

50376  
1984  
291

50376  
1984  
291

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année 1984

N° d'ordre : 614

## THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

### DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES OPTION BIOCHIMIE

par

**Jean ROUSSEAU**



\*0300137799\*

# LES SOUS-CLASSES D'IMMUNOGLOBULINE G DU RAT

ÉTUDES IMMUNOCHIMIQUES ET ANALYSE DE LEUR AFFINITÉ  
POUR LA PROTÉINE A DE S. AUREUS

présentée le 27 Avril 1984 devant la Commission d'Examen

#### JURY

Président : Professeur J. MONTREUIL  
Rapporteurs : Professeur G. BISERTE  
Professeur H. BAZIN  
Professeur G. SPIK  
Examineurs : Professeur M. DAUTREVAUX  
Professeur J-P. VAERMAN



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. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
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. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre -
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
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. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
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. BKOUCHE 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. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRIDOUX Michel	Chimie physique
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. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
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. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
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. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse -
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique atomique et moléculaire riques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
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 MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
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. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
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  
M. WARTEL Michel  
M. WATERLOT Michel  
M. WERNER Georges  
M. WOSNIAK Michel  
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie infrarouge et Raman  
Chimie inorganique  
Géologie générale  
Informatique fondamentale appliquée  
Hydrométallurgie  
Algèbre

A mes parents

A mes grand-parents

A mes beaux-parents

A toute ma famille

A mes amis

A Roselyne,

A Ludivine

Je tiens à exprimer, ici, toute ma gratitude à mes Juges :

**Monsieur le Professeur J. MONTREUIL**, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de présider le Jury de cette thèse. Vous m'avez toujours accueilli avec bienveillance et disponibilité au cours des années de préparation à cette thèse ; j'ai pu bénéficier de vos précieux conseils et de votre aide. Veuillez accepter, avec mes sincères remerciements, l'expression de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur G. BISERTE**, le caractère attrayant de votre enseignement dans le cadre de la Maîtrise de Biologie Humaine a suscité chez moi la "vocation" de chercheur. Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir dans votre Institut et de me confier le sujet de cette thèse. Je tiens à vous remercier de l'intérêt que vous avez porté à l'évolution de ce travail. Je vous prie d'accepter le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux attachement.

**Monsieur le Professeur H. BAZIN**, votre aide, vos précieux conseils, et toutes les discussions fructueuses que nous avons pu avoir durant ces dernières années ont été déterminants pour l'évolution de ce travail. Je suis très heureux de vous retrouver ici en tant que rapporteur de cette thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

**Mademoiselle le Professeur G. SPIK**, vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être le rapporteur de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et du très bon accueil que j'ai reçu dans votre laboratoire. Soyez assurée de ma respectueuse gratitude.

**Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX**, c'est une grande joie pour moi de vous compter parmi mes juges. C'est vous qui avez guidé mes premiers pas dans la recherche avec compétence et bienveillance. J'ai été très marqué par la clarté de votre enseignement et la rigueur de votre esprit scientifique. Cette thèse est également pour moi l'occasion de vous remercier de m'avoir confié de nombreuses responsabilités dans le laboratoire de Biochimie de l'Hôpital B. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon sincère attachement.



**Monsieur le Professeur J.P. VAERMAN**, vous m'avez fait l'honneur de vous intéresser à ce travail. Votre grande compétence dans le domaine des immunoglobulines me fait solliciter votre indulgence pour juger cette thèse. Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

\*\*\*\*\*

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui ont contribué à ce travail.

Je remercie chaleureusement l'équipe "Immunoglobulines" :

Roselyne ROUSSEAU et Jacques BONNETERRE  
pour leur collaboration et discussions fructueuses

Josiane HERNO, Anne-Marie MIR et Marie-Thérèse PICQUE  
pour leur précieuse et efficace collaboration technique

Daniel DEFFRASNES et Daniel DUVIEUXBOURG  
pour leur aide efficace au sein du service animalerie.

Mes remerciements s'adressent également à :

Madame M.H LOUCHEUX et Monsieur J.P AUBERT  
pour les études de dichroïsme circulaire

Messieurs P. SAUTIERE, G. BRIAND et Madame D. BELAICHE  
pour les études de séquence peptidique

Mademoiselle B. PLATTEAU et Messieurs J.P KINTS et J.M MALACHE  
pour leur aide efficace dans le cadre de la collaboration avec l'Unité  
d'Immunologie Expérimentale du Professeur H. BAZIN

Madame M. BLANQUET  
pour la dactylographie des articles et celle des figures et tableaux.

Madame Y. VENDEL  
pour la dactylographie du texte.

Mesdames M.T GARET, M.C DUVIEUXBOURG et N. CREPEL  
pour les reproductions photographiques.

Cette thèse est également pour moi l'occasion d'assurer de ma sympathie l'ensemble  
du personnel de l'IRCL - U124 INSERM et de remercier tous ceux qui m'ont accordé  
leur collaboration, leur aide et leur amitié.

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur la Cellule Normale et Cancéreuse (U - 124 INSERM) et à l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE (Directeur : Professeur G. BISERTE).

\*\*\*\*\*

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

## PUBLICATIONS

1. DIFFERENCES IN SENSITIVITY TO REDUCTION OF RAT IMMUNOGLOBULIN IgG SUBCLASSES  
J. ROUSSEAU, H. BAZIN et G. BISERTE (1979)  
FEBS LETT., 98, 359-362.
2. RAT IMMUNOGLOBULINS  
J. ROUSSEAU et H. BAZIN (1979)  
VET. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL., 1, 61-78.
3. THE DIFFERENTIAL ENZYME SENSITIVITY OF RAT IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES TO PAPAINE AND PEPSIN  
J. ROUSSEAU, G. BISERTE et H. BAZIN (1980)  
MOL. IMMUNOL., 17, 469-482.
4. TRYPTIC CLEAVAGE OF RAT IgG : A COMPARATIVE STUDY BETWEEN SUBCLASSES  
J. ROUSSEAU, R. ROUSSEAU-PREVOST, H. BAZIN et G. BISERTE (1981)  
IMMUNOL. LETT., 3, 93-98.
5. RAT IgG SUBCLASSES : DIFFERENCES IN AFFINITY TO PROTEIN A-SEPHAROSE  
J. ROUSSEAU, M. T. PICQUE, H. BAZIN et G. BISERTE (1981)  
MOL. IMMUNOL., 18, 639-645.
6. COMPARATIVE STUDY OF THE CONFORMATIONAL FEATURES OF RAT IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES BY CIRCULAR DICHROISM  
J. ROUSSEAU, J. P. AUBERT, M. H. LOUCHEUX-LEFEBVRE (1982)  
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 701, 93-101.

7. OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PREPARATION OF F(ab) AND F(ab')<sub>2</sub> FRAGMENTS FROM MONOCLONAL IgG BELONGING TO THE DIFFERENT RAT IgG SUBCLASSES  
J. ROUSSEAU, R. ROUSSEAU-PREVOST et H. BAZIN (1983)  
J. IMMUNOL. METHODS, 64, 141-146.
8. PROTEOLYSIS OF RAT IgG SUBCLASSES BY S. AUREUS V8 PROTEASE  
J. ROUSSEAU, R. ROUSSEAU-PREVOST, H. BAZIN et G. BISERTE (1983)  
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 748, 205-212.

#### COMMUNICATIONS

1. SENSITIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES OF SUBCLASSES OF RAT IgG  
J. ROUSSEAU, H. BAZIN et G. BISERTE (1978)  
4th European Immunology Meeting, BUDAPEST, 12-14 Avril 1978,  
ABSTRACTS pp 93.
2. TRYPTIC CLEAVAGE OF RAT MONOCLONAL IgG : PRODUCTION OF A FRAGMENT RELATED TO THE VH DOMAIN FROM RAT IgG1 AND IgG2a  
J. ROUSSEAU, H. BAZIN et G. BISERTE (1980)  
4th International Congress of Immunology, PARIS 21-26 Juillet 1980.  
ABSTRACT n° 1.1.12.
3. RAT IgG SUBCLASSES : DIFFERENCES IN AFFINITY TO PROTEIN A-SEPHAROSE  
R. ROUSSEAU-PREVOST, J. ROUSSEAU, H. BAZIN et G. BISERTE (1980)  
4th International Congress of Immunology, PARIS 21-26 Juillet 1980.  
ABSTRACT n° 1.2.21.

4. AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF RAT IgG SUBCLASSES ON LECTINS  
COVALENTLY LINKED TO SEPHAROSE 4B  
J. ROUSSEAU, H. DEBRAY, R. ROUSSEAU-PREVOST et G. BISERTE  
(1981)  
4th International Symposium in Affinity Chromatography and Related  
Techniques, VELDHOVEN, 22-26 Juin 1981. ABSTRACT n° 1-8.
  
5. ISOLATION OF RAT IgG SUBCLASSES BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY  
ON PROTEIN A-SEPHAROSE  
J. ROUSSEAU, R. ROUSSEAU-PREVOST, H. BAZIN et G. BISERTE  
(1981)  
4th International Symposium on Affinity Chromatography and Related  
Techniques, VELDHOVEN, 22-26 Juin 1981. ABSTRACT n° 1-43.

Nos recherches ont bénéficié du contrat suivant :

C.R.L. INSERM 80.30.28 : " Sous-classes d'immunoglobulines G du Rat.  
Etudes des relations entre structure et activité biologique."

\*\*\*\*\*

## TABLE DES MATIERES

	page
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE : LES SOUS-CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES G. DONNEES GENERALES</u>	5
<u>CHAPITRE 1</u>	
<u>NOMENCLATURE DES SOUS-CLASSES D'IGG DANS DIFFERENTES ESPÈCES ANIMALES.....</u>	7
<u>CHAPITRE 2</u>	
<u>LES SOUS-CLASSES D'IGG : DIFFERENCES IMMUNOCHIMIQUES.....</u>	10
<u>A - LA STRUCTURE DE L'IMMUNOGLOBULINE G : DONNEES GENERALES.....</u>	10
1. Modèle de structure des IgG.....	10
2. L'organisation de l'immunoglobuline G en domaines.....	12
3. Protéolyse enzymatique des IgG.....	12
4. Structure tridimensionnelle de l'IgG.....	15
<u>B - LES PONTS DISULFURE INTER-CHAINES DES SOUS-CLASSES D'IgG : DIFFERENCES DE SENSIBILITE A LA REDUCTION ET A LA REOXYDATION</u>	15
1. IgG humaines.....	15
2. IgG de Souris.....	18
<u>C - DIFFERENCES DE SENSIBILITE DES SOUS-CLASSES D'IgG A LA PROTEOLYSE ENZYMATIQUE.....</u>	18
1. IgG humaines.....	19
1.1. Action de la papaïne.....	19
1.2. Action de la pepsine.....	21
1.3. Autres enzymes.....	21
1.3.1. Trypsine.....	21
1.3.2. Plasmine.....	21
1.3.3. Armillaria mellea protéase.....	22
1.3.4. Elastase lysosomiale des polynucléaires.....	22
2. IgG de Souris.....	22



3. IgG d'autres espèces animales.....	24
3.1. IgG de Cobaye.....	24
3.2. IgG bovines.....	27
3.3. IgG de Chèvre.....	27
3.4. IgG de Lapin.....	27
4. CONCLUSIONS.....	28
 D - DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE SOUS-CLASSES D'IgG.....	 29
1. Séquence en acides aminés.....	30
2. Structure des glycanes.....	38
 E - DIFFERENCES CONFORMATIONNELLES ENTRE SOUS-CLASSES D'IgG.....	 40
 <u>CHAPITRE 3</u>	
<u>L'AFFINITÉ DES SOUS-CLASSES D'IGG POUR LA PROTÉINE A</u>	
<u>DE S. AUREUS : UN EXEMPLE DE RELATIONS ENTRE LEURS</u>	
<u>DIFFÉRENCES STRUCTURALES ET LEURS DIFFÉRENCES</u>	
<u>D'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE.....</u>	
	42
 A - LA PROTEINE A DE <u>S. AUREUS</u> .....	 44
 B - DIFFERENCES D'AFFINITE DES SOUS-CLASSES D'IgG POUR LA PROTEINE	
A DE <u>S. AUREUS</u> .....	44
1. IgG humaines.....	46
2. IgG de Souris.....	46
3. IgG de Cobaye.....	47
4. IgG de Hamster.....	47
5. IgG des ruminants (Chèvre, Mouton et Boeuf).....	47
6. IgG d'autres espèces.....	48
 C - BASES STRUCTURALES DE LA LIAISON ENTRE IgG ET PROTEINE A	
RELATIONS ENTRE LES DIFFERENCES DE STRUCTURE DES SOUS-CLASSES	
D'IgG ET LEUR AFFINITE POUR LA PROTEINE A.....	48
1. Liaison des fragments d'IgG pour la protéine A.....	49
2. Liaison à la protéine A d'IgG réduites ou d'IgG présentant	
une délétion de la région charnière.....	51
3. Structure tridimensionnelle du complexe entre Fc d'IgG1	
humaine et fragment B de la protéine A.....	51
4. Liaison à la protéine A d'IgG chimiquement modifiées sur	
certains acides aminés.....	52
5. Analyse structurale d'une IgG3 humaine ayant la propriété	
de se lier à la protéine A.....	52
 D - CONCLUSIONS.....	 52

<u>DEUXIEME PARTIE</u> : TRAVAUX PERSONNELS.....	57
--	----

REMARQUE PRELIMINAIRE.....	58
----------------------------	----

## CHAPITRE I

CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE DES SOUS-CLASSES D'IGG DU RAT.....	59
--	----

A - METHODES D'ISOLEMENT DES IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES APPARTENANT AUX DIFFERENTES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT.....	117
--	-----

B - ETUDE DU POIDS MOLECULAIRE DES CHAINES LOURDES : $\gamma_1$ , $\gamma_{2a}$ , $\gamma_{2b}$ , $\gamma_{2c}$	118
---	-----

1. Poids moléculaires des chaînes lourdes $\gamma_1$ , $\gamma_{2a}$ , $\gamma_{2b}$ , $\gamma_{2c}$ .....	123
--	-----

2. Localisation dans la chaîne $\gamma$ des différences de poids moléculaires observées pour les chaînes $\gamma_1$ , $\gamma_{2a}$ , $\gamma_{2b}$ , $\gamma_{2c}$ .	123
--	-----

3. Origine des différences de poids moléculaires observées.....	127
---	-----

C - REDUCTION DES PONTS DISULFURE INTER-CHAINES.....	130
--	-----

1. Intérêt et principe de l'étude.....	130
--	-----

2. Résultats.....	131
-------------------	-----

3. Discussion.....	131
--------------------	-----

D - DIFFERENCES DE SENSIBILITE DES SOUS-CLASSES D'IgG AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES.....	133
--	-----

1. Intérêt et objectifs de l'étude.....	133
---	-----

2. Etude de l'action de la papaïne.....	133
---	-----

2.1. Protocole de l'étude.....	133
--------------------------------	-----

2.2. Résultats.....	134
---------------------	-----

2.3. Origine de la résistance à la protéolyse enzymatique par la papaïne.....	141
--	-----

3. Etude de l'action de la pepsine.....	145
---	-----

3.1. Protocole de l'étude.....	145
--------------------------------	-----

3.2. Résultats.....	148
---------------------	-----

3.3. Mécanismes pouvant expliquer la résistance à la protéolyse enzymatique.....	151
---	-----

4. Etude de l'action de la trypsine.....	155
--	-----

4.1. Protocole de l'étude.....	157
--------------------------------	-----

4.2. Résultats.....	157
---------------------	-----

4.3. Discussion.....	159
----------------------	-----

5. Etude de l'action de la protéase V8 de <u>S. aureus</u> .....	159
--	-----

5.1. Protocole de l'étude.....	159
--------------------------------	-----

5.2. Résultats.....	161
---------------------	-----

5.3. Discussion.....	166
----------------------	-----

E - CONCLUSIONS : TYPAGE CHIMIQUE DES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT ET CONDITIONS OPTIMALES POUR LA PREPARATION DE FRAGMENTS Fab, F(ab') <sub>2</sub> et Fc.....	166
--	-----

1. Typage chimique des sous-classes d'IgG.....	166
--	-----

2. Conditions optimales pour la préparation de fragments Fab, F(ab') <sub>2</sub> et Fc.....	169
---	-----

## CHAPITRE II

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION D'UN FRAGMENT  
CORRESPONDANT AU DOMAINE VARIABLE V<sub>H</sub> OBTENU  
PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE DES IGG1 ET<sup>H</sup>IGG2A DE RAT..... 172

A - MISE EN EVIDENCE D'UN CLIVAGE DES SOUS-CLASSES IgG1 ET IgG2a EN  
DEUX FRAGMENTS ASSOCIES DE FACON NON COVALENTE..... 180

B - LOCALISATION DU SITE DE CLIVAGE TRYPSIQUE DANS LA PARTIE Fd DE LA  
MOLECULE D'IgG..... 182

C - ISOLEMENT DES FRAGMENTS DE 120 000 et 13 000 DALTONS, ET ETUDES  
STRUCTURALES..... 182

1. Isolement des fragments 1 et 2..... 182

2. Etude structurale du fragment 2 (13 000 daltons)..... 184

3. Etude structurale du fragment 1 (120 000 daltons)..... 184

D - CONCLUSIONS..... 189

## CHAPITRE III

ETUDES CONFORMATIONNELLES DES SOUS-CLASSES D'IGG DU RAT.... 192

A - ETUDE DES IgG NATIVES ET DE CERTAINS DE LEURS FRAGMENTS..... 203

1. IgG..... 203

2. Fragments Fab et Fc..... 204

3. Origine des différences observées..... 204

B - MODIFICATIONS CONFORMATIONNELLES INDUITES PAR LE CHAUFFAGE, LE  
pH ACIDE ET LE THIOCYANATE DE SODIUM..... 206

1. Chauffage à 56° C..... 206

2. Effet du pH acide..... 208

3. Effet du traitement par le NaSCN 3 M..... 208

C - CONCLUSIONS..... 208

## CHAPITRE IV

ETUDE DE L'AFFINITÉ DES SOUS-CLASSES D'IGG DU RAT  
POUR LA PROTÉINE A DE S. AUREUS..... 211

A - PROTOCOLE EXPERIMENTAL..... 221

B - AFFINITE DES IgG MONOCLONALES POUR LA PROTEINE A..... 221

1. IgG2a..... 221

2. IgG2b..... 222

3. IgG1..... 222

4. IgG2..... 223

C - FRACTIONNEMENT DES SOUS-CLASSES D'IgG DU SERUM DE RAT..... 223

1. Affinité pour la protéine A de sous-classes d'IgG du sérum  
de rat (partiellement ou totalement purifiées)..... 225

2. Chromatographie du sérum de Rat sur protéine A-Sépharose..... 227

3. Protocole de préparation des sous-classes d'IgG du sérum de Rat utilisant la chromatographie sur protéine A-Sépharose et la chromatographie sur DEAE cellulose.....	230
D - ROLE DE LA DENATURATION DES IgG SUR L'AFFINITE POUR LA PROTEINE A	230
1. Affinité pour la protéine A d'IgG1 et d'IgG2c chauffées à 56°C	233
2. Affinité pour la protéine A d'IgG renaturées après incubation à pH acide (pH 2,8).....	233
E - CONCLUSIONS.....	236
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u> .....	240
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u> .....	247
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

**INTRODUCTION**

---

Les immunoglobulines monoclonales produites par les myélomes humains et expérimentaux, puis plus récemment les anticorps monoclonaux produits par les hybrides entre cellules myélomateuses et lymphocytes (ou hybridomes) ont très largement contribué au développement des recherches orientées sur la structure et l'activité biologique des immunoglobulines. L'étude des immunoglobulines dans le modèle expérimental du Rat a en particulier bénéficié de la découverte des immunocytomes du Rat LOU et du développement de ce système par BAZIN et al. (1972, 1973). L'analyse des immunoglobulines monoclonales produites par ces immunocytomes a permis une détermination précise des classes et sous-classes d'immunoglobulines chez le Rat, en particulier l'identification de quatre sous-classes d'IgG : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c (BAZIN, BECKERS et QUERINJEAN, 1974 a) ; l'identification de classes présentes dans le sérum normal à un taux très faible : IgD (BAZIN et al., 1978 a, b) et IgE (BAZIN et al., 1974 b ; BAZIN et BECKERS, 1976). Les immunocytomes du Rat LOU, transplantables, produisent de grandes quantités d'immunoglobulines, ce qui rend possible d'une part l'étude de leur structure, d'autre part l'analyse des relations entre structure et activité biologique. Le développement de la technologie des hybridomes de Rat (GALFRE et al., 1979 ; BAZIN, 1982) et, de ce fait, la possibilité d'utilisation des anticorps monoclonaux de Rat, a renforcé l'intérêt pour les études de la physiologie des immunoglobulines dans ce modèle expérimental.

Parmi les différents isotypes des immunoglobulines, les sous-classes d'IgG ont depuis longtemps intéressé les chercheurs pour les raisons suivantes : elles représentent au sein de la classe IgG des populations moléculaires ayant le même schéma général de structure mais elles diffèrent par l'expression de certaines activités biologiques comme la fixation du complément, l'affinité pour les cellules lymphoïdes, la vitesse de catabolisme, l'interaction avec certains constituants des parois bactériennes comme la protéine A de S. aureus, etc... Les sous-classes d'IgG constituent de ce fait un modèle de choix pour une étude des relations entre structure et activité biologique. De plus, des travaux récents ont montré que, suivant la nature

de l'antigène et la nécessité ou non d'une coopération entre lymphocytes B et T, la réponse anticorps de chaque sous-classe est différemment sollicitée. Enfin, on a attribué aux sous-classes d'IgG des rôles biologiques différents, soit effecteur, soit bloquant de l'immunité, dans les réactions immunitaires dirigées contre les cellules tumorales.

Une bonne connaissance des propriétés immunochimiques des sous-classes d'IgG ainsi que celle d'une de leurs activités biologiques, l'affinité pour la protéine A de S. aureus, peuvent être très utiles pour des études physiologiques dans un modèle expérimental comme celui du Rat. Il y a à cela plusieurs raisons :

- Certaines propriétés immunochimiques, comme la sensibilité à la protéolyse enzymatique, permettent d'identifier la sous-classe d'IgG à laquelle appartient un anticorps monoclonal ; elles peuvent donc constituer une alternative à l'identification réalisée à l'aide d'immun-sérums monospécifiques, dont la préparation est souvent difficile.

- Les conditions optimales pour la préparation de divers fragments issus de la protéolyse enzymatique peuvent être définies pour chaque sous-classe d'IgG. La préparation de ces fragments est utile, par exemple, pour connaître dans quelle partie de la molécule est localisée une propriété biologique de la sous-classe, ou encore pour supprimer une activité biologique qui peut être gênante lorsqu'est utilisé un anticorps monoclonal (par exemple, la fixation de sa partie Fc sur les cellules lymphoïdes).

- La mise en évidence de différences d'affinité des sous-classes d'IgG pour la protéine A de S. aureus peut être mise à profit pour leur isolement à partir d'un mélange hétérogène d'anticorps.

Ces différentes raisons nous ont incité à entreprendre une étude des propriétés immunochimiques des sous-classes d'IgG de Rat et de leur affinité pour la protéine A de S. aureus. Durant cette étude, nous avons été amenés à isoler et caractériser de façon plus complète un fragment "inhabituel" correspondant au domaine variable des chaînes lourdes (domaine VH). Nous avons également étudié le rôle de modifications conformationnelles induites

par les agents dénaturants, sur l'affinité des sous-classes d'IgG pour la protéine A. Avant de présenter les résultats de ces travaux, nous rappelons, dans une première partie, quelques données générales concernant l'immunochimie et l'activité biologique des sous-classes d'IgG dans différents modèles expérimentaux.



**PREMIERE PARTIE**

---

**LES SOUS-CLASSES D'IMMUNOGLOBULINE G**  
**DONNEES GENERALES**

L'existence de sous-classes d'IgG a pu être démontrée chez l'Homme et dans un très grand nombre d'espèces de mammifères. Ces sous-classes ont été distinguées à l'origine par leurs caractères antigéniques. Des études ultérieures ont montré qu'elles différaient également par leurs propriétés immunochimiques, notamment leur sensibilité à la protéolyse enzymatique et leur structure primaire. Les différences de sensibilité à la protéolyse enzymatique ont pu être utilisées pour réaliser un typage des sous-classes d'IgG. Enfin, les sous-classes d'IgG présentent des différences d'activité biologique. Parmi celles-ci, les différences d'affinité pour la protéine A, constituant des parois bactériennes de S. aureus, se sont révélées être un outil intéressant pour la purification sélective de certaines sous-classes d'IgG. Ce sont ces différents aspects qui seront abordés dans cette première partie. Le chapitre I rappellera la nomenclature des sous-classes chez l'Homme et dans différentes espèces animales. Le chapitre II traitera des données immunochimiques. Dans ce chapitre, l'action des enzymes protéolytiques sera étudiée de façon détaillée. Le chapitre III analysera les différences d'affinité pour la protéine A qui existent entre les sous-classes d'IgG de différentes espèces animales et montrera comment ces différences ont pu être reliées aux différences de structure primaire.

## CHAPITRE I


### NOMENCLATURE DES SOUS-CLASSES D'IgG DANS DIFFERENTES ESPECES ANIMALES

---

La nomenclature des sous-classes d'IgG dans les différentes espèces où cette hétérogénéité de la classe IgG a été recherchée, est résumée dans le tableau 1. Plusieurs remarques importantes sont à faire sur cette classification :

- Cette classification est essentiellement fondée sur la mise en évidence de différences antigéniques chez des IgG d'une même espèce animale. Ultérieurement des différences immunochimiques et des différences d'activité biologique ont été également démontrées.
- La différenciation de l'IgG en sous-classes semble être une caractéristique apparue chez les mammifères. En effet, des sous-classes d'IgG n'ont pu être démontrées chez les Oiseaux et les Reptiles.
- Les espèces où la classification a pu être la plus complète sont celles où des protéines monoclonales ont été étudiées, c'est-à-dire essentiellement l'Homme, la Souris et le Rat. Par exemple, l'IgG3 chez la Souris (GREY et al., 1971) et l'IgG2c chez le Rat (BAZIN et al., 1974) ont été découvertes grâce à l'analyse d'immunoglobulines monoclonales, n'étant présentes chez l'animal normal qu'à un taux faible ou très faible.
- Il n'existe pas en règle générale d'homologie entre les sous-classes provenant de différentes espèces, bien que dans certains cas, elles puissent avoir le même nom. Par exemple, l'IgG2a de Souris et l'IgG2a de Rat sont très différentes sur le plan physico-chimique et sur le plan biologique. Une exception : l'IgG3 de Souris et l'IgG2c de Rat possèdent beaucoup de similitudes antigéniques, physico-chimiques et biologiques.

TABLEAU 1.- NOMENCLATURE DES SOUS-CLASSES D'IgG DANS DIFFERENTES ESPECES ANIMALES

HOMME	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Grey et Kunkel, 1964 Terry et Fahey, 1964
SOURIS	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	Fahey <i>et al.</i> , 1964 a,b Potter <i>et al.</i> , 1965 Grey <i>et al.</i> , 1971
RAT	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c	Nussensweig et Binaghi, 1965 Binaghi et Sarando de Merlo, 1966 Jones, 1969 Hermann et Friedrich, 1970 Bazin, Beckers et Querinjean, 1974
LAPIN	IgG (IgG2), IgG1	Zvaifler et Becker, 1966 Rodkey et Freeman, 1969
COBAYE	IgG1, IgG2	 Benacerraf <i>et al.</i> , 1963 Coe, 1968
CHIEN	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c	Johnson et Vaughan, 1967 Johnson <i>et al.</i> , 1967
BOEUF	IgG1, IgG2	Aalund, 1968 Milstein et Feinstein, 1968 Kickhöfen <i>et al.</i> , 1968
CHEVRE	IgG1, IgG2	Gray <i>et al.</i> , 1969
MOUTON	IgG1, IgG2	Gray <i>et al.</i> , 1969
CHEVAL	IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG(T)	Rockey <i>et al.</i> , 1964 Montgomery <i>et al.</i> , 1966

- Les différences entre sous-classes au sein de différentes espèces ne sont pas les mêmes. Par exemple, chez l'Homme les quatre sous-classes d'IgG présentent beaucoup de similitudes antigéniques et structurales, alors que chez la Souris les sous-classes, en particulier IgG1 et IgG2a, ont des structures beaucoup plus "éloignées". Chez le Cheval, l'IgG(T) ne présente pas de réaction croisée avec les autres sous-classes d'IgG.

- Le Lapin représente un cas tout à fait particulier quant à la division de la classe IgG en sous-classes. En effet, si l'on ne considère que les caractères antigéniques, il n'existe qu'une seule sous-classe d'IgG (avec peut être une sous-classe mineure : IgG1 ; ZVAIFLER et BECKER, 1966 ; RODKEY et FREEMAN, 1969). Cependant, deux populations d'IgG différentes par leurs caractères physico-chimiques et structuraux (voir chapitre II) ont été distinguées.

## CHAPITRE II

### LES SOUS-CLASSES D'IgG : DIFFERENCES IMMUNOCHIMIQUES

---

Dans toutes les espèces animales où les sous-classes d'IgG ont été mises en évidence, des différences immunochimiques, à la fois dans le comportement des ponts disulfure inter-chaînes des IgG sous l'action d'agents réducteurs et dans la sensibilité de l'IgG à la protéolyse enzymatique, ont été démontrées. Les études structurales réalisées dans plusieurs modèles ont également montré des différences de séquence peptidique caractérisant les sous-classes d'IgG. Enfin, quelques études conformationnelles ont suggéré l'existence de différences de conformation en solution des sous-classes d'IgG. Avant d'exposer ces différents aspects qui permettent de distinguer les sous-classes d'IgG, nous rappellerons les points qui leur sont communs, c'est-à-dire quelques notions générales sur la structure et la conformation de l'immunoglobuline G.

#### A - LA STRUCTURE DE L'IMMUNOGLOBULINE G : DONNEES GENERALES

##### 1. MODELE DE STRUCTURE DE L'IgG

Les IgG ont un poids moléculaire de 150 000 et une constante de sédimentation de 7 S. Elles contiennent en moyenne 2,9 % de glucides. Elles sont formées par l'association covalente de deux chaînes légères (L) et de deux chaînes lourdes (H), soit un schéma général  $H_2L_2$ .

- Les chaînes légères, de poids moléculaire 23 000, peuvent être de deux types : K et  $\lambda$ . La proportion de chaînes K varie selon l'espèce : 66 % chez l'Homme, 95 % chez la Souris et le Rat, 80 % chez le Lapin.
- Les chaînes lourdes  $\gamma$  de l'IgG sont de poids moléculaire environ 50 000.

Il existe un seul pont disulfure entre chaîne lourde et chaîne légère et plusieurs ponts disulfure entre chaînes lourdes (figure 1).

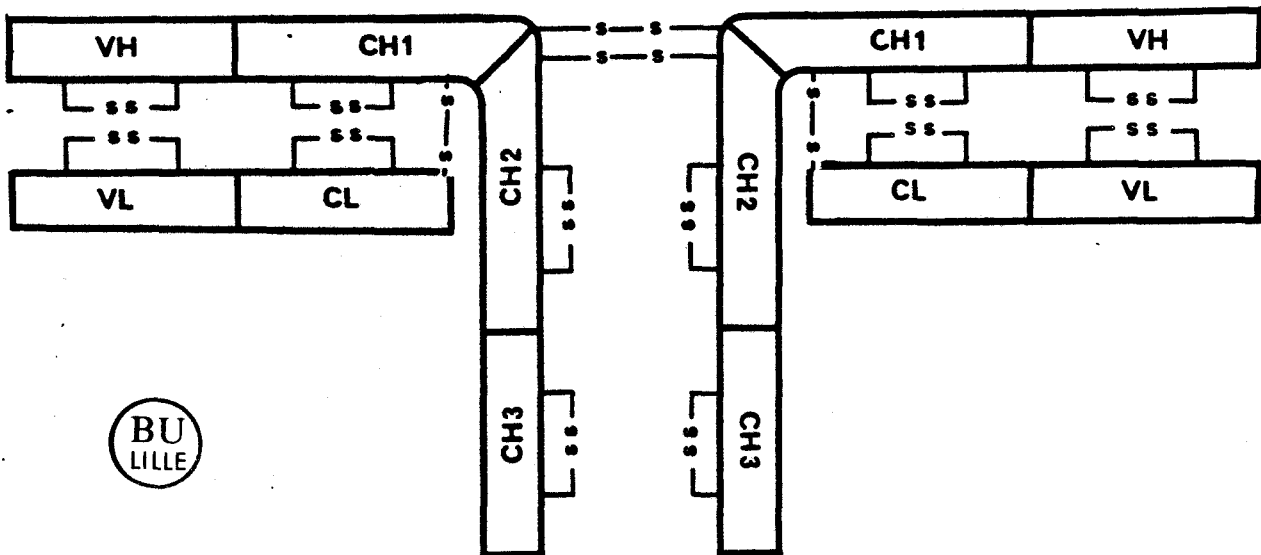


Figure 1.- Représentation schématique de la structure de l'IgG.

L'IgG est formée de deux chaînes légères contenant chacune deux domaines : un domaine variable  $V_L$  et un domaine constant  $C_L$ , et de deux chaînes lourdes comportant chacune un domaine variable  $V_H$  et trois domaines constants :  $CH_1$ ,  $CH_2$  et  $CH_3$ . La région charnière, qui contient les ponts disulfures interchaînes lourdes, est située entre les domaines  $CH_1$  et  $CH_2$ .

## 2. L'ORGANISATION DE L'IMMUNOGLOBULINE G EN DOMAINES

Chaque chaîne de l'immunoglobuline G présente des zones d'homologie structurale, d'environ 110 acides aminés, dénommées domaines :

- La chaîne légère comporte deux domaines : un domaine variable VL et un domaine constant CL.
- La chaîne lourde comporte un domaine variable VH et 3 domaines constants CH1 ou CY 1, CH2 ou CY 2, CH3 ou CY 3. Il existe également entre les domaines CY 1 et CY 2 une séquence peptidique plus courte, riche en résidus de proline, dénommée région charnière, qui est la plus sensible à la protéolyse enzymatique (figure 1).

Les domaines se présentent sous forme de globules compacts de structure secondaire et tertiaire similaires (POLJAK et al., 1973 ; DEISENHOFER et al., 1976 ; HUBER et al., 1976 ; COLMAN et al., 1976 ; SILVERTON, NAVIA et DAVIES, 1977). On sait maintenant que chaque domaine ainsi que la région charnière sont codés par un gène distinct (exon) séparé des autres gènes par une séquence non codante (intron) (EARLY et al., 1979 ; SAKANO et al., 1979 ; TUCKER et al., 1979 ; CALAME et al., 1980 ; GOUGH et al., 1980 ; MIYATA et al., 1980 ; YAMAWAKI-KATAOKA, MIYATA et HONJO, 1981 ; OLLO et al., 1981). Chaque domaine aurait une autonomie propre et aurait pu évoluer de façon relativement indépendante des autres. Enfin, il posséderait une fonction effectrice particulière : fixation de l'antigène pour les domaines VH et VL, fixation du complément pour le domaine CY 2 des IgG, cytophilie pour le domaine CY 3 etc...

## 3. PROTEOLYSE ENZYMATIQUE DE L'IgG

Les IgG peuvent être clivées par de nombreux enzymes protéolytiques. Le clivage enzymatique s'effectue principalement à l'endroit de la région charnière. Nous rappellerons ici la terminologie et la structure des principaux fragments issus de la protéolyse enzymatique.



La papaïne clive l'IgG dans la région charnière en deux fragments majeurs : Fab et Fc ; un fragment mineur Fc' est également produit (figure 2) :

- Le fragment Fab est capable de se lier à l'antigène ; il est formé par l'association covalente d'une chaîne légère et d'un fragment de chaîne lourde, dénommé Fd (correspondant au domaine VH et CH1 ou CY1).
- Le fragment Fc est incapable de se lier à l'antigène, mais est porteur d'autres fonctions biologiques, par exemple la fixation du complément, la cytophilie, etc... Le fragment Fc peut comporter les domaines CY2, CY3 et la région charnière ; il est dénommé dans ce cas Fc covalent (ou encore Fch dans le cas de l'IgG3 humaine). Il peut ne pas comporter la région charnière et dans ce cas il est appelé Fc non covalent.
- Le fragment Fc' est obtenu par hydrolyse prolongée de l'IgG par la papaïne. Il correspond à la presque totalité du domaine CY3.

La pepsine libère deux fragments principaux :  $F(ab')_2$  et pFc' (figure 2). Le fragment  $F(ab')_2$  est formé par l'association covalente de deux chaînes légères et de deux fragments de la chaîne lourde, dénommés Fd', correspondant aux domaines VH, CY1 et à la région charnière. Le fragment pFc' correspond au domaine CY3. La pepsine transforme le domaine CY2 de l'IgG en plusieurs petits peptides. Un fragment mineur, dénommé F(ab'), similaire dans sa structure au fragment Fab, peut être obtenu par hydrolyse peptique.

La trypsine clive l'IgG en fragments Fab(t) et Fc(t), analogues dans leur structure aux Fab et Fc obtenus par hydrolyse par la papaïne.

Des fragments de structure similaire au fragment  $F(ab')_2$  peuvent être obtenus à quantité faible par hydrolyse par la papaïne ou par la trypsine. Ces fragments sont dénommés  $F(ab)_2$ .

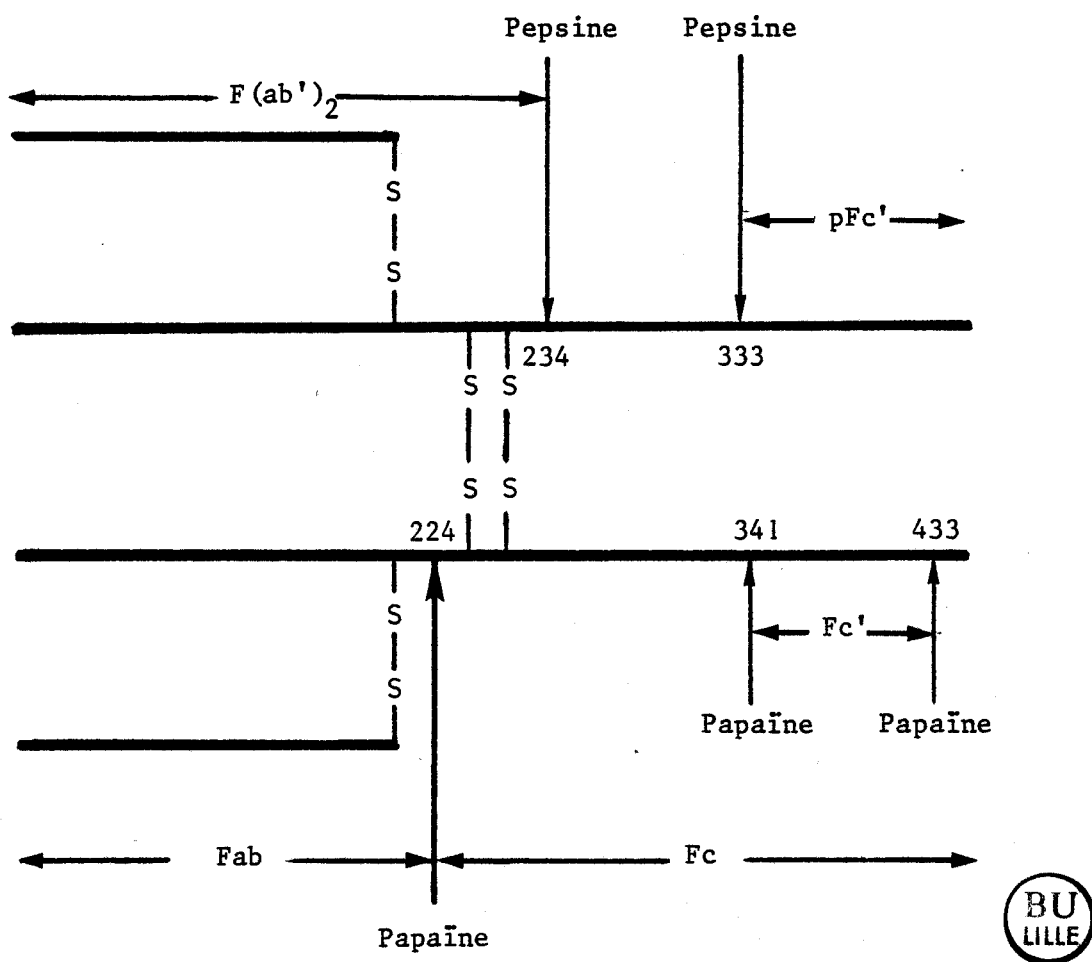


Figure 2.- Structure schématique de l'IgG humaine représentant les points de clivage par la papaïne et la pepsine et les fragments principaux obtenus :  $Fab$ ,  $Fc$ ,  $Fc'$  (papaïne) ;  $F(ab')_2$ ,  $pFc'$  (pepsine). Les chiffres indiqués sur la figure correspondent aux positions des résidus d'acides aminés clivés dans l'IgG humaine.

#### 4. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'IgG

Les études physiques de l'IgG, en particulier les analyses par diffraction des rayons X de fragments Fab, Fab', Fc ou de molécules entières, ont permis de dégager un certain nombre de caractéristiques de la structure tridimensionnelle de l'IgG :

- La molécule a une conformation en Y ou en T, les deux Fab formant entre eux un angle minimum de 80 à 95°. En l'absence de l'antigène, les Fab effectuent en permanence des rotations de 30° autour de la région charnière. Ces mouvements sont très diminués lors de la fixation de l'antigène.
- Chaque domaine présente une structure tridimensionnelle similaire, qui se caractérise par la présence de deux feuillets plissés  $\beta$  constitués par des chaînes peptidiques anti-parallèles et qui représentent 50 à 60 % des acides aminés du domaine.
- Les axes des domaines de chacune des chaînes lourdes et légères forment entre eux des angles qui peuvent varier d'une IgG à une autre, surtout les angles entre VL et CL, ainsi que ceux entre VH et CH1 (ou C $\gamma$ 1).
- Les domaines VH et VL, CH1 (ou C $\gamma$ 1) et CL, et les deux CH3 (ou C $\gamma$ 3) forment des dimères étroitement associés. A l'inverse, les domaines CH2 (ou C $\gamma$ 2) n'ont aucun contact direct entre eux. Ce sont les copules glucidiques présentes dans ces domaines qui forment l'interface entre les deux C $\gamma$ 2.

#### B - LES PONTS DISULFURE INTER-CHAINES DES SOUS-CLASSES D'IgG : DIFFERENCES DE SENSIBILITE A LA REDUCTION ET A LA REOXYDATION

Dans le modèle multicaténaire de la molécule d'IgG, les ponts disulfure qui maintiennent la liaison covalente entre chaînes lourdes (ponts inter-H) ainsi que ceux qui lient les chaînes lourdes et les chaînes légères (ponts inter-HL), sont beaucoup plus sensibles à la réduction que les ponts

disulfure intra-chaînes situés à l'intérieur de chaque domaine. La réduction de ces ponts inter-chaînes lourdes et inter-chaînes lourdes-chaînes légères, ainsi que leur réoxydation ultérieure, peuvent différer dans leurs étapes selon la nature de la sous-classe d'IgG. Dans certains cas, les étapes de la réoxydation "in vitro" ont pu être corrélées avec les étapes d'assemblage des chaînes lourdes et légères synthétisées "in vivo" dans le plasmocyte (ZOLLA et al., 1970 ; BEVAN et al., 1972). Ce sont essentiellement les sous-classes d'IgG humaines et murines qui ont été étudiées.

### 1. IgG HUMAINES

VIRELLA et PARKHOUSE (1973) ont montré que lors de la réduction progressive des ponts disulfure inter-chaînes, les ponts entre chaînes lourdes et légères (ponts inter-HL) et les ponts entre chaînes lourdes (ponts inter-H) des IgG1, IgG2 et IgG3 étaient réduits au hasard, les intermédiaires de réduction étant  $H_2L$ ,  $H_2$  et HL. A l'inverse, dans la sous-classe IgG4 le produit intermédiaire de réduction est la sous-unité HL, ce qui montre que dans cette sous-classe, les ponts inter-H sont plus sensibles à la réduction que les ponts inter-HL (figure 3A). Les travaux de SEARS et al. (1977) ont confirmé que dans le cas de l'IgG1 humaine, les ponts disulfure inter-chaînes étaient réduits sans intermédiaire préférentiel.

PETERSEN et DORRINGTON (1974) ont montré que dans le cas de l'IgG1, la réoxydation des ponts disulfure, après réduction, se fait par les intermédiaires HL et  $H_2L$ , ce qui suggère la cinétique d'assemblage :

$H \text{ et } L \longrightarrow HL \longrightarrow H_2L \longrightarrow H_2L_2$ , soit les étapes 1, 4 et 7 de la figure 3B, les étapes 2, 5 et 7 représentant une voie mineure de réoxydation. Dans le cas de l'IgG4, la réoxydation se fait de façon très différente, l'intermédiaire prédominant étant la sous-unité HL. La réoxydation des ponts inter-chaînes lourdes ( $HL \longrightarrow H_2L_2$ ) s'effectue très lentement. Les ponts disulfure de l'IgG4 s'assemblent donc en suivant les étapes 1, 3 et 6 de la figure 3B. Ainsi, les ponts inter-chaînes lourdes de l'IgG4 humaine apparaissent très sensibles à la réduction, et s'assemblent très lentement "in vitro". Cette caractéristique de l'IgG4 explique très vraisemblablement l'observation de TURNER, BENNICH et NATVIG (1970 b) selon laquelle les préparations d'IgG4 contiennent une faible proportion de molécules d'IgG

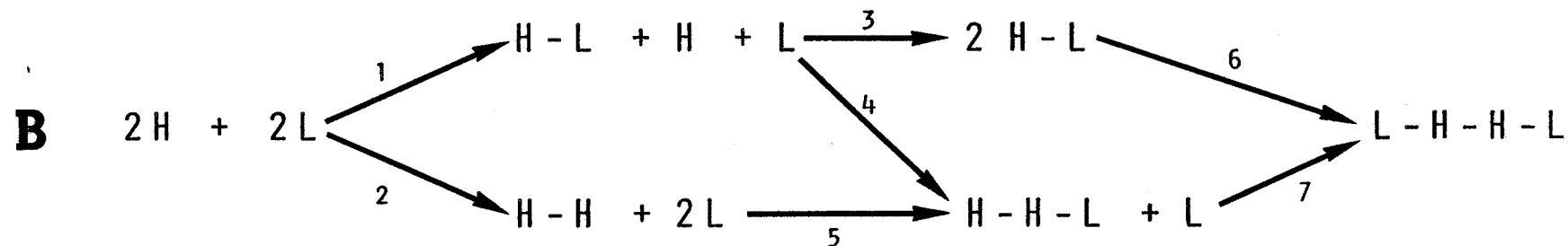
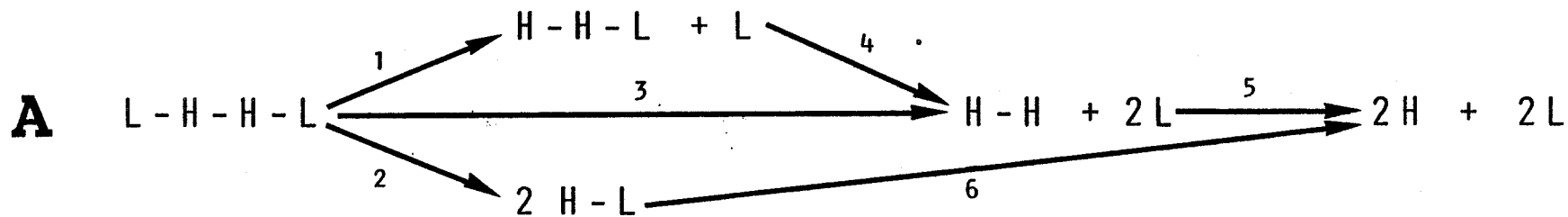


Figure 3.- Schéma des étapes de la réduction et de la réoxydation des IgG humaines.

A. Étapes de la réduction. Les ponts interchaînes des IgG1, IgG2 et IgG3 sont réduits au hasard par les étapes initiales 1, 2 ou 3. A l'inverse, la réduction des IgG4 suit exclusivement la voie 2.

B. Étapes de la réoxydation. La réoxydation des IgG1 se fait par les étapes 1, 4 et 7 (voie majeure) et par les étapes 2, 5 et 7 (voie mineure). La réoxydation des IgG4 se fait exclusivement par les étapes 1, 3 et 6.

dans lesquelles les ponts disulfure inter-chaînes lourdes ne sont pas formés. Les raisons de cette différence entre IgG4 et les autres sous-classes d'IgG ne sont pas connues. En particulier, la structure de la région charnière de l'IgG4 ne présente pas des différences significatives avec celles des autres sous-classes qui pourraient expliquer ce phénomène.

## 2. IgG DE SOURIS

WILLIAMSON et ASKONAS (1968) ont étudié les produits intermédiaires de réduction de l'IgG2a murine. Ils ont montré que le dimère  $H_2$  et les chaînes légères sont les produits majeurs de réduction. Ceci indique que les ponts disulfure inter-HL de l'IgG2a murine sont plus labiles à la réduction que les ponts inter-H. La comparaison avec d'autres sous-classes d'IgG n'a cependant pas été réalisée chez la Souris.

Les travaux les plus importants réalisés dans le modèle murin ont été ceux consacrés aux assemblages in vivo des chaînes lourdes et légères synthétisées par les plasmocytes. BAUMAL, POTTER et SCHARFF (1971) ont montré une différence très nette entre la sous-classe IgG2b et les sous-classes IgG1 et IgG2a ; les IgG1 et les IgG2a s'assemblent via des intermédiaires majeurs  $H_2$  et  $H_2L$ , la sous-unité HL étant un intermédiaire mineur ; à l'inverse, les IgG2b s'assemblent via un seul intermédiaire de type HL.

## C - DIFFERENCES DE SENSIBILITE DES SOUS-CLASSES D'IgG A LA PROTEOLYSE ENZYMATIQUE

C'est la caractéristique immunochimique qui a été la plus étudiée pour distinguer les sous-classes d'IgG car elle constitue une alternative à l'identification des sous-classes par leurs caractères antigéniques (STANWORTH et TURNER, 1978). En effet, cette identification est souvent rendue difficile car il est malaisé d'obtenir des antisérums parfaitement spécifiques d'une sous-classe. L'étude de la protéolyse enzymatique des sous-classes d'IgG constitue également une étape indispensable pour la préparation dans des conditions optimales de différents fragments : Fab,  $F(ab')_2$ , Fc, etc...

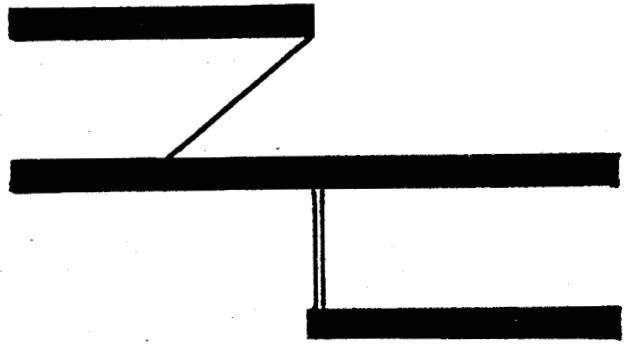
De très nombreux travaux ont été réalisés sur les sous-classes d'IgG de différentes espèces animales. Les enzymes les plus utilisés ont été la papaïne et la pepsine.

## 1. IgG HUMAINES

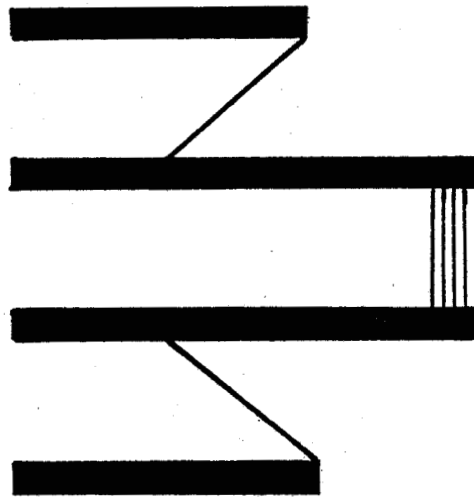
### 1.1. Action de la papaïne

Les études initiales de TAKATSUKI et OSSERMAN (1964) et celles de POULIK et SHUSTER (1964) avaient montré que parmi les IgG humaines, une partie n'était pas sensible à l'action de la papaïne, quand cet enzyme était ajouté en milieu d'incubation en l'absence de cystéine. Des études ultérieures (JEFFERIS et al., 1968 ; GERGELY, FUDENBERG et VAN LOGHEM, 1970) devaient montrer que cette différence était liée à la nature de la sous-classe : les IgG2 et IgG4 sont résistantes à l'action de la papaïne alors que les IgG1 et surtout les IgG3 sont sensibles à l'action de l'enzyme. L'IgG2 demeure relativement résistante à l'action de la papaïne en présence de cystéine (concentration finale 0,01 M) alors que l'IgG4 y devient sensible (et l'IgG3 très sensible). GERGELY, FUDENBERG et VAN LOGHEM (1970) ont également montré qu'il existe une hétérogénéité au sein de la sous-classe IgG1, certaines IgG1 monoclonales étant plus résistantes que d'autres. L'utilisation de ces différences de sensibilité à la protéolyse par la papaïne a rendu possible l'isolement de fragments Fc d'IgG1 et d'IgG3 à partir d'un pool d'IgG de sérum normal et de localiser les marqueurs allotypiques associés à chacune de ces sous-classes (MICHAELSEN et NATVIG, 1971 ; VIRELLA et PARKHOUSE, 1971). Un certain nombre de fragments distincts des Fab et Fc, différents suivant la nature de la sous-classe, ont été identifiés lors de la digestion courte (45 minutes) par la papaïne en l'absence de cystéine (MICHAELSEN et NATVIG, 1973). Un fragment Fab/c, c'est-à-dire un fragment comportant un Fab relié au Fc en raison de l'absence de coupure d'une chaîne gamma, est libéré de l'IgG1. Des fragments de type F(ab)<sub>2</sub> ont été identifiés dans le cas des sous-classes IgG2 et IgG4. Un fragment Fch, c'est-à-dire un fragment contenant le Fc et la très longue région charnière est libéré de l'IgG3. La figure 4 résume les différents types de fragments mineurs obtenus par action de la papaïne en des temps courts d'hydrolyse.

$F_{ab/c}$   
(Ig G<sub>1</sub>)



$F(ab)_2$   
(Ig G<sub>2</sub> et Ig G<sub>4</sub>)



$F_{ch}$   
(Ig G<sub>3</sub>)

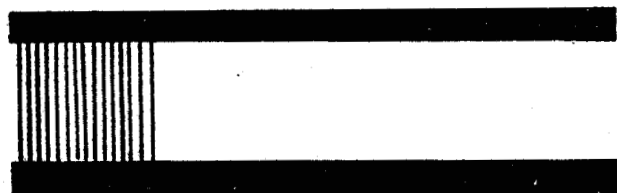


Figure 4.- Représentation schématique des fragments obtenus en temps courts de digestion (45 min) par la papaïne sur les sous-classes d'IgG humaines (d'après Michaelsen et Natvig, 1973).



## 1.2. Action de la pepsine

L'action de la pepsine a été étudiée de façon très complète par TURNER, BENNICH et NATVIG (1970 a,b). Les sous-classes d'IgG diffèrent dans leur sensibilité à la pepsine : l'IgG1 est la plus résistante à l'action de l'enzyme, l'IgG2 moyennement résistante alors que l'IgG3 et l'IgG4 sont beaucoup plus sensibles. Les produits majeurs de la digestion sont  $F(ab')_2$  et  $pFc'$  pour les quatre sous-classes. Cependant, des fragments mineurs de type  $F(ab')$  sont produits pour les sous-classes IgG2, IgG3 et IgG4. Ces fragments correspondent pour l'IgG2 et l'IgG3 à une digestion du fragment  $F(ab')_2$ . Dans le cas de l'IgG4, ils correspondent à la digestion de la fraction des IgG4 dans laquelle les ponts disulfure inter-chaînes lourdes ne sont pas formés (caractéristique liée à la lenteur d'oxydation des ponts inter-chaînes lourdes ; voir paragraphe B).

## 1.3. Autres enzymes

### 1.3.1 Trypsine

L'action de la trypsine a été étudiée par MEDGYESI et al. (1971). L'IgG2 est résistante à l'action de cet enzyme alors que les autres sous-classes sont clivées en fragments  $Fab(t)$  et  $Fc(t)$  analogues à ceux produits lors de l'hydrolyse par la papaïne.

### 1.3.2. Plasmine

La plasmine a une action sur les IgG humaines analogues à celle de la papaïne et de la trypsine. Elle est responsable de leur fragmentation lors de la conservation (SKVARIL, 1960 ; CONNELL et PAINTER, 1966). VIRELLA et YEH (1977) ont comparé la sensibilité à la plasmine d'immunoglobulines monoclonales appartenant aux quatre sous-classes d'IgG humaines. Les résultats sont assez similaires à ceux obtenus par action de la papaïne en présence de cystéine : très grande sensibilité de l'IgG3, résistance de l'IgG2, sensibilité intermédiaire des IgG1 et IgG4.

### 1.3.3. Armillaria mellea protéase

L'action de cet enzyme qui coupe la liaison peptidique impliquant le groupement  $\alpha$ -aminé des résidus de lysine a été étudiée par HUNNEYBALL et STANWORTH (1975). Les produits majeurs obtenus sont de type Fab et Fc. Trois sous-classes : IgG1, IgG3 et IgG4 sont très sensibles à l'action de l'enzyme alors que l'IgG2 y est résistante.

### 1.3.4. Elastase lysosomiale des polynucléaires

Cet enzyme est présent dans les granules des polynucléaires neutrophiles (KRUIZE, MENNINGER, FEHR et BONI, 1976). SOLOMON, GRAMSE et HAVEMANN (1978) ont montré que l'IgG1 et l'IgG3 sont beaucoup plus sensibles à l'action de cet enzyme que les IgG2 et IgG4. Des résultats légèrement différents ont été obtenus par FOLDS, PRINCE et SPITZNAGEL (1978) par incubation en présence de cystéine ; dans ces conditions, toutes les IgG sont sensibles à l'action de l'enzyme, l'IgG3 étant la plus rapidement hydrolysée. BAICI et al. (1980) ont analysé les fragments obtenus après protéolyse par l'élastase leucocytaire et montré que les fragments obtenus sont très similaires à ceux obtenus par action de la papaïne en temps courts de digestion (MICHAELSEN et NATVIG, 1973). Le rôle biologique possible de cet enzyme dans la dégradation des complexes immuns a été évoqué (FOLDS et al., 1978).

Les différences de sensibilité à la protéolyse enzymatique ainsi que les fragments obtenus par action de différents enzymes sont résumés dans le tableau 2.

## 2. IgG DE SOURIS

Les IgG murines présentent tout comme les IgG humaines une hétérogénéité de sensibilité à la protéolyse enzymatique, hétérogénéité liée à la nature de la sous-classe. Une étude de POTTER (1967), comparant différentes IgG monoclonales, montre que, parmi les sous-classes d'IgG, l'IgG1 semble la plus résistante à l'action de la papaïne en présence de cystéine.

TABLEAU 2.- DIFFERENCES DE SENSIBILITE A LA PROTEOLYSE ENZYMATIQUE DES SOUS-CLASSES D'IgG HUMAINES. FRAGMENTS OBTENUS

PAPAÏNE

- SENSIBILITE

- . Digestion en l'absence de cystéine      IgG3 > IgG1 > IgG2, IgG4
- . Digestion en présence de cystéine      IgG3 > IgG1, IgG4 > IgG2

- FRAGMENTS OBTENUS

- . Digestion en l'absence de cystéine
  - IgG1 : IgG + Fab + Fc
  - IgG2 : IgG
  - IgG3 : Fch + Fab
  - IgG4 : IgG (+ Fab + Fc)
  
- . Digestion en présence de cystéine
  - = Fragments majeurs      Fab + Fc
  - = Fragments mineurs      IgG1 : Fab/c
  - (obtenus en temps court de      IgG2 : F(ab)<sub>2</sub>
  - digestion)                      IgG3 : Fch
  - IgG4 : F(ab)<sub>2</sub>



PEPSINE

- SENSIBILITE

IgG3, IgG4 > IgG2 > IgG1

- FRAGMENTS OBTENUS

- = Fragments majeurs      F(ab')<sub>2</sub> + pFc'
- = Fragments mineurs      IgG2, IgG3, IgG4 : F(ab')

TRYPSINE

- SENSIBILITE

IgG3 > IgG1, IgG4 > IgG2

- FRAGMENTS OBTENUS

Fab(t) et Fc(t)

PLASMINE

Identique à la trypsine

A-MELLEA PROTEASE

- SENSIBILITE

IgG1, IgG2, IgG3 > IgG4

- FRAGMENTS OBTENUS

Fab et Fc

ELASTASE LYSOSOMIALE DES POLYNUCLÉAIRES

- SENSIBILITE

IgG3 > IgG1 > IgG2, IgG4

- FRAGMENTS OBTENUS

- IgG1 : Fab + Fc + Fab/c (mineur)
- IgG2 : Fab + Fc + Fab)<sub>2</sub> (mineur)
- IgG3 : Fab + Fc + Fch (mineur)
- IgG4 : Fab + Fc + F(ab)<sub>2</sub> (mineur)

L'étude la plus complète a été réalisée par GORINI, MEDGYESI et DORIA (1969). La sous-classe IgG1 est la plus résistante à la protéolyse par la papaïne (en l'absence de cystéine) et à l'hydrolyse par la trypsine. La papaïne libère de l'IgG1 un fragment de type  $F(ab)_2$  de poids moléculaire 115 000 daltons alors que les IgG2a et IgG2b sont hydrolysées en Fab et Fc. La trypsine (en l'absence de cystéine) clive les IgG1 et IgG2a en fragments de haut poids moléculaire (120 000 daltons), probablement de type  $F(ab)_2$  alors que les IgG2b sont beaucoup plus sensibles et hydrolysées en fragments Fab(t) et Fc(t). L'addition de cystéine augmente le degré de protéolyse des IgG2a alors qu'elle est sans effet sur les IgG1. L'IgG2b est extrêmement sensible à l'action de la pepsine. Le fragment produit par hydrolyse pepsique de l'IgG2b est de type F(ab') alors qu'il est de type  $F(ab')_2$  pour les IgG1 et IgG2b. DISSANAYAKE et HAY (1975) ont étudié la sensibilité à la pepsine des Fc d'IgG1, IgG2a, IgG2b. Le Fc d'IgG2a est totalement résistant à l'action de la pepsine alors que les Fc d'IgG1 et IgG2b sont transformés en un fragment de type pFc'. Les principaux résultats obtenus sur les IgG de Souris sont résumés dans le tableau 3.

### 3. IgG D'AUTRES ESPECES ANIMALES

#### 3.1. IgG DE COBAYE

L'action de la papaïne et de la pepsine sur les deux sous-classes d'IgG du Cobaye, IgG1 et IgG2, a été étudiée par LESLIE, MELAMED et COHEN (1971). La digestion par la papaïne (en présence de cystéine 10 mM) libère un Fab et trois fragments Fc : Fc covalent, Fc non covalent et Fc', de l'IgG2 de Cobaye, alors qu'un fragment de type Fc' et un fragment Fab sont libérés par digestion de l'IgG1 (figure 5). L'IgG1 est plus sensible à l'action de la papaïne que l'IgG2. Cette sensibilité ne s'interprète pas de la même façon que pour les IgG humaines ou de Souris, puisqu'il semble qu'elle corresponde plutôt à une fragilité de domaine  $C\gamma 2$  vis-à-vis de la protéolyse qu'à une plus grande sensibilité de la région charnière. Cette sensibilité du domaine  $C\gamma 2$  est retrouvée lors de la digestion par la pepsine puisque la transformation de l'IgG2 en  $F(ab')_2$  et pFc' est très lente (environ 8 heures) alors que celle de l'IgG1 est beaucoup plus rapide (1 heure).

TABLEAU 3.- DIFFERENCES DE SENSIBILITE A LA PROTEOLYSE  
ENZYMATIQUE DES SOUS-CLASSES D'IgG DE SOURIS.  
PRINCIPAUX FRAGMENTS OBTENUS

### PAPAÏNE

- SENSIBILITE

. Digestion en l'absence de cystéine : IgG2b > IgG2a > IgG1

- FRAGMENTS OBTENUS

. Digestion en l'absence de cystéine : IgG1 : F(ab)<sub>2</sub>  
IgG2a, IgG2b : Fab et Fc

. Digestion en présence de cystéine : Fab et Fc



### PEPSINE

- SENSIBILITE

IgG2b >>> IgG2a, IgG1

- FRAGMENTS OBTENUS

IgG1, IgG2a : F(ab')<sub>2</sub>  
IgG2b : F(ab')

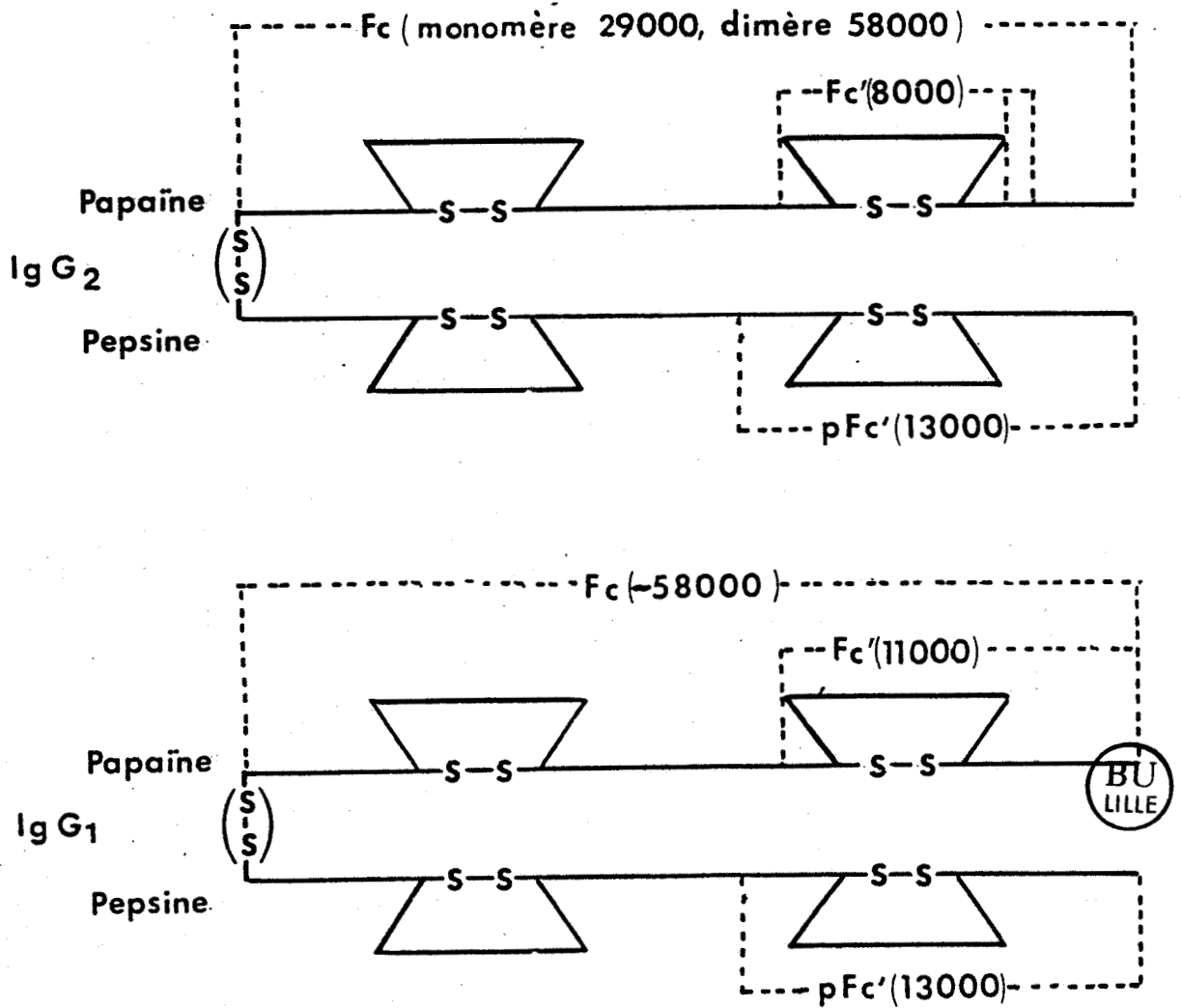
### TRYPSINE

- SENSIBILITE

IgG2b > IgG2a, IgG1

- FRAGMENTS OBTENUS

IgG1, IgG2a : F(ab)<sub>2</sub>  
IgG2b : Fab(t) et Fc(t)



**Figure 5.-** Représentation schématique des Fc des IgG1 et IgG2 de Cobaye indiquant les fragments obtenus par digestion par la papaïne et par la pepsine (d'après Leslie, Melamed et Cohen, 1971). La papaïne libère de l'IgG2 un Fc covalent (58 000 daltons), un Fc non covalent (29 000 daltons) et deux fragments Fc' (environ 8 000 daltons) qui diffèrent par leur extrémité C-terminale. La digestion de l'IgG1 par la papaïne produit un fragment Fc covalent (58 000 daltons) et un Fc' (11 000 daltons). La digestion pepsique aboutit à la formation d'un fragment pFc' (13 000 daltons) pour les deux sous-classes.

