence est la plupart du temps due à des adhésines ayant des propriétés de lectines (SHARON *et al.*, 1981). Par exemple, l'adhérence de plusieurs souches d' *E. coli* d'origine humaine ainsi que celle de nombreuses enterobactéries se fait par l'intermédiaire d'une lectine présente dans les appendices bactériens (fibrilles, flagelles, *pili*) spécifique du mannose et des composés contenant du mannose (cf. p. 15).

En contraste, l'attachement d'une bactérie non-piliée *S. flexneri* aux cellules épithéliales coloniques de Cobaye se fait

par l'intermédiaire d'une lectine présente dans la muqueuse intestinale et apparemment associée avec le mucus colonique. Cette adhérence à la cellule épithéliale colonique (IZHAR *et al.*, 1982) ou l'agglutination au mucus (MIRELMAN *et al.*, 1983) peut également être inhibée par des monosaccharides et l'inhibiteur le plus efficace s'est trouvé être le fucose (8 mM). D'autres monosaccharides sont également inhibiteurs de l'agglutination : le glucose (13 mM) et le mannose (18 mM) (MIRELMAN *et al.*, 1983).

Lors d'un stage chez le Prof. D. MIRELMAN (Rehovot, Israël) afin de mieux définir la spécificité de la lectine étudiée, nous avons essayé d'inhiber l'agglutination de *S. flexneri* 1b au mucus colonique de Cobaye par des fucosylglycopeptides, provenant soit des sIgA soit d'autres protéines lactées, par des fucosyloligosaccharides du lait humain, ainsi que des oligosaccharides contenant du glucose ou du mannose.

A - MATERIELS ET METHODES

1 - Les bactéries :

a - Croissance des bactéries :

Une souche de *Shigella flexneri* 1b est isolée de patients du Centre Médical de Shéba (Hôpital de Tel Hashomer, Israël).

Les souches de *S. flexneri* sont habituellement cultivées sur un milieu Luria broth (tryptone 10 g ; extrait de levure 5 g ; NaCl 5 g pour 1 litre) complétement en calcium (1 mM) et en glucose (11 mM). Les bactéries sont ensuite stockées à -70°C (HALE et BONVENTRE, 1979).

b - Fixation des bactéries au glutaraldehyde :

Les bactéries sont inoculées sur milieu Luria broth (15 ml) dans les conditions décrites précédemment et cultivées une nuit à 37°C. Elles sont ensuite centrifugées et lavées avec une solution de NaCl (0,154 M) pour éliminer le bouillon de culture. Les bactéries sont ensuite mises en contact 10 min en présence de glutaraldehyde 0,25 % dans la solution de NaCl, centrifugées puis lavées une première fois dans une solution saline (NaCl 0,154 M) contenant du glycocole 0,1 M puis dans la solution saline seule. Les centrifugations sont effectuées à 30°C pendant 10 min, à 9000 g. Les bactéries (10^9 b/ml) sont conservées dans la solution saline à 4°C.

2 - L'agglutinine :

a - Préparation des cellules coloniques de Cobaye :

Les Cobayes Dunkin-Hartley (300 g) sont sacrifiés par dislocation cervicale, et le colon transverse et descendant est récupéré puis lavé par une solution de NaCl (0,154 M) préchauffée à 37°C et contenant du dithiothreitol 1 mM. Les cellules épithéliales intestinales sont récupérées par le procédé de WEISER (1973). Le colon ligaturé à l'une de ses extrémités est rempli avec du tampon phosphate 50 mM - citrate de sodium 27 mM pH 7,5 et incubé 15 min à 37°C. La solution est éliminée et l'intestin est rempli à nouveau d'une solution préchauffée de PBS pH 7,2 contenant de l'EDTA 1,5 mM (acide éthylène diamino tétraacétique) et du DTT 0,5 mM (dithiothreitol) et incubé 30 min à 37°C. La solution contenant les cellules coloniques est récupérée avec précaution et la manipulation précédente incluant l'incubation est répétée. Les solutions de cellules épithéliales sont combinées et les cellules sont sédimentées à 500 g 10 min resuspendues et lavées par du PBS contenant de l'EDTA (1,5 mM). Après le lavage les cellules sont resuspendues dans de l'acide 2 ([n-morpholino] ethane) sulfonique 20 mM contenant du NaCl (140 mM) et du CaCl_2 (1 mM) pH 6,2 (tampon Mes Ca).

b - Préparation de l'agglutine soluble de Cobaye :

Les cellules coloniques ($4 \cdot 10^6$ cellules/ml) collectées sont incubées 45 min à 37°C dans 10 ml de tampon Mes Ca pH 6,2. Après incubation les cellules épithéliales sont sédimentées (500 g ; 5 min) et le surnageant collecté. Les cellules sont resuspendues et une seconde incubation est réalisée dans les mêmes conditions. Les surnageants sont ajoutés et à nouveau centrifugés (100.000 g ; 60 min). Le surnageant devenu clair est extrait avec de l'éther de pétrole (1 : 1 ; v/v) et la phase aqueuse gardée. La quantité de protéines excrétées par les cellules épithéliales ($4 \cdot 10^6$) est de 0,75 mg. Cette solution contient l'activité agglutinante.

3 - Les oligosaccharides et les glycopeptides :

Les structures des glycanes utilisés pour cette étude sont données dans les Tableaux XVIII, XIX et XX ; p. 260, 262 et 264.

a - Matériel^{*} :

Le composé A est isolé de la fraction N-glycopeptidique acide des sIgA du lait humain (article n° 3 p. 197). Les glycopeptides B et C proviennent de l'asialolactotransferrine humaine (SPIK *et al.*, 1982b), D de la sérotransferrine humaine (SPIK *et al.*, 1975) et S de la lactotransferrine bovine (van HALBEEK *et al.*, 1981). Le glycopeptide E est obtenu lors de la dégalactosylation enzymatique du composé B (voir ci-dessous). Le glycanne F est isolé de l'urine de patients atteints de gangliosidoses à GM 1 (WOLFE *et al.*, 1975) et l'oligosaccharide G de l'urine de patients atteints de fucosidoses (STRECKER *et al.*, 1978). Les oligosaccharides H et J à M proviennent du lait humain (KUHN et BAER, 1956 ; KUHN *et al.*, 1958 ; KUHN *et al.*, 1956 ; BJORNDAL et LUNDBLAD, 1970 ; GRIMMONPREZ et MONTREUIL, 1968). Le glycanne I est préparé par dégalactosylation enzymatique de H. Le disaccharide H provient du méconium humain (HERLANT-

* Nous remercions les Pr G. SPIK et P. SINAÏ ainsi que les Dr G. STRECKER et J.C. MICHALSKI pour le don de glycopeptides et d'oligosaccharides

PEERS *et al.*, 1981), l'oligosaccharide O est synthétisé par le Prof. P. SINAI (Orléans, France). Les composés P (NORDEN *et al.*, 1973) et Q et R (NORDEN *et al.*, 1974) sont isolés de patients atteints de mannosidose.

b - Dégalactosylation :

La dégalactosylation* est réalisée en présence de β -D-galactosidase (EC 3.2.1.23) de Jack Bean (LI et LI, 1970). Le glycanne (5 mg) est dissous dans 0,3 ml de tampon phosphate de sodium (0,2 M) - acide citrique (0,1 M) pH 3,5 et 0,3 ml d'enzyme (1,1 U ; $30 \cdot 10^{-6}$ g de protéine) sont ajoutés. Après incubation à 37°C pendant 48 h pour le composé H et 16 h pour le composé B. Les produits de la réaction sont séparés par chromatographie sur une colonne de Bio-Gel P-2 (1,2 x 108 cm) avec un débit de 3 ml/h pour H et sur une colonne de Bio-Gel P-10 (1,2 x 90 cm) pour B au même débit. Des fractions de 0,5 ml sont collectées. Le repérage des oligosaccharides et des glycopeptides se fait par le réactif de l'orcinol (p. 181).

c - Désialylation :

L'hydrolyse enzymatique par la neuraminidase* de *C. perfringens* (EC 3.2.1.18) est effectuée selon le protocole décrit par NEES *et al.* (1975). 10 mg de glycopeptides sont hydrolysés par 0,08 U de neuraminidase (2,5 γ d'enzyme) en présence de 50 μ l de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5,6. Une goutte de toluène est ajoutée et l'hydrolyse est conduite 24 h à 37°C. L'enzyme est inactivé par précipitation à l'éthanol froid. Le glycopeptide désialylé est récupéré après passage sur une colonne de Dowex 1 x 2 (200-400 mesh, HCOO⁻) et élué avec de l'eau distillée. Les sels sont ensuite éliminés par passage sur colonne de Bio-Gel P-2 (1,2 x 108 cm) équilibrée dans l'eau distillée.

* Nous remercions les Prof. S. BOUQUELET et R. SCHAUER pour le don d'enzymes purifiés.

4 - Test d'agglutination : Les tests d'agglutination de *S. flexneri* 1b à l'agglutinine isolée des cellules coloniques du Cobaye et l'inhibition de cette agglutination par différents glycopeptides et oligosaccharides sont effectués dans les conditions décrites par MIRELMAN *et al.* (1983)

Des volumes égaux (5 µl) de l'agglutinine, des bactéries fixées dans le glutaraldehyde et des oligosaccharides dissous dans le Mes Ca pH 6,2 sont mélangés et observés sous un microscope à contraste de phase. L'agglutination est considérée positive lorsque des amas de dix bactéries ou plus apparaissent (Fig. 44 ; p. 259). Afin de déterminer le titre de l'agglutination des dilutions sérielles au 1/2 sont effectuées sur des solutions de glycannes. Un contrôle de l'agglutination (Mes Ca seul) et de l'inhibition (Fucose 8 mM) sont systématiquement inclus. La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus faible à laquelle un glycanne donné est capable de prévenir l'agglutination de *S. flexneri* 1b à une préparation d'agglutinine soluble isolée des cellules coloniques de Cobaye.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

L'utilisation des fucosylglycopeptides (Tableau XVIII ; p. 260) montre que le meilleur inhibiteur est un asialofucosylglycopeptide (Structure B). La nécessité d'un résidu de fucose lié sur l'asparaginyln-acétylglucosamine est démontrée par la perte de l'activité inhibitrice par le composé D. Cependant, des résidus de galactose en position terminale non réductrice sont nécessaires à l'inhibition puisque leur élimination de la structure B par l'action de β -D-galactosidase produit la structure E qui est inactive. La présence simultanée de résidus de galactose et de fucose sur les glycopeptides est donc nécessaire pour l'inhibition. Ceci est confirmé par le fait que les glycannes F et G n'ont aucune activité inhibitrice lors de

Figure 44 : Agglutination des bactéries S. flexneri 1b fixées au glutaraldehyde par la lectine colonique de Cobaye. L'incubation des bactéries avec la lectine est réalisée sur une lame de microscope, à température ambiante et l'agglutination est examinée au microscope à contraste de phase (x 1000).

l'agglutination. Le glycopeptide (Structure C) contenant deux résidus de fucose, un lié en α -1,6 sur l'asparaginyl N-acétylglucosamine et l'autre en α -1,3 sur la N-acétylglucosamine de l'antenne " α -1,6 " est aussi inhibiteur que le monofucosylglycopeptide B. Nous pouvons donc en conclure que le fucose ne semble pas avoir une activité par lui-même mais qu'il doit interagir avec les structures biantenneés des glycopeptides en changeant leur conformation spatiale et en rendant ainsi le résidu de galactose terminal plus accessible à la lectine (MONTREUIL, 1983).

Néanmoins, l'utilisation des fucosyloligosaccharides (Tableau XIX ; p. 262) vient compliquer ce schéma. En effet, le composé le plus actif est cette fois un oligosaccharide isolé du lait humain (Structure H) qui ne contient pas de fucose et qui est inhibiteur à la même concentration que le glycopeptide B (0,6 mM). Le galactose en position terminale non inhibitrice apparaît comme crucial pour l'activité inhibitrice puisque la dégalactosylation (Structure I) abolit l'activité de même que la substitution de ce monosaccharide par du fucose (Structure K). L'addition d'un (Structure I) ou de deux (Structure L) résidus de fucose substituant d'autres monosaccharides que le galactose dans le lacto-N-tétraose, réduit ou abolit l'activité inhibitrice. Ceci peut s'expliquer par un encombrement stérique qui rend le résidu de galactose en position terminale non réductrice inaccessible à la lectine.

Cette opinion est renforcée par les résultats obtenus avec les structures sialylées. En fait, quand les glycannes les plus inhibiteurs (glycopeptide B et oligosaccharide H) sont substitués par un résidu d'acide N-acétylneuraminique (glycopeptide A, Tableau XVIII ; p. 260) ou deux résidus (oligosaccharide M, Tableau XIX ; p. 262) l'activité inhibitrice est complètement abolie. Nous pouvons donc en conclure que la perte de l'activité inhibitrice des glycopeptides lors de l'agglutination ne dépend ni du nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique ni de la nature de la liaison (α -2,3 ou α -2,6) mais pourrait être due soit au masquage du résidu de galactose soit à la pré-



TABLEAU XIX

ACTIVITE INHIBITRICE DES OLIGOSACCHARIDES SUR L'AGGLUTINATION DE
S. flexneri 1b PAR L'AGGLUTININE ISOLEE DES CELLULES COLONIQUES DE COBAYE

Nom des Composés	Structure des Composés	Concentration minimale inhibitrice
H	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	0.6 mM
I	GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	> 20 mM
J	Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	5 mM
K	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	> 20 mM
L	Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]GlcNAc(β1-4)[Fuc(α1-3)]Gal(β1-4)Glc	> 20 mM
M	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	> 20 mM
N	Gal(β1-3)GlcNAc	10 mM
O	Gal(β1-4)GlcNAc	> 20 mM

sence des charges négatives de l'acide N-acétylneuraminique. En effet, la désialylation du glycopeptide A (conduisant à la structure B) rend ce composé tout aussi inhibiteur que le glycopeptide B. Ainsi, il apparaît de plus en plus qu'un galactose facilement accessible en position terminale non réductrice doit être présent dans les structures oligosaccharidiques inhibitrices. Ce n'est cependant pas une condition suffisante puisque la taille de l'oligosaccharide intervient. En effet, le disaccharide N:Gal(β 1-3)GlcNAc est un pauvre inhibiteur. Ceci est également vrai pour la structure B puisque le disaccharide O : Gal(β 1-4)GlcNAc est complètement inactif.

Bien que le glucose ait été montré inhibiteur (MIRELMAN *et al.*, 1983) les résidus de glucose en position terminale réductrice présents dans tous les oligosaccharides du lait ne semblent pas avoir un rôle déterminant.

L'agglutination de *S. flexneri* lb est également inhibée en présence de mannose ou de structures contenant du mannose (MIRELMAN *et al.*, 1983). Nous avons pour cela utilisé divers composés à mannose (Tableau XX ; p. 264). La structure P contenant deux résidus de mannose est pauvrement inhibitrice, l'addition de résidu α -1,2 mannose en position terminale non réductrice (Structures Q et R) augmente cette inhibition de même les structures oligomannosidiques (Structure S) qui ont un grand nombre de résidus terminaux de mannose α -1,2 sont de très bons inhibiteurs.

C - CONCLUSIONS

Les résultats ici démontrent qu'au moins deux systèmes de reconnaissance par l'intermédiaire des sucres peuvent être impliqués dans l'adhésion de *S. flexneri* lb à l'agglutinine colonique de Cobaye.

Ces structures de reconnaissance sont les unités saccharidiques suivantes : Gal(β 1-3 ou 4)GlcNAc-R et Man(α 1-2)Man-R.



TABLEAU XX

ACTIVITE INHIBITRICE DES OLIGOSACCHARIDES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE
SUR L'AGGLUTINATION DE *S. flexneri* 1b A L'AGGLUTININE DE COBAYE

Nom des composés	Structure des composés	Concentration minimale inhibitrice
P	Man(α1-3)Man(β1-4)GlcNAc	9 mM
Q	Man(α1-2)Man(α1-3)Man(β1-4)GlcNAc	3.5 mM
R	Man(α1-2)Man(α1-2)Man(α1-3)Man(β1-4)GlcNAc	3 mM
S	<p>Man(α1-2)Man(α1-2)Man(α1-3) $\left[\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \end{array} \right]_{0-1}$ $\left[\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right]_{0-1}$ Man(α1-6) Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-)Asn</p>	0.6 mM

La première unité glycanique est encore plus effective lorsqu'elle fait partie intégrante d'une molécule comme dans le lacto-N-tétrase ou comme dans un glycopeptide biantenné possédant un résidu de fucose substituant en α -1,6 l'asparaginy1-N-acétyl glucosamine.

De plus, la présentation multiple de la structure Man (α 1-2)Man sur le même glycopeptide augmente considérablement l'effet inhibiteur de cette unité.

Néanmoins, il reste à voir si les différentes spécificités que nous avons démontrées indiquent la présence d'une lectine multispécifique ou de plusieurs lectines qui permettraient l'adhérence bactérienne au mucus colonique de Cobaye.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nos recherches ont permis de contribuer à mieux connaître les structures glycaniques des IgA de sécrétion du lait humain, de les comparer avec les fractions glycaniques des IgA sériques et de préciser la participation de glycanes dans les mécanismes de la défense anti-bactérienne des muqueuses et notamment celle du tractus intestinal du nourrisson.

Pour réaliser notre travail, nous avons, dans un premier temps, mis au point un procédé rapide de préparation des sIgA en grande quantité à partir du lait de Femme. Après fractionnement des protéines par un gradient de concentration en sulfate d'ammonium et par un gradient de pH, les précipités P₂ et P₄ enrichis en sIgA sont chromatographiés sur colonnes de SP- et QAE-Sephadex et sur colonne d'Ultrogel AcA34.

Les immunoglobulines sIgA isolées des deux précipités possèdent des propriétés physico-chimiques identiques et leur degré de pureté répond aux critères actuels d'analyse chimique et immuno-chimique.

Les immunoglobulines IgA sériques ont été préparées à partir de sérums normaux et myélomateux renfermant de 10 à 40 g d'IgA par litre de sérum, en appliquant la méthode de précipitation des protéines par l'acide caprylique. Les immunoglobulines qui se trouvent dans le surnageant ont été purifiées par la suite par chromatographie sur DEAE-cellulose ou DEAE-trisacryl. Le procédé de fractionnement utilisé a permis d'obtenir des IgA sériques myélomateuses pures en trois étapes avec un rendement de 60 % et des IgA sériques normales avec un rendement 10 % environ.

L'étude comparée des compositions centésimales et molaires en glucides des IgA sériques normales, myélomateuses et des IgA de sécrétion a révélé que les mêmes monosaccharides étaient présents dans les différentes immunoglobulines à des taux et dans des rapports variables et qu'il s'agissait de fucose, galactose, mannose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine et d'acide N-acétylneuraminique. La présence de N-acétylgalactosamine, monosaccharide marqueur des glycanes liés O-glycosidiquement, démontre l'existence, dans les IgA sériques et sécrétoires, de la sous-classe des IgA₁.

L'application à ces immunoglobulines de la méthode de FRANGIONE et WOLFENSTEIN-TODEL (1972) a permis après hydrolyse tryptique et pepsique et chromatographie de gel filtration d'obtenir deux fractions majeures. La première fraction, de masse moléculaire élevée, renferme la zone charnière et les glycanes alcali-labiles, la seconde fraction contient les glycanes alcali-stables liés N-glycosidiquement aux chaînes lourdes, à la pièce de sécrétion et à la pièce de jonction.

La purification de la fraction glycanique alcali-labile après l'action de la soude et la réduction est effectuée par tamisage moléculaire, échange d'ions et chromatographie de partage sur papier.

La fraction alcali-stable des sIgA après hydrolyse pronasique est séparée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1 x 2 en fractions sialoglycopeptidique (GP-A) et asialoglycopeptidique (GP-N). Trois fractions sialoglycopeptidiques (GP-A1 à GP-A3) sont obtenues après électrophorèse préparative sur papier. La fraction asialoglycopeptidique très complexe a été soumise à la gel filtration et à la chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées (Con A et LCA-Sepharose).

Ainsi, le fractionnement sur colonne de Bio-Gel P-30 de cette fraction asialoglycopeptidique nous a permis, dans un premier

temps, de séparer sept fractions glycaniques selon leur masse moléculaire. La chromatographie sur colonne de Con A-Sepharose de la fraction majeure après Bio-Gel P-30 permet l'obtention de six fractions différentes possédant un taux variable de fucose et de galactose. La chromatographie sur LCA-Sepharose de chaque fraction chromatographiée préalablement sur colonne de Con A-Sepharose permet de séparer les glycopeptides possédant un fucose substituant l'asparaginyln-N-acetylglucosamine des autres glycopeptides.

L'établissement des structures a été réalisé grâce à l'application des techniques classiques suivantes : méthanolyse, méthylation couplée à la spectrométrie de masse, action de glycosidases, hydrazinolyse-désamination nitreuse couplée à la spectrométrie de masse en collaboration avec G. STRECKER et la résonance magnétique nucléaire en collaboration avec le groupe du Prof. J.F.G. VliegENT-HART. Elles sont rassemblées dans la Fig. 45 ; p. 269.

L'application de ces différentes méthodes a permis, d'une part, de déterminer la structure de quatre glycannes alcalilabiles et de montrer que l'unité de base de ces glycannes est le disaccharide Gal(β 1-3)GalNAc. C'est sur cette structure que viennent se greffer les autres monosaccharides : l'acide N-acétylneuraminique, la N-acétylglucosamine, le galactose et le fucose. Les glycannes de masse moléculaire plus élevée sont plus complexes. L'étude d'une fraction nonasaccharidique a été réalisée en spectrométrie de masse grâce à la collaboration du Prof. H. EGGE. L'analyse du spectre obtenu est en faveur d'un mélange de glycannes possédant soit des structures linéaires soit des structures branchées. Cette structure possède le noyau saccharidique des glycannes doués d'activité de groupe sanguin décrit par LLOYD et KABAT (1968).

L'hétérogénéité structurale n'existe pas dans la fraction O-glycanique des IgA sériques normales ou myélomateuses. Seul le disaccharide de base est présent, il peut néanmoins ne renfermer que

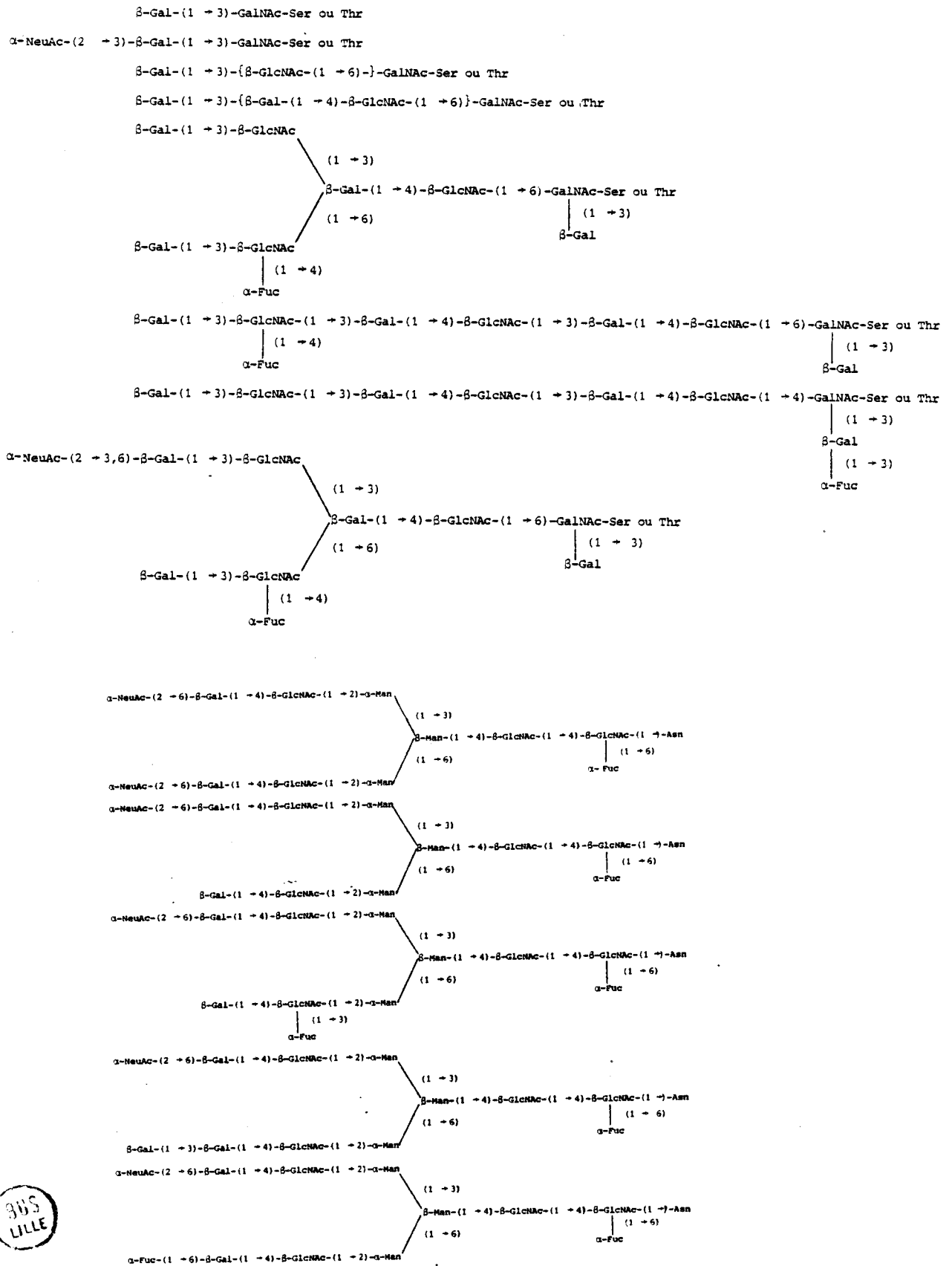


Figure 45 : Récapitulatif des différentes structures O- et N-glycanniques rencontrées chez les IgA de sécrétion du lait humain.

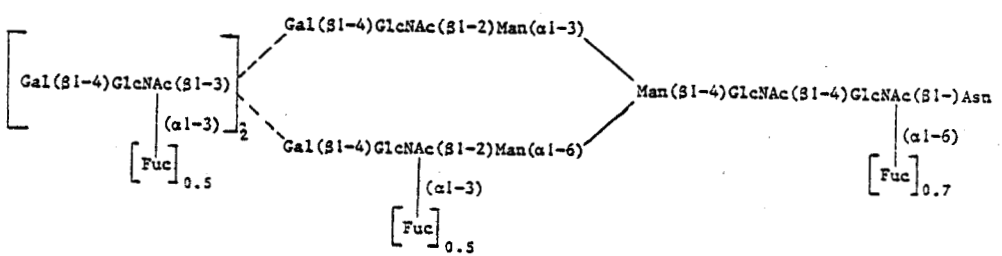
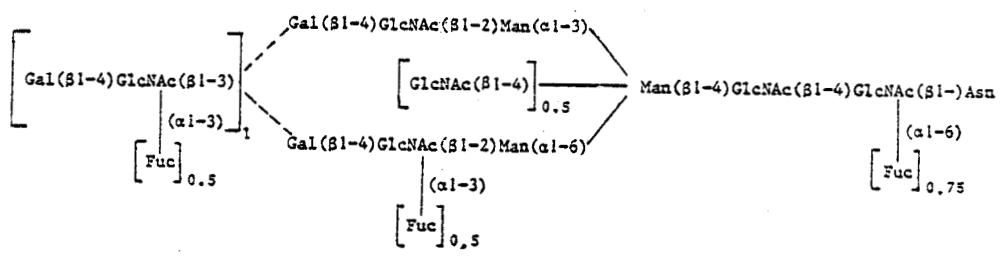
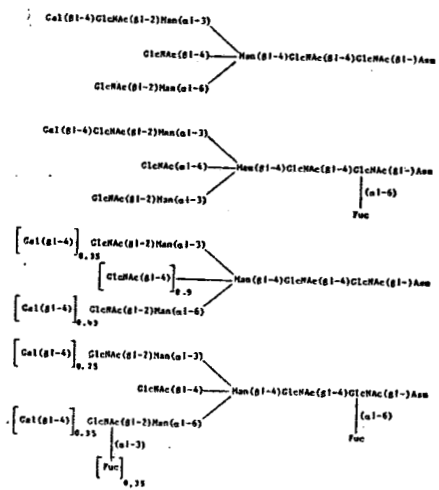
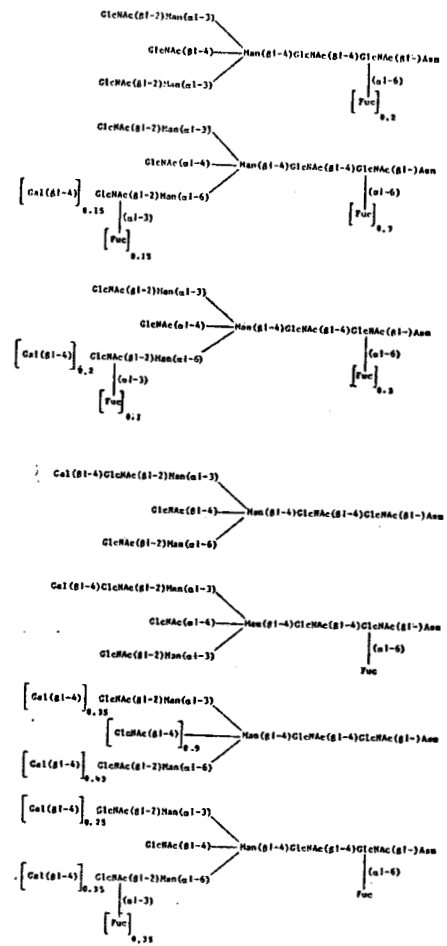


Figure 45 (suite)

de la N-acétylgalactosamine ou être sialylé (1 molécule sur 10 environ). Ces résultats sont en accord avec ceux de BAENZIGER et KORNFELD (1974a) concernant les structures glycaniques d'IgA₁ sérique myélomateuse. Il n'y a donc pas de modification de la glycosylation des zones charnières des IgA sériques dans les IgA pathologiques étudiées. La glycosylation des sIgA est probablement due à une activité plus importante des glycosyltransférases du lait et pose le problème du rôle joué par ces glycannes dans les mécanismes de reconnaissance avec des protéines (la lactotransferrine, la pièce de sécrétion) ou avec des bactéries lors de la défense de l'intestin du nourrisson.

Les sialoglycopeptides au nombre de cinq sont mono ou disialylés et possède un nombre variable de fucose et de galactose. L'application du procédé d'hydrazinolyse-désamination nitreuse aux sialoglycopeptides des sIgA a contribué à l'étude en spectrométrie de masse des oligosaccharides méthylés libérés de la fraction sialoglycopeptidique la plus hétérogène. Cette technique a permis de positionner sans ambiguïté le fucose, de confirmer l'exclusion mutuelle de l'acide N-acétylneuraminique et du fucose sur une même antenne et de préciser l'existence de séquences classiques telles que Gal(β1-4) 2,5 aMan-01, de séquences peu communes telles que : Gal(β1-4) Fuc (α1-3) 2,5 aMan-01 et Gal(β1-3)Gal(β1-4) 2,5 aMan-01 et même de séquences originales : Fuc(α1-6)Gal(β1-4) 2,5 aMan-01.

Les asialoglycopeptides sont au nombre d'une vingtaine. Ils sont subdivisés en glycopeptides de type poly N-acétyllactosaminique possédant un à deux résidus de fucosyl N-acétyllactosamine supplémentaire et en glycopeptides biantennés de type N-acétyllactosaminique avec ou non un résidu de N-acétylglucosamine "intercalaire" substituant le β-mannose. L'utilisation de la Con A Sepharose nous a permis d'apporter quelques éléments nouveaux concernant la spécificité de cette lectine et en particulier de montrer que les glycopeptides biantennés possédant la N-acétylglucosamine "intercalaire" et un seul résidu de galactose sur la branche lié au mannose α-1,3 étaient retardés.

L'établissement des structures glycaniques des sIgA ainsi que les données actuelles de la littérature sur la fraction glycanique de la pièce de jonction, de la pièce de sécrétion et des chaînes α_1 myélocyteuses semble être en faveur d'une localisation préférentielle d'un type de structure glycanique sur l'un ou l'autre composant des sIgA. Ainsi, les glycopeptides poly-N-acétyllactosaminique seraient localisés de préférence sur la pièce de sécrétion alors que les glycannes avec de la N-acétylglucosamine intercalaire seraient présents sur les chaînes α , les glycannes sialylés et non fucosylés appartenant à la pièce de jonction.

L'hétérogénéité et la complexité des glycannes biantennés rencontrés dans les IgA de sécrétion du lait humain posent le problème de la participation de ces glycannes dans les différents rôles des sIgA. Pour cela, nous avons effectué un stage dans le laboratoire du Prof. D. MIRELMAN et nous nous sommes intéressée à la spécificité d'une lectine intestinale. En effet, l'adhérence de *Shigella flexneri* lb au mucus ou aux cellules coloniques de Cobaye se fait par l'intermédiaire d'une lectine qui reconnaît les monosaccharides libres suivants : fucose, glucose et mannose. Afin de mieux définir la spécificité de cette lectine, nous avons étudié l'inhibition de l'agglutination par des oligosaccharides et des glycopeptides renfermant ces différents monosaccharides à mannose comme $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ qui se sont révélés être inhibiteurs. La plus grande inhibition étant obtenue avec les glycopeptides de type oligomannosidique, renfermant trois chaînons $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}$ en position terminale non réductrice. L'étude de fucosylglycopeptides isolés des sIgA du lait de Femme montre que le fucose lié en $\alpha 1-6$ n'est pas un déterminant important. Néanmoins, la présence de ce résidu sur des asialoglycopeptides entraîne une inhibition de l'agglutination. La présence du fucose dans ces glycopeptides doit entraîner un changement de conformation du glycanne et rendre le galactose accessible. La présence de galactose semble de même primordiale dans les oligosaccharides du lait comme le lacto-N-tétraose $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)$

Gal(β 1-4)Glc qui est un très bon inhibiteur. La présence de fucose sur le galactose terminal et sur la N-acétylglucosamine qui entraîne fort probablement un encombrement stérique empêche l'inhibition de l'agglutination.

Ainsi, à l'heure actuelle, nous possédons un ensemble de techniques et de résultats qui devrait nous permettre d'acquérir, dans les prochaines années, des données intéressantes concernant le problème capital des relations structure des sIgA - activité antibactérienne et de mieux comprendre le mécanisme de l'intervention des sIgA dans la défense de l'intestin du nourrisson.

BIBLIOGRAPHIE

(Les nombres entre parenthèses renvoient à la page du mémoire . Les références incluses dans les articles ne sont pas classées ci-dessous).