### 3.2. IgG BOVINES

Deux sous-classes majeures d'IgG existent dans l'espèce bovine : IgG1 et IgG2. L'IgG1 est la sous-classe majeure retrouvée dans le colostrum. Cette prédominance résulte d'un transport sélectif de cette sous-classe du sérum vers le colostrum. BUTLER et KENNEDY (1978) ont analysé la sensibilité à la papaïne et à la pepsine de ces deux sous-classes. Des différences mineures ont été observées lors du traitement par la papaïne en présence de cystéine, l'IgG1 apparaissant légèrement plus résistante à l'action enzymatique que l'IgG2. A l'inverse, l'IgG1 apparaît beaucoup plus sensible à l'action de la pepsine que l'IgG2. De plus, le fragment pFc' de l'IgG2 est de taille plus importante que celui libéré de l'IgG1, ce qui indique que les sites de clivage par la pepsine diffèrent selon la sous-classe.

### 3.3. IgG DE CHEVRE

Les deux sous-classes d'IgG de Chèvre : IgG1 et IgG2 présentent une différence de sensibilité à l'action de la papaïne (en l'absence de cystéine). L'hydrolyse de l'IgG1 est beaucoup plus rapide que celle de l'IgG2. Cette sensibilité a été observée aussi bien pour l'IgG1 sérique que pour celle présente dans le colostrum (MICUSAN et BORDUAS, 1975).

### 3.4. IgG DE LAPIN

Chez le Lapin, il n'existe pas de sous-classes d'IgG qui puissent être distinguées par leurs caractères antigéniques. Cependant, deux formes d'IgG, l'une résistante à l'action de la papaïne, l'autre sensible, ont été mises en évidence (GOODMAN, 1965 ; FANGER et SMYTH, 1972 a,b ; STANWORTH et TURNER, 1978). Ces deux populations présentent par ailleurs des différences biologiques : vitesse de catabolisme, transfert placentaire. FANGER et SMYTH (1972 a,b) ont montré que la résistance à la protéolyse est conférée par la présence d'une copule glucidique dans la région charnière de l'IgG. Cette copule glucidique semble également responsable des différences d'activité biologique.

#### 4. CONCLUSIONS

Ce long inventaire de l'action des enzymes protéolytiques sur les sous-classes d'IgG de diverses espèces animales montre que, dans tous les cas, une sous-classe se révèle particulièrement résistante à l'action des enzymes protéolytiques agissant essentiellement sur la région charnière tels que la papaïne. Cette caractéristique permet, par exemple, l'identification de la sous-classe IgG2 humaine ou de la sous-classe IgG1 murine. Il existe également des différences de sensibilité à la protéolyse enzymatique qui correspondent à une hydrolyse plus ou moins grande du domaine C $\gamma$ 2. C'est ce que l'on observe pour l'action de la pepsine ou pour l'hydrolyse prolongée par la papaïne.

Les mécanismes de la résistance plus ou moins importante à l'action de divers enzymes protéolytiques ne sont pas clairement expliqués. Dans le cas des IgG de Lapin, la résistance d'une sous-population d'IgG à l'hydrolyse par la papaïne semble conférée par la présence d'un glycanne dans la région charnière. Cette particularité structurale n'a pas été retrouvée pour les IgG d'autres espèces animales. L'augmentation de la sensibilité à l'hydrolyse par la papaïne liée à l'addition d'un agent réducteur tel que la cystéine, suggère que la réduction (partielle ou totale) des ponts disulfure inter-chaînes de la région charnière a pour conséquence une augmentation de la flexibilité de cette région et donc de son accessibilité à l'action de l'enzyme.

Il est donc probable que la flexibilité et l'accessibilité de la région charnière soient les facteurs limitant la protéolyse enzymatique par la papaïne et les autres enzymes actifs sur cette région. Il n'existe pas de relation évidente entre le nombre de ponts disulfure de cette région et sa sensibilité à la protéolyse enzymatique : chez la Souris, par exemple, IgG1 et IgG2a possèdent le même nombre de ponts disulfure inter-chaînes (3) mais l'une (IgG2a) est sensible à l'action de la papaïne alors que l'autre (IgG1) y est très résistante. On peut cependant remarquer que les sous-classes les plus sensibles à l'action de la papaïne (ainsi qu'à celle de la trypsine) sont celles dont les régions charnières sont les plus longues : IgG3 (66 acides aminés) chez l'Homme, IgG2b (25 acides aminés) chez la Souris. A l'inverse, les sous-classes les plus résistantes sont celles qui possèdent la plus courte



région charnière : IgG2 et IgG4 humaines (16 acides aminés), IgG1 murine (16 acides aminés) (voir paragraphe D). La seule exception est représentée par les IgG1 et IgG2 de Cobaye ; en effet, l'IgG1, dont la région charnière est la plus courte, est plus sensible à l'action de la papaïne que l'IgG2. Il faut cependant noter que, dans ce cas, la protéolyse par la papaïne de l'IgG1 convertit l'IgG en Fab et en Fc', avec transformation du domaine C $\gamma$ 2 en peptides. De ce fait, la sensibilité de l'IgG1 de Cobaye à la papaïne traduit plutôt une sensibilité à la protéolyse du domaine C $\gamma$ 2 qu'une sensibilité de la région charnière.

## D - DIFFERENCES STRUCTURALES ENTRE SOUS-CLASSES D'IgG

### 1. SEQUENCE EN ACIDES AMINES

La structure primaire d'immunoglobulines monoclonales appartenant à différentes sous-classes d'IgG a été déterminée chez l'Homme et dans différentes espèces animales. Ces études avaient pour but principal d'essayer d'établir des relations entre les différences de structure des sous-classes et leurs différences d'activité biologique. Un autre objectif était de déterminer les analogies structurales entre sous-classes d'IgG de différentes espèces animales.

Les études les plus complètes ont été réalisées sur les sous-classes d'IgG humaines, murines et de Cobaye. Dans ces 3 modèles, les séquences des domaines constants (figures 6, 8 et 10) et des régions charnières (figures 7, 9 et 11) ont été déterminées. Les comparaisons structurales permettent de dégager 3 points essentiels :

1° - Les différences observées au sein de ces différentes espèces ne sont pas les mêmes : chez l'Homme, les homologies entre domaines constants sont très importantes (plus de 90 % pour chaque domaine C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3) ; chez la Souris les différences entre sous-classes, en particulier IgG1 et IgG2a sont beaucoup plus grandes que chez l'Homme puisque l'homologie entre domaines constants est de 60 à 80 % seulement. Ces données impliquent que la diversification en sous-classes n'a pas la même signification dans différentes espèces animales. Les données acquises chez l'Homme suggèrent que la divergence de sous-classes est un phénomène apparu récemment au





Figure 7.- Séquence des régions charnières des sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 humaines.

Les nombres en-dessous des séquences des régions charnières d'IgG1 et d'IgG2 se réfèrent aux séquences complètes de la chaîne lourde  $\gamma_1$  EU (Edelman *et al.*, 1969) et de la chaîne lourde  $\gamma_2$  TIL (Wang, Tung et Fudenberg, 1980). L'homologie de la séquence, répétée trois fois de façon identique dans la région charnière de l'IgG3, avec celle de la région charnière de l'IgG1 est indiquée. De même sont encadrées les séquences identiques des régions charnières des IgG1, IgG2 et IgG4. Les sites de clivage par la papaïne (PAP) identifiés (Press et Hogg, 1970 ; Michaelsen, Frangione et Franklin, 1977 ; Wang, Tung et Fudenberg, 1980) sont également indiqués.



CH<sub>1</sub> Y1 AKTTPT VYPLAP GMAASQ SMVTLG CLVKGYFPEPVI VITWNSGSLSSGVHTFPA VLQSDLYTLLSSVSVP TSPET VTCMVAHAPSS TKVDKKI  
 Y2a AKTTAPS VYPLAP VCGDTTGSVTLG CLVKGYFPEPVI LITWNSGSLSSGVHTFPA VLQSDLYSSVTVTVTSSSTWPSQSI TCMVAHAPSS TKVDKKI  
 Y2b AKTI PPS VYPLAP GCGDTTGSVTSG CLVKGYFPEPVI VITWNSGSLSSGVHTFPA ALLQSGLYTMS SSVTVPSST WPSQT VTCMVAHAPSS TKVDKKI

CH<sub>2</sub> Y1 VSSVFI FPPKPKD TLLITVTPK VTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDNVEVHTAQTQPREEQFMSTFRVVSALPIMHQDMLNGKEFKCRVMSAAFPAPIEK TISKTKG  
 Y2a LGGPSVFI FPKIKMPLMISLSP IIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVDNVEVHTAQTTHTRQMYBSTLRVVSAPPIQHQMMSGKEFKCKVMNKDLPAPIERTISKPKG  
 Y2b EGGPSVFI FPPNIKDVLMISLTPK VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQHRED YNSTIRVVS TLP IQH QDVMMSGKEFKCKVMNKDLPSP IERTISKIKG

CH<sub>3</sub> Y1 KPRAPQVYTI PPKKEQNAKDKVSLTCMITDFFPE DITIVENQSDGQAPENYKNIQPIIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHMHHTEKSLSHSPGG  
 Y2a SVRAPQVYVLPPP GGHTKKEVTLTCMVTNFMPEDIYVEVTNNGKTELYKNIQPVLDSDGGSYFMYSKLRYEKKMNVERNYSYCSVWHQGLHMHNVSTKSFSTRTPGG  
 Y2b LVRAPQVYTLPPP AEOLSRKDVSLTCLVVGFMPPGDISVEVTSNGHTEENYKDIAPVLDSDGGSYFIYSKLNMKTSKWEKTD SFCNIVRHEGLKMYLKKITISRSPGG

Figure 8.- Séquence des domaines CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> des chaînes lourdes d'IgG murines.  
 Y1 : IgG1 (MOPC 21 (Adetugbo, 1978) ; Y2a : IgG2a MOPC 1973 (Fougereau *et al.*, 1976 ; Y2b : séquence déduite de celle du gène codant pour la chaîne Y2b (Tucker *et al.*, 1979). Les résidus d'acides aminés ou séquences identiques pour les trois sous-classes sont encadrés. La numérotation indiquée est celle de la chaîne lourde Y1 (Adetugbo, 1978). Les acides aminés sont identifiés par le code à une lettre.





CH<sub>1</sub> Igg1 ARTZAPSVFFPLAIBSCVDTSGSMITLGCLVKGYFPEVTVKWNSGALTS6VHLYPAVLSSGLYSLTSMVTVPSSQKATCNVDHPASIGTKVDKIIV  
Igg2 ARTIAPSVFFPLAASCVDTSGSMITLGCLVK6YFPEVTVKWNSGALTS6VHTFFAVLQSGLYSLTSMVTVPSSQKATCNVAHPASSTKVPDKTV

CH<sub>2</sub> Igg1 LGGPSVFIFFPKPKDITLNI SLTPKATCVVVDVVSQEDLEVQFTVM6M KLM BTAZABVLZZZFNIGTFRVVSALITIZHBMLVSBKALPATITITRTISKAKG  
Igg2 LGGPSVFIFFPKPKDITLNI SLTPRVTCVVVDVVSQDEPEVQFTMVFYDMKPV6NAETKPRVEQVNTTFRVESVLPIDHIDNALRGKEFKCKVYNKALPAPIEKTISKTKG

CH<sub>3</sub> Igg1 PPRIPZVYLLPPLPRBZLSKIKVSLTCTMTTGFFYPADINVENHDSSEPI SDYKNTPPVFDSDIDE TFFLYSRLKVDTMAMNDIGESFTCSVMHEALP NHVIQKSI SRSPG  
Igg2 APRMPDIVYTLPPSRDELSSSKVSVITCLJINFFPADIHVEHASNRRVPVSEKEYKNTPIIEDADIGSYFLYSKLTVDKSAWDQIGTVVYTCVMHEALNHVITQKAI SRSPG

Figure 10.- Séquence des domaines CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> des Igg1 et Igg2 de Cobaye (Cebra *et al.*, 1971 ; Tracey et Cebra, 1974 ; Trischmann et Cebra, 1974 ; Cebra *et al.*, 1977).

Les séquences (ou résidus d'acides aminés) identiques sont encadrées. L'identification des acides aminés est réalisée par le code à une lettre.

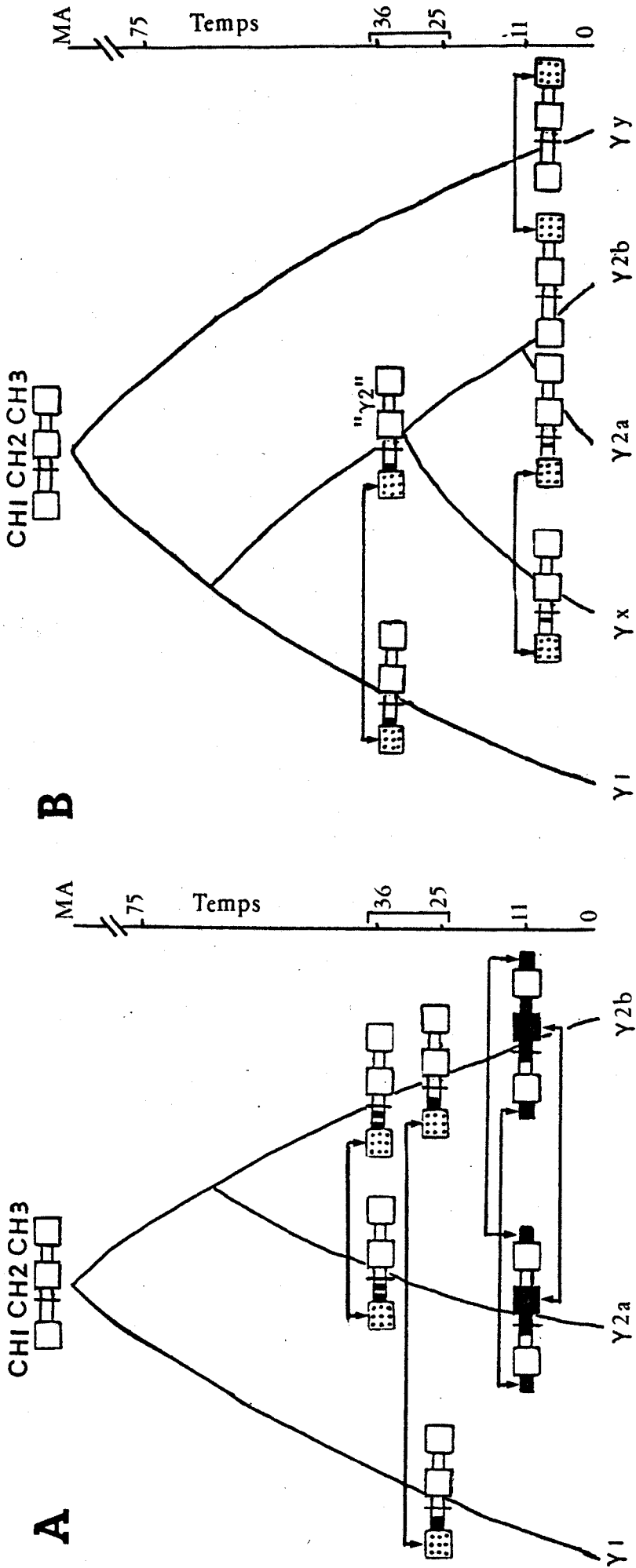




cours de l'évolution, alors que chez la Souris, il apparaît que la divergence des sous-classes est un phénomène relativement ancien de l'évolution.

2° - Chez la Souris, comme chez le Cobaye, il existe des homologies différentes selon les domaines C  $\gamma$ . C'est ainsi qu'il y a 80 % d'homologie entre les domaines C  $\gamma$ 1 des IgG1 et IgG2b de Souris, mais seulement 55 % entre leurs domaines C  $\gamma$ 3. La détermination complète des séquences nucléotidiques des gènes  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2a et  $\gamma$ 2b chez la Souris (MIYATA et al., 1980 ; YAMAWAKI-KATAOKA, MIYATA et HONJO, 1981 ; OLLO et al., 1981) a permis de proposer une explication intéressante à ce phénomène. En effet, les séquences nucléotidiques codant pour le domaine C  $\gamma$ 1 et pour une partie de l'intron suivant (intron I1), présentent une grande homologie dans le cas de l'IgG1 et de l'IgG2b. Ceci suggère qu'un "échange" de domaines s'est effectué par un mécanisme de crossing-over non homologue, le point de crossing-over étant localisé au milieu de l'intron I1. Un crossing-over non homologue se serait également produit au cours de l'évolution entre les gènes  $\gamma$ 2a et  $\gamma$ 2b (voir figure 12). Ce crossing-over aurait également permis l'introduction du domaine C  $\gamma$ 1 de l'IgG2a dans le gène codant pour l'IgG2b (ou l'inverse).

3° - La région charnière est la zone où les différences de séquences entre sous-classes sont les plus importantes quelle que soit l'espèce étudiée. C'est ainsi que les sous-classes d'IgG humaines, dont les domaines constants C  $\gamma$ 1, C  $\gamma$ 2 et C  $\gamma$ 3 présentent des homologies de l'ordre de 90 % (voir la figure 6), ont des homologies de l'ordre de 50 % pour leurs régions charnières. On notera en particulier dans la figure 7, la structure de la région charnière de l'IgG3 humaine comportant 66 acides aminés alors que les autres régions charnières ne comportent que 16 ou 19 acides aminés. L'originalité de la structure de la région charnière suggère que le gène codant cette séquence a évolué beaucoup plus rapidement que les autres gènes C  $\gamma$ , et que par conséquent la pression de sélection qui s'est exercée à ce niveau est beaucoup plus importante que pour les autres domaines. Une donnée intéressante concernant le gène codant pour la région charnière a été apportée par TUCKER et al. (1979). Ces auteurs ont montré que le gène codant pour les domaines constants de la chaîne  $\gamma$ 2b était composé de 4 exons codant successivement pour le domaine C  $\gamma$ 1, la région charnière, les domaines C  $\gamma$ 2 et



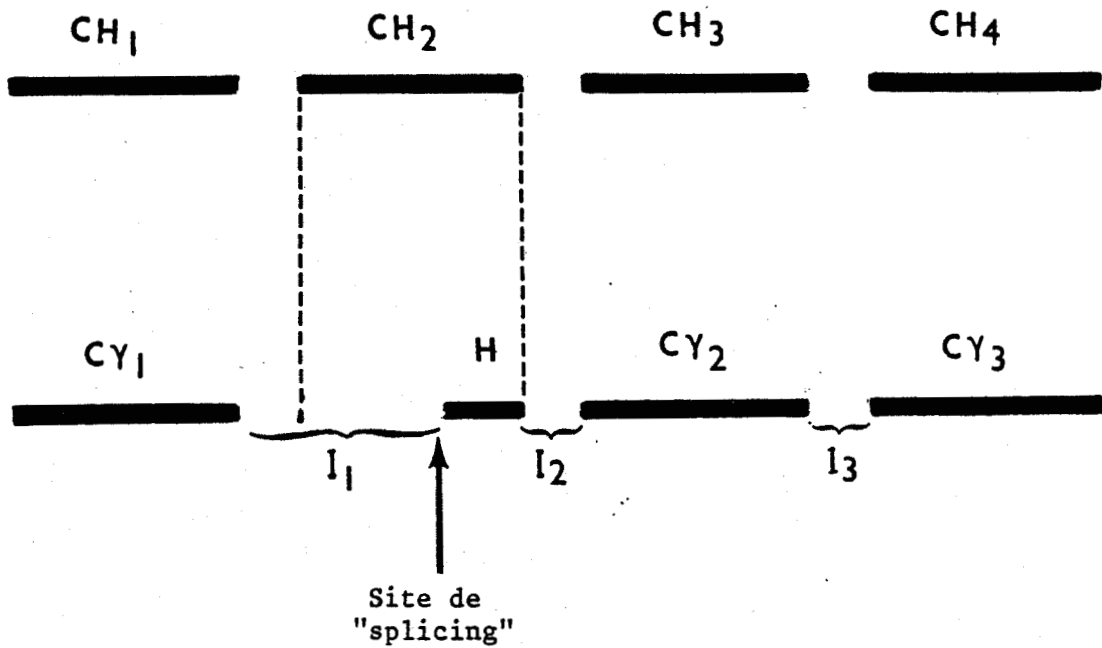
BU  
LILLE

Figure 12.- Représentation schématique de l'évolution des gènes  $\gamma$  des IgG de Souris, déduite de la comparaison des structures des exons et introns des gènes  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2a$  et  $\gamma 2b$ . Deux schémas d'évolution sont possibles : A et B. Les lignes horizontales avec des flèches indiquent les échanges de segments de gènes par crossing-over. Les carrés représentent les exons codant pour les domaines et les bandes plus étroites, les introns. MA : Millions d'années (d'après Yamawaki-Kataoka *et al.*, 1981).

C $\gamma$ 3 ; ces exons sont séparés par trois introns (I1, I2, I3). Il est apparu que la séquence nucléotidique de l'ensemble (intron I1 + exon codant pour la région charnière) présentait une homologie relativement importante avec celles codant pour les domaines C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3. Ceci suggère que cet ensemble correspond à un domaine ancestral, homologue du domaine C $\mu$ 2 des IgM, et que l'expression du gène codant pour la région charnière résulterait en fait d'une modification des sites de "splicing" dans le gène ancestral (figure 13). Cette possibilité d'utilisation d'une partie d'un gène codant pour un domaine pour produire un exon codant pour la région charnière est probablement une des raisons qui expliquent les divergences importantes qui peuvent exister entre les régions charnières de différentes sous-classes.

## 2. STRUCTURE DES GLYCANNES

Toutes les IgG contiennent une copule glucidique par chaîne  $\gamma$ , localisée dans le domaine C $\gamma$ 2 (voir la revue de BEALE et FEINSTEIN, 1976). Le glycanne est lié à l'axe peptidique par une liaison de type N-glycosidique, le résidu de N-acétylglucosamine étant lié à l'asparagine en position 297 de la chaîne  $\gamma$ 1 de l'immunoglobuline EU ou à une position tout à fait homologue dans d'autres chaînes (HILL et al., 1966 ; TRACEY et CEBRA, 1974 ; FOUGEREAU et al., 1976 ; WANG, TUNG et FUDENBERG, 1980). Les structures actuellement déterminées (KORNFELD et al., 1971 ; BAENZIGER et KORNFELD, 1974 ; ITO, MURAMATSU et KOBATA, 1975 ; TAI et al., 1975 ; CHERON et al., 1976 ; RAO, GARVER et MENDICINO, 1976 ; MIZOUCHI et al., 1982) pour différentes IgG normales ou myélomateuses montrent qu'il s'agit d'une structure de type N-acétyl-lactosaminique plus ou moins complète : comportant 0,1 ou 2 acides sialiques, 0, 1 ou 2 galactoses. Dans certains cas, la structure se limite au "core" : Man  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  6 (Man  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3) (GLcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 Man  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 GLcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 (  $\pm$  Fuc  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  6) GLcNAc. MIZOUCHI et al. (1982) ont montré que les IgG myélomateuses contiennent ces différentes structures en proportions très variables d'une immunoglobuline à une autre. A l'inverse, la proportion des différentes structures observée dans le cas d'IgG normales est relativement constante d'un échantillon à un autre. Jusqu'à présent, il n'a pas été démontré de différences dans la structure de ce glycanne en relation avec la sous-classe d'IgG.



(BU  
LILLE)

Figure 13.- Schéma illustrant l'hypothèse de Tucker *et al.* (1979) selon laquelle une partie de l'intron  $I_1$  et le gène codant la région charnière (H) seraient issus d'un gène  $CH_2$  ancestral. L'exon codant pour la région charnière résulterait de l'apparition dans le gène  $CH_2$  d'un site supplémentaire de "splicing".

Il existe cependant chez le Lapin une sous-population d'IgG caractérisée par l'attachement de type o-glycosidique d'un résidu de N-acétylgalactosamine à une thréonine dans la région charnière (FANGER et SMYTH, 1972 a,b). Cet attachement est asymétrique, le résidu de N-acétylgalactosamine n'étant présent que sur une seule des deux chaînes. La présence de ce résidu de galactosamine explique la résistance à la papaïne de cette sous-population d'IgG ainsi que des différences d'activité biologique telles que la vitesse de catabolisme. La présence d'une telle structure n'a pas été observée dans d'autres espèces animales.

#### E - DIFFERENCES CONFORMATIONNELLES ENTRE SOUS-CLASSES D'IgG

Alors que de très nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la conformation des immunoglobulines G en solution, en particulier l'étude des flexibilités relatives des parties Fab et Fc, des modifications observées lors de la fixation de l'antigène ou d'autres ligands, peu d'informations ont été obtenues sur l'existence de différences conformationnelles entre sous-classes qui pourraient expliquer certaines différences d'activité biologique. JOHNSON et al. (1974) ont analysé les spectres dichroïques de différentes IgG monoclonales appartenant à l'une des quatre sous-classes d'IgG humaines. Leurs résultats montrent que l'IgG3 se distingue très nettement des autres sous-classes par l'existence d'une bande négative située à 240 nm (caractéristique des cystéines, BEWLEY, 1977). Ceci est très probablement lié à la structure de la région charnière de l'IgG3, région très étendue (66 acides aminés) et comportant 15 ponts disulfure. D'autres études (JOHNSON, MICHAELSEN et SCOPES, 1975) ont montré que cette région charnière de l'IgG3 a une structure très ordonnée, contenant un grand pourcentage de structure en feuillet plissé  $\beta$ . SJOBERG et al. (1980) ont montré que la forme globale de la molécule d'IgG3 est très différente de la structure classique en Y (ou en "tête de Mickey") déduite des études de diffraction de rayons X de l'IgG1 humaine KOL (HUBER et al., 1976 ; COLMAN et al., 1976). En effet, la molécule d'IgG3 a la forme d'un cylindre elliptique. Cette conformation très "étirée" est probablement liée à l'existence de la région charnière de 66 acides aminés. Elle explique vraisemblablement la sensibilité de l'IgG3 à la protéolyse enzymatique. La relation entre cette conformation et l'expression de certaines activités biologiques (fixation du complément, liaison aux lymphocytes et macrophages) n'a pas été étudiée.

Une analyse très intéressante a été réalisée par le groupe de CEBRA, sur les deux sous-classes d'IgG de Cobaye : IgG1 et IgG2 (CEBRA et al., 1974 ; CORDLE, 1976 ; CEBRA et al., 1977). Ces auteurs, constatant qu'il était difficile de corrélérer les différences de structure entre domaines constants des IgG1 et IgG2 avec leurs différences d'activité biologique, ont émis l'hypothèse que ces deux sous-classes possédaient les mêmes sites d'expression d'une activité biologique (par exemple la fixation du complément ou la liaison aux mastocytes) mais que la conformation globale de la molécule intervenait pour permettre ou non l'expression de l'activité biologique. L'approche méthodologique utilisée a été la suivante. Ayant préparé des IgG1 et IgG2 à activité anti-dansyl, ces auteurs ont mesuré la décroissance de la lumière fluorescente polarisée de complexes IgG-dansyllysine excités par un flash de lumière polarisée. Les résultats ont montré que la décroissance se produit selon une courbe complexe pour les deux sous-classes, alors qu'il s'agit d'une courbe simple pour le fragment Fab. Le caractère complexe de la courbe provient de ce que la rotation de la partie Fab autour de la région charnière s'ajoute au mouvement global de la molécule en solution. Or cette contribution liée au mouvement de rotation de la partie Fab est beaucoup plus importante pour l'IgG2 que pour l'IgG1. Ceci suggère que la flexibilité de la région charnière de l'IgG2 est beaucoup plus grande que celle de l'IgG1. Ces différences conformationnelles sont probablement liées selon CEBRA et al. (1977) à la structure de la région charnière, qui est nettement plus courte dans l'IgG1 que dans l'IgG2 (voir la figure 11, page 36). Les mêmes auteurs ont analysé la formation de complexes entre IgG1 et IgG2 anti-dansyl et un haptène divalent, le didansyldiaminooctane. Les IgG2 forment essentiellement un dimère, les deux sites anticorps de chaque molécule d'IgG étant liés à l'antigène. Dans le cas des IgG1, les complexes sont des polymères de plus grande taille où tous les sites anticorps ne sont pas occupés. Ces résultats indiquent également que la mobilité des parties Fab de l'IgG1 est beaucoup plus restreinte que dans le cas de l'IgG2.

### CHAPITRE III

#### L'AFFINITE DES SOUS-CLASSES D'IgG POUR LA PROTEINE A DE S. AUREUS : UN EXEMPLE DES RELATIONS ENTRE LEURS DIFFERENCES STRUCTURALES ET LEURS DIFFERENCES D'ACTIVITE BIOLOGIQUE

---

Les activités biologiques des immunoglobulines peuvent être schématiquement divisées en deux catégories (figure 14) :

1° La liaison à l'antigène, dénommée fonction primaire de l'immunoglobuline, et qui est une propriété de la partie Fab.

2° Les autres activités biologiques qui peuvent être ou non une conséquence de la réaction antigène-anticorps : catabolisme, fixation du complément, transfert transmembranaire, liaison aux leucocytes et plaquettes, affinité pour les constituants des parois bactériennes. Ces activités, dénommées fonctions secondaires de l'immunoglobuline dépendent pour leur expression de la structure de la partie constante de la chaîne lourde et plus particulièrement de la structure du Fc.

C'est par l'expression de ces fonctions "secondaires" que se distinguent les sous-classes d'IgG. Pour chacune de ces fonctions, de très nombreux travaux ont cherché à définir les bases structurales de la fonction biologique et à expliquer les relations entre les différences d'activité biologique des sous-classes d'IgG et leurs différences structurales. Parmi ces fonctions biologiques secondaires, l'affinité pour la protéine A, constituant des parois bactériennes de S. aureus, s'est révélée très intéressante pour la purification des immunoglobulines de la classe IgG et dans certains cas, pour la séparation des différentes sous-classes d'IgG. C'est également la propriété biologique dont les bases structurales ont été les mieux définies, essentiellement pour les sous-classes d'IgG humaines.

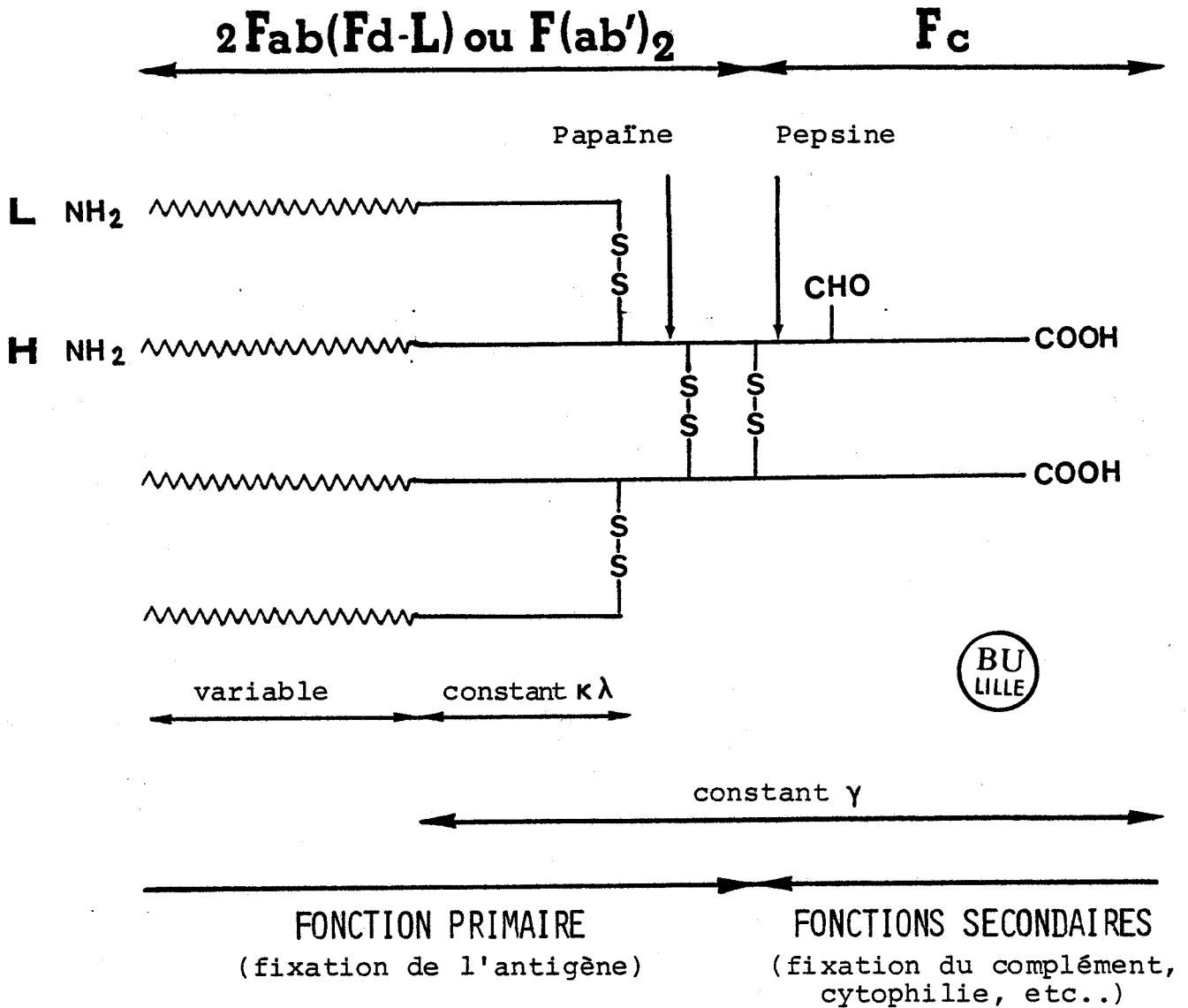


Figure 14.- Représentation schématique de la molécule d'IgG, des principaux fragments obtenus par protéolyse enzymatique (Fab,  $F(ab')_2$ ,  $F_c$ ), et localisation dans cette structure des fonctions primaire (fixation de l'antigène) et secondaires (fixation du complément, cytophilie, régulation du catabolisme, etc...) (d'après Spiegelberg, 1974). CHO : site de fixation du glycanne de l'IgG.

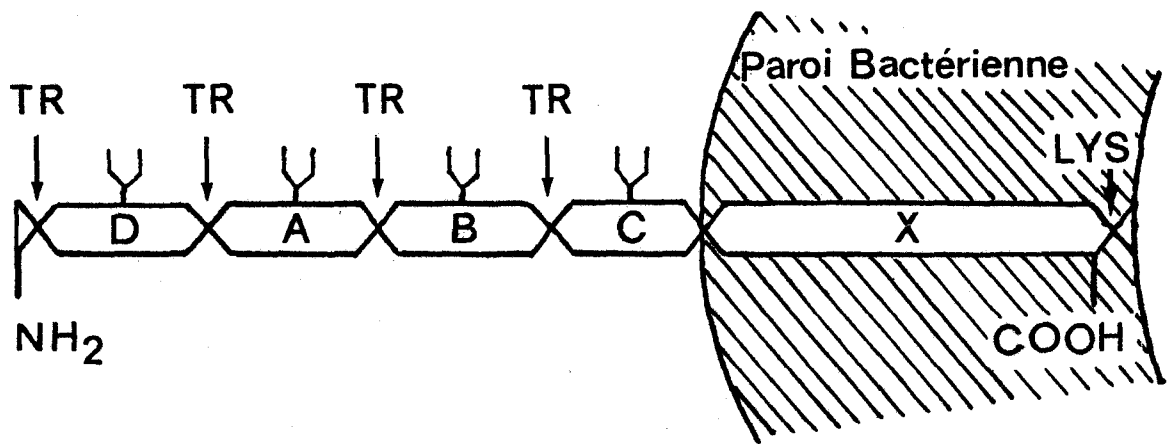


## A - LA PROTEINE A DE S. AUREUS

La protéine A est un constituant protéique présent sur la paroi des staphylocoques appartenant aux diverses souches de Staphylococcus aureus. Identifiée de façon précise par GROV, MYKLESTAD et OEDING (1964) et OEDING, GROV et MYKLESTAD (1964), elle a été purifiée et sa structure primaire a été déterminée (SJODAHL, 1977 a,b). Son interaction avec le Fc des IgG a été mise en évidence pour la première fois par FORSGREN et SJOQUIST (1966). La figure 15 montre comment se présente de façon schématique la structure de la protéine A. Quatre zones d'homologies (A, B, C et D) sont capables de se lier chacune à une molécule d'IgG ; une autre zone (zone X) constitue l'ancrage de la protéine A dans la paroi bactérienne. La liaison de la protéine A aux immunoglobulines G a été présumée comme un facteur de pathogénicité de S. aureus, par le fait qu'elle empêcherait les anticorps anti-bactériens d'exercer leur action sur leurs cibles (MUDD, 1971). Son affinité pour les IgG et éventuellement pour d'autres classes d'immunoglobulines, ainsi que ses différences d'affinité pour les sous-classes d'IgG, ont fait de la protéine A de S. aureus un réactif immunologique dont les applications analytiques se sont développées de façon considérable.

## B - DIFFERENCES D'AFFINITE DES SOUS-CLASSES D'IgG POUR LA PROTEINE A DE S. AUREUS

La capacité des molécules d'IgG de lier la protéine A de S. aureus a été étudiée par différentes méthodes : interaction avec des suspensions bactériennes inactivées (ANKERST et al., 1974), diffusion en gel d'agar ou d'agarose en une dimension (dans un gel contenant de la protéine A, KRONVALL et WILLIAMS, 1969), ou en double dimension (KRONVALL et al., 1970 c ; KRONVALL et al., 1974), liaison d'IgG immobilisée, sur un support solide (agarose, polyacrylamide) à de la protéine A marquée à l'iode 125 (LANGONE, BOYLE et BORSOS, 1977), chromatographie sur des colonnes de protéine A couplée au Sépharose (HJELM, HJELM et SJOQUIST, 1972).



BU  
LILLE

Figure 15.- Structure schématique de la protéine A de *S. aureus*, avec ses quatre zones homologues, D, A, B, C, fixant chacune une molécule d'IgG, et la zone X, qui permet l'ancrage dans la paroi bactérienne. Les points de clivage par la trypsine (TR) et la lysostaphine (LYS) sont également indiqués (d'après Langone, 1982). Lysostaphine : enzyme protéolytique de *Staphylococcus staphylolyticus*.

En raison de l'intérêt de la protéine A pour la purification des IgG, l'affinité des sous-classes d'IgG a été étudiée chez l'homme et dans de très nombreuses espèces animales (voir les revues de GODING, 1978 et LANGONE, 1982).

### 1. IgG HUMAINES

KRONVALL et WILLIAMS (1969) ont été les premiers à démontrer que parmi les sous-classes d'IgG humaines IgG1, IgG2 et IgG4 se lient à la protéine A alors que l'IgG3 ne se fixe pas. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de ANKERST et al. (1974). Cependant, SKVARIL (1976), SKVARIL, ROTH-WILKY et BARANDUM (1980) et VAN KAMP (1979) ont montré qu'une proportion faible et variable de l'IgG3 se lie à la protéine A. La base structurale de cette réactivité d'une fraction de l'IgG3 n'est pas connue, mais pourrait suggérer une hétérogénéité au sein de la sous-classe IgG3.

DUHAMEL et al. (1979) ont montré qu'il existe des différences légères d'affinité entre la sous-classe IgG1 et la sous-classe IgG2 qui se manifestent lorsqu'un gradient de pH descendant est appliqué sur une colonne de protéine A-Sépharose. La majorité de l'IgG2 est éluée à pH 4,7, alors que la majorité de l'IgG1 est éluée à pH 4,3.

### 2. IgG DE SOURIS

Initialement, KRONVALL, GREY et WILLIAMS (1970 a) montraient que les sous-classes IgG2a, IgG2b et IgG3 sont absorbées sur des suspensions bactériennes de S. aureus (Cowan strain I) contenant de la protéine A. La fixation de l'IgG1 n'était pas mise en évidence. Cependant, ultérieurement l'affinité de l'IgG1 par la protéine A a été démontrée (MITCHELL, GODING et RICHARD, 1977 a ; MITCHELL et al., 1977 b ; Mc KENZIE, WARNER et MITCHELL, 1978 ; EY, PROWSE et JENKIN, 1978 ; CHALON, MILNE et VAERMAN, 1979). L'affinité de l'IgG1 est plus faible que celle d'autres sous-classes. Cela se traduit par le fait que lorsqu'un gradient de thiocyanate de sodium est appliqué sur une colonne de protéine A-Sépharose à pH 7,4, l'IgG1 est éluée par une molarité 0,5 M alors que les IgG2 sont

éluées entre 1,5 M et 2 M. De même, si un gradient de pH descendant est appliqué, l'IgG1 est éluée par un tampon de pH 7,0 à 6,0, alors que l'IgG2a est éluée à pH 4,5 - 5,0 et l'IgG2b à pH 3,5 - 4,0 (EY et al., 1978). Ces différences d'affinité permettent donc la purification des sous-classes d'IgG de souris (IgG1, IgG2a, IgG2b) à partir du sérum. La purification de l'IgG3, qui est présente en proportion très faible dans le sérum de Souris, est possible en utilisant la technique décrite par SEPPALA et al. (1981). Ces auteurs ont montré que l'IgG3 est éluée par un tampon de pH 4,5 et peut être séparée de l'IgG2a en utilisant un gradient continu de pH. Ces auteurs ont également montré que les IgG2a peuvent avoir une affinité différente pour la protéine A selon la nature de leur allotype : les IgG2a ayant l'allotype a et j sont éluées à pH 5,0, alors que les IgG2a ayant l'allotype b sont éluées à pH 4,5.

### 3. IgG DE COBAYE

Les deux sous-classes d'IgG : IgG1 et IgG2 fixent la protéine A (FORSGREN, 1968 ; STALENHEIM et MALMHEDEN-ERIKSSON, 1971 ; GROV, 1973 ; ENDRESEN, 1979 b). L'affinité de l'IgG2 semble plus importante que celle de l'IgG1 (résultats fondés sur une élution des sous-classes d'une colonne de protéine A-Sépharose utilisant un gradient de pH ; COE, COE et ROSS, 1981).

### 4. IgG DE HAMSTER

Les deux sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG2) de différentes espèces de Hamster, présentent des différences d'affinité pour la protéine A et peuvent de ce fait être séparées par chromatographie sur protéine A-Sépharose en utilisant un gradient de pH descendant (COE et al., 1981).

### 5. IgG DES RUMINANTS (Chèvre, Mouton et Boeuf)

La liaison à la protéine A des deux sous-classes d'IgG de Chèvre, IgG1 et IgG2, a été étudiée par DELACROIX et VAERMAN (1979) et DUHAMEL, MEEZAN et BRENDEL (1980). A pH 9,1, l'élution de l'IgG1 est retardée sur une colonne de protéine A-Sépharose (ce qui permet la séparation des autres

protéines du sérum). L'élution de l'IgG2 est obtenue par abaissement du pH à 5,9 (DELACROIX et VAERMAN, 1979). DUHAMEL et al. (1980) ont rapporté des résultats différents pour l'IgG1 puisqu'ils suggèrent que son élution est obtenue à pH 6,7.

GOUDSWAARD et al. (1978) ont montré que l'IgG1 de Mouton a une faible affinité pour la protéine A, puisqu'elle n'est pas retenue d'une colonne de protéine A-Sépharose à pH 7,5. A l'inverse, l'IgG2 a une affinité beaucoup plus grande (élution à pH 2,5). Des résultats similaires ont été obtenus pour les IgG1 et IgG2 bovines (GOUDSWAARD et al., 1978).

## 6. IgG D'AUTRES ESPECES

La liaison de la protéine A à des IgG de nombreuses autres espèces a été étudiée. Chez le Porc, 90 à 96 % des IgG se lient à la protéine A-Sépharose (MILON, HOUDAYER et METZGER, 1978 ; GOUDSWAARD et al., 1978 ; ENDRESEN, 1979 a ; ZIKAN, 1980). Les deux sous-classes IgG1 et IgG2 donnent un profil d'élution hétérogène quand un gradient de chlorure de magnésium est appliqué à une colonne de protéine A-Sépharose (ZIKAN, 1980). Chez le Lapin, une faible proportion des IgG ne se fixe pas à la protéine A, mais l'interprétation de cette hétérogénéité en terme de sous-classes ne peut être faite (GODING, 1976). Chez le Chien, la totalité des sous-classes d'IgG se lie à une colonne de protéine A-Sépharose (WARR et HART, 1979) et des différences d'affinité n'ont pas été mises en évidence. De même chez le Cheval, (GOUDSWAARD et al., 1978), les quatre sous-classes : IgGa, IgGb, IgGc et IgG(T) se lient à la protéine A-Sépharose.

## C - BASES STRUCTURALES DE LA LIAISON ENTRE IgG ET PROTEINE A. RELATIONS ENTRE LES DIFFERENCES DE STRUCTURE DES SOUS-CLASSES D'IgG ET LEUR AFFINITE POUR LA PROTEINE A

Les bases structurales de l'interaction entre protéine A de S. aureus et IgG ont été à peu près complètement définies, essentiellement pour les IgG humaines. Ceci a pu être réalisé grâce à l'utilisation de différents types d'approches méthodologiques très intéressantes :

- 1° L'étude de la liaison de fragments d'IgG à la protéine A.
- 2° L'analyse de l'affinité pour la protéine A d'IgG dont les ponts disulfure inter-chaînes ont été réduits, ou d'IgG qui comportent une délétion de la région charnière.
- 3° La cristallisation d'un complexe entre Fc d'IgG et fragment B de la protéine A, et la détermination de la structure tridimensionnelle de ce complexe.
- 4° L'analyse de l'affinité pour la protéine A d'IgG chimiquement modifiées sur certains acides aminés.
- 5° L'analyse structurale d'une IgG3 myélomateuse humaine ayant la propriété de se lier à la protéine A.

### 1. LIAISON DE FRAGMENTS D'IgG A LA PROTEINE A

Les études réalisées dans différents modèles (Homme, Souris, Lapin, Cobaye principalement) ont montré que le Fc de l'IgG se lie à la protéine A. Une certaine réactivité de la partie Fab a été observée dans certaines espèces animales, par exemple chez l'Homme (INGANAS, JOHANSSON et BENNICH, 1980 ; INGANAS, 1981), le Cobaye (GROV, 1973 ; ENDRESEN, 1979 b) et le Porc (ZIKAN, 1980) mais la liaison est faible et ne semble pas impliquer les mêmes séquences de la protéine A que celles qui se lient à la partie Fc.

Divers fragments du Fc de l'IgG1 humaine, correspondant soit au domaine C $\gamma$ 3 (Fc' ; KRONVALL et FROMMEL, 1970 ; pFc', SKVARIL et al., 1980), soit au domaine C $\gamma$ 2 (ENDRESEN et GROV, 1976) sont incapables de se lier à la protéine A. A l'inverse, des fragments du Fc contenant une chaîne (c'est-à-dire un ensemble C $\gamma$ 2 + C $\gamma$ 3) intacte sont capables de se lier à la protéine A (ENDRESEN et GROV, 1976) (figure 16). De même, chez le Lapin, ni le fragment Facb (IgG dépourvue du domaine C $\gamma$ 3), ni les fragments F(ab')<sub>2</sub> et pFc' ne sont réactifs vis-à-vis de la protéine A (STEWART, VARRO et STANWORTH, 1978). STEWART et al. (1978) ont montré qu'un hydrolysât par la plasmine de l'IgG qui contient un mélange de Facb et pFc n'est pas capable de se lier à la protéine A. L'ensemble de ces résultats suggère que la liaison à la protéine A nécessite une chaîne C $\gamma$ 2-C $\gamma$ 3 intacte.

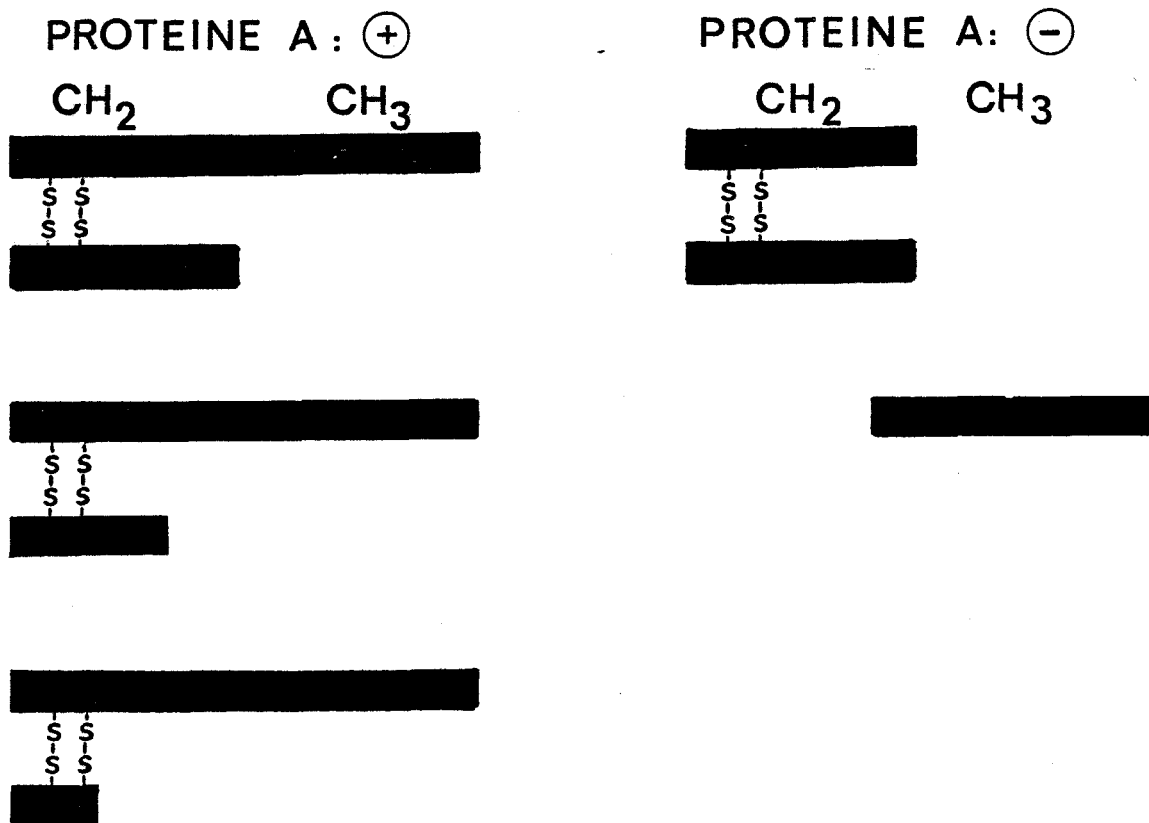


Figure 16.- Diagramme représentant de façon schématique les différents fragments obtenus par hydrolyse trypsique du Fc d'IgG humaine (digestion après acidification du Fc). Les fragments de la partie droite de la figure -correspondant soit à un dimère covalent du domaine CH<sub>2</sub>, soit au domaine CH<sub>3</sub>- sont incapables de se lier à la protéine A. Les fragments de la partie gauche de la figure se lient à la protéine A. On observe que ces différents fragments contiennent tous une chaîne du Fc intacte. Ceci indique que les domaines CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> participent tous deux à l'interaction avec la protéine A (d'après Kronvall et Frommel, 1970 ; Endresen et Grov, 1976 ; Skvaril *et al.*, 1980).

## 2. LIAISON A LA PROTEINE A D'IgG REDUITES OU D'IgG PRESENTANT UNE DELETION DE LA REGION CHARNIERE

La réduction des ponts disulfures de la région charnière n'affecte pas la liaison de l'IgG à la protéine A (KLEIN et al., 1981). De même, des IgG humaines dont la région charnière est absente ont une affinité intacte pour la protéine A (KLEIN et al., 1981). Ainsi, à la différence d'autres activités biologiques comme la fixation du complément ou l'interaction avec les leucocytes, la région charnière ne joue aucun rôle dans la liaison de l'IgG à la protéine A.

## 3. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU COMPLEXE ENTRE Fc D'IgG1 HUMAINE ET FRAGMENT B DE LA PROTEINE A

L'analyse par DEISENHOFER et al. (1978) et DEISENHOFER (1981), d'un cristal correspondant au complexe Fc d'IgG1-fragment B de la protéine A a permis de définir très précisément les résidus d'acides aminés de l'IgG impliqués dans la liaison avec la protéine A (figure 17). Ces résidus appartiennent à la fois au domaine C $\gamma$ 2 et au domaine C $\gamma$ 3. Dans le domaine C $\gamma$ 2 : la méthionine en position 252, l'isoleucine 253, la sérine 254, la valine 305, la leucine 309, l'histidine 310, la glutamine 311 et l'asparagine 312. Dans le domaine C $\gamma$ 3 : l'histidine 433, l'asparagine 434, l'histidine 435 et la tyrosine 436. Parmi ces résidus d'acides aminés, tous sont retrouvés pour toutes les sous-classes d'IgG humaines (voir la figure 6) sauf l'histidine 435 qui est remplacée par une arginine dans le cas de l'IgG3 (La tyrosine en position 436 est présente chez les IgG3 ayant l'allotype G3m (g) alors que ce résidu est remplacé par la phénylalanine pour les IgG3 ayant l'allotype G3m(b)). Ainsi, la comparaison des données cristallographiques avec les séquences des sous-classes d'IgG humaines suggérait que l'histidine en position 435 pouvait jouer un rôle très important dans la liaison des IgG1,2 et 4 à la protéine A et expliquer l'absence d'affinité de l'IgG3.



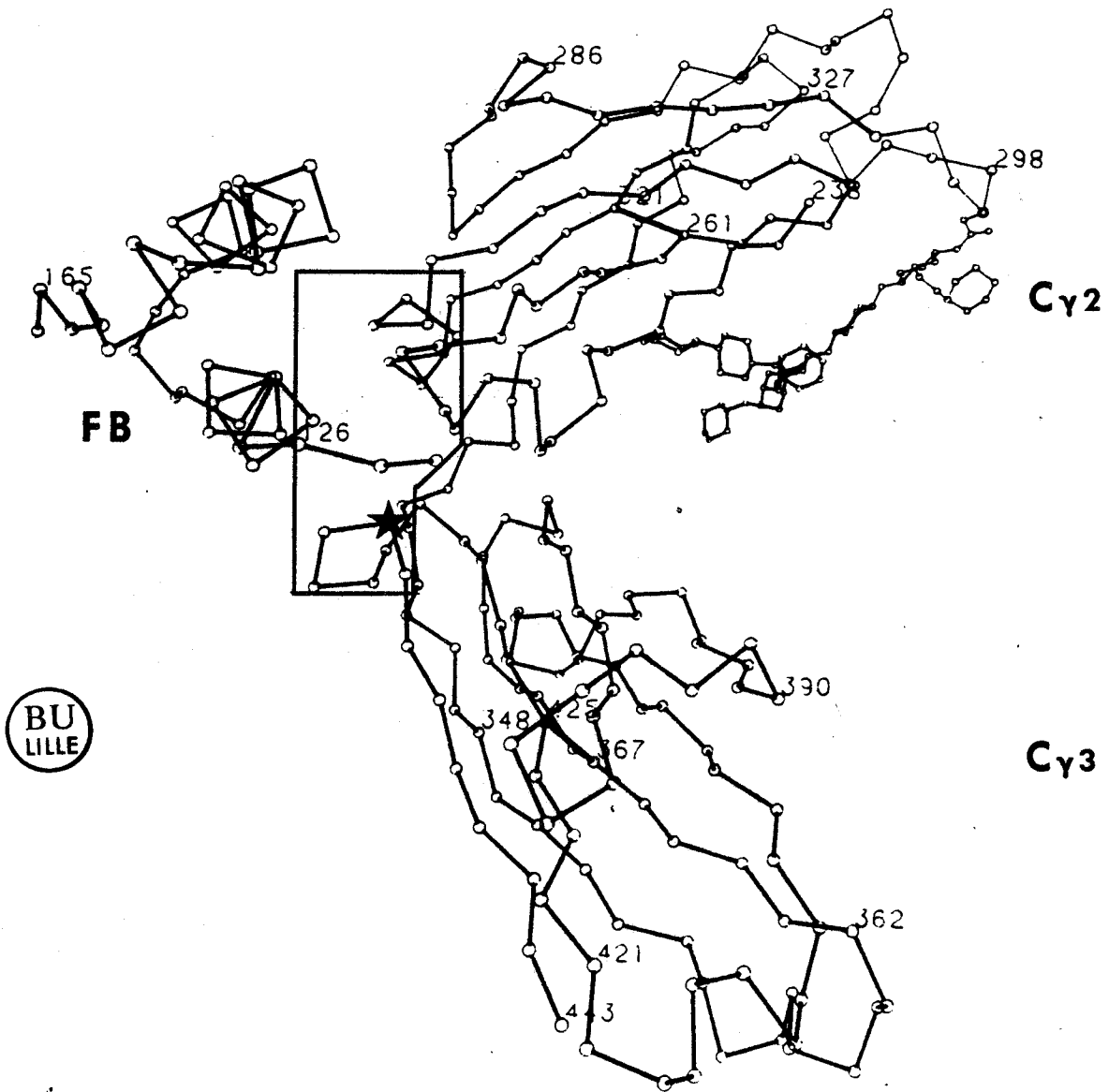


Figure 17.- Structure tridimensionnelle du complexe entre Fc d'IgG1 humaine et fragment B de la protéine A de *S. aureus* (d'après Deisenhofer, 1981). Le fragment B de la protéine A (FB) est en traits plus foncés que le Fc de l'IgG1. La zone d'interaction entre le fragment B et les résidus d'acides aminés des domaines C $\gamma_2$  et C $\gamma_3$  est encadrée. Le résidu d'histidine en position 435 de la chaîne  $\gamma$  des IgG1, IgG2 et IgG4 (sous-classes se liant à la protéine A) est indiqué par une étoile. Ce résidu est substitué par une arginine dans l'IgG3 (sous-classe qui n'a pas d'affinité pour la protéine A).

#### 4. LIAISON A LA PROTEINE A D'IgG CHIMIQUEMENT MODIFIEES SUR CERTAINS ACIDES AMINES

La modification d'un très grand nombre de résidus de lysine de l'IgG humaine et de l'IgG de Lapin par carbamylation (KRONVALL, QUIE et WILLIAMS, 1970 b, STEWART et al., 1978) ne modifie pas la capacité de liaison à la protéine A. De même, la modification des résidus de tyrosine par nitration (18 sur 19 résidus) n'altère pas la liaison entre IgG humaine ou de Lapin et protéine A (STEWART et al., 1978). A l'inverse, la modification des résidus d'histidine par le diéthylpyrocarbonate altère de façon significative l'interaction entre IgG humaine et protéine A dès que deux résidus d'histidine sont modifiés (HAAKE, FRANKLIN et FRANGIONE, 1982).

#### 5. ANALYSE STRUCTURALE D'UNE IgG3 HUMAINE AYANT LA PROPRIETE DE SE LIER A LA PROTEINE A

RECHT et al. (1981) ont étudié la séquence d'une IgG3 monoclonale humaine (GOE), inhabituelle puisqu'elle possède une affinité pour la protéine A. Cette étude a montré que certaines parties de la séquence de cette IgG3, en particulier la zone située entre les domaines C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3, et la séquence C-terminale, sont de type IgG1. Parmi les résidus d'acides aminés inhabituels dans la séquence de cette IgG3, on retrouve l'histidine en position 435. Les résultats confirment donc les résultats précédents et indiquent que, parmi les résidus d'acides aminés en contact avec la protéine A, l'histidine 435 des IgG humaines joue un rôle capital dans la liaison à la protéine A.

#### D - CONCLUSIONS

Les études réalisées chez l'Homme et dans différents modèles expérimentaux ont montré que la protéine A de S. aureus peut être utilisée pour séparer de façon plus ou moins complète les sous-classes d'IgG d'un sérum, ou d'une population d'anticorps de fonction définie.

L'ensemble des approches méthodologiques citées dans le paragraphe C a permis d'identifier les séquences peptidiques de l'IgG humaine impliquées dans la liaison à la protéine A. En particulier l'affinité des IgG1, 2 et 4 et l'absence d'affinité de l'IgG3 sont expliquées par la substitution du résidu d'histidine en position 435 par une arginine. La figure 18 résume les différents acides aminés impliqués dans la liaison de l'IgG humaine à la protéine A. Les résidus d'acides aminés en position homologue des IgG de Souris et de Cobaye sont également indiqués. Cette comparaison ne permet pas d'expliquer très clairement les bases structurales des différences d'affinité qui existent entre sous-classes d'IgG de Souris ou de Cobaye. On peut seulement remarquer que la séquence Met-Ile-Ser (252-254) des IgG2a et IgG2b murines (IgG à forte affinité pour la protéine A) est remplacée par la séquence Thr-Ile-Ser dans l'IgG1 qui a une affinité plus faible. Mais, on remarque par exemple que l'IgG2b murine, qui a une très forte affinité pour la protéine A, ne possède pas d'histidine en position homologue du résidu d'histidine 435 des IgG humaines, mais un résidu de tyrosine. Il est de ce fait difficile par cette comparaison de définir si c'est la présence de tel ou tel acide aminé en position homologue de celui des IgG humaines qui explique les différences d'affinité des sous-classes d'IgG de Souris ou de Cobaye. On peut même suggérer pour ces IgG de différentes espèces animales que des résidus d'acides aminés en position non homologue de ceux des IgG humaines sont impliqués dans la liaison à la protéine A.

En conclusion, si dans le cas des IgG humaines, les bases structurales de la liaison à la protéine A sont définies clairement, il n'en est pas de même pour les IgG d'autres espèces animales. En particulier, les points suivants ne sont pas expliqués :

- les acides aminés impliqués dans la liaison à la protéine A des sous-classes d'IgG de différentes espèces animales
- les éléments de structure qui expliquent les différences d'affinité de sous-classes par exemple lorsque l'élution des IgG est obtenue par un gradient de pH descendant sur une colonne de protéine A-Sépharose
- le rôle exact joué par la partie Fab dans ces différences d'affinité.

## CY2

IgG humaines

Y <sub>1,2,4</sub>	252	253	254	305	309	310	311	312
	Met	Ile	Ser	Val	Leu (Val)	His	Gln	Asn (Asp)
Y <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—

## CY3

	433	434	435	436
	His	Asn	His	Tyr
	—	—	Arg	— (Phe)

IgG murines

Y <sub>1</sub>	Leu	Ile	Thr	Ala	Met	His	Gln	Asp
Y <sub>2a</sub>	Met	—	Ser	—	Gln	—	—	Asn
Y <sub>2b</sub>	Met	—	Ser	—	Gln	—	—	—
	His	Asn	His	His	His	His	His	His
	—	—	—	—	—	—	—	Val
	Lys	—	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr

IgG de Cobaye

Y <sub>1</sub>	Met	Ile	Ser	Ala	Glx	His	Asx	X
Y <sub>2</sub>	—	—	—	Val	Gln	—	Gln	Asp
	Pro	Asn	His	His	His	His	Val	Val
	His	—	—	—	—	—	—	—



Figure 18.- Résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison du Fc des IgG humaines au fragment B de la protéine A (d'après Deisenhofer, 1981), et résidus en position homologue dans les IgG murines et les IgG de Cobaye.

X : position où il n'existe pas de résidu homologue.

**DEUXIEME PARTIE**

---

**TRAVAUX PERSONNELS**

REMARQUE PRELIMINAIRE

Nos travaux personnels correspondent à la fois à des travaux ayant fait l'objet de publications et à des résultats non publiés, qui représentent le plus souvent un complément d'information aux travaux publiés. Les résultats non publiés seront bien entendu présentés "in extenso". En ce qui concerne les résultats publiés, le lecteur sera invité à se reporter aux publications, en particulier pour les détails expérimentaux et pour les figures. Cependant, afin de faciliter la lecture du texte, nous y avons également inclus les figures les plus significatives de chaque publication.

**CHAPITRE I**

---

**CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE DES SOUS-CLASSES  
D'IgG DU RAT**

Publication n° 1

- RAT IMMUNOGLOBULINS

J. ROUSSEAUX et H. BAZIN (1979)

VET. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL., 1, 61-78.

Publication n° 2

- DIFFERENCES IN SENSITIVITY TO REDUCTION OF RAT IMMUNOGLOBULIN IgG SUBCLASSES

J. ROUSSEAUX, H. BAZIN et G. BISERTE (1979)

FEBS LETT., 98, 359-362.

Publication n° 3

- THE DIFFERENTIAL ENZYME SENSITIVITY OF RAT IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES TO PAPAIN AND PEPSIN

J. ROUSSEAUX, G. BISERTE et H. BAZIN (1980)

MOL. IMMUNOL., 17, 469-482.

Publication n° 4

- PROTEOLYSIS OF RAT IgG SUBCLASSES BY S. AUREUS V8 PROTEASE

J. ROUSSEAUX, R. ROUSSEAUX-PREVOST, H. BAZIN et G. BISERTE (1983)

BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 748, 205-212.

Publication n° 5

- OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PREPARATION OF F(ab) and F(ab')<sub>2</sub> FRAGMENTS FROM MONOCLONAL IgG BELONGING TO THE DIFFERENT RAT IgG SUBCLASSES

J. ROUSSEAUX, R. ROUSSEAUX-PREVOST et H. BAZIN (1983)

J. IMMUNOL. METHODS, 64, 141-146.



**PUBLICATION n° 1**

## RAT IMMUNOGLOBULINS

J. ROUSSEAUX<sup>1</sup> and H. BAZIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherche sur le Cancer, INSERM U124, Place de Verdun, B.P. 3567, 59020 Lille Cedex (France)

<sup>2</sup>Experimental Immunology Unit, Faculty of Medicine, University of Louvain, Clos Chapelle-aux-Champs, 30, Brussels 1200 (Belgium)

(Accepted 5 September 1979)

### ABSTRACT

Rousseaux, J. and Bazin, H., 1979. Rat immunoglobulins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1: 61-78.

Five immunoglobulin isotypes (or classes) have been identified in the human as well as in the rat species. The homologies between the human and the rat immunoglobulin classes have been well defined with the help of the monoclonal immunoglobulins produced by the LOU immunocytomas (plasmocytomas, myeloma tumours). The LOU rat immunocytomas model, the physicochemical and the biological properties of the rat immunoglobulins are described in this review.

### INTRODUCTION

Five immunoglobulin classes or isotypes have been identified in the human species. As far as we know, the general physicochemical and biological properties of these immunoglobulin classes are very well maintained throughout the mammalian species and probably in birds too. Major difficulties in characterizing the equivalent of the five human immunoglobulin isotypes (IgM, IgD, IgA, IgE and IgG) have not been met in species such as the mouse or the rat where many monoclonal immunoglobulins could be studied. When neither aminoacid sequences nor immunological cross-reactivity were known, other biochemical or biological major properties were accepted as valuable criteria. Among them are: the specific

62

association of IgA with the intestinal tract, the binding of IgE on mast cells, and the presence of IgM and IgD on lymphocyte membranes. However, homology at the level of the subclasses of different species is still unknown. So far, no subclass property has been found that is applicable to all species. As a consequence, it is necessary to separately analyse the different subclasses of immunoglobulins in all species and consider each of them as a special case.

This review deals with the physicochemical and biological properties of the rat immunoglobulin classes and subclasses. As most of the work has been carried out with myeloma proteins, the homogeneity of which has allowed their purification, we shall give special attention to the LOU rat myeloma model.

#### LOU RAT IMMUNOCYTOMAS

Monoclonal immunoglobulins synthesized by B lymphoid tumours are presently accepted as representative immunoglobulins. They have largely contributed to the recent progress in the discovery of the physicochemical, biochemical and biological properties of immunoglobulins. No difference has ever been observed between these proteins and their naturally induced counterparts. Moreover, some myeloma proteins have been found to bind antigen.