- ABEL, C.A., GREY, H.M. (1968) *Biochemistry*, 7, 2682 (71)
- ABRAHAM, E.P., ROBINSON, R. (1939) *Nature*, 140, 24 (24)
- ADAMS, J.M., KIMBALL, A.C., ADAMS, F.H. (1947) *Amer. J. Dis. Child.*, 74, 10 (36)
- ADINOLFI, M, GLYNN, A.A., LINDSAY, M., MILNE, C.M. (1966a) *Immunology*, 10, 517 (39, 45)
- ADINOLFI, M., MOLLISSON, P.L., POLLEY, M.J., ROSE, J.M. (1966b) *J. Exp. Med.*, 123, 951 (39)
- AHLSTEDT, S., CARLSSON, B., FALLSTROM, S.P., HANSON, L.A., HOLMGREN, C., LIDEN-JANSON, G., LINDBLAD, B.S., JODAL, U., KALJSER, B., SOHL-AKERLUND, A., WADSWORTH, C. (1977) in : "Immunology of the gut", Ciba Foundation Symposium 46, p. 115, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland (36-38)
- AKABORI, S., OHNO, K., NARITA, K. (1952) *Bull. Chem. Soc.*, 25, 214 (142)
- ALLEN, A., GARNER, A. (1980) *Gut*, 21, 249 (18)
- ALTAMIRANO, G.A., BARRANCO-ACOSTA, C., van ROOST, E., VAERMAN, J.P. (1980) *Mol. Immunol.*, 17, 1525 (97, 108)
- AMMAN, A.J., HONG, R. (1971) *Medecine*, 50, 223 (20)
- ANDRADE, J.R.C. (1980) *Rev. Microbiol.*, 11, 117 (18)
- ANDRE, C., ANDRE, F., FARGIER, M.C. (1978) *Clin. exp. Immunol.*, 33, 327 (74)
- ANDRE, A., PEETOM, F., RONDMAN, K.W. (1964) *Vox Sang.*, 8, 99 (31)
- ANDREWS, J.S., HEWLETT, E.L. (1981) *J. Infect. Dis.*, 143, 242 (35)
- ARNOLD, R.R., RUSSEL, J.E., CHAMPION, W.J., BREWER, M., GAUTHIER, J.J., (1982) *Infect. Immunity*, 35, 792 (24)
- ARNON, H., SALZBERGER, M., OLITZKI, A.L. (1959) *Pediatrics*, 23, 86 (36)

- ARONSON, M., MEDAIA, O., SCHORI, L., MIRELMAN, D., SHARON, N., OFEK, I., (1979) *J. Infect. Dis.*, 139, 329 (18)
- ASHWELL, G., MORELL, A.G. (1971) in "Glycoproteins of Blood Cells and Plasma" (G.A. Jamieson and T.J. Greenwalt eds) p. 173, Lippincott, Philadelphia (111)
- AUGENER, W., GREY, H.M., COOPER, N.R., MULLER-EBERHARD, H.J. (1971) *Immunochemistry*, 8, 1011 (119)
- AUNE, T.M., THOMAS, E.L. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 80, 209 (28, 29)
- AXELSSON, H., JOHANSSON, B.G., RYMO, L. (1966) *Acta Chem. Scand.*, 20, 2339 (59)
- BAENZIGER, J. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 4063 (88, 90, 250)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S. (1974a) *J. Biol. Chem.*, 249, 7260 (2, 80, 81, 189, 250, 270)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S. (1974b) *J. Biol. Chem.*, 249, 7270 (2, 80, 81, 192, 250, 252)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S., KOCHWA, S. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 1897 (252)
- BALLANTYNE, B. (1977) *Clin. Toxicol.*, 11, 195 (28)
- BAUER, J. (1910) *Z. Exp. Pathol. Therap.*, 7, 417 (59)
- BAYARD, B., FOURNET, B. (1976) *Carbohydr. Res.*, 46, 75 (144)
- BAYARD, B., MONTREUIL, J. (1974) in "Methodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués (J. Montreuil ed) Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci. n° 221, p. 209, Edition du CNRS, Paris (144, 145)
- BAYARD, B., ROUX, D. (1975) *FEBS-Lett.*, 55, 206 (144)
- BAZIN, H. (1960) in "The secretory antibody system" (Fergusson A. et Mc Sween RNM eds.) p. 33, MTP Press Ltd, Lancaster (60)
- BAZIN, H., LEVI, G., DORIA, G. (1970) *J. Immunol.*, 105, 1049 (43)
- BEACHEY, E.H., SIMPSON, W.A. (1982) *Infection*, 10, 107 (16, 18)
- BEALE, D. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 351, 13 (91)
- BEALE, D., FEINSTEIN, A. (1976) *Quarterly Reviews of Biophysics*, 9, 135 (114)
- BEERENS, H., ROMOND, C., NEUT, C. (1980) *Amer. J. Clin. Nutri.*, 33, 2434 (13)
- BEH, K.J., HUSBAND, A.J., LASCELLES (1979) *Immunology*, 37, 385 (43)
- BELCHER, R., NUTTEN, A.J., SAMBROOK, C.M. (1954) *Analyst.*, 79, 201 (138)

- BENNETT, R.M., KOKOCINSKI, T. (1978) *Brit. J. Haematol.*, 39, 509 (23)
- BENNICH, H., BAHR-LINDSTRÖM, H. (1974) *Prog. Immunol.*, 1, 49 (83)
- BENNICH, H., NATVIG, J.B., TURNER, M.W. (1974) *Scand. J. Immunol.*, 3, 107 (112)
- BERGHEIM, O. (1940) *J. Infect. Dis.*, 66, 222 (12)
- BERMAN, M.A., SPIEGELBERG, H.L., WEIGLE, W.O. (1979) *J. Immunol.*, 122, 89 (42)
- BERTSCHINGER, H.U., MOON, J.W., WHIPP, S.C. (1972) *Infect. Immunity*, 5, 595 (18)
- BEZKOROVAINY, A., GROHLICH, D., NICHOLS, J.H. (1979) *Amer. J. Clin. Nutri.*, 32, 1428 (15)
- BEZKOROVAINY, A., NICHOLS, J.H. (1976) *Pediat. Res.*, 10, 1 (15)
- BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, H. (1981a) *Clin. Biochem.*, 14, 135 (15)
- BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, H. (1981b) *Int. J. Biochem.*, 13, 585 (15)
- BIENENSTOCK, J. (1975) *Amer. J. Vet. Res.*, 36, 488 (54)
- BIENENSTOCK, J., BEFUS, A.D. (1980) *Immunology*, 41, 249 (32, 43, 44, 53)
- BJÖRCK, L., CLAEISSON, O. (1980) *J. Dairy Sci.*, 63, 919 (29)
- BJÖRCK, L., CLAEISSON, O., SCHULTHESS, W. (1979) *Milchwissenschaft*, 34, 726 (29)
- BJÖRK, I., KARLSSON, F.H., BERGGARD, I. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 1701 (114)
- BJÖRNDAL, H., LUNDBLAD, A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 201, 434 (256)
- BLOTH, B., SVEHAG, S.E. (1971) *J. Exp. Med.*, 133, 1035 (121, 125)
- BOACKLE, R.J., PRUITT, K.M., MESTECKY, J. (1973) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 32, 959 (39)
- BOESMAN-FINKELSTEIN, M., FINKELSTEIN, R.A. (1982) *FEBS-Lett.*, 144, 1 (61)
- BOHNHOFF, M., MILLER, C.P., MARTIN, W.R. (1964) *J. Exp. Med.*, 120, 805 (12)
- BOURGOIS, A., FOUGEREAU, M. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 12, 558 (112)
- BRAMBELL, F.W.R. (1970) in "Frontiers of Biology" (A. Neuberger, E.L. Tatum and E.J. Holborow eds.) Vol. 18, p.1, Elsevier Amsterdam London (52)
- BRANDTZAEG, P. (1970) *Immunochemistry*, 7, 127 (60, 101, 121)

- BRANDTZAEG, P. (1971a) Clin. exp. Immunol., 8, 69 (20, 60)
- BRANDTZAEG, P. (1971b) J. Immunol., 106, 318 (6, 34)
- BRANDTZAEG, P. (1971c) Acta Pathol. Microbiol. Scand., 79, 165 (102)
- BRANDTZAEG, P. (1974a) Nature, 252, 418 (91, 95)
- BRANDTZAEG, P. (1974b) Immunology, 26, 1101 (95)
- BRANDTZAEG, P. (1974c) Scand. J. Immunol., 3, 579 (96)
- BRANDTZAEG, P. (1974d) Adv. exp. Med. Biol., 45, 87 (97)
- BRANDTZAEG, P. (1974e) Scand. J. Immunol., 3, 707 (97)
- BRANDTZAEG, P. (1974f) J. Immunol., 112, 1553 (104)
- BRANDTZAEG, P. (1975) Immunology, 29, 559 (101)
- BRANDTZAEG, P. (1976a) Ric. Clin. Lab., 6 (Suppl. 3), 15 (87, 94)
- BRANDTZAEG, P. (1976b) Scand. J. Immunol., 5, 411 (94, 124, 125)
- BRANDTZAEG, P. (1976c) Clin. exp. Immunol., 25, 59 (95)
- BRANDTZAEG, P. (1977) Immunochemistry, 14, 179 (103)
- BRANDTZAEG, P. (1981) Clin. exp. Immunol., 44, 221 (105)
- BRANDTZAEG, P., BAKLIEN, K., Scand. J. Gastroenterol., 11, 1 (99)
- BRANDTZAEG, P., BERDAL, P. (1975) Scand. J. Immunol., 4, 403 (94, 95)
- BRANDTZAEG, P., FJELLANGER, I., GJERULDSSEN, S.T. (1968) Science, 160, 789 (20, 96)
- BRANDTZAEG, P., FJELLANGER, I., GJERULDSSEN, S.T. (1970) Scand. J. Haematol., Suppl., 12, 3 (102)
- BRANDTZAEG, P.; GJERULDSSEN, S.T., KORSRUD, F., BAKLIEN, K., BERDAL, P., EK, J. (1979) J. Immunol., 122, 503 (94, 95)
- BRAUMAN, J.I., BRYSSON, J.A., KAHL, D.C., NELSON, N.J. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 6679 (139)
- BRAUN, O.H. (1958) Z. Kinderheilkd, 81, 742 (26)
- BROEKHUYSE, R.N. (1974) Invest. Ophthalmol., 13, 550 (23)
- BROOKER, B.E. (1980) Cell Tissue Res., 210, 321 (51)
- BROWN, W.R., ISOBE, Y., NAKANE, P.K. (1976) Gastroenterology, 71, 985 (99)

- BROWN, W.R., ISOBE, K., NAKANE, P.K., PACINI, B. (1977) *Gastroenterology*, 73, 1333 (99)
- BROWN, W.J., KUHN, U.S., TOLLIVER, E.A., NORINS, L.C. (1970) *Brit. J. Vener. Dis.*, 46, 196 (104)
- BROWN, W.R., SMITH, P.D., LEE, E., Mc CALMON, R.T., NAGURA, H. (1982) *Clin. exp. Immunol.*, 48, 85 (109)
- BULLEN, J.J., CUSHNIE, G.H., ROGERS, H.J. (1957) *Immunology*, 12, 303 (24)
- BULLEN, J.J., ROGERS, H.J., GRIFFITHS, E. (1974) in "Microbial Iron metabolism (Nielands J.B. ed.) p. 517, Academic Press, New York (47, 48)
- BULLEN, J.J., ROGERS, H.J., LEIGHT, L. (1972) *Brit. Med. J.*, 8, 69 (47, 50)
- BULLEN, C.L., TEARLE, P.V., WILLIS, A.T. (1976) *J. Med. Microbiol.*, 9, 325 (10, 12)
- BULLEN, C.L., WILLIS, A.T. (1971) *Brit. Med. J.*, 3, 338 (10, 11)
- BURROWS, W., ELLIOTT, M.E., HAVENS, I. (1947) *J. Infect. Dis.*, 81, 261 (35)
- BURTON, D.R., BOYD, J., BRAMPTON, S.B., EASTERBROOK-SMITH, E., EMANUEL, J., NOVOTNY, T.W., RADEMACHER, M.R., van SCHARAVENDIJK, M.J., STERNBERG, E., DWEK, R.A. (1980) *Nature*, 288, 338 (119)
- BURTON, D.W. (1973) *J. Med. Microbiol.*, 6, 131 (38, 39)
- CANFIELD, R.E. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 2691 (24)
- CANN, G.N., ZARITSKY, A., KOSHLAND, M.E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6656 (91, 93)
- CAPRA, J.D., KEHOE, J.M. (1975) *Adv. Immunol.*, 20, 1 (60)
- CARLSON, D.M. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 2984 (136)
- CARLSSON, B.S., GOTHEFORS, L., AHLSTEDT, S., HANSON, L.A., WINBERG, J. (1976) *Acta Paediatr. Scand.*, 65, 216 (36)
- CARRANO, C.J., RAYMOND, K.N. (1979) *J. Amer. Chem. Soc.*, 101, 5401 (24)
- CEBRA, J.J., ROBBINS, J.B. (1966) *J. Immunol.*, 97, 12 (62)
- CEBRA, J.J., SMALL, P.A. Jr. (1967) *Biochemistry*, 6, 503 (71, 73)
- CEDERBLAD, G., JOHANSSON, B.G., RYMO, L. (1966) *Acta Chem. Scand.*, 20, 2349 (59, 62)
- CHALLACOMBE, S.J., TOMASI, T.B. (1980) *J. Exp. Med.*, 152, 1459 (44)
- CHANDAN, R.C., SHAHANI, K.M., HOLLY, R.C. (1964) *Nature*, 204, 706 (24)
- CHANDRA, R.K. (1979) *Bull. W.H.O.*, 57, 167 (7, 9)

- CHANDY, K.G., STOCKLEY, R.A., BURNETT, D. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361, 1855 (121)
- CHANDRASEKARAN, E.V., MENDICINO, A., GARVER, F.A., MENDICINO, J. (1981) J. Biol. Chem., 256, 1549 (69, 70)
- CHAPUIS, R.M., KOSHLAND, M.E. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 657 (87)
- CHAPUIS, R.M., KOSHLAND, M.E. (1975) Biochemistry, 14, 1320 (87)
- CHARET, P., TETAERT, D., HAN, K.K., MONTREUIL, J. (1973) C.R. Acad. Sci., 276D, 1629 (138)
- CHERON, A., FOURNET, B., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1976) Biochimie, 58, 927 (252)
- CHERVENKA, C.H. (1970) Anal. Biochem., 34, 24 (136)
- CLAMP, J.R. (1975) in "The plasma proteins" (Putnam F.W. ed.) Vol. II (2nd ed) p. 163, Academic Press, New York (85)
- CLAMP, J.R., BERNIER, G.M., PUTNAM, F.W. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 86, 149 (69)
- COHN, E.J. (1945) Science, 101, 51 (132)
- COLMAN, P.M., DEISENHOFER, J., HUBER, R., PALM, W. (1976) J. Mol. Biol., 100, 257 (116)
- CONNELL, G.E., PORTER, R.R. (1971) Biochem. J., 124, 53P (119)
- COOPER, A., BLUESTONE, R. (1968) Ann. Rheum. Dis., 27, 537 (71)
- COURTOY, P.J., LIMET, J.N., BAUDHUIN, P., SCHNEIDER, Y.J., VAERMAN, J.P. (1982) Arch. int. Physiol. Biochim., 90, B11 (108)
- CRABBE, P.A., HEREMANS, J.F. (1966) Gut, 7, 119 (20)
- CRAGO, S.S., KULHAVY, R., PRINCE, S.J., MESTECKY, J. (1978) J. Exp. Med., 147, 1832 (99, 105)
- CRAGO, S.S., PRINCE, S.J., PRETLOW, T.G., Mc GHEE, J.R., MESTECKY, J. (1979) Clin. exp. Immunol., 38, 585 (51)
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C., LAMM, M.E. (1975) J. Biol. Chem., 250, 1987 (102, 125)
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C., LAMM, M.E., FRANKLIN, E.C. (1974) J. Biol. Chem., 249, 5654 (97)
- DAVIES, A. (1922) Lancet, 203, 1009 (35)
- DAVIES, D.R., PADLAN, E.A., SEGAL, D.M. (1975) Ann. Rev. Biochem., 44, 639 (114)

- DAVIS, P.J., PARRY, S.H., PORTER, P. (1978) *Immunology*, 34, 879 (35)
- DAWSON, G., CLAMP, J.R. (1968) *Biochem. J.*, 107, 341 (78)
- DAYTON, D.H., SMALL, P.A., CHANOCK, R.M., KAUFMAN, H.E., TOMASI, T.B., (1971) in "The secretory immunologic system", U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. (43)
- DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 117, 41 (137, 207, 249)
- DEBRAY, H., MONTREUIL, J. (1981) in "Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry" (T.C. Bøg-Hansen ed.) Vol. 1, p. 221, W. de Gruyter, Berlin, New York (137, 207, 247, 249)
- DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1983) in "Lectins" (T.C. Bøg-Hansen and G.A. Spengler eds.) Vol. III, p. 335, W. de Gruyter, Berlin, New York (137, 247, 249)
- DEBRE, R., RAMON, G., LEVY-SOLAL, E., THIROLOIX, P.L. (1930) *Nourrisson*, 18, 235 (34, 37)
- DEBUIRE, B., PUTNAM, F.W. (1982) in "Protides of the biological Fluids", 29th Colloquium 1982 (H. Peeters ed.) p. 41, Pergamon Press, Oxford, New York (83, 84)
- DECKX, R.J., VANTRAPPEN, G.R., PAREIN, M.M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 204 (26)
- DEISENHOFER, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2361 (116)
- DELACROIX, D.L., DIVE, C., RAMBAUD, J.C., VAERMAN, J.P. (1982) *Immunology*, 47, 383 (74, 109)
- DELLA CORTE, E., PARKHOUSE, R. (1973) *Biochem. J.*, 136, 589 (87)
- de PREVAL, C. (1976) in "Immunoglobuline" (J.F. Bach ed.) p. 139, Flammarion Médecine-Sciences, Paris (64)
- DESCAMPS, J. (1974) Thèse d'Etat, Lille, n° 294 (1, 61, 63, 80, 82, 132, 162, 189)
- DESCAMPS, J., MONSIGNY, M., MONTREUIL, J. (1968) *C.R. Acad. Sci.*, 266-D, 1775 (80)
- DIAS-JOUANEN, E.P., WILLIAMS, R.C. Jr. (1974) *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 3, 248 (51)
- di GIROLAMO, R., LISTON, J., MATCHES, J. (1977) *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 19 (19)
- DITTMANN, J., HOLM-ANDERSEN, I., LIEM, G., MAYER, J.B. (1967) *Zschr. Kinderheilkd.*, 101, 305 (12)
- DIVES, C., HEREMANS, J.F. (1974) *Eur. J. Clin. Invest.*, 4, 235 (109)
- DOLBY, J.M., HONOUR, P. (1979) *J. Hyg. (Camb)*, 83, 255 (50)
- DOLBY, J.M., HONOUR, P., ROWLAND, M.G.M. (1980) *J. Hyg. (Camb)*, 85, 347 (35, 36)