IgA, IgD and IgE (the three immunoglobulin classes last to be discovered) were identified with the help of monoclonal immunoglobulins in the human species where, by far, the most numerous cases of immunoglobulin secreting tumours have been studied. Likewise human subclasses of the IgG as well as the IgA isotypes have been recognized with the help of the corresponding monoclonal proteins.

However, for obvious ethical reasons, the human myeloma proteins are difficult to obtain in large quantities. Many investigations have been done with monoclonal immunoglobulins of the mouse BALB/c model, but neither IgD nor IgE myeloma tumours have been found in the mouse species.

We shall describe the LOU immunocytomas model and the possibilities which it offers for immunological studies.

### Tumour incidence

Ancestors of the LOU rats have been found in various colonies of rats at the University of Louvain. They were all derived from the outbred stock of the late Professor Joseph Maisin and, probably, are of the Wistar origin. From different lines bred in parallel, the LOU/C and LOU/M sublines were selected for their high and low immunocytomas incidence respectively. Both sublines are histocompatible, the LOU/C line being considered as the reference. The LOU ileocaecal tumours first appear in 8 to 9 month-old rats. The incidence is highest between 12 and 15 months. The time of appearance averages 14 to 15 months. In male rats, the tumour incidence is twice that of the female: 34 and 17 % respectively. By comparison, the incidence of ileocaecal immunocytoma in LOU/M rats is 1 to 2 % (Bazin et al., 1972; Bazin et al., 1973; Bazin et al., 1978a; Beckers and Bazin, 1978).

In the great majority of primitive tumour bearing animals, immunocytomas appear to originate in the ileocaecal lymph nodes, since surgical removal of these lymph nodes decreases the immunocytomas incidence significantly (Moriame et al., 1977). The tumours make their appearance in the form of solid masses which are mobile under the fingers and easy to detect by palpation of the abdomen. They grow fast: the tumour-carriers generally die within one month after the tumour has become palpable. The primitive tumour, at autopsy, presents nodule(s) in the ileocaecal region. The abdominal viscera are often infiltrated with metastases. Ascitic fluid is sometimes present and can be helpful in detecting the primitive tumour. The histological appearance of these tumours in LOU ancestors was described by Maisin et al. (1955). An ultrastructural study of them has been published by Burtonboy et al. (1978).

In a study of the monoclonal immunoglobulins synthesized by 250 LOU/C ileocaecal immunocytomas which appeared consecutively in their breeding colony, Bazin and Beckers (1976) found 86 per cent of secreting tumours, 14 per cent of which were Bence Jones protein producers. Tables I and II give the distribution of immunoglobulin-synthesizing tumours in the LOU strain. For comparison, the monoclonal immunoglobulins produced by the human spontaneous myelomas and the BALB/c induced plasmocytomas are given. The highest incidence in the LOU model was found in the IgE,

64

IgG1 classes. No clear explanation can be given for the difference observed between the three models. All the Bence Jones proteins secreted by the LOU rat immunocytomas and studied so far proved to be of the Kappa type (Querijnjean et al., 1972; Wang et al., 1975,1976). However, light chains of LOU IgG1 monoclonal proteins have been identified as Lambda type (Querijnjean et al., 1973).

TABLE I

Class distribution of the monoclonal immunoglobulins synthesized in the human, rat and mouse species (in percentage)

Species	IgM	IgD	IgA	IgE	IgG
Human* (spontaneous tumours)	6.9	0.9	18.8	very low	73.3
Rat (spontaneous LOU/C tumours)	2.9	2.9	0.9	43.5	49.6
Mouse** (induced BALB/c tumours)	0.5	0	73.7	0	25.8

\* Oberdorfer et al, 1973

\*\* Potter, 1972

TABLE II

Percentage of IgG subclasses monoclonal immunoglobulins in the human, rat and mouse species

Human (multiple myeloma)*	subclasses	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	percentage	73	12	8	7
Rat (LOU/C model)	subclasses	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
	percentage	77.6	12.2	1.6	9.6
Mouse (BALB/c model)**	subclasses	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
	percentage	39.5	26.7	32.5	1.1

\* Oberdorfer et al., 1973

\*\* Potter, 1972

### Production of LOU monoclonal immunoglobulins

Almost all the primitive and spontaneous LOU immunocytomas can be transplanted in LOU/C, LOU/M or their F1 hybrids. The tumours must be removed under sterile conditions and teased in a Petri dish. The tumour tissue is minced until it can be aspirated through a 19-gauge needle into a syringe. About 0.2 ml is injected subcutaneously into one side of the breast or in the peritoneal cavity. In the latter case, an ascitic tumour line can be obtained after few passages and easily transplanted by inoculating recipient rats intraperitoneally with 0.2 to 0.5 ml ascitic fluid. The latent periods of transplanted LOU immunocytomas are generally shortened after few passages to 5 to 10 days.

The immunoglobulin secreting properties of LOU immunocytomas are quite variable. Most of the tumours keep their secreting properties for years. But in some cases, the ability to produce monoclonal proteins decreases more or less rapidly. The IgE and IgD tumours seem to be more prone to lose their secreting properties. However, good producers have been obtained in both cases. LOU immunocytomas can be stored in liquid nitrogen as described by Bazin et al. (1972).

LOU immunocytomas can also be propagated in in vitro continuous lines (Burtonboy et al., 1973; Bennich et al., 1978). More than 12 different immunocytomas have already been adapted to in vitro cultures (Bazin et al., unpublished).

### Purification of rat monoclonal proteins

Monoclonal proteins are isolated from sera or ascites collected from LOU rats or F<sub>1</sub> hybrids bearing immunocytomas.

#### IgM

IgM monoclonal immunoglobulins are purified by the use of their euglobulin properties and of their high molecular weight (about 1 million daltons). The following procedure is used in our laboratory (Bazin et al., 1974): precipitation in ammonium sulfate at 40% final concentration is followed by euglobulin precipitation in a buffer of low ionic strength (Tris-HCl 0.005M, pH 8.0). The euglobulin fraction is then filtered through a Sephadex G-200 column (Pharmacia, Uppsala). The first peak represents pure IgM.

66

Occasionally IgM monoclonal proteins are pseudoglobulins and cannot be purified by euglobulin precipitation.

#### IgA

Purification of monoclonal IgA is carried out as follows (Bazin et al., 1974): after precipitation in 40% saturated ammonium sulfate, the proteins are applied on a DEAE-cellulose (DE 32 Whatman) column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer pH 8.0 and eluted with a 0.1M Tris-HCl, 0.08M NaCl buffer, pH 8.0. Final purification is achieved by chromatography through a Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala) column equilibrated in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0.

#### IgD

Monoclonal IgD proteins may be purified using their molecular weight, which, in non-dissociating media, is higher than that of IgG. The first step is gel filtration through Aca 22 or Aca 34 Ultrogel (LKB, Sweden) at +4°C with 0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl buffer containing  $\epsilon$ -amino-caproic acid (final concentration 0.01M)

Further purification is achieved by repeated runs through Ultrogel Aca 34 and finally by preparative agarose gel electrophoresis (Bazin et al., 1978b).

#### IgE

A number of different procedures to isolate rat monoclonal IgE have been reported. They use all or part of the following physicochemical properties of rat IgE : (1) solubility in 40% saturated ammonium sulfate ; (2) electrophoretic mobility which is of the  $\gamma_1$  type ; (3) molecular weight (about 190,000).

Kulczycki and Metzger (1974) have purified rat IgE by the following method: monoclonal IgE is precipitated by ammonium sulfate at 50% saturation; the precipitate is then fractionated in a Sepharose 6B column and further by DEAE-cellulose chromatography. Final purification is achieved by immunoabsorption of protein contaminants. Conrad et al. (1975) used precipitation by 50% saturated ammonium sulfate followed by Biogel P-300 chromatography and preparative iso-electrofocusing in sucrose gradient.

In our laboratory, the following procedure is used (Bazin and Beckers, 1976): proteins precipitated by 50% saturated ammonium

sulfate are applied on a column of DEAE-cellulose (DE 32 Whatman) equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.0 and eluted with a linear gradient of increasing molarity (final buffer : 0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0). The monoclonal protein is then purified by chromatography through an Aca 34 Ultrogel column equilibrated in 0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 8.0. The first peak eluted from the column represents pure IgE.

A procedure using only immunoabsorption on a column of purified goat anti- $\epsilon$  antibodies has also been reported (Fritsche and Spiegelberg, 1978).

#### IgG2a

Monoclonal IgG2a proteins may have electrophoretic mobilities ranging from  $\gamma_1$  to  $\gamma_2$ . IgG2a of  $\gamma_2$  electrophoretic mobility is usually isolated in the following manner: the precipitate obtained by 40% saturated ammonium sulfate is equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer pH 8.0, passed through a DEAE-cellulose column equilibrated with the same buffer, and subsequently eluted with 0.05M Tris-HCl, 0.05M NaCl, pH 8.0. The first peak represents pure IgG2a but may be contaminated with IgG2b.

IgG2a of  $\gamma_1$  electrophoretic mobility is isolated by a procedure similar to the one used for IgG1 monoclonal proteins.

#### IgG2b

Different monoclonal IgG2b immunoglobulins may have electrophoretic mobilities of type  $\gamma_2$  or  $\gamma_1$ . Their isolation procedures are similar to those used for IgG2a immunoglobulins.

#### IgG1

After precipitation by 40% saturated ammonium sulfate, the immunoglobulin fraction is chromatographed through DEAE-cellulose column (DE 32 Whatman) equilibrated in 0.05M Tris-HCl buffer pH 8.0. Elution is obtained by a linear gradient of increasing concentrations of Tris and NaCl (final buffer : 0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0). The IgG1-containing fraction is passed through an Ultrogel ACA 34 column. The first peak eluted from the column usually represents pure IgG1, but may, occasionally, be contaminated with some IgG2a or IgG2b.



68

### IgG2c

Monoclonal proteins of this class have been purified by the use of their euglobulin properties. Precipitation is carried out as follows (Bazin et al., 1974): one volume of serum or ascite is added to 19 volumes of distilled water adjusted to pH 6.0. The precipitated proteins are dissolved in 2% (w/v) NaCl, pH 7.0 and precipitated again. This procedure is repeated two more times. The proteins are then applied to a Sephadex G-200 column (Medgyesi et al., 1978).

However, this procedure is not always easy to perform, and monoclonal purified IgG2c is often contaminated with normal immunoglobulins, in particular IgG2a. The following procedure seems preferable: proteins precipitated in 40% saturated ammonium sulfate are applied to a column of CM-cellulose (CM 32 Whatman) equilibrated with 0.2M Na-acetate, 0.1M NaCl buffer, pH 4.2. Subsequent elution with 0.2M Na-acetate, 0.2M NaCl buffer, pH 4.2 leads to the recovery of pure IgG2c with sometimes some IgG2a. Final purification can be achieved by chromatography on Protein-A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala) equilibrated with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. IgG2a contaminants are eliminated during the washing of the column with PBS. IgG2c is eluted by PBS, 1M NaSCN, pH 7.4.

## PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF RAT IMMUNOGLOBULINS

### Electrophoretic mobility. Isoelectric point

In zone electrophoresis in agarose or cellulose-acetate, monoclonal immunoglobulins of the IgE class and IgG1 subclass have a fast anodic mobility ( $\gamma_1$  type). An isoelectric point of 5.9 has been reported for rat monoclonal IgE IR162 (Conrad et al., 1975). Proteins of the IgG2c subclass are characterized by the slowest electrophoretic migration. IgG2a and IgG2b monoclonal proteins may have different electrophoretic mobilities:  $\gamma_2$  or  $\gamma_1$ . Such differences of charge among proteins of the same subclass are related to the Fab part of the molecule, probably to differences in sequence of variable regions of light and heavy chains.

### Solubility

Peculiar solubility properties have been found for different

classes or subclasses of rat Ig: rat IgM and IgG2c generally behave as euglobulins, being poorly soluble in solutions of low ionic strength; rat IgE differs from IgG and IgM by its solubility in 40% saturated ammonium sulfate (Iversky et al., 1974).

#### Molecular weight

The sedimentation coefficients and molecular weights of the rat immunoglobulins and the molecular weights of their heavy chains are given in Table III. These parameters are very similar to those of the human counterparts of the various (sub)classes. IgD is characterized by an anomalously high molecular weight in non-dissociating media, greater than 570,000 daltons (Bazin et al., 1978b). This seems to correspond to the occurrence of non-covalent aggregates. Some faint differences are observed between the molecular weight of rat IgG heavy chains in relation to the subclass to which they belong. In SDS-polyacrylamide gel (5%) IgG2b and IgG1 heavy chains have the highest M.W. : 55,000, and IgG2a and IgG2c the lowest : 50,000 to 52,000 (Rousseaux et al., unpublished).

#### Sensitivity to reduction

Differences in sensitivity to reduction have been found between rat IgG subclasses. IgG2a is the most sensitive to reduction and the intermediate product is exclusively an half-molecule (HL). For the other IgG subclasses, other intermediates of reduction are present: H<sub>2</sub>L and H<sub>2</sub>, the main product being HL for IgG1, and H<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>L for IgG2c monoclonal proteins (Rousseaux et al., 1979).

#### Proteolysis of rat immunoglobulins

Rat IgE is very sensitive to papain digestion and Fc fragments can only be obtained after short incubation periods, i.e. 10 minutes at 37°C (Fritsche and Spiegelberg, 1978). Rat IgD is, like its human counterpart, very sensitive to proteolysis, in particular by serum enzymes such as plasmin. Therefore, preparation of the IgD proteins must be performed in the presence of the plasmin inhibitor ε-amino-caproic acid.

Differences in sensitivity to proteolytic cleavage have been observed among rat IgG subclasses: IgG1 is the most resistant to



TABLE III

Molecular weights of rat monoclonal immunoglobulins and of their heavy chains

	IgM	IgA	IgD	IgE	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
Sedimentation coefficient	17-19 S	7 S	N.D.***	7.6 S	6.7 S	6.4 S	6.5 S	6.7 S
Molecular weight*	900.000	163.000	140.000	183.000 to 198.000	156.000	156.000	156.000	156.000
Molecular weight** of heavy chain	72.000	N.D.	60.000	72.000 to 75.000	55.000	50.000 to 52.000	55.000	50.000 to 52.000

\* Determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (5, 7 or 12% acrylamide)

\*\* Determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in reducing conditions (5 to 15% acrylamide)

\*\*\* Not determined

papain (without cystein) and pepsin cleavages, whereas IgG2a is the most sensitive to papain and IgG2c the most sensitive to pepsin. Differences in the size and composition of the released fragments have also been noticed (Rousseaux et al., in preparation).

#### Sequence analyses

Some sequence analyses have been reported on rat monoclonal immunoglobulins. Amino terminal sequences of their heavy chains (Querinjean et al., 1975) show that about 54% of the variable domains belong to the VHIII subgroup, compared to 35% for the pooled heavy chains of normal rat immunoglobulins. Partial amino-acid sequences of the Kappa light chains have been published by Querinjean et al. (1972) and Wang et al. (1975, 1976). The complete amino-acid sequence of a monoclonal Kappa light chain has been reported by Starace and Querinjean (1975). A Kappa extra piece has also been sequenced by Schechter (personal communication).

#### BIOLOGICAL PROPERTIES OF RAT IMMUNOGLOBULINS

The main biological properties of the rat immunoglobulins presently known are given in Tables IV and V. Moreover, rat IgE can fix to homologous mast cells (Bazin et al., 1974; Conrad et al., 1975; Bazin and Beckers, 1976), on lymphocyte (Fritsche and Spiegelberg, 1978) and on macrophages (Capron et al., 1977). The binding of protein A to rat immunoglobulin classes has been given by Medgyesi et al. (1978): protein A can bind IgG1 and IgG2c subclasses of rat immunoglobulin classes.

#### ALLOTYPES OF RAT IMMUNOGLOBULINS

Three allotypes have been described in rats at the Kappa light chains (Barabas and Kelus, 1967; Wistar, 1969; Rokhlin et al., 1971; Beckers et al., 1974) and at the alpha and gamma 2b heavy chains (Bazin et al., 1974; Beckers and Bazin, 1975). Gutman et al. (1975) have found one sequence gap and many aminoacid substitutions between the two allotypes of the Kappa chain. The determinations of the allotypes of many inbred strains of rats are given in Bazin et al. (1979).



TABLE IV

Biological properties of rat immunoglobulin classes

Properties	References	IgM	IgA	IgD	IgE	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
concentration range in normal serum* (in mg/ml)	Bazin & Pauwels, (unpublished)	0.97	0.15	0.008	0.000001	11.1	11.0	1.3	2.2
valency for antigen binding	Oriol et al., 1971 Bazin et al., 1974	5 5	2	-	2	2	2	2	2
Half lives (in days)	Van Breda Vriesman & Feldman, 1972 Cremer et al., 1973 Bazin et al., 1974 Tada et al., 1975	2.6	-	-	0.5	-	5.0	-	-
Antibody activities	Arnason et al., 1964 Nussengweig & Binaghi, 1965 Binaghi & Sarando de Merlo, 1966 Pauwels et al., 1979	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
complement fixation									
total complement	Medgyesi et al., 1975	yes	yes	-	yes	yes	yes	-	no
C1	Medgyesi et al., 1978	yes	no	-	no	yes	yes	-	no

\* values obtained from outbred rats kept under conventional breeding conditions

TABLE V

Biological properties of rat immunoglobulin classes

Properties	References	IgM	IgA	IgD	IgE	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
cross placenta	Binaghi et al., 1966 McGhee et al., 1975 Michalek et al., 1975	no	no	-	no	yes	yes	-	-
presence in colostrum and milk	Binaghi et al., 1966 McGhee et al., 1975 Michalek et al., 1975 Bazin et al., 1978c	no	yes	-	yes	yes	yes	-	-
absorption by the intestinal tract (in suckling rats)	Binaghi et al., 1966 McGhee et al., 1975 Michalek et al., 1975 Bazin et al., 1978c	-	no	-	yes	yes(?)	yes	no(?)	-



ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Hans van der Donck, Fakulteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit te Utrecht, for reviewing the manuscript.

This work was supported by grants from the "Fonds Cancérologique de la CGER", Belgium, the National Institutes of Health, contract RO1-AI-12840, the FRSM, Belgium, the INSERM, France, and EURATOM, contract n°250.77.1.BIO.B.

H.B. is staff member of the European Communities, Biology Division.

REFERENCES

- Arnason, B.G., de Vaux ST-Cyr, C. and Relyveld, E.H., 1964. Role of the thymus in immune reactions in rats. IV. Immunoglobulins and antibody formation. *Int. Arch. Allergy*, 25:206-224.
- Barabas, A.Z. and Kelus, A.S., 1967. Allotypic specificity of serum proteins in inbred strains of rats. *Nature (London)*, 215:155-156.
- Bazin, H. and Beckers, A., 1976. IgE myelomas in rats. Nobel Symposium n° 33. "Molecular and Biological Aspects of the Acute Allergic Reaction". S.G.O. Johansson, K. Stranberg and B. Uvnas (Editors). Plenum Cy., New York, pp. 125-151.
- Bazin, H., Deckers, C., Beckers, A. and Heremans, J.F., 1972. Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rat. I. General features in LOU/Wsl strain rat immunocytomas and their monoclonal proteins. *Int. J. Cancer*, 10:568-580.
- Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C. and Moriamé, M., 1973. Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rat. V. Monoclonal immunoglobulins secreted by 250 ileocecal immunocytomas of the LOU/Wsl rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51:1359-1361.
- Bazin, H., Beckers, A. and Querinjean, P., 1974. Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins, IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.*, 4:44-48.
- Bazin, H., Beckers, A., Vaerman, J.P. and Heremans, J.F., 1974. Allotypes of rat immunoglobulins. I. An allotype at the alpha-chain locus. *J. Immunol.*, 112:1035-1041.
- Bazin, H., Beckers, A., Platteau, B. and Kints, J.P., 1978a. Les rats LOUVAIN et leur apport en cancérologie. *Acta Zool. Pathol. Antverp.*, 72:35-44.

- Bazin, H., Beckers, A., Urbain-Vansanten G., Pauwels, R., Bruyins, C., Tilkin, A.F., Platteau, B. and Urbain, J., 1978b. Transplantable IgD immunoglobulin-secreting tumors in rat. *J. Immunol.*, 121:2077-2082.
- Bazin, H., Platteau, B., Beckers, A. and Pauwels, R., 1978c. Differential effect of neonatal injections of anti-mu or anti-delta antibodies on the synthesis of IgM, IgD, IgE, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, 121:2083-2087.
- Bazin, H., Nezlin, R. and Brdicka, R., 1979. Immunoglobulin polymorphism : rat. In: P.L. Altman and D.D. Katz (Editors), *Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Part 1. Mouse and Rat.* FASEB, Bethesda, USA. pp.306-308.
- Beckers, A. and Bazin, H., 1975. Allotypes of rat immunoglobulins. III. An allotype of the gamma 2b chain locus. *Immunochemistry*, 12:671-675.
- Beckers, A. and Bazin, H., 1978. Incidence of spontaneous ileocecal immunocytomas in hybrids of LOU/C rats and rat strains with spontaneous tumor incidence. *J. Natl. Cancer Inst.*, 60:1505-1508.
- Beckers, A., Querinjean, P. and Bazin, H., 1974. Allotypes of rat immunoglobulins. II. Distribution of the allotypes of kappa and alpha chain loci in different inbred strains of rat. *Immunochemistry*, 11:605-609.
- Bennich, H., Karlsson, T., Bazin, H. and Zeuthen, J., 1978. *In vitro* culture of IgE secreting cells from two rat myelomas. *Prot. Biol. Fluids*, 25:559-562.
- Binaghi, R.A. and Sarando de Merlo, E., 1966. Characterization of rat IgA and its non-identity with the anaphylactic antibody. *Int. Arch. Allergy*, 30:589-596.
- Binaghi, R.A., Oettgen, H.F. and Benacerraf, B., 1966. Anaphylactic antibody in the young rat. *Int. Arch. Allergy*, 29:105-111.
- Burtonboy, G., Bazin, H., Deckers, C., Lamy, M. and Heremans, J.F., 1973. Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. III. Establishment of immunoglobulin-secreting cell lines from LOU/Wsl strain rats. *Eur. J. Cancer*, 9:259-262.
- Burtonboy, G., Beckers, A., Rodhain, J., Bazin, H. and Lamy, M.E., 1978. Rat ileocecal immunocytoma. An ultrastructural study with special attention to the presence of viral particles. *J. Natl.*



76

- Cancer Inst., 61:477-484.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Joseph, M., Rousseaux, R., Capron, M. and Bazin, H., 1977. Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat : a new mechanism of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.*, 7:315-322.
- Conrad, D.H., Bazin, H., Sehon, A.H. and Froese, A., 1975. Binding parameters of the interaction between rat IgE and rat mast cell receptors. *J. Immunol.*, 114:1688-1691.
- Cremer, N.E., Taylor, D.O.N., Lennette, E.H. and Hagens, 1973. IgM production in rats infected with moloney leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51:905-915.
- Fritsche, R. and Spiegelberg, H.L., 1978. Fc receptors for IgE on normal rat lymphocytes. *J. Immunol.*, 121:471-478.
- Gutman, G.A., Lah, E. and Hood, L., 1975. Structure and regulation of immunoglobulins : kappa allotypes in the rat have multiple amino-acid differences in the constant region. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 72:5046-5050.
- Iserky, C., Kulczycki Jr., A. and Metzger, H., 1974. Isolation of IgE from reaginic rat serum. *J. Immunol.*, 112:1901-1909.
- Kulczycki Jr., A. and Metzger, H., 1974. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. *J. Exp. Med.*, 140:1676-1695.
- Maisin, J., Maisin, H., Dunjic, A. and Maldague, P., 1955. La radiobiologie comme méthode de travail en physiopathologie et en cancérologie expérimentale. *Bull. Acad. Suisse Sci. Med.* 11:247-273.
- McGhee, J.R., Michalek, S.M. and Ghanta, V.K., 1975. Rat immunoglobulins in serum and secretions : purification of rat IgM, IgA and IgG and their quantitation in serum, colostrum, milk and saliva. *Immunochemistry*, 12:817-823.
- Medgyesi, F.A., Fust, G., Bazin, H., Ujhelyt, E. and Gergely, J., 1975. Interaction of rat immunoglobulins with complement. 9th Meeting of FEBS. G. Gergely and G.A. Medgyesi (Editors). *Publ. House of the Hungarian Academy of Sciences*, 36:123-130.
- Medgyesi, G.A., Fust, G., Gergely, J. and Bazin, H., 1978. Classes and subclasses of rat immunoglobulins : interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. *Immunochemistry*, 15:125-129.
- Michalek, S.M., Rahman, A.F.R. and McGhee, J.R., 1975. Rat immunoglobulins in serum and secretion : comparison of IgM, IgA and

- IgG in serum, colostrum, milk and saliva of protein malnourished and normal rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148:1114-1118.
- Moriamé, M., Beckers, A. and Bazin, H., 1977. Decrease of the incidence of malignant ileocaecal immunocytoma in LOU/C rats after surgical removal of the ileocaecal lymph nodes. *Cancer Letters*, 3:139-143.
- Nussenzweig, V. and Binaghi, R.A., 1965. Heterogeneity of rat immunoglobulins. *Int. Arch. Allergy*, 27:355-360.
- Oberdorfer von, A., Schnauffer, K., Lange, H.J. and Neiss, A., 1973. Zur Verteilung von Paraproteinämien nach geschlecht und alter der Patienten, Paraprotein-Klassen, -subklassen und -Leichtketten-Typen. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 11:51-64.
- Oriol, R., Binaghi, R. and Coltorti, E., 1971. Valence and Association constant of rat macroglobulin antibody. *J. Immunol.*, 104:932-937.
- Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B. and Van der Straeten, M., 1979. The influence of different adjuvants on the production of IgD and IgE antibodies. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 130 C:49-58.
- Potter, M., 1972. Immunoglobulin-producing tumours and myeloma proteins of mice. *Phys. Rev.*, 52:631-719.
- Querijnjean, P., Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C., Heremans, J.F. and Milstein, C., 1972. Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. Purification and chemical characterization of four kappa chains from LOU/Wsl rats. *Eur. J. Biochem.*, 31:354-359.
- Querijnjean, P., Bazin, H., Starace, V., Beckers, A., Deckers, C. and Heremans, J.F., 1973. Lambda light chains in rat immunoglobulins. *Immunochemistry*, 10:653-654.
- Querijnjean, P., Bazin, H., Kehoe, J.M. and Capra, J.D., 1975. Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rat. IV. N-terminal sequence variability in LOU/C/Wsl rat monoclonal heavy chain. *J. Immunol.*, 114:1375-1378.
- Rokhlin, O.V., Vengerova, T.I. and Nezlin, R.S., 1971. RL allo-types of light chains of rat immunoglobulins. *Immunochemistry*, 8:525-538.
- Rousseaux, J., Bazin, H. and Biserte, G., 1979. Differences in sensitivity to reduction of rat immunoglobulin IgG subclasses. *Febs-Letters*, 98:359-362.

78

- Starace, V. and Querinjean, P., 1975. The primary structure of a rat kappa Bence Jones protein : phylogenetic relationships of V- and C-region genes. *J. Immunol.*, 115:59-62.
- Tada, T., Okumura, K., Platteau, B., Beckers, A. and Bazin, H., 1975. Half-lives of two types of rat homocytotropic antibodies in the circulation and in the skin. *Int. Arch. Allergy*, 48: 116-131.
- Van Breda Vriesman, P.T.C. and Feldman, J.D., 1972. Rat gammaM immunoglobulin : isolation and some biological characteristics. *Immunochemistry*, 9:525-534.
- Wang, A.C., Fudenberg, H.H. and Bazin, H., 1975. The nature of "species-specific" aminoacid residues. *Immunochemistry*, 12: 505-509.
- Wang, A.C., Fudenberg, H.H. and Bazin, H., 1976. Partial amino acid sequences of kappa-chains of rat immunoglobulin : Genetic and evolutionary implications. *Biochem. Genet.*, 14:209-223.
- Wistar Jr., R., 1969. Immunoglobulin allotype in the rat. Localization of the specificity to the light chain. *Immunology*, 17:23-32.

**PUBLICATION n° 2**

## DIFFERENCES IN SENSITIVITY TO REDUCTION OF RAT IMMUNOGLOBULIN IgG SUBCLASSES

Jean ROUSSEAU, Hervé BAZIN<sup>+</sup> and Gérard BISERTE

*Institut de Recherches sur le Cancer, INSERM U 124, Place de Verdun, BP 3567, 59020 Lille Cédex, France and*

*<sup>+</sup>Experimental Immunology Unit, Faculty of Medicine, University of Louvain, Clos Chapelle aux Champs, 30-1200 Brussels, Belgium*

Received 27 November 1978

### 1. Introduction

Immunoglobulin IgG can be separated into distinct subclasses that differ by some biological properties such as activation of complement, cytophilic activity, interaction with staphylococcal protein A [1] and by structural characteristics. In particular, human IgG subclasses have been found differentially affected by reduction [2], IgG4 being reduced through the HL subunit intermediate, although in IgG1, IgG2 and IgG3, the intermediates are H<sub>2</sub>L, H<sub>2</sub> and HL.

In the rat, four isotypes of IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c, have been identified [3]. In an attempt to define structural differences between rat IgG subclasses and to relate them to the IgG of other species, we have investigated the sensitivity to reduction of different types of monoclonal IgG proteins produced by rat LOU immunocytomas. Our results point out clear differences between some of the subclasses, and some relationship with human IgG subclasses.

### 2. Material and methods

#### 2.1. Purification of IgG proteins

Immunocytomas were transplanted in rats LOU/M and in (LOU/Wistar) or (LOU/OKA) F<sub>1</sub> hybrids as in [4]. Monoclonal IgG were isolated from ascites or sera of rats bearing tumors by ammonium sulphate precipitation followed by chromatography on DEAE- or CM-cellulose and filtration on Ultrogel Aca 34 (LKB, Sweden) [3]. Their heavy chain subclasses

were typed by immunodiffusion against specific antisera [3]. Normal IgG2a was isolated from serum of randomly-bred Wistar rats by DEAE-cellulose chromatography [5].

#### 2.2. Reduction experiments

##### 2.2.1. Dithioerythritol (DTE) reduction

Proteins (2 mg/ml) in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.2) were reduced at room temperature with 0.05–20 mM dithioerythritol. After 1 h incubation under nitrogen, alkylation was performed at 0°C with iodoacetamide (50% molar excess over total thiol).

##### 2.2.2. Dithiothreitol (DTT) reduction

Proteins (10 mg/ml) in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.6) were reduced at room temperature with 0.2–20 mM dithiothreitol. After 1 h incubation, the pH was lowered to 8.0 by addition of 0.2 M Tris-HCl (pH 7.2) and alkylation was carried out at 0°C with iodoacetic acid (10% molar excess over total thiol).

#### 2.3. Analysis of the reduction products

Reduction products were studied by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as in [6] with the following modifications: a 5–20% acrylamide gradient was used for the separation and the stacking gel (5% acrylamide) was buffered by 0.1 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (pH 6.8). Samples to be electrophoresed were diluted to 1 mg/ml in 2% (w/w) SDS, 0.075 M iodoacetamide, heated 5 min at 95°C and a further 30 min at 45°C. The following molecular weight markers were run together with the reduction products: rat IgE

(mol. wt 189 000 [7]; rat IgG2a (mol. wt 150 000); phosphorylase *b* (mol. wt 96 800); human serum albumin (mol. wt 66 300); egg albumin (mol. wt 43 000); cytochrome *c* (mol. wt 11 700). The molecular weight of the reduction products was calculated from a calibration curve of the logarithm of molecular weight of the markers against the logarithm of the concentration of acrylamide reached by the marker [8]. Quantitation of the reduction intermediates and of unreduced protein was performed by scanning the gels with an Helena Autoscanner Quick Quant II.

**3. Results**

Two monoclonal proteins of subclasses IgG1 and IgG2a, three proteins of subclass IgG2c and one of subclass IgG2b were studied together with IgG2a isolated from normal rat serum.

Tables 1 and 2 show the relative percentage of

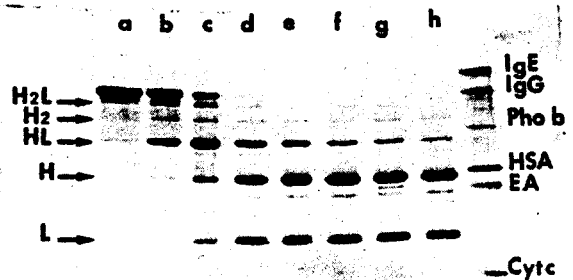


Fig.1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein IR 530 (IgG2a subclass) after reduction by dithioerythritol (DTE) and alkylation: (a) unreduced protein; (b) DTE 0.05 mM; (c) 0.1 mM; (d) 0.5 mM; (e) 1 mM; (f) 5 mM; (g) 10 mM; (h) 20 mM. IgE: rat IgE (mol. wt 189 000); IgG (rat IgG2a, mol. wt 150 000) Pho-b: phosphorylase *b* (mol. wt 96 800) HSA: human serum albumin (mol. wt. 66 300) EA: egg albumin (mol. wt 43 000) cyt *c*: cytochrome *c* (mol. wt 11 700).

Table 1  
Relative proportions of reduction intermediates and of unreduced protein (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) in proteins of different heavy chain subclasses, after dithioerythritol (DTE) reduction

Subclass	Protein	DTE	H <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> L	H <sub>1</sub>	HL
IgG1	IR 595	0.1 mM	31.6	28.2	12.6	27.6
		1.0 mM	5.8	15.2	20.5	58.5
	IR 656	0.1 mM	42.9	21.0	5.6	30.5
		1.0 mM	3.5	20.0	19.2	57.3
IgG2a	IR 530	0.1 mM	16.5	4.1	2.4	77.0
		1.0 mM	0	0	5.4	94.6
	IR 418	0.1 mM	16.1	4.5	2.6	76.8
		1.0 mM	0	0	4.6	95.4
	Normal	0.1 mM	20.5	21.1	2.6	55.8
		1.0 mM	0	0	0	100
IgG2b	IR 863	0.1 mM	10.9	21.2	23.2	44.7
		1.0 mM	2.7	0	56.3	41.0
IgG2c	IR 304	0.1 mM	8.1	34.7	29.3	27.9
		1.0 mM	0	4.2	78.3	17.5
	IR 759	0.1 mM	5.9	12.6	40.9	40.6
		1.0 mM	0	5.4	66.5	28.1
	IR 558	0.1 mM	0	32.3	23.9	43.8
		1.0 mM	0	56.4	18.9	24.7

Table 2  
Relative proportions of reduction intermediates and of unreduced protein in proteins of different heavy chain subclasses, after dithiothreitol (DTT) reduction

Subclass	Protein	DTT	H <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> L	H <sub>2</sub>	HL
IgG1	IR 595	0.2 mM	60.4	26.7	7.8	5.1
		1.0 mM	12.0	24.6	10.0	53.4
	IR 656	0.2 mM	42.7	35.9	6.2	15.2
		1.0 mM	10.6	23.7	11.4	54.3
IgG 2a	IR 530	0.2 mM	23.0	6.2	4.3	66.5
		1.0 mM	0	0	5.1	94.9
	IR 418	0.2 mM	25.6	3.4	6.2	64.8
		1.0 mM	0	0	3.8	96.2
	Normal	0.2 mM	36.0	19.8	1.8	42.4
		1.0 mM	0	4.0	4.0	92.0
IgG2b	IR 863	0.2 mM	31.4	15.1	21.8	31.7
		1.0 mM	7.5	17.3	35.6	39.6
IgG 2c	IR 304	0.2 mM	5.8	20.1	35.3	38.8
		1.0 mM	0	0	58.8	41.2
	IR 759	0.2 mM	23.5	34.0	17.6	24.9
		1.0 mM	1.2	16.2	60.5	22.1
	IR 558	0.2 mM	2.2	30.7	15.8	51.3
		1.0 mM	0	24.1	5.4	70.5



unreduced protein (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) and of reduction intermediates (H<sub>2</sub>L, H<sub>2</sub> and HL) with dithioerythritol (0.1 mM and 1 mM) and dithiothreitol (0.2 mM and 1 mM). The two procedures give almost the same results (except for monoclonal IgG2c IR 558). IgG2a appears clearly different from the other subclasses: in

effect, the two monoclonal IgG2a proteins and normal IgG2a are almost entirely reduced via the HL subunit (fig.1). For the other IgG subclasses H<sub>2</sub>L and H<sub>2</sub> reduction intermediates are also present in significant amounts. However in the IgG1 proteins studied, the HL subunit is the major product (fig.2),

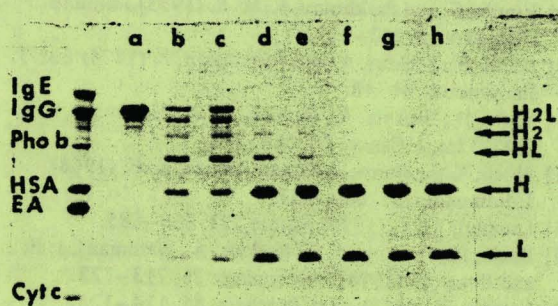


Fig.2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein IR 656 (IgG1 subclass) after reduction by DTE. For legend, see fig.1.

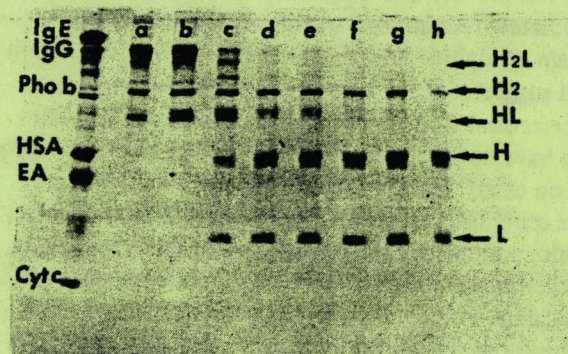


Fig.3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein IR 863 of IgG2b subclass after reduction by DTE. For legend, see fig.1.

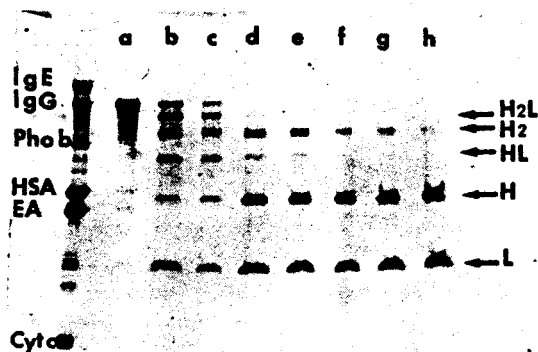


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein IR 304 of IgG2c subclass after reduction by DTE. For legend, see fig. 1.

whereas in the monoclonal IgG2b, and two of the three IgG2c proteins studied, the H<sub>2</sub> intermediate is the predominant product, and remains present even with high concentrations of reducing agent (fig. 3,4). A discrepancy between the results of DTE and DTT reduction is observed for the monoclonal IgG2c IR 558 immunoglobulin, the major intermediate being the H<sub>2</sub>L with DTE and the HL with DTT.

#### 4. Discussion

Reduction experiments have clearly shown differences between the IgG proteins studied and part of these differences can be related to the subclass. In IgG2a (monoclonal or normal) proteins, the almost exclusive product of partial reduction is the HL subunit with only traces of other intermediates. This implies that in IgG2a the inter heavy-chain disulphide bridges are very sensitive to reduction and suggest that the inter heavy-chain non-covalent interactions in the hinge region are somewhat weak. We have noticed that the molecular weight of the heavy chain of rat IgG2a proteins is smaller than the one of the other IgG subclasses, in particular IgG2b and IgG2c. This could be due to a smaller size of the hinge region. Experiments are undertaken to study the structure of the hinge of the different subclasses, and answer this hypothesis. In IgG1 proteins, although H<sub>2</sub>L and H<sub>2</sub> intermediates are present, the major product is the HL subunit, suggesting that the inter heavy-chain bonds are more sensitive to reduction than the inter heavy-light chains bridges. For IgG2b and IgG2c

proteins, the results cannot be considered as characteristic of the subclass. In effect, the IgG2c proteins behave differently, and only one IgG2b monoclonal immunoglobulin is available. This protein is remarkable for the resistance of the inter heavy-chain bridge to reduction. It will be interesting in the future to study whether this property is found in IgG2b from normal serum.

Rat IgG2a is reduced in a similar manner to human IgG4 [2]. This is probably linked to common structural features of the hinge region, but cannot be related to common biological properties, as human IgG4 does not bind complement, interacts poorly with macrophages and binds staphylococcal protein A, whereas the reverse is true for rat IgG2a [9]. Rat IgG2a behaves differently from mouse IgG2a, where H<sub>2</sub>L and H<sub>2</sub> intermediates are present [10]. These results together with differences in the products obtained by proteolytic cleavage [11] suggest that the hinge regions of rat and mouse IgG2a do not have the same conformation.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Mrs M. T. Picqué, Mr J. P. Kints and J. M. Malache for their helpful technical assistance. H.B. is a staff member of the European Communities, Biology Division.

#### References

- [1] Spiegelberg, H. L. (1974) *Adv. Immunol.* 19, 259-293.
- [2] Virella, G. and Parkhouse, R. M. E. (1973) *Immunochimistry* 10, 213-217.
- [3] Bazin, H., Beckers, A. and Querinjean, P. (1974) *Eur. J. Immunol.* 4, 44-48.
- [4] Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C. and Heremans, J. F. (1972) *Int. J. Cancer* 10, 568-580.
- [5] Bloch, K. J., Morse, H. C. and Austen, K. F. (1968) *J. Immunol.* 101, 650-657.
- [6] Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- [7] Bazin, H., Querinjean, P., Beckers, A., Heremans, J. F. and Dessy, F. (1974) *Immunology* 26, 713-723.
- [8] Lambin, P. (1978) *Anal. Biochem.* 85, 114-125.
- [9] Medgyesi, G. A., Füst, G., Gergely, J. and Bazin, H. (1978) *Immunochemistry* 15, 125-129.
- [10] Williamson, A. R. and Askonas, B. A. (1968) *Biochem. J.* 107, 823-828.
- [11] Rousseaux, J., Bazin, H. and Biserte, G. (1978) 4th Eur. Immunol. Meet., Budapest, April 12-14, abstr. p. 93.



**PUBLICATION n° 3**

## THE DIFFERENTIAL ENZYME SENSITIVITY OF RAT IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES TO PAPAIN AND PEPSIN

J. ROUSSEAU,<sup>1</sup> G. BISERTE<sup>1</sup> and H. BAZIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches sur le Cancer, INSERM U 124, Place de Verdun, BP 3567, 59020 Lille Cédex and Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France, and <sup>2</sup>Experimental Immunology Unit, Faculty of Medicine, University of Louvain, Clos-Chapelle-aux-Champs, 30-1200 Brussels, Belgium

(Received 6 August 1979)

**Abstract** - Monoclonal IgG belonging to the different rat IgG subclasses and IgG2a from normal rat serum were subjected to enzymatic degradation with papain and pepsin under several experimental conditions. IgG1 was found the most resistant to papain and IgG2a the most sensitive when the proteins were incubated in absence of cysteine or with low concentrations of the reducing agent (0.001 M). Papain digestion in the presence of 0.01 M cysteine led to the release of non-covalent Fc from rat IgG1, IgG2a and IgG2b. IgG1 and IgG2a were the most resistant to pepsin degradation, whereas IgG2c had very high sensitivity to the action of this enzyme. The effects of the increase of pepsin concentration and of the addition of cysteine were found to be different according to the IgG subclass. The pepsin Fc (pFc) fragment was generated in significant yields from rat IgG2a and IgG2c, but was absent from pepsin digests of IgG1. The mechanisms of resistance to proteolysis and its possible biological significance have been discussed.

### INTRODUCTION

Monoclonal IgG proteins have been shown to be differentially affected by proteolytic digestion and a correlation between susceptibility to proteolysis and subclasses has been observed. Human myeloma IgG subclasses differ in their sensitivity to papain digestion, IgG3 being the most sensitive and IgG2 the most resistant to this enzymatic cleavage (Gergely *et al.*, 1967; Jefferies *et al.*, 1967; Gergely *et al.*, 1970); these differences have also been observed with IgG subclasses from normal human serum (Virella & Parkhouse, 1971; Michaelsen & Natvig, 1971). Human IgG subclasses also differ in their susceptibility to pepsin digestion; the rate of release and the size of the fragments are different according to IgG subclass (Turner *et al.*, 1970a, b). Studies of mouse myeloma immunoglobulins G have revealed differences in their sensitivity to papain cleavage (IgG2b being the most sensitive and IgG1 the most resistant) as well as to pepsin and trypsin digestions (Gorini *et al.*, 1969). In addition, variations of the experimental conditions, such as the time of incubation, or the presence or absence of reducing agents, have shown differences in the sensitivity of the subclasses and in the size of the fragments resulting from proteolytic cleavage (Gorini *et al.*, 1969; Michaelsen & Natvig, 1973).

The discovery of monoclonal rat immunoglobulins synthesized by the ileocaecal immunocytomas of the LOU/Wsl rats (Bazin *et al.*, 1973; Bazin *et al.*, 1974) has permitted the identification of four rat IgG subclasses: IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c. These subclasses differ by their biological properties, in particular, complement binding, interaction with staphylococcal protein A, macrophage binding (Medgyesi *et al.*, 1978), homocytotropic activity (Morse *et al.*, 1968). In an attempt to define structural differences between rat IgG subclasses and to relate them to IgG subclasses of other species, we have investigated, in the present work, the susceptibility to papain and pepsin digestion of monoclonal immunoglobulins IgG of the LOU rat and of IgG2a from normal rat serum.

### MATERIAL AND METHODS

#### *Immunocytomas*

Immunocytomas producing monoclonal immunoglobulins were maintained in our laboratory by transplantation in LOU/M/Wsl rats or (LOU × Wistar) F<sub>1</sub> hybrids as described previously (Bazin *et al.*, 1972), except for the immunocytoma IR 863 producing an IgG2b monoclonal protein that was transplanted in (LOU × OKA) F<sub>1</sub> hybrids.

### Purification of rat immunoglobulins

Normal sera was obtained from randomly bred Wistar rats.

Monoclonal immunoglobulins were isolated from ascites or sera of rats bearing tumors. Purification of IgG2a (from tumors IR 33 and IR 530) and of IgG1 (from tumors IR 595 and IR 656) was performed as described previously (Bazin *et al.*, 1974). One monoclonal IgG2a (from tumor IR 418) was isolated by DEAE-cellulose chromatography with linear gradient elution from 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, to 0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 8.0. Monoclonal IgG2c immunoglobulins (from tumors IR 304, IR 558 and IR 759) were isolated by ammonium sulfate precipitation at 40%, followed by chromatography on CM-cellulose (CM-32) equilibrated with 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.2. Purification was achieved by stepwise elution to 0.2 M Na-acetate, 0.2 M NaCl, pH 4.2. Monoclonal IgG2b (from tumor IR 863) was isolated by precipitation with saturated ammonium sulfate at 40%, followed by DEAE-cellulose chromatography with convex gradient elution from 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 to 0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 8.0.

Normal rat IgG2a was isolated by chromatography of the proteins of normal rat serum precipitated by ammonium sulfate at 40% on a DEAE-cellulose column equilibrated in 0.005 M phosphate buffer, pH 7.4. The first peak eluted by the same buffer represents IgG2a with sometimes some IgG2b.

### Antisera

Polyvalent rabbit antisera to normal rat serum were purchased from SEBIA (France). Antisera monospecific for the heavy chain of rat IgG subclass were prepared as described previously (Bazin *et al.*, 1974).

### Enzymes

Mercuripapain (25 mg/ml) and twice crystallized pepsin were from Sigma Chemical Co. Twice crystallized papain (38 mg/ml) was from Worthington Biochemical.

### Enzymatic digestions

Enzymatic digestions were conducted with the buffers described by Gorini *et al.*, (1969) in the following conditions.

**Papain digestions.** Rat IgG at a concentration of 10 mg/ml were digested (1) with mercuripapain in the presence of 0.001 M

cysteine or with 2 × crystallized papain without cysteine at an enzyme to protein ratio of E/S = 1% (w/w) or 5% for 4 hr or 18 hr; (2) with mercuripapain or 2 × crystallized papain in the presence of 0.01 M cysteine at E/S = 1% for 4 hr or 18 hr.

**Pepsin digestions.** Digestions of 4 hr or 18 hr were performed with an enzyme to protein ratio of 1% (with or without the presence of cysteine 0.01 M), or 5%. IgG were dissolved in the sodium acetate 0.1 M buffer, pH 4.5, dialyzed 16 hr at 4°C against the same buffer, and adjusted to a concentration of 10 mg/ml prior to digestion. Increasing immunoglobulin concentrations from 10 to 30 mg/ml and an E/S of 3% were also used.

### Immuno-electrophoresis

Immuno-electrophoresis was carried out on 10 × 10 cm slides of 1% agarose in sodium barbital buffer 0.078 M, pH 8.2. Immunoglobulins or enzymatic digests (0.25–0.5 mg) were analyzed using rabbit antiserum to rat serum proteins and goat (or rabbit) serum monospecific for the heavy chain of the IgG subclass.

### Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS

Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out according to the procedure described by Laemmli (1970) with the following modifications.

Electrophoresis of the unreduced samples was performed in a gradient of acrylamide for 5–25% concentration (in 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS), cast into a mold containing two glass cells (inner dimensions 13 × 10 × 0.1 cm) held by a simple device recently described (Kerckaert, 1978). The stacking gel contained 5% acrylamide, 0.125 M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6.8, and 0.1% SDS. The samples to be electrophoresed were prepared as follows: immunoglobulins digests or controls were diluted to a concentration of 4 mg/ml and dialyzed against 0.025 M Tris, 0.192 M glycine buffer, pH 8.3. After dialysis, they were adjusted to a protein concentration of 2 mg/ml in 5% SDS, 0.075 M iodoacetamide. The solutions were heated for 5 min at 96°C and a further 30 min at 45°C. Protein (10–20 µg) was loaded on the gel. The molecular weight markers included in the run were: human serum albumin (mol. wt 68,000), egg albumin (mol. wt 43,000), cytochrome C (mol. wt 11,700) and, in some cases, rat IgE (mol. wt 189,000), rat IgG2a (mol. wt 156,000), phosphorylase b (mol. wt 96,000) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (mol. wt 35,700).

Electrophoresis of the reduced samples was carried out in a similar manner, except that in some cases 10% acrylamide gel was used instead of the gradient 5–25%. The samples were prepared as described before except that 2-mercaptoethanol was added to the dialyzed samples (final concentration 5%) and iodoacetamide omitted.

After electrophoresis (2 hr 30–3 hr at 40 mA), the gel slabs were stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue in methanol/trichloroacetic acid water (25:25:50). The molecular weights of the immunoglobulins and their fragments were estimated from a calibration curve of the logarithm of molecular weight markers against their distance of migration in the gel. For high molecular weight fragments (above 80,000 daltons) a calibration curve of the log of mol. wt markers against the log of the concentrations of acrylamide reached by the marker was found more accurate (Lambin, 1978).

## RESULTS

After proteolytic cleavage, the immunoglobulin digests were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in SDS (PAGE-SDS) with or without the reduction of the materials by 2-mercaptoethanol (2 ME) and by immunoelectrophoresis.

### *Papain digestion studies*

*Analysis of the sensitivity to papain of rat IgG subclasses.* In order to distinguish between papain resistant and papain sensitive rat IgG subclasses, a procedure similar to the one described for human IgG (Gergely *et al.*, 1970) was used. Monoclonal IgG belonging to different rat IgG subclasses and IgG2a isolated from normal rat serum (NRS) were digested 4 hr either with mercuripapain in the presence of cysteine 0.001 M, or with twice crystallized papain in the absence of cysteine. Figure 1 shows the pattern obtained in PAGE-SDS after digestion with mercuripapain at an enzyme to protein ratio of 1% (w/w) or 5%, of 2 monoclonal IgG1, 3 monoclonal IgG2a and IgG2a from NRS, 1 IgG2b and 3 IgG2c monoclonal proteins. With an enzyme to protein ratio of 1%, IgG1 and IgG2b proteins appeared the most resistant to papain, IgG1 being almost only digested in a high molecular weight fragment (mol. wt 105,000–115,000 daltons), whereas for IgG2b, a large amount of undigested material (mol. wt 156,000) was present. Low molecular weight fragments (mol. wt 50,000 and 27,000) were

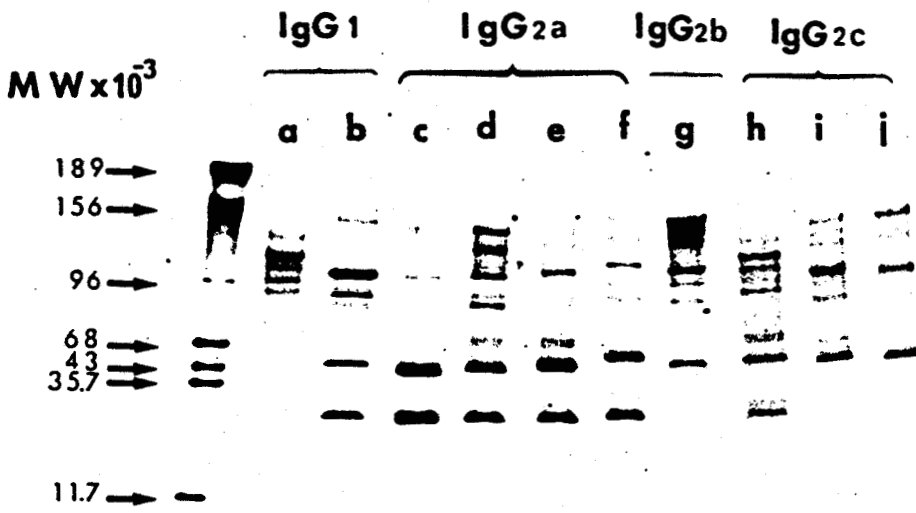
released in significant amounts from IgG2a proteins. With a higher concentration of enzyme (5% relative to protein), IgG1 appeared the most resistant, with the presence of a high molecular weight fragment, whereas in all the other subclasses digestion in low molecular weight fragments was nearly complete. The component of high molecular weight released from IgG1 is very probably a F(ab)<sub>2</sub>, as after reduction by 2 ME, a protein band of mol. wt 23,000–25,000 was only observed (i.e. light chain and Fd molecular weights).

Papain resistance of the IgG1 subclass was further demonstrated when the rat IgG were digested with 2 × crystallized papain (Fig. 2A). The IgG1 proteins were almost undigested, even with a high papain concentration (5%). In the same conditions, cleavage of IgG2a was much more complete, those of IgG2b and IgG2c being only partial.

Immunoelectrophoresis was performed to detect the release of Fab and Fc fragments from the proteins. With mercuripapain at 1% concentration relative to protein (Fig. 3), precipitation lines of Fab and Fc mobilities were already observed within 4 hr of digestion for IgG2a, whereas no Fab and Fc lines were present in IgG1 and IgG2b digests after the same time of digestion: Fc lines could only be observed after 18 hr. For IgG2c, Fab and Fc lines were present in a 4 hr digest but the digestion was not complete after 18 hr, as a third precipitation band sharing common determinants with Fab and Fc was observed. With a higher enzyme concentration (5%), cleavage in Fab and Fc appeared complete for IgG2a and IgG2b; on the contrary, a precipitation line of a mobility similar to undigested protein was observed in IgG1 and IgG2c digests.

*The effect of cysteine on papain digestion. Identification of the fragments released by papain in the presence of 0.01 M cysteine.* Incubation with 1% papain in the presence of 0.01 M cysteine led to an almost complete cleavage of the papain resistant rat IgG subclasses: IgG1 and IgG2b (Fig. 2B). For these two subclasses, a minor component of mol. wt around 100,000 was demonstrated by PAGE-SDS, together with main bands of mol. wt 50,000 and 27,000 (IgG2b) or 28,000 (IgG1). A small amount of material of high molecular weight was also present in IgG2c digests but not in IgG2a. Immunoelectrophoresis (Fig. 4) showed only for IgG1 proteins an intermediate precipitation band between Fab and Fc lines. The

# 1% PAPAÏN



# 5% PAPAÏN

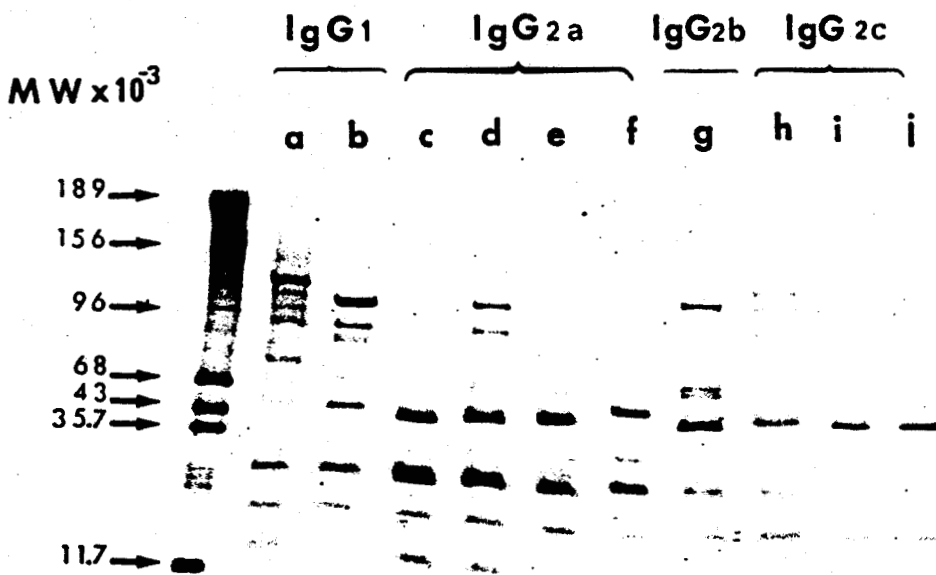


Fig. 1. PAGE-SDS (gradient 5-25% acrylamide) of papain digests of rat IgG (digestion 4 hr with mercuripapain and 0.001 M cysteine). (a) IgG1 IR 595; (b) IgG1 IR 656; (c) IgG2a IR 530; (d) IgG2a IR 418; (e) IgG2a from normal rat serum; (f) IgG2a IR 33; (g) IgG2b IR 863; (h) IgG2c IR 304; (i) IgG2c IR 558; (j) IgG2c IR 759. Molecular weight markers: rat IgE (mol. wt:  $189 \times 10^3$ ), rat IgG2a ( $156 \times 10^3$ ), phosphorylase b ( $96 \times 10^3$ ), human serum albumin ( $68 \times 10^3$ ), egg albumin ( $43 \times 10^3$ ), glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase ( $35.7 \times 10^3$ ), cytochrome C ( $11.7 \times 10^3$ ).

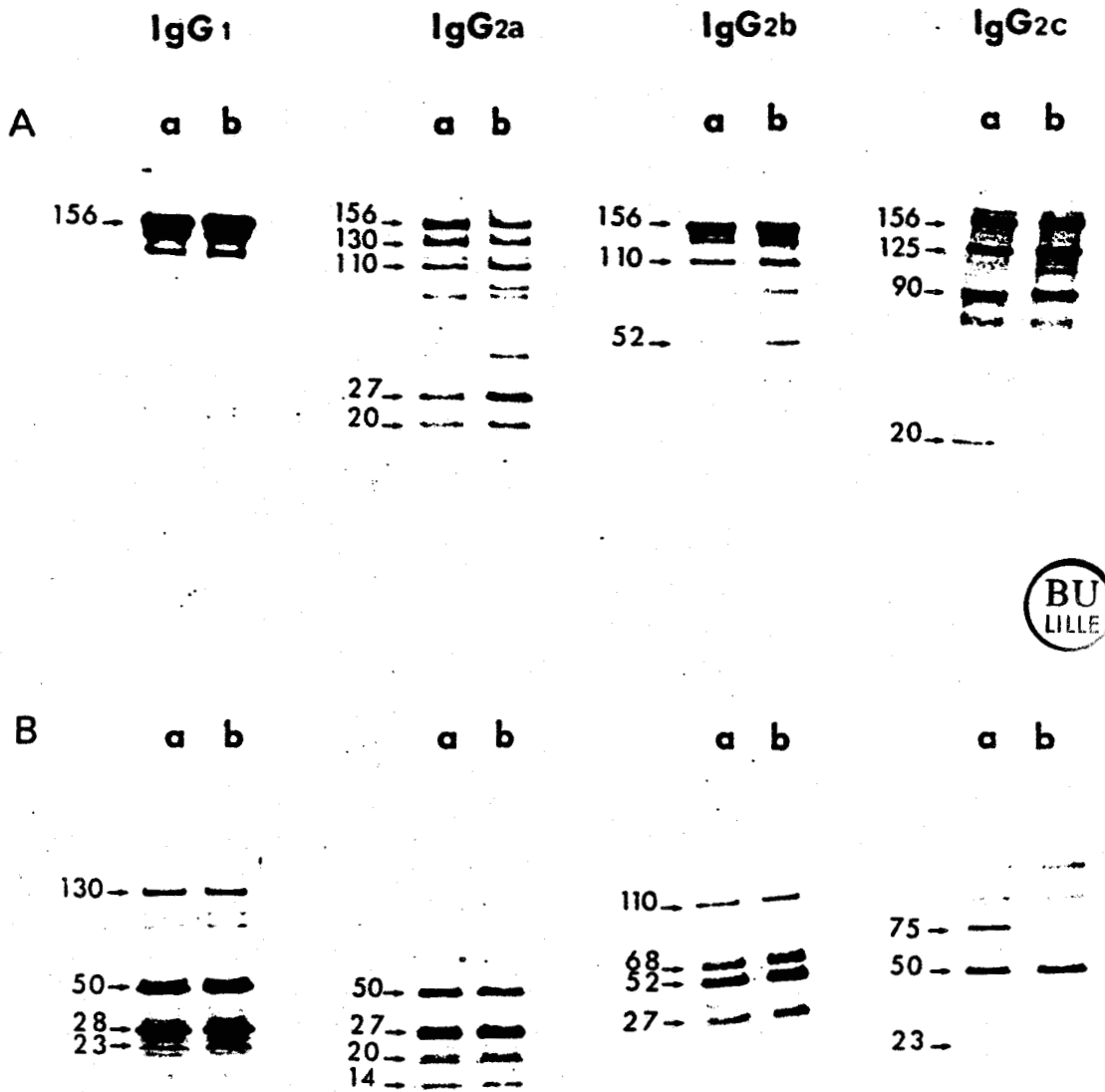


Fig. 2. PAGE-SDS (5-25% acrylamide) of rat IgG (IgG1 IR 595, IgG2a IR 530, IgG2b IR 863, IgG2c IR 304) after digestion with 2 x crystallized papain (1%). (A) Digests in the absence of cysteine; (B) digests in the presence of 0.01 M cysteine: (a) 4 hr digests; (b) 18 hr digests. Left—mol. wt  $\times 10^{-3}$ .

approximate molecular weight of the main protein bands observed by PAGE-SDS with or without reduction of the digests by 2 ME is given in Table 1. For three of the subclasses, IgG1, IgG2a and IgG2b, one of the components has the same molecular weight with or without reduction by 2 ME: 28,000 for IgG1, 27,000 for IgG2a and IgG2b. In IgG2c digests a main protein band of 50,000 daltons was observed together with minor bands of mol. wt 75,000 and 23,000; after reduction by 2 ME, the main component has a mol. wt of 23,000 (molecular weight of the light chain) and is associated with minor bands of mol. wt 25,000, 27,000 and 11,000. A component of

Table 1. Molecular weights of the main components observed by PAGE-SDS of rat IgG papain digests (1% papain with cysteine 0.01 M) with or without reduction by 2-mercaptoethanol (2 ME) at 5% final concentration

	Unreduced digest	Digest reduced with 2 ME
IgG1	50,000	23-25,000
	28,000	28,000
IgG2a	50,000	23-25,000
	27,000	27,000
IgG2b	68,000	23-25,000
	52,000	27,000
	27,000	
IgG2c	50,000	23,000

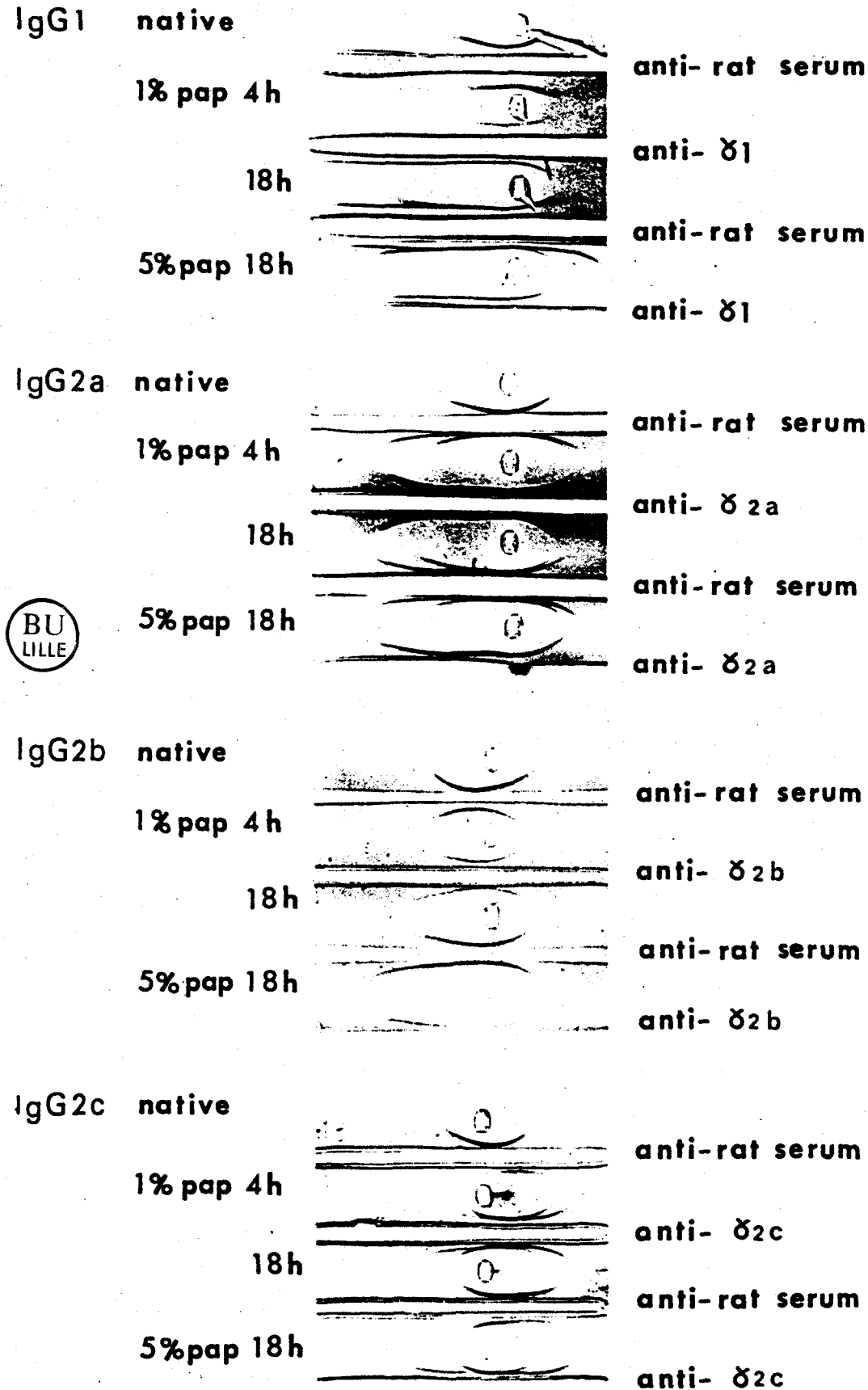


Fig. 3. Immunoelectrophoresis of rat IgG subclasses native and digested with mercuripapain at enzyme to protein ratio of 1% or 5% in the presence of 0.001 M cysteine. Anti- $\delta$ 2c antiserum is also anti-idiotypic for the IgG2c protein (IR 304).

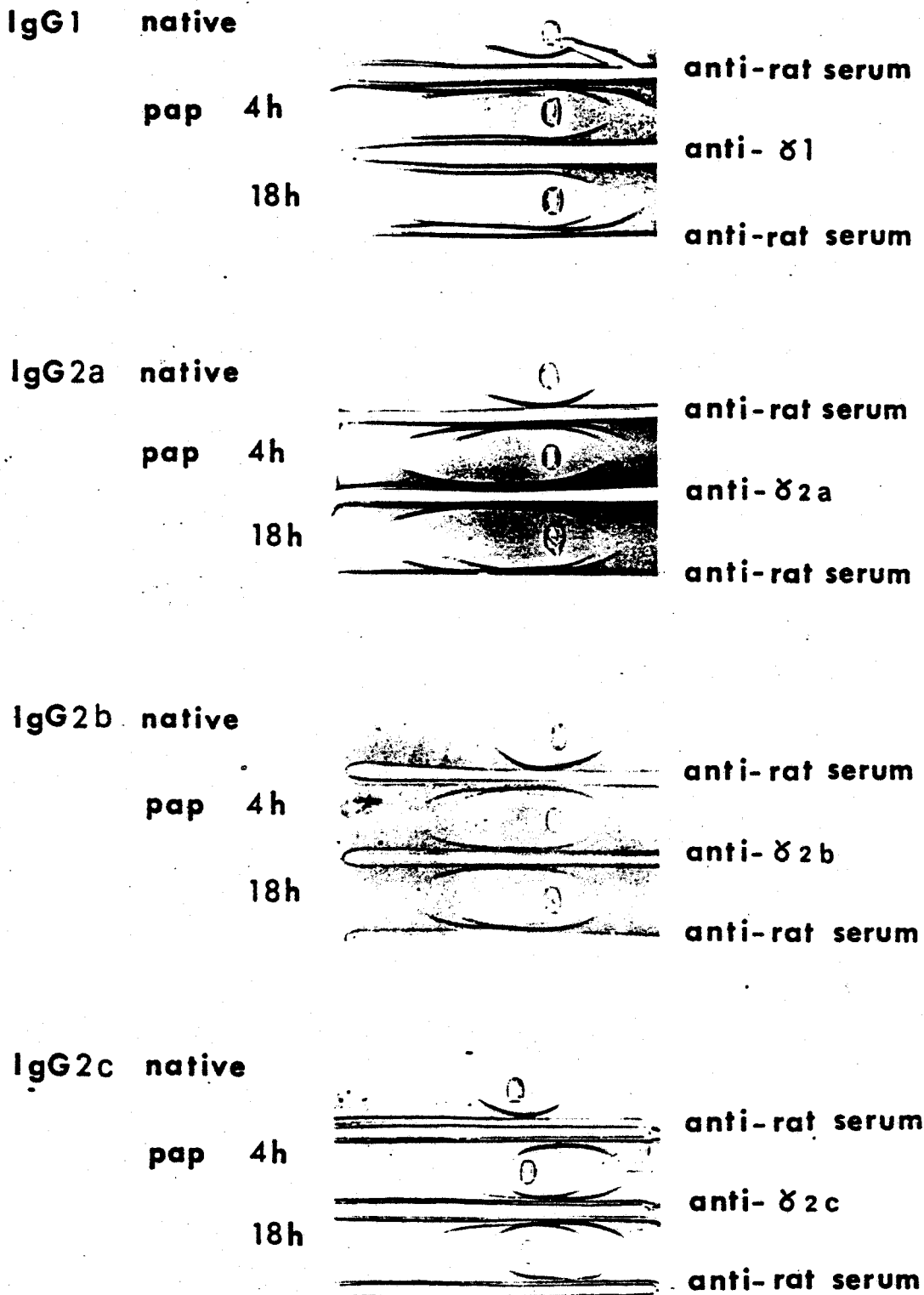


Fig. 4. Immunoelectrophoresis of rat IgG subclasses native and digested with papain at 1°, enzyme to protein ratio in the presence of 0.01 M cysteine. Anti  $\gamma$ 2c antiserum is also anti-idiotypic for the IgG2c protein (1R 304).



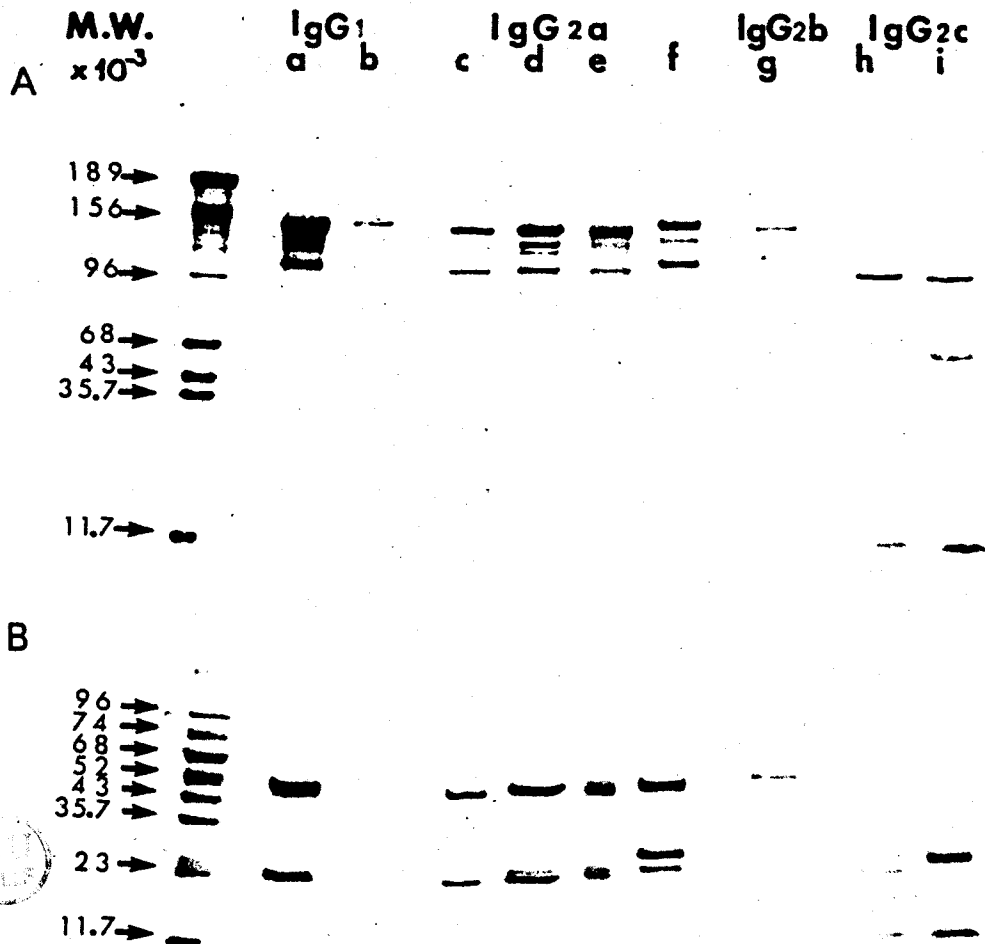


Fig. 5. PAGE-SDS (5–25% acrylamide gradient) of rat IgG digested 4 hr with pepsin at 1% (w/w) enzyme to protein ratio. (A) Unreduced digests. (B) Digests reduced by 2-mercaptoethanol (final concentration 5%). (a) IgG1 IR 595; (b) IgG1 IR 656; (c) IgG2a IR 530; (d) IgG2a IR 418; (e) IgG2a from normal rat serum; (f) IgG2a IR 33; (g) IgG2b IR 863; (h) IgG2c IR 558; (i) IgG2c IR 759.

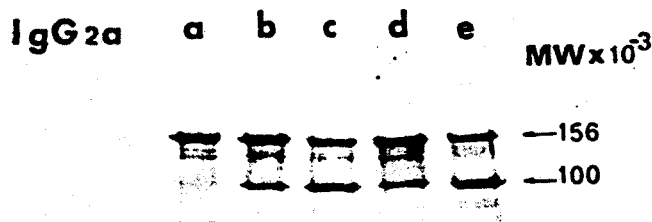
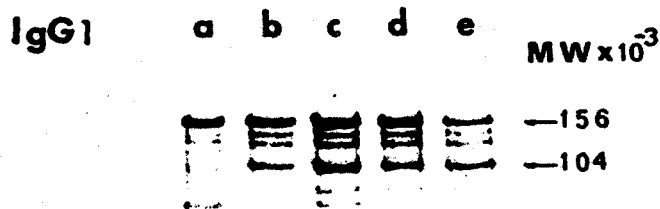
mol. wt 68,000 was present in PAGE-SDS of IgG2b digest, but absent after reduction by 2 ME, where only two components of mol. wt 23,000–25,000 and 27,000 were demonstrated. Taken together, these results suggest that papain release Fab fragments (mol. wt 50,000) and a non-covalent Fc from rat IgG2a (mol. wt 27,000) and IgG1 (mol. wt 28,000). For IgG2b, the two components of 68,000 and 27,000 daltons probably represent a covalent and a non-covalent Fc, respectively. In the case of IgG2c, no component that could be taken for a non-covalent Fc was demonstrated.

*Pepsin digestion studies*

Figure 5 shows the pattern in PAGE-SDS of monoclonal Ig belonging to different rat IgG subclasses and IgG2a from NRS after a 4 hr digestion with 1% pepsin. All the proteins appeared only partially digested except proteins

of the IgG2c subclass, in which a complete cleavage in fragments similar in size to  $F(ab)_2$  (mol. wt 96,000) and pepsin Fc, pFc (mol. wt 13,000) has occurred. After reduction of the digests by 2 ME, it was noticed that in all but the IgG2c subclass, the undigested heavy chain was present in large amounts. A component of mol. wt 24,000–25,000 daltons, i.e. similar in size to  $Fd'$ , was observed together with the light and heavy chains; pFc was clearly seen in the IgG2a and IgG2c digests.

The increase of the time of digestion to 18 hr and/or the enzyme concentration to 5% relative to protein led to a much more complete cleavage of the IgG subclasses. However, the cleavage of the IgG1 and IgG2a proteins was still incomplete after 18 hr at 5% pepsin (Fig. 6). IgG2b appeared very sensitive to the increase of time and enzyme concentration (Fig. 7). After 18 hr of incubation with 5% pepsin, a component of mol. wt 78,000



—12.5

Fig. 6. PAGE-SDS (5-25% acrylamide) of pepsin digests of rat IgG1 (IR 595) and IgG2a (IR 530). (a) Native protein; (b) 4 hr digest with 1% pepsin; (c) 18 hr digest with 1% pepsin; (d) 4 hr digest with 5% pepsin; (e) 18 hr digest with 5% pepsin.

was predominant (Fig. 7e); after reduction of the digest by 2 ME, only a band of mol. wt 35,000 was observed and no band of light chain. Immunoelectrophoresis (Fig. 8) showed two precipitation lines of mobility identical to the protein. For the IgG2c subclass, the increase of enzyme concentration led to the production of multiple components of mol. wt 46,000-50,000, i.e. similar in size to F(ab)' fragments (Fig. 9). Their appearance was proportional to the decrease of F(ab)'<sub>2</sub>. After reduction by 2 ME (Fig. 10), it was noticed that the appearance and increase of F(ab)' fragments correspond to the production of a band of mol. wt 22,000, together with components of mol. wt 25,000, 23,000 (light chain) and 12,000 (pFc).

Incubation with pepsin in the presence of

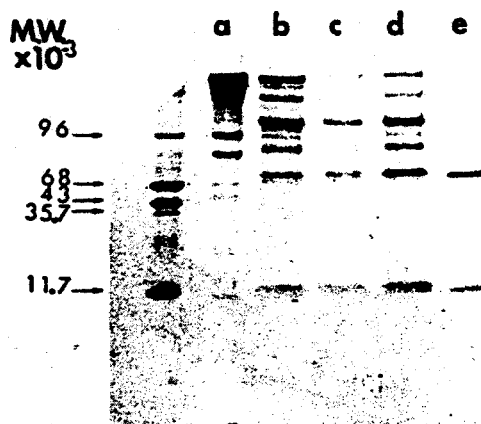


Fig. 7. PAGE-SDS (5-25% acrylamide) of rat IgG2b IR .863. (a) Native protein; (b) 4 hr digest with 1% pepsin; (c) 18 hr digest with 1% pepsin; (d) 4 hr digest with 5% pepsin; (e) 18 hr digest with 5% pepsin.

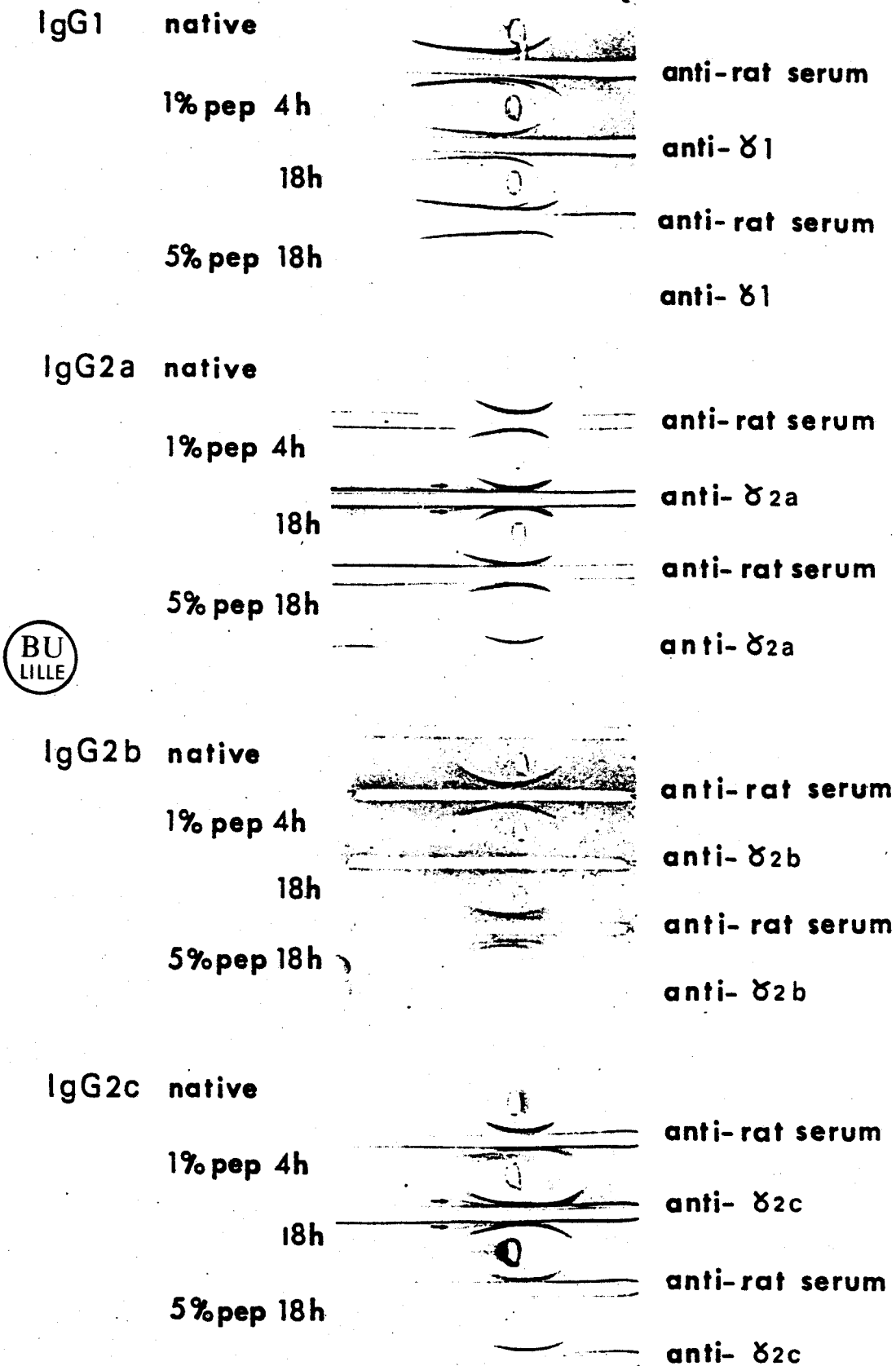


Fig. 8. Immunoelectrophoresis of rat IgG subclasses native and digested with 1% (w/w) or 5% (w/w) pepsin. Anti- $\delta$ 2c is also anti-idiotypic for the IgG2c protein IR 304. Arrows indicate the position of pFc.

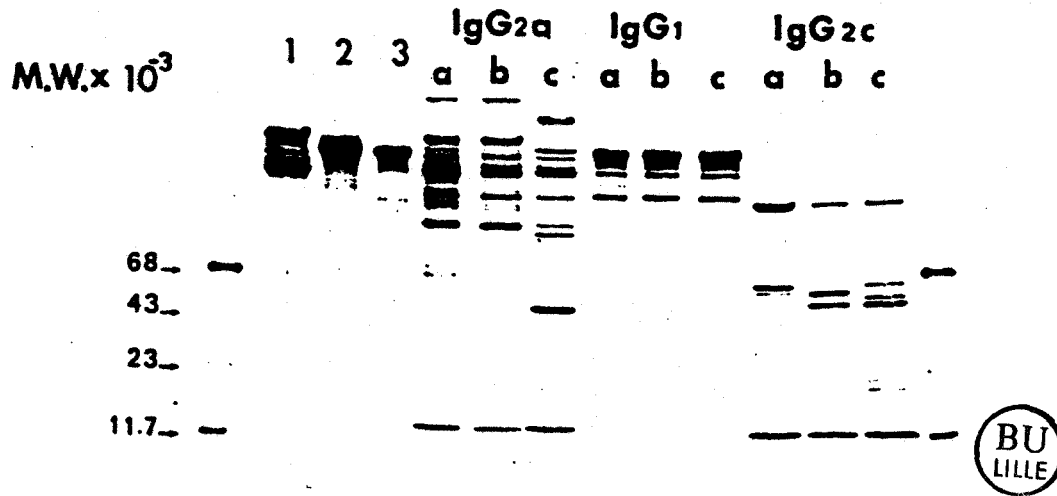


Fig. 9. PAGE-SDS (5-25% acrylamide) of 4 hr digests with pepsin of rat IgG1 (IR 595) IgG2a (IR 530) and IgG2c (IR 304). (1) Native IgG1, (2) native IgG2a, (3) native IgG2c. (a) Digest with 1% (w/w) pepsin; (b) digest with 5% (w/w) pepsin; (c) digest with 1% (w/w) pepsin in the presence of 0.01 M cysteine.

cysteine (0.01 M) has no significant effect on the digestion of IgG1 and IgG2b proteins. For the IgG2c subclass, an increase of the production of F(ab)' fragments was observed (Fig. 9). IgG2a appeared the most sensitive to the addition of cysteine, as significant amounts of a F(ab)' fragment were produced in these conditions (Fig. 9).

Another difference between the rat IgG is the amount of pFc released from the proteins according to the IgG subclass. Immunoelectrophoresis (Fig. 8) and PAGE-SDS (see Figs. 6, 7, 9, 10) indicated clearly the presence of pFc in the case of IgG2a and IgG2c; less was released from IgG2b, but this fragment was not detected in the case of IgG1. The modification of the protein concentration from 10 to 30 mg/ml

had no significant effect on the release of F(ab)<sub>2</sub> and pFc from IgG1 monoclonal proteins.

DISCUSSION

The results of these studies indicate that rat IgG molecules are differentially affected by papain and pepsin cleavages and that the differences are related to the IgG subclass. Resistance to papain was clearly demonstrated when the proteins were incubated in the absence of cysteine or with low concentration of the reducing agent (0.001 M). IgG1 was found the most resistant to papain, as the majority of the fragments produced (even with high concentration of the enzyme) were of high molecular weight and related to F(ab)<sub>2</sub>. The susceptibility to papain cleavage was found in the order: IgG2a > IgG2c > IgG2b > IgG1. The resistance to papain of rat IgG1 resembles the one of mouse IgG1 (Gorini *et al.*, 1969) and those described in other species: human IgG2 (Gergely *et al.*, 1967; Jefferies *et al.*, 1967; Gergely *et al.*, 1970); bovine colostrum IgG1 (Fang & Mukkur, 1976; Wie *et al.*, 1978); goat IgG2 (Micusan & Borduas, 1975) and a subpopulation of rabbit IgG (Jefferies & Stanworth, 1967). Rat IgG2a appears more sensitive to papain than mouse IgG2a (Gorini *et al.*, 1969). This may be related to a greater accessibility of the hinge to papain, as it has also been demonstrated that the inter heavy chain bridges of the hinge region are very labile to reduction (Rousseaux *et al.*, 1979). The molecular features responsible for the resistance (or sensitivity) to papain are not well established. The number of inter heavy chain disulphide

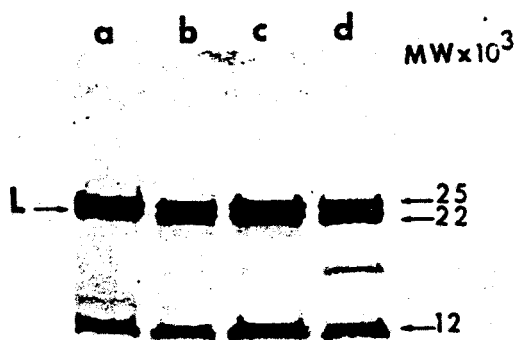


Fig. 10. PAGE-SDS (5-25% acrylamide) of pepsin digests of rat IgG2c (IR 304) reduced by 2-mercaptoethanol (5% final concentration). (a) 4 hr digest with 1% (w/w) pepsin; (b) 18 hr digest with 1% pepsin; (c) 4 hr digest with 5% (w/w) pepsin; (d) 18 hr digest with 5% (w/w) pepsin. L, light chain of IgG2c (IR 304).

bridges, and the sequences of the hinge region in human IgG (Frangione & Milstein, 1968; Edelman *et al.*, 1969; Pink *et al.*, 1970; Milstein & Frangione, 1971; Adlesberg *et al.*, 1975; Michaelsen & Natvig, 1974) and in mouse IgG (Svasti & Milstein, 1970, 1972; De Préval *et al.*, 1970) do not demonstrate clear structural relationships between the IgG subclasses resistant (or sensitive) to papain. Perhaps the structural analysis of the hinge of rat IgG subclasses and comparison to human and mouse IgG by the use of secondary structure predictions (Chou & Fasman, 1974) could demonstrate the molecular mechanism of resistance to papain. The presence of an oligosaccharide in the hinge region has been proposed to explain the resistance to papain of some molecules of rabbit IgG (Fanger & Smyth, 1972*a, b*). However, such an oligosaccharide has not been found in the sequence of the  $\gamma$  heavy chain of mouse IgG1, a papain-resistant IgG subclass (Atedugbo, 1978). Nevertheless, carbohydrate analyses of rat IgG subclasses are in progress to find out whether a correlation between sugar composition and resistance to papain could exist.

The addition of cysteine at the concentration 0.01 M led to a complete cleavage of all IgG subclasses in Fab and Fc fragments. Gorini *et al.* (1969) have suggested that cysteine induces a steric rearrangement of the molecule rather than a reduction of the disulfide bonds of the hinge. The molecular weight of the fragments observed in PAGE-SDS are consistent with the release by papain of a non-covalent Fc from IgG2a and IgG1 and with the presence of both a non-covalent and a covalent Fc in rat IgG2b digests. No component of the molecular weight of a non-covalent Fc was found in rat IgG2c digests. Arend *et al.* (1977) have found that long time digestion with papain of rat IgG2a releases two types of non-covalent Fc: Fc(I) (mol. wt 25,300) and Fc(II) (mol. wt 20,300). Such heterogeneity of the Fc was not demonstrated by our experiments as only a small amount of component of mol. wt 20,000 was observed. However our papain digestions were performed at neutral pH instead of the acid pH (5.5) used by Arend *et al.* (1977).

Subclass differences in susceptibility to pepsin digestion were also put in evidence by our studies. IgG1 and IgG2a were found the most resistant and IgG2c the most sensitive to pepsin. An order of sensitivity could be defined: IgG2c > IgG2b > IgG2a > IgG1. Fragments similar in size to F(ab)' were detected in two IgG

subclasses: IgG2c and IgG2a. They arose in different experimental conditions and their genesis appears different. In the case of IgG2c, the amount of F(ab)' fragment released by pepsin increased with the length of incubation and with high enzyme to protein ratios. The increase was proportional to the disappearance of F(ab)<sub>2</sub>. Examination of the products of digestion by PAGE-SDS with reduction by 2 ME suggested that F(ab)' arose from the break-down of F(ab)<sub>2</sub> by a digestion of the hinge region. In the case of IgG2a, the release of F(ab)' fragments was observed mainly when pepsin digestion was conducted in the presence of cysteine (although a small amount was present in digestion without cysteine). This is very probably related to the high sensitivity to reduction of the inter heavy chain bridges of IgG2a (Rousseaux *et al.*, 1979). No evidence for a proteolytic cleavage of the hinge was obtained as it was the case for rat IgG2c.

Another clear difference between rat IgG subclasses is the amount of pFc released upon digestion by pepsin. A good yield of pFc was obtained from the IgG2a and IgG2c proteins, less was released from IgG2b, but this fragment was not detectable from IgG1, whatever the experimental conditions. The differences are probably related to the structure and conformation of the C $\gamma_3$  domain and of the inter C $\gamma_2$ -C $\gamma_3$  region. Relevance of the similar release of pFc (i.e. almost the C $\gamma_3$ ) from IgG2a and IgG2c to the known biological properties of these two subclasses can be pointed out. In effect, among rat IgG, IgG2a and IgG2c both bind to macrophages (Medgyesi *et al.*, 1978), a function known to be effected by the C $\gamma_3$  domain (Yasmeen *et al.*, 1973; Dorrington & Painter, 1974; Okafor *et al.*, 1974; Ciccimara *et al.*, 1975).

No clear identity between rat IgG and mouse or human IgG can be defined by our pepsin digestion studies. The sensitivity to pepsin of rat IgG2c resembles the one of human IgG3 or mouse IgG2b; however, a good yield of pFc is obtained from rat IgG2c, whereas this is not the case for human IgG3 and mouse IgG2b. Rat IgG2a and human IgG1 behave similarly as both are resistant to pepsin and give a good release of pFc, but the effect of cysteine on human IgG1 is not known. F(ab)<sub>2</sub> of the human IgG2 subclass are sensitive to further break-down as for rat IgG2c, but the former is pepsin resistant, whereas the latter is very sensitive to the enzyme. Nevertheless, it can be observed that in man as in rat, one IgG subclass is resistant both to papain

and pepsin: human IgG2 and rat IgG1.

It is not known whether resistance of a particular IgG subclass to proteolytic enzymes analyzed in our study may reflect a resistance to other enzymes, especially bacterial proteases. If this was the case, it could represent, as suggested for human IgA2 by Torano & Putnam (1978), an escape from bacterial proteases and therefore have a biological significance. Further studies with different enzymes of bacterial origin would give an answer to this hypothesis.

**Acknowledgements**—The helpful technical assistance of A. M. Debevere, J. Herno, M. T. Picqué and J. P. Kints is gratefully acknowledged. Studies in Brussels have been supported by grants No. 3.4158.76 and 3.9005.78 of FRSM Belgium and grant ROI—AI 128.40 from the N.I.H. (U.S.A.). Hervé Bazin is a staff member of Euratom, Biology Division.

#### REFERENCES

- Adlesberg J. B., Franklin E. C. & Frangione B. (1975) Repetitive hinge region sequence in human IgG3: isolation of an 11,000 dalton fragment. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 723–727.
- Arend W. R., Hermodson M. A. & Teller D. C. (1977) Characterization of two species of Fc fragments obtained from rat IgG2a by prolonged papain digestion. *J. Immun.* **118**, 388–394.
- Atedugbo K. (1978) Evolution of immunoglobulin subclasses. Primary structure of a murine myeloma  $\gamma_1$  chain. *J. biol. Chem.* **253**, 6068–6075.
- Bazin H., Beckers A., Deckers C. & Heremans J. F. (1972) Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats—I. General features of LOU Wsl strain immunocytomas and their monoclonal proteins. *Eur. J. Cancer* **10**, 568–580.
- Bazin H., Beckers A., Deckers C. & Moriamé M. (1973) Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats—V. Monoclonal immunoglobulins secreted by 250 ileocecal immunocytomas in LOU/Wsl rats. *J. natn. Cancer Inst.* **51**, 1359–1361.
- Bazin H., Beckers A. & Querinjean P. (1974) Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immun.* **4**, 44–48.
- Chou P. Y. & Fasman G. D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical  $\beta$ -sheet and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **13**, 211–222.
- Ciccimara F., Rosen F. S. & Merler E. (1975) Localization of the IgG effector site for monocyte receptors. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2081–2083.
- De Préval C., Pink J. R. L. & Milstein C. (1970) Interchain bridges of mouse IgG2a and IgG2b. *Nature, Lond.* **228**, 930–932.
- Dorrington K. J. & Painter R. H. (1974) Functional domains of immunoglobulins G. In *Progress in Immunology* II, Vol. 1, p. 75. North-Holland, Amsterdam.
- Edelman G. H., Cunningham B. A., Gall E. W., Gottlieb P. D., Rutishauser U. & Waxdal M. J. (1969) The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molecule. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **63**, 78–85.
- Fang N. D. & Mukkur T. K. S. (1976) Physico-chemical characterization of proteolytic cleavage fragments of bovine colostrum immunoglobulin G1 (IgG1). *Biochem. J.* **155**, 25–30.
- Fanger M. W. & Smyth D. G. (1972a) The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Multiple carbohydrate attachment sites. *Biochem. J.* **127**, 757–765.
- Fanger M. W. & Smyth D. G. (1972b) Asymmetric attachment of C-2-oligosaccharide. *Biochem. J.* **127**, 767–774.
- Frangione B. & Milstein C. (1968) Variations in the S-S bridges of immunoglobulins G: interchain disulphide bridges of  $\gamma$ G3 myeloma proteins. *J. molec. Biol.* **33**, 893–906.
- Gergely J., Medgyesi G. H. & Stanworth D. R. (1967) Structural studies of immunoglobulins. II The varying susceptibility to papain digestion of a group of human myeloma  $\gamma$ G-globulins. *Immunochemistry* **4**, 369–374.
- Gergely J., Fudenberg H. H. & van Loghem E. (1970) The papain susceptibility of IgG myeloma proteins of different heavy chain subclasses. *Immunochemistry* **7**, 1–6.
- Gorini G., Medgyesi G. A. & Doria G. (1969) Heterogeneity of mouse myeloma  $\gamma$ G globulins as revealed by enzymatic proteolysis. *J. Immun.* **103**, 1132–1142.
- Jefferies R. & Stanworth D. R. (1967) Structural differences within the gamma G class of immunoglobulins. *Nature, Lond.* **215**, 276–277.
- Jefferies R., Weston P. D., Stanworth D. R. & Clamp J. R. (1967) Relationship between the papain sensitivity of human  $\gamma$ G immunoglobulins and their heavy chain subclass. *Nature, Lond.* **219**, 646–649.
- Kerckaert J. P. (1978) Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **84**, 354–360.
- Laemli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, Lond.* **227**, 680–685.
- Lambin P. (1978) Reliability of molecular weight determinations of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Analyt. Biochem.* **85**, 114–125.
- Medgyesi G. A., Füst G., Gergely J. & Bazin H. (1978) Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. *Immunochemistry* **15**, 125–129.
- Michaelsen T. E. & Natvig J. B. (1971) Isolation and characterization of IgG subclass proteins and Fc fragments from normal human IgG. A method for utilising 'non a' and 'non g' as genetic markers. *Immunochemistry* **8**, 235–242.
- Michaelsen T. E. & Natvig J. B. (1973) Characterization of subclasses related F(ab)<sub>2</sub>, Fab<sub>2</sub>c and Fc<sub>2</sub>h fragments obtained by short papain digestion of human IgG myeloma proteins. *Scand. J. Immun.* **3**, 299–312.
- Michaelsen T. E. & Natvig J. B. (1974) Unusual molecular properties of human IgG3 proteins due to an extended hinge region. *J. biol. Chem.* **249**, 2778–2785.
- Micusan V. V. & Borduas A. G. (1975) Papain hydrolysis of goat IgG immunoglobulins: a mean of subclass characterization. *Immunochemistry* **12**, 345–347.
- Milstein C. & Frangione B. (1971) Disulphide bridges of the heavy chain of human immunoglobulin G2. *Biochem. J.* **121**, 217–225.
- Morse H. C., Bloch K. J. & Austen K. F. (1968) Biologic properties of rat antibodies—II. Time course of appearance of antibody involved in antigen induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A rat); association of this activity with rat IgG<sub>a</sub>. *J. Immun.* **101**, 658–663.
- Okafor G. O., Turner M. W. & Hay F. C. (1974) Localisation of monocyte binding site of human immunoglobulin G. *Nature, Lond.* **248**, 228–230.
- Pink, J. R. L., Buttery S. H., De Vries G. M. & Milstein C. (1970) Human immunoglobulin subclasses: partial amino acid sequence of the constant region of a  $\gamma_4$  chain. *Biochem. J.* **117**, 33–47.
- Rousseaux J., Bazin H. & Biserte G. (1979) Differences in sensitivity to reduction of rat immunoglobulin IgG subclasses. *FEBS Lett.* **98**, 359–362.

- Svasti J. & Milstein C. (1970) Interchain bridges of mouse IgG1. *Nature, Lond.* **223**, 932-934.
- Svasti J. & Milstein C. (1972) The disulphide bridges of a mouse immunoglobulin G1 protein. *Biochem. J.* **126**, 837-850.
- Torano A. & Putnam F. W. (1978) Complete amino acid sequence of the  $\alpha_2$  heavy chain of a human IgA2 immunoglobulin of the A2m(2) allotype. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 966-969.
- Turner M. W., Bennich H. H. & Natvig J. B. (1970a) Pepsin digestion of human G-myeloma proteins of different subclasses—I. The characteristic features of pepsin cleavage as a function of time. *Clin. exp. Immun.* **7**, 603-625.
- Turner M. W., Bennich H. H. & Natvig J. B. (1970b) Pepsin digestion of human G-myeloma proteins of different subclasses—II. Immunochemical investigations of the products of peptic digestion. *Clin. exp. Immun.* **7**, 627-640.
- Virella G. & Parkhouse R. M. E. (1971) Papain sensitivity of heavy chain subclasses in normal human IgG and localization of antigenic determinant for the subclasses. *Immunochemistry* **8**, 243-250.
- Wie S. I., Dorrington K. J. & Froese A. (1978) Characterization of the proteolytic fragment of bovine colostral IgG1. *J. Immun.* **121**, 98-104.
- Yasmeen D., Ellerson J. R., Dorrington K. J. & Painter R. H. (1973) Evidence for the domain hypothesis: location of the site of cytophilic activity toward guinea pig macrophages in the CH3 homology region of human immunoglobulin G. *J. Immun.* **110**, 1706-1709.



**PUBLICATION n° 4**



BBA 31725

## PROTEOLYSIS OF RAT IgG SUBCLASSES BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* V8 PROTEINASE

JEAN ROUSSEAU, ROSELYNE ROUSSEAU-PRÉVOST, HERVÉ BAZIN<sup>a</sup> and GÉRARD BISERTE

*Institut de Recherches sur le Cancer et Unité INSERM U. 124, BP 311, Place de Verdun, 59020 Lille Cédex (France) and <sup>a</sup> Experimental Immunology Unit, University of Louvain, Clos Chapelle-aux-Champs, 30-1200 Brussels (Belgium)*

(Received May 4th, 1983)

*Key words: Immunoglobulin degradation; Proteinase; IgG; (Rat)*

Monoclonal IgG belonging to the four rat IgG subclasses (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2c</sub>) and some IgG subclasses from normal rat serum were subjected to enzymatic degradation with *Staphylococcus aureus* V8 proteinase. The results show that only one subclass, IgG<sub>2b</sub>, is significantly cleaved by the enzyme, with the release of two main products identified as F(ab)<sub>2</sub> and Fc-like fragments. This unique susceptibility of the IgG<sub>2b</sub> subclass represents therefore an easy means of identification and also offers a simple procedure for a preparation of F(ab)<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG<sub>2b</sub> antibodies.

### Introduction

Enzymatic hydrolysis has been used for several years as a means of immunochemical analysis of the immunoglobulins, especially the characterization of the IgG subclasses. The differential enzyme sensitivity and the differences in size of the fragments released by enzymatic digestion have constituted an alternative approach to the use of monospecific antisera in the IgG subclass characterization of myeloma proteins [1]. The effects of papain and pepsin have been extensively studied in different species, especially man [2-5], mouse [6], rat [7], cow [8] and goat [9]. The action of trypsin has also been investigated in man [10], mouse [6] and rat [11]. Cleavage of IgG subclasses by other enzymes has also been reported to a lesser extent [12-15]. A detailed knowledge of enzyme sensitivity of IgG subclasses in rat as in mouse has gained importance because of the recent development of hybridoma technology and the now extensive use of monoclonal antibodies.

In the present study, the action of the staphylococcal enzyme *S. aureus* V8 proteinase, specific for glutamic and aspartic residues [16-18],

on rat IgG subclasses (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub>) has been investigated. The results show that only one subclass, IgG<sub>2b</sub>, is significantly cleaved by *S. aureus* V8 proteinase. The two main fragments released by enzymatic digestion of the IgG<sub>2b</sub> subclass are of F(ab)<sub>2</sub> and Fc types. This subclass can therefore be easily identified in monoclonal rat IgG or in fractions of IgG from normal rat serum.

### Materials and Methods

*Purification of rat immunoglobulins.* Monoclonal rat IgGs were isolated using procedures previously described [19,20]. IgG<sub>2a</sub> and a fraction containing both IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> were isolated from normal rat serum (obtained from randomly bred Wistar rats) by chromatography on DEAE-cellulose (DE-32, Whatman) and elution with 0.005 M and 0.01 M sodium phosphate buffers, pH 7.4, respectively. IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2c</sub> from normal rat serum were isolated by chromatography on Protein A-Sepharose (Pharmacia) as previously reported [21].

*Antisera.* Polyvalent rabbit antisera to rat serum proteins were purchased from Sebia. Antisera

specific for Fab of rat IgG, Fc of rat IgG, and antisera specific for IgG subclasses were prepared essentially as reported in Ref. 19.

**Enzymatic digestions.** Proteinase from *S. aureus* V8 was purchased from Miles Laboratories. Digestions were performed in three different buffers: 0.1 M ammonium acetate, pH 4.0; 0.1 M ammonium carbonate/0.002 M EDTA, pH 7.8; 0.1 M sodium phosphate/0.002 M EDTA, pH 7.8 [18]. Rat IgGs (10 mg/ml) were digested for 4 h at 37°C with an enzyme/protein ratio of 1/30 (w/w). The digestion was stopped by quick freezing of the samples. Until analysis, samples were stored at -70°C.

**Isolation of the proteolytic fragments from monoclonal rat IgG<sub>2b</sub>.** Digestion of monoclonal rat IgG<sub>2b</sub> (IR 863) was performed for 4 h at 37°C in 0.1 M sodium phosphate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8, using an enzyme/protein ratio of 1/30. The digest was dialyzed at 4°C against 0.01 M sodium phosphate/0.15 M NaCl buffer, pH 7.4 and fractionated at 4°C on an Ultrogel Aca-44 (IBF, France) column equilibrated in the same buffer. Further purification of the fragments was achieved by chromatography on DEAE-cellulose (DE-32, Whatman) and sequential elution with sodium phosphate buffers as reported in Ref. 11.

**Immuno-electrophoresis.** Immuno-electrophoresis was carried out in 1% agarose with 0.078 M sodium barbital buffer, pH 8.2.

**Polyacrylamide gel electrophoresis.** Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS was performed as described by Laemmli [22] with the modifications previously reported [7].

## Results

### *Analysis of the digestion products from the four rat IgG subclasses*

Monoclonal IgGs belonging to the four different rat IgG subclasses were digested with *S. aureus* V8 proteinase in three different buffers: (1) 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 4.0; (2) 0.1 M ammonium carbonate buffer/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8; (3) 0.1 M sodium phosphate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8 [18]. The digestion products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in SDS, with or without reduction of the disulfide bridges, and by immuno-electrophoresis. Fig. 1 shows the patterns obtained by SDS-poly-

acrylamide gel electrophoresis after digestion in buffers 1, 2 or 3. In non-reducing conditions (Fig. 1, part A), it was observed that IgG incubated in acetate buffer give multiple bands with  $M_r$  slightly lower than that of the intact IgG, but release of clearly identifiable fragments was only observed for monoclonal IgG<sub>2b</sub> IR 863 and IgG<sub>1</sub> IR 27. For IgG<sub>2b</sub> IR 863, a fragment with  $M_r$  28000 was released after incubation in acetate buffer. A fragment with  $M_r$  about 10000 was noticed in the case of IgG<sub>1</sub> IR 27. IgG incubated in carbonate or in phosphate buffers, pH 7.8, gave almost the same patterns (Fig. 1A, parts 2 and 3). A significant cleavage was only observed in the case of IgG<sub>2b</sub> IR 863. This IgG was found completely split into two main fragments with  $M_r$  105000 and 28000. Analysis of the digestion products after reduction of the disulfide bridges is shown in Fig. 1B. For most of the IgG, low molecular weight products (between 10000 and 12000) were observed after digestion in one of the three different buffers. In addition, fragments with  $M_r$  slightly lower than the light chain were found, more especially for IgG digested in phosphate buffer (see Fig. 1B, part 3). Components with  $M_r$  slightly lower than the heavy chain (between 45000 and 50000) were also observed in several cases (see for example IgG digested in acetate buffer in Fig. 1B, part 1). The only IgG for which a complete cleavage of the heavy chain was obtained after digestion at pH 7.8 was IgG<sub>2b</sub> IR 863. Three main components were observed in addition to light chain:  $M_r$  28000, 26000 and 21000. Among these three components, it must be noticed that one has the same  $M_r$  28000, in reducing and non-reducing conditions.

Immuno-electrophoretic analyses of the digestion products from monoclonal IgG are shown in Fig. 2. The presence of precipitation lines with mobility clearly different from that of undigested IgG was only noticed in the case of IgG<sub>2b</sub> IR 863 digested at pH 7.8 in carbonate or phosphate buffers (see Fig. 2). One line had an anodic mobility and reacted with an anti-Fc $\gamma$  antiserum. The other had a mobility slightly more cathodic than undigested IgG and did not react with an anti-Fc $\gamma$  antiserum.

IgG subclasses isolated from normal rat serum were also digested with *S. aureus* V8 proteinase. Three purified subclasses, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, and IgG<sub>2c</sub>,

and a fraction containing both IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> (in a ratio of about 1/1 as determined by single radial immunodiffusion with specific anti- $\gamma_{2a}$  and anti- $\gamma_{2b}$  antisera) were digested with *S. aureus* V8 proteinase in phosphate buffer, pH 7.8. The digestion products were analyzed in SDS-polyacrylamide electrophoresis (Fig. 3). Analysis in non-reducing conditions (Fig. 3) showed that a fragment of  $M_r$  105 000 was observed for the fraction con-

taining IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>. Other IgG subclasses seemed more or less uncleaved by *S. aureus* V8 proteinase. Analysis in reducing conditions (Fig. 3) showed that the fraction containing IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> not subjected to hydrolysis (lane 7) contained two  $\gamma$  heavy chains with different molecular weight: the first ( $M_r$  55 000) has the same molecular weight as  $\gamma_{2b}$  heavy chain from monoclonal IgG<sub>2b</sub>, while the second ( $M_r$  52 000) has the molec-

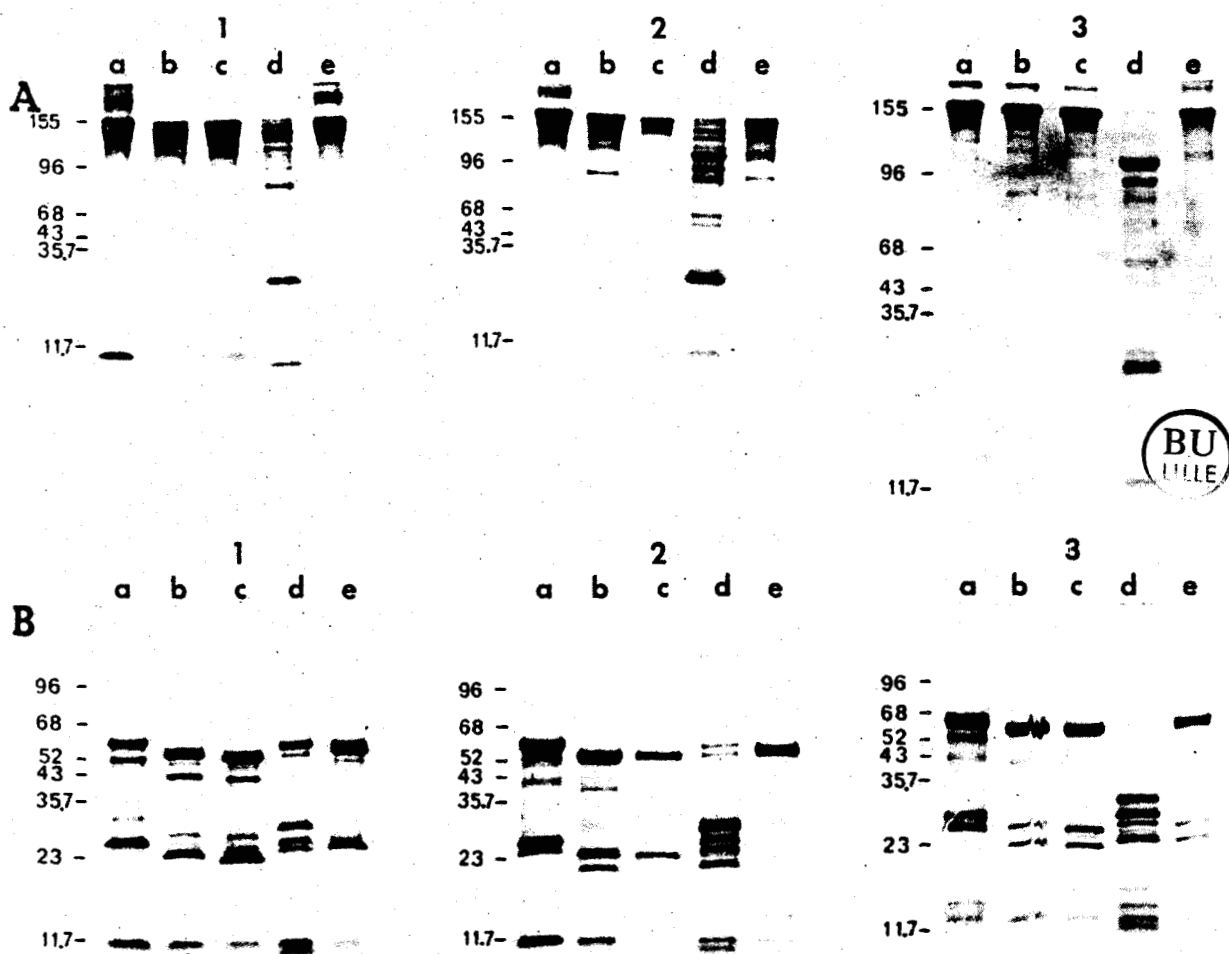


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of monoclonal rat IgG digested with *S. aureus* V8 proteinase. A. Unreduced samples. B. Samples reduced with 2-mercaptoethanol (final concentration 5%). (1) Digestion in 0.1 M ammonium acetate buffer pH 4.0; (2) digestion in 0.1 M ammonium bicarbonate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8; (3) digestion in 0.1 M sodium phosphate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8. a, IgG<sub>1</sub> IR 27; b, IgG<sub>2a</sub> IR 418; c, IgG<sub>2a</sub> IR 530; d, IgG<sub>2b</sub> IR 863; e, IgG<sub>2c</sub> IR 304. Numbers on the left indicate the position of molecular weight markers ( $\times 10^{-3}$ ): rat IgG ( $155 \cdot 10^3$ ); phosphorylase *b* ( $96 \cdot 10^3$ ); human serum albumin ( $68 \cdot 10^3$ ); ovalbumin ( $43 \cdot 10^3$ ); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( $35.7 \cdot 10^3$ ); cytochrome *c* ( $11.7 \cdot 10^3$ ).

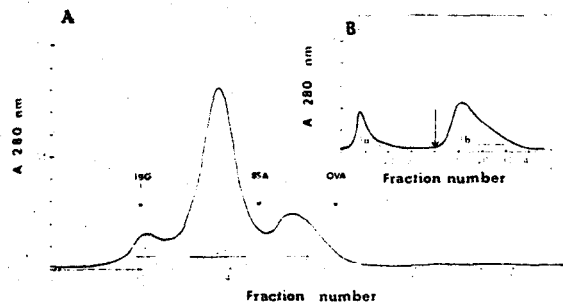
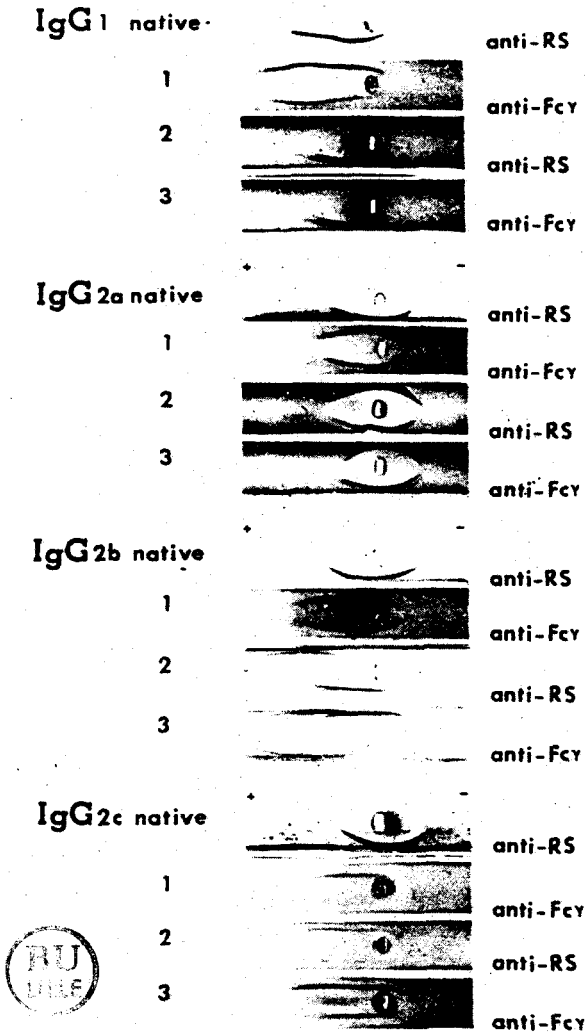


Fig. 4. Purification of fragments released from digestion of rat IgG<sub>2b</sub> IR 863 (50 mg) with *S. aureus* V8 proteinase in 0.1 M sodium phosphate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8. A. Gel filtration on Ultrogel Aca-44 column (2.6 × 90 cm) in 0.01 M sodium phosphate/0.15 M NaCl buffer, pH 7.4 (flow rate, 15 ml/h; volume of fractions, 5 ml). Arrows indicate the position of molecular weight markers. IgG, rat IgG<sub>2a</sub>; BSA, bovine serum albumin; OVA, ovalbumin. B. Purification of fraction 3 by DEAE-cellulose chromatography (column dimensions, 1.6 × 10 cm; flow rate, 15 ml/h; volume of fractions, 5 ml). Elution buffers: 0.01 M sodium phosphate, pH 7.8, followed by 0.2 M sodium phosphate, pH 6.8, at the point indicated by the arrow.

Fig. 2. Immunoelectrophoresis of monoclonal rat IgG (IgG<sub>1</sub> IR 27, IgG<sub>2a</sub> IR 530, IgG<sub>2b</sub> IR 863, IgG<sub>2c</sub> IR 304) digested with *S. aureus* V8 proteinase. (1) Digestion in 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 4.0; (2) digestion in 0.1 M ammonium carbonate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8; (3) digestion in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.8. Anti-RS: antiserum to rat serum proteins; anti-Fc $\gamma$ : antiserum to Fc of rat IgG.

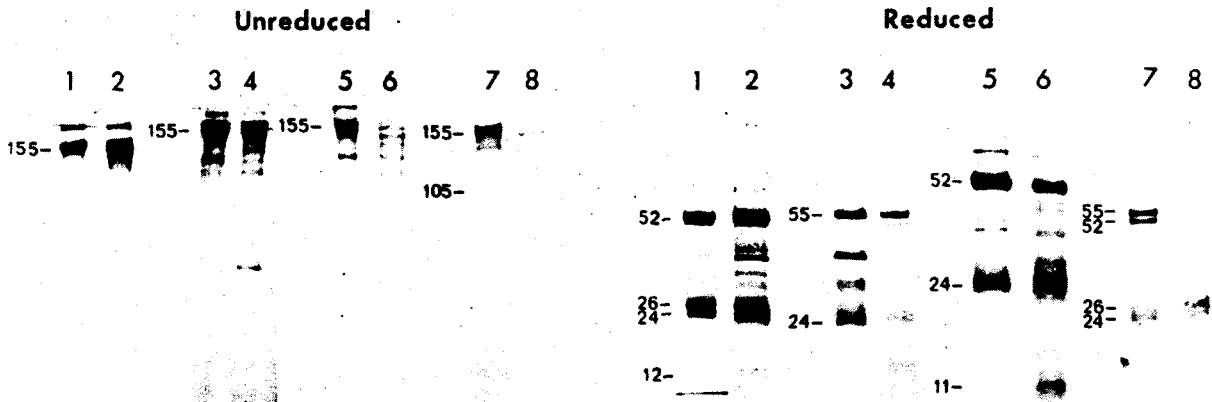


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of IgG fractions from normal rat serum after incubation with *S. aureus* V8 proteinase in 0.1 M sodium phosphate/0.002 M EDTA buffer, pH 7.8. Left, unreduced samples. Right, samples reduced with 2-mercaptoethanol (final concentration 5%). 1, native IgG<sub>1</sub>; 2, IgG<sub>1</sub> digested with *S. aureus* V8 proteinase; 3, native IgG<sub>2a</sub>; 4, IgG<sub>2a</sub> digested with *S. aureus* V8 proteinase; 5, native IgG<sub>2c</sub>; 6, IgG<sub>2c</sub> digested with *S. aureus* V8 proteinase; 7, fraction containing IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> (native); 8, fraction containing IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> digested with *S. aureus* V8 proteinase. Numbers on the left indicate the molecular weight ( $\times 10^{-3}$ ).

ular weight of  $\gamma_{2a}$  heavy chain. After digestion with *S. aureus* V8 proteinase, the heavy chain of  $M_r$  identical to  $\gamma_{2b}$  heavy chain had completely disap-

peared, while the heavy chain with  $M_r$  of  $\gamma_{2a}$  heavy chain remained (Fig. 3, lane 8). Taken together, these results suggested that in fractions containing

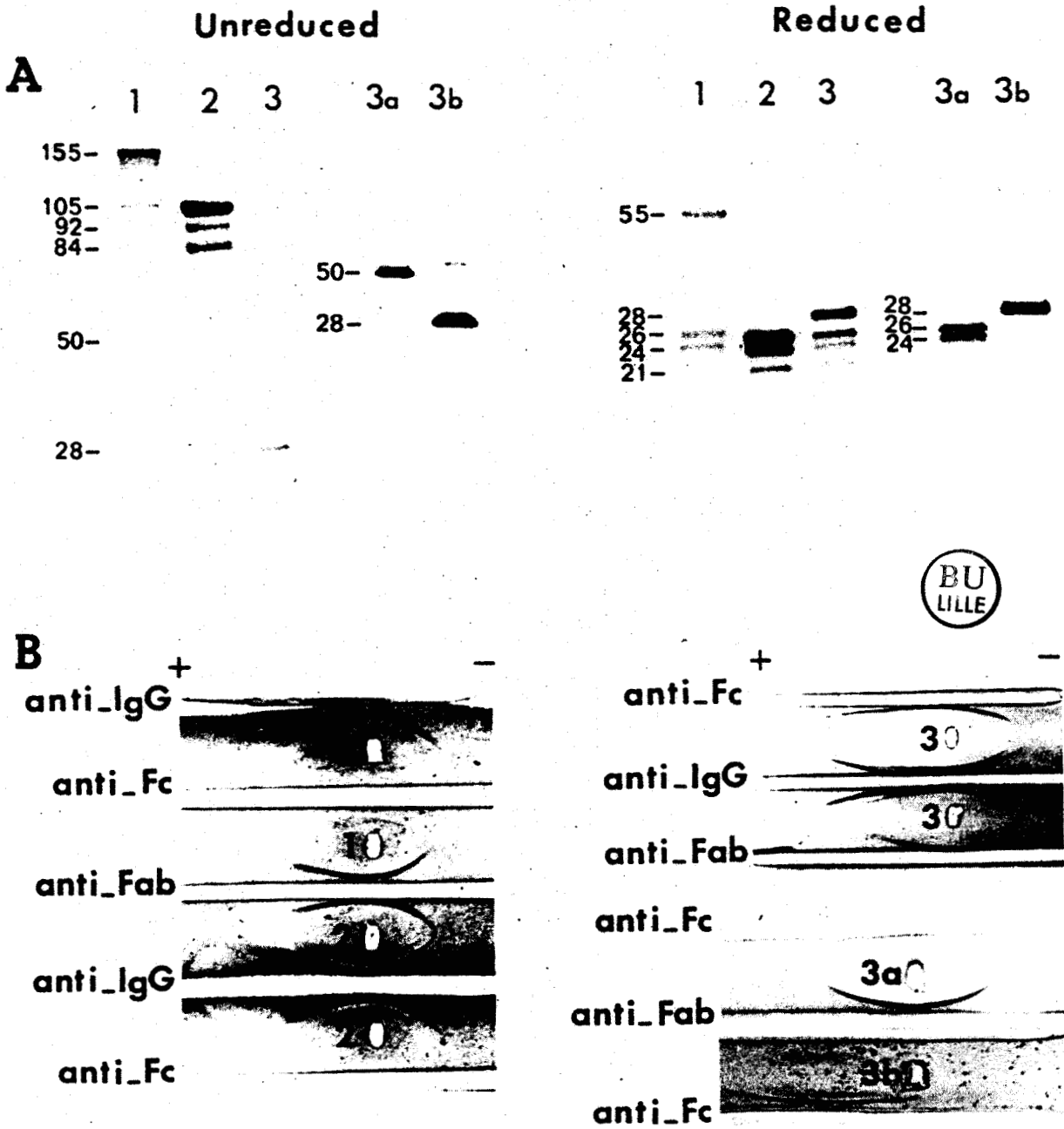


Fig. 5. Controls of the fragments obtained after purification of monoclonal IgG<sub>2b</sub> IR 863 digested with *S. aureus* V8 proteinase (refer to Fig. 4). A. Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS of fragments unreduced (left) or reduced with 2-mercaptoethanol (right). Numbers on the left indicate the molecular weights of the fragments ( $\times 10^{-3}$ ). B. Immunoelectrophoresis. Anti-IgG, antiserum to rat IgG (heavy and light chains); anti-Fc, antiserum to Fc of rat IgG; anti-Fab, antiserum to Fab of rat IgG.

both IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>. IgG<sub>2b</sub> is cleaved into a fragment with  $M_r$  105 000, i.e. identical in size to the fragment released from monoclonal IgG<sub>2b</sub>. However, it must be noticed that the fragment of  $M_r$  28 000 observed in the case of monoclonal IgG<sub>2b</sub> IR 863 (Fig. 1) does not seem to be released from normal IgG<sub>2b</sub>. Analysis in reducing conditions of IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2c</sub> subclasses digested with *S. aureus* V8 proteinase show the presence of fragments with low molecular weight (about 10 000) and in the case of IgG<sub>2a</sub> subclass a diminution of intensity of the light-chain component.

*Analysis of the fragments released by digestion of monoclonal IgG<sub>2b</sub>*

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of IgG digested with *S. aureus* V8 proteinase at pH 7.8 showed that IgG<sub>2b</sub> was the only subclass to be cleaved into two main fragments:  $M_r$  105 000 and 28 000. The nature of these fragments was investigated in more detail. Fig. 4A shows the elution profile obtained by gel filtration on Ultrogel AcA-44 of IgG<sub>2b</sub> IR 863 incubated with *S. aureus* V8 proteinase in phosphate buffer, pH 7.8. Three peaks were observed with apparent molecular weights 155 000, 103 000 and 62 000. Peak 1 represents undigested IgG as shown by controls in SDS-polyacrylamide gel and in immunoelectrophoresis (Fig. 5). Peak 2 was found to contain one main fragment ( $M_r$  105 000) and two minor ( $M_r$  92 000 and 84 000) when analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in non-reducing conditions (Fig. 5A). Analysis of peak 2 after reduction of disulfide bridges showed two main bands,  $M_r$  26 000 and 24 000 (light chain), and a minor one with  $M_r$  21 000 (Fig. 5A). Immunoelectrophoresis showed that peak 2 reacted with an anti-Fab antiserum, but not with an anti-Fc antiserum (Fig. 5B). Taken together, these results suggested that the main fragment ( $M_r$  105 000) present in peak 2 was an F(ab)<sub>2</sub>-like fragment, made up of two light chains associated to two Fd fragments ( $M_r$  26 000). SDS-polyacrylamide gel analysis of peak 3 in non-reducing conditions showed the presence of one main fragment ( $M_r$  28 000) and a minor ( $M_r$  50 000). In reducing conditions, one main band ( $M_r$  28 000) and three minor with  $M_r$  26 000, 24 000 (light chain) and 21 000 were noticed. Immunoelectrophoretic anal-

ysis of peak 3 showed two precipitation lines: one (anodic) reacted only with an anti-Fc antiserum, while the other (cathodic) reacted only with an anti-Fab antiserum (Fig. 5B). Purification of the two fragments present in peak 3 was achieved by DEAE-cellulose chromatography (see Fig. 4B). Two fractions (3a and 3b) were obtained. Fraction 3a has  $M_r$  50 000 in SDS-polyacrylamide and reacts only with an anti-Fab antiserum; fraction 3b has  $M_r$  28 000 in reducing and non-reducing conditions and reacts only with an anti-Fc antiserum (Fig. 5). Taken together, these results suggested that peak 3 contained two fragments: one minor ( $M_r$  50 000 in SDS-polyacrylamide) is an Fab-like fragment, while the other represents a non-covalent Fc, as its molecular weight was estimated as 62 000 by gel filtration but as 28 000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (both in reducing and non-reducing conditions).

#### Discussion

The main result from these studies is that, among monoclonal rat IgGs, those that belong to the IgG<sub>2b</sub> subclass were completely split by *S. aureus* V8 proteinase into two main fragments identified as F(ab)<sub>2</sub>-like and Fc-like fragments. An F(ab)-like fragment was also produced in low amounts. The cleavage was only complete when digestion was performed at pH 7.8 either in carbonate or in phosphate buffers, while incubation at pH 4.0 was not found to release F(ab)<sub>2</sub>- and Fc-like fragments. Indeed, analysis of digestion products obtained at pH 4.0 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed the release of a fragment with  $M_r$  28 000, but immunoelectrophoresis did not show evidence for F(ab)<sub>2</sub>- and Fc-like fragments. The three different buffers used for incubation with *S. aureus* V8 proteinase were chosen for two reasons: (1) the enzyme exhibits maximum activity at pH 4.0 and at pH 7.8; (2) specific cleavage of peptide bonds on the C-terminal side of glutamic acid is obtained by incubation either in acetate buffer, pH 4.0, or in carbonate buffer, pH 7.8, while cleavage of both aspartyl and glutamyl bonds is possible when digestion is performed in phosphate buffer pH 7.8 [16-18]. The result obtained for monoclonal IgG<sub>2b</sub> suggests that a glutamyl bond of the hinge region

is split by *S. aureus* V8 proteinase at pH 7.8, while this is not the case at pH 4.0. The absence of cleavage at pH 4.0 is probably not linked to differences in activity of *S. aureus* V8 proteinase at pH 4.0 and pH 7.8. In fact, Drapeau et al. [16] have shown that *S. aureus* V8 proteinase is more active at pH 4.0 than at pH 7.8. Differences in susceptibility to cleavage of IgG<sub>2b</sub> at pH 4.0 and pH 7.8 are more likely due to the existence of conformational changes at pH 4.0. Such modifications of conformation at acid pH have been observed for example for rabbit IgG [23].

The absence of cleavage in F(ab)<sub>2</sub> and Fc fragments in the case of monoclonal IgG of other subclasses suggests that IgG<sub>2b</sub> has a unique structural feature in its hinge region, i.e., a glutamic acid residue accessible to cleavage, this residue being absent in hinge regions of other IgG subclasses. Monoclonal IgG from IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2c</sub> subclasses showed minor cleavages by *S. aureus* V8 proteinase and the results of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis suggested that both heavy and light chains were split by the enzyme. Nevertheless, these cleavages were not found to be specifically related to a given subclass and did not seem to occur in the hinge region. The unique susceptibility of the IgG<sub>2b</sub> subclass found with monoclonal IgG was also observed with IgG<sub>2b</sub> from normal rat serum. Indeed, with a fraction from rat serum containing both IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>, only IgG<sub>2b</sub> was found to be split by *S. aureus* V8 proteinase with consequent production of F(ab)<sub>2</sub>-like fragments. However, an Fc-like fragment was not observed. The reasons for this discrepancy between monoclonal IgG<sub>2b</sub> and normal IgG<sub>2b</sub> are not clearly understood. It may be suggested that use of a lower enzyme-to-protein ratio in the case of the fraction containing IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> could lead to the production of an intact Fc fragment.

A comparative study of the cleavage of IgG subclasses by *S. aureus* V8 proteinase has not been reported for IgG of other species. Nevertheless, in mice, Oi and Herzenberg [24] and Oi et al. [25] have described the cleavage of monoclonal IgG<sub>2a</sub> by *S. aureus* V8 proteinase using digestion in a buffer containing SDS. Two fragments were released: one, designated F(ab')<sub>2</sub>, is similar in size to the F(ab)<sub>2</sub> fragment released from rat IgG<sub>2b</sub>; the other, designated F(abc)<sub>2</sub>, was not found in our study.

In conclusion, cleavage of monoclonal or normal IgG with *S. aureus* V8 proteinase offers an easy method for identification of IgG<sub>2b</sub> subclass. It also offers an easy procedure for preparation of F(ab)<sub>2</sub> fragments from monoclonal antibodies belonging to rat IgG<sub>2b</sub> subclass.

#### Acknowledgements

The helpful technical assistance of J. Herno, A.M. Mir and M.T. Picqué is gratefully acknowledged. These studies have been supported by CRL No. 80.30.28 INSERM and LA No. 268.04 CNRS.

#### References

- 1 Stanworth, D.R. and Turner, M.W. (1978) in Handbook of Experimental Immunology (Weir, D.M., ed.), Vol. 1, Immunochemistry, Ch. 6, Blackwell Scientific Publications
- 2 Jefferies, R., Weston, P.D., Stanworth, D.R. and Clamp, J.R. (1967) Nature (London) 219, 646-649
- 3 Gergely, J., Fudenberg, H.H. and Van Loghem, E. (1970) Immunochemistry 7, 1-6
- 4 Turner, M.W., Bennich, H.H. and Natvig, J.B. (1970) Clin. Exp. Immunol. 7, 603-625
- 5 Turner, M.W., Bennich, H.H. and Natvig, J.B. (1970) Clin. Exp. Immunol. 7, 627-640
- 6 Gorini, G., Medgyesi, G.A. and Doria, G. (1969) J. Immunol. 103, 1132-1142
- 7 Rousseaux, J., Biserte, G. and Bazin, H. (1980) Mol. Immunol. 17, 469-482
- 8 Butler, J.E. and Kennedy, N. (1978) Biochim. Biophys. Acta 535, 125-137
- 9 Micusan, V.V. and Borduas, A.G. (1975) Immunochemistry 12, 345-347
- 10 Medgyesi, G.A., Jakab, M., Csecsinagy, M. and Gergely, J. (1971) Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 405-414
- 11 Rousseaux, J., Rousseaux-Prévost, R., Bazin, H. and Biserte, G. (1981) Immunol. Lett. 3, 93-98
- 12 Turner, M.W., Komvopoulos, A., Bennich, H. and Natvig, J.B. (1972) Scand. J. Immunol. 1, 53-62
- 13 Virella, G. and Yeh, C.J.G. (1977) Experientia 33, 1231-1233
- 14 Hunneyball, I.M. and Stanworth, D.R. (1975) Immunology 29, 921-931
- 15 Hunneyball, I.M. and Stanworth, D.R. (1976) Immunology 30, 579-586
- 16 Drapeau, G.R., Boily, Y. and Houmard, J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6720-6726
- 17 Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3506-3509
- 18 Drapeau, G.R. (1977) Methods Enzymol. 47, 189-191
- 19 Bazin, H., Beckers, A. and Querinjean, P. (1974) Eur. J. Immunol. 4, 44-48
- 20 Rousseaux, J. and Bazin, H. (1979) Vet. Immunol. Immunopathol. 1, 61-78

212

- 21 Rousseaux, J., Picqué, M.T., Biserte, G. and Bazin, H. (1981) *Mol. Immunol.* 18, 639-645
- 22 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685
- 23 Stewart, G.A. and Stanworth, D.R. (1975) *Immunochemistry* 12, 713-721
- 24 Oi, V.T. and Herzenberg, L.A. (1979) *Mol. Immunol.* 16, 1005-1017
- 25 Oi, V.T., Bryan, V.M., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1980) *J. Exp. Med.* 151, 1260-1274



**PUBLICATION n° 5**

JIM 02813

## Optimal Conditions for the Preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> Fragments from Monoclonal IgG of Different Rat IgG Subclasses

J. Rousseaux, R. Rousseaux-Prévost and H. Bazin<sup>1</sup>

*Institut de Recherches sur le Cancer et Unité 124 de l'INSERM, BP 311, Place de Verdun, 59020 Lille Cédex, France and <sup>1</sup> Experimental Immunology Unit, University of Louvain, Clos-Chapelle-aux-Champs, 30-1200 Brussels, Belgium*

(Received 21 December 1982, accepted 23 May 1983)

The optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal rat IgG of different subclasses are described. Digestion of IgG for 2-4 h at 37°C with 1% (w/w) papain at pH 7.0 in the presence of 0.01 M cysteine leads to almost complete cleavage into Fab and Fc fragments. Fab fragments are isolated by sequential chromatography on Ultrogel AcA 44 and on DEAE-cellulose columns. In the case of IgG2c subclass, Fab fragment may be directly isolated by chromatography on Protein A-Sepharose. Production of F(ab')<sub>2</sub> fragments from rat IgG1 and IgG2a is obtained with best yield by treatment at acid pH (pH 2.8) before incubation with 1% (w/w) pepsin at pH 4.5 for 4 h at 37°C. For monoclonal IgG2b the best procedure is incubation with *S. aureus* V8 protease at pH 7.8 (4 h at 37°C with an E/S ratio of 1/30 (w/w)). The best yield of F(ab')<sub>2</sub> from monoclonal IgG2c is obtained by incubation for 4 h at 37°C with 1% (w/w) pepsin. F(ab')<sub>2</sub> fragments (or the F(ab)<sub>2</sub>-like fragment released by digestion of IgG2b with *S. aureus* V8 protease) are isolated by gel filtration on Ultrogel AcA 44.