- DOLBY, J.M., STEPHENS, S. (1983) Immunology, in press (50)
- DONNE, A. (1844-1845) Cours de Microscopie, Vol. 1 et Atlas n° 1 (Baillièrè, Paris) (51)
- DOOLEY, J.S., POTTER, B.J., THOMAS, H.C., SHERLOCK, S. (1982) Hepatology, 2, 323 (109)
- DORRINGTON, K.J. (1978) Canad. J. Biochem., 56, 1087 (113, 116, 118)
- DORRINGTON, K.J., KLEIN, M.M. (1982) Mol. Immunol., 19, 1215 (118)
- DORRINGTON, K.J., PAINTER, R.H. (1974) Prog. Immunol. III, 298 (120)
- DORRINGTON, K.J., ROCKEY, J.H. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 200, 584 (73)
- DOWNHAM, M.A.P.S., SCOTT, R., SIMS, D.G., WEBB, J.K.G., GARDNER, P.S. (1976) Brit. Med. J., 2, 274 (34)
- DUGUID, J.P., GILLIES, R.R. (1957) J. Path. Bact., 74, 397 (16)
- du PAN, M.R., SCHEIDEGGER, J.J., PONGRATZ, E., ROULET, H. (1955) Arch. Franc. Pediat., 12, 243 (59)
- EDDIE, D.S., SCHULKIND, M.L., ROBBINS, J.B. (1971) J. Immunol., 106, 181 (39)
- EDELMAN, G.M. (1970) Sci. Am. Aug., 34 (114)
- EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, W.E., GOTTLIEB, P.D., RUTISHAUSER, U., WAXDAL, M.J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 78, (67, 68, 83, 112, 118)
- EDELMAN, G.M., GALL, W.E. (1969) Ann. Rev. Biochem., 38, 415 (112)
- EDMONDSON, W.P., PURCELL, R.H., GUNDELFINGER, B.F. (1966) J. Amer. Med. Ass., 195, 453 (44)
- EDMUNDSON, A.B., SHEBER, F.A., ELY, K.R., SIMONDS, N.B., HUTSON, N.K., ROSSITER, J.L. (1968) Arch. Biochem. Biophys., 127, 725 (69)
- EDMUNDSON, A.B., ELY, K.R., ABOLA, E.E., SCHIFFER, M., PANAGIOTOPOULOS, N. (1975) Biochemistry, 14, 3953 (115, 117)
- EIDELMAN, S., DAVIS, S.D. (1968) Lancet, 1, 884 (20)
- EIN, D. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 60, 982 (65)
- ELLERSON, J.R., YASMEEN, D., PAINTER, R.H., DORRINGTON, K.J. (1972) FEBS-Lett., 24, 318 (119)
- ELSON, L.A., MORGAN, W.T.J. (1933) Biochem. J., 27, 1824 (138)
- EMODI, G., JUST, M. (1974) Scand. J. Immunol., 3, 157 (51)

- EPSTEIN, W.V., TAN, M. (1968) *Arthritis Rheum.*, 9, 713 (71)
- ESHDAT, Y., OFEK, I., YASHOUV-GAN, Y., SHARON, N., MIRELMAN, D. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 1551 (16)
- ESKELAND, T. (1974) *Scand. J. Immunol.*, 3, 757 (91)
- ESKELAND, T., BRANDTZAEG, P. (1974) *Immunochemistry*, 11, 161 (94)
- ESPERSEN, F., SCHIOTZ, P.O. (1981) *Acta Path. Microbiol. Scand. sect C*, 89, 93 (36)
- EVANS, P.A., NEWBY, T.J., STOKES, C.R., PATEL, D., BOURNE, F.J. (1980) *Scand. J. Immunol.*, 11, 419 (43, 44)
- FADER, R.C., DAVIS, C.P. (1980) *Infect. Immunity*, 30, 554 (18)
- FAHEY, J.L. (1963) *Immunopathol. Int. Symp.* 3rd, 50 (64)
- FAIR, D.S., SLEDGE, C., KRUEGER, R.G., MANN, K.G., HOOD, L.E. (1975) *Biochemistry*, 14, 5561 (67)
- FALCHUK, K.R., PERROTTO, J.L., ISSELBACHER, K.J. (1975) *New Engl. J. Med.*, 292, 395 (26)
- FALKLER, W.A. Jr, DIWAN, A.R., HALSTEAD, S.B. (1975) *Arch. Virol.*, 47, 3 (31, 34)
- FEENEY, R.E. (1951) *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 196 (23)
- FEINSTEIN, D., FRANKLIN, E.C. (1966) *Nature*, 121, 1496 (74)
- FERRI, R.G., TUTIYA, T. (1959) *Hospital (Rio de Janeiro)*, 55, 265 (59)
- FIELDSTEEL, A.H. (1974) *Cancer Res.*, 34, 712 (31)
- FILIPE DA SILVA, J.A., MONTEIRO, C.C. (1959) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41, 1707 (59)
- FINE, J.M., STEINBUCH, M. (1970) *Rev. Europ., Etudes Clin. et Biol.* XV, 1115 (130, 132)
- FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H. (1980) *Carbohydr. Res.*, 80, 336 (139)
- FISHAUT, M., THEODORE, C.M., OGRA, P.L. (1981) in "Immunology of the Gastrointestinal Tract" (Strober W. ed.) Humana Press (51)
- FISHER, M.N., NAGY, N., BAZIN, H., UNDERDOWN, B.J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2008 (104, 108)
- FLEMING, A. (1922) *Proc. Roy. Soc. Biol. Sci.*, 93, 306 (24)
- FLOREY, H. (1955) *Proc. Roy. Soc.*, 143, 144 (18)
- FORD, J.E., SCOTT, K.J., SANSOM, B.F., TAYLOR, P.J. (1975) *Brit. J. Nutri.*, 34, 469 (32)

- FORMAL, S.B., DAMMIN, G.J., LABREC, E.M., SCHNEIDER, H. (1958) *J. Bacteriol.*, 75, 604 (253)
- FOURNET, B., FIAT, A. M., ALAIS, C., JOLLES, P. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 576, 336 (15)
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J. (1981) *Anal. Biochem.*, 116, 489 (139, 142)
- FRANEK, F., ZIKAN, J. (1964) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 29, 1401 (87)
- FRANGIONE, B., WOLFENSTEIN-TODEL, C. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3673 (76, 77, 136, 189, 267)
- FRANKLIN, R.M., KENYON, K.R., TOMASI, T.B. (1973) *J. Immunol.*, 110, 984 (99)
- FRANKLIN, R.M., PRENDERGAST, R.A., SILVERSTEIN, A.M. (1978) *J. Exp. Med.*, 148, 1705 (53)
- FRETER, R. (1964) *Bull. WHO*, 31, 825 (35)
- FRETER, R. (1970) *Infect. Immunity*, 2, 556 (35)
- FRETER, R. (1974) in "Barua and Burrows Cholera" (Saundey ed.) p. 315, Philadelphia (19)
- FRETER, R., GANGAROSA, E.J. (1963) *J. Immunol.*, 91, 724 (35)
- FRETER, R., MONDAL, S., SHRIVASTAVA, D.L., SUNDERMAN, F.W. (1965) *Infect. Dis.*, 115, 83 (35)
- FUBARA, E.S., FRETER, R. (1972) *Amer. J. Clin. Nutr.*, 25, 1357 (35)
- FUBARA, E.S., FRETER, R. (1973) *J. Immunol.*, 111, 395 (35)
- FUKUDA, K., TOMITA, L., HAMADA, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 677, 462 (203)
- GALLY, J.A., EDELMAN, G.M. (1972) *Ann. Rev. Genetics*, 6, 1 (60)
- GARCIA-PARDO, A., LAMM, M.E., PLAUT, A.G., FRANGIONE, B. (1979) *Mol. Immunol.*, 16, 477 (102, 125)
- GARCIA-PARDO, A., LAMM, M.E., PLAUT, A.G., FRANGIONE, B. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 11734 (102, 125, 126)
- GAUHE, A., GYORGY, P., HOOVER, J.R.E., KUHN, R., ROSE, C.R., HANS, W.R., ZILLIKEN, F. (1954) *Arch. Biochem. Biophys.*, 48, 214 (13)
- GEMSKI, P., TAKEUCHI, A., WASHINGTON, O., FORMAL, S. (1972) *J. Infect. Dis.*, 126, 523 (253)
- GENCO, R.J., PLAUT, A.G., MOELLERING, R.C. (1975) *J. Infect. Dis.*, 131 (Suppl.) S17 (40)
- GERBRANDY, J.L.F., VAN DURA, E.A. (1972) *J. Immunol.*, 109, 1146 (43)

- GHETIE, V., CHISIU, N.S., MIHAESCU, S. (1971) St. cerc. Biochim. Bucharest, 14, 371 (104)
- GHETIE, V. MOTA, G. (1973) Immunochemistry, 80, 839 (104)
- GHOSE, A.C., JIRGENSONS, B. (1971) Biochim. Biophys. Acta, 251, 14 (114)
- GIBBONS, R.J., SPINELL, D.M., SKOBE, Z. (1976) Infect. Immunity, 13, 238 (18)
- GIBSON, D., LEVANON, M., SMITHIES, O. (1971) Biochemistry, 10, 3114 (45)
10, 3114 (65)
- GINDRAT, J.J., GOTHEFORS, L., HANSON, L.A., WINBERG, J. (1972) Acta Paediatr. Scand., 61, 587 (36, 50)
- GITLIN, D., KUMATE, J., URRUSTI, J., MORALES, C. (1964) J. Clin. Invest., 43, 1938 (120)
- GOLDBACH, W., HAENEL, H., GRUTTE, F.K. (1964) Ernähr. Forsch., 9, 295 (26)
- GOLDBLUM, R.M., AHLSTEDT, S., CARLSSON, B., HANSON, L.A., JODAL, V., LIDEN-JANSON, G., SUHL-AKERLAND, A. (1975) Nature, 257, 797 (54)
- GOLDMAN, A.S., CUTBERTO, G., NICHOLS, B.L., GOLDBLUM, R.M. (1982) J. Pediatr., 100, 563 (24)
- GOLDMAN, M.S., SMITH, C.W. (1973) J. Pediatr., 82, 1082 (52)
- GONZAGA, A.J., WARREN, R.J., ROBBINS, F.C. (1963) Pediatrics, 32, 1039 (34)
- GOODMAN, M.R., LINK, D.W., BROWN, W.R., NAKANE, P.K. (1981) Amer. Rev. Resp. Dis., 123, 116 (99)
- GORDON, J., HOWLETT, A.R., SMITH, J.L. (1978) Immunology, 34, 397 (71)
- GORDON, J., SMITH, J.L. (1978) Clin. exp. Immunol., 34, 288 (71)
- GOTHEFORS, L., CARLSSON, B., AHLSTEDT, S., HANSON, L.A., WINBERG, J. (1976) Acta Paediatr. Scand., 65, 225 (36)
- GOTHEFORS, L., MARKLUND, S. (1975) Infect. Immunity, 11, 1201
- GOTZE, O., MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1971) J. Exp. Med., 134, 90 (31)
- GRABAR, P., WILLIAMS, C.A. (1955) Biochim. Biophys. Acta, 17, 65 (134)
- GRAY, W.R., DREYER, W.J., HOOD, L. (1967) Science, 155, 465 (69)
- GREEN, N.M. (1969) Adv. Immunol., 11, 1 (114)
- GREY, H.M., ABEL, C.A., YOUNT, W.J., KUNKEL, H.G. (1968) J. Exp. Med., 128, 1223 (60, 71, 74)
- GRIFFISS, J.M., BERTRAM, M.A. (1977) J. Infect. Dis., 136, 733 (42)
- GRIFFITH, E., HUMPHREYS, J. (1978) Eur. J. Biochem., 82, 503 (26)

- GRIMMONPREZ, L., BOUQUELET, S., BAYARD, B., SPIK, G., MONSIGNY, M.,
MONTREUIL, J. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 13, 484
- GRIMMONPREZ, L., MONTREUIL, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 843 (14, 256)
- GUENTZEL, M.N., FIEDL, L.H., EUBANKS, E.R., BARRY, L.J. (1977) *Infect.
Immunity*, 15, 538 (18)
- GUGLER, E., BOKELMANN, G., DÄTWYLER, A., von MURALT, G. (1958) *Schweiz.
Med. Wochschr.*, 88, 1264 (59)
- GUY-GRAND, D., GRISCELLI, C., VASSALLI, P. (1974) *Eur. J. Immunol.*, 14,
435 (104)
- GYLLENBERG, H., ROINE, P. (1957) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 41,
144 (10)
- GYORGY, P. (1964) *C.R. 3ème Congrès Intern. Nutr.*, Amsterdam, 203 (7)
- GYORGY, P., DHANAMITTA, S., STEERS, E. (1962) *Science*, 137, 338 (31)
- GYORGY, P., GAUHE, A., HOOVER, J.R.E., KUHN, R., RUELIUS, H.W., ZIL-
LINKEN, F. (1954a) *Arch. Biochem. Biophys.*, 48, 214 (13)
- GYORGY, P., HOOVER, J.R.E., KUHN, R., ROSE, C.S. (1954b) *Arch. Biochem.
Biophys.*, 48, 209 (13)
- GYORGY, P., JEANLOZ, R.W., NICOLAI, H.V., ZILLIKEN, F. (1974) *Eur. J.
Biochem.*, 43, 29 (13)
- GYORGY, P., ROBERT, F., NORRIS, R.F., ROSE, C.S. (1954c) *Arch. Bio-
chem. Biophys.*, 48, 193 (13)
- HAKOMORI, S.I. (1964) *J. Biochem.*, 55, 205 (139)
- HALE, T.L., BONVENTRE, P.F. (1979) *Infect. Immunity*, 24, 879 (254)
- HALL, J.G., ANDREW, E. (1980) *Immunology Today*, 1, 100 (109, 110)
- HALPERN, M.S., COFFMAN, R.L. (1972) *J. Immunol.*, 109, 674 (85, 87)
- HALPERN, M.S., KOSHLAND, M.E. (1970) *Nature*, 228, 1276 (60, 85)
- HALPERN, M.S., KOSHLAND, M.E. (1973) *J. Immunol.*, 111, 1653 (87)
- HALSEY, J.F., JOHNSON, B.H., CEBRA, J.J. (1980) *J. Exp. Med.*, 151,
767 (99)
- HALSEY, J.F., MITCHELL, C., MEYER, R., CEBRA, J.J. (1982) *Eur. J.
Immunol.*, 12, 107 (54)
- HAMILTON, S.R., YARDLEY, J.H., BROWN, G.D. (1979) *Infect. Immunity*,
24, 422 (44)
- HANEBERG, B., FINNE, P. (1974) *Acta Paediatr. Scand.*, 63, 588 (26)

- HANNAM-HARRIS, A.C., GORDON, J., SMITH, J.L. (1980) *J. Immunol.*, 125, 2177 (71)
- HANNAM-HARRIS, A.C., SMITH, J.L. (1981) *Immunology*, 43, 417 (71)
- HANSON, L.Å. (1959) *Experientia*, 15, 473 (59)
- HANSON, L.Å. (1960) *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 17, 45 (59)
- HANSON, L.Å. (1982) *Immunology Today*, 3, 168 (51)
- HANSON, L.Å., AHLSTEDT, S., ANDERSSON, B., CARLSSON, B., DAHLGREN, U., LIDIN-JANSON, G., MATTSBY-BALTZER, I., SVANBORG-EDEN, C. (1980) *J. Reticuloendothelial Soc.*, 28, Suppl., 1 (32, 53)
- HANSON, L.Å., JOHANSSON, B.G. (1967) *Proc. Nobel. Symp.*, 3rd, 141 (96)
- HARMATZ, P.R., KLEINMAN, R.E., BUNNEL, B.W., BLOCH, K.J., WALKER, W.A. (1982) *Hepatology*, 2, 328 (109)
- HARRIS, J.P., SOUTH, M.A. (1981) *Amer. J. Pathol.*, 105, 47 (99)
- HARTLEY, J.L., SOFFER, R.L. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 1545 (203)
- HASE, S., MATSUSHIMA, Y. (1969) *J. Biochem.*, 66, 57 (143)
- HAUPTMAN, S.P., TOMASI, T.B. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 3891 (87)
- HAVEZ, R., GUERRIN, F., MUH, J.P., BISERTE, G. (1966a) *C.R. Soc. Biol.*, 160, 571 (60, 96)
- HAVEZ, R., MUH, J.P., ROUSSEL, P., DEGAND, P., CARLIER, C. (1966b) *C.R. Acad. Sci.*, 262, 1379 (96)
- HAVEZ, R., DEGAND, P., ROUSSEL, P., RANDOUX, A. (1970) *Poumon*, 26, 5 (19)
- HAVEZ, R., LAINE-BASSEZ, A., HAYEM-LEVY, A., LEBAS, J. (1973) *Bull. Physiopath. Resp.*, 9, 219 (19)
- HEIMBURGER, N., HEIDE, K., HAUPT, H., SCHULTZE, H.E. (1964) *Clin. Chim. Acta*, 10, 293 (63)
- HEIMER, R., JONES, D.W., MAURER, P.H. (1969) *Biochemistry*, 8, 3937 (71)
- HENTGES, D.J. (1967a) *J. Bacteriol.*, 93, 1369 (12)
- HENTGES, D.J. (1967b) *J. Bacteriol.*, 93, 2029 (12)
- HEREMANS, J.F. (1974) in "The Antigens" (M. Sela ed.) Vol. II, p. 365, Academic Press, New York, San Francisco, London (19, 39, 56, 60, 61, 72, 78, 85, 109, 123)
- HEREMANS, J.F., CRABBE, P.A. (1967) in "Gamma Globulins", *Proc. Nobel Symp.* 3rd, p. 129 (20)