---

**Key words:** rat - IgG subclasses - proteolytic cleavage

---

### Introduction

Preparations of F(ab')<sub>2</sub> or Fab fragments from IgG antibodies of defined specificities are sometimes needed, for example when non-specific binding of IgG antibodies to cellular surfaces of lymphocytes via Fc receptors must be avoided. Monoclonal IgGs from the rat differ in sensitivity to papain and pepsin and the differences relate to IgG subclass (Rousseaux et al., 1980). This paper extends previous observations and describes optimal conditions for preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of each of the four rat IgG subclasses: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c.

### Material and Methods

#### *Immunoglobulins*

Monoclonal rat IgG were isolated from ascites produced by LOU rat immuno-

cytomas using procedures previously described (Bazin et al., 1974; Rousseaux and Bazin, 1979).

#### *Enzyme digestion*

Digestion of IgG (10 mg/ml) with papain was performed in 0.075 M Na-phosphate, 0.075 M NaCl buffer, pH 7.0, containing 0.01 M cysteine. Mercuripapain (Sigma Chemical Co.), previously activated by dilution in the buffer containing cysteine, was added to the IgG solution to give an enzyme: protein ratio of 1% (w/w). After incubation for 2-4 h at 37°C, digestion was terminated by addition of iodoacetamide (final concentration, 0.015 M).

Digestion of IgG (10 mg/ml) with pepsin was performed in 0.1 M Na-acetate buffer, pH 4.5. Pepsin (Sigma Chemical Co.) was added to the IgG solution at a final enzyme:protein ratio of 1% (w/w). After incubation at 37°C, digestion was stopped by raising the pH to 8.0 with 0.1 M NaOH.

Digestion of monoclonal IgG2b with *S. aureus* V8 protease was performed in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.8 (Drapeau, 1977). *S. aureus* V8 protease (Miles Laboratories) was added to the IgG solution (10 mg/ml) to give a final enzyme: protein ratio of 1/30 (w/w). After 4 h incubation at 37°C, digestion was stopped by quickly freezing the solution.

#### *Purification of Fab and F(ab)<sub>2</sub> fragments*

The Fab fragment released by papain digestion of monoclonal IgG was purified in the case of IgG1, IgG2a and IgG2b subclasses by the following procedure: the enzyme digest was applied to an Ultrogel AcA 44 (IBF, France) column equilibrated in 0.01 M Na-phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4. The Fab peak obtained by gel filtration was further purified by chromatography on DEAE-cellulose (DE 32, Whatman) equilibrated in 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 7.8. The column was successively eluted with the equilibration buffer; 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 6.8; 0.05 M Na-phosphate buffer, pH 6.8 and 0.2 M Na-phosphate buffer, pH 6.8. Purification of the Fab fragment from rat IgG2c was by chromatography on a Protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) column equilibrated in 0.14 M Na-phosphate, pH 8.0. Elution was first with the equilibration buffer, then with 0.1 M Na-citrate buffer, pH 6.0 followed by 0.1 M Na-citrate buffer, pH 3.0.

Purification of the F(ab')<sub>2</sub> fragment released by pepsin digestion or of the F(ab)<sub>2</sub>-like fragment released by digestion of monoclonal IgG2b with *S. aureus* V8 protease was by chromatography on Ultrogel AcA 44 columns equilibrated in 0.01 M Na-phosphate, 0.15 M NaCl buffer, pH 7.4.

#### *Miscellaneous*

Immunoelectrophoreses and polyacrylamide gel electrophoresis in SDS were performed essentially as described previously (Rousseaux et al., 1980).

## Results and Discussion

### *Preparation of papain Fab fragments*

Digestion of monoclonal IgG of different subclasses with 1% (w/w) papain in the presence of 0.01 M cysteine leads to an almost complete cleavage of IgG into Fab and Fc fragments after incubation for 2-4 h at 37°C. In the case of monoclonal IgG1, IgG2a and IgG2b, gel filtration on Ultrogel AcA 44 of the papain digest shows two main peaks besides some undigested or partially digested material (Fig. 1A). The first peak represents Fc while the second represents Fab. The Fab fragment partially purified by the gel filtration step is completely purified by chromatography on a DEAE-cellulose column equilibrated in 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 7.8. The Fab is eluted either with the equilibration buffer or in some cases with 0.01 M or 0.05 M Na-phosphate buffer, pH 6.8. The Fc fragment contaminating the Fab peak obtained by gel filtration, is eluted by 0.2 M Na-phosphate buffer, pH 6.8 (Fig. 1B). The Fab fragment released from monoclonal IgG2a has a mol.wt. of 48,000 and the Fc fragment a mol.wt. of 27,000 on SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

In the case of IgG2c, a subclass that has high affinity for protein A (Medgyesi et al., 1978; Rousseaux et al., 1980), the Fab is better purified by chromatography on Protein A-Sepharose. The Fab fragment is eluted from the column at pH 8.0 while Fc and undigested IgG are eluted at pH 6.0 and pH 3.0 (data not shown).

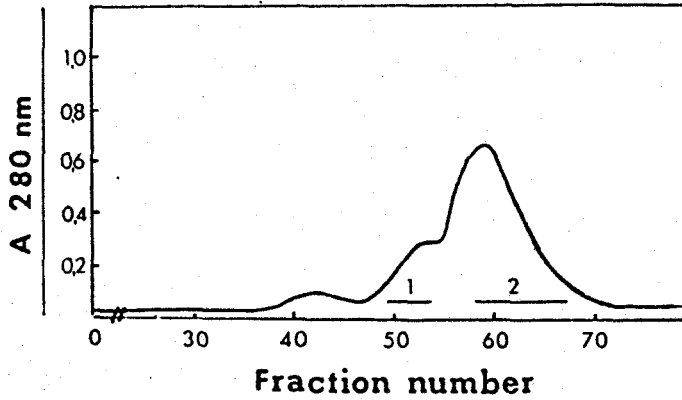
### *Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments*

As rat IgG subclasses differ significantly in their sensitivity to pepsin digestion, the optimal conditions for digestion differ between subclasses.

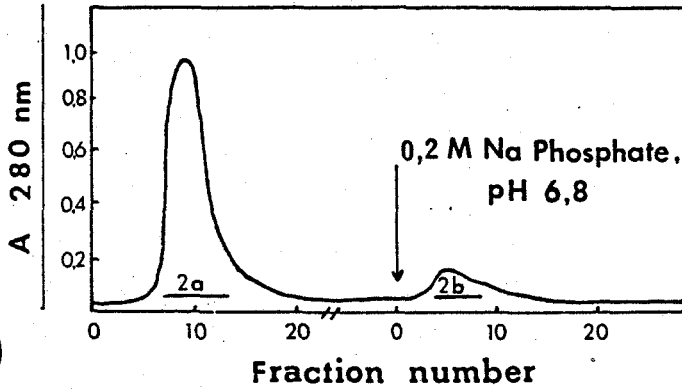
Rat IgG1 and to a lesser extent IgG2a are resistant to pepsin cleavage (Rousseaux et al., 1980), even when in the case of IgG1, higher enzyme:protein ratios are used. The use of higher protein concentration (30 mg/ml instead of 10 mg/ml) did not improve the yield of F(ab')<sub>2</sub>, although it has been reported successful for bovine IgG (Wie et al., 1978). Fig. 2 shows that even after 18 h incubation with 1% (w/w) pepsin, a large amount of undigested material is present. For monoclonal IgG2a, the use of a higher enzyme:protein ratio (5% instead of 1%) improved the yield of F(ab')<sub>2</sub> (see Fig. 2, lanes 7 and 8). Such results for IgG2a subclass are reminiscent of those of Williams (1975) and of Winearis et al. (1979). These authors used pepsin cleavage at a high enzyme:protein ratio (4%) but also at a slightly more acidic pH (pH 4.2 instead of pH 4.5 in our study). Under these conditions they observed complete cleavage (after 18 h at 37°C) of rat IgG2. This was probably mainly IgG2a, the major IgG2 subclass. We found that complete cleavage into F(ab')<sub>2</sub> was obtained if IgG1 and IgG2a were previously incubated at acid pH (pH 2.8) as reported by Stewart and Stanworth (1975) for rabbit IgG. The direct acidification of IgG solutions to pH 2.8 by addition of 0.5 M HCl as proposed by Stewart and Stanworth (1975) was not found successful in the case of monoclonal rat IgG1, since it led to the formation of highly insoluble material that could not be dissolved at higher pH. We found that the best method was to dialyze the IgG (15 mg/ml) for 16 h at 4°C against 0.1 M Na-formate buffer, pH 2.8, then against 0.1 M Na-acetate buffer, pH 4.5 and then to adjust the protein concentration to 10 mg/ml before pepsin

144

A



B



M.W.  $\times 10^{-3}$  2a 2b

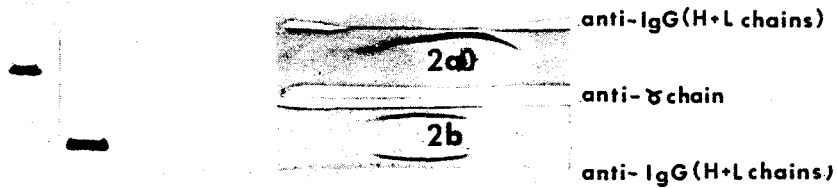


Fig. 1. Purification of Fab fragment released by papain digestion of monoclonal IgG2a (IR 530). A: Gel filtration on Ultrogel Aca 44 (column dimensions: 2.5 cm  $\times$  90 cm; flow rate: 15 ml/h; volume of fractions: 5 ml; buffer: 0.01 M Na-phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) of 50 mg IgG2a IR 530 digested with papain for 2 h at 37°C. Peak 1: Fc fragment; peak 2: Fab fragment. B: Purification of peak 2 (Fab fragment) by DEAE-cellulose chromatography (column dimensions: 2 cm  $\times$  15 cm; flow rate: 15 ml/h; volume of fractions: 5 ml). Peak 2a represents purified Fab; peak 2b represents Fc (see controls on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoelectrophoresis).

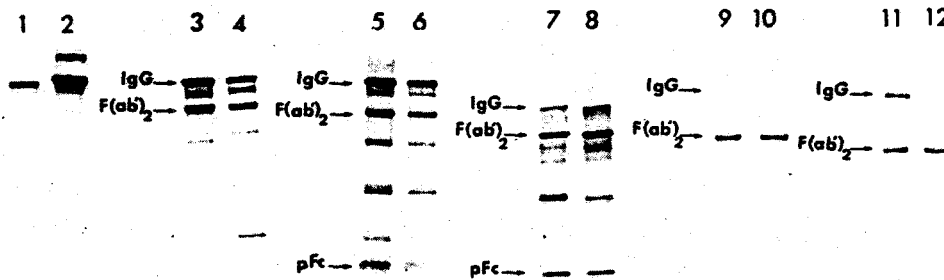


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide) of peptic digests of monoclonal IgG1 IR 27 and IgG2a IR 530. 1: Undigested IgG1 IR 27. 2: Undigested IgG2a IR 530. 3 and 4: IgG1 IR 27 digested with 1% (w/w) pepsin for 4 h and 18 h respectively. 5 and 6: IgG2a IR 530 digested with 1% (w/w) pepsin for 4 h and 18 h respectively. 7 and 8: IgG2a IR 530 digested with 5% (w/w) pepsin for 4 h and 18 h respectively. 9 and 10: IgG1 IR 27 digested with 1% pepsin (w/w) for 2 h and 4 h respectively, after preincubation at pH 2.8. 11 and 12: IgG2a IR 530 digested with 1% (w/w) pepsin for 2 h and 4 h respectively after preincubation at pH 2.8.

digestion. As shown in Fig. 2 the use of such a procedure leads to almost complete cleavage into  $F(ab)_2$ , without formation of other fragments, after 4 h incubation at 37°C with 1% (w/w) pepsin. Acid pH modifies the Fc conformation of IgG, probably affecting the conformation of the  $C\gamma_2$  domain (Stewart and Stanworth.

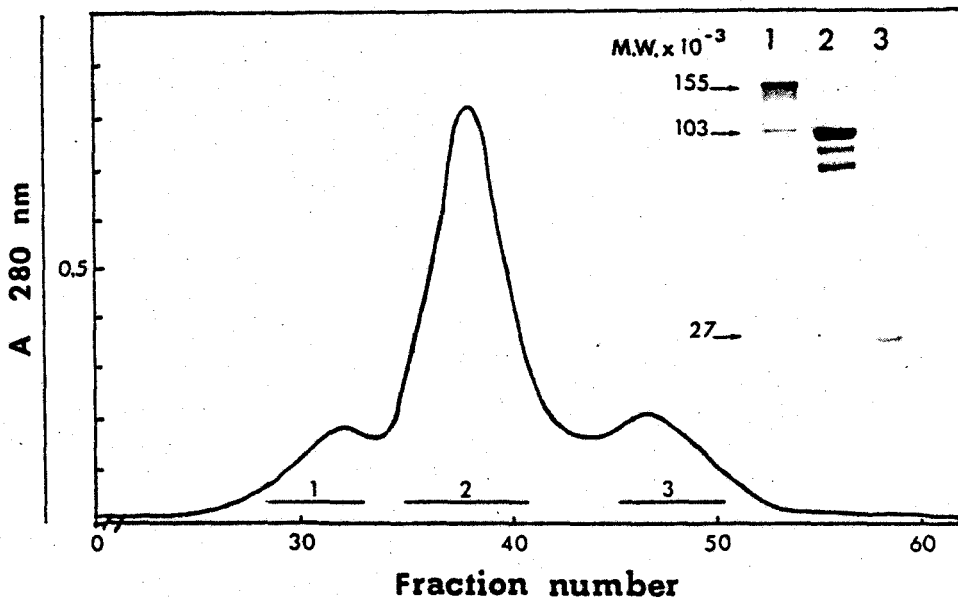


Fig. 3. Gel filtration on Ultrogel AcA 44 (column dimensions: 2.5 cm x 90 cm; flow rate: 15 ml/h; volume of fractions: 5 ml; buffer: 0.01 M Na-phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) of 50 mg monoclonal IgG2b IR 863 digested with *S. aureus* V8 protease. Peak 1, undigested material; peak 2,  $F(ab)_2$ -like fragment; peak 3, Fc-like fragment (see controls on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis).



1975; Stewart et al., 1977) and the contacts between the  $C\gamma_2$  and  $C\gamma_3$  domains (Ellerson et al., 1976). Such conformational changes are not completely reversed on return to a higher pH and therefore modify the sensitivity of  $C\gamma_2$  domains to proteolysis. For example, Stewart and Stanworth (1975) have shown that acid pH treatment renders rabbit IgG more sensitive to pepsin, papain and trypsin with, in all cases, production of an  $F(ab)_2$ -like fragment.

Proteins of IgG2b subclass are more sensitive to pepsin than IgG1 and IgG2a. Short digestion (4 h), however, gives a mixture of undigested IgG and  $F(ab')_2$ , while longer digestion (18 h) gives a mixture of  $F(ab')_2$  and a smaller fragment, probably  $F(ab')$  (Rousseaux et al., 1980). Digestion with *S. aureus* V8 protease provides an alternative to pepsin cleavage in the case of IgG2b. IgG2b is cleaved by *S. aureus* V8 protease into an  $F(ab)_2$ -like fragment and an Fc-like fragment. This sensitivity to *S. aureus* V8 protease is unique to the IgG2b subclass (Rousseaux et al., manuscript in preparation). The  $F(ab)_2$ -like fragment is isolated by gel filtration on Ultrogel Aca 44 (Fig. 3) and has a mol.wt. of about 103,000 daltons.

The IgG2c subclass is the most sensitive to pepsin cleavage. IgG2c is split into  $F(ab')_2$  and pFc fragments, but with time progressive conversion of  $F(ab')_2$  to  $F(ab')$  is observed (Rousseaux et al., 1980). A digestion time of 4 h at 37°C with 1% (w/w) pepsin is thus optimal for the production of  $F(ab')_2$ . With this incubation time, complete cleavage of IgG2c to  $F(ab')_2$  and pFc is obtained without noticeable production of  $F(ab')$ .

#### Acknowledgements

The technical assistance of J. Herno, A.M. Mir and M.T. Picqué is gratefully acknowledged. This work was supported by CRL No. 80-30-28 INSERM and LA 268-04 CNRS.

#### References

- Bazin, H., A. Beckers and P. Querinjean, 1974, *Eur. J. Immunol.* 4, 44.
- Drapeau, G.R., 1977, *Methods Enzymol.* 47, 189.
- Ellerson, J.R., D. Yasmeeen, R.H. Painter and K.J. Dorrington, 1976, *J. Immunol.* 116, 510.
- Medgyesi, G.A., G. Füst, J. Gergely and H. Bazin, 1978, *Immunochemistry* 15, 125.
- Rousseaux, J. and H. Bazin, 1979, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1, 61.
- Rousseaux, J., G. Biserte and H. Bazin, 1980, *Mol. Immunol.* 17, 469.
- Stewart, G.A. and D.R. Stanworth, 1975, *Immunochemistry* 12, 713.
- Stewart, G.A., and P.M. Johnson, M.W. Barrett, P.M. Scopes and D.R. Stanworth, 1977, *Immunochemistry* 14, 263.
- Wie, S.I., K.J. Dorrington and A. Froese, 1978, *J. Immunol.* 121, 98.
- Williams, A.F., 1975, *Eur. J. Immunol.* 5, 883.
- Winearls, C.G., J.W. Fabre, P.R. Millard and P.J. Morris, 1979, *Transplantation* 28, 36.

L'étude immunochimique des sous-classes d'IgG du Rat a été entreprise avec trois objectifs principaux :

1° Elle constitue une approche complémentaire à celle utilisant les antisérums monospécifiques pour caractériser la nature de la sous-classe d'IgG à laquelle appartient un anticorps obtenu après immunisation ou un anticorps monoclonal. Nous avons donc essayé d'établir des méthodes simples pour identifier les sous-classes d'IgG du Rat par leurs caractères immunochimiques.

2° L'existence de différences immunochimiques entre sous-classes d'IgG peut être mise à profit pour séparer certaines sous-classes à partir du sérum.

3° La connaissance de l'action de différents enzymes protéolytiques permet de définir les conditions optimales pour la préparation de fragments doués d'activité biologique, c'est-à-dire, soit la fixation de l'antigène : Fab et  $F(ab')_2$  (fonction primaire), soit exprimant les fonctions secondaires de l'immunoglobuline : fragments Fc et pFc' principalement.

Trois points ont été plus particulièrement étudiés :

- 1° Le poids moléculaire des chaînes lourdes gamma,
- 2° L'action des agents réducteurs sur les ponts disulfure inter-chaînes,
- 3° L'action des différents enzymes protéolytiques : papaïne, pepsine, trypsine, protéase V8 de S. aureus.

Nous verrons comment les différences immunochimiques observées ont pu être utilisées :

- pour mettre au point un typage chimique des sous-classes d'IgG,
- pour définir les conditions optimales de préparations de fragments issus de la protéolyse enzymatique.

Auparavant, nous décrirons succinctement les méthodes de préparation des immunoglobulines monoclonales utilisées pour ces études.



## A - METHODES D'ISOLEMENT DES IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES APPARTENANT AUX DIFFERENTES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT

Les immunoglobulines monoclonales du Rat ont été isolées à partir des ascites ou sérums de Rat LOU/M portant des tumeurs (immunocytomes, ou dans certains cas, hybridomes). Les détails concernant la transplantation des tumeurs, le recueil des sérums ou ascites, ainsi que les détails techniques des purifications sont indiqués dans l'appendice technique et la publication n° 1. Nous nous contenterons ici de résumer brièvement les protocoles de fractionnement. La plupart comporte essentiellement deux étapes :

- la précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation,
- le fonctionnement sur colonne d'échangeurs d'anion, type DEAE-cellulose (Whatman), DEAE-Séphacel (Pharmacia) ou, d'utilisation plus commode, DEAE-Trisacryl M (IBF).

Ces deux étapes suffisent généralement pour purifier les IgG2a et IgG2b monoclonales (voir figure 19). La purification d'IgG1 monoclonales nécessite une étape complémentaire de filtration sur gel d'Ultrogel AcA 34 (IBF) pour éliminer les  $\beta$  globulines, (principalement la transferrine) (figure 20). Une purification sur colonne de protéine A - Sépharose peut également être réalisée (pour les détails techniques, voir chapitre IV). Les  $\beta$  globulines ne sont pas retenues sur une colonne de protéine A-Sépharose équilibrée à pH 8. Une faible partie de l'IgG1 est également éluée à ce pH, mais la majorité est éluée par un tampon de pH 6.

L'isolement des IgG2c monoclonales présentait plus de difficultés. En effet, ces protéines sont en général à un taux faible dans les ascites et sérums des animaux porteurs de tumeurs. De plus, elles ont des euglobulines, qui précipitent donc dans les solutions salines diluées. De ce fait, leur purification par chromatographie sur échangeurs d'anions, type DEAE-cellulose, se révélait impossible car elles précipitent dans les tampons de faible molarité et ne sont éluées que par des concentrations salines qui éluent également les  $\beta$  globulines. BAZIN et al. (1974) et MEDGYESI et

al. (1978, 1980) ont proposé une technique d'isolement comportant une précipitation des IgG2c par l'eau distillée ou l'acide borique à 0,5 %. Ces techniques ne nous ont pas donné de résultat satisfaisant, en particulier pour les ascites présentant des taux faibles d'IgG2c monoclonales. Nous avons développé un protocole original comportant deux étapes principales (figure 21) :

1° Une précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation,

2° Une chromatographie sur échangeurs de cations CM-cellulose (Whatman) ou CM-Trisacryl (IBF) en tampon acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2.

Cette chromatographie a plusieurs avantages :

- les IgG2c sont solubles dans le tampon acétate, pH 4,2
- l'utilisation en gradient discontinu de molarité en NaCl (molarité 0,1 M et 0,2 M), permet d'obtenir l'élution en dernier de l'IgG2c monoclonale.

La contamination éventuelle de la préparation d'IgG2c monoclonale par de l'IgG2a peut être éliminée par chromatographie sur protéine A-Sépharose (pour les détails techniques, voir le chapitre IV). L'IgG2a est éluée par un tampon de pH 8. L'IgG2c monoclonale est éluée par l'utilisation d'un tampon de pH 6 ou de pH 3.

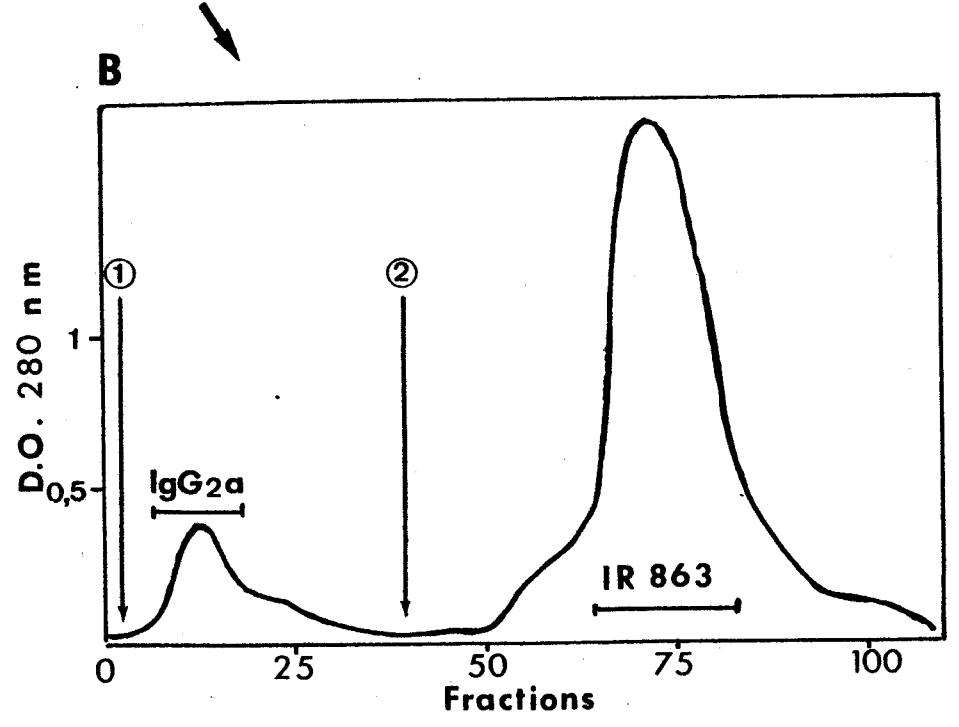
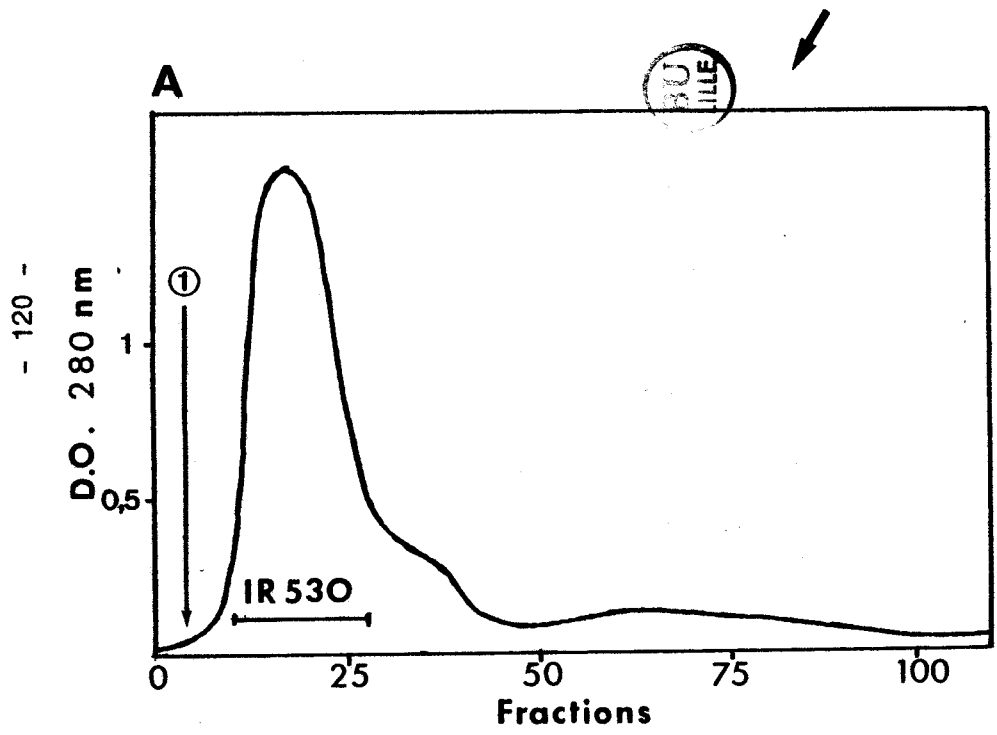
#### B - ETUDE DU POIDS MOLECULAIRE DES CHAINES LOURDES : $\gamma$ 1, $\gamma$ 2a, $\gamma$ 2b, $\gamma$ 2c

Nous avons observé, lors de contrôles d'IgG monoclonales purifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, l'existence de différences de poids moléculaire entre leurs chaînes lourdes  $\gamma$ . Une étude systématique réalisée sur plusieurs IgG monoclonales a montré qu'il existait une relation entre ces différences et la nature de la sous-classe. Ces différences ont été également observées pour des IgG isolées du sérum de rat. Nous avons essayé de déterminer dans quelle partie de la chaîne  $\gamma$  était localisée la différence de poids moléculaire.

Figure 19.- Représentation schématique de la purification de l'IgG2a monoclonale IR 530 (A) et de l'IgG2b monoclonale IR 863 (B). Après précipitation par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation et équilibration du précipité par chromatographie sur Trisacryl GF 05, les IgG monoclonales sont purifiées par chromatographie sur DEAE-Cellulose ou DEAE-Trisacryl M (colonne 3 x 30 cm ; débit : 30 ml/h ; volume des fractions : 5 ml).

A : Elution par le tampon ① : Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8.  
B : Elution par le tampon ① : Tris-HCl 0,05 M, pH 8, puis le tampon ② : Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8.

ASCITE  
 ↓  
 $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  40% pH 7,0  
 ↓  
 Trisacryl GF O5  
 en Tp Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0  
 ↓  
 DEAE-Cellulose ou DEAE-Trisacryl M  
 en Tp Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0

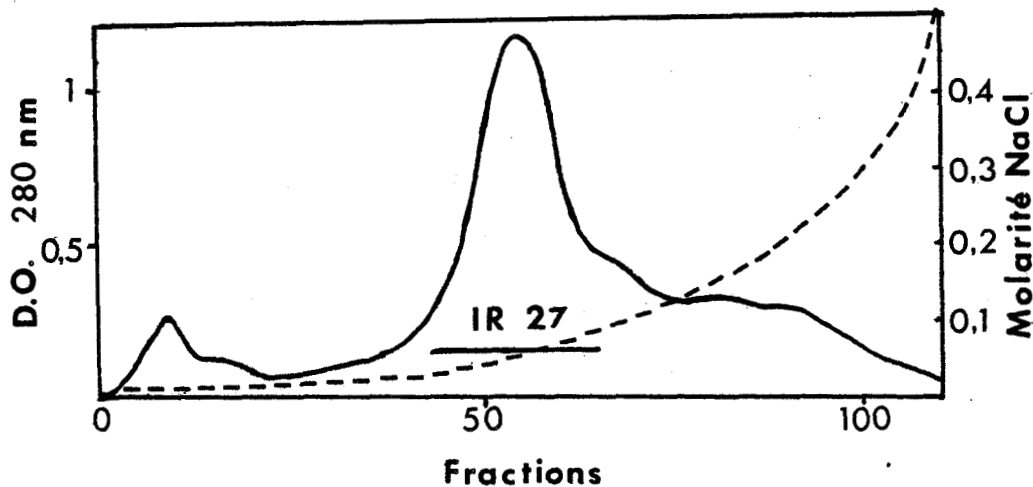


ASCITE

SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 40%, pH 7,0

Trisacryl GFO5  
en Tp Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0

DEAE-Cellulose



Ultrogel ACA 34

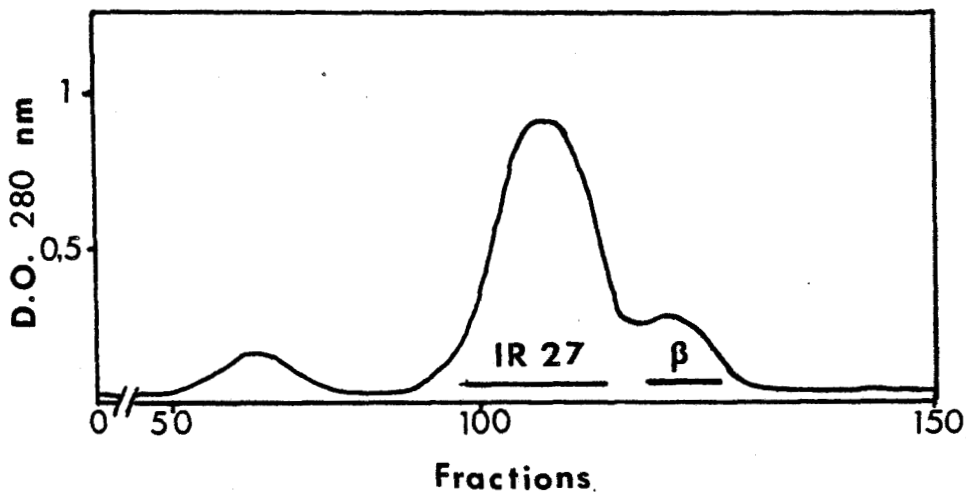


Figure 20.- Représentation schématique de la purification de l'IgG1 monoclonale IR 27. Après précipitation de l'ascite par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation et équilibration du précipité (par chromatographie sur Trisacryl GF05) en tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8, la purification est réalisée par chromatographie sur DEAE-Cellulose (colonne 3 x 30 cm ; débit : 30 ml/h ; volume des fractions : 5 ml ; élution par un gradient de molarité en NaCl), puis par chromatographie sur Ultrogel Aca 34 qui sépare l'IR 27 des β-globulines (β) (colonne : 2,6 x 190 cm ; débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml).

ASCITE

SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 40%, pH 7,0

Phosphate de Na 0,01 M,  
NaCl 0,35M, pH 7,4

Trisacryl GF 05  
en Tp Acétate de Na 0,2M, pH 4,2

CM - Trisacryl

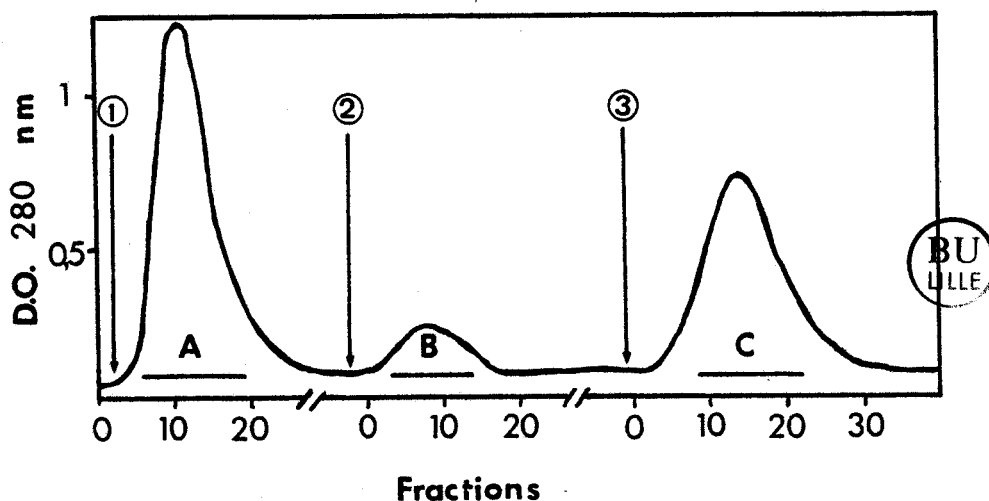


Figure 21.- Représentation schématique de la purification de l'IgG2c monoclonale IR 304. L'ascite est précipitée par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation ; le précipité est dialysé contre le tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,35 M, pH 7,4 puis est équilibré contre le tampon acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2 (chromatographie sur Trisacryl GF 05). La chromatographie sur CM-Trisacryl (colonne 3 x 30 cm ; débit : 30 ml/h ; volume des fractions : 10 ml), comporte l'élution par 3 tampons : 1 : acétate de Na 0,2 M, pH 4,2 ; 2 : acétate 0,2 M, NaCl 0,1 M, pH 4,2 ; 3 : acétate 0,2 M, NaCl 0,2 M, pH 4,2. La fraction A contient des  $\beta$ -globulines et des IgG1 et IgG2a ; la fraction B contient de l'IgG2a ; la fraction C contient l'IgG2c monoclonale IR 304 et une proportion variable d'IgG2a (en général moins de 10 %).

## 1. POIDS MOLECULAIRE DES CHAINES LOURDES $\gamma$ 1, $\gamma$ 2a, $\gamma$ 2b et $\gamma$ 2c

La figure 22 montre un exemple de séparation par électrophorèse en gel d'acrylamide - SDS (concentration d'acrylamide 7,5 %), d'IgG monoclonales de sous-classe IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c (réduites par le mercapto-éthanol 5 %). On observe que les chaînes  $\gamma$  1 et  $\gamma$  2b ont un poids moléculaire apparent de 55 000 daltons alors que les chaînes lourdes  $\gamma$  2a et  $\gamma$ 2c ont un poids moléculaire de 52 000 daltons.

Le tableau 4 indique les poids moléculaires obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS à différentes concentrations d'acrylamide (5 à 15 %), pour des IgG monoclonales de sous-classes IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. L'utilisation de différentes concentrations d'acrylamide permet de déterminer le poids moléculaire réel des glycoprotéines. En effet, celles-ci ont la propriété de fixer moins de SDS que les holo-protéines, ce qui entraîne une mobilité plus faible en électrophorèse à des faibles concentrations d'acrylamide (par exemple 5 %) (SEGREST et al., 1971 ; SEGREST et JACKSON, 1972). L'utilisation d'une représentation graphique  $1/\text{poids moléculaire apparent}$  en fonction de  $1/\text{concentration en acrylamide}$  ( $1/A$ ) permet de déterminer une droite dont l'extrapolation à  $1/A = 0$  correspond à  $1/\text{poids moléculaire réel}$  (SEGREST et JACKSON, 1972 ; WARD et DOPHEIDE, 1976). La figure 23 montre les résultats obtenus pour les chaînes lourdes  $\gamma$  1,  $\gamma$  2a,  $\gamma$  2b et  $\gamma$  2c. Les chaînes  $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2b ont donc un poids moléculaire de l'ordre de 2 000 à 3 000 daltons supérieur à celui des chaînes  $\gamma$ 2a et  $\gamma$  2c. Ces différences de poids moléculaires ont également été observées pour des sous-classes d'IgG isolées de sérum de Rat par chromatographie sur protéine A-Sépharose ou par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir chapitre IV).

## 2. LOCALISATION DANS LA CHAINE DES DIFFERENCES DE POIDS MOLECULAIRES OBSERVEES POUR LES CHAINES $\gamma$ 1, $\gamma$ 2a, $\gamma$ 2b et $\gamma$ 2c

Pour déterminer dans quelle partie de la chaîne  $\gamma$  étaient localisées les différences de poids moléculaires observées, nous avons utilisé la

Figure 22.- Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (acrylamide 7,5 %) d'IgG1 (1), IgG2a (2a), IgG2b (2b) et IgG2c (2c) monoclonales réduites par le mercaptoéthanol 5 %. Les chiffres sur la gauche indiquent le poids moléculaire ( $\times 10^{-3}$ ) des chaînes  $\gamma$  des IgG1 et IgG2a. Les chiffres sur la droite indiquent les poids moléculaires ( $\times 10^{-3}$ ) des chaînes  $\gamma$  des IgG2b et IgG2c.  
L : chaînes légères.



TABLEAU 4.-



POIDS MOLECULAIRE APPARENT DES CHAINES LOURDES  $\gamma$  D'IGG MONOCLONALES DE SOUS-CLASSES IgG1, IgG2a, IgG2b ET IgG2c DE RAT

(Résultats exprimés en kilodaltons sous forme de moyenne  $\pm$  un écart type des déterminations réalisées sur un même gel d'acrylamide pour différentes IgG monoclonales d'une même sous-classe).

SOUS-CLASSES D' IgG	IgG MONOCLONALES TESTEES	POIDS MOLECULAIRE APPARENT A LA CONCENTRATION D'ACRYLAMIDE (%)				
		5	7,5	10	12,5	15
IgG1	IR 27, IR 595, IR 766	54,8 $\pm$ 0,2	55,1 $\pm$ 0,3	55 $\pm$ 0,2	51,8 $\pm$ 0,2	52,1 $\pm$ 0,15
IgG2a	IR 33, IR 418, IR 530	51,8 $\pm$ 0,3	51,8 $\pm$ 0,3	51,5 $\pm$ 0,5	48,2 $\pm$ 0,4	48,7 $\pm$ 0,4
IgG2b	IR 863	55	54,5	55	51,5	52
IgG2c	IR 304, IR 558, IR 769	51,7 $\pm$ 0,4	51,6 $\pm$ 0,3	51,3 $\pm$ 0,6	50,8 $\pm$ 0,2	49,6 $\pm$ 0,5

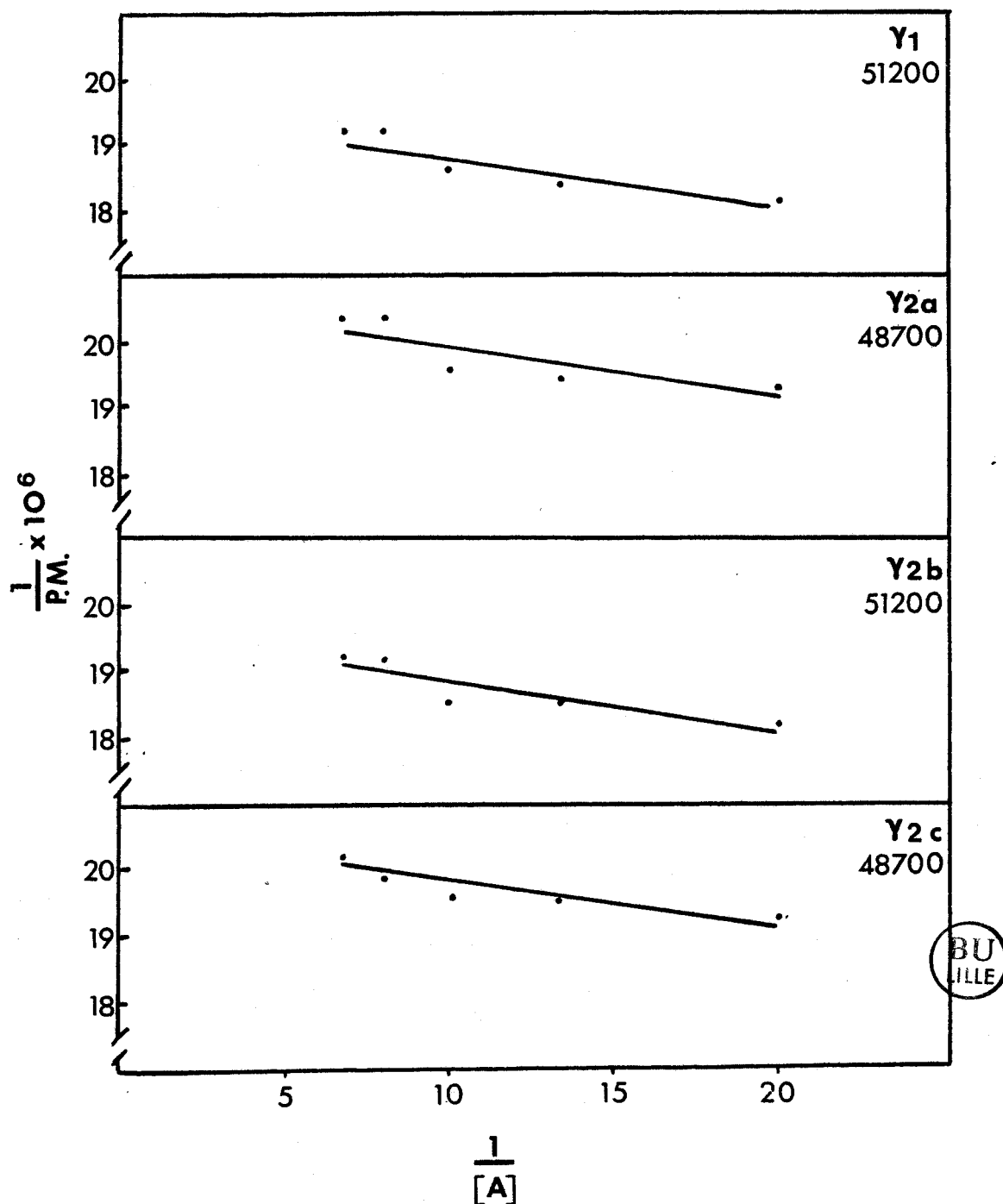


Figure 23.- Représentation schématique de la variation du poids moléculaire apparent (P.M.) des chaînes lourdes  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2a$ ,  $\gamma_2b$  et  $\gamma_2c$  en fonction de la concentration en acrylamide ( $[A]$ ) utilisée pour l'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. La représentation  $\frac{1}{P.M.} \times 10^6$  en fonction de  $\frac{1}{[A]}$  permet selon Segrest et Jacobson (1972) de déterminer le poids moléculaire réel en extrapolant à  $\frac{1}{[A]} = 0$ . Le poids moléculaire des chaînes  $\gamma_1$  et  $\gamma_2b$  ainsi déterminé est de 51 200 daltons ; celui des chaînes  $\gamma_2a$  et  $\gamma_2c$  de 48 700 daltons.

BU  
LILLE

comparaison de divers fragments issus de la protéolyse enzymatique. Le Fd, provenant du Fab obtenu par action de la papaïne contient les domaines  $V_H$ ,  $C\gamma 1$  et le début de la région charnière ; le Fd', provenant du  $F(ab')_2$  obtenu par action de la pepsine, contient le  $V_H$ , le  $C\gamma 1$  et la région charnière ; le Fc non covalent, obtenu par action de la papaïne sur les IgG1, IgG2a et IgG2b (voir paragraphe D du même chapitre), correspond aux domaines  $C\gamma 2$  et  $C\gamma 3$ . La figure 24 montre la séparation obtenue par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS en milieu réducteur de fragments  $F(ab')_2$  et Fab d'IgG1, IgG2a et IgG2b monoclonales. Les poids moléculaires des Fd' d'IgG1 et d'IgG2b sont 26 000 daltons, celui du Fd' d'IgG2a est 23 000 daltons. De même, les Fd d'IgG1 et d'IgG2b ont un poids moléculaire 26 000 daltons contre 23 000 daltons pour le Fd d'IgG2a. A l'inverse, les Fc des IgG1, IgG2a et IgG2b ne présentent pas de différences très significatives (28 000 daltons pour l'IgG1 et l'IgG2b, 27 000 pour IgG2a) (résultats non présentés). La figure 25 résume les résultats obtenus en replaçant les différents fragments dans la structure de l'IgG. On peut donc considérer que les différences de poids moléculaires observées sont vraisemblablement localisées dans la partie de la molécule correspondant aux domaines  $V_H$  et  $C\gamma 1$ . Dans le cas des IgG1 et IgG2a, les domaines  $V_H$  ont pu être isolés, et ont à peu près le même poids moléculaire (voir chapitre II). De ce fait, on peut considérer que pour les IgG1 et IgG2a, les domaines  $C\gamma 1$  ont des poids moléculaires différents.

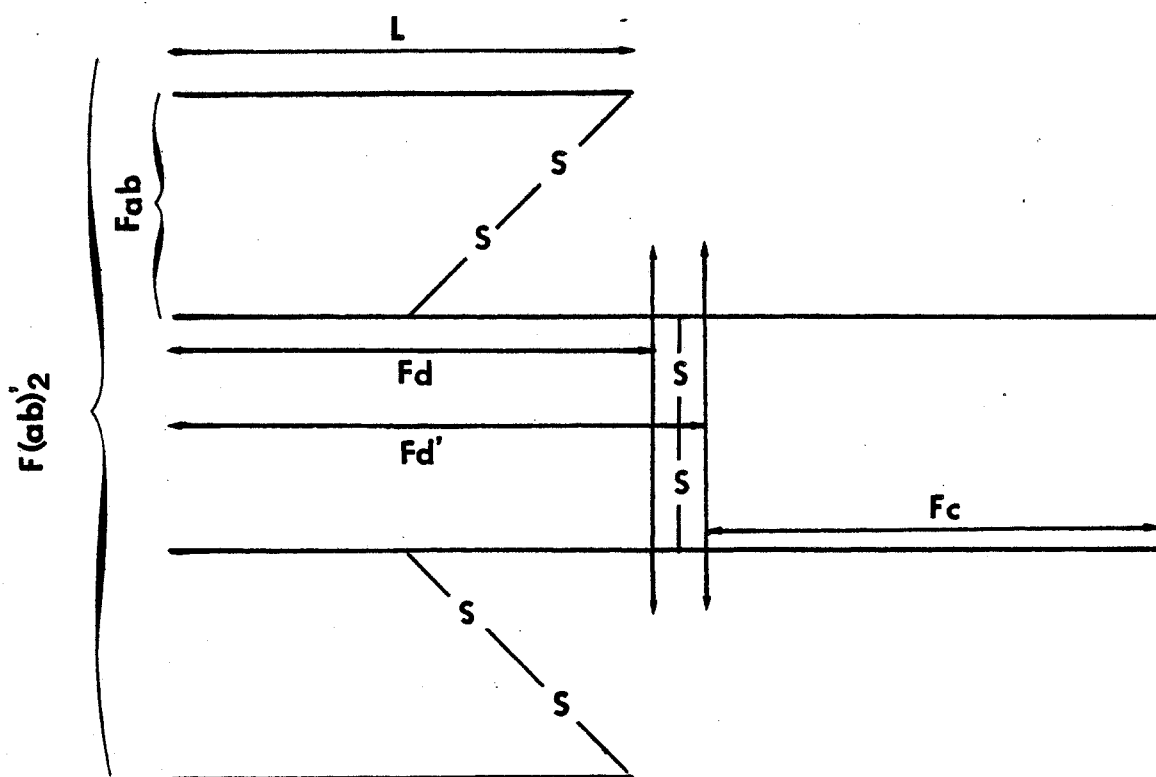
### 3. ORIGINE DES DIFFERENCES DE POIDS MOLECULAIRES OBSERVEES

La différence d'environ 3 000 daltons observée pour les chaînes  $\gamma$  selon la sous-classe peut correspondre :

- à une différence de longueur de chaîne peptidique (environ 20 à 30 acides aminés),
- à la présence d'une copule glucidique supplémentaire,
- à une différence d'hydrophobicité de la chaîne peptidique aboutissant à la formation de complexes protéines - SDS de tailles différentes.

Bien que les séquences des chaînes lourdes  $\gamma$  d'IgG de Rat ne soient pas connues, il paraît peu vraisemblable qu'il existe une différence de

Figure 24.- Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (concentration d'acrylamide 7,5 %) de fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub> d'IgG1 (IR 766), d'IgG2a (IR 418) et d'IgG2b (IR 863) monoclonales, réduits par le mercaptoéthanol (concentration finale 5 %). L : chaîne légère. Les chiffres sur la gauche des électrophorégrammes correspondent au poids moléculaire ( $\times 10^{-3}$ ).



Fd IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2b</sub> 26000  
 IgG<sub>2a</sub> 23000

Fc IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2b</sub> 28000  
 IgG<sub>2a</sub> 27000



Fd' IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2b</sub> 26000  
 IgG<sub>2a</sub> 23000

Figure 25.- Représentation de la structure de l'IgG, des fragments Fab (constitué par l'association covalente d'une chaîne légère L et d'un fragment de chaîne lourde Fd), F(ab')<sub>2</sub> (constitué par l'association covalente de deux chaînes légères L et de deux fragments de chaînes lourdes Fd'), et Fc. Le poids moléculaire des Fd et Fd' d'IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2b</sub> est de 26 000 daltons alors que celui des Fd et Fd' d'IgG<sub>2a</sub> est de 23 000. Les Fc d'IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2b</sub> ont un poids moléculaire de 28 000, celui du Fc d'IgG<sub>2a</sub> est de 27 000.

longueur de chaîne de 25 à 30 acides aminés. En effet, par exemple, les chaînes  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2a$  et  $\gamma 2b$  des IgG de souris ne présentent qu'une différence de 6 acides aminés (supplémentaires pour la chaîne  $\gamma 1$ ) dans le domaine  $CH_1$  et de 5 à 9 acides aminés pour la région charnière. La présence d'une copule glucidique supplémentaire localisée dans le Fd n'a pas été démontrée par des analyses glucidiques de fragments Fab d'IgG1 et d'IgG2b. (réalisées dans le Laboratoire de Chimie Biologique, Professeur J. MONTREUIL). Des différences dans le contenu en acides aminés hydrophobes semblent l'éventualité la plus vraisemblable. De telles différences ont été démontrées comme responsables des variations dans le poids moléculaire des chaînes A de la cristalline  $\alpha$  (DEJONG, ZWEERS et COHEN, 1978). En effet, il suffit dans ce cas d'une seule substitution Gln  $\rightarrow$  Leu dans la chaîne pour entraîner une différence de poids moléculaire apparent d'environ 2 000 daltons. De même, les différences de poids moléculaires observées pour les chaînes K et  $\lambda$  d'IgG humaines (VIRELLA et COELHO, 1974), pourraient s'expliquer, non par des différences de longueur de chaînes, mais par des différences dans leurs compositions en acides aminés.

## C - REDUCTION DES PONTS DISULFURE INTER-CHAINES

### 1. INTERET ET PRINCIPE DE L'ETUDE

La sensibilité différente des ponts disulfure inter-chaînes à la réduction est une propriété chimique simple à mettre en évidence et qui permet de distinguer certaines sous-classes d'IgG. Par exemple, l'IgG4 humaine est réduite essentiellement en une sous-unité HL du fait d'une plus grande sensibilité des ponts inter-chaînes lourdes à la réduction. Cette propriété n'est pas retrouvée pour les autres sous-classes d'IgG humaines (VIRELLA et PARKHOUSE, 1973).

L'action de réducteurs, dithioérythritol et dithiothréitol sur les sous-classes d'IgG de Rat, a été étudiée sur différentes IgG monoclonales. Le principe de l'étude est d'utiliser des concentrations progressivement croissantes d'agent réducteur (de 0,05 mM jusque 20 mM) et d'analyser les produits de réduction de l'IgG par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS. Les détails expérimentaux sont indiqués dans l'article n° 2.

## 2. RESULTATS

Les figures 1, 2, 3 et 4 de l'article n° 2 (pages 82-84) montrent les produits intermédiaires obtenus par réduction progressive (dithioerythritol de 0,05 mM à 20 mM) d'IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG2c monoclonales. Dans les tableaux 1 et 2 de l'article n° 2 sont indiquées les proportions relatives des intermédiaires de réduction :  $H_2L$ ,  $H_2$  et HL ainsi que celle de l'IgG non réduite ( $H_2L_2$ ), pour différentes IgG monoclonales appartenant à l'une des quatre sous-classes d'IgG de Rat, réduites soit par le dithioerythritol (tableau 1) ou le dithiothréitol (tableau 2). On constate que l'IgG2a se distingue nettement des autres sous-classes par le fait que l'intermédiaire de réduction est à peu près exclusivement la sous-unité HL alors que des proportions variables de produits  $H_2L$ ,  $H_2$  et HL sont observées pour les autres sous-classes d'IgG. Ces résultats indiquent que les ponts disulfure inter-chaînes lourdes de la région charnière de l'IgG2a sont plus sensibles à la réduction que les ponts entre chaînes lourdes et chaînes légères. Pour les autres sous-classes les résultats peuvent s'interpréter comme une réduction au hasard des ponts inter-chaînes (SEARS et BEYCHOK, 1977) (cf première partie, chapitre II, paragraphe B). Cependant, la persistance d'une certaine proportion de dimère  $H_2$  pour l'IgG2b IR 863 et l'IgG2c IR 304 (figures 3 et 4 de l'article n° 2) avec des concentrations relativement élevées d'agent réducteur (5 à 10 mM) suggère une hétérogénéité au sein de la population d'IgG. En effet, ce résultat peut s'interpréter comme correspondant à l'existence de molécules d'IgG dont les ponts disulfure inter-chaînes lourdes seraient résistants à la réduction. Ceci pourrait provenir, par exemple de la présence, au sein de la préparation d'IgG, de molécules agrégées.

## 3. DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent qu'il existe pour la sous-classe IgG2a une réduction préférentielle des ponts entre chaînes lourdes plutôt que des ponts entre chaînes lourdes et chaînes légères. Une telle propriété l'apparente à la sous-classe IgG4 humaine (VIRELLA et PARKHOUSE, 1973 ; PETERSEN et DORRINGTON, 1974), et à l'IgG1 de Souris mais non à l'IgG2a murine (WILLIAMSON et ASKONAS, 1968).

Cette différence de sensibilité à la réduction signifie-t-elle que les ponts inter-chaînes lourdes de l'IgG2a sont anormalement labiles ou que les ponts entre chaînes lourdes et chaînes légères sont anormalement résistants à la réduction ? La figure 1 de l'article n° 2 montre que l'intermédiaire HL persiste même aux concentrations élevées de réducteurs. Ceci suggère que le pont entre la chaîne lourde et la chaîne légère de l'IgG2a est relativement difficile à réduire, à l'inverse de ce qui se produit sur les autres sous-classes. Ceci pourrait être lié à l'existence d'interactions entre domaines C $\gamma$ 1 et C $\mu$ 1 plus fortes pour l'IgG2a que pour les autres sous-classes.

Y a-t-il une relation entre cette propriété immunochimique de l'IgG2a de Rat et son activité biologique ? Elle n'est pas évidente, si l'on considère, par exemple, que l'IgG2a possède cette propriété en commun avec l'IgG4 humaine alors que ces sous-classes diffèrent par plusieurs activités biologiques : fixation du complément, liaison aux macrophages. La seule propriété biologique commune serait l'activité anaphylactique, mais son existence pour l'IgG4 est controversée (VAN DER GIESSEN et al., 1976 ; VIJAY et PERELMUTTER, 1977 ; VAN TOORENEBERGEN et ALBERSE, 1981, 1982) alors qu'elle est clairement établie pour l'IgG2a de Rat (MORSE, BLOCH et AUSTEN, 1968 ; BACH, BLOCH et AUSTEN, 1971 ; BAZIN et al., 1984).

A l'inverse, il serait intéressant d'étudier le rôle de la réduction des ponts disulfure sur l'activité anaphylactique de l'IgG2a de Rat. En effet, la réduction des ponts disulfure de la région charnière affecte de nombreuses activités biologiques : fixation du complément, liaison aux lymphocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles, etc... Cet effet de la réduction a été interprété comme le fait que la rotation de la partie Fab autour de la région charnière est augmentée, et que par conséquent un empêchement stérique se produit au niveau du domaine C $\gamma$ 2 (domaine impliqué dans la fixation du complément et dans la liaison à de nombreuses populations cellulaires). Cependant, les anticorps anaphylactiques sont considérés classiquement comme résistants à la réduction (voir par exemple la revue générale de BINAGHI, 1973). L'examen de l'activité anaphylactique de l'IgG2a réduite seulement au niveau des ponts inter-chaînes lourdes (par exemple par le dithiothréitol 0,2 mM) ou dont l'ensemble des ponts disulfure inter-



chaînes seraient réduits (dithiothréitol 5 mM), permettrait de définir le rôle joué par les ponts disulfure dans l'activité anaphylactique de l'IgG2a (c'est-à-dire son affinité pour les mastocytes).

## D - DIFFERENCES DE SENSIBILITE DES SOUS-CLASSES D'IgG AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES

### 1. INTERET ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'étude de l'action des enzymes protéolytiques est considérée comme la méthode de choix pour caractériser les sous-classes d'IgG sur la base de leurs propriétés immunochimiques et une approche complémentaire à l'identification des sous-classes d'IgG par des antisérums spécifiques (STANWORTH et TURNER, 1978). Elle constitue également un élément indispensable pour définir les conditions optimales à la préparation de divers fragments de l'IgG : Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fc. L'intérêt pour la préparation des fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub> d'IgG de Rat s'est considérablement accru du fait du développement de la technologie des hybridomes et de l'utilisation des anticorps monoclonaux de Rat. En effet, il est souvent nécessaire d'utiliser des fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub> plutôt que l'anticorps monoclonal IgG entier, par exemple si on veut éviter l'interaction de l'anticorps avec des récepteurs cellulaires spécifiques du Fc, ou encore si on veut éviter que cet anticorps soit capté par l'hépatocyte, etc...

Nous avons analysé l'action de plusieurs enzymes protéolytiques : papaïne, pepsine, trypsine, protéase V8 de S. aureus, sur des IgG monoclonales de Rat appartenant à l'une des quatre sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. Dans certains cas, l'action de ces enzymes a également été étudiée dans des sous-classes d'IgG isolées du sérum de Rat.

### 2. ETUDE DE L'ACTION DE LA PAPAINE

#### 2.1. PROTOCOLE DE L'ETUDE

La papaïne a été l'enzyme le plus utilisé pour distinguer les sous-classes d'IgG. L'analyse de son action à pH 7 en l'absence d'agents réduc-

teurs comme la cystéine (ou en présence d'une molarité très faible, c'est-à-dire 0,001 M) représente la méthode la plus intéressante pour différencier les sous-classes résistantes ou sensibles à la protéolyse enzymatique par cet enzyme. Initialement proposée par GERGELY et al. (1967, 1970) pour distinguer les sous-classes d'IgG humaines, cette méthode a été utilisée pour différencier les sous-classes d'IgG de Souris (GORINI et al., 1969) et les sous-classes d'IgG de nombreuses autres espèces animales (cf première partie, chapitre II, paragraphe C).

L'action de la papaïne sur les sous-classes d'IgG du Rat a été analysée en utilisant différentes IgG monoclonales appartenant à l'une des quatre sous-classes sur les conditions expérimentales suivantes :

- digestion à 37° C, pendant des temps variables de 1 à 18 heures, en tampon phosphate de sodium 0,075 M, NaCl 0,075 M, pH 7,
- rapport enzyme/protéine de 1 à 5 % (poids/poids),
- présence ou non d'un agent réducteur, la cystéine, à la concentration 0,01 M.

Après digestion par la papaïne, les fragments obtenus ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (avec ou sans réduction par le 2 mercaptoéthanol), et par immunoélectrophorèse, en utilisant d'une part un antisérum anti-protéines du sérum de Rat (ou un antisérum anti-IgG dirigé contre les chaînes lourdes et légères) et d'autre part, un antisérum spécifique de la sous-classe d'IgG (cet antisérum réagit contre la partie Fc de la molécule). Certains fragments ont également été purifiés et caractérisés (pour les détails expérimentaux, voir les publications n° 3 et n° 5 ainsi que l'appendice technique).

## 2.2. RESULTATS

### 2.2.1. ANALYSE DE LA SENSIBILITE A LA PAPAINE DES SOUS-CLASSES D'IgG

Cette étude a été réalisée par incubation des IgG monoclonales avec la papaïne en l'absence d'addition d'un réducteur, la cystéine 0,01 M (ou avec

une concentration très faible : 0,001 M), des rapports enzyme/substrat et des temps d'incubation à 37° C variables. Les résultats obtenus ont montré que les sous-classes IgG1 et IgG2b sont les plus résistantes à l'action de la papaïne. C'est ce que l'on observe par exemple pour une digestion de 4 heures ou de 18 heures avec un rapport enzyme/protéine de 1 % : l'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (figure 26 A) montre que la fraction majeure est l'IgG non digérée pour ces deux sous-classes. En augmentant le rapport enzyme/substrat (5 % au lieu de 1 %), on observe que l'IgG1 est transformée en un fragment de poids moléculaire environ 110 000 daltons, alors que pour les autres sous-classes, des fragments de 20 000 à 50 000 daltons sont observés (voir figure 1 de l'article n° 3, page 89).

L'immunoélectrophorèse des produits de digestion par la mercuri-papaïne (en présence de cystéine 0,001 M) est présentée dans la figure 27. On observe après 4 heures d'incubation avec la papaïne (rapport enzyme/protéine : 1 %) la présence d'un arc de précipitation de mobilité identique à la protéine non digérée dans le cas de l'IgG1 et l'IgG2b, alors que pour l'IgG2a et l'IgG2c, deux arcs différents de mobilité de type Fab et de type Fc sont présents ; l'arc de mobilité Fc réagit avec un antisérum spécifique de la sous-classe, ce qui n'est pas le cas pour l'arc de mobilité Fab. Après un temps de digestion prolongée (18 heures) avec un rapport enzyme/protéine de 5 %, des arcs de mobilité Fab et Fc sont présents pour toutes les sous-classes d'IgG, mais on note également la présence d'un arc de mobilité intermédiaire dans le cas de l'IgG1. Les résultats des immunoélectrophorèses confirment donc la résistance à la protéolyse enzymatique par la papaïne des sous-classes IgG1 et IgG2b. L'IgG1 peut être considérée comme la plus résistante à l'action de la papaïne, puisque la digestion complète en fragments de type Fab et Fc n'est pas observée même pour des concentrations élevées d'enzyme et des temps prolongés d'incubation.

#### 2.2.2. EFFET DE LA CYSTEINE 0,01 M SUR LA DIGESTION DES SOUS-CLASSES D'IgG PAR LA PAPAINE

La figure 26 B montre la séparation par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS des produits de digestion par la papaïne des sous-classes d'IgG après une incubation de 4 heures ou 18 heures à 37° C en présence de

Figure 26.- Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (gradient 5-25 %) d'IgG monoclonales de Rat IgG1 IR 595, IgG2a IR 530, IgG2b IR 863, IgG2c IR 304 après digestion par la papaïne (2 x cristallisée, Worthington) (rapport enzyme/protéine : 1 %). A : Hydrolyse en l'absence de cystéine ; B : Hydrolyse en présence de cystéine 0,01 M. a : temps de digestion de 4 h ; b : temps de digestion de 18 h. Les chiffres indiqués à gauche de chaque électrophorégramme correspondent au poids moléculaire  $\times 10^{-3}$ .

*N.B.- Cette figure est identique à la figure 2 de l'article n° 3, page 90.*

Figure 27.- Immunoélectrophorèse des sous-classes d'IgG de Rat après digestion par la mercuripapaïne en présence de cystéine 0,001 M (rapport enzyme/protéine : 1 % ou 5 %). L'antisérum anti- $\gamma$ 2c contient des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre l'IgG2c IR 304.

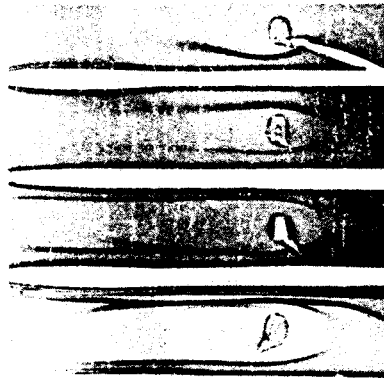
*N.B.*- Cette figure est identique à la figure 3 de l'article n° 3, page 91 .

IgG1 native

1% pap 4h

18h

5% pap 18h



anti-rat serum

anti- $\delta$ 1

anti-rat serum

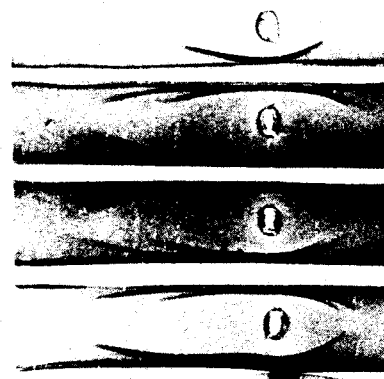
anti- $\delta$ 1

IgG2a native

1% pap 4h

18h

5% pap 18h



anti-rat serum

anti- $\delta$ 2a

anti-rat serum

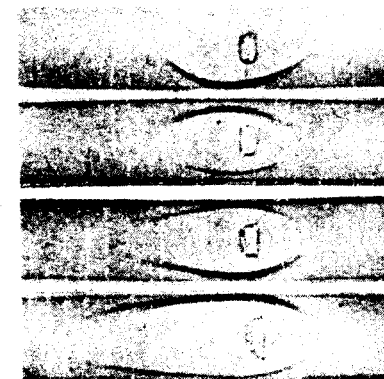
anti- $\delta$ 2a

IgG2b native

1% pap 4h

18h

5% pap 18h



anti-rat serum

anti- $\delta$ 2b

anti-rat serum

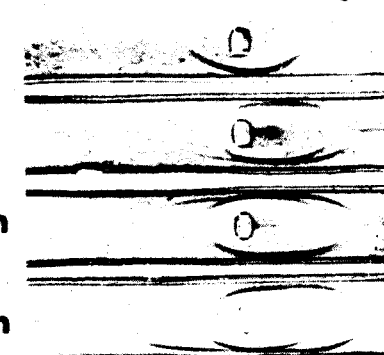
anti- $\delta$ 2b

IgG2c native

1% pap 4h

18h

5% pap 18h



anti-rat serum

anti- $\delta$ 2c

anti-rat serum

anti- $\delta$ 2c



TABLEAU 5.- POIDS MOLECULAIRES DES FRAGMENTS OBTENUS PAR  
HYDROLYSE DES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT PAR  
LA PAPAINE EN PRESENCE DE CYSTEINE 0,01 M

(Détermination par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS  
gradient d'acrylamide de 5 à 25 %)

	<u>Fragments majeurs</u>	<u>Fragments mineurs</u>
IgG1	50.000 28.000	120.000 23.000 14.000
IgG2a	50.000 27.000	14.000
IgG2b	62.000 52.000 28.000	110.000
IgG2c	50.000	75.000 23.000



cystéine 0,01 M. On observe dans ces conditions un clivage presque complet des deux-sous-classes résistantes à la papaïne : IgG1 et IgG2b. Une faible proportion de matériel de poids moléculaire élevé (environ 100 000 daltons) est observée. La figure 26 B et le tableau 5 indiquent les poids moléculaires des fragments majeurs et mineurs obtenus par action de la papaïne en présence de cystéine 0,01 M. Pour trois des sous-classes d'IgG : IgG1, IgG2a, IgG2b, un fragment a le même poids moléculaire (27 000 pour l'IgG2a, 28 000 pour l'IgG1 et l'IgG2b) qu'il soit ou non réduit par le 2-mercaptoéthanol.