- HERLANT-PEERS, M.C., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., van HALBEEK, H., VELDINK, G.A., VLIEGENTHART, J.F.G. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 117, 291 (256)
- HERMANN, J., JOLLES, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 200, 178 (26)
- HESSE, W. (1894) *Zschr. Hyg. Inpektr.*, XVII, 238 (27)
- HIBI, T., ASAKURA, H., KOBAYASHI, K., MUNAKATA, Y., KANO, S., TSUCHIYA, M., TERAMOTO, T., UEMATSU, Y. (1982) *Gut*, 23, 422 (71)
- HICKMAN, S., KORNFELD, R., OSTERLAND, C.K., KORNFELD, S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2156 (252)
- HICKMAN, S., KULCZYCKI, A., LYNCH, R.G., KORNFELD, S. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 4402 (85)
- HILL, I.R., PORTER, P. (1974) *Immunology*, 26, 1239 (39, 45, 46)
- HILL, R.L., DELANEY, R., FELLOWS, R.E. Jr, LE BOVITZ, H.E. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 1792 (112)
- HIRANO, S., HAYASHI, H., MASUDA, F., ONODERA, K. (1966) *Agr. Biol. Chem.*, 30, 212 (15)
- HO, F.C.S., LAWTON, J.W.M. (1978) *J. Pediatr.*, 93, 910 (52)
- HO, F.C.S., WONG, R.L.C., LAWTON, J.W.M. (1979) *Acta Paediatr. Scand.*, 68, 389 (51)
- HODES, H.L., BERGER, R., HEVIZY, M. (1962) *Amer. J. Dis. Child.*, 104, 457 (34)
- HOGG, D.M., JAGO, G.R. (1970) *Biochem. J.*, 117, 779 (29)
- HOLLANDER, F. (1954) *Arch. Int. Med.*, 93, 107 (18)
- HOLMGREN, J., HANSON, L.Å., CARLSSON, B., LUNDBLAD, B.S., RAHIMTOOLA, J. (1976) *Scand. J. Immunol.*, 5, 867 (36, 37)
- HOOGENDORN, H., PIESSENS, J.P., SCHOLTES, W., STODDARD, L.A. (1977) *Caries Res.*, 11, 77 (29)
- HOPF, U., BRANDTZAEG, P., HÜTTEROTH, T.H., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.H. (1978) *Scand. J. Immunol.*, 8, 543 (99)
- HOPPER, J.E., NISONOFF, A. (1971) *Adv. Immunol.*, 13, 57 (60)
- HOSKINS, L.E., BOULDING, E.T. (1976a) *J. Clin. Invest.*, 57, 63 (19)
- HOSKINS, L.E., BOULDING, E.T. (1976b) *J. Clin. Invest.*, 57, 74 (19)
- HUANG, S.W., FOGH, J., HONG, R. (1976) *Scand. J. Immunol.*, 5, 263 (99)
- HUBER, R. (1980) *Klin. Wochenschr.*, 58, 1217 (60, 86, 114)

- HUBER, H., DOUGLAS, S.D., HUBER, C., GOLDBERG, L.S. (1971) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 41, 262 (39)
- HURLIMAN, J., WALDESBÜHL, M., ZUBER, C. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, 181, 393 (62)
- HURME, M., KONTIAINEN, S. (1976) *Scand. J. Immunol.*, 5, 339 (43)
- HURVITZ, A.I., KEHOE, J.M., CAPRA, J.D. (1971) *J. Immunol.*, 107, 648 (71)
- HUSBAND, A.M., GOWANS, J.L. (1978) *J. Exp. Med.*, 148, 1146 (43)
- HYSLOP, N.E., KERN, K.C., WALKER, W.A. (1974) in "Lysozyme" (Osserman E.F., Canfield, R.E. and Beychok, S. eds.) p. 449, Academic Press, New York London (26)
- ISAACSON, P. (1982) *Gut*, 23, 578 (26)
- ISCAKI, S., GENESTE, C., MANGALO, R. (1981) *Immunol. Lett.*, 3, 27 (103)
- ISCAKI, S., GENESTE, C., PILLOT, J. (1978) *Immunochemistry*, 15, 401 (103)
- ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T., LEE, E.H., FUDENBERG, H.H. (1965) *J. Immunol.* 95, 197 (39)
- ISHIZAKA, T., SIAN, C.M., ISHIZAKA, K. (1972) *J. Immunol.*, 108, 848 (31)
- ISOBE, Y., CHEN, S.T., NAKANE, P.K., BROWN, W.R. (1977) *Acta Histochem. Cytochem.*, 10, 161 (99)
- ITO, S., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 938 (252)
- IZHAR, M., NUCHAMOWITZ, Y., MIRELMAN, D. (1982) *Infect. Immunity*, 35, 1110 (16, 21, 254)
- JACKSON, G.D.F., LEMAITRE-COELHO, I., VAERMAN, J.P., BAZIN, H., BECKERS, A. (1978) *Eur. J. Immunol.*, 8, 123 (99, 108)
- JAGO, G.R., MORRISSON, M. (1962) *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 111, 585 (27)
- JERRY, L.M., KUNKEL, H.G. (1972) *J. Immunol.*, 109, 982 (102)
- JERRY, L.M., KUNKEL, H.G., ADAMS, L. (1972) *J. Immunol.*, 109, 275 (74)
- JERRY, L.M., KUNKEL, H.G., GREY, H. M. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65, 557 (69)
- JOHANSSON, B. (1960) *Acta Chem. Scand.*, 14, 510 (21)
- JOHN, T.J., DEVERAJAN, L.V., LUTHER, L., VIJAYARATHNAM, P. (1976) *Pediatrics*, 57, 47 (33)
- JOLLES, P. (1976) *Biomedicine*, 25, 275 (27)
- JOLLES, J., DIANOUX, A.C., HERMANN, J., NIEMANN, B., JOLLES, P. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 128, 568 (24, 26)

- JOLLES, J., JAUREGUI-ADELL, J., BERNIER, I., JOLLES, P. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 78, 668 (24)
- JOLLES, J., JOLLES, P. (1971) *Helv. Chim. Acta*, 54, 2668 (26)
- JOLLES, J., JOLLES, P. (1972) *FEBS-Lett.*, 22, 31 (26)
- JOLLES, J., MAZURIER, J., BOUTIGUE, M.H., SPIK, G., MONTREUIL, J., JOLLES, P. (1976) *FEBS-Lett.*, 69, 27 (21)
- JONES, G.W., FRETER, R. (1976) *Infect. Immunity*, 14, 240 (16)
- KAARTINEN, J., IMIR, R., KLOCKARS, M., SANDHOLM, M., MAKELA, O. (1978) *Scand. J. Immunol.*, 7, 229 (109)
- KABAT, E.A., WU, T.T., BILOFSKY, H. (1976) in "Variable Regions of Immunoglobulin chains. Tabulations and Analysis of amino acid sequences". Belt, Bearanek and Newman, Boston (65, 66)
- KAJI, H., PARKHOUSE, R.M.E. (1974) *Nature*, 249, 45 (91)
- KAJI, H., PARKHOUSE, R.M.E. (1975) *J. Immunol.*, 114, 1218 (94)
- KAMERLING, J.P., GERWIG, G.I., Vliegenthart, J.F.G. (1982) XIth International Carbohydrate Symposium, Vancouver, 22-28 août, Abstract II-37 (170)
- KAPLAN, M.E., DALMASSO, A.P., WOODSON, M. (1972) *J. Immunol.*, 108, 275 (39)
- KARTE, H. (1959) *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 107, 265 (59)
- KAUR, J., Mc GHEE, J.R., BURROWS, W. (1972) *J. Immunol.*, 108, 387 (37)
- KAVERZNEVA, E.D., DE-FAN, T. (1961) *Biokhimiya*, 26, 782 (142)
- KEHOE, J.M., TOMASI, T.B., ELLOUZ, F., CAPRA, J.D. (1972) *J. Immunol.*, 109, 59 (87)
- KENNY, J.F., BOESMAN, M.I., MICHAELS, R.H. (1967) *Pediatrics*, 39, 202 (34, 35, 36, 62)
- KEREN, D.F., KERN, S.E., BAUER, D.H., SCOTT, P.J., PORTER, P. (1982) *J. Immunol.*, 128, 475 (43)
- KEUSCH, G.T., DONOHUE, R.A., JACEWICZ, M. (1981) *Encyclopedia of pharmacology* (F. Domer ed.) (253)
- KEUSCH, G.T., JACEWICZ, M. (1977) *J. Exp. Med.*, 146, 535 (253)
- KIKUTANI, H., SITIA, R., GOOD, R.A., STAVEZER, J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6436 (73)
- KILIAN, M., HOLMGREN, K. (1981) *Infect. Immunity*, 31, 868 (40)
- KILIAN, M., MESTECKY, J., KULHAVY, R., TOMANA, M., BUTLER, W.T. (1980) *J. Immunol.*, 124, 2596 (40)

- KILIAN, M., MESTECKY, SCHROHENLOHER, R.E. (1979) *Infect. Immunity*, 26, 143 (40, 42)
- KLEINMAN, R.E., WALKER, W.A. (1979) *Dig. Dis. Sci.*, 24, 876 (51, 53, 55)
- KLOCKARS, M., OSSERMAN, E.F. (1974) *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 139 (26)
- KLOCKERS, M., ROBERTS, P. (1976) *Acta Haemat.*, 55, 289 (27)
- KNIGHT, K.L., ROSENZWEIG, M., LICHTER, E.A., HANLY, W.C. (1974) *J. Immunol.*, 112, 877 (101)
- KNOP, J., BREU, H., WERNET, P., ROWLEY, D. (1971) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 49, 405 (39)
- KOBATA, A. (1977) in "The glycoconjugates" (Horowitz M.I. and Pigman W. eds.) Vol.I, p. 423, Academic Press, New York, London (13)
- KOBAYASHI, K. (1971) *Immunochemistry*, 8, 785 (61, 96, 97, 99, 101)
- KOHLER, H., SHIMIZU, A., PAUL, C., PUTMAN, F.W. (1970) *Science*, 169 56 (67)
- KORHONEN, H. (1981) in "Resistance factors and genetic aspects of mastitis control" (L. Basselik-Chabielska ed.) p. 421, Ossolineum, Warszawa, Poland (28)
- KORNFELD, R. (1978) *Biochemistry*, 17, 1415 (203)
- KORNFELD, R., KELLER, J., BAENZIGER, J., KORNFELD, S. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 3259 (250, 252)
- KORNFELD, S., PLAUT, A.G. (1981) *Rev. Infect. Dis.*, 3, 521 (40, 41, 190)
- KORNFELD, K., REITMAN, H.L., KORNFELD, R. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 6633 (205)
- KORSRUD, F.R., BRANDTZAEG, P. (1980) *Immunology*, 39, 129 (95)
- KORSRUD, F.R., BRANDTZAEG, P. (1981a) *Scand. J. Immunol.*, 13, 271 (95)
- KORSRUD, F.R., BRANDTZAEG, P. (1981b) *Scand. J. Immunol.*, 13, 281 (95)
- KORTT, A., RUBAN, E., SCHOLZ, R., KRATZIN, H., GOTZ, H., HILSCHMANN, N. (1978) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359, 1681 (74)
- KOWNATSKI, E. (1973) *Immunol. Commun.*, 2, 105 (91)
- KOWNATSKI, E., BÄHR, B. (1974) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355, 600 (88)
- KRAEHEBUHL, J.P., RACINE, L., GALARDY, R.E. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 254, 190 (99, 105)
- KRATZIN, H., ALTEVOGT, P., RUBAN, E., KORTT, A., STAROSCIK, K., HILSCHMANN, N. (1975) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1337 (78, 79, 112)

- KRAWCZUK, J., SAWICKI, Z., KRAWCZYNSKI, J. (1978) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 16, 343 (26)
- KRONBORG, I.J., HOWARD, A. (1980) Current Therapeutics, Oct, 21 (6)
- KRUSIUS, T., FINNE, J. (1978) Eur. J. Biochem., 84, 394 (144)
- KÜHN, L.C., KRAEHEBUHL, J.P. (1979a) J. Biol. Chem., 254, 11066 (99, 103)
- KÜHN, L.C., KRAEHEBUHL, J.P. (1979b) J. Biol. Chem., 254, 11072 (103, 104, 105)
- KÜHN, L.C., KRAEHEBUHL, J.P. (1981) J. Biol. Chem., 256, 12490 (97, 99, 101, 103)
- KÜHN, L.C., KRAEHEBUHL, J.P. (1982) Trends Biochem. Sci., 7, 299 (104, 106, 107)
- KUHN, R. (1957) Angew. Chem., 69, 23 (12)
- KUHN, R., BAER, H.H. (1956) Chem. Ber., 89, 504 (14, 256)
- KUHN, R., BAER, H.H., GAUHE, H. (1956) Chem. Ber., 89, 2513 (256)
- KUHN, R., BAER, H.H., GAUHE, H. (1958) Chem. Ber., 91, 364 (256)
- KUHN, R., GAUHE, H. (1962) Chem. Ber., 95, 518 (14)
- KUHN, R., KIRSCHENLOHR, W. (1956) Ann. der Chem., 600, 135 (13)
- KUNKEL, H.G., PRENDERGAST, R.A. (1966) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 910 (74)
- KUNKEL, H.G., SMITH, W.K., JOSLIN, F.G., NATVIG, J.B., LITWIN, S.D. (1969) Nature, 223, 1247 (69)
- KUTTEH, W.H., KOOPMAN, W.J., CONLEY, M.E., EGAN, M.L., MESTECKY, J. (1980) J. Exp. Med., 152, 1424 (109)
- LABIB, R.S., CALVANICO, N.J., TOMASI, T.B. (1976) J. Biol. Chem., 251, 1969 (97)
- LAINÉ, A., HAYEM, A., LEBAS, J., ROMON, A. (1977) Clin. Chim. Acta, 79, 541 (135)
- LALLY, E.T., ZITRON, I.M., FIORINI, R.C., MONTGOMERY, P.C. (1978) in "Secretory Immunity and Infection" (Mc Ghee J.R., Mestecky J. and Babb J.L. eds.) p. 143, Plenum Press, New York (43)
- LAMM, M.E. (1976) Adv. Immunol., 22, 223 (19, 20, 60, 99)
- LAMM, M.E., GREENBERG, J. (1972) Biochemistry, 11, 2744 (96, 97, 98, 99, 101, 102)

- LAMM, M.E., WEISZ-CARRINGTON, P., ROUX, P., Mc WILLIAMS M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J. (1979) in "Immunology of Breast Milk" (Ogra P.L. and Dayton D.H. eds.) p. 105, Raven Press, New York (53)
- LAMPRECHT, C.L., KRAUSE, H.E., MUFSON, M.A. (1976) *J. Infect. Dis.*, 134, 211 (34)
- LASCELLES, A.K., GURNER, B.W., COOMBS, R.R.A. (1969) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 47, 349 (51)
- LASHCHENKO, P. (1909) *Z. Hyg. Infektionskr.*, 64, 419 (24)
- LAURELL, A.B. (1957) *Vox Sang.*, 2, 312 (134)
- LAWRENCE, G., SHANN, F., FREESTONE, D.S., WALKER, P.D. (1979) *Lancet*, 1, 227 (43)
- LAWTON, J.W.M., SHORTRIDGE, K.F. (1977) *Lancet*, 1, 253 (32)
- LEE, G.B., OGILVIE, B.M. (1982) *Adv. Exptl. Med., Biol.*, 144, 247 (19)
- LEMAITRE-COELHO, I., JACKSON, G.D.F., VAERMAN, J.P. (1977) *Eur. J. Immunol.*, 7, 588 (99)
- LEMAITRE-COELHO, I., JACKSON, G.D.F., VAERMAN, J.P. (1978) *Scand. J. Immunol.*, 8, 459 (108)
- LEMETAYER, E., NICOL, L., GRASSET, J., GAUTHIER, R., PIALOUX, J. (1950) *Bull. Acad. Nat. Med. (Paris)*, 134, 22 (36, 37)
- LEPOW, M.L., WARREN, R.J., GRAY, N., INGRAM, V.G., ROBBINS, F.G. (1961) *New Engl. J. Med.*, 264, 1071 (34)
- LEVESQUE, J. (1959) *Ann. Ped.*, 35, 5 (10, 11, 12)
- LEVESQUE, J., AICARDI, P., GAUTIER, M. (1959) *Ann. Ped.*, 35, 30 (10)
- LI, Y.T., LI, S.C. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5153 (257)
- LILJEMARK, W.F., BLOOMQUIST, C.G., OFSTEHAGE, J.C. (1979) *Infect. Immunity*, 26, 1104 (20)
- LIMET, J.N., QUINTART, J., OTTE-SLACHMUYLDER, C., SCHNEIDER, Y.J. (1982) *Acta Biol. Med. Germ.*, 41, 113 (108)
- LIMET, J.N., SCHNEIDER, Y.J., TROUET, A., VAERMAN, J.P. (1980) *Proc. EEC Seminar on the Mucosal Immune System, Bristol* (108)
- LINDBERG, B., LÖNNGREN, J., SVENSSON, S. (1975) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 31, 185 (144)

- LINDH, E. (1975) *J. Immunol.*, 114, 284 (104)
- LINDH, E., BJÖRK, I. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 62, 263 (102, 125)
- LIPPARD, V.W., SCHLOSS, O.M., JOHNSON, P.A. (1936) *Amer. Med. Assoc. J. Dis. Child*, 51, 562 (38)
- LIU, Y.S.V., LOW, T.L.K., INFANTE, A., PUTNAM, F.W. (1976) *Science*, 193, 1017 (68, 69, 74, 78, 79, 83)
- LLOYD, K.O., KABAT, E.A. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, 1470 (268)
- LLOYD, S., SOULSBY, E.J.L. (1978) *Immunology*, 34, 939 (38)
- LODINOVA, R., JOUJA, V. (1977) *Acta Paediatr. Scand.*, 66, 709 (26, 27)
- LUBIN, B., BOESMAN, M.I., MICHAELS, R.H., KENNY, J.F., GITLIN, D. (1964) *J. Pediat.*, 65, 1103 (59)
- LUM, L.G., MUCHMORE, A.V., KEREN, D., DECKER, J., KOSKI, I., STROBER, W., BLAESE, R.M. (1979) *J. Immunol.*, 122, 65 (42)
- LUNDFORD, J., DEUTSCH, H.F. (1957) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 96, 742 (59)
- MAASS, G., BARCKHAUS, C. (1980) *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 246, 294 (34)
- MAGNUSSON, K.E., STENDAHL, O., STJERNSTRÖM, I., EDEBO, L. (1978) *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.*, 86, 113 (52)
- MAGNUSSON, K.E., STENDAHL, O., STJERNSTRÖM, I., EDEBO, L. (1979) *Immunology*, 36, 439 (20)
- MAGNUSSON, K.E., STJERNSTRÖM, I. (1982) *Immunology*, 45, 239 (20)
- MAIYOTH, G. (1949) *Ann. Ped. Basel*, 173, 34 (12)
- MAJUMBAR, A.S., GHOSE, A.C. (1981) *Infect. Immunity*, 32, 9 (45)
- MALE, C.J. (1979) *Infect. Immunity*, 26, 254 (40, 42)
- MANCIAUX, L. (1958) *Thèse de Médecine, Université de Nancy*, n° 70, 55 (12)
- MANCINI, G., CARBONARA, A.D., HEREMANS, J.F. (1965) *Immunochemistry*, 2, 235 (135, 160, 162)
- MARQUART, M., DEISENHOFER, J. (1982) *Immunology Today*, 3, 160 (60, 116, 118)
- MARQUART, M., DEISENHOFER, J., HUBER, R., PALM, W. (1980) *J. Mol. Biol.*, 141, 369 (116)
- MARSHALL, R.D. (1972) *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 673 (85)
- MARSHALL, V.M.E., REITER, B. (1976) *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, Vol. III, 109 (29)

- MARSHALL, V.M.E., REITER, B. (1980) *J. Gen. Microbiol.*, 120, 513 (29)
- MARTINEZ-TELLO, F.J., BRAUN, D.G., BLANC, W.A. (1968) *J. Immunol.*, 101, 989 (99)
- MARTORELL, F., HABICHT, J.P., YARBROUGH, C., LECHTIG, A., KLEIN, R.E., WESTERN, K.A. (1975) *Amer. J. Dis. Child.*, 129, 1296 (5)
- MASON, D.Y., STEIN, H. (1981) *Clin. exp. Immunol.*, 46, 305 (95)
- MASSON, P.L. (1970) in Collection "Mecido Monographies d'Agrégés" (S.A. Arscia, ed) Bruxelles, p. 93 (23)
- MASSON, P.L., HEREMANS, J.F., SCHONNE, E. (1969) *J. Exp. Med.*, 130, 643 (23)
- MATA, L.J., URRUTIA, J.J., GARCIA, B., FERNANDEZ, R. (1969) *Amer. J. Dis. Child.*, 117, 142 (11)
- MATA, L.J., URRUTIA, J.J., LECHTIG, A. (1971) *Amer. J. Clin. Nutr.*, 24, 249 (36)
- MATA, L.J., WYATT, R.G. (1971) *Amer. J. Clin. Nutr.*, 24, 976 (34)
- MATHER, E.L., KOSHLAND, M.E. (1977) in "Immune system : Genetics and Regulation" (E.E. Sercarg, L.A. Herzenberg and E.F. Fox eds.) Symp. Molec. Cell. Biol. 6, 727, Academic Press, New York (95)
- MATSUSHIMA, Y., FUJII, N. (1957) *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, 30, 48 (142, 143)
- MATTHEWS, T.H.J., NAIR, C.D.G., LAWRENCE, M.K., TYRELL, D.A.J. (1976) *Lancet*, 2, 1387 (32)
- MATTINGLY, J.A., WAKSMAN, B.H. (1978) *J. Immunol.*, 121, 1878 (44)
- MAYER, G., KLEIN, M. (1961) in "The mammary gland and its secretions" (Kon S.K. and Crowie A.T. eds.) p. 363, Academic Press New York (51)
- MAYER, J.B. (1956) *Engebir. inn. Med. Kinderbeilk*, 7, 429 (12)
- MAZURIER, J. (1980) Thèse de Doctorat d'Etat n° 486, Lille I, France (21)
- MAZURIER, J., SPIK, G. (1974) *Arch. Intern. Physiol. Bioch.*, 82, 27 (21)
- MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1974) *FEBS-Lett.*, 48, 262 (21)
- Mc CLELLAND, D.B.L., GRATH, J., SAMSON, R.R. (1978) *Acta Paediatr. Scand. Supplt.*, 271, 1 (24)
- Mc CLELLAND, D.B.L., SAMSON, R.R., PARKIN, D.M., SHEARMAN, D.J.C. (1972) *Gut*, 13, 450 (36, 50)
- Mc CLELLAND, D.B.L., van FURTH, R. (1975) *Immunology*, 28, 1099 (26)

- Mc GHEE, J.R., MESTECKY, J., BABB, J.L. (1978) *Adv. exp. Med. Biol.*, 107, 1 (53)
- Mc NABB, P.C., TOMASI, T.B. (1981) *Ann. Rev. Microbiol.*, 35, 477 (32, 38)
- MEHTA, S.K., PLAUT, A.G., CALVANICO, N.J., TOMASI, T.B. (1973) *J. Immunol.*, 111, 1274 (40, 102, 125)
- MEINKE, G.S., SPIEGELBERG, H.L. (1971) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 30, 468 (87)
- MELCHERS, F. (1973) *Biochemistry*, 12, 1471 (85)
- MELCHERS, F., LENNOX, E.S., FACON, M. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 244 (69)
- MESTECKY, J., HAMMACK, W.J., SCHROHENLOHER, R.E., BENNETT, J.C. (1972a) *Protides Biol. Fluids. Proc. Colloq.*, 20, 279 (88)
- MESTECKY, J., KULHAVY, R., KRAUS, F.W. (1972b) *J. Immunol.*, 108, 738 (87)
- MESTECKY, J., Mc GHEE, J.R., CRAGO, S.S., JACKSON, S., KILIAN, M., KIYONO, H., BABB, J.L., MICHALEK, S.M. (1980a) *J. Reticuloendothelial Soc.*, 28 supplement, 45 (32)
- MESTECKY, J., PREUD'HOMME, J.L., CRAGO, S.S., MIHAESCO, E., PRCHAL, J.T., OKOS, A.J. (1980b) *Clin. exp. Immunol.*, 39, 371 (53, 94)
- MESTECKY, J., SCHROHENLOHER, R., KULHAVY, R., WRIGHT, G.P., TOMANA, M. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 544 (88, 92, 94)
- MESTECKY, J., WINCHESTER, R.J., HOFFMAN, T., KUNKEL, H.G. (1977) *J. Exp. Med.*, 145, 760 (94, 95)
- METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., JOLLES, P., MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 622, 308 (21)
- METZ-BOUTIGUE, M.H., MAZURIER, J., JOLLES, J., SPIK, G., MONTREUIL, J., JOLLES, P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 670, 243 (21)
- MEYER, K., GELLHORN, A., PRUDDEN, J.F., LEHMAN, W.L., STEINBERG, A. (1948) *Amer. J. Med.*, 5, 496 (26)
- MEYNELL, G.G. (1963) *Brit. J. Exp. Pathol.*, 44, 209 (12)
- MICHAEL, J.G., RINGENBAK, R., HOTTENSTEIN, S. (1971) *J. Infect. Dis.* 124, 445 (36)
- MICHAELS, R.H. (1965) *J. Immunol.*, 94, 262 (34)
- MICHAELSEN, T.E., FRANGIONE, B., FRANKLIN, E.C. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 883 (116)
- MICHALEK, S.M., Mc GHEE, J.R., MESTECKY, J., ARNOLD, R.R., BOZZO, L., (1976) *Science*, 192, 1238 (43, 44)

- MICHEL, F.B., BOUSQUET, J., TRONC, F., DELON, J. (1977) *Med. Hyg.*, 35, 3514 (20)
- MICKELSON, M.N. (1966) *J. Gen. Microbiol.*, 43, 31 (29)
- MICKELSON, M.N. (1977) *J. Bacteriol.*, 132, 541 (29)
- MILES, A.A., KHIMJI, P.L. (1975) *J. Med. Microbiol.*, 8, 477 (23)
- MILLER, H.R.P., NAWA, Y. (1979) *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 21, 31 (19)
- MIRELMAN, D., NUCHAMOWITZ, Y., IZHAR, M. (1983) *J. Cell Biochem.*, in press (253, 254, 258, 263)
- MITSUOKA, T., HAYAKAWA, K., KIMURA, N. (1974) *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A.*, 226, 469 (10)
- MIZOGUCHI, A., MIZUOCHI, T., KOBATA, A. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 9612 (99, 100, 250)
- MOHR, J.A. (1973) *J. Pediatr.*, 83, 1062 (52)
- MOHR, J.A., LEU, R., MABRY, W. (1970) *J. Surg. Oncol.*, 2, 163 (52)
- MOLE, J.E., BHOWN, A.S., BENNETT, J.C. (1977) *Biochemistry*, 16, 3507 (88, 89)
- MONONEN, I., KRUSIUS, T. (1983) *Carbohydr. Res.*, 112, 165 (144)
- MONTGOMERY, P.C., COHEN, C., SKANDERA, C.A., CONNELLY, K.M. (1979) in "Immunology of Breast Milk" (Ogra P.L. and Dayton D. eds.) p. 115, Raven Press, New York (43)
- MONTGOMERY, P.C., DORRINGTON, K.J., ROCKEY, J.H. (1969) *Biochemistry*, 8, 1247 (73)
- MONTREUIL, J. (1956) *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 242, 192 (14)
- MONTREUIL, J. (1971) *Ann. Nutr. Alim.*, 25, 1 (12)
- MONTREUIL, J. (1982) *Compreh. Biochem.* (Neuberger H. and van Deenen L.L.M. eds.) Vol. 19 B part II, p. 1, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York (174)
- MONTREUIL, J. (1983) *Biochem. Soc. Trans*, 11, 134 (261)
- MONTREUIL, J., BOUQUELET, S., SPIK, G., STRECKER, G., ROMOND, C. (1983) *Communication personnelle* (13)
- MONTREUIL, J., CHOSSON, A., HAVEZ, R., MULLET, S. (1960a) *C.R. Soc. Biol.*, 154, 732 (1, 59, 61, 132)
- MONTREUIL, J., SPIK, G. (1963) "Méthodes colorimétriques de dosage de glucides totaux", *Lab. Chimie Biologique, Fac. Sci. Ed., Lille* (138)
- MONTREUIL, J., TONNELAT, J., MULLET, S. (1960b) *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 413 (1, 21, 23)

- MOORE, C.E.W., CATO, E.P., CUMMINS, C.S., HOLDEMAN, L.V., SMIBERT, R.M., SMITH; L.D.S. (1970) "Outline of Clinical Methods in anaerobic Bacteriology (12)
- MORETTA, L., FERRARINI, M., COOPER, M.D. (1978) Contemp. Topics Immunol., 8, 19 (42)
- MORGAN, O.S., BANKAY, J., QUASH, G.A. (1975) W.I. Med. J., XXIV, 46 (50)
- MORO, E. (1900) Wien. Klin. Wochenschr., 15, 144 (10)
- MORO, E. (1901) Wien. Klin. Wochenschr., 14, 1073 (59)
- MORRISON, M.H., ALLEN, P.Z., BRIGHT, J., JAYOSINGHE, W. (1961) Arch. Biochem. Biophys., 111, 126 (28)
- MORRISON, M.H., HAMILTON, B., STOTZ, E. (1957) J. Biol. Chem., 228, 767 (28)
- MORRISON, S.L., KOSHLAND, M.E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 124 (87, 88)
- MOSMANN, T.R., GRAVEL, Y., WILLIAMSON, A.R., BAUMAL, R. (1978) Eur. J. Immunol., 8, 94 (94, 95)
- MOSTOV, K.E., KRAEHEBUHL, J.P., BLOBEL, G. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7257 (99, 101)
- MOTA, G. (1977) Rev. Roum. Biochim., 14, 39 (61, 62, 74, 85, 189)
- MOTA, G. (1979) Rev. Roum. Biochim., 16, 221 (76)
- MOUTON, R.P., STOOP, J.W., BALLIEUX, R.E., MUL, N.A.J. (1970) Clin. exp. Immunol., 7, 201 (36)
- MÜLDER, J.B. (1971) Lab. Animal Sci., 21, 734, 737 (253)
- MULKS, M.H., PLAUT, A.G. (1978) N. Engl. J. Med., 299, 973 (40, 42)
- MULKS, M.H., PLAUT, A.G., FELDMAN, H.A., FRANGIONE, B. (1980) J. Exp. Med., 152, 1442 (76)
- MULLOCK, B.M., HINTON, R.H., DOBROTA, M., PEPPARD, J., ORLANS, E. (1979) Biochem. Biophys. Acta, 587, 381 (108)
- MULLOCK, B.M., HINTON, R.H., DOBROTA, M., PEPPARD, J., ORLANS, E. (1980) Biochem. J., 190, 819 (105, 107)
- MUNN, E.A., FEINSTEIN, A., MUNRO, A.J. (1971) Nature, 231, 527 (121, 125)
- MURILLO, G.J., GOLDMAN, A.S. (1970) Pediatr. Res., 4, 71 (51, 52)
- MUSOKE, A.J., WILLIAMS, J.F., LEID, R.W., WILLIAMS, C.S.F. (1975) Immunology, 29, 845 (38)
- NAGURA, H., NAKANE, P.K., BROWN, W.R. (1979) J. Immunol., 123, 2359 (95, 99, 105)

- NAGURA, H., SMITH, P.D., NAKANE, P.K., BROWN, W.R. (1981) *J. Immunol.*, 126, 587 (109)
- NAGY, L.K., BHOGAL, B.S., MACKENZIE, T. (1976) *Res. Vet. Sci.*, 21, 303 (20)
- NAMBA, Y., HIDAKA, Y., TAKI, K., MORITOMO, T. (1981) *Infect. Immunity*, 31, 580 (27, 34)
- NATVIG, J.B., KUNKEL, H.G. (1973) *Adv. Immunol.*, 16, 1 (60)
- NEES, S., VEH, R.W., SCHAUER, R., EHRLICH, K. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1027 (257)
- NEILANDS, J.B. (1980) in "Iron in Biochemistry and Medicine" (Jacobs A. and Worwood, M. eds.) Vol. II, p. 529, Academic Press, London, New York (23)
- NEIMANN, N., LAVERGUE, E., MANCIAUX, M., STERLIN, S., PERCEBOIS, T. (1965) *Pediatric*, 139 (12)
- NEUT, C., ROMOND, C., BEERENS, H. (1980) *Reprod. Nutr. Develop.*, 20, 1679 (10, 11)
- NEWCOMB, R.W., ISHIZAKA, K., DE VALD, B.L. (1969) *J. Immunol.*, 103, 215 (37, 96)
- NEWCOMB, R.W., NORMANSELL, D. STANWORTH, D. (1968) *J. Immunol.*, 101, 905 (62, 96)
- NIAZI, S. STATE, D. (1948) *Cancer Res.*, 8, 653 (138)
- NICHOLS, J.H., BEZKOROVAINY, A. (1973) *Biochem. J.*, 135, 875 (15)
- NICHOLS, J.H., BEZKOROVAINY, A. (1974) *Life Sci.*, 14, 967 (15)
- NIEDERMEIER, W., TOMANA, M., MESTECKY, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 527 (88)
- NISONOFF, A., HOPPER, J.E., SPRING, S.B. (1975) *The antibody molecule*, Academic Press, New York (60)
- NISONOFF, A., WISSLER, F.C., LIPMAN, L.N., WOERNLEY, D.L. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, 230 (114)
- NORDBRING, F. (1957) *Acta Pediatr.*, 46, 569 (37)
- NORDEN, N.E., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., AUTIO, S. (1974) *Biochemistry*, 13, 871 (257)
- NORDEN, N.E., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., OCKERMAN, P.A., AUTIO, S. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 6210 (257)
- NORTON, R.G., SHOHL, A.T. (1926) *Amer. J. Dis. Child.*, 32, 183 (12)
- OAKLEY, J.R., Mc WEENY, P.M., HAYES-ALLEN, M., EMERY, J.L. (1976) *Lancet*, 1, 770 (5)