L'immunoélectrophorèse des sous-classes d'IgG différées par la papaïne en présence de cystéine 0,01 M montre, pour toutes, la présence d'arcs de mobilité Fab et Fc (figure 4 de l'article n° 3, page 92). Un arc de mobilité intermédiaire, suggérant une digestion incomplète, est observé pour l'IgG1.

### 2.2.3. ISOLEMENT DES FRAGMENTS OBTENUS PAR DIGESTION DES SOUS-CLASSES D'IgG PAR LA PAPAINE EN PRESENCE DE CYSTEINE 0,01 M

L'isolement des fragments obtenus par digestion par la papaïne, en présence de cystéine 0,01 M dans le tampon d'incubation, a été réalisé selon les protocoles suivants :

- pour les sous-classes IgG1, IgG2a, IgG2b, deux étapes successives :
  - . chromatographie sur colonne d'Ultrogel AcA 44 (en tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4).
  - . chromatographie sur colonne de DEAE cellulose ou DEAE Trisacryl M, équilibrée en tampon phosphate 0,01 M, pH 7,8 et élution par les tampons phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,8 ; 0,01 M, pH 6,8 ; 0,05 M, pH 6,8 et 0,2 M, pH 6,8.
  
- pour la sous-classe IgG2c, seule l'étape de chromatographie sur colonne DEAE-cellulose (ou DEAE-Trisacryl M) a été utilisée. En effet, les essais de séparation sur colonne d'Ultrogel AcA 44 ont mis en évidence la présence de nombreux pics correspondant probablement à des agrégats de différentes tailles, ce qui enlève beaucoup d'intérêt à cette étape de purification.



Les détails expérimentaux sont indiqués dans la publication n° 5 (page 111).

La figure 28 résume les résultats de la purification des fragments obtenus par digestion d'une IgG2a monoclonale (IR530). La chromatographie sur Ultrogel AcA 44 sépare deux fragments majeurs, dont la purification complète est assurée par chromatographie sur DEAE-cellulose. Le fragment élué de la colonne de DEAE-cellulose par le tampon phosphate de sodium 0,2 M, pH 6,8 (fractions 1b et 2b) a un poids moléculaire apparent d'environ 60 000 daltons en chromatographie sur Ultrogel AcA 44 mais de 27 000 daltons en électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. Il réagit en immunoélectrophorèse avec un antisérum anti-chaîne lourde  $\gamma$ . Tous ces éléments indiquent qu'il s'agit d'un Fc non covalent, c'est-à-dire ne comportant pas les ponts disulfure de la région charnière. Le fragment élué par le tampon phosphate 0,01 M, pH 7,8 (1a et 2a) a un poids moléculaire d'environ 50 000 daltons en chromatographie sur Ultrogel AcA 44 et en électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. Après réduction des ponts disulfure par le 2-mercaptoéthanol, son poids moléculaire est de 23 000. Il ne réagit pas avec un antisérum anti-chaîne lourde  $\gamma$ . Tout ceci indique qu'il s'agit d'un fragment Fab. Il faut noter que pour certaines IgG2a monoclonales de mobilité plus anodique en électrophorèse, le fragment Fab est élué de la colonne de DEAE-cellulose soit par le tampon phosphate 0,01 M, pH 6,8 ; soit par le tampon phosphate 0,05 M, pH 6,8.

L'isolement des fragments obtenus par action de la papaïne sur les IgG1 monoclonales donne des résultats similaires à ceux obtenus pour l'IgG2a (résultats non présentés). Un fragment mineur, d'environ 14 000 daltons, observé lors du contrôle des hydrolysats enzymatiques d'IgG1 et d'IgG2a par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (voir par exemple la figure 26 B) n'a pas été purifié dans nos expériences. Cependant, sa taille suggère qu'il s'agit d'un Fc', analogue à celui obtenu par protéolyse enzymatique des IgG humaines.

La séparation des produits de digestion d'une IgG2b monoclonale (IR 863) est présentée dans la figure 29 ainsi que le contrôle des fragments purifiés. Les résultats indiquent que trois types de fragments sont obtenus :

Figure 28.- Purification des fragments obtenus par la digestion par la papaïne de l'IgG2a monoclonale IR 530 (50 mg ; digestion de 4 h à 37°C en présence de cystéine 0,01 M et avec un rapport enzyme/protéine de 1 %). La chromatographie sur Ultrogel Aca 44 (tampon PBS, pH 7,4 ; colonne : 2,6 x 90 cm ; débit d'élution : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml) sépare deux fractions principales 1 et 2. La chromatographie sur DEAE-Cellulose de ces deux fractions donne pour chacune d'elles deux sous-fractions : 1a et 1b, 2a et 2b (colonne : 2 x 15 cm ; débit : 15 ml/h ; fractions : 5 ml ; tampon 1 : phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,8 ; tampon 2 : phosphate de sodium 0,2 M, pH 6,8). Les fractions 1a, 2a et 1b, 2b sont respectivement identiques (voir les contrôles par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoélectrophorèse dans la partie inférieure de la figure).

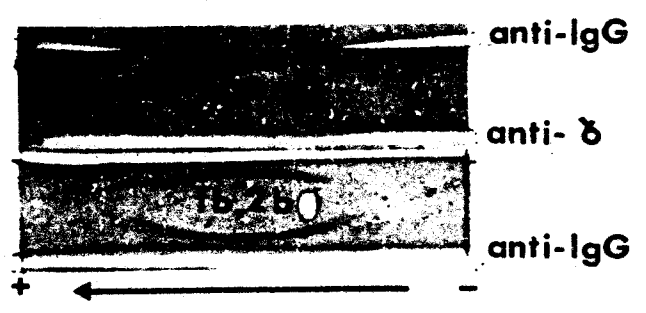
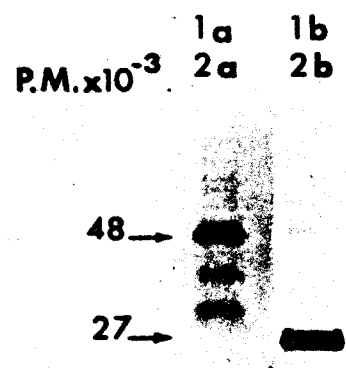
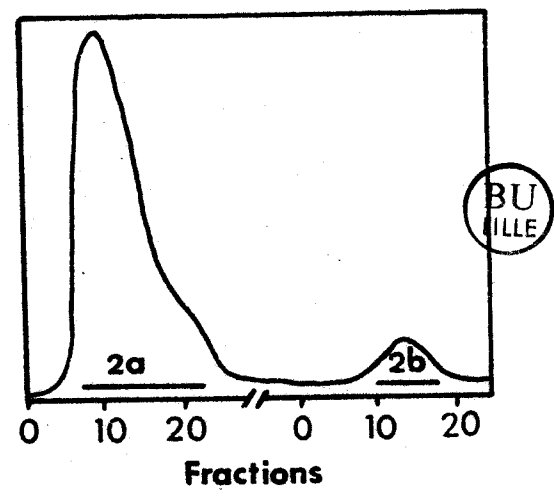
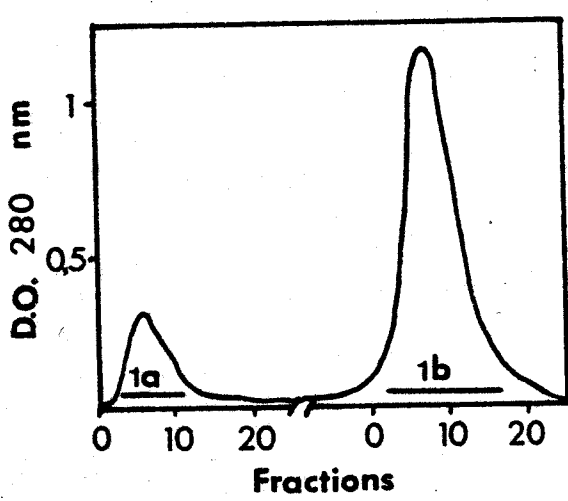
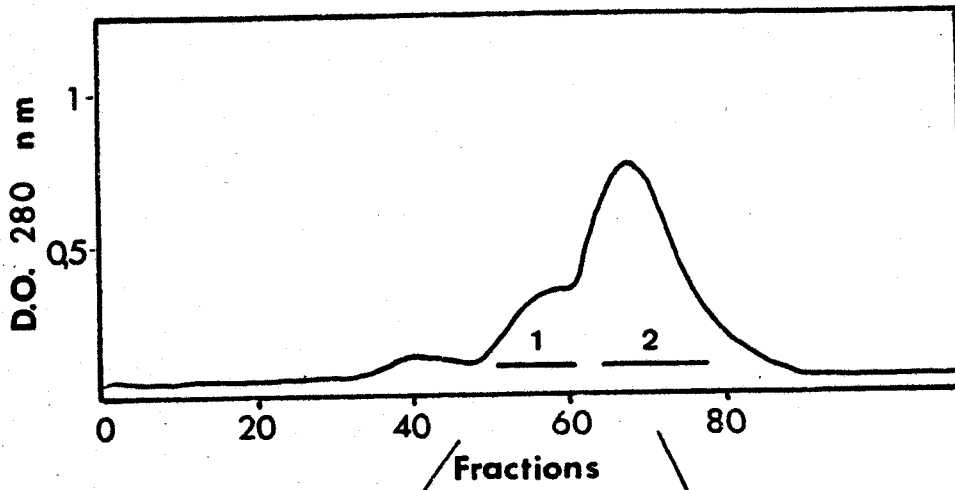
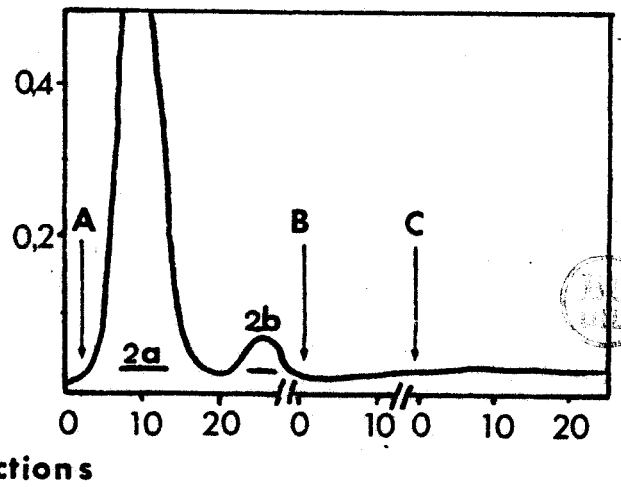
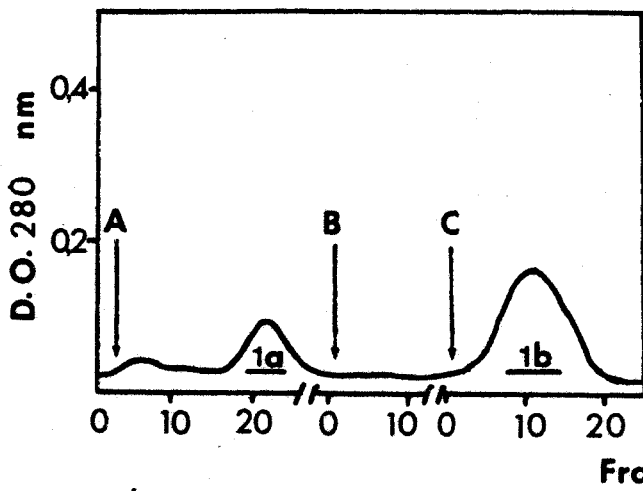
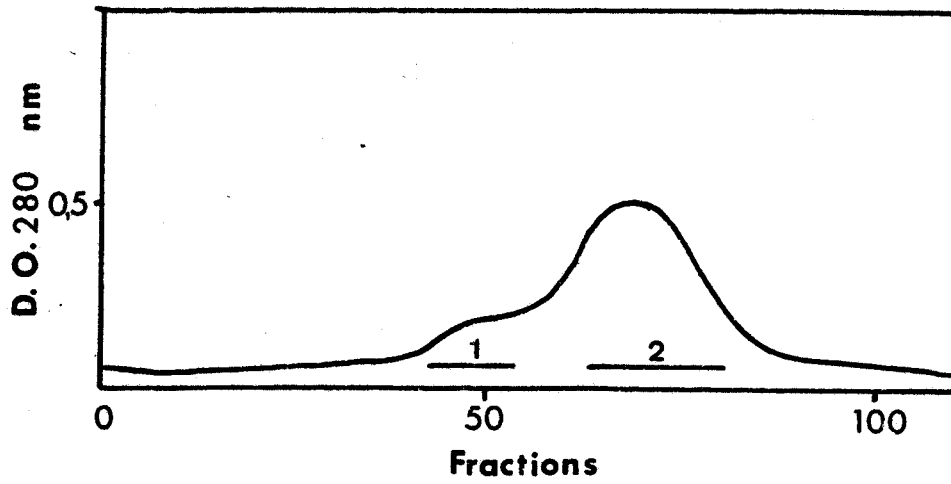
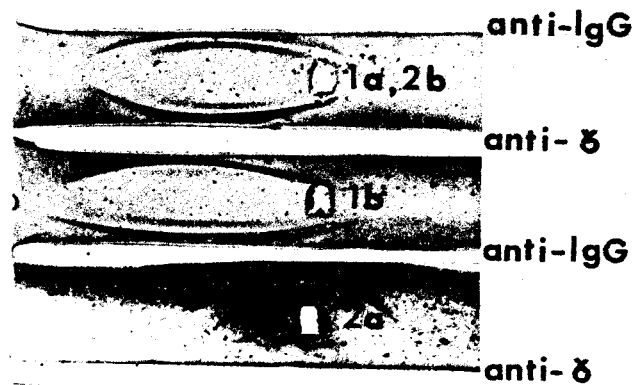
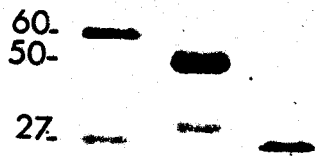


Figure 29.- Purification des fragments obtenus par hydrolyse par la papaïne de l'IgG2b monoclonale IR 863 (80 mg ; digestion de 4 h à 37°C en présence de cystéine 0,01 M et avec un rapport enzyme/protéine : 1 %). Deux fractions 1 et 2 sont obtenues par chromatographie sur Ultrogel AcA 44 (schéma du haut de la figure ; conditions expérimentales identiques à la figure 28). La chromatographie des fractions 1 et 2 sur DEAE-Cellulose et l'élution par les tampons A : phosphate de Na 0,01 M, pH 7,8 ; B : phosphate de Na 0,01 M pH 6,8 ; C : phosphate de Na 0,2 M, pH 6,8, permet d'obtenir les fractions 1a, 1b et 2a, 2b, dont le contrôle par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoélectrophorèse est présenté dans le bas de la figure ; 1a et 2b donnent des résultats identiques.

*N.B.*- Dans certaines expériences, les fractions 1a et 2b sont éluées par le tampon B.



1a  
P.Mx10<sup>-3</sup> 2b 2a 1b



+ ←

Fab de poids moléculaire 50 000, Fc non covalent de poids moléculaire 27 000, et Fc covalent de poids moléculaire 60 000. Ce dernier fragment comporterait tout ou partie des ponts disulfure de la région charnière.

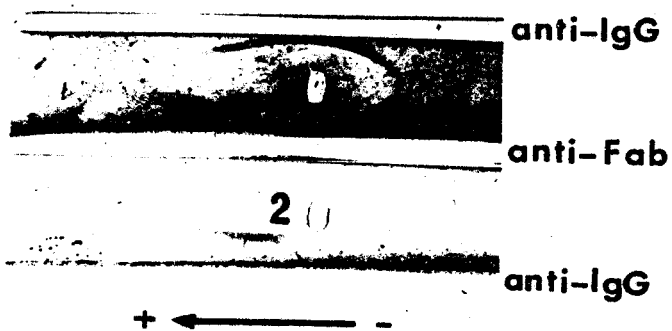
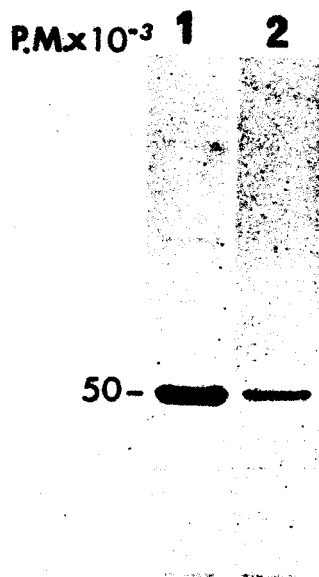
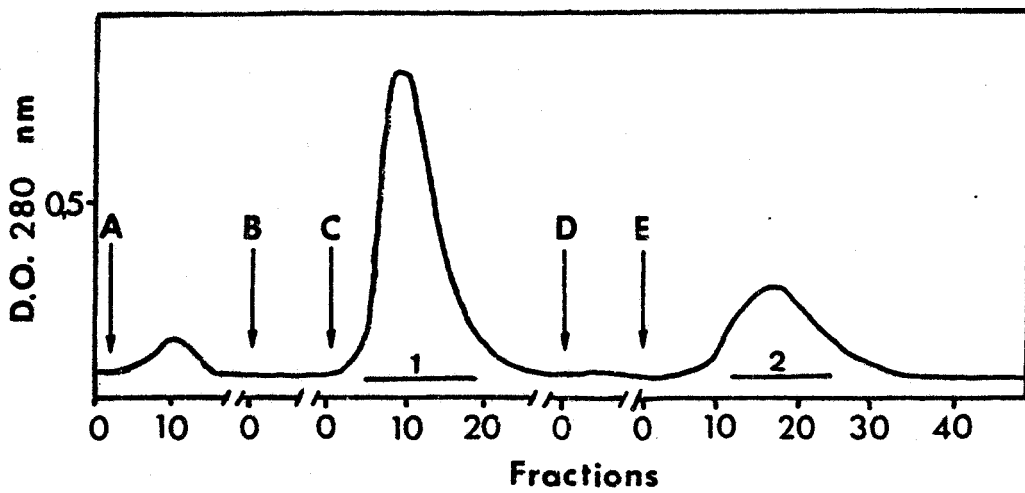
La purification de l'hydrolysate par la papaïne d'une IgG2c monoclonale (IR 304) est présentée dans la figure 30. Les contrôles par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoelectrophorèse indiquent que le Fc d'IgG2c a un poids moléculaire de 50 000 daltons, et qu'il s'agit donc d'un Fc covalent. Il existe également dans la fraction correspondant au Fc un composé mineur de poids moléculaire environ 27 000 daltons qui pourrait correspondre à un Fc non covalent.

La figure 31 résume schématiquement les structures des différents fragments obtenus par protéolyse par la papaïne des quatre sous-classes d'IgG du Rat.

### 2.3. ORIGINE DE LA RESISTANCE A LA PROTEOLYSE ENZYMATIQUE PAR LA PAPAINE

Nos résultats montrent que chez le Rat, comme pour d'autres espèces animales où des sous-classes d'IgG ont été mises en évidence, certaines d'entre elles sont résistantes à l'action de la papaïne lorsque l'incubation est réalisée en l'absence d'agent réducteur (ou une concentration très faible). A l'inverse d'autres enzymes protéolytiques, comme la trypsine ou la protéase V8 de S. aureus, pour lesquels la spécificité d'action se limite à un nombre restreint d'acides aminés (par exemple, lysine et arginine pour la trypsine), la papaïne clive les liaisons peptidiques du côté C-terminal de nombreux acides aminés différents (avec cependant une préférence pour les acides aminés hydrophobes). Le clivage par la papaïne des IgG dans la région charnière reflète donc essentiellement l'accessibilité de cette zone de la molécule plutôt que la présence de certains résidus d'acides aminés dans la séquence. L'accessibilité de la région charnière comme facteur limitant la digestion par la papaïne est suggérée par les effets de l'addition d'un agent réducteur tel que la cystéine 0,01 M. En plus de son effet activateur sur la papaïne, la cystéine 0,01 M est capable de réduire de façon partielle les ponts disulfure inter-chaînes. La réduction des ponts disulfure de la région

Figure 30.- Purification d'un hydrolysate par la papaïne d'IgG2c monoclonale IR 304 (50 mg de protéine ; digestion par la papaïne de 4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 1 % ; en présence de cystéine 0,01 M). Chromatographie sur DEAE-Cellulose (2 x 15 cm ; débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml), et élution par les tampons A : phosphate de Na 0,01 M, pH 7,8 ; B : phosphate de Na 0,01 M, pH 6,8 ; C : phosphate de Na 0,05 M, pH 6,8 ; D : phosphate de Na 0,1 M, pH 6,8 ; E : phosphate de Na 0,2 M, pH 6,8. Le contrôle des fractions 1 et 2 par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoélectrophorèse est présenté dans le bas de la figure.





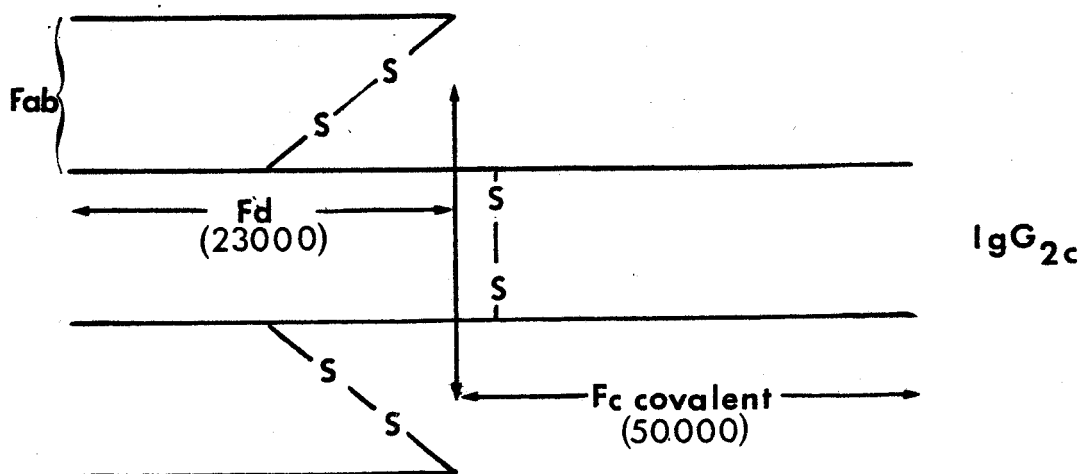
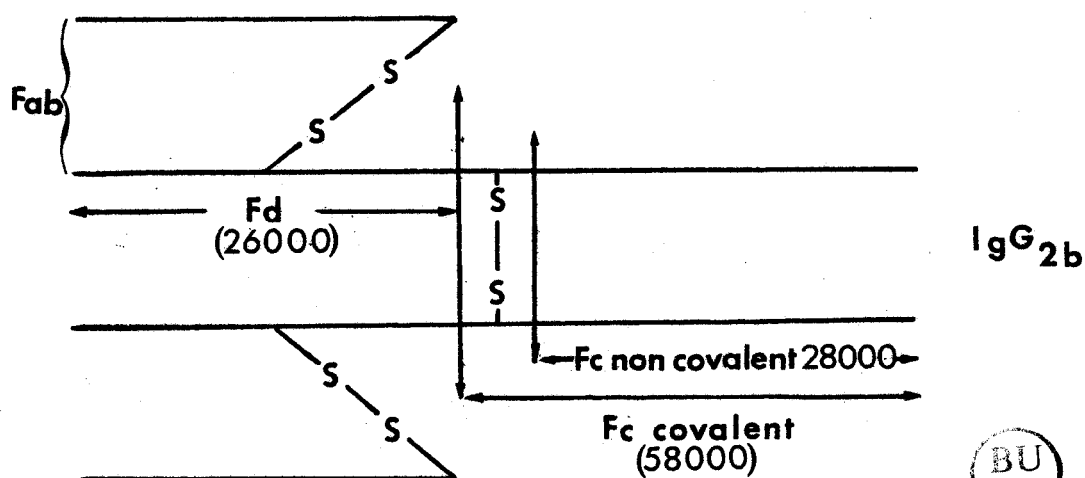
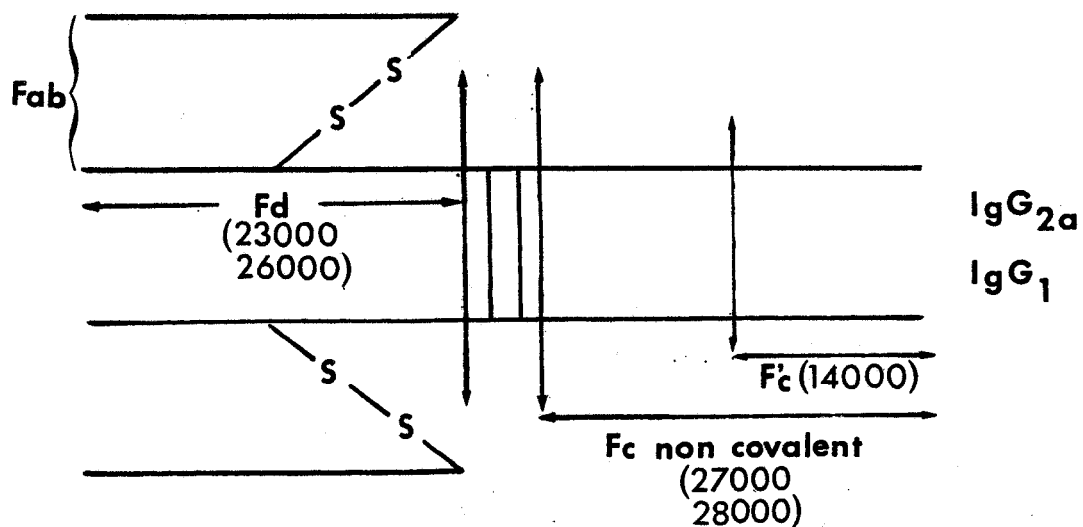


Figure 31.- Représentation schématique des différents fragments obtenus par hydrolyse par la papaïne (en présence de cystéine 0,01 M) des sous-classes d'IgG du Rat. Les poids moléculaires des fragments Fc et de la partie Fd des fragments Fab sont indiqués entre parenthèses.

charnière est à l'origine de l'augmentation de sensibilité à l'action de la papaïne comme l'ont clairement établi les travaux de WRIGHT, ENGEL et JATON (1978) sur les IgG de Lapin. Quel en est le mécanisme ? Plusieurs études ont montré que la réduction des ponts disulfure de la région charnière a pour conséquence une modification de la conformation de la molécule d'IgG. Les mouvements de rotation de la partie Fab sont très augmentés et le domaine C  $\gamma$ 2 participe également à ces mouvements (CHAN et CATHOU, 1977 ; FEWTRELL et al., 1979). La région située entre domaines C  $\gamma$ 2 et C  $\gamma$ 3 représente la zone autour de laquelle s'effectuent les mouvements de rotation, alors que dans l'IgG non réduite, c'est autour de la région charnière que s'effectuent les rotations des parties Fab (YGUERABIDE, EPSTEIN et STRYER, 1970). De ce fait, on comprend que la réduction des ponts disulfure de la région charnière ait pour conséquence une plus grande accessibilité de cette zone à l'action d'enzymes protéolytiques comme la papaïne.

Quelles peuvent être les causes qui expliquent une moins grande accessibilité de la région charnière des sous-classes IgG1 et IgG2b à l'hydrolyse par la papaïne ? La structure tridimensionnelle de l'IgG, telle qu'elle a pu être définie pour l'IgG1 humaine par COLMAN et al. (1976), HUBER et al. (1976), SILVERTON et al. (1977) montre que le glycanne du domaine C  $\gamma$ 2 est proche de la région charnière. Par ailleurs, on sait que la présence d'acides sialiques dans les copules glucidiques des protéines leur confère une résistance à la protéolyse enzymatique, qui peut être diminuée par désialidation (voir exemple AQUINO et al., 1980). Enfin, une sous-population d'IgG de Lapin contient une galactosamine liée à une tréonine de la région charnière, ce qui lui donne une résistance plus grande à la protéolyse par la papaïne (FANGER et SMYTH, 1972 a,b). Tous ces éléments nous ont conduit à rechercher si les différences de sensibilité à la protéolyse enzymatique par la papaïne pouvaient s'expliquer par des différences de composition glucidique ou éventuellement de localisation des glycanes.

L'analyse de la composition glucidique de différentes IgG monoclonales de sous-classe IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c a été effectuée. Les résultats obtenus (tableau 6) montrent qu'il existe des variations dans le pourcentage des sucres et plus particulièrement dans la teneur en acide sialique pour des IgG monoclonales d'une même sous-classe. Dans aucun cas, la présence de galactosamine n'a été mise en évidence. Enfin la protéolyse par la papaïne de l'IgG1, sous-classe résistante à l'action de l'enzyme, a été étudiée après un traitement par la neuraminidase (incubation de 8 heures à 37° C avec un rapport enzyme/protéine de 13,5 U par mg). On ne met pas en évidence de différence significative entre la digestion par la papaïne d'IgG1 traitée par la neuraminidase et d'IgG1 témoin (figure 32). L'ensemble de ces résultats n'est donc pas en faveur d'un rôle des glycanes dans la résistance à la protéolyse par la papaïne.

Une autre explication pourrait être les différences de longueur de la région charnière comme nous l'avons déjà discuté dans la première partie (chapitre II, paragraphe C). En effet, pour les IgG humaines et murines, il semble exister une corrélation entre la longueur de la séquence en acides aminés de la région charnière et la sensibilité à la protéolyse par la papaïne. Cette hypothèse pourrait être analysée dans le cas des IgG du Rat, et dans ce sens, la détermination des séquences des régions charnières des IgG1 et IgG2b (résistantes à la papaïne) et IgG2a (sensible à la papaïne) serait particulièrement intéressante.

### 3. ETUDE DE L'ACTION DE LA PEPSINE

#### 3.1. PROTOCOLE D'ETUDE

Les travaux réalisés initialement par NISONOFF et al. (1960) sur les IgG de Lapin ont montré que la pepsine clive les IgG à un pH acide (en général pH 4,5) en deux fragments majeurs :  $F(ab')_2$  et  $pFc'$ . Cependant, des différences de sensibilité à la protéolyse par la pepsine ainsi que des différences dans la nature des fragments obtenus ont été décrites pour les sous-classes d'IgG humaines et d'autres espèces animales (cf première partie, chapitre II, paragraphe C).

TABLEAU 6.- COMPOSITION GLUCIDIQUE MOLLAIRE DE DIFFERENTES IgG MONOCLONALES DES SOUS-CLASSES IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c.

Cette composition a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse de la glycoprotéine (selon Zanetta *et al.*, 1972). Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif par rapport au mannose.



		Fucose	Galactose	Mannose	N-Acétylglucosamine	Acide N-acétylneuraminique
IgG1	IR 27	N.D.	1,55	3	3,44	1,25
	IR 595	0,34	0,96	3	3,06	0,42
	IR 766	0,69	1,65	3	2,95	1,38
IgG2a	IR 33	0,94	1,29	3	3,11	1,07
	IR 418	0,95	1,08	3	2,84	0,28
	IR 530	0,80	1,05	3	3,43	0,19
IgG2b	IR 863	N.D.	1,55	3	3,33	0,33
IgG2c	IR 304	N.D.	1,46	3	3,36	0,61
	IR 1012	0,7	0,6	3	2,7	1,07

Figure 32.- Etude de l'effet du traitement par la neuraminidase (pour les conditions expérimentales, voir le texte, page 145) sur la sensibilité des IgG1 et IgG2a à l'hydrolyse par la papaïne en l'absence de cystéine 0,01 M. 1 à 4 : protéines contrôles ; 5 à 8 : protéines hydrolysées par la papaïne, 18 h à 37°C (rapport enzyme/protéine : 1 %). 1 : IgG1 IR 766 native ; 2 : IgG1 IR 766 traitée par la neuraminidase ; 3 : IgG2a IR 418 native ; 4 : IgG2a IR 418 traitée par la neuraminidase ; 5 : hydrolysats par la papaïne de l'IgG1 IR 766 native ; 6 : hydrolysats par la papaïne de l'IgG1 IR 766 traitée par la neuraminidase ; 7 : hydrolysats par la papaïne de l'IgG2a IR 418 native ; 8 : hydrolysats par la papaïne de l'IgG2a IR 418 traitée par la neuraminidase.

L'analyse de l'action de la pepsine sur les sous-classes d'IgG du Rat a été effectuée dans les conditions expérimentales suivantes :

- incubation à 37° C en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,5, durant des temps variables de 1 heure à 18 heures.
- rapport enzyme/protéine de 1 à 5 % (poids/poids).
- addition ou non d'un agent réducteur, la cystéine 0,01 M.

L'analyse des fragments obtenus a été réalisée de la même manière que pour les hydrolysats obtenus par action de la papaïne.

### 3.2. RESULTATS

#### 3.2.1. DIFFERENCES DE SENSIBILITE A LA PROTEOLYSE PAR LA PEPSINE

L'utilisation de rapport enzyme/protéine et de temps d'incubation à 37° C variables ont permis de mettre en évidence des différences significatives dans la sensibilité des sous-classes d'IgG à la digestion par la pepsine. L'IgG2c est très sensible à l'hydrolyse pepsique, la digestion de cette sous-classe étant complète après 4 heures à 37° C et un rapport enzyme/protéine 1 % (figure 33). Les sous-classes IgG1 et IgG2a sont les plus résistantes à l'hydrolyse par la pepsine, leur digestion étant incomplète même avec une incubation prolongée (18 heures) et un rapport enzyme/protéine de 5 % (figure 6 de l'article n° 3, page 94). La digestion de l'IgG2b est nettement accrue par l'augmentation du temps de digestion et de rapport enzyme/protéine (figure 7 de l'article n° 3). On peut donc définir un ordre de sensibilité : IgG2c > IgG2b > IgG1, IgG2a. L'examen des produits de digestion pepsique par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immuno-électrophorèse met également en évidence des différences dans la nature des fragments obtenues selon la sous-classe :

- Un fragment, dont le poids moléculaire (environ 100 000) suggère qu'il s'agit d'un F(ab')<sub>2</sub>, est obtenu par hydrolyse pepsique de toutes les sous-classes, mais le rendement est variable pour chaque sous-classe selon le temps d'incubation et le rapport enzyme/protéine.

Figure 33.- Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (gradient 5-25 %) d'IgG de Rat après incubation avec la pepsine (rapport enzyme/protéine de 1 %) pendant 4 h à 37°C. A : hydrolysats non réduits ; B : hydrolysats réduits par le mercaptoéthanol (concentration finale 5 %). a : IgG1 IR 595 ; b : IgG1 IR 656 ; c : IgG2a IR 530 ; d : IgG2a IR 418 ; e : IgG2a du sérum de Rat ; f : IgG2a IR 33 ; g : IgG2b IR 863 ; h : IgG2c IR 558 ; i : IgG2c IR 759. Les chiffres sur la gauche des électrophorégrammes indiquent le poids moléculaire des marqueurs ( $\times 10^{-3}$ ).

*N.B.*- Cette figure est identique à la figure 5 de l'article n° 3, page 93.

- Un fragment de poids moléculaire 13 000, c'est-à-dire la taille du pFc' est présent pour les sous-classes IgG2a, IgG2b et IgG2c (figures 5, 7 et 9 de l'article n° 3) mais n'est pas détecté dans le cas de l'IgG1.

- Un ou plusieurs fragments de poids moléculaire 50 000 à 55 000 (c'est-à-dire la taille du F(ab')) est détecté après digestion des sous-classes IgG2a, IgG2b et IgG2c. Dans le cas des IgG2b et IgG2c, la libération de ce fragment est conditionnée par l'augmentation du rapport enzyme/protéine et du temps d'incubation (figures 7 et 9 de l'article n° 3).

Ces différents fragments ont été isolés et caractérisés.

### 3.2.2. ISOLEMENT DES FRAGMENTS OBTENUS PAR LA DIGESTION PEPSIQUE

Les produits de digestion des IgG par la pepsine ont été isolés par chromatographie sur Ultrogel AcA 44. La figure 34 montre la séparation obtenue pour les sous-classes IgG1 et IgG2a après 18 heures de digestion avec la pepsine (rapport enzyme/protéine : 5 %). On y observe qu'il existe une proportion non négligeable d'IgG non digérée ; que le fragment de poids moléculaire 100 000 réagit avec un antisérum anti-IgG et ne réagit pas avec un anti-Fc (il s'agit donc d'un F(ab')<sub>2</sub>) ; que le fragment 3 observé pour l'IgG2a (poids moléculaire 13 000 en électrophorèse en acrylamide-SDS) réagit avec un antisérum anti-Fc  $\gamma$ , et avec un antisérum anti-IgG. Ces critères le définissent comme un pFc'.

La figure 35 montre la séparation obtenue pour une IgG2c monoclonale (IR 304) selon que la digestion est réalisée pendant 4 heures avec la pepsine dans un rapport de 1 % (enzyme/protéine) (figure 35 A) ou de 18 heures avec 5 % d'enzyme (figure 35 B). On y observe que le fragment majeur a un poids moléculaire de 100 000 dans le premier cas, de 50 000 dans le deuxième cas. Ces fragments ne réagissent pas avec un anti-Fc  $\gamma$ . Ces critères (poids moléculaire et antigénicité) les définissent comme étant respectivement un F(ab')<sub>2</sub> (poids moléculaire 100 000) et un F(ab') (poids moléculaire 50 000).



Des résultats analogues à ceux obtenus pour l'IgG2c sont obtenus pour les sous-classes IgG2b selon que la protéine est digérée 18 heures avec 1 % de pepsine (production de  $F(ab')_2$ ) ou 18 heures avec 5 % de pepsine (production de  $F(ab')$ ).

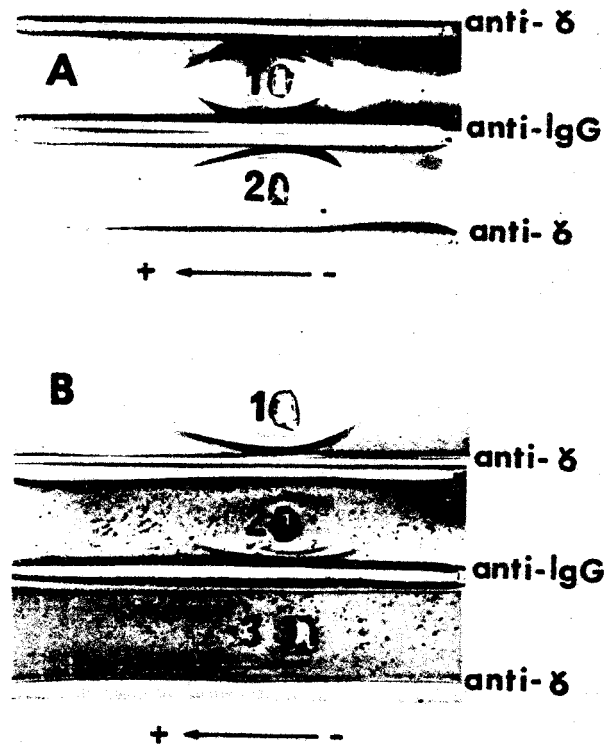
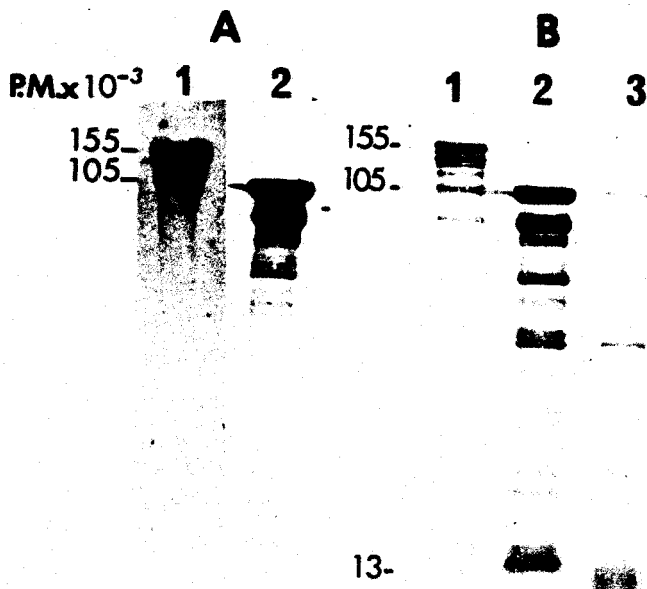
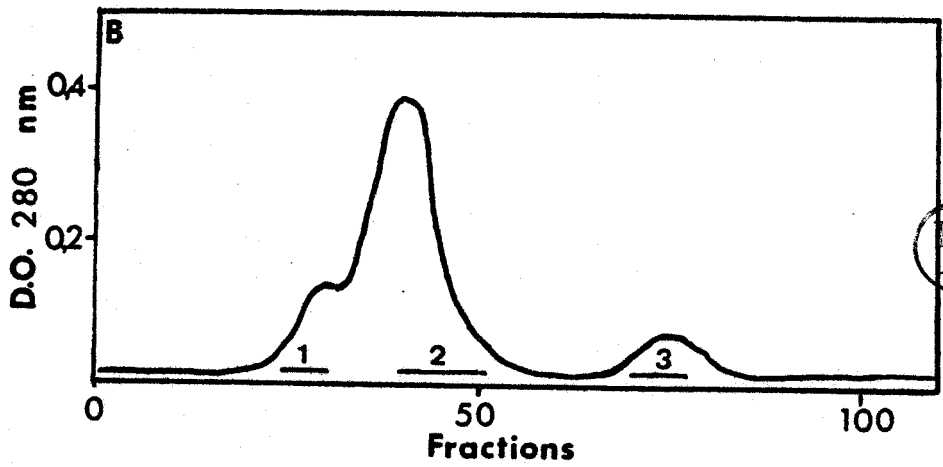
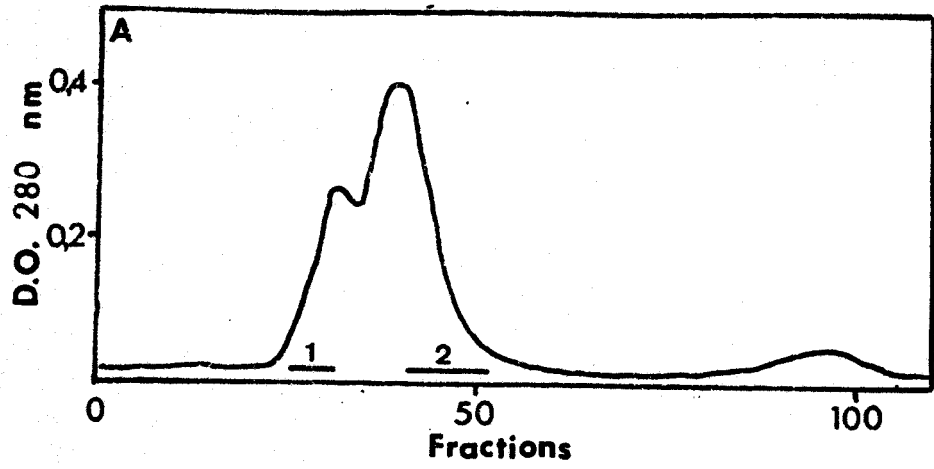
### 3.3. MECANISMES POUVANT EXPLIQUER LA RESISTANCE A LA PROTEOLYSE PEPSIQUE

Les résultats principaux obtenus dans notre étude sont :

- la résistance à la protéolyse pepsique des sous-classes IgG1 et IgG2a, la très grande sensibilité de l'IgG2c,
- l'absence de production de pFc' dans le cas de la sous-classe IgG1,
- la libération de fragment  $F(ab')$  par hydrolyse pepsique des sous-classes IgG2b et IgG2c,
- la production de fragment  $F(ab')$  par hydrolyse de l'IgG2a en présence de cystéine 0,01 M.

Comme la papaïne, la pepsine est un enzyme qui clive les liaisons peptidiques dans lesquels sont engagés les carboxyles de nombreux acides aminés différents, plus particulièrement les acides aminés hydrophobes et aromatiques. Cependant, à la différence de la papaïne dont le site de clivage principal est la région charnière, la pepsine peut cliver la molécule d'IgG en plusieurs sites : la partie C-terminale de la région charnière (libération d'un fragment  $F(ab')_2$ ), le domaine  $C\gamma 2'$  (libération de plusieurs peptides), la zone située entre domaine  $C\gamma 2$  et  $C\gamma 3$  (libération d'un fragment pFc') (voir par exemple la revue générale de STANWORTH et TURNER, 1978). Cette possibilité de clivage en plusieurs sites est liée en partie à ce que la digestion pepsique s'effectue à un pH légèrement acide (pH 4,5 en général) et que des modifications conformationnelles minimales se produisent à ce pH (STEWART et STANWORTH, 1975). On peut donc penser que la résistance à la pepsine dépend à la fois de l'accessibilité de la région charnière, de la structure et de la conformation du domaine  $C\gamma 2$ , ainsi que de l'importance des contacts entre domaines  $C\gamma 2$  et  $C\gamma 3$ . Cette situation complexe est illustrée par le fait que les différences entre sous-classes d'IgG de Rat mise en évidence dans notre étude, comme celles observées pour les IgG humaines

Figure 34.- Chromatographie sur Ultrogel AcA 44 (tampon PBS, pH 7,4 ; colonne 2,6 x 90 cm ; débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml) d'IgG1 monoclonale IR 27 (A) et d'IgG2a monoclonale IR 418 (B) après hydrolyse par la pepsine (rapport enzyme/protéine : 5 %), 18 heures à 37°C. Dans le bas de la figure, sont présentés les contrôles par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (concentration d'acrylamide 7,5 %) et par immunoelectrophorèse des fragments 1 et 2 de la partie A et 1, 2 et 3 de la partie B.



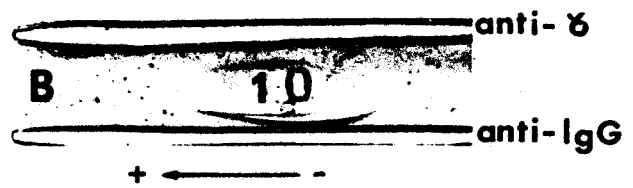
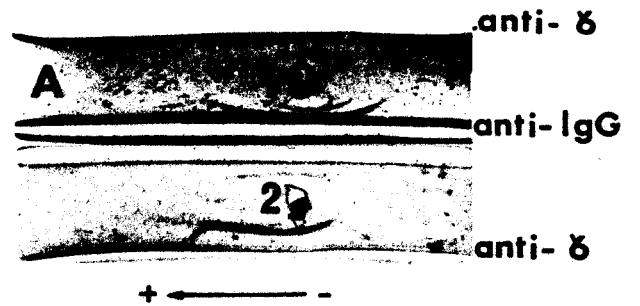
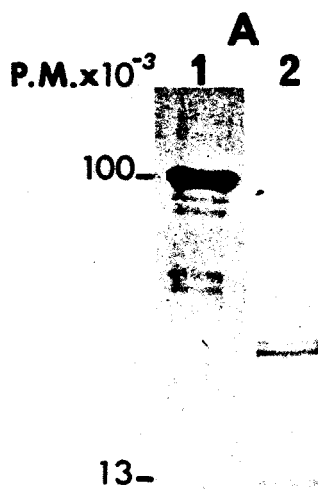
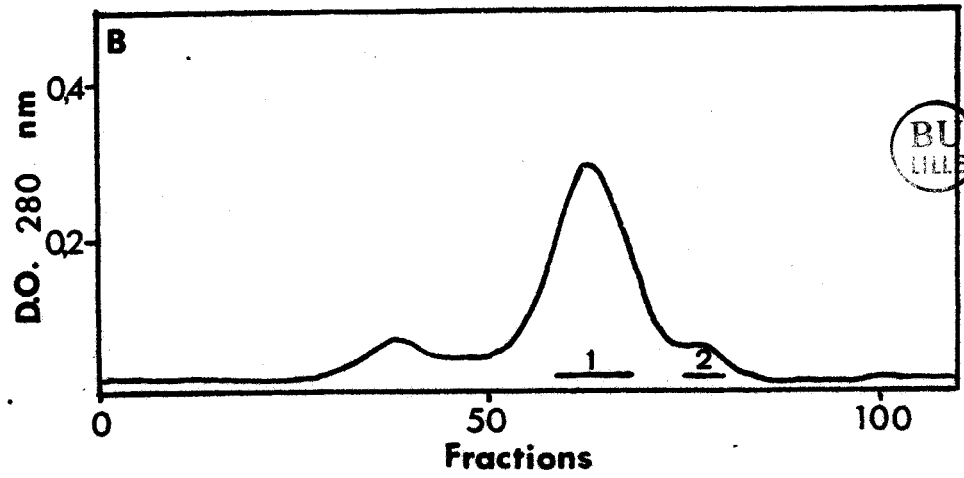
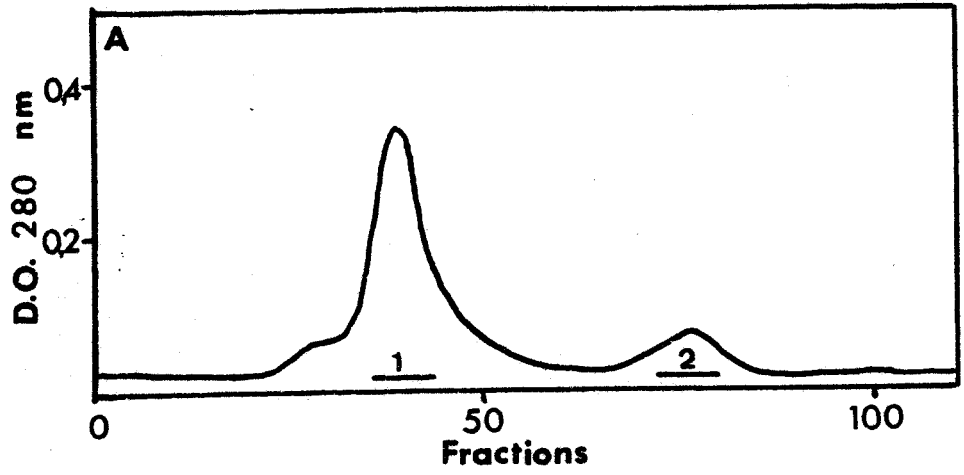
(TURNER, BENNICH et NATVIG, 1970 a,b), résident à la fois dans la production de fragment  $F(ab')_2$  mais aussi dans celles de fragments  $pFc'$  et  $F(ab')$ .

Les éléments de structure expliquant les différences de comportement des sous-classes d'IgG à l'action de la pepsine ne sont donc pas les mêmes que ceux responsables de la résistance à la papaïne (excepté la région charnière). On notera en particulier que l'IgG2a de Rat, sensible à l'hydrolyse par la papaïne, est résistante à l'hydrolyse pepsique. De même, l'IgG4 humaine, résistante à l'action de la papaïne, est très sensible à l'hydrolyse pepsique.

Dans le cas des IgG humaines, dont les structures primaires sont connues, les particularités de séquence qui permettent d'expliquer l'action de la pepsine ne sont pas évidentes, excepté la structure de la région charnière de l'IgG3 dont la longueur inhabituelle est probablement la cause de la grande sensibilité de cette sous-classe à l'hydrolyse pepsique. En particulier, les structures des domaines  $C\gamma 2$  et  $C\gamma 3$  présentent de très grande homologie entre sous-classes (plus de 90 %) (voir première partie, chapitre II, paragraphe D).

Ce qui doit jouer un rôle important dans le comportement des sous-classes d'IgG à l'hydrolyse pepsique est l'importance des contacts entre domaines, plus spécialement les contacts  $C\gamma 2$  et  $C\gamma 3$  et peut-être les contacts  $C\gamma 2 - Fab$ . En effet, plusieurs travaux (DOI et JIRGENSONS, 1970 ; CONNELL et PORTER, 1971 ; ELLERSON et al., 1972 ; STEWART et STANWORTH, 1975) ont montré que les contacts entre domaines  $C\gamma 2$  et  $C\gamma 3$  peuvent être rompus après incubation à un pH acide (pH 2,8 par exemple) et ne sont pas complètement restaurés lorsque la solution d'IgG est ramenée à un pH neutre. Or, ceci a pour conséquence une augmentation très importante de la sensibilité à la protéolyse à la pepsine et à d'autres enzymes (CONNELL et PORTER, 1971 ; STEWART et STANWORTH, 1975 ; STEWART et al., 1977).

Figure 35.- Chromatographie sur Ultrogel AcA 44 (conditions identiques à la figure 34) d'IgG2c monoclonale IR 304 digérée par la pepsine. A : 4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 1 %. B : 18 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 5 %. Dans le bas de la figure sont présentés les contrôles par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoelectrophorèse des fractions 1 et 2 de la partie A et 1 de la partie B.



Nous avons étudié l'effet d'une pré-incubation à un pH acide (pH 2,8) sur les sous-classes d'IgG du Rat résistantes à l'action de la pepsine : IgG1 et IgG2a (pour les détails techniques, voir la publication n° 5). Les résultats obtenus (figure 2 de l'article n° 5, page 114) montrent que la sensibilité à l'action de la pepsine est considérablement augmentée, avec une libération de fragment  $F(ab')_2$  en des temps courts de digestion (2 à 4 heures). Dans ces conditions, on n'observe plus de production de pFc' pour la sous-classe IgG2a (alors qu'il est libéré de l'IgG2a non pré-incubée à pH acide). Ces résultats suggèrent donc que c'est la conformation des domaines C  $\gamma$ 2 et C  $\gamma$ 3 et plus particulièrement les contacts existant entre ces domaines qui contribuent à la résistance de certaines sous-classes d'IgG à l'hydrolyse pepsique. La résistance de l'IgG1 et l'absence de production de pFc' par cette sous-classe serait liée à l'existence de zones de contact inter-C  $\gamma$ 2 - C  $\gamma$ 3 plus importantes que pour les autres sous-classes.

La production de  $F(ab')$  par digestion des sous-classes IgG2b et IgG2c ne relève pas du même mécanisme, puisque la pré-incubation à pH acide des sous-classes résistantes (IgG1 et IgG2a) n'aboutit pas à la formation de ce type de fragment. Elle pourrait dépendre de la structure de la région charnière de ces sous-classes. Une production importante de  $F(ab')$  a été notée pour la sous-classe IgG2b murine (GORINI et al., 1969) dont la région charnière est plus longue que celle des sous-classes IgG1 et IgG2a murines, et comporte un nombre de sites potentiels de clivage par la pepsine plus important (voir première partie, chapitre II, paragraphe D).

#### 4. ETUDE DE L'ACTION DE LA TRYPSINE

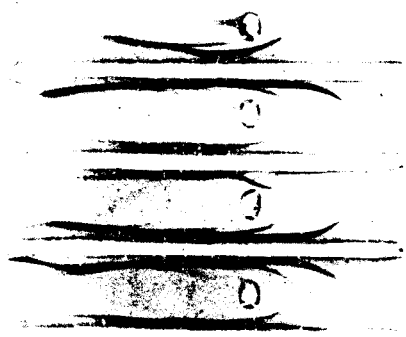
Cette étude sera présentée de façon succincte dans ce paragraphe. En effet, le clivage tryptique des sous-classes IgG1 et IgG2a sera développé dans le chapitre II, car il aboutit à la production tout à fait inhabituelle d'un fragment correspondant au domaine variable VH. Seront décrits essentiellement ici les fragments obtenus par hydrolyse tryptique des sous-classes IgG2b et IgG2c.

Figure 36.- Immunoélectrophorèse d'IgG monoclonales IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c après digestion par la trypsine (rapport enzyme/protéine : 2 %) en présence ou non de cystéine 0,01 M. L'antisérum anti- $\gamma$ 2c contient des anticorps anti-idiotypiques contre l'IgG2c étudiée (IR 304).

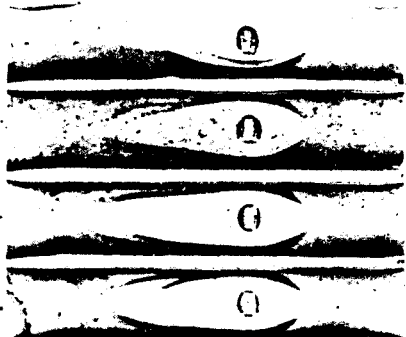
*N.B.- Cette figure est identique à la figure 1 de l'article n° 6, page 175.*



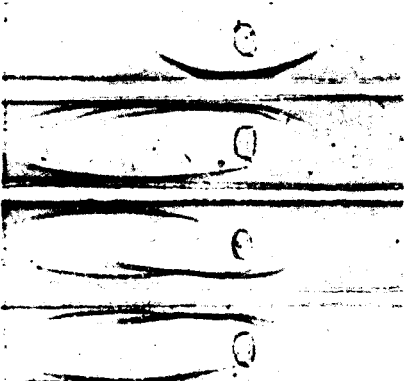
**IgG 1** native anti-rat serum  
 2% trypsin 4h anti- $\delta$ 1  
 18h anti-rat serum  
 2% trypsin 4h cysteine 0.01M anti- $\delta$ 1



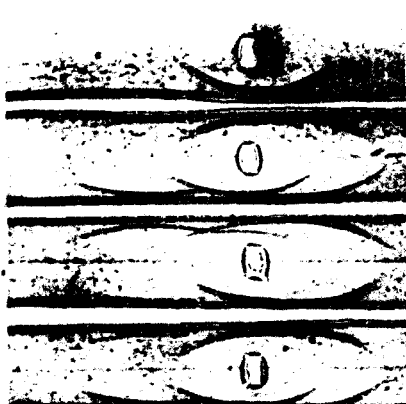
**IgG 2a** native anti-rat serum  
 2% trypsin 4h anti- $\delta$ 2a  
 18h anti-rat serum  
 2% trypsin 4h cysteine 0.01M anti- $\delta$ 2a



**IgG 2b** native anti-rat serum  
 2% trypsin 4h anti- $\delta$ 2b  
 18h anti-rat serum  
 2% trypsin 4h cysteine 0.01M anti- $\delta$ 2b



**IgG 2c** native anti-rat serum  
 2% trypsin 4h anti- $\delta$ 2c  
 18h anti-rat serum  
 2% trypsin 4h cysteine 0.01M anti- $\delta$ 2c



#### 4.1. PROTOCOLE DE L'ETUDE

La digestion par la trypsine a été réalisée dans les conditions expérimentales suivantes :

- Incubation à 37° C en tampon Tris-HCl 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 7,2 durant des temps de 4 heures ou 18 heures.
- Rapport enzyme/protéine de 2 % (poids/poids).
- Addition ou non d'un réducteur, la cystéine 0,01 M.

#### 4.2. RESULTATS

##### 4.2.1. DIFFERENCES DE SENSIBILITE A LA PROTEOLYSE TRYPSIQUE

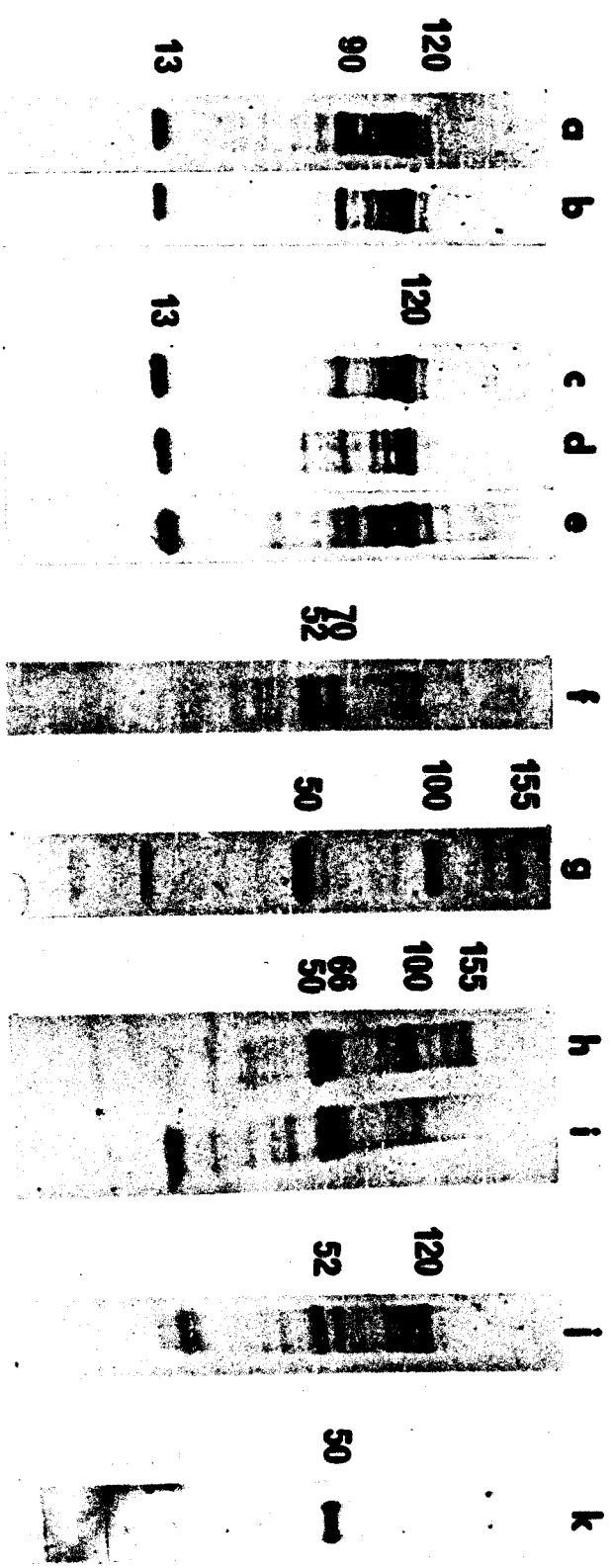
La figure 36 montre les immunoélectrophorèses des produits d'hydrolyse trypsique des différentes sous-classes d'IgG. Les sous-classes IgG2b et IgG2c présentent des arcs de précipitation de mobilité Fab et Fc, avec pour les hydrolysats de 4 heures, un arc de précipitation de mobilité similaire à l'IgG non digérée. L'addition de cystéine 0,01 M ne modifie pas les résultats de façon significative. A l'inverse, on n'observe pas d'arcs de précipitation de mobilité Fab et Fc pour les sous-classes IgG1 et IgG2a. En particulier, pour l'IgG2a, la ligne de précipitation observée après une digestion de 4 heures a une mobilité identique à l'IgG non digérée.

La séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS de différentes IgG monoclonales digérées par la trypsine, 4 heures à 37° C, est présentée dans la figure 37. Les IgG1 et IgG2a monoclonales sont clivées en deux fragments majeurs de 120 000 et 13 000 daltons dont la caractérisation sera abordée dans le chapitre II. Deux fragments de poids moléculaire 52 000 et 60 000 daltons sont obtenus par hydrolyse de l'IgG2b (figure 38 A,f). Le fragment majeur obtenu par hydrolyse de l'IgG2c a un poids moléculaire de 50 000 daltons. Ce fragment est obtenu de façon optimale après 18 heures de digestion.

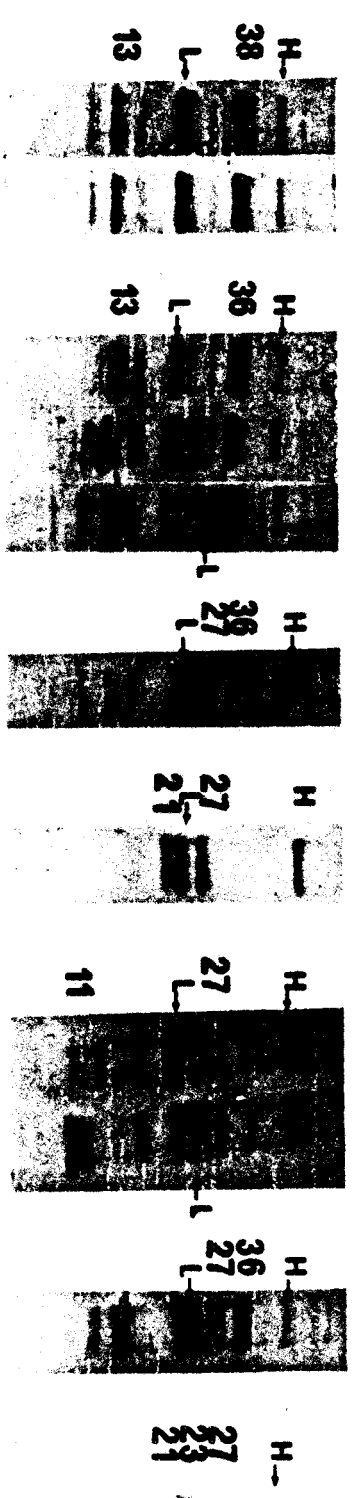
Figure 37.- Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (gradient 5-25 % d'acrylamide) d'IgG de Rat après digestion par la trypsine (4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 2 %). A : Hydrolysats non réduits ; B : Hydrolysats réduits par le 2-mercaptoéthanol (concentration finale 5 %). a : IgG1 IR 595 ; b : IgG1 IR 656 ; c : IgG2a IR 530 ; d : IgG2a IR 418 ; e : IgG2a IR 33 ; f : IgG2b IR 863 ; g : IgG2c IR 304 ; h : IgG2c IR 558 ; i : IgG2c IR 759 ; j : IgG2a du sérum de Rat ; k : IgG2c du sérum de Rat. Les chiffres sur la gauche des électrophorégrammes indiquent le poids moléculaire ( $\times 10^{-3}$ ) des principaux fragments. H : chaîne lourde ; L : chaîne légère.

*N.B.*- Cette figure est identique à la figure 3 de l'article n° 6, page 176 .

**A**



**B**



#### 4.2.2. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE DES IgG2b ET IgG2c

La figure 38 montre la séparation obtenue sur colonne d'Ultrogel Aca 44 pour une IgG2b monoclonale (IR 863) digérée par la trypsine pendant 4 heures. Deux pics (1 et 2) sont obtenus. Ces pics ont été purifiés sur colonne de DEAE-cellulose (ou DEAE-Trisacryl-M) dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites pour les hydrolysats par la papaïne. Les contrôles de pureté obtenus (figure 38) montrent que le Fab(t) d'IgG2b a un poids moléculaire d'environ 52 000 daltons, le Fc un poids moléculaire de 60 000 daltons (il s'agit donc d'un Fc covalent). Des résultats similaires ont été obtenus pour la sous-classe IgG2c, excepté que les Fab(t) et Fc(t) ont le même poids moléculaire de 50 000 daltons (résultats non présentés).