- O'DALY, J.A., CEBRA, J.J. (1971a) *Biochemistry*, 10, 3843 (87, 102)
- O'DALY, J.A., CEBRA, J.J. (1971b) *J. Immunol.*, 107, 436 (87)
- OFEK, I., BEACHEY, E.H. (1980) in "Bacterial Adherence" (Beachey E.H. ed.) series B, Vol. 6, p. 1, Chapman and Hall, London, New York, (7, 8, 15)
- OFEK, I., MIRELMAN, D., SHARON, N. (1977) *Nature*, 265, 623 (16)
- OFEK, I., SHARON, N. (1983) *La Recherche*, 142, 376 (16, 17)
- OGATA, S., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1975) *J. Biochem.*, 78, 687 (247)
- OGRA, P.L., DAYTON, D.H. (1979) in "Immunology of Breast Milk" (Ogra P.L. and Dayton D.H. eds.) Raven Press, New York (53)
- OGRA, S.S., OGRA, P.L. (1978) *J. Pediatr.*, 92, 546 (52)
- OGRA, S.S., OGRA, P.L., LIPPES, J., TOMASI, T.B. (1972) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 139, 570 (99)
- OGRA, S.S., WEINTRAUB, D., OGRA, P.L. (1977) *J. Immunol.*, 119, 245 (52)
- OPDEBEECK, J.P. (1982) *Amer. J. Vet. Med. Ass.*, 181, 1061 (51)
- ORAM, J.D., REITER, B. (1965) *J. Gen. Microbiol.*, 40, 57 (29)
- ORAM, J.D., REITER, B. (1966a) *Biochem. J.*, 100, 373 (29, 31)
- ORAM, J.D., REITER, B. (1966b) *Biochem. J.*, 100, 382 (29)
- ORLANS, E., PEPPARD, J., REYNOLDS, J., HALL, J. (1978) *J. Exp. Med.*, 147, 588 (99, 108)
- ORLANS, E., PEPPARD, J., FRY, J.F., HINTON, R.H., MULLOCK, B.M. (1979) *J. Exp. Med.*, 150, 1577 (108)
- OTNAESS, A.B., ØRSTAVIK, I. (1980) *Acta Path. Microbiol. Scand., Sec. C.*, 88, 15 (34)
- OTNAESS, A.B., ØRSTAVIK, I. (1981) *Infect. Immunity*, 33, 459 (32)
- OTNAESS, A.B., SVENNERHOLM, A.M. (1982) *Infect. Immunity*, 35, 738 (31)
- OUCHTERLONY, O. (1949) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 26, 507 (135, 161)
- PADLAN, E.O., DAVIES, D.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 819 (119)
- PARDO, A.G., LAMM, M.E., PLAUT, A.G., FRANGIONE, B. (1979) *Mol. Immunol.*, 16, 477 (42)
- PARKHOUSE, R.M.E. (1972) *Nature*, 236, 9 (85, 87, 95)
- PARKHOUSE, R.M.E., DELLA CORTE, E. (1973) *Biochem. J.*, 136, 607 (87, 91)

- PARMELY, M.J., BEER, A.E. (1977) *J. Dairy Sci.*, 60, 655 (51)
- PARMELY, M.J., BEER, A.E., BILLINGHAM, R.E. (1976) *J. Exp. Med.*, 144, 358 (51)
- PARMELY, M.J., REATH, D.B., BEER, A.E., BILLINGHAM, R.E. (1977) *Transplant. Proc.*, 9, 1477 (52)
- PARROT, D.M.V. (1978) in "Immunology of breast milk" (Ogra P.L. and Dayton D. eds.) p. 131; Raven Press, New York (54)
- PAZ PARENTE, J., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. (1983) *Anal. Biochem.*, in press (139)
- PEARSE, B.M.F. (1975) *J. Mol. Biol.*, 97, 93 (108)
- PEARSE, B.M.F. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1255 (108)
- PEARSE, B.M.F. (1978) *J. Mol. Biol.*, 126, 803 (108)
- PEETERS, T., VANTRAPPA, G. (1975) *Gut*, 16, 553 (26)
- PEPPARD, J., ORLANS, E., PAYNE, A.W., ANDREW, E. (1981) *Immunology*, 42, 83 (109)
- PERRAUDIN, J.P., PRIEELS, J.P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 718, 42 (47)
- PETUELY, F. (1957) *Biochem. Zts.*, 65, 426 (13)
- PETUELY, F., LYNNAU, V. (1956) *Biochem. Zts.*, 62, 326 (11, 12)
- PICHICHERO, M.E., SOMMERFELT, A.E., STEINHOFF, M.C., INSEL, R.A. (1980) *J. Infect. Dis.*, 142, 694 (36)
- PIERCE, N.F. (1978) *J. Infect. Dis.*, 137, 661 (43)
- PIERCE, N.F., CRAY, W.C., SIRCAR, B.K. (1978) *Infect. Immunity*, 21, 185 (35)
- PIERCE, N.F., KOSTER, F.T. (1980) *J. Immunol.*, 124, 307 (44)
- PIERCE, N.F., REYNOLDS, H.Y. (1975) *J. Infect. Dis.*, 131, 383 (43)
- PINK, J.R.L., BUTTERY, S.H., DE BRIES, G.M., MILSTEIN, C. (1970) *Biochem. J.*, 117, 33 (67)
- PINKU, A., HAIKIN, H., FRIEDMAN, M.G., SAROV, I. (1982) *J. Med. Vir.*, 9, 111 (34)
- PITT, J. (1976) *Pediatrics*, 58, 769 (51)
- PITT, J., BARLOW, B., HEIRD, W.C. (1977) *Pediat. Res.*, 11, 906 (52)
- PITTARD, W.B., POLMAR, S.H., FANAROFF, A.A. (1977) *J. Reticuloendothelial. Soc.*, 22, 597 (52, 120)
- PLAUT, A.G. (1978) *N. Engl. J. Med.*, 298, 1459 (40)

- PLAUT, A.G., GENCO, R.J., TOMASI, T.B. (1974) J. Immunol., 113, 289 (40)
- PLAUT, A.G., GILBERT, J.V., ARTENSTEIN, M.S., CAPRA, J.D. (1975) Science, 190, 1103 (40)
- PLAUT, A.G., GILBERT, J.V., HELLER, I. (1978a) Adv. Exp. Med. Biol., 107, 489 (40)
- PLAUT, A.G., GILBERT, J.V., RULE, A.H. (1978) in "Immunology of *Neisseria gonorrhoeae*, American Society of Microbiology (Brooks G.F., Gotschlich E.C., Holmes, K.K., Sawyer W.D. and Young F.E. eds.) p. 279, Washington (40)
- PLAUT, A.G., GILBERT, J.V., LAMM, M.E., LONGMAID, H.E., MURKOFISKY, N. (1979) Fed. Proc., 38, 1224 (Abst. 5275) (42)
- PLAUT, A.G., GILBERT, J.V., WISTAR, R. (1977) Infect. Immunity, 17, 130 (40)
- PLAUT, A.G., GORBACH, S.L., NAHAS, L. (1967) Gastroenterology, 53, 868 (18)
- PLOTKIN, S.A., KATZ, M. (1974) J. Pediatr., 84, 309 (33)
- POGER, M.E., LAMM, M.E. (1974) J. Exp. Med., 139, 629 (95)
- POKROVSKII, V.I., DEMINA, A.A., CEND, N., DEVIATKINA, N.V., ZHAMBA, G., SEMINA, N.A., OCHIRVAAN, G., CEREN, S. (1978) J. Hyg. Epid. Micro. Immunol., 22, 230 (36)
- POLIS, B.D., SHMUKLER, H.W. (1953) J. Biol. Chem., 201, 475 (28)
- POLJAK, R.J. (1978) CRC Crit. Rev. Biochem., 5, 45 (114)
- POLJAK, R.J. (1975) Nature, 256, 373 (114)
- POLJAK, R.J., AMZEL, L.M., AVEY, H.P., CHEN, B.L., PHIZACKERLEY, R.P., SAUL, F. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3305 (114, 119)
- POLJAK, R.J., AMZEL, L.M., PHIZACKERLEY, R.P. (1976) Prog. Biophys. Molec. Biol., 31, 67 (119)
- POLLACK, S., AISEN, P., LASKY, F.D., VANDERHOFF, G. (1976) Brit. J. Haematol., 34, 231 (24)
- POLONOVSKI, M., LESPAGNOL, A. (1933) Bull. Soc. Chim. Biol., 15, 320 (13)
- PORTER, P. (1969) Biochim. Biophys. Acta, 181, 381 (52)
- PORTER, P., KENWORTHY, R., ALLEN, W.D. (1974) Vet. Rec., 95, 99 (44)
- PORTER, P., LINGGOOD, M.A., CHILDLow, J. (1978) in "Secretory Immunity and Infection" (J.R. Mc Ghee, J. Mestecky and J.L. Eabb eds.) p. 133, Plenum Press, New York (43)

- PORTER, R.R. (1959) *Biochem. J.*, 73, 119 (114)
- PORTER, R.R., WEIR, R.C. (1966) *J. Cell. Physiol.*, 67, Suppl. 1, 51 (69)
- POTTER, M. (1977) *Adv. Immunol.*, 25, 141 (65)
- PRUITT, K.M., TENOVUO, J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 704, 204 (29)
- PUFFER, R.R., SERRANO, C.V. (1973) Report of the Inter-American Investigation of Mortality of Childhood. Pan American Health Organization Scientific Publication, n° 162 (5)
- PURKAYASTHA, S., RAO, C.V.N., LAMM, M.E. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 6583 (99)
- PUSKAS, M., ANTONI, F., PETERFY, F. (1982) *Biochem. Med.*, 27, 135 (51, 52)
- PUTNAM, F.W. (1974) *Prog. Immunol.*, 1, 25 (112)
- PUTNAM, F.W. (1977) in "The plasma Proteins" (Putman F.W. ed.) Vol. III, p. 1, Academic Press, New York, 2nd ed. (74, 85)
- PUTNAM, F.W., FLORENT, G., PAUL, C., SHINODA, T., SHIMIZU, A. (1973) *Science*, 182, 287 (83, 112)
- RAAM, S.V., INMAN, F.P. (1973) *J. Immunol.*, 110, 1044 (85)
- RADL, J., SCHUIT, H.R.E., MESTECKY, J., HIJMANS, W. (1974) *Adv. exp. Med. Biol.*, 45, 57 (94)
- RASCHKE, W., MATHER, E.L., KOSHLAND, M.E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3469 (95)
- RAYNAUD, M. (1959) *Ann. Pediat.*, 35, 8 (15)
- RAYNAUD, M., BIZZINI, B. (1971) *Ann. Nutr. Alim.*, 25, 209 (15)
- RAZIN, S. (1978) *Microbiol. Rev.*, 42, 414 (16)
- REITER, B. (1976) in "Inhibition and Inactivation of vegetative microbes" (F.A. Skinner and W.H. Hugo eds.) p. 31, Academic Press, London (28, 29, 32)
- REITER, B. (1978) *Ann. Rech. Vet.*, 9, 205 (28, 29)
- REITER, B. (1979) in "Oxygen free radicals and tissue damage" CIBA Foundation Symposium n° 65, p. 285, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, New York (28)
- REITER, B. (1981) in "Immunological aspects of Infection in the Foetus and Newborn" (Lambert H.P. and Wood C.B.S. eds.) p. 155, Academic Press, London (26, 28, 29)
- REITER, B., BJÖRCK, L., MARSHALL, V.M.E., LONGMAN, A.G., COUSINS, C.M. (1973/1974) *Ann. Rep. Nat. Inst. Res. Dairying*, 98 (29)

- REITER, B., BROCK, J.H., STEEL, E.D. (1975) *Immunology*, 28, 83 (24)
- REITER, B., MARSHALL, V.M.E., PHILIPS, S.M. (1980) *Res. Vet. Sci.*, 28, 116 (28)
- REITER, B., MØLLER-MADSEN, A. (1963) *J. Dairy Res.*, 30, 419 (27)
- REITER, B., ORAM, J.D. (1967) *Nature*, 216, 328 (28)
- REITER, B., PICKERING, A., ORAM, J.D. (1964) in "International Symposium Food Microbiology 4th (Molin N. ed.) p. 297, Almquist & Wicksell, Uppsala, Sweden (28, 29)
- REITER, B., PICKERING, A., ORAM, J.D., POPE, G.S. (1963) *J. Gen. Microbiol.*, 33, XII (27, 29)
- REMYINGTON, J.S., SCHAFER, I.A. (1968) *Nature*, 217, 364 (96)
- RENSTON, R.H., JONES, A.L., CHRISTIANSEN, A.L., HRADEK, G.T., UNDERDOWN, B.J. (1980) *Science*, 208, 1276 (108)
- RIBADEAU-DUMAS, R. (1983) *La Recherche*, 140, 8 (58)
- RICARDO, M.J., BREWER, J.M., INMAN, F.P. (1974) *Biochem. J.*, 137, 71 (88)
- RICHMAN, L.K., CHILLER, J.M., BROWN, W.R., HANSON, D.G., NELSON, M.V. (1978) *J. Immunol.*, 121, 2429 (44)
- RIESEN, W.F., HUSER, H., SKVARIL, F. (1976) *FEBS-Lett.*, 61, 243, (60, 114, 189)
- RIMINGTON, C. (1931) *Biochem. J.*, 25, 1062 (138)
- RIVIER, D., PAGE, N., ISLIKER, H. (1983) *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 134C, 25 (50)
- ROBERTSON, P.W., COOPER, G.N. (1973) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 51, 575 (43)
- ROGERS, H.J. (1976) *Immunology*, 30, 425 (47)
- ROGERS, H.J., SYNGE, C. (1978) *Immunology*, 34, 19 (47, 50)
- ROHDE, J.E., NORTHRUP, R.S. (1976) in "Acute Diarrhoea in Childhood", CIBA Foundation Symposium, 142, 339 (5)
- ROMOND, C., BEERENS, H., NEUT, C., MONTREUIL, J. (1980) *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 131A, 309 (13)
- ROSE, C.S., KUHN, R., ZILLINKEN, F., GYORGY, P. (1954) *Arch. Biochem. Biophys.*, 49, 123 (13)
- ROSENTHAL, L., LIBERMAN, H. (1931) *J. Infect. Dis.*, 48, 226 (26)

- ROUX, M.E., Mc WILLIAMS, M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M., WEISZ-CARRINGTON, P., LAMM, M.E. (1977) *J. Exp. Med.*, 146, 1311 (51, 52, 54)
- ROWLAND, M.G.M., COLE, T.J., TULLY, M., DOLBY, J.M., HONOUR, P. (1980) *J. Hyg. (Camb.)*, 85, 405 (35, 36)
- RUBEN, F., HOLZMAN, I.R., FIREMAN, P. (1982) *Amer. J. Obstr. Gynecol.*, 143, 518 (52)
- RUDEL, W.S.J., BLENDIS, L.M., WALTERS, C.L. (1977) *Gut*, 18, 73 (28)
- RUSSEL, M.W., BROOKER, B.E., REITER, B. (1977) *J. Comp. Path.*, 87, 43 (28)
- RUSSEL, M.W., BROWN, T.A., MESTECKY, J. (1981) *J. Exp. Med.*, 153, 968 (109)
- RUSSEL, M.W., BROWN, T.A., MESTECKY, J. (1982) *Mol. Immunol.*, 19, 677 (109)
- RUSSEL, M.W., REITER, B. (1975) *J. Reticuloendothelial Soc.*, 18, 1 (28)
- SABIN, A.B. (1950) *Amer. J. Dis. Child.*, 80, 866 (34)
- SABIN, A.B., FIELDSTEEL, A.H. (1962) *Pediatrics*, 29, 105 (31, 34)
- SACK, R.B. (1975) *Ann. Rev. Microbiol.*, 29, 333 (32)
- SAMSON, R.R., MIRTLE, C., Mc CLELLAND, D.B.L. (1979) *Immunology*, 38, 367 (50)
- SARASOMBATH, S., MESTECKY, J., SKVARIL, F. (1977) *Clin. exp. Immunol.*, 29, 67 (94)
- SARKAR, N.H., CHARNEY, J., DION, A.S., MOORE, D.H. (1973) *Cancer Res.*, 33, 626 (31)
- SAVAGE, D.C. (1978) *Amer. J. Clin. Nutr.*, 31, 131 (19)
- SAVAGE, D.C., DUBOS, R., SCHAEGLER, R. (1968) *J. Exp. Med.*, 127, 67 (18)
- SAVILAHTI, E. (1973) *Clin. exp. Immunol.*, 13, 395 (20)
- SAVVIDOU, G., KLEIN, M., HORNE, C., HOFMANN, T., DORRINGTON, K.J. (1981) *Mol. Immunol.*, 18, 793 (69)
- SCHADE, A., CAROLINE, L. (1944) *Science*, 100, 14 (23)
- SCHEIDEGGER, J.J. (1955) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103 (134)
- SCHLESINGER, J.J., COVELLI, H.D. (1977) *Lancet*, 2, 529 (52)
- SCHLOSSMAN, A., MORO, E. (1903) *Munch. Med. Wochschr.*, 1, 597 (59)
- SCHOUB, B.D., PROZESKY, O.W., LECATSAS, G., OOSTHUIZEN, R. (1977) *J. Med. Microbiol.*, 11, 25 (34)

- SCHREIBER, R.D., MORRISON, D.C., PODACK, E.R., MULLER-EBERHARD, H.J. (1979) *J. Exp. Med.*, 149, 870 (45)
- SCHUBERT, J., GRUNBERG, A. (1949) *Schweiz Med. Wschr.*, 79, 1007 (36)
- SCHWICK, G., ESSER, H.O., KOCH, F. (1959) *Behringwerk-Mitteil.*, 37, 11 (59)
- SEELIG, L.L., BEER, A.E. (1978) *Biol. Reprod.*, 18, 736 (54)
- SELLWOOD, R., GIBBONS, R.A., JONES, G.W., RUTTER, J.M. (1975) *J. Med. Microbiol.*, 8, 405 (16, 31)
- SHARON, N., ESHDAT, Y., SILVERBLATT, F.J., OFEK, I. (1981) in "Bacterial adherence to cell surface sugars" (K. Elliott, M. O'Connor and J. Whelan eds.) 80th Ciba Foundation Symposium, p. 119, Pitman Medical, London (16, 253)
- SHIMIZU, A., PUTNAM, F.W., PAUL, C., CLAMP, J.R., JOHNSON, I. (1971) *Nature New Biol.*, 231, 73 (83)
- SHINODA, T., TITANI, K., PUTNAM, F.W. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 4475 (67)
- SHUSTER, J. (1971) *Immunochemistry*, 8, 405 (104)
- SILVERTON, E.W., NAVIA, M.A., DAVIES, D.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5140 (85, 86)
- SIMMON, A., YOLKEN, R.H., MATA, L. (1979) *Acta Paediatr. Scand.*, 68, 161 (34, 37)
- SKAUG, K., OTNAESS, A.B., ØRSTAVIK, I., JERVE, F. (1982) *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C.*, 90, 21 (36)
- SKVARIL, F., REJNEK, I. (1958) *Cesk. Pediatr.*, 13, 793 (59)
- SLETTEN, K., CHRISTENSEN, T.B., BRANDTZAEG, P. (1975) *Immunochemistry*, 12, 783 (97, 98, 99)
- SMITH, H.W., CRABB, W.E. (1961) *J. Pathol. Bacteriol.*, 82, 53 (10)
- SMITH, C.W., GOLDMAN, A.S. (1968) *Pediatr. Res.*, 2, 103 (51)
- SMITH, L.D.S., HOLDEMAN, L.V. (1968) *Pathogenic Anaerobic Bacteria*, 17, 423 (12)
- SMITH, T.J., BUESCHER, E.L., TOP, F.H., ALTEMEIER, W.A., Mc COWN, J.M. (1970) *J. Infect. Dis.*, 122, 239 (44)
- SOCKON, D.J., JEEJEEBHOY, K.N., BAZIN, H., UNDERDOWN, B.J. (1979) *J. Exp. Med.*, 150, 1538 (105, 108)
- SOCKEN, D.J., SIMMS, E.S., NAGY, B., FISHER, M.M., UNDERDOWN, B.J., (1981a) *J. Immunol.*, 127, 316 (109)

- SOCKEN, D.J., SIMMS, E.S., NAGY, B., FISHER, M.M., UNDERDOWN, B.J. (1981b) *Mol. Immunol.*, 18, 345 (109)
- SOCKEN, D.J., UNDERDOWN, B.J. (1978) *Immunochemistry*, 15, 499 (103)
- SØLLING, K., SØLLING, J., RØMER, F.K. (1981) *Acta Med. Scand.*, 209, 473 (71)
- SOUTH, M.A., COOPER, M.D., WOLLHEIM, F.A., HONG, R., GOOD, R.A. (1966) *J. Exp. Med.*, 123, 615 (96, 104)
- SOX, H.C., HOOD, L. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66, 975 (69)
- SPACKMAN, P.H., STEIN, W.H., MOORE, S. (1958) *Anal. Chem.*, 30, 1190 (138)
- SPIEGELBERG, H.L. (1974) *Adv. Immunol.*, 19, 259 (119)
- SPIEGELBERG, H.L., ABEL, C.A., FISHKIN, B.G., GREY, H.M. (1970) *Biochemistry*, 9, 4217 (69)
- SPIEGELBERG, H.L., GÖTZE, O. (1972) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 31, 655 (39)
- SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J. (1975) *FEBS-Lett.*, 50, 296 (256)
- SPIK, G., BRUNET, B., MAZURIER-DEHAINE, C., FONTAINE, G., MONTREUIL, J. (1982a) *Acta Paediatr.*, 71, 979 (23)
- SPIK, G., CHERON, A., MONTREUIL, J., DOLBY, J.M. (1978) *Immunology*, 35, 663 (47)
- SPIK, G., JORIEUX, S., MAZURIER, J., MONTREUIL, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, in press (45)
- SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., van HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G. (1982b) *Eur. J. Biochem.*, 121, 413 (21, 22, 203, 256)
- SPIK, G., MONTREUIL, J. (1983) *Bull. Eur. Physiopathol. Resp.*, in press (23, 24)
- SPRINGGS, B., EPSTEIN, W.V. (1974) *J. Rheumatol.*, 1, 287 (71)
- STAFFORD, H.A., KNIGHT, K.L., FANGER, M.W. (1982) *J. Immunol.*, 128, 2201 (119)
- STEELE, E.J., CHAICUMPA, W., ROWLEY, D. (1974) *J. Infect. Dis.*, 130, 93 (35)
- STEPHENS, S., DOLBY, J.B., MONTREUIL, J., SPIK, G. (1980) *Immunology*, 41, 597 (47, 49, 50)
- STOCKERT, R.J., KRESSNER, M.S., COLLINS, J.C., STERNLIEB, I., MORELL, A.G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6229 (111)
- STOLIAR, O.A., PELLELY, R.P., KANIECKI-GREEN, E., KLAUS, M.H., CARPENTER, C.C.J. (1976) *Lancet*, 1, 1258 (33, 37)

- STOTT, D.I. (1976) *Immunochemistry*, 13, 157 (91)
- STOTT, D.I., WILLIAMSON, A.R. (1982) in "Compreh. Biochem." (Neuberger A. ed.) Vol. 19 B, part II, p. 189, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam (60, 65)
- STRECKER, G., FOURNET, B., MONTREUIL, J., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIEGENTHART, J.F.G., DUBESSET, D. (1978) *Biochimie*, 60, 725 (144, 256)
- STROBER, W., KRAKAUER, R., KLAEVEMAN, H.L., REYNOLDS, H.Y., NELSON, D.L. (1976) *New Engl. J. Med.*, 294, 351 (104)
- STROMBECK, D.R., HARROLD, D. (1974) *Infect. Immunity*, 10, 1266 (18)
- STURN, B., SCHNEVEIS, K.E. (1978) *Med. Microbiol. Immunol.*, 165, 119 (44)
- SVEHAG, S.E., BLOTH, B. (1970) *Science*, 168, 847 (121)
- SVANBORG-EDEN, C., SVENNERHOLM, A.M. (1978) *Infect. Immunity*, 22, 790 (20)
- SVENNERHOLM, A.M., HANSON, L.A., HOLMGREN, J., JALIL, F., LINDBLAD, B.S., KHAN, S.R., NILSSON, A., SVENNERHOLM, B. (1981) *J. Infect. Dis.*, 143, 707 (44)
- SVENNERHOLM, A.M., HOLMGREN, J., HANSON, L.A., LINDBLAD, B.S., QUESHI, F., RAHIMTOOLA, R.J. (1977) *Scand. J. Immunol.*, 6, 1345 (43)
- SVENNERHOLM, A.M., LANGE, S., HOLMGREN, J. (1978) *Infect. Immunity*, 21, 1 (36)
- SWARBRICK, E.T., STOKES, C.R., SOOTHILL, J.F. (1979) *Gut*, 20, 121 (44)
- SYREN, E., RAESTE, A.M. (1971) *Acta Haematol.*, 45, 29 (26)
- TAI, T., ITO, S., YAMASHITA, K., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 968 (252)
- TAMURA, Z., NAKAJIMA, T., SAMEJIMA, K., YOSHLOKA, M., NAKAMURA, F., NAKAMURA, H., INAGAKI, M. (1972) *Proc. Jap. Med. Acad.*, 48, 138 (15)
- TASSOVATZ, B., KOTSICH, A. (1961) *Ann. Ped.*, 37, 285 (11)
- TASSOVATZ, B., KRAGOUYEVITCH (1964) *Ann. Ped.*, 40, 291 (11)
- THOMAS, E.L. (1983) in "Lactoperoxydase system : chemistry and biological significance" (Pruitt K.M. and Tenovua J. eds.) Marcel Dekker Inc., in press (29, 30)
- THOMPSON, R.A., ASQUITH, P. (1970) *Clin. exp. Immunol.*, 7, 491 (60)
- THOMPSON, R.E., REYNOLDS, H.Y., WAXDAL, M.J. (1975) *Biochemistry*, 14, 2853 (97)
- THOMSEN, O. (1909) *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 3, 539 (59)

- TILLMANS, J., PHILIPPI, K. (1929) *Biochem. Z.*, 215, 36 (138)
- TIMMERMAN, W.A. (1931) *Z. Immun. Forsch.*, 70, 388 (36)
- TISSIER, H. (1900) Recherche sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. (10, 11)
- TISSIER, H. (1905) *Ann. Inst. Pasteur*, 19, 109 (11)
- TOMANA, M., NIEDERMEIER, W., MESTECKY, J., SKVARIL, F. (1976) *Immunochemistry*, 13, 325 (80)
- TOMASI, T.B. (1965) Thesis Rockefeller University, New York (60)
- TOMASI, T.B. (1972) *N. Engl. J. Med.*, 287, 500 (33)
- TOMASI, T.B. (1976) *The immune system of secretion*, Prentice Hall Inc, Englewood Cliffs (60, 107)
- TOMASI, T.B., BIENENSTOCK, J. (1968) *Adv. Immunol.*, 9, 1 (60, 62, 96, 101, 121, 122)
- TOMASI, T.B., CALVANICO, N. (1968) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 27, 617 (62)
- TOMASI, T.B., CZERWINSKY, D.S. (1968) in "Immunologic deficiency Diseases in Man", 3rd Developmental Immunology Workshop, Vol. 4, p. 270 (62, 104)
- TOMASI, T.B., CZERWINSKI, D.S. (1976) *Scand. J. Immunol.*, 5, 647 (94)
- TOMASI, T.B., GREY, H.M. (1972) *Prog. Allergy*, 16, 81 (60, 99, 109, 111)
- TOMASI, T.B., TAN, E.M., SOLOMON, A., PRENDERGAST, R.A. (1965) *J. Exp. Med.*, 121, 101 (59, 101, 102)
- TOPPET, Y.J., OKA, T. (1974) Some aspects of mammary gland development in the mature mouse in lactation. "A comprehensive treatise" (Larson B.L. and Smith V.R. eds.) p. 327, Academic Press, New York (53)
- TORANO, A., PUTNAM, F.W. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 966 (69, 74)
- TORANO, A., TZUZUKIDA, Y., LIU, Y.S.V., PUTNAM, F.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2301 (74, 84)
- TOURVILLE, D.R., ADLER, R.H., BIENENSTOCK, J., TOMASI, T.B. (1969) *J. Exp. Med.*, 129, 411 (99)
- TOURVILLE, D.R., OGRA, S.S., LIPPES, J., TOMASI, T.B. (1970) *Amer. J. Obst. Gynecol.*, 108, 1102 (99)
- TRAMONT, E.C. (1977) *J. Clin. Invest.*, 59, 117 (20)
- TSUZUKIDA, Y., WANG, C.C., PUTNAM, F.W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1104 (74, 75)

- UNDERDOWN, B.J., KOCZEKAN, K., SOCKEN, D., WEICKER, J. (1977) *Immunochemistry*, 14, 111 (96, 102, 125)
- UNDERDOWN, B.J., SOCKEN, D.J. (1978) in "Secretory Immunity and Infection" Proceedings of the International Symposium (Mc Ghee J.R., Mestecky, J. and Babb J.L. eds.) p. 503, Plenum Press, New York (97)
- VAERMAN, J.P. (1970) Thèse Université Louvain, Sintal, Louvain (71)
- VAERMAN, J.P. (1973) *Res. Immunobiol. Immunochem.*, 3, 91 (60, 62)
- VAERMAN, J.P., ANDRE, C., BAZIN, H., HEREMANS, J.F. (1973) *Eur. J. Immunol.*, 3, 580 (109)
- VAERMAN, J.P., HEREMANS, J.F. (1966) *Science*, 153, 647 (74)
- VAERMAN, J.P., LEMAITRE-COELHO, I. (1979) in "Protein Transmission through living membranes" (Hemmings W.A. ed.) pp. 383, Elsevier, Amsterdam, North Holland, Biomedical Press (108)
- VAERMAN, J.P., LEMAITRE-COELHO, I., JACKSON, G.D. (1978) in "Secretory Immunity and Infection", Proceedings of the International Symposium (Mc Ghee J.R., Mestecky J. and Babb J.L. eds.) 107, p. 233, Plenum Press, New York (108)
- VAKIL, J.R., CHANDAN, R.C., PARRY, J.M., SHAHANI, K.M. (1969) *J. Dairy Sci.*, 52, 1192 (26)
- VALENTINE, R.C., GREEN, N.M. (1967) *J. Mol. Biol.*, 27, 615 (114)
- VAN EPPS, D.E., REED, K., WILLIAMS, R.C. (1978) *Cell Immunol.*, 36, 363 (42)
- VAN EPPS, D.E., WILLIAMS, R.C. (1976) *J. Exp. Med.*, 144, 1227 (42)
- van HALBBEK, H., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., SPIK, G., CHERON, A., MONTREUIL, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 675, 293 (256)
- van LOGHEM, E., De LANCE, G., KOINSTINEN, J. (1976) *Scand. J. Immunol.*, 5, 161 (76)
- Van MUNSTER, P.J., STOELINGA, G.B.A., POELS-ZANDERS, S. (1969) *Immunology*, 17, 165 (102)
- Van MUNSTER, P.J., STOELINGA, G.B.A., POELS-ZANDERS, S. (1971) *Immunochemistry*, 8, 471 (96, 97, 99)
- VEERHUIS, R., KIJLSTRA, A. (1982) *Exp. Eye. Res.*, 34, 257 (50)
- Vliegentaht, J.F.G., DORLAND, L., van HALBEEK, H. (1983) *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 41, 209 (156)
- Vliegenthart, J.F.G., van HALBEEK, H., DORLAND, L. (1981) *Pure Appl. Chem.*, 53, 45 (156)
- von MURALT, G., GUGLER, E., ROULET, D.L.A. (1961) in "Protides of the biological fluids" Proceedings of the 8th Colloquium, Brugge 1960, p. 166, Elsevier, Amsterdam (59)

- VYAS, G.N., FUDENBERG, H.H. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 1211 (69)
- WAGNER, M., STARR, T.J. (1969) in "Germfree Biology", Vol. 5, p. 889, Plenum Press, New York (11)
- WAKELIN, D. (1978) Nature, 273, 617 (38)
- WALDMAN, R.H., MACH, J.P., STELLA, M.M., ROWE, D.S. (1970) J. Immunol., 105, 43 (60)
- WALKER, W.A., ISSELBACHER, K.J. (1974) Gastroenterology, 67, 531 (19, 38)
- WALKER, W.A., ISSELBACHER, K.J. (1977) N. Engl. J. Med., 297, 767 (19)
- WALKER, W.A., ISSELBACHER, K.J., BLOCH, K.J. (1972) Science, 177, 608 (38)
- WALKER, W.A., LAKE, A.M., BLOCH, K.J. (1980) in "Mechanism in Mucosal Immunity", Proc. Int. Workshop Mucosal Immun., Nov.20-21, Bethesda (38)
- WARDLAW, A.C. (1962) J. Exp. Med., 115, 123 (45)
- WARREN, R.J., LEPOW, M.L., BARTSCH, G.E., ROBBINS, F.C. (1961) Amer. J. Dis. Child., 102, 685 (34)
- WATANABE, S., BARNIKOL, H.U., HORN, J., BERTRAM, J., HILSCHMANN, N. (1973) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 1505 (112)
- WATSON, D.L. (1980) Aust. J. Biol. Sci., 33, 403 (51)
- WEICKER, J., UNDERDOWN, B.J. (1975) J. Immunol., 114, 1337 (96, 103)
- WEINBERG, E.D. (1966) Bact. Rev., 30, 136 (23)
- WEINBERG, E.D. (1974) Science, 184, 952 (25)
- WEINHEIMER, P.F., MESTECKY, J., ACTON, R.T. (1971) J. Immunol., 107, 1211 (87)
- WEISER, M.H. (1973) J. Biol. Chem., 258, 2536 (255)
- WEISZ-CARRINGTON, P., ROUX, M.E., LAMM, M.E. (1977) J. Immunol., 119, 1306 (53)
- WEISZ-CARRINGTON, P., ROUX, M.E., Mc WILLIAMS, M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M., LAMM, M.E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2928 (53)
- WEITZMAN, S., SCHARFT, M.D. (1976) J. Mol. Biol., 102, 237 (85)
- WELSH, J.K., MAY, J.T. (1979) J. Pediatr., 94, 1 (32, 33, 39)
- WELSH, J.K., SKURRIE, I.J., MAY, J.T. (1978) Infect. Immunity, 19, 395 (31, 34)
- WERNER, I., ODIN, L. (1952) Acta Soc. Med. Upsaliensis, 57, 230 (238)

- WILLIAMS, R.C., GIBBONS, R.J. (1972) *Science*, 177, 697 (19)
- WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I. (1980) *Cell*, 21, 67 (108)
- WINKELHAKE, J.I. (1978) *Immunochemistry*, 15, 695 (118)
- WINTROBE, M.M. (1967) *Clinical Haematology*, Philadelphia, Lea and Febiger, p. 133 (23)
- WOLFE, L.S., SENIOR, R.G., NG YING KIN, N.M.K. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 123 (256)
- WOLFENSTEIN-TODEL, C., PRELLI, F., FRANGIONE, B., FRANKLIN, E.C. (1973) *Biochemistry*, 12, 5195 (76)
- WONG, D.M., WONG, A.I.H. (1930) *Nat. M. J. Clinic.*, 16, 673 (37)
- WRIGHT, R.C., TRAMER, J. (1958) *J. Dairy Res.*, 25, 104 (27, 29)
- WYATT, R.B., GARCIA, B., CACERES, A., MATA, L.J. (1972) *Arch. Lat. Amer. Nutr.*, 22, 629 (36)
- YANG, C.Y., KRATZIN, H., GOTZ, H., HILSCHMANN, N. (1979) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 260, 1919 (74)
- YOLKEN, R.H., WYATT, R.G., MATA, L., URRUTIA, J.J., GARCIA, B., CHANOCK, R.M., KAPIKIAN, A.Z. (1978) *J. Pediatr.*, 93, 916 (34)
- YOSIZAWA, Z., SATO, T., SCHMID, K. (1966) *Clin. Chim. Acta*, 23, 147 (142)
- YPHANTIS, D.A. (1964) *Biochemistry*, 3, 297 (136)
- ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C., VINCENDON, G. (1972) *J. Chromatogr.*, 69, 291 (138)
- ZEVENBERGEN, J.L., MAY, C., WANSON, J.C., VAERMAN, J.P. (1980) *Scand. J. Immunol.*, 11, 93 (99, 108)
- ZIKAN, J. (1973) *Immunochemistry*, 10, 351 (87, 88)
- ZIKAN, J., MESTECKY, J., SCHROHENLOHER, R.E., TOMANA, M., KULHAVY, R. (1972) *Immunochemistry*, 9, 1185 (64, 73)
- ZIMMERMAN, B., GREY, H.M. (1971) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 30, 594 (71)
- ZIPURSKY, A., BROWN, E.J., BIENENSTOCK, J. (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, 181 (39)