#### 4.3. DISCUSSION

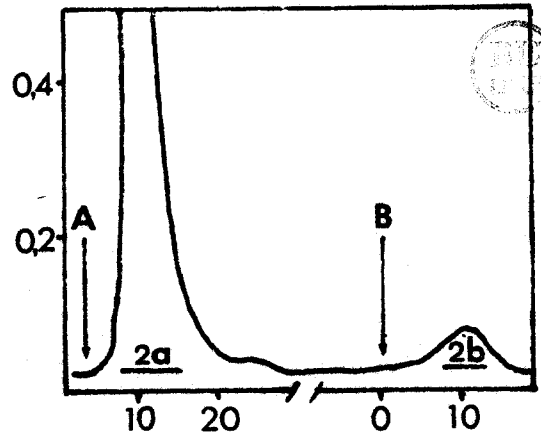
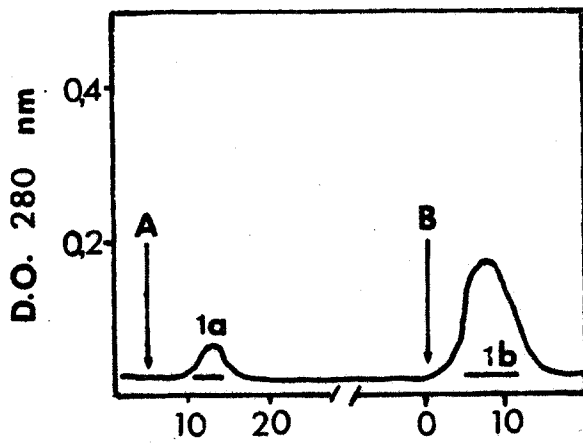
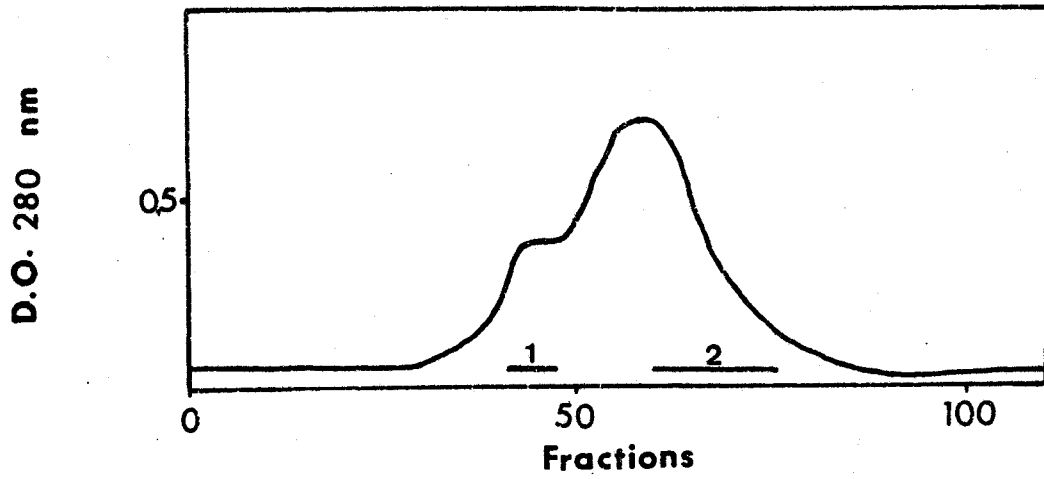
Les résultats obtenus montrent que deux sous-classes IgG2b et IgG2c sont clivées en fragments Fab(t) et Fc(t) analogues à ceux libérés des IgG humaines (MEDGYESI et al., 1971), (excepté la sous-classe IgG2 humaine résistante à l'hydrolyse trypsique), et à ceux obtenus par digestion des sous-classes IgG2a et IgG2b de souris (GORINI et al., 1969). Les sous-classes IgG1 et IgG2a de Rat ne sont pas clivées dans la région charnière et apparaissent donc résistantes à l'hydrolyse par cet enzyme. Nos résultats confirment ceux de NEZLIN, KRILOV et ROKHLIN (1973) montrant que l'IgG2a de Rat est résistante à la protéolyse trypsique, alors que l'IgG2b est clivée en fragments de type Fab(t) et Fc(t). Cependant, pour la sous-classe IgG2a, deux fragments de poids moléculaire 120 000 et 13 000 daltons sont observés dans des conditions dissociantes. Leur caractérisation sera décrite dans le chapitre II.

### 5. ETUDE DE L'ACTION DE LA PROTEASE V8 DE S. AUREUS

#### 5.1. PROTOCOLE DE L'ETUDE

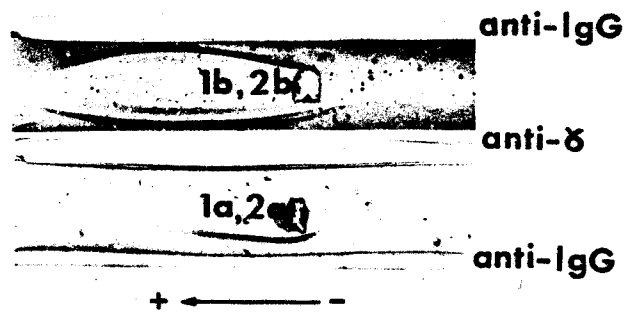
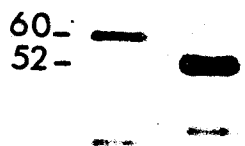
La protéase V8 de S. aureus est une endopeptidase spécifique des résidus d'acide glutamique et d'acide aspartique (DRAPEAU, BOILY et

Figure 38.- Représentation schématique de la purification des fragments obtenus par hydrolyse trypsique de l'IgG2b monoclonale IR 863 (4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 2 %). La chromatographie sur Ultrogel AcA 44 (conditions identiques aux figures 34 et 35) sépare deux fractions majeures 1 et 2 qui sont ensuite purifiées sur DEAE-Cellulose (colonne 2 x 15 cm ; débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml ; tampon A : phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,8 ; tampon B : phosphate de sodium 0,2 M, pH 6,8. Les contrôles de pureté des fractions 1a, 2a et 1b, 2b par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoélectrophorèse sont présentés dans la partie inférieure de la figure.



Fractions

1b 1a  
P.M.  $\times 10^{-3}$  2b 2a



HOUMARD, 1972 ; HOUMARD et DRAPEAU, 1972). Son action peut être limitée aux résidus d'acide glutamique si l'incubation est réalisée en présence d'ions ammonium (DRAPEAU, 1977). Elle présente deux pH optima pour son activité : pH 4,0 et pH 7,8 (DRAPEAU et al., 1972). La digestion des sous-classes d'IgG du Rat a de ce fait été étudiée dans trois tampons différents :

- Acétate d'ammonium 0,1 M, pH 4,0
- Bicarbonate d'ammonium 0,1 M, EDTA 0,002 M, pH 7,8
- Phosphate de sodium 0,1 M, EDTA 0,002 M, pH 7,8.

L'incubation à 37° C pendant 4 heures a été effectuée en utilisant un rapport enzyme/protéine de 1/30 (DRAPEAU, 1977). Les détails expérimentaux sont indiqués dans la publication n° 4.

## 5.2. RESULTATS

### 5.2.1. DIFFERENCES OBSERVEES ENTRE SOUS-CLASSES D'IgG

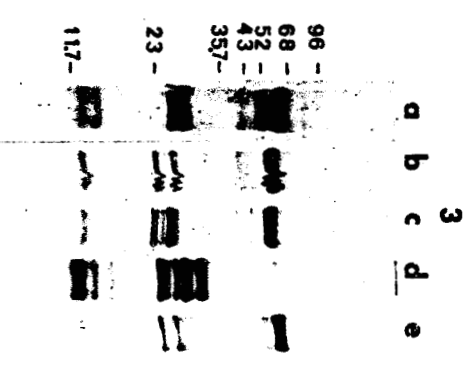
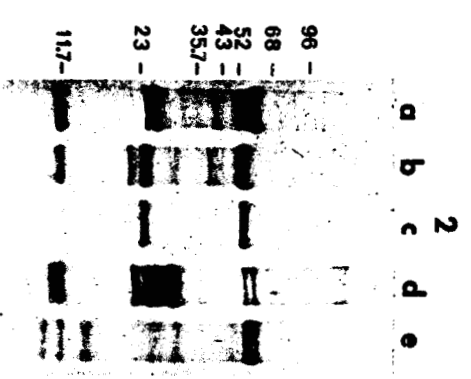
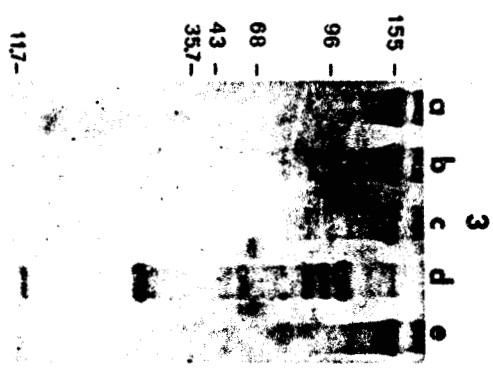
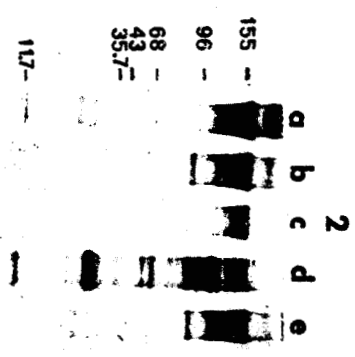
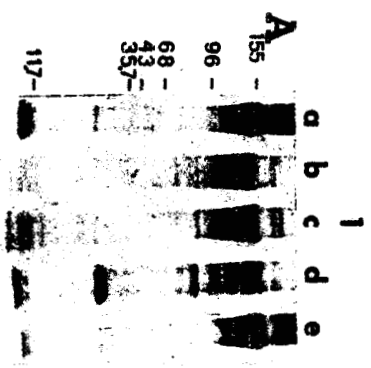
La figure 39 montre la séparation obtenue par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS d'IgG monoclonales incubées avec la protéase V8 de S. aureus dans les tampons n° 1, 2 et 3. Les résultats principaux observés sont :

- la digestion complète de l'IgG2b (IR 863) en deux fragments majeurs de 105 000 et 28 000 daltons après incubation en tampons bicarbonate ou phosphate pH 7,8 (voir parties 2 et 3 de la figure 39 A),
- l'absence de fragmentation significative des autres sous-classes d'IgG dans les mêmes conditions,
- la digestion incomplète de l'IgG2b en tampon acétate pH 4,0,
- la présence pour toutes les sous-classes d'IgG de fragments de faible poids moléculaire (environ 12 000 daltons) lorsque les produits de digestion des IgG sont analysés après réduction par le mercaptoéthanol (figure 39 B).



Figure 39.- Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS d'IgG monoclonales de Rat après hydrolyse par la protéase V8 de *S. aureus* (4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 1/30). A : Echantillons non réduits ; B : échantillons réduits par le 2-mercaptoéthanol. (1) Digestion en tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 4 ; (2) digestion en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M 0,002 M EDTA, pH 7,8 ; (3) digestion en tampon phosphate de sodium 0,1 M, 0,002 M EDTA, pH 7,8. a : IgG1 IR 27 ; b : IgG2a IR 418 ; c : IgG2a IR 530 ; d : IgG2b IR 863 ; e : IgG2c IR 304. Les chiffres sur la gauche des électrophorégrammes indiquent le poids moléculaire des marqueurs ( $\times 10^{-3}$ ).

*N.B.*- Cette figure est identique à la figure 1 de l'article n° 4, page 103.



Les immunoélectrophorèses des différentes sous-classes d'IgG incubées avec la protéase V8 de S. aureus sont présentées dans la figure 2 de l'article n° 4 (page 104). Les hydrolysats d'IgG2b obtenus par digestion en tampons bicarbonate d'ammonium ou phosphate de sodium, pH 7,8 montrent la présence d'arcs de précipitation distincts dans leur mobilité de l'IgG non digérée.

La figure 3 de l'article n° 4 (page 104) montre les résultats obtenus avec des IgG1, IgG2a, IgG2c et une fraction contenant IgG2a et IgG2b isolées du sérum normal. Ces IgG ont été incubées avec la protéase V8 de S. aureus en tampon phosphate, pH 7,8. On observe seulement une digestion de la fraction contenant de l'IgG2b avec production d'un fragment de poids moléculaire 105 000 daltons (figure 3 A,8). La chaîne polypeptidique ayant le poids moléculaire de la chaîne  $\gamma$ 2b (figure 3 B,7) disparaît après digestion par la protéase V8 de S. aureus (figure 3 B,8).

#### 5.2.2. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS OBTENUS PAR DIGESTION DES IgG2b MONOCLONALES

La comparaison des hydrolysats obtenus de différentes sous-classes montrait que seule l'IgG2b est clivée par la protéase V8 de S. aureus. Les fragments obtenus par digestion en tampon phosphate, pH 7,8 ont été isolés par chromatographie sur Ultrogel AcA 44 et chromatographie sur DEAE-Trisacryl M. La figure 40 résume la purification des fragments et le contrôle de leur pureté. De ces résultats, on peut conclure que la protéase V8 de S. aureus libère trois fragments de l'IgG2b :

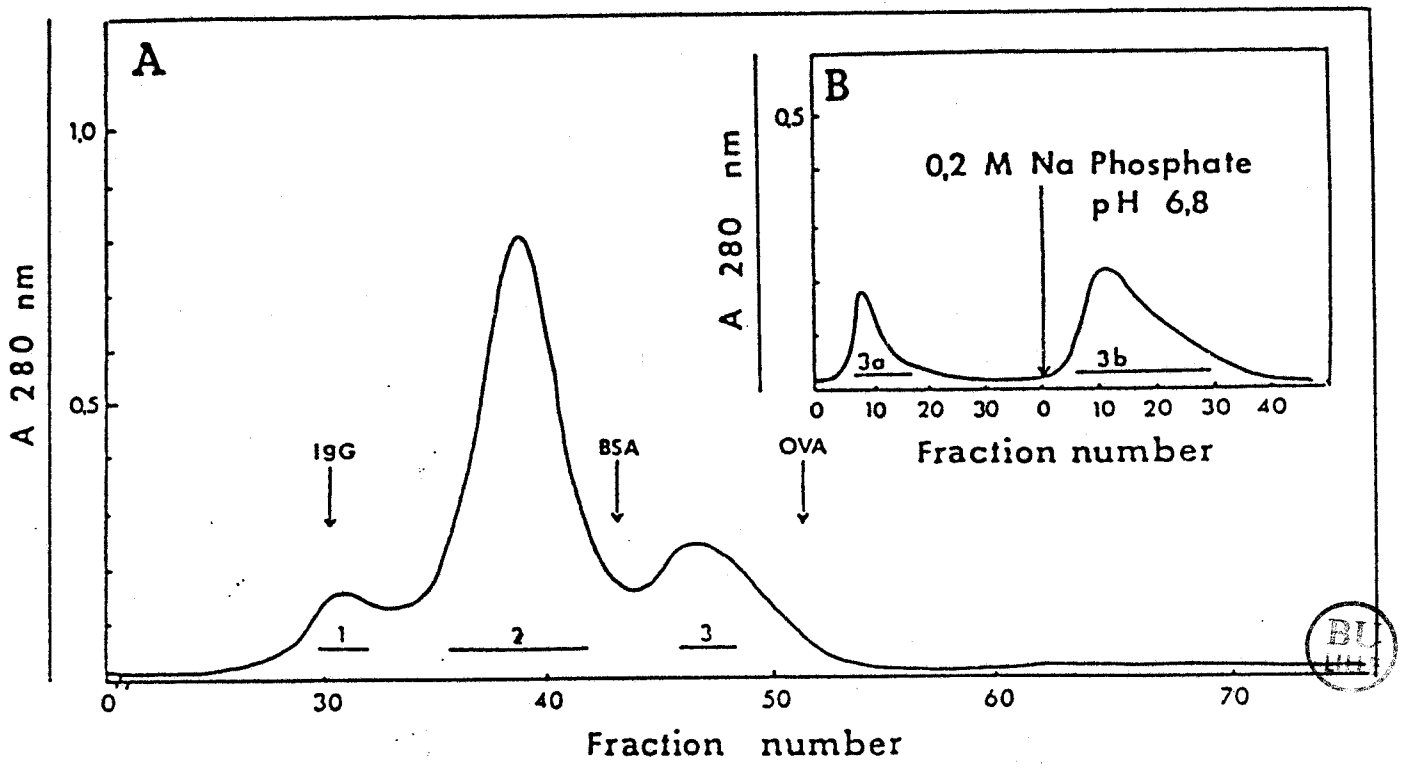
- un fragment  $F(ab)_2$  de poids moléculaire 105 000
- un fragment  $F_c$  non covalent de poids moléculaire 27 à 28 000 daltons
- un fragment (mineur) de type Fab de poids moléculaire 50 000

La structure de ces fragments est résumée schématiquement dans la figure 41.

Figure 40.- Représentation schématique de la purification des fragments obtenus par hydrolyse de l'IgG2b monoclonale IR 863 par la protéase V8 de *S. aureus* (digestion de 4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 1/30, en tampon phosphate de Na 0,1 M, EDTA 0,002 M, pH 7,8). A : Séparation sur Ultrogel AcA 44 (colonne 2,6 x 90 cm) en PBS, pH 7,4. Les marqueurs de poids moléculaire IgG, sérumalbumine bovine (BSA) et ovalbumine (OVA) sont indiqués. B : Purification du pic 3 par chromatographie sur DEAE-Cellulose (colonne 1,6 x 10 cm ; débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml). Elution par les tampons phosphate de Na 0,01 M, pH 7,8 et 0,2 M, pH 6,8).

La partie inférieure de la figure présente le contrôle des fractions par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (A) et par immunoélectrophorèse (B).

*N.B.- Cette figure correspond aux figures 4 et 5 de l'article n° 4, pages 104 et 105.*



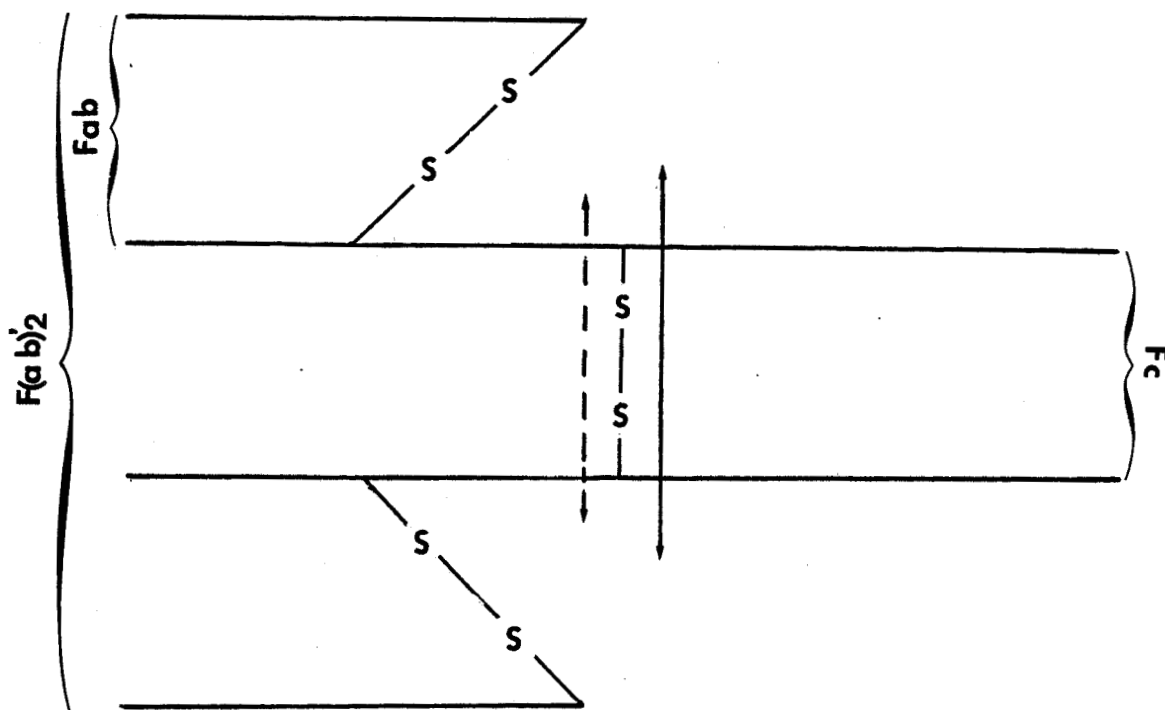


Figure 41.- Schéma illustrant, à l'aide du modèle de la molécule d'IgG, la structure des fragments obtenus par hydrolyse de l'IgG2b IR 863 par la protéase V8 de *S. aureus*. La flèche en traits pleins correspond au clivage de la molécule en fragments  $F(ab)'_2$  et  $F_c$ , alors que la flèche en pointillés indique qu'il existe un site de clivage (mineur) libérant un fragment de type Fab (la représentation d'un seul pont disulfure entre chaînes lourdes dans la région charnière est hypothétique, la structure de cette région charnière n'étant pas connue).

### 5.3. DISCUSSION

Le résultat principal obtenu est que seule la sous-classe IgG2b est clivée par la protéase V8 de S. aureus à pH 7,8 en deux fragments majeurs de type  $(F(ab)_2$  et Fc non covalent. L'identité des résultats obtenus en tampon phosphate de sodium et en tampon bicarbonate d'ammonium suggère que c'est au niveau d'un résidu d'acide glutamique que s'effectue le clivage. La production de fragments  $F(ab)_2$  et Fc non covalent indique que la liaison peptidique clivée par la protéase V8 est située dans la partie C-terminale de la région charnière. L'absence de digestion complète de l'IgG2b à pH 4 n'est probablement pas liée à des différences d'activité de la protéase V8 à pH 4,0 et 7,8, puisque DRAPEAU et al. (1972) montrent que l'enzyme est en fait plus actif à pH 4 qu'à pH 7,8. Il est vraisemblable que ces différences sont liées à l'existence de modifications conformationnelles à pH acide, comme celles observées pour les IgG de Lapin (STEWART et STANWORTH, 1975 ; STEWART et al., 1977).

### E - CONCLUSIONS : TYPAGE CHIMIQUE DES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT ET CONDITIONS OPTIMALES POUR LA PREPARATION DE FRAGMENTS Fab, $F(ab')_2$ et Fc

#### 1. TYPAGE CHIMIQUE DES SOUS-CLASSES D'IgG

Les résultats présentés dans les paragraphes B, C et D permettent de définir un certain nombre de caractéristiques immuno-chimiques qui différencient les sous-classes d'IgG du Rat. Les caractéristiques principales sont résumées dans le tableau 7. Parmi celles-ci, on notera la résistance à la protéolyse par la papaïne des IgG1 et IgG2b, la très grande sensibilité à l'hydrolyse pepsique de l'IgG2c, et la sensibilité à l'hydrolyse par la protéase V8 de l'IgG2b. A partir de ces résultats, il nous est apparu que la méthode la plus simple et la plus reproductible pour distinguer les quatre sous-classes d'IgG du Rat était l'analyse par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS des IgG réduites par le mercaptoéthanol et de leur produit de digestion trypsique. En effet, les chaînes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2b$  ont un poids moléculaire apparent de 55 000 daltons alors que les chaînes  $\gamma 2a$  et  $\gamma 2c$  ont un poids moléculaire de 52 000 daltons. Après hydrolyse trypsique, les fragments

TABEAU 7.- CARACTERISTIQUES IMMUNOCHIMIQUES PRINCIPALES PERMETTANT DE DIFFERENCIER LES SOUS-CLASSES D'IGG DU RAT

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
Poids moléculaire de la chaîne lourde $\gamma$ (acrylamide-SDS, 7,5 %)	55.000	52.000	55.000	52.000
Intermédiaires de réduction par le dithiothreitol	HL, H <sub>2</sub> L et H <sub>2</sub>	HL	HL, H <sub>2</sub> L et H <sub>2</sub>	HL, H <sub>2</sub> L et H <sub>2</sub>
Hydrolyse par la papaïne en l'absence de cystéine	±	+++	±	++
Hydrolyse par la pepsine	±	±	++	+++
Hydrolyse par la trypsine	Fragment VH	Fragment VH	Fab(t) et Fc(t)	Fab(t) et Fc(t)
Hydrolyse par la protéase V8 de <i>S. aureus</i>	±	±	+++ Fragments F(ab) <sub>2</sub> et Fc	±





Figure 42.- Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (acrylamide 7,5 % ; échantillons réduits par le mercaptoéthanol 5 %) d'IgG1 (1), IgG2a (2a), IgG2b (2b), IgG2c (2c), natives (A) ou après hydrolyse par la trypsine, 4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 2 % (B). Les chiffres sur les côtés des électrophorégrammes indiquent le poids moléculaire ( $\times 10^{-3}$ ), des chaînes lourdes (partie A) ou de différents fragments (partie B).

obtenus permettent de distinguer clairement les sous-classes dont les chaînes ont le même poids moléculaire : IgG1 et IgG2b d'une part, et IgG2a et IgG2c d'autre part (figure 42). Pour les IgG1, les chaînes polypeptidiques observées sont : la chaîne légère et deux polypeptides de 38 000 et 13 000 daltons. Pour les IgG2b ce sont : la chaîne légère, un polypeptide majeur de 28 000 daltons (Fc non covalent) et deux bandes de 26 000 et 36 000 daltons. De même, on observe pour l'IgG2a trois bandes peptidiques correspondant à la chaîne légère et à deux fragments de 36 000 et 13 000 daltons alors que pour l'IgG2c, la chaîne légère et deux polypeptides de 26 000 et 22 000 daltons sont obtenus par hydrolyse trypsique.

## 2. CONDITIONS OPTIMALES POUR LA PREPARATION DE FRAGMENTS Fab, F(ab')<sub>2</sub> ET Fc

A partir des résultats obtenus par protéolyse enzymatique des sous-classes d'IgG, les conditions optimales pour la préparation de différents fragments principalement Fab, F(ab')<sub>2</sub> et Fc peuvent être définies. Elles sont résumées dans le tableau 8. La préparation de fragments Fab peut être obtenue pour toutes les sous-classes par hydrolyse par la papaïne. Dans le cas des sous-classes IgG2b et IgG2c, l'hydrolyse par la trypsine permet également l'obtention d'un fragment Fab(t). Pour ces deux sous-classes, il est en fait plus simple d'utiliser l'hydrolyse par la pepsine qui, dans certaines conditions présentées dans le tableau 8, libère des fragments de type F(ab'). En effet, ces fragments peuvent être purifiés par une seule chromatographie sur Ultrogel AcA 44.

L'isolement de fragments Fc peut être réalisée après hydrolyse par la papaïne des différentes sous-classes. Cependant, pour les protéines de sous-classe IgG2c, le rendement en fragment Fc est faible, et il est préférable d'utiliser l'hydrolyse par la trypsine. La trypsine peut également être employée pour la préparation de Fc(t) à partir d'IgG2b monoclonales.

**TABLEAU 8.- RESUME SCHEMATIQUE DES CONDITIONS OPTIMALES POUR LA PREPARATION DE FRAGMENTS Fab OU Fab(t) F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> ou F(ab)<sub>2</sub> ET Fc ou Fc(t), A PARTIR D'IgG MONOCLONALES DE SOUS-CLASSES IgG1, IgG2a, IgG2b ET IgG2c**

Les pourcentages indiqués sont des pourcentages enzyme/protéine (poids/poids) ; les hydrolyses sont réalisées à 37°C ; l'hydrolyse par la papaïne est réalisée en présence de cystéine 0,01 M.



	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c
Fab et Fc	Papaïne (1 %, 4 h)	Papaïne (1 %, 2 h)	Papaïne (1 %, 4 h)	Papaïne (1 %, 2 h)
Fab(t) et Fc(t)	non obtenu	non obtenu	Trypsine (2 %, 4 h)	Trypsine (2 %, 4 h)
Fab')	non obtenu	non obtenu	Pepsine (5 %, 18 h)	Pepsine (5 %, 18 h)
F(ab') <sub>2</sub>	Hydrolyse pepsique (1 %, 4 h) après incubation à pH 2,8	Hydrolyse pepsique (1 %, 4 h) après incubation à pH 2,8	Pepsine (1 %, 18 h)	Pepsine (1 %, 4 h)
F(ab) <sub>2</sub>	non obtenu	non obtenu	Protéase V8 de <i>S. aureus</i> (3,3 %, 4 h)	non obtenu

La production optimale de fragments  $F(ab')_2$  à partir des protéines de sous-classe IgG1 et IgG2a peut être obtenue si les IgG sont préalablement incubées à un pH acide (pH 2,8). Les détails expérimentaux sont indiqués dans la publication n° 5. Dans ces conditions, une hydrolyse complète des IgG1 et IgG2a en fragments  $F(ab')_2$  est obtenue en des temps d'incubation de 2 à 4 heures. L'hydrolyse par la protéase V8 de S. aureus représente la méthode optimale pour obtenir un fragment de type  $F(ab)_2$  à partir d'IgG2b monoclonales.

**CHAPITRE II**

---

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN FRAGMENT CORRESPONDANT AU  
DOMAINE VARIABLE V<sub>H</sub> OBTENU PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE DES  
IgG1 et IgG2a DE RAT**

Publication n° 6

- TRYPTIC CLEAVAGE OF RAT IgG : A COMPARATIVE STUDY BETWEEN  
SUBCLASSES

J. ROUSSEAU, R. ROUSSEAU-PREVOST, H. BAZIN et G. BISERTE  
(1981)

IMMUNOL. LETT., 3, 93-98.

## TRYPTIC CLEAVAGE OF RAT IgG: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN SUBCLASSES

J. ROUSSEAU, R. ROUSSEAU-PREVOST, H. BAZIN\* and G. BISERTE.

*Institut de Recherches sur le Cancer, INSERM U 124, BP 311, 59020 Lille Cédex, France and \*Experimental Immunology Unit, Faculty of Medicine, University of Louvain, Clos-Chapelle-aux-Champs, 30-1200 Brussels, Belgium*

(Received 15 September 1980)

(Revised version received 13 February 1981)

(Accepted 13 February 1981)

### 1. Summary

Monoclonal rat IgG belonging to the 4 rat IgG subclasses, and some IgG subclasses isolated from normal rat serum were subjected to enzymatic degradation with trypsin. Differences in the products of tryptic digestion were observed according to the IgG subclass. IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> were degraded mainly into Fab and Fc fragments. IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> appeared resistant to such cleavage. However, tryptic digestion of the latter two produced two fragments separated only in dissociating media. Results of the studies suggest that one of the fragments (mol. wt. 13,000) probably consists of most of the variable domain of the  $\gamma$  heavy chain, while the second (mol. wt. 120,000) consists of the IgG deleted of the VH regions.

### 2. Introduction

Enzymatic hydrolysis has been used for several years as a means for immunochemical analysis of the immunoglobulins, in particular for the characterization of the subclasses. It has been shown that IgG subclasses differ in their sensitivity to the proteolytic enzymes, especially papain and pepsin. The action of trypsin has also been studied but less extensively. Human IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>4</sub> are susceptible to trypsin cleavage, which produces Fab- and Fc-like fragments: tFab and tFc [1]. On the other hand, IgG<sub>2</sub> is resistant to trypsin and fragmentation occurs only after long times of digestion. In the mouse, studies by Gorini et al. [2] have shown that IgG<sub>1</sub> is more resistant to tryp-

sin than IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>: these latter two are split into Fab- and Fc-like fragments that are not found in the digests of IgG<sub>1</sub>. In the rat, Nezlin et al. [3] have demonstrated a different susceptibility to trypsin of two IgG subclasses: IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>. IgG<sub>2a</sub> is resistant to the enzyme and left undigested whereas IgG<sub>2b</sub> is degraded into Fab and Fc fragments. The availability of the monoclonal IgG secreted by the LOU rat immunocytomas [4,5] led us to extend the study to a comparison of the 4 rat IgG subclasses: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> [6]. Our results showed that IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> are susceptible to trypsin and split mainly into Fab- and Fc-like fragments. On the contrary, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> appeared mainly unsplit when studied in non-dissociating conditions, but were separated in dissociating media into two components, one of which is probably related to most of the VH domain and the other consists in the IgG depleted of VH.

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Immunocytomas

Immunocytomas producing monoclonal immunoglobulins were maintained in our laboratory as described previously [4].

#### 3.2. Purification of rat immunoglobulins

Normal rat serum was obtained from randomly bred Wistar rats.

Monoclonal rat IgG and IgG<sub>2a</sub> from normal rat serum were isolated as described previously [7]. IgG<sub>2c</sub> from normal rat serum was purified by chromatog-

raphy of a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation on a protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) column. Elution was performed sequentially with 0.01 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl pH 8.0, 0.1 M sodium citrate, pH 6.0 and pH 3.0. Fraction eluted at pH 3.0 contains only IgG<sub>2c</sub> and represents about 90% of IgG<sub>2c</sub> from normal rat serum [8].

### 3.3. Antisera

Polyvalent rabbit antisera to normal rat serum proteins were purchased from Sebia. Antisera specific for the heavy chain of rat IgG were prepared as described previously [6].

### 3.4. Enzymatic digestions

TPCK-trypsin was purchased from Worthington Biochemicals. Mercuripapain (25 mg/ml) and twice crystallized pepsin were from Sigma Chemicals. Trypsin digestions were performed as follows: rat IgG (10 mg/ml) in 0.1 M Tris · HCl buffer, pH 7.8, containing 0.02 M CaCl<sub>2</sub>, were digested for 4 h or 18 h with an enzyme:protein ratio of 2% (w/w) with or without the addition of 0.01 M cysteine. The digestion was terminated by addition of soybean trypsin inhibitor (equimolar amount to trypsin). Papain digestions with 1% (w/w) papain and 0.01 M cysteine, pepsin digestion with 1% (w/w) pepsin were performed as reported previously [7].

### 3.5. Purification of papain Fab and Fc fragments

Papain Fab and Fc from monoclonal IgG<sub>1</sub> (IR 595), IgG<sub>2a</sub> (IR 418, IR 530) and IgG<sub>2a</sub> from normal rat serum were prepared by fractionation of a 2-h papain digest on an Ultrogel AcA44 (LKB, Sweden) column equilibrated in 0.01 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4. The Fab and Fc were further purified by chromatography on DEAE-cellulose (DE 32 Whatman) and sequential elution with 0.01 M sodium phosphate, pH 7.8, then with sodium phosphate, pH 6.8, buffers of the following molarities: 0.01 M, 0.05 M and 0.2 M. Purification of Fab from monoclonal IgG<sub>2c</sub> (IR 304) was performed as for IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> except that fractionation on Ultrogel AcA44 was omitted.

### 3.6. Immunoelectrophoresis

Immunoelectrophoresis was carried out in 1% agarose with sodium barbital buffer 0.078 M, pH 8.2.

### 3.7. Polyacrylamide gel electrophoresis

Acrylamide gel electrophoresis in a gradient from 5 to 30% acrylamide was performed as described by Margolis and Kenrick [9], except that a concave instead of a linear gradient was used.

Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS was performed as described by Laemmli [10] with the modifications previously reported [7,11].

## 4. Results

Fig. 1 shows the pattern obtained by immunoelectrophoresis analysis of monoclonal proteins belonging to the different IgG subclasses. Monoclonal IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> digested with 2% trypsin showed precipitation

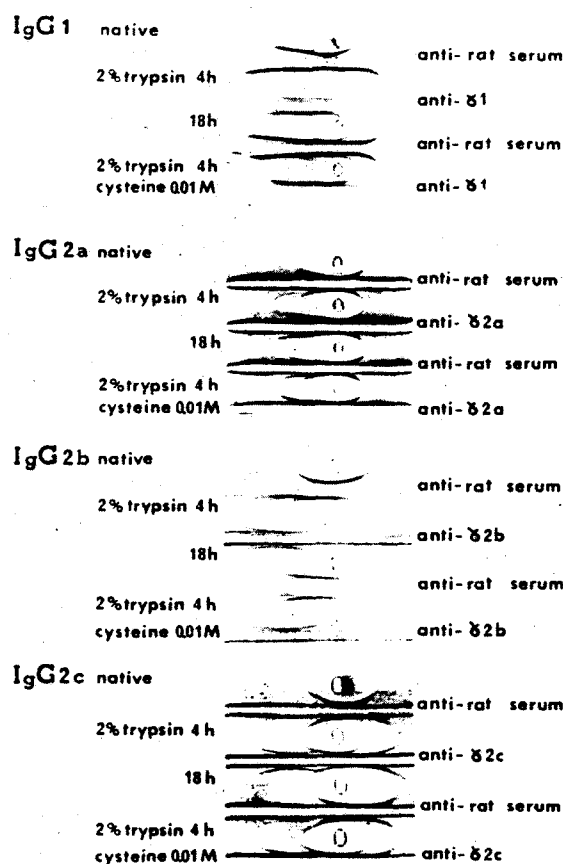


Fig. 1. Immunoelectrophoresis of monoclonal rat IgG native and digested with 2% (w/w) trypsin with or without 0.01 M cysteine. Anti-γ<sub>2c</sub> is also anti-idiotypic for the IgG<sub>2c</sub> protein (IR 304).



lines of Fab and Fc mobilities together with, in 4-h digests, a precipitation line of mobility similar to undigested protein. The addition of cysteine did not seem to significantly alter the immunoelectrophoretic pattern of these two subclasses. IgG<sub>2c</sub> from normal rat serum gave essentially the same results as monoclonal IgG<sub>2c</sub> (data not shown). In contrast to IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub>, no Fab and Fc lines were observed in the digests of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>. For monoclonal IgG<sub>1</sub>, the

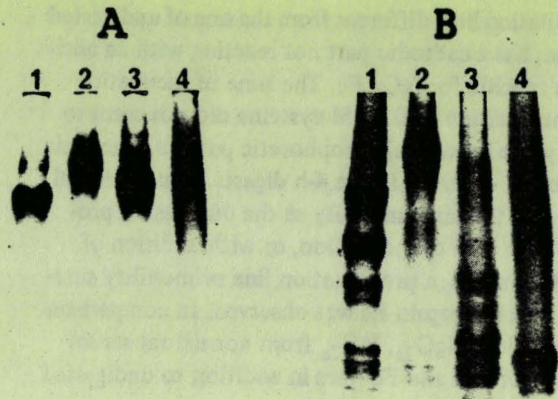


Fig. 2. Electrophoresis in an acrylamide gradient (5–30%) of monoclonal IgG. 1, IgG<sub>1</sub> (IR 27); 2, IgG<sub>2a</sub> (IR 418); 3, IgG<sub>2b</sub> (IR 863); 4, IgG<sub>2c</sub> (IR 304). A: native proteins; B: proteins digested for 4 h with 2% (w/w) trypsin.

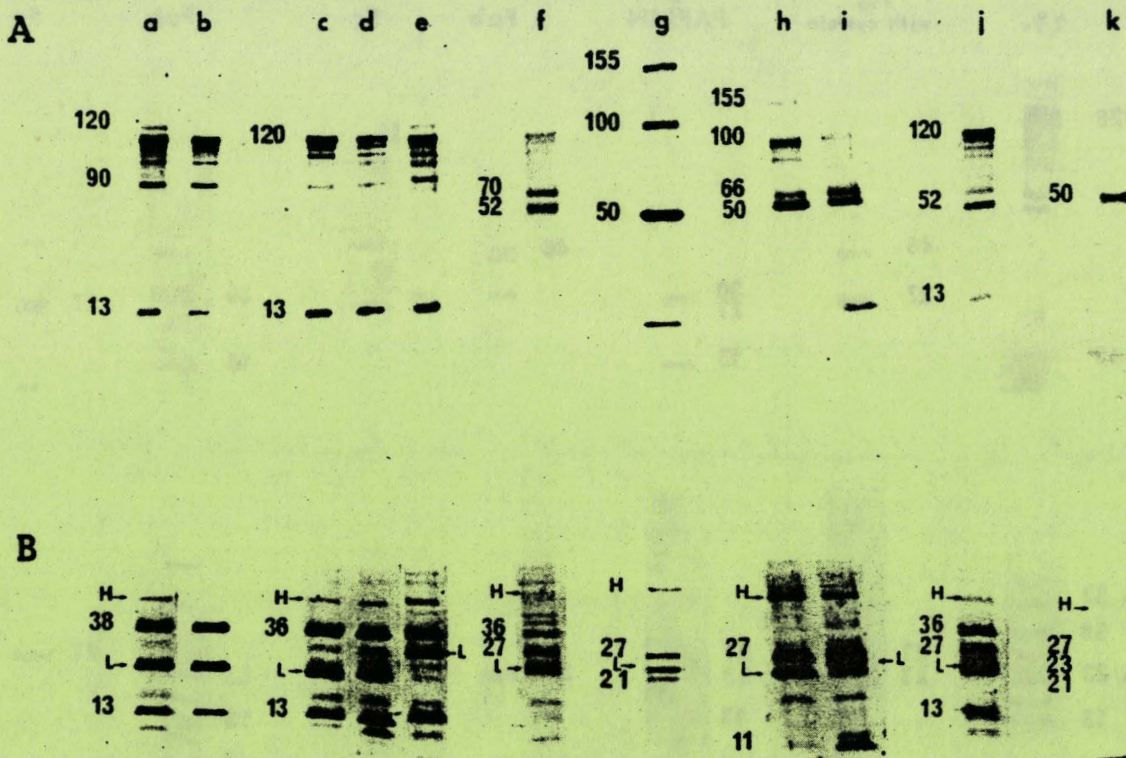


Fig. 3. PAGE-SDS (gradient 5–25% acrylamide) of tryptic digests of rat IgG (digestion 4 h with 2% (w/w) trypsin). A: unreduced digests. B: digests reduced by 2-mercaptoethanol (5% final concentration). (a) IgG<sub>1</sub> IR 595; (b) IgG<sub>1</sub> IR 656; (c) IgG<sub>2a</sub> IR 530; (d) IgG<sub>2a</sub> IR 418; (e) IgG<sub>2a</sub> IR 33; (f) IgG<sub>2b</sub> IR 863; (g) IgG<sub>2c</sub> IR 304; (h) IgG<sub>2c</sub> IR 558; (i) IgG<sub>2c</sub> IR 759; (j) IgG<sub>2a</sub> from normal rat serum; (k) IgG<sub>2c</sub> from normal rat serum.

precipitation line, different from the one of undigested protein, has a cathodic part not reacting with an anti-serum specific for IgG<sub>1</sub> Fc. The time of incubation and the addition of 0.01 M cysteine did not seem to modify the immunoelectrophoretic pattern. The main compound observed in the 4-h digests of monoclonal IgG<sub>2a</sub> had the same mobility as the undigested protein. After 18 h of incubation, or with addition of 0.01 M cysteine, a precipitation line of mobility similar to that for pepsin Fc was observed. In comparison to monoclonal IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2a</sub> from normal rat serum gave minor Fab and Fc lines in addition to undigested protein.

Electrophoresis in a gradient of acrylamide (Fig. 2) of 4-h tryptic digests with 2% trypsin showed that monoclonal IgG<sub>2a</sub> appeared almost completely resis-

tant to trypsin. For IgG<sub>1</sub>, about half of the preparation was found cleaved in fragments of high molecular weight (about 100,000 daltons). In the case of IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> most of the protein was split into components of mol. wt. 50,000.

Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS of different monoclonal IgG, together with IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2c</sub> isolated from normal rat serum, after trypsin cleavage (4 h with 2% trypsin) is shown in Fig. 3. Monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> were found completely split into two main fragments: mol. wt. 120,000 and 13,000. In the case of IgG<sub>2a</sub> isolated from normal rat serum, an additional component of 52,000 daltons was also observed. Monoclonal IgG<sub>2b</sub> digests showed two components of 52,000 and 70,000 daltons. Monoclonal IgG<sub>2c</sub> and IgG<sub>2c</sub> from normal rat serum were split

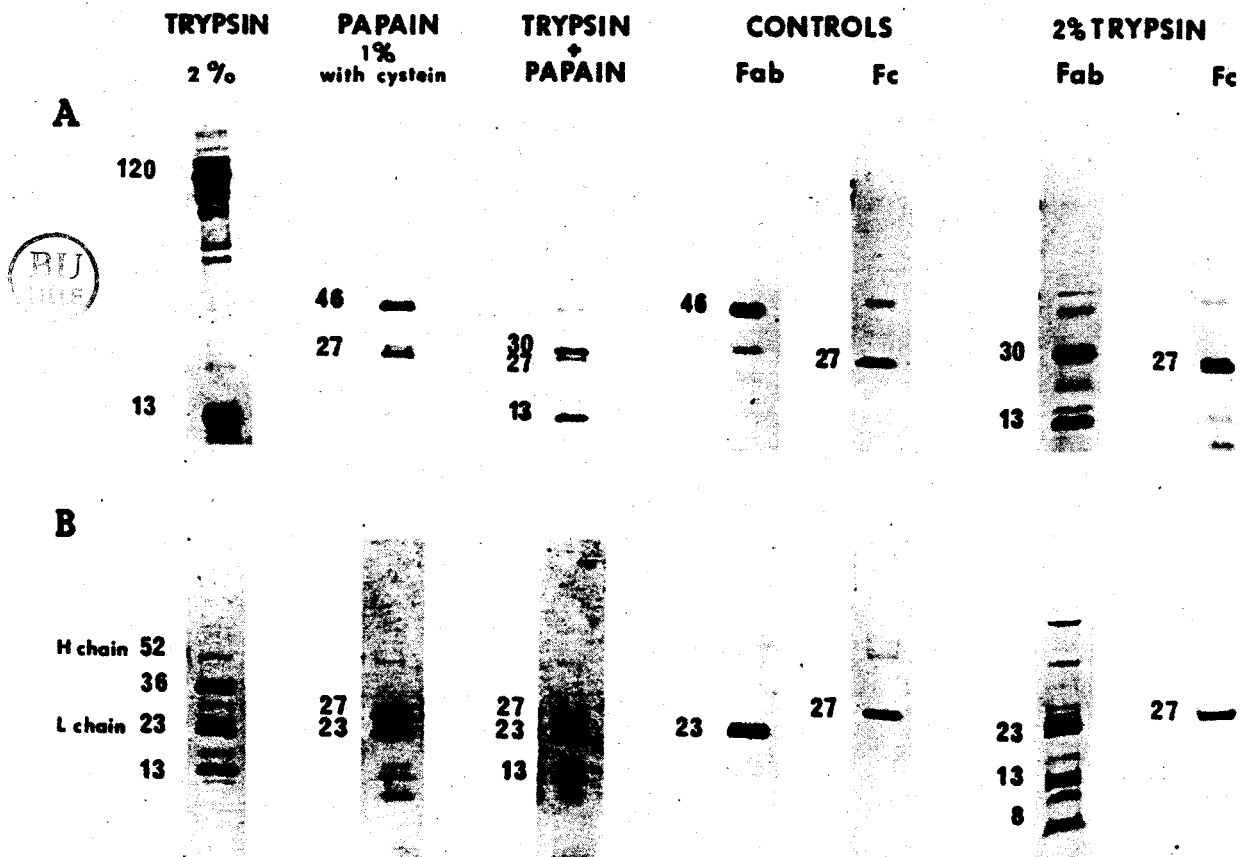


Fig. 4. PAGE-SDS (5-25% acrylamide) of monoclonal IgG<sub>2a</sub> IR 418 digested with trypsin (2%, 4 h), papain (1%, 2 h with 0.01 M cysteine), trypsin plus papain, and of Fab and Fc from IR 418 digested with trypsin (2%, 4 h). A: unreduced digests; B: digests reduced by 2-mercaptoethanol (5% final concentration).

into a main component: mol. wt. 50,000. Some minor components of mol. wt. 100,000, 66,000 and 11,000 (the latter only noticed in IR 759 digests) were also observed. After reduction of the cleavage products by 2-mercaptoethanol (Fig. 3B) fragments of mol. wt. 38,000 (IgG<sub>1</sub>) or 36,000 (IgG<sub>2a</sub>) and of mol. wt. 13,000 were observed together with the light chain in monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> digests whereas the intact heavy chain was absent. For IgG<sub>2b</sub> a major component of mol. wt. 27,000 and a minor of mol. wt. 36,000 were found associated with the light chain. IgG<sub>2c</sub> digests showed protein bands of mol. wt. 25,000 and 20,000 together with the light chain (and also low amounts of intact heavy chain). Taken together these results suggested that IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> were split by trypsin mainly into Fab and Fc, whereas a different type of cleavage had occurred for IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>. For these two subclasses, light chains appeared undigested whereas the heavy chain was split into two fragments, mol. wt. 13,000 and 36,000 or 38,000. The results of PAGE-SDS analysis suggested that the large heavy chain fragments (mol. wt. 36,000–38,000) were linked to the light chains to constitute the component of mol. wt. 120,000.

In order to determine whether the cleavage of the heavy chain of rat IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> was in the Fd or the Fc part of the IgG molecule, a comparison with the products of papain cleavage was undertaken. Papain releases from IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> a non-covalent Fc (mol. wt. 27,000 for IgG<sub>2a</sub>) and Fab fragments (mol. wt. 46,000–48,000) [7]. Different monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> were split successively with trypsin and papain (or the reverse) and the resulting fragments were compared to purified Fab and Fc by PAGE-SDS analysis. Also the digestion by trypsin of some Fab and Fc from monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> was investigated. The results shown for a monoclonal IgG<sub>2a</sub> (IR 418) (Fig. 4) indicated clearly that Fab was cleaved by trypsin into two components: mol. wt. 30,000 and 13,000 whereas Fc appeared undigested. After reduction by 2-mercaptoethanol, the component of mol. wt. 30,000 was found to be composed of a light chain (mol. wt. 23,000) and of a component of mol. wt. 8,000. The same results were observed for the other monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>. In contrast to the Fab of monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>, Fab of monoclonal IgG<sub>2c</sub> (IR 304) was found insensitive to trypsin cleavage. Furthermore, pepsin plus trypsin cleavage

of monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> showed that F(ab)<sub>2</sub> was also completely cleaved by trypsin. These results showed that trypsin cleavage of rat IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> occurs in the Fd part of the molecule with the release of a fragment of mol. wt. 13,000 related to the N-terminal part of the heavy chain.

## 5. Discussion

Results of these studies showed that rat IgG are differentially affected by tryptic cleavage and that a relation to the IgG subclass can be defined. IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> are split mainly into Fab- and Fc-like fragments although minor components are also released. In the case of IgG<sub>2c</sub>, a large product (mol. wt. 100,000) probably an F(ab)<sub>2</sub>-like fragment is observed after a short time of cleavage. In IgG<sub>2b</sub> digests, the presence of a heavy chain component of mol. wt. 36,000 (i.e. like in IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> digests but without the associated component of mol. wt. 13,000) suggests that a type of cleavage other than production of Fab and Fc has also occurred, but the nature of this cleavage has not been defined. For monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>, the results indicate that short time (4 h) tryptic cleavage split the heavy chain in the Fd with the release of a fragment corresponding to the N-terminal part of the heavy chain. The size of this fragment (mol. wt. 13,000) suggests that it probably represents most of the variable domain of the heavy chain. Such a cleavage has not been described for IgG of other species except occasionally for a monoclonal human IgG<sub>2</sub> [12] and a monoclonal human IgG<sub>3</sub> [13]. Production of a VH fragment has also been reported from papain digestion of a monoclonal human IgG<sub>3</sub> [14]. In all these reported cases the site of cleavage is situated in the third hypervariable region and therefore this explains that it occurs only for very peculiar sequences of this hypervariable zone. On the contrary to these previous reports cleavage of rat IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> appears related to the subclass. In effect, it was observed for several different monoclonal IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> and also for IgG<sub>2a</sub> from normal rat serum. However, in the case of this latter, an additional component of mol. wt. 52,000 was observed and the presence of minor Fab and Fc lines were demonstrated by immunoelectrophoresis. It was also observed that Fab of normal rat IgG<sub>2a</sub> was not entirely split by trypsin. This suggests

that a small part of the population of rat IgG<sub>2a</sub> is split into Fab and Fc and unsplit in the Fd part. It should also be noticed that long-time tryptic cleavage (18 h) or digestion in the presence of cysteine releases from monoclonal IgG<sub>2a</sub> a fragment probably related to the tFc described by Medgyesi [1].

Experiments are now in progress to determine the sequence around the cleavage site for IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>. Nevertheless, at present, results of our studies indicate that it is easy to obtain a fragment related to the VH domain by tryptic cleavage of monoclonal rat IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> whereas such a fragment cannot be obtained from IgG<sub>2b</sub> and IgG<sub>2c</sub> proteins.

#### Acknowledgements

The helpful technical assistance of A. M. Debévère, J. Herno and M. T. Picqué is gratefully acknowledged.

Studies have been supported by LA 268.04 CNRS (G. B.) and by CRL no. 80.3028 INSERM.

#### References

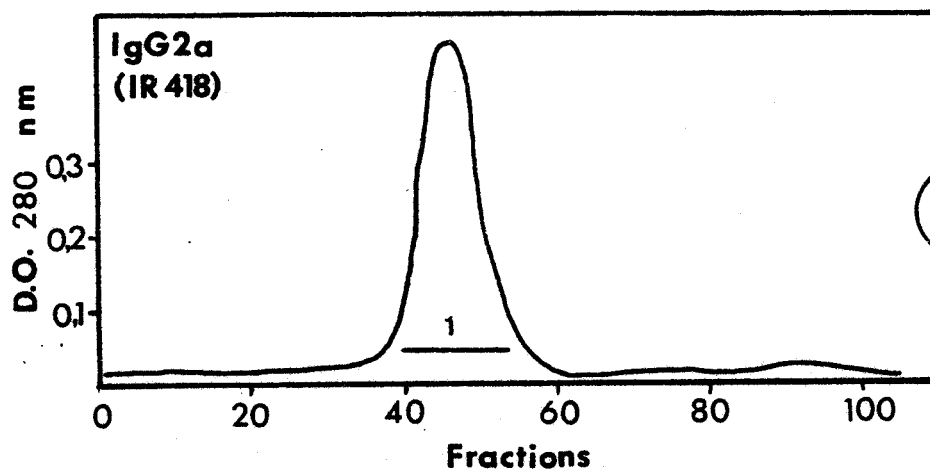
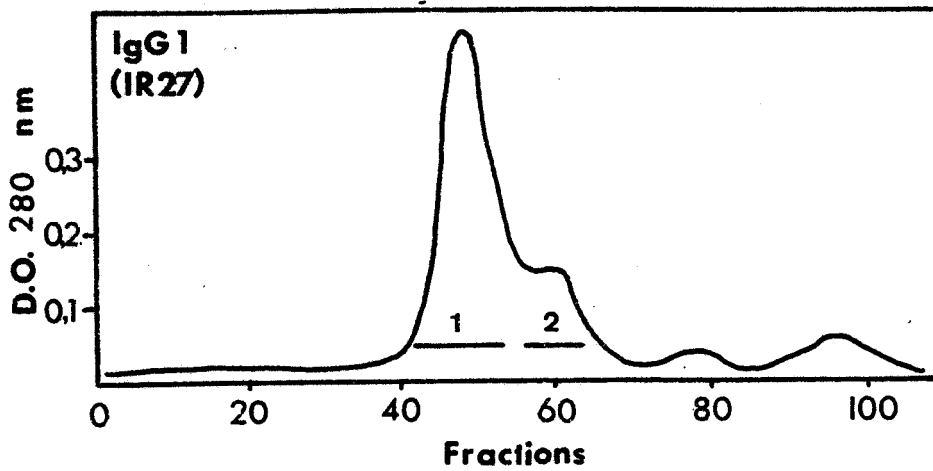
- [1] Medgyesi, G. A., Jakab, M., Csécsinagy, M. and Gergely, J. (1971) *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 6, 405-414.
- [2] Gorini, G., Medgyesi, G. A. and Doria, G. (1969) *J. Immunol.* 103, 1132-1142.
- [3] Nezlín, R. S., Krilov, M. Y. and Rokhlin, O. V. (1973) *Immunochemistry* 10, 651-652.
- [4] Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C. and Heremans, J. F. (1972) *Eur. J. Cancer* 10, 568-580.
- [5] Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C. and Moriamé, C. (1973) *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1359-1361.
- [6] Bazin, H., Beckers, A. and Querinjean, P. (1974) *Eur. J. Immunol.* 4, 44-48.
- [7] Rousseaux, J., Biserte, G. and Bazin, H. (1980) *Mol. Immunol.* 17, 469-482.
- [8] Rousseaux, J., Bazin, H. and Biserte, G. (1981) *Mol. Immunol.* (in press).
- [9] Margolis, J. and Kenrick, K. G. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 347-362.
- [10] Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
- [11] Kerckaert, J. P. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 354-360.
- [12] Laschinger, C. A. and Connell, G. E. (1978) *Immunochemistry* 15, 119-123.
- [13] Parr, D. H. and Hofmann, T. (1980) *Mol. Immunol.* 17, 1-7.
- [14] Dammaco, F., Franklin, E. C. and Frangione, B. (1972) *J. Immunol.* 109, 565-569.

Dans le chapitre I (paragraphe D-3), nous avons montré que les IgG monoclonales de sous-classes IgG2b et IgG2c sont clivées par la trypsine en fragments Fab(t) et Fc(t). A l'inverse, les IgG1 et IgG2a apparaissent résistantes à ce type de clivage, mais deux fragments de poids moléculaire 120 000 et 12 000 daltons étaient mis en évidence par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. Ce chapitre développe la caractérisation de ces deux fragments, en particulier l'identification du polypeptide de 13 000 daltons au domaine variable  $V_H$ , et l'étude du point de clivage par la trypsine.

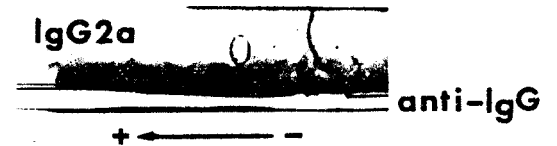
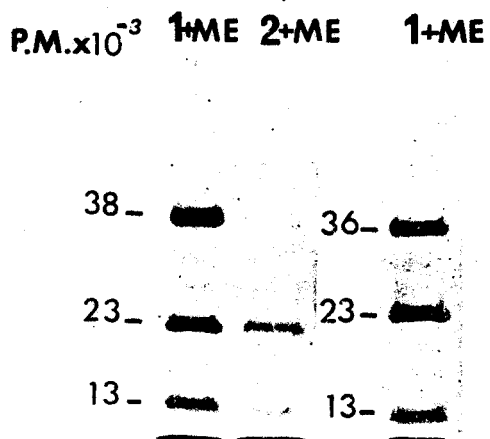
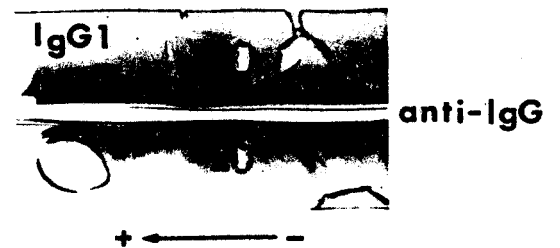
A - MISE EN EVIDENCE D'UN CLIVAGE DES SOUS-CLASSES IgG1 ET IgG2a EN DEUX FRAGMENTS ASSOCIES DE FACON NON COVALENTE

La figure 43 montre la séparation obtenue par chromatographie sur Ultrogel AcA 44 d'une IgG1 monoclonale (IR 27) et d'une IgG2a monoclonale (IR 418) préalablement incubées avec la trypsine (rapport enzyme/protéine 2 %) 4 heures à 37° C. Le profil d'élution de l'IgG2a met en évidence un seul pic dont le poids moléculaire apparent est identique à l'IgG non digérée (environ 155 000 daltons). Dans le cas de l'IgG1, ce pic majeur est suivi d'un deuxième pic (mineur) d'environ 60 000 daltons. Les contrôles par immunoélectrophorèse montrent la présence d'arcs de précipitation de mobilités Fab et Fc dans cette deuxième fraction, alors que la fraction ayant le poids moléculaire de l'IgG donne un seul arc de précipitation de mobilité identique à l'IgG non digérée. L'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS de cette fraction montre pour l'IgG1 comme pour l'IgG2a, la présence de deux fragments de poids moléculaire 120 000 et 13 000 daltons. Après réduction des ponts disulfures par le mercaptoéthanol, 3 polypeptides sont obtenus : la chaîne légère (23 000 daltons), un polypeptide de 13 000 daltons et un autre de 36 000 (IgG2a) ou 38 000 daltons (IgG1) ; on note l'absence de la chaîne lourde intacte. Les mêmes résultats ont été observés pour d'autres IgG1 monoclonales (IR 595, IR 656, IR 766) et d'autres IgG2a (IR 33, IR 530) ainsi que pour des IgG1 et IgG2a isolées du sérum normal. Ces résultats permettent de conclure que la trypsine clive les IgG1 et IgG2a en deux fragments (120 000 et 13 000) étroitement associés de façon non covalente et que le site de clivage est situé sur la chaîne lourde  $\gamma$ . Ils suggèrent également que le fragment de poids moléculaire 120 000 daltons est

Figure 43.- Chromatographie sur Ultrogel AcA 44 (colonne 2,6 x 90 cm ; débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 4 ml) d'IgG1 monoclonale IR 27 et d'IgG2a IR 418 après hydrolyse par la trypsine (4 h à 37°C avec un rapport enzyme/protéine de 2 %). La partie inférieure de la figure présente les contrôles des fractions obtenues par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS et par immunoélectrophorèse. + ME : Echantillons réduits par le mercaptoéthanol.



BU  
LILLE



formé par l'association de deux chaînes légères et de deux polypeptides de 36 000 daltons (IgG2a) ou 38 000 daltons (IgG1).

## B - LOCALISATION DU SITE DE CLIVAGE TRYPSIQUE DANS LA PARTIE Fd DE LA MOLECULE D'IgG

Pour déterminer si le site de clivage trypsique était localisé dans la partie Fc ou la partie Fd de la chaîne lourde  $\gamma$ , une comparaison avec les produits de digestion par la papaïne a été effectuée. Différentes IgG1 et IgG2a monoclonales ont été clivées successivement par la papaïne et la trypsine. Les fragments Fab et Fc purifiés ont également été soumis à l'hydrolyse trypsique. L'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS des fragments obtenus (figure 4 de l'article n° 6, page 177) indique clairement que le fragment Fab est clivé par la trypsine en deux fragments de poids moléculaire 30 000 et 13 000 daltons, alors que le Fc est résistant à l'hydrolyse trypsique. Après réduction par le mercaptoéthanol, le fragment de poids moléculaire 30 000 donne deux polypeptides de poids moléculaires 8 000 et 23 000 daltons (chaîne légère). A l'inverse des Fab d'IgG1 et d'IgG2a monoclonales, le Fab d'IgG2c (IR 304) se révèle résistant à l'hydrolyse trypsique (résultats non présentés). L'ensemble de ces résultats indique que la trypsine clive les IgG1 et IgG2a dans la partie Fab de la molécule (et plus particulièrement dans la partie Fd) et que le fragment de poids moléculaire 13 000 correspond à la partie N-terminale de la chaîne lourde.

## C - ISOLEMENT DES FRAGMENTS DE 120 000 ET 13 000 DALTONS, ET ETUDES STRUCTURALES

### 1. ISOLEMENT DES FRAGMENTS 1 ET 2

Les fragments de 120 000 et 13 000 daltons (que nous dénommerons 1 et 2 respectivement) ont été isolés de différentes IgG1 et IgG2a monoclonales : IR 27 (IgG1), IR 33, IR 418, IR 530 (IgG2a), ainsi que de l'IgG2a de sérum de Rat. Leur purification a été réalisée par chromatographie de filtration sur gel de Séphacryl SF-200 (PHARMACIA), en urée 4 M, acide propionique M. La figure 44A montre le profil d'élution obtenu pour l'IgG2a IR 418 clivée par la trypsine 2 % (4 heures à 37° C) et le contrôle de pureté des fragments 1 et 2.



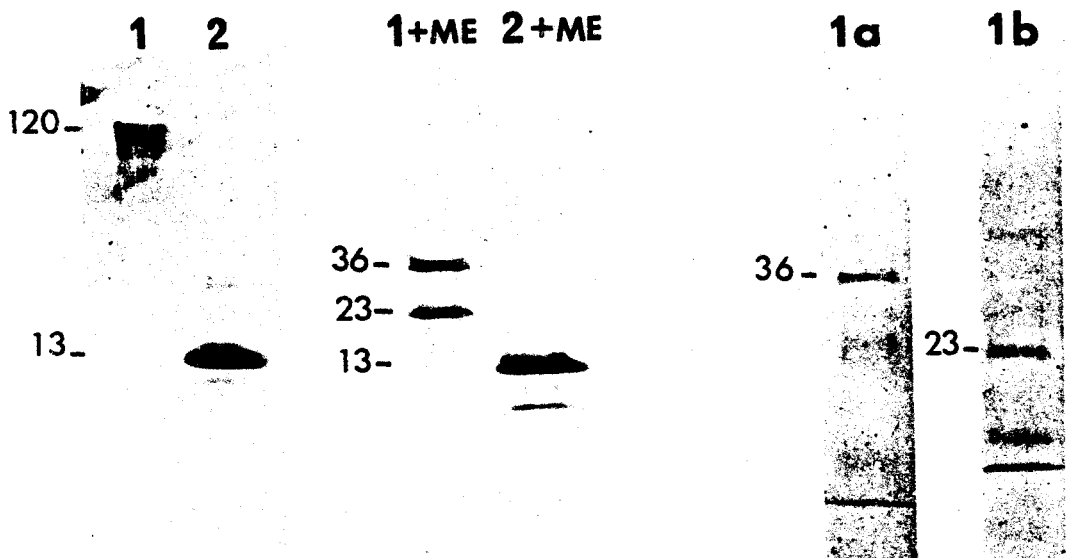
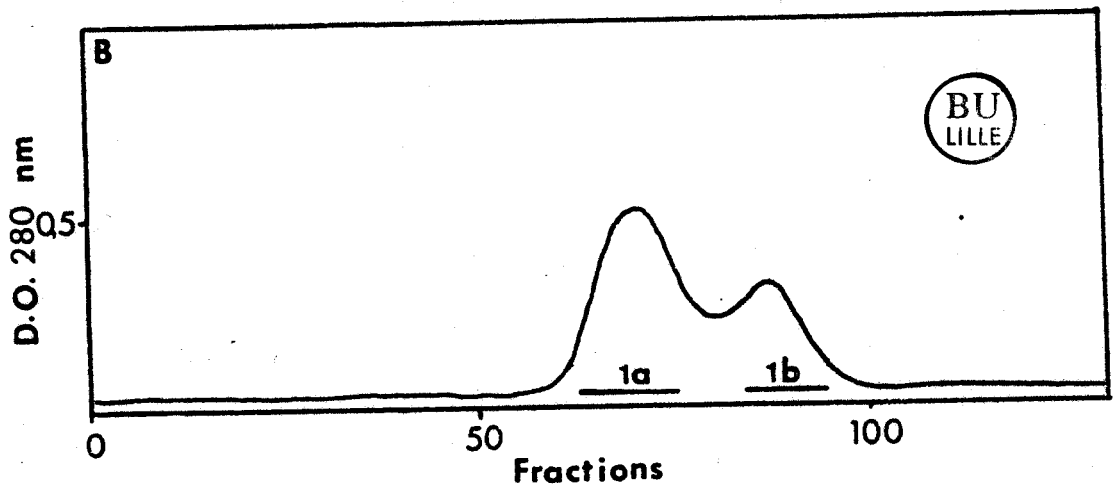
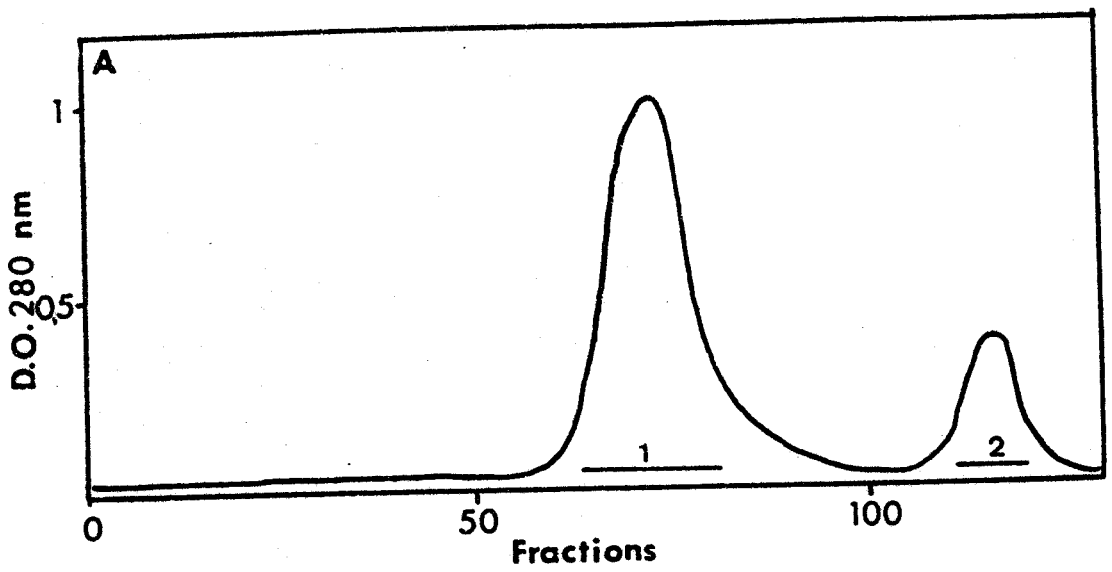
Figure 44.- Purification des fragments obtenus par hydrolyse trypsique de l'IgG2a monoclonale IR 418 (digestion de 300 mg de protéine, 4 h à 37°C, avec un rapport enzyme/protéine de 2 %).

A : Chromatographie de l'hydrolysate sur Séphacryl-SF 200 (colonne 5 x 90 cm ; débit : 45 ml/h ; volume des fractions : 15 ml) en urée 4 M, acide propionique M.

B : Chromatographie de la fraction 1 réduite par le dithiothreitol 0,01 M et alkylée par l'acide iodoacétique 0,03 M, sur Séphadex-G 150 (colonne 2,6 x 90 cm, débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 5 ml) en urée 4 M, acide propionique M.

La partie inférieure de la figure présente le contrôle de pureté des fractions obtenues (1, 2, 1a et 1b), par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. Les chiffres sur la gauche des électrophorégrammes indiquent le poids moléculaire ( $\times 10^{-3}$ ).

+ ME : échantillons réduits par le mercaptoéthanol.



## 2. ETUDE STRUCTURALE DU FRAGMENT 2 (13 000 DALTONS)

L'analyse de l'acide aminé N-terminal du fragment 2 a été réalisée par dansylation en milieu SDS (ISHITANI, NIITSU et LITKOWSKY, 1975). Aucun acide aminé N-terminal ne pouvait être identifié de façon précise pour le fragment obtenu de l'IgG1 IR 27 et des IgG2a IR 418 et 530, suggérant donc l'existence d'un N-terminal bloqué. A l'inverse, l'acide aminé N-terminal du fragment 2 de l'IgG2a IR 33 était identifié comme étant l'acide glutamique.

La séquence N-terminale du fragment 2 de l'IR 33, déterminée par dégradation automatique d'Edman est présentée dans la figure 45. Cette séquence est identique à la séquence N-terminale de la chaîne  $\gamma$  de l'IgG2a IR 33 déterminée précédemment par QUERINJEAN et al. (1974).

L'étude de l'extrémité C-terminale du fragment 2 de l'IR 33 a été réalisée par digestion par carboxypeptidases A et B en présence de SDS 0,056 M (AMBLER, 1973). Les acides aminés libérés après des hydrolyses de 5 heures et 16 heures à 37° C sont présentés dans le tableau 9. Ils suggèrent une séquence C-terminale :... Arg-Leu-Lys. L'arginine pourrait cependant aussi provenir d'un site de clivage mineur par la trypsine. En effet, après réduction par le mercaptoéthanol, le fragment 2 présente une chaîne polypeptidique mineure de poids moléculaire 10 000 (voir figure 44) dont l'extrémité C-terminale pourrait être l'arginine.

En conclusion, le fragment de 13 000 daltons a une séquence N-terminale identique à celle de la chaîne lourde  $\gamma$ . Sa taille moléculaire suggère qu'il correspond à la totalité du domaine variable de la chaîne lourde (domaine  $V_H$ ). Cependant, l'étude de l'extrémité C-terminale de ce fragment ne permet pas de la localiser précisément dans la séquence de la chaîne lourde  $\gamma$ .

## 3. ETUDE STRUCTURALE DU FRAGMENT 1 (120 000 DALTONS)

L'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS du fragment 1 isolé de l'IgG2a IR 418 montrait qu'il était formé par l'association covalente de deux chaînes

Tableau 9. - ETUDE DE L'EXTREMITE C-TERMINALE DES FRAGMENTS 1a ET 2.

Détermination des acides aminés libérés par hydrolyse par les carboxypeptidases A et B, en présence de SDS 0,056 M (AMBLER, 1973), (hydrolyse de 5 h et 16 h à 37° C). Les résultats sont présentés sous forme de mole d'acide aminé libéré par mole de polypeptide.



	5 HEURES	16 HEURES
Fragment 1a	Glycocolle : 0,05	Glycocolle : 0,12 Thréonine : 0,07
Fragment 2	Leucine : 0,50 Lysine : 0,58	Leucine : 0,80 Lysine : 0,90 Arginine : 0,17

Fragment 2 de l'IgG2a IR 33

1 10  
Glu-Ala-Val-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly

Séquence N-terminale de la  
chaîne  $\gamma$ 2a de l'IR 33  
(Querinjean *et al.*, 1974)

1 10  
Glu-Ala-Val-Leu-Val-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Gly

Fragment 1a (IgG2a IR 418)

1 10 15  
Ser-Asn-Ser-Met-Val-Thr-Leu-Gly-CMCys-Leu-Val-Lys-Gly- X -Phe

Séquence 139-153 de la chaîne  
 $\gamma$  de l'IgG1 MOPC 21  
(Adetugbo, 1978)

139 153  
Ser-Gln-Ser-Met-Val-Thr-Leu-Gly- Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Tyr-Phe



Figure 45.- Séquence N-terminale du fragment 2 obtenu par hydrolyse trypsique de l'IgG2a IR 33 et du fragment 1a purifié de l'hydrolysate trypsique de l'IgG2a IR 418. La séquence du fragment 2 est identique à la séquence N-terminale de la chaîne  $\gamma$ 2a de l'IR 33. La séquence du fragment 1a présente une homologie très importante avec la séquence 139-153 de l'IgG1 de Souris MOPC 21 (séquence située au début du domaine  $C\gamma_1$ ).

polypeptidiques de 23 000 daltons (poids moléculaire identique à la chaîne légère) et de deux polypeptides de 36 000 daltons. Les ponts disulfure inter-chaînes reliant ces polypeptides ont été réduits par le dithiothréitol 0,01 M en tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 8,6 et les thiols alkylés par l'acide iodoacétique 0,03 M à pH 8.

Les polypeptides de 36 000 et 23 000 daltons ont été séparés par filtration sur gel de Séphadex-G150 en urée 4 M-acide propionique M. La figure 44B présente le profil d'éluion obtenu et le contrôle des deux pics obtenus 1a et 1b, par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS. La fraction 1a correspond au polypeptide de 36 000 daltons. La fraction 1b a un poids moléculaire identique à la chaîne légère (23 000 daltons).

Les résultats des analyses de la séquence N-terminale des pics 1a et 1b sont présentés dans la figure 45. La polypeptide 1b a une séquence N-terminale identique à celle de la chaîne légère d'IR 418. La séquence N-terminale du polypeptide 1a (qui correspond au fragment de 36 000 daltons) a été comparée avec les séquences des domaines variables  $V_H$  et des domaines  $C_H1$  actuellement connues. Cette comparaison a mis en évidence une homologie très importante avec la séquence 139-153 de l'IgG1 MOPC 21 (ADETUGBO, 1978). Cette séquence est située dans la partie N-terminale du domaine  $C_H1$  (voir première partie, chapitre II, paragraphe C, figure 7). Elle n'est cependant pas située au tout début de ce domaine, qui commence à l'acide aminé en position 121 pour la chaîne  $\gamma 1$  de l'IgG MOPC 21.

L'analyse de l'acide aminé C-terminal, du fragment de 36 000 daltons, a été effectuée par hydrolyse par les carboxypeptidases A et B en SDS 0,056 M (AMBLER, 1973). Les résultats obtenus (tableau 9) montrent la libération très faible de glycolcolle au bout de 24 heures (0,12 mole/mole). Ceci suggère que l'extrémité C-terminale de ce fragment est identique à celle de la chaîne  $\gamma$ , c'est-à-dire la séquence Pro-Gly commune à la plupart des chaînes  $\gamma$  de différentes espèces (voir première partie, Chapitre II, Paragraphe D).

Les résultats des études structurales sont résumées de façon schématique dans la figure 46. On peut conclure que le fragment 1 (120 000

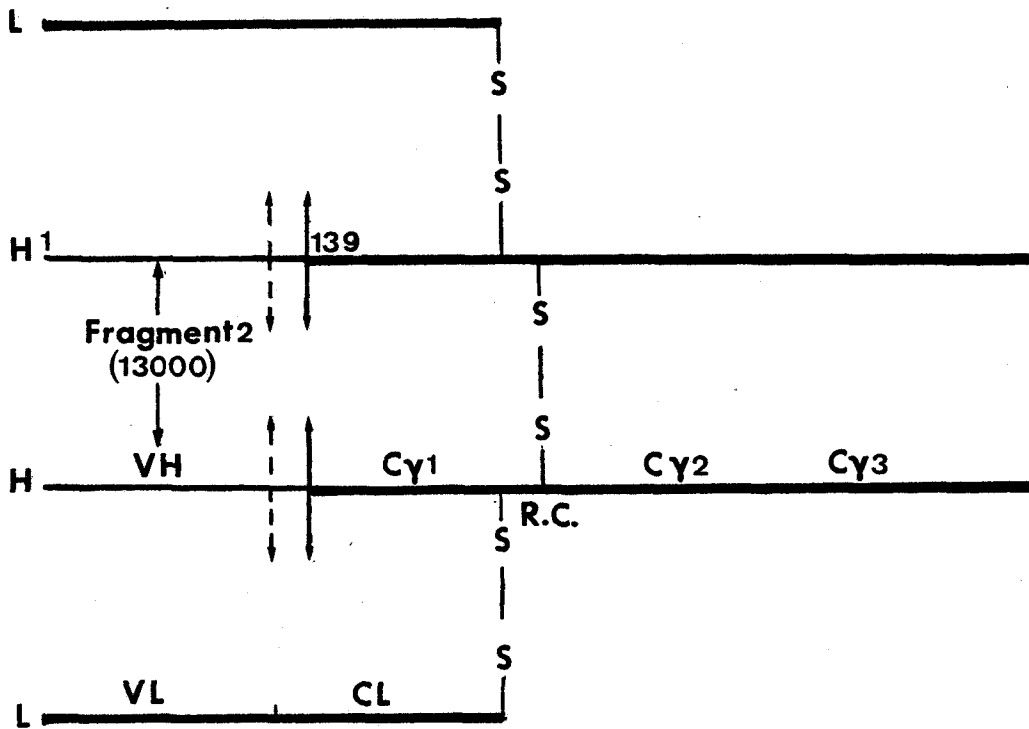


Figure 46.- Schéma résumant la structure des fragments 1 et 2 obtenus par hydrolyse trypsique des IgG2a. Le fragment 1 de 120 000 daltons (en traits pleins) est formé par l'association de deux chaînes légères et de deux fragments de chaîne lourde dont la séquence débute à un résidu d'acide aminé homologue du résidu 139 de la chaîne  $\gamma_1$  de l'IgG1 de Souris MOPC 21 (Adetugbo, 1978). Le fragment 2 (13 000 daltons) correspond au domaine variable VH. La flèche en traits pleins correspond au début du fragment de chaîne lourde constituant le fragment 1. La flèche en pointillés correspond à la jonction entre domaine VH et domaine  $C\gamma_1$ . R.C. : région charnière.

daltons) est constitué de l'IgG dépourvue du domaine  $V_H$  et du début du domaine  $C_H1$  (environ 15 acides aminés), alors que le fragment 2 correspond au domaine variable  $V_H$  et peut-être au début du domaine  $C_H1$ .

#### D - CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude montrent que l'hydrolyse trypsique des IgG de sous-classes IgG1 et IgG2a conduit à la formation de deux fragments étroitement associés de manière non covalente : l'un correspond au domaine variable  $V_H$ , l'autre à l'IgG dépourvue des domaines  $V_H$ . Les analyses structurales indiquent que le site de clivage est probablement situé en une position du domaine  $C^{\gamma}1$  homologue du résidu 138 de la chaîne  $\gamma 1$  de Souris. Cette localisation au début du domaine  $C^{\gamma}1$  suggère que les chaînes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2a$  de Rat possèdent dans ce domaine un résidu de lysine accessible au clivage trypsique, alors que ce résidu est absent dans les chaînes  $\gamma 2b$  et  $\gamma 2c$ . Cette particularité structurale au sein d'un domaine constant expliquerait que ce clivage soit une caractéristique de deux sous-classes. Cependant, nos études ne peuvent exclure l'existence d'un (ou plusieurs) autre site de clivage situé en une position N terminale par rapport à celui identifié : par exemple, un deuxième site de clivage situé à la jonction entre partie variable et partie constante de la chaîne lourde  $\gamma$ , aboutissant à la perte d'un peptide correspond au début du domaine  $C^{\gamma}1$ . Il faut également noter que le site de clivage identifié par notre étude est situé au-delà du résidu de cystéine impliqué dans la liaison entre chaîne lourde et chaîne légère de plusieurs sous-classes d'IgG, sauf l'IgG1 humaine, l'IgG1 de Souris et l'IgG1 de Cobaye (pour lesquelles le pont inter-HL est formé par une cystéine située dans la région charnière). Nos résultats impliquent donc, si le site de clivage est situé en une position homologue du résidu 138 de la chaîne  $\gamma 1$  de Souris, que le pont inter-HL des IgG1 et IgG2a de Rat soit situé au niveau de la région charnière (voir figure 47). En effet, si le pont inter-HL était situé au début du domaine  $C^{\gamma}1$ , il faudrait admettre que le site de clivage trypsique soit en position N terminale par rapport à ce pont disulfure, c'est-à-dire avant le résidu 135. Dans ce cas, le clivage en position 138 se serait produit secondairement, au cours des étapes de purification.



Si l'on compare les résultats obtenus dans notre étude à ceux déjà rapportés dans la littérature, on constate que le clivage par la trypsine aboutissant à la production d'un fragment de type  $V_H$ , a été décrit comme une éventualité exceptionnelle pour les IgG humaines. En effet, quelques immunoglobulines monoclonales humaines : IgG KUP (DAMMACO, FRANKLIN et FRANGIONE, 1972), IgG1 ZIE (LASCHINGER et CONNELL, 1978) et IgG PAV (PARR et HOFMANN, 1980) sont clivées par la trypsine avec production d'un fragment  $V_H$ . Ce clivage n'est pas une caractéristique de sous-classe ; il est situé dans la troisième zone hypervariable du domaine  $V_H$  et correspond vraisemblablement à la présence d'une arginine (position 96) dans cette zone hypervariable. Les IgG clivées en cette position par la trypsine ont en commun la propriété d'être des cryoglobulines, propriété qui serait liée à la structure primaire particulière de la troisième zone hypervariable (PARR et HOFMANN, 1980).

Dans notre étude, les résultats sont très différents, puisque le clivage tryptique avec production d'un fragment  $V_H$  est une caractéristique de deux sous-classes : IgG1 et IgG2a. De plus, le site de coupure n'est pas situé dans le domaine variable, mais semble être localisé à un résidu de lysine homologue du résidu 138 de la chaîne  $\gamma 1$  de souris, c'est-à-dire une position correspondant au début du domaine  $C\gamma 1$ . Comment expliquer cette propriété particulière aux chaînes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2a$  de Rat ? Si l'on examine les séquences connues de différentes chaînes lourdes  $\gamma$  (voir les figures 5, 7 et 9 de la première partie, Chapitre II), on constate qu'il n'existe pas de résidu d'acide aminé susceptible d'être clivé par la trypsine (lysine ou arginine) en position homologue du résidu 138 de la chaîne  $\gamma 1$  de Souris. L'absence d'un tel résidu d'acide aminé pour les autres chaînes  $\gamma$ , et, à l'inverse la présence d'un résidu de lysine pour les chaînes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2a$  de Rat pourrait expliquer ce clivage tryptique tout à fait inhabituel.

Une autre particularité du clivage tryptique des sous-classes IgG1 et IgG2a est sa localisation à l'intérieur d'un domaine (domaine  $C\gamma 1$ ) alors que la plupart des sites de clivage enzymatique des IgG sont situés, soit dans la région charnière, soit dans les zones de flexibilité entre les domaines. Nous avons recherché une explication à ce phénomène en examinant le modèle de structure tridimensionnelle du domaine  $C\gamma 1$  défini à partir des études

cristallographiques de l'IgG1 humaine KOL (HUBER et al., 1976 ; DEISENHOFER et al., 1976). Si on replace (par analogie) le résidu de lysine présumé en position 138 dans les chaînes  $\gamma$  1 et  $\gamma$  2a de Rat, on constate qu'il est situé dans une zone de repliement de la chaîne correspondant à un coude  $\beta$ . Cette localisation pourrait expliquer l'accessibilité au clivage tryptique. En effet, les coudes  $\beta$  sont souvent situés à la surface de la molécule, par exemple ceux auxquels sont attachés les copules glucidiques (AUBERT, BISERTE et LOUCHEUX-LEFEBVRE, 1976). Il existe d'autres exemples de clivages enzymatiques situés à l'intérieur d'un domaine : le site de coupure pepsique situé à la fin du domaine C $\gamma$  2 (position 333 dans l'IgG1 humaine), ou l'un des sites de clivage par la papaine aboutissant à la formation du Fc' (position 433 dans l'IgG1 humaine) (voir figure 1 de la première partie, Chapitre II). Or, l'examen de leur position dans la structure tridimensionnelle de l'IgG montre qu'ils sont également situés dans des coudes  $\beta$ .

**CHAPITRE III**

---

**ETUDES CONFORMATIONNELLES DES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT**

Publication n° 7

- COMPARATIVE STUDY OF THE CONFORMATIONAL FEATURES OF RAT IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES BY CIRCULAR DICHROISM  
J. ROUSSEAU, JP. AUBERT et MH. LOUCHEUX-LEFEBVRE (1982)  
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 701, 93-101.

BBA 31053

## COMPARATIVE STUDY OF THE CONFORMATIONAL FEATURES OF RAT IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES BY CIRCULAR DICHROISM

J. ROUSSEAU, J.-P. AUBERT and M.-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE

*Institut de Recherches sur le Cancer et Unité 124 INSERM (Prof. G. Biserte), BP 311, 59020 Lille Cedex (France)*

(Received May 29th, 1981)

(Revised manuscript received September 25th, 1981)

*Key words: Immunoglobulin G; Circular dichroism; Conformation; (Rat)*

Four subclasses of rat immunoglobulin G and some of their fragments were studied by circular dichroism. These studies were carried out in different conditions in order to determine whether conformational differences exist between each subclass. The results showed that in their native state the subclasses cannot be distinguished by characteristic differences. Moreover, differences between monoclonal immunoglobulins G of the same subclass were found, particularly in the 200-250 nm region, and their relationship to aromatic side chain contributions (especially those of tyrosine) has been investigated. However, the conformations of the immunoglobulin G were found to be differently affected by denaturing treatments and a relation to subclass has been demonstrated.

### Introduction

Immunoglobulins G are divided into subclasses in several species of mammals including man. These subclasses are distinguished by biological and physico-chemical properties (for review see ref. 1) as well as by some features of the primary structure of their constant domains. Structural differences are mainly located in the hinge region of the IgG molecule [2], but significant differences have also been found in the C<sub>γ1</sub> domain for mouse IgG1 and IgG2a [3,4] and in the C<sub>γ3</sub> domain for guinea-pig IgG1 and IgG2 [5]. Conformational studies by circular dichroism have also shown differences between the subclasses of human IgG; in particular, characteristic features either for IgG3 or for IgG1 and IgG2 have been pointed out [6].

In the rat, four IgG subclasses have been identified: IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c [7]. Differences in biological properties among these sub-

classes have been reported: complement binding [8,9], affinity for macrophages [10], eosinophils [11], mast cells [12] and affinity for protein A from *Staphylococcus aureus* [8]. Some physico-chemical differences have also been found, in particular sensitivity to reductive cleavage [13] and proteolytic enzymes [14].

The present work is devoted to the conformational features of rat IgG subclasses observed by circular dichroism. The studies were performed on several monoclonal immunoglobulins G produced by the immunocytomas of the LOU/Wsl strain [15,16] and, for some subclasses, on their papain Fab and Fc fragments. Circular dichroic spectra were recorded on the proteins both in their native state and after treatments capable of affecting their secondary and tertiary structures: heating at 56°C, acid pH and the chaotropic salt NaSCN. The results show that, whereas no clear-out differences can be found between subclasses in their native state, the conformations of the subclasses are differentially affected by denaturing treatments.

Abbreviation: IgG, immunoglobulin G.

**Materials and Methods**

*Isolation of rat IgG.* Monoclonal rat IgG and IgG2a from normal rat serum were prepared using procedures previously described [7,14,17].

*Isolation of papain Fab and Fc fragments.* Digestion of monoclonal (or normal) IgG2a was performed for 2 h in the presence of 1% (w/w) papain and 0.01 M cysteine, as previously described [14]. The papain Fab and Fc fragments were purified by chromatography on Ultrogel AcA 44 (LKB, Sweden) in 0.01 M phosphate buffer/0.15 M NaCl, pH 7.4, followed by chromatography on DEAE-cellulose DE-32 (Whatman) equilibrated in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.8. Elution was performed in the same buffer followed by phosphate buffers at pH 6.8 with different molarities: 0.01, 0.05 and 0.2 M.

Papain digestion of monoclonal IgG1 was performed as for IgG2a except that the digestion time was 18 h; the purification of corresponding Fab and Fc fragments was achieved as for rat IgG2a.

Digestion of monoclonal IgG2c was performed in the same conditions as for IgG2a. Purification of Fab and Fc fragments was conducted by DEAE-cellulose chromatography in the conditions described before for IgG2a. However, purification of the Fc fragment was not complete in these conditions and so was not studied here.

The purity of the isolated fragments was assessed by immunoelectrophoresis (with antisera to rat serum proteins and antisera specific for the

IgG subclasses), and by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate (SDS) [18].

*Amino acid composition.* Amino acid analyses of purified monoclonal IgG and Fc fragments were performed on a JEOL 5AH amino acid analyser after 24 and 72 h hydrolysis with 6 N HCl in the presence of phenol to protect degradation of tyrosine residues. Results were expressed as molar ratios assuming a total of 1300 residues for whole IgG and 428 residues for Fc.

*Circular dichroism studies.* The dichroic spectra were recorded with a JOBIN-YVON MARK III dichrograph. The cells used were of 0.01–1 cm path length. Concentrations, determined by Bio-Rad protein assay [19] taking as reference bovine  $\gamma$ -globulin, were always between 0.5 and 1 mg/ml. The results are expressed as  $[\theta]$  in  $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ , taking 111 as the mean residue weight. The solvent used was 0.01 M phosphate buffer/0.214 M NaF, pH 7.4. For the variations with pH, the proteins were dialysed against either 0.1 M acetate buffer, pH 4.5 or 4, or 0.05 M formate buffer, pH 3.5 or 2.8. Treatment by NaSCN was performed as follows: proteins were dissolved in 0.01 M phosphate buffer/0.15 M NaCl/3 M NaSCN, pH 7.4, and kept for 3 h at room temperature. They were then dialysed to 0.01 M phosphate buffer/0.214 M NaF, pH 7.4.

Temperature was varied between 4 and 56°C and checked with a platinum probe plunged directly into the solutions.

TABLE I

SUMMARY OF THE CONFORMATIONAL CHANGES INDUCED BY HEATING AT 56°C, ACID pH, AND 3 M NaSCN ON RAT IgG SUBCLASSES

Subclasses	Heating at 56°C	Incubation at acid pH (2.8)	Treatment with 3 M NaSCN
IgG1	Increase of the negative band at 217 nm (25%)	Displacement of the negative band from 217 to 198 nm	Decrease of the negative band at 217 nm (16%)
IgG2a	No modification	No modification	Decrease of the negative band at 217 nm (35%)
IgG2b	No modification	Increase of the negative band at 217 nm (48%)	Increase of the negative band at 217 nm (29%)
IgG2c	Increase of the negative band at 217 nm and displacement to 214 nm (25%)	Displacement of the negative band from 217 to 198 nm	No modification

## Results and Discussion

Monoclonal IgG belonging to the four rat IgG subclasses and IgG2a from normal rat serum were studied by circular dichroism. In addition the circular dichroic spectra of some of the papain Fab and Fc fragments were also determined. The proteins were analysed both in their native state and after the following treatments: heating at 56°C, incubation at acid pH (from 4.5 to 2.8), incubation in 3 M NaSCN. As a large number of spectra were recorded, only the most significant results are given in the figures. The other results are summarized in Table I.

### Studies of the native IgG and their fragments

**IgG1.** Two monoclonal immunoglobulins G1 (IR 27 and IR 595) were studied together with the Fab fragment from protein IR 595. Both immunoglobulins G1 exhibited two negative dichroic bands (Fig. 1). The more intense band at 217 nm is representative of  $\beta$  pleated sheet structure. Another weak negative band at 230 nm for IR 595 and at 240 nm for IR 27, together with, for IR 27, another transition at 234 nm, were also observed.

Since circular dichroic spectra in the peptide chromophore region can be seen as a linear combination of conformationally related subspectra, we

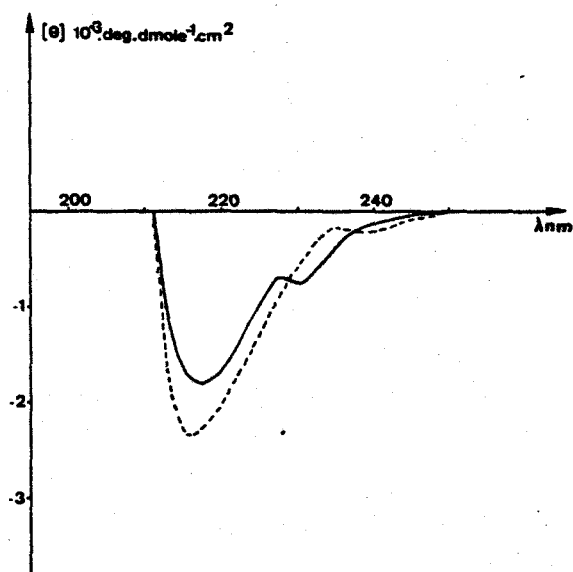


Fig. 1. Intrinsic circular dichroic spectra of IgG1 IR 595 (—) and IgG1 IR 27 (-----).

have tried to determine the percentage of different secondary structures for IR 27 and IR 595 proteins, and (see further) for immunoglobulins G of other subclasses. The curves have been analysed by the procedure of Chen et al. [20] and Chang et al. [21]. In the first calculations [20] the authors consider two types of secondary structures ( $\alpha$  helix and  $\beta$  pleated sheet) and the remainder as un-ordered structure. In the second calculation [21] the authors take into account a  $\beta$ -turn contribution. Their basic spectrum was not experimentally measured but extracted from different proteins. The calculation we have carried out, using either the first or the second method failed to obtain a coherent result. It is not impossible to think as observed by Brahms and Brahms [22] that this is essentially due to the fact that some aromatic side chains generate dichroic effects in the peptide domain. In effect in the near ultraviolet region we have considered in this study the proteins exhibit positive and negative dichroic bands, unrelated to the polypeptide backbone and arising from disulfide bonds and side chain aromatic amino acids located in asymmetric environments. These bands could be a source of error for the conformational analysis. This contribution of aromatic side chains could be preponderant with proteins giving weak CD amide bands such as immunoglobulins which are  $\beta$  pleated sheet-rich proteins [23].

Brahms and Brahms [22] as well as Cathou et al. [23] and Dorrington et al. [24] have suggested that at 230 [22] or 234 nm [23,24] the main contribution arises from tyrosine residues. For example, the experimental CD spectrum of the variable domain of Bence Jones protein REI does not fit the calculated spectrum in the region 220–250 nm [22]; it exhibits a positive band centered at 230 nm that could be related to the presence of tyrosine with a CD contribution which overlaps that of the amide band. Indeed, this immunoglobulin fragment has a very large proportion of  $\beta$  sheet structure and contains eight tyrosine out of 108 residues (7.04%) [25]. Also Dorrington et al. [24] have found, for human Fc, a positive transition at 234 nm that is not present in pFc, these two fragments differing only by a small sequence containing two tyrosine residues. However, in the latter case the observations are opposed to those of Brahms and Brahms, as the loss of tyrosine

induces an increase of the positive contribution at 234 nm and not a decrease as expected by Brahms and Brahms. Such a result would be in good agreement with a negative dichroic band due to the tyrosine residues as previously observed at 230 nm for pooled human IgG (Dorrington et al. [24]) and at 225 nm for rabbit IgG (Stewart et al. [26]).

Therefore differences in the CD observed in the region 230 nm between IR 27 and IR 595 and (see further) between monoclonal (or normal) immunoglobulins G2a could be linked to different contributions of tyrosine residues, either the number of tyrosines in the whole protein or the localization of these residues. Amino acid analyses of proteins IR 27 and IR 595 showed slight differences in their tyrosine content: 54 tyrosine residues out of 1300 in IR 27 and 49 in IR 595. These differences are rather small and it is not certain that they contribute to the differences in the CD spectra at 230 nm. However, as IR 27 and IR 595 are two proteins of the same subclass and have the same type of light chain (kappa), that is, they exhibit the same sequence in the constant part of light and heavy chains, one can assume that the differences in tyrosine content are located in the variable domains of the light and heavy chains. Since this region is especially rich in  $\beta$  pleated sheet structure, the contribution of tyrosine residues might be important.

Therefore, it appears that the possible contribution of the side chains explains the impossibility to calculate with a good accuracy the proportions of different structures by standard methods from the 200–250 nm region. For this reason, only a qualitative appreciation of the dichroic spectra recorded for each immunoglobulin will be made.

The CD spectrum of the Fab fragment from IR 595 resembles the whole protein, in particular with the same weak negative band at 230 nm (data not shown).

*IgG2a*. Three monoclonal immunoglobulins G of this subclass: IR 33, IR 418 and IR 530, in addition to IgG2a from normal rat serum, were studied. The four dichroic spectra are given in Fig. 2. Their shapes are similar and they are reminiscent of the spectra obtained from monoclonal IgG1, with an intense band at 217 nm, in agreement with the presence of  $\beta$  sheet structure. However, some differences are observed: in the region

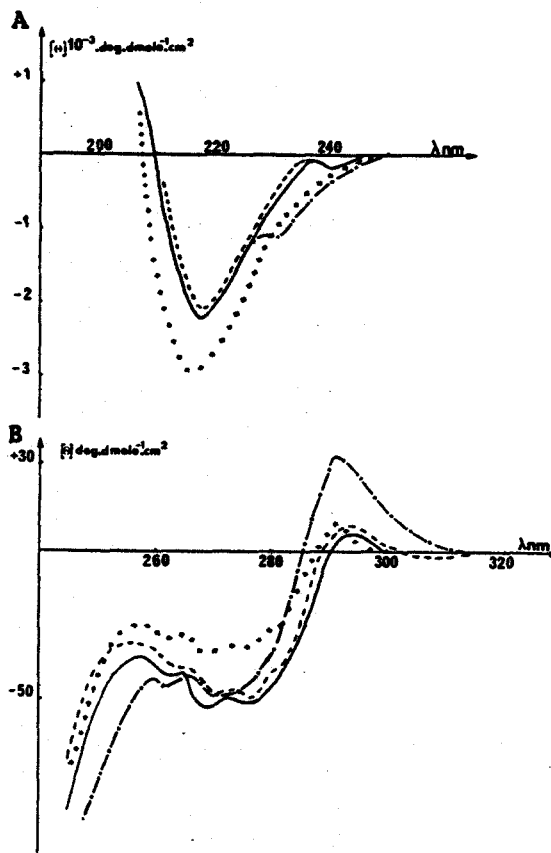


Fig. 2. Aromatic and intrinsic circular dichroic spectra of IgG2a from normal rat serum (—); IgG2a IR 530 (· · · · ·); IgG2a IR 33 (- - - - -) and IgG2a IR 418 (+ + +).

200–250 nm (Fig. 2A) a weak negative band at 230 nm is present for IgG2a IR 530 and at 240 nm for normal IgG2a; also IgG2a IR 530 shows a larger positive contribution at 292 nm than that observed for other immunoglobulins G2a (Fig. 2B).

Whereas the CD spectrum of Fab fragment from IR 530 looks like that of the whole protein, the dichroic spectra of two Fc fragments (one from normal IgG2a and the other from monoclonal IR 530) are very different from the whole protein in the region 200–250 nm (Fig. 3). They show, besides the  $\beta$  sheet structure band at 217 nm another band at 230 nm with about the same intensity. As these differences of shape in the 230 nm region could be linked to aromatic side chain contributions [22–24] the content of tyrosine in proteins IR



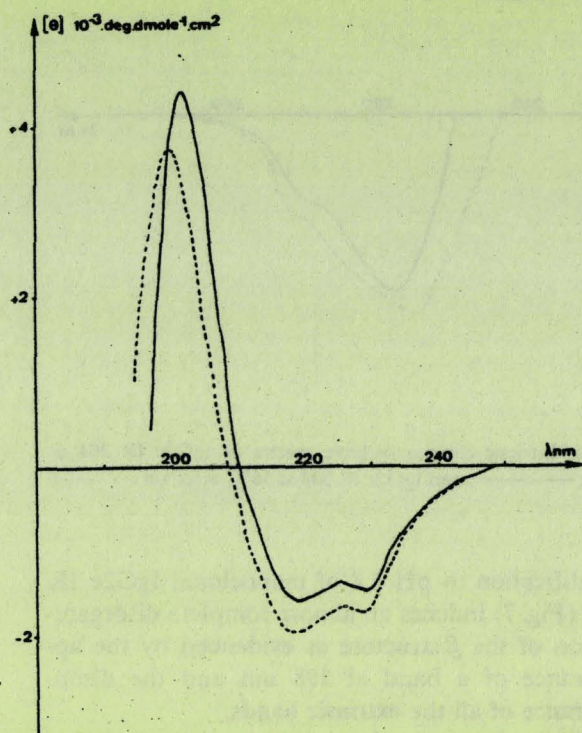


Fig. 3. Intrinsic circular dichroic spectra of Fc fragment of IgG2a from normal rat serum (—) and Fc fragment of IgG2a 530 (-----).

418, IR 530 and in the Fc from IR 530 was determined. It was found that 51 tyrosine residues out of 1300 (3.92%) for IR 418, 43 out of 1300 (3.31%) for IR530 and 13 out of 428 (3.04%) for Fc from IR 530. These differences are not very important and it is not well established whether they can contribute to the differences in the CD spectra at 230 nm. Nevertheless, it can be seen that in the region 280–300 nm (Fig. 2B), IR 530 has a positive contribution very different from other immunoglobulins G2a and which could be due to the aromatic side chains of tyrosine residues. There are previous examples of abnormal CD spectra of immunoglobulin fragments relative to the whole protein. Ellerson et al. [27] found a higher negative contribution at 230 nm in the Fc from a monoclonal IgG than in the whole protein. However, this negative band was not as large as the one observed for the Fc of rat IgG2a. Ellerson et al. [27] and Dorrington et al. [24] have shown that the CD spectrum of pFc (i.e., the  $C_{\gamma_3}$  domain) of human IgG shows a displacement of the nega-

tive band located at 217 nm to 224 nm; the origin of this displacement was not clearly elucidated. These authors suggested that the negative band at 230 nm in IgG and Fc could be due to the contribution of the  $C_{\gamma_3}$  domain (or to  $C_{\gamma_2}$ - $C_{\gamma_3}$  interactions). In contrast to Fc and the  $C_{\gamma_3}$  domain, the CD spectrum of the  $C_{\gamma_2}$  domain showed only a negative band at 217 nm [27]. Therefore, in Fc of rat IgG2a it could be possible that the contribution of the  $C_{\gamma_3}$  domain is much more important than in Fc of human IgG. It can be seen that Fc from rat IgG2a is different from Fc from human IgG as it does not contain the hinge region (Arends et al. [28]). Perhaps this difference of structure could explain the difference in the CD spectra of human and rat Fc of IgG.

**IgG2b.** In this subclass, only one monoclonal IgG (IR 863) has been studied. Its dichroic spectrum exhibits only a negative band at 217 nm the intensity of which is similar to that observed for other monoclonal immunoglobulins G (data not shown).

**IgG2c.** One monoclonal IgG was studied: IR 304 together with its Fab fragment. The CD spectrum of the native protein shows as for other immunoglobulins G an important negative band at 217 nm; a shoulder at 230 nm is also observed (see Fig. 5).

Fab from IR 304 gives a CD spectrum similar to the one of the whole IgG (data not shown).

#### *Studies of conformational changes induced by heating, and pH and NaSCN treatment*

**Heating at 56°C.** All the monoclonal immunoglobulins G1 heated from 4 to 56°C show an increase of the magnitude of the negative band at 217 nm indicating a possible increase of  $\beta$  sheet structure. This effect becomes much more important after 1 h of heating at 56°C (Fig. 4). In contrast to the whole protein, Fab from IR 595 does not show any modification of its CD spectrum upon heating at 56°C.

CD spectra of monoclonal IgG2a and IgG2a from normal rat serum appear insensitive to heating at 56°C. This insensitivity to heating was also observed with the Fc fragment (from normal IgG2a or monoclonal IgG2a IR 530). With the Fab fragment a very weak variation of the CD spectrum was observed.

98

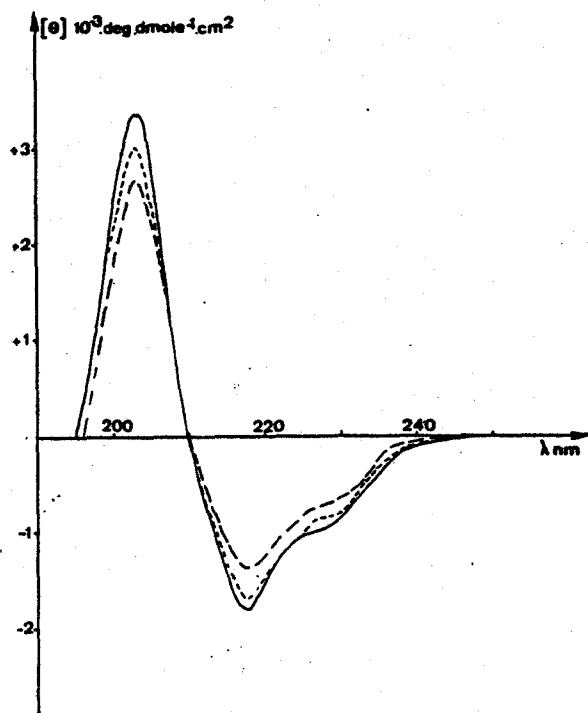


Fig. 4. Intrinsic circular dichroic spectra of IgG1 IR 595 at 4°C (—); IgG1 IR 595 at 56°C (-----); IgG1 IR 595 at 56°C after 1 h (-·-·-).



Monoclonal IgG2b IR 863 is as insensitive to heating as IgG2a.

An important effect of heating at 56°C is observed with monoclonal IgG2c IR 304: increase of the negative band at 217 nm which is shifted at about 214 nm, indicating an increase of the  $\beta$  sheet structure (Fig. 5). In contrast the dichroic spectrum of the Fab fragment exhibits almost no variation upon heating.

**Effect of acid pH.** After acidification to pH 2.8 (but not to pH 3.5) part of the secondary structure of monoclonal IgG1 IR 595 is destroyed as observed by the appearance of a dichroic band at 198 nm, characteristic of an unordered structure (Fig. 6). In addition, the near ultraviolet CD bands disappear, indicating a disorganization of the tertiary structure. This effect is not found with monoclonal IgG2a IR 418 that appears to be completely insensitive to acidification upto pH 2.8. A very large increase of the band at 217 nm corresponding to an increase of  $\beta$  structure was observed with monoclonal IgG2b IR 863 (data not shown).

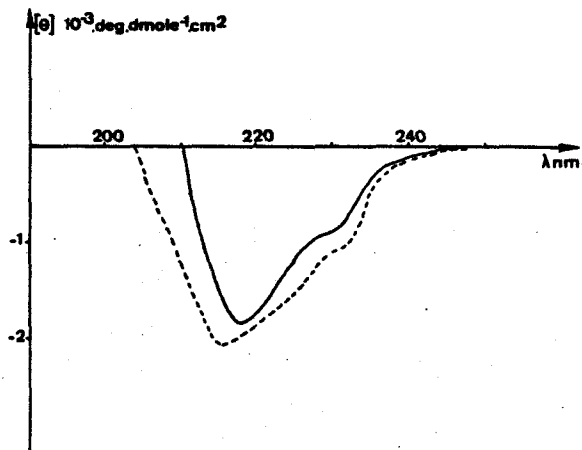


Fig. 5. Intrinsic circular dichroic spectra of IgG2c IR 304 at 4°C (—) and IgG2c IR 304 at 56°C after 1 h (-----).

Acidification to pH 2.8 of monoclonal IgG2c IR 304 (Fig. 7) induces an almost complete disorganization of the  $\beta$  structure as evidenced by the appearance of a band at 198 nm and the disappearance of all the extrinsic bands.

While there are no previous reports related to the effects of heating at 56°C on the CD spectrum of IgG, acid pH has been investigated on human IgG [29] and on its Fab and Fc fragments [30]. These studies were carried out on a part of normal IgG (where human subclass IgG1 is predominant) or on a monoclonal IgG whose subclass was not indicated. They showed that the  $\beta$  structure of human IgG is strongly affected by acid pH, the effect beginning at a pH under 4.0 and reaching a maximum at pH 2.1. However, only part of the  $\beta$  structure is disorganized, as besides a negative band at 200 nm, the negative band at 217 nm still persists at pH 2.1. These results are similar to those observed for rat IgG1 and IgG2c but different from those obtained from rat IgG2b (where only an increase of the band at 217 nm is noticed) and rat IgG2a, that appears to be insensitive to acid pH.

**Effect of NaSCN treatment (see Table I).** Treatment with 3 M NaSCN followed by dialysis against 10 mM phosphate/214 mM NaF, pH 7.4, induces in IgG1 IR 27 a small decrease of the magnitude of the dichroic band at 217 nm, thus a decrease of  $\beta$  sheet structure content. After this treatment the protein becomes insensitive to heat-

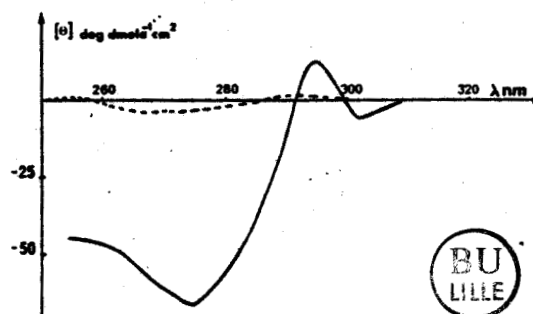
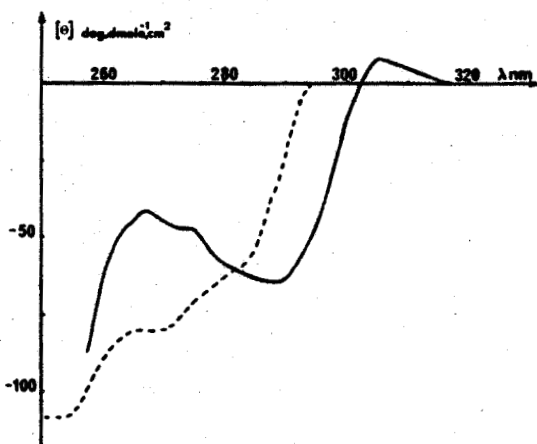
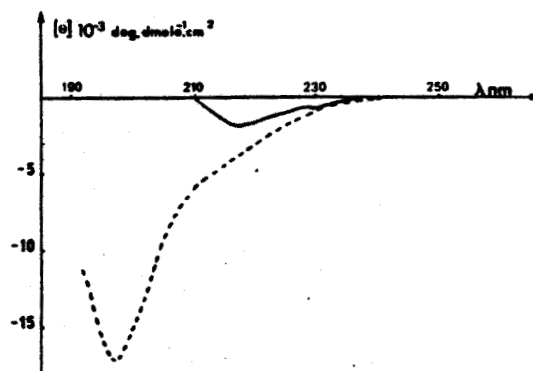
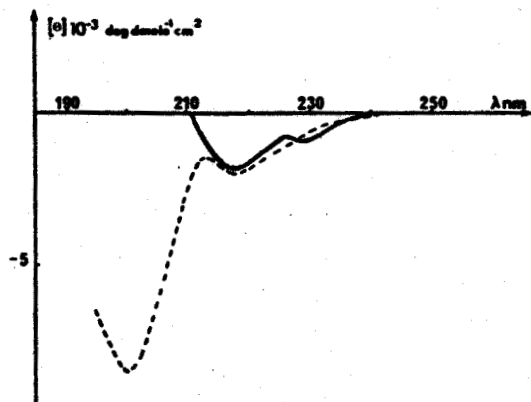


Fig. 6. Aromatic and intrinsic circular dichroic spectra of IgG1 IR 595 at pH 2.8; IgG1 IR 595 at pH 7.4 (—) and IgG1 IR 595 at pH 2.8 (-----).

Fig. 7. Aromatic and intrinsic circular dichroic spectra of IgG2c IR 304 at pH 2.8; IgG2c IR 304 at pH 7.4 (—) and IgG2c IR 304 at pH 2.8 (-----).

ing as shown by the absence of modification of the CD spectrum at 56°C.

Monoclonal IgG2a IR 418 incubated with 3 M NaSCN shows a decrease of the band at 217 nm, thus a decrease of  $\beta$  structure. Moreover heating at 56°C of the protein previously treated by NaSCN induces weak modification of the CD spectrum.

An increase of  $\beta$  structure is observed with monoclonal IgGb IR 863, whereas IgG2c IR 304 appears to be insensitive to treatment with NaSCN.

### Conclusions

The purpose of this study was to investigate whether some conformational characteristics could distinguish the different rat IgG subclasses. The most significant structural properties of each sub-

class are summarized in Table I, in which we have assumed that the results obtained from variation of temperature and pH or from the NaSCN treatment are characteristic of each subclass, even if they were observed with only one or two monoclonal immunoglobulins G representative of the subclass.

The results show that in their native state, the subclass cannot be differentiated by characteristic properties. Moreover, some differences between monoclonal immunoglobulins G of a given subclass were noticed. These differences are perhaps related, as suggested by Brahms and Brahms [22], to the contribution of aromatic side chains, especially those of tyrosine residues. The differences of content in tyrosine observed for monoclonal IgG of a given subclass are located in the variable domains of the monoclonal IgG. In these domains, the  $\beta$  sheet structure is very predominant and so the dichroic signal is weak; this could explain that

the contribution of tyrosine residues involves the perturbation of the CD spectrum as discussed by Brahms and Brahms [22]. Such differences in CD spectra of monoclonal mouse IgA binding phosphorylcholine [31] have been previously described and found related to differences between the variable regions of heavy and light chains.

Our results for rat IgG differ from those reported by Johnson et al. [6] for human IgG subclasses. In effect, these authors found characteristic features, mainly for the IgG3 subclass. The negative band at 240 nm observed for IgG3 is explained by the extended structure of its hinge region with a very high content of cysteine residues (30 involved in 15 inter-heavy chain disulfide bridges). Such a hinge structure does not exist among rat IgG subclasses.

In contrast to the results obtained for the native proteins, studies by circular dichroism of the denaturation of the rat IgG led to characteristic differences between subclasses (see Table I). Proteins of the IgG2a subclass appear completely insensitive to heating and acid pH; IgG2b is sensitive only to acid pH; IgG1 and IgG2c are affected both by acid pH and heat treatment. For IgG2c, thermal instability is perhaps linked to their euglobulin properties [7]; in effect, proteins of this subclass have a strong tendency to form non-covalent aggregates, even in physiological buffers. Although only the Fab fragments were studied in the IgG1 and IgG2c subclasses, it seems that the resistance or sensitivity to thermal or acid denaturation is a property of the Fc part of the IgG molecule, as for example Fc from IgG2a is unaffected by heat treatment (as the whole protein) and Fab from IgG1 and IgG2c are also insensitive to heating (whereas the whole protein is sensitive).

Whereas a precise location of the modification of secondary structure has not been established by our study, it is interesting to notice that the two subclasses sensitive to heating and in which acid pH induces a partial disorganization of the  $\beta$  structure (i.e., IgG1 and IgG2c) both bind staphylococcal protein A [8]. The two others, IgG2a and IgG2b which are insensitive to heating and in which no disorganization of the  $\beta$  structure is observed at acid pH, do not bind (IgG2a) or bind weakly (IgG2b) [8,32]. In addition, it can be recalled that most of the human IgG, sensitive to

acid pH, interacts strongly with protein A [33]. It is therefore tempting to speculate that the conformational changes induced by heating or acid pH could be mainly located in the  $C_{\gamma 2}$  and  $C_{\gamma 3}$  domains, that are necessary to bind protein A. We have effectively noticed that monoclonal rat IgG1 and IgG2c lose their property to be retained from a protein A-Sepharose column, either after heating at 56°C for 1 h or after acidification at pH 2.8 followed by subsequent dialysis against phosphate-buffered saline pH 8.0 (Rousseaux et al., unpublished data). It could be interesting to study whether other biological properties of the IgG1 and IgG2c subclasses such as their binding to macrophages [10] could be affected by heating and acid pH.

The effect of 3 M NaSCN was studied because this salt is sometimes used for the elution of immunoglobulins either from immunoadsorbent columns or from protein A-Sepharose columns. Our results show that the conformation of IgG is affected by this treatment and so the recovered proteins are not totally 'native'. Moreover some thermal instability occurs for IgG previously stable i.e., IgG2a and IgG2b and the reverse is observed for IgG1. This must be noted for further investigations.

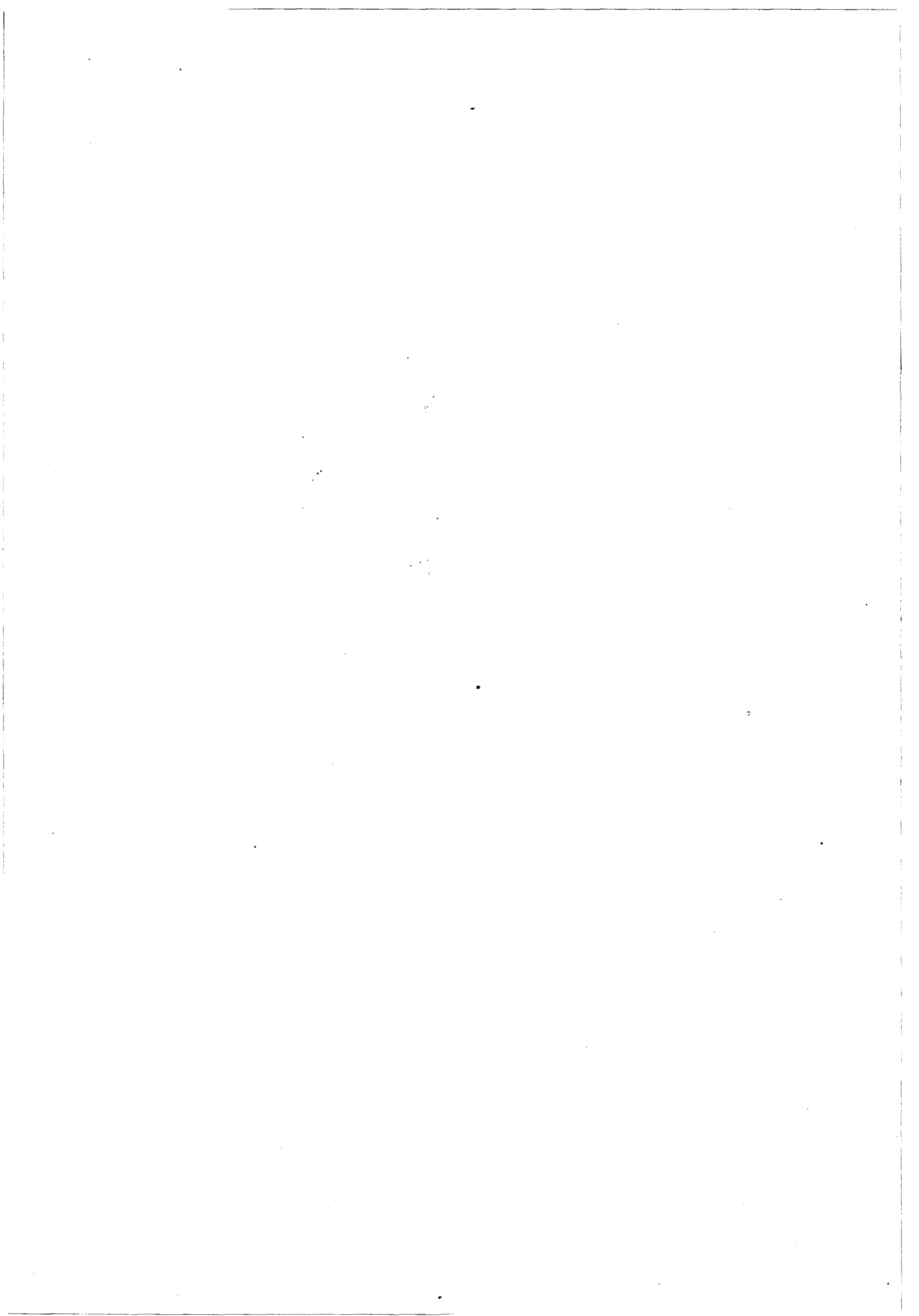
#### Acknowledgements

We wish to thank Dr. H. Bazin for providing us with immunocytomas and myeloma ascites or sera. We thank Mrs. M.T. Picqué, J. Herno, A.M. Mir, M.P. Hildebrand and Mr. C. Denis for their excellent technical assistance. This investigation was supported by L.A. 268.04 CNRS and CRL 80.3028 INSERM.

#### References

- 1 Spiegelberg, H.L. (1974) *Adv. Immun.* 19, 259-293
- 3 Milstein, C. and Pink, J.R.L. (1970) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 21, 209-263
- 3 Rocca-Serra, J., Milili, M. and Fougereau, M. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 511-523
- 4 Adetugbo, K. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6068-6075
- 5 Melamed, M.D. (1976) *Immunochemistry* 13, 271-279
- 6 Johnson, P.M., Scopes, P.M., Tracey, B.M. and Watkins, J. (1974) *Immunology* 27, 27-31
- 7 Bazin, H., Beckers, A. and Querinjean, P. (1974) *Eur. J. Biochem.* 4, 44-48

- 8 Medgyesi, G.A., Füst, G., Gergely, J. and Bazin, H. (1978) *Immunochemistry* 15, 125-129
- 9 Füst, G., Medgyesi, G.A., Bazin, H. and Gergely, J. (1980) *Immunol. Lett.* 1, 249-253
- 10 Medgyesi, G.A., Foris, G., Deczo, B., Gergely, J. and Bazin, H. (1980) *Immunology* 40, 317-323
- 11 Capron, M., Capron, A., Torpier, G., Bazin, H., Bout, D. and Joseph, M. (1978) *Eur. J. Immun.* 8, 127-232
- 12 Morse, H.C., Bloch, K.J. and Austen, J.F. (1968) *J. Immunol.* 101, 658-663
- 13 Rousseaux, J., Bazin, H. and Biserte, G. (1979) *FEBS Lett.* 98, 359-362
- 14 Rousseaux, J., Biserte, G. and Bazin, H. (1980) *Mol. Immun.* 17, 469-482
- 15 Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C. and Heremans, J.F. (1972) *Eur. J. Cancer* 10, 568-580
- 16 Bazin, H., Beckers, A., Deckers, C. and Moriamé, M. (1973) *J. Nat. Cancer Inst.* 51, 1359-1361
- 17 Rousseaux, J. and Bazin, H. (1979) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1, 61-78
- 18 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685
- 19 Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- 20 Chen, Y., Yang, J.T. and Chau, K.H. (1974) *Biochemistry* 13, 3350-3359
- 21 Chang, C.T., Wu, C.S.C. and Yang, J.T. (1978) *Anal. Biochem.* 91, 13-31
- 22 Brahms, S. and Brahms, J. (1980) *J. Mol. Biol.* 138, 149-178
- 23 Cathou, R.E., Kulczycki, A., Jr. and Huber, E. (1968) *Biochemistry* 7, 3958-3964
- 24 Dorrington, K.J., Bennich, H. and Turner, M.W. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 512-516
- 25 Epp, O., Colman, P., Fehlhammer, H., Bode, W., Schiffer, M., Huber, R. and Palm, W. (1974) *Eur. J. Biochem.* 45, 513-524
- 26 Stewart, G.A., Johnson, P.M., Barrett, M.W., Scopes, P.M. and Stanworth, D.R. (1977) *Immunochemistry* 14, 263-268
- 27 Ellerson, J.R., Yasmee, D., Painter, R.H. and Dorrington, K.J. (1976) *J. Immunol.* 116, 510-517
- 28 Arends, W.P., Hermodson, M.A. and Teller, D.C. (1977) *J. Immunol.* 118, 388-400
- 29 Doi, E. and Jirgensons, B. (1970) *Biochemistry* 9, 1066-1073
- 30 Ghose, A.C. and Jirgensons, B. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 384-393
- 31 Morris, D.H., Williams, R.E. and Young, N.M. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 1167-1173
- 32 Rousseaux, J., Picqué, M.T., Biserte, G. and Bazin, H. (1981) *Mol. Immun.* 18, 639-645
- 33 Kronvall, G. and Williams, R.C. (1969) *J. Immunol.* 103, 828-833



L'étude de la conformation des sous-classes d'IgG du Rat avait pour buts :

1° de définir s'il existait des différences conformationnelles entre IgG qui puissent être reliées à la nature de la sous-classe d'IgG,

2° de rechercher si les sous-classes d'IgG pouvaient être affectées de façon différente par l'action d'agents dénaturants : chauffage, pH acide, agents chaotropiques (thiocyanate de sodium), et de déterminer dans quelle partie de la molécule se produisent ces modifications de conformation,

3° d'établir une relation entre les modifications conformationnelles induites par les agents dénaturants et l'expression d'une activité biologique, l'affinité pour la protéine A de S.aureus. Cet aspect sera développé dans le chapitre IV.

Cette étude a été réalisée en utilisant essentiellement comme approche méthodologique le dichroïsme circulaire. Les détails expérimentaux sont indiqués dans la publication n° 7.

## A - ETUDE DES IgG NATIVES ET DE CERTAINS DE LEURS FRAGMENTS

### 1. IgG

Plusieurs IgG monoclonales ont été étudiées pour chaque sous-classe (sauf la sous-classe IgG2b). Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'il n'existait pas de spectre dichroïque caractéristique de chaque sous-classe mais qu'au contraire ces spectres pouvaient être très différents pour des IgG monoclonales d'une même sous-classe. C'est par exemple ce qui a été observé pour différentes IgG2a monoclonales et l'IgG2a du sérum de rat (voir la figure 2 de l'article n° 7, page 197). Dans la zone spectrale située entre 200 et 250 nm, on note qu'en plus de la bande négative majeure à 217 nm, caractéristique de la structure en feuillet plissé  $\beta$ , il existe pour certaines IgG2a, d'autres bandes négatives plus faibles : à 230 nm pour l'IgG2a IR 530, à 240 nm pour l'IgG2a "normale". De plus dans la zone 250 - 350 nm,

on note des différences significatives dans l'amplitude de la bande positive à 292 nm (voir notamment l'IgG2a IR 530). De telles différences ont également été observée pour des IgG1 et des IgG2c monoclonales.

## 2. FRAGMENTS Fab ET Fc

Les spectres dichroïques de fragments Fab et Fc de différentes IgG monoclonales ont été enregistrés. Les résultats ont montré que, quelle que soit la sous-classe, le fragment Fab possède un spectre dichroïque très proche de l'IgG entière. C'est le cas par exemple de fragment Fab de l'IgG2a IR 530. A l'inverse, le fragment Fc peut présenter un spectre dichroïque très différent de l'IgG entière. La figure 3 de l'article n° 7 (page 198) montre le résultat obtenu pour les fragments Fc de l'IgG2a "normale" et de l'IgG2a IR 530. On note l'existence, à côté de la bande négative à 217 nm, caractéristique de la structure en feuillet plissé  $\beta$ , une autre bande négative à 230 nm ayant à peu près la même intensité.

## 3. ORIGINE DES DIFFERENCES OBSERVEES

Les résultats obtenus sur des IgG monoclonales de différentes sous-classes ainsi que sur leurs fragments Fab et Fc ont montré qu'il n'existe pas de spectre dichroïque caractéristique de chaque sous-classe. Au contraire, certaines particularités des spectres, telles les bandes négatives à 230 nm ou à 240 nm, sont le propre d'une seule IgG monoclonale. De plus, les fragments Fc présentent également certaines particularités spectrales qui ne sont pas retrouvés dans l'IgG entière.

Quelles peuvent être l'origine de ces différences ? Plusieurs travaux (CATHOU et al., 1968 ; DORRINGTON et al., 1972 ; BRAHMS et BRAHMS, 1980) ont suggéré que, dans la zone 200 - 250 nm, où la contribution de la chaîne polypeptidique prédomine, certaines chaînes latérales aromatiques, notamment celles des tyrosine et tryptophanne, pourraient modifier le spectre dichroïque. Cette contribution des chaînes aromatiques serait particulièrement importante dans le cas de protéines ayant une forte proportion de structure en feuillet plissé  $\beta$  ; c'est le cas pour les immunoglobulines (CATHOU et al., 1968).



BRAHMS et BRAHMS (1980) ont suggéré qu'à 230 nm la contribution provient essentiellement des chaînes latérales des résidus de tyrosine. C'est ce qui a été montré pour le domaine variable de la protéine de Bence Jones REI. Ce fragment, dont la structure tridimensionnelle est connue (EPP et al., 1974) présente une très grande proportion de structure en feuillet plissé  $\beta$  et contient 8 tyrosines sur 108 résidus. Son spectre dichroïque est caractérisé par l'existence d'une bande positive à 230 nm qui pourrait être due à la présence de chaînes latérales de tyrosine situés dans un environnement asymétrique. Des résultats analogues, mais dans lesquels la présence de tyrosine induit une bande négative à 230 nm, ont été rapportés par DORRINGTON et al. (1972).

Nous avons de ce fait analysé les contenus en tyrosine des différentes IgG monoclonales et fragments présentant une anomalie du spectre dichroïque à 230 nm. En particulier, les pourcentages de résidus de tyrosine de l'IgG2a IR 418 (ne présentant pas de bande négative à 230 nm), de l'IgG2a IR 530 (présentant une faible bande négative à 230 nm) et du Fc de l'IgG2a IR 530 (présentant une bande négative importante à 230 nm) ont été comparés. Les résultats obtenus sont :

IgG2a IR 418	:	51 résidus de tyrosine sur 1300 (3,92 %)
IgG2a IR 530	:	43 résidus de tyrosine sur 1300 (3,31 %)
Fc d'IgG2a IR 530	:	13 résidus sur 428 (3,04 %)

On constate que les différences ne sont pas très importantes et il est difficile de conclure si à elles seules, elles sont capables d'expliquer les différences spectrales observées.

Ce que l'on peut cependant supposer, c'est que les différences spectrales observées pour des IgG d'une même sous-classe sont probablement dues à des différences structurales localisées dans leurs domaines variables  $V_H$  et  $V_L$  puisque c'est la seule partie de la molécule qui puisse être différente pour des IgG d'une même sous-classe (et possédant le même type de chaîne légère, kappa). De fait, les fragments Fab des IgG monoclonales étudiées présentent des spectres dichroïques similaires à l'IgG entière, ce qui suggère que ce sont les parties variables  $V_H$  et  $V_L$  qui sont à l'origine

des variations observées dans les spectres. Le rôle des différences structurales des domaines  $V_H$  et  $V_L$  pour expliquer les variations des spectres dichroïques a été démontré pour des IgA monoclonales à activité anti-phosphorylcholine (MORRIS, WILLIAMS et YOUNG, 1974). Les variations relativement faibles des taux de tyrosine entre différentes IgG monoclonales reflètent donc vraisemblablement des différences essentiellement localisées dans deux domaines :  $V_H$  et  $V_L$ . Ces deux domaines étant particulièrement riches en structure en feuillet plissé  $\beta$ , il n'est pas impossible que la présence d'une ou deux tyrosine supplémentaires dans ces domaines suffise pour modifier le spectre dichroïque de l'IgG.

## B - MODIFICATIONS CONFORMATIONNELLES INDUITES PAR LE CHAUFFAGE, LE pH ACIDE ET LE THIOCYANATE DE SODIUM

### 1. CHAUFFAGE A 56° C

Le chauffage à 56° C des IgG1 monoclonales entraîne une augmentation de la bande négative à 217 nm indiquant une augmentation de la structure en feuillet plissé  $\beta$  (voir la figure 4 de l'article n° 7). Des modifications similaires sont observées pour les IgG2c monoclonales : augmentation de la bande négative à 217 nm et déplacement à 214 nm (voir la figure 5 de l'article n° 7). Ces modifications persistent lorsque l'IgG est ramenée à 4° C. De telles modifications ne sont pas observées pour les IgG2a et IgG2b monoclonales (résultats non présentés). Les modifications observées pour les IgG1 et IgG2c ont été retrouvées avec les fragments Fc de ces protéines, et pas avec les fragments Fab. De plus, les Fc et Fab des IgG2a et IgG2b ne présentent pas de modifications conformationnelles lors du chauffage à 56° C.

Ces résultats suggéraient que les IgG1 et IgG2c étaient plus sensibles à la dénaturation thermique que les IgG2a et IgG2b. L'augmentation de structure  $\beta$  était évocateur d'une polymérisation des molécules d'IgG. C'est effectivement ce qui a été mis en évidence par une analyse des IgG en électrophorèse en gradient d'acrylamide. On note en effet qu'il existe une proportion plus importante de formes polymères dans les IgG1 et IgG2c chauffées à 56° C, que dans les IgG2a (figure 47).



Figure 47.- Electrophorèse en gradient d'acrylamide (5-25 %) de sous-classes d'IgG natives et chauffées à 56°C pendant 2 h.

1 : IgG1 IR 27 native ; 2 : IgG1 IR 27 chauffée à 56°C, 2 h ;  
3 : IgG2a IR 530 native ; 4 : IgG2a IR 530 chauffée à 56°C, 2 h ;  
5 : IgG2c IR 304 native ; 6 : IgG2c IR 304 chauffée à 56°C, 2 h.

La position des marqueurs de poids moléculaire IgM, IgD et IgG est indiquée sur la gauche de l'électrophorégramme.

## 2. EFFET DU pH ACIDE

Les IgG ont été étudiées à différents pH : 4,5 ; 3,5 ; 2,8. Des modifications des spectres dichroïques ont été observées essentiellement à pH 2,8. Le spectre de l'IgG1 IR 595 à pH 2,8 (figure 6 de l'article n° 7, page 200) indique à la fois une désorganisation de la structure secondaire (apparition d'une bande à 198 nm, caractéristique d'une structure non ordonnée), et de la structure tertiaire (disparition de la bande à 305 nm). Le spectre dichroïque de l'IgG1 ramené à pH 7,4 après acidification à pH 2,8, n'est pas superposable totalement au spectre de l'IgG "native". Ceci suggère que les modifications conformationnelles induites par l'acidification ne disparaissent pas complètement quand l'IgG est ramenée à pH 7,4. Des résultats similaires sont observés pour les IgG2c monoclonales. A l'inverse, on n'observe pas de modification significative pour les IgG2a monoclonales. Dans le cas de l'IgG2b monoclonale IR 863, on observe une augmentation de la bande négative à 217 nm, indiquant une augmentation de structure en feuillet plissé  $\beta$  (résultats non présentés). L'ensemble des modifications observés est résumé dans le tableau I de l'article n° 7 (page 195).

## 3. EFFET DU TRAITEMENT PAR LE NaSCN 3M

Le NaSCN 3M est utilisé pour l'éluion des IgG de colonnes d'immuno-adsorbants, ou de colonnes de protéine A-Sépharose. Nous avons étudié si les IgG dénaturées après traitement par le NaSCN 3M récupèrent ou non une conformation native. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I de l'article n° 7 (page 195). On observe que les spectres dichroïques "natifs" ne sont pas obtenus pour les IgG de sous-classe IgG1, IgG2a et IgG2b.

## C - CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude montrent que, dans leur état natif, les sous-classes d'IgG ne peuvent être distinguées par des propriétés particulières de leurs spectres dichroïques. Au contraire, des différences entre IgG monoclonales d'une même sous-classe ont été mises en évidence. Ces différences sont peut être reliées à la contribution des chaînes latérales aromatiques, plus particulièrement celles des tyrosines, probablement localisés

dans les domaines variables des chaînes lourdes et légères. Nos résultats pour les sous-classes d'IgG du Rat ne sont pas les mêmes que ceux rapportés pour les sous-classes d'IgG humaines par JOHNSON et al. (1974) (voir première partie, Chapitre II, paragraphe E). Ces auteurs ont en effet montré que la sous-classe IgG3 humaine se distingue très nettement des autres sous-classes d'IgG par une bande négative très importante à 240 nm. Cette bande s'explique par l'existence d'un très grand nombre de ponts disulfure interchaînes dans la région charnière de l'IgG3 (15 contre 2 à 4 pour les autres sous-classes) (voir première partie, Chapitre II, paragraphe D).

Les sous-classes d'IgG apparaissent affectées de façon différente par les agents dénaturants : chauffage, pH acide, traitement par le thiocyanate de sodium 3M. Trois points méritent plus particulièrement d'être signalés :

- deux sous-classes : IgG1 et IgG2c sont sensibles à la dénaturation thermique et à l'acidification,
- les modifications observées sur l'IgG sont retrouvées avec le fragment Fc et pas avec le fragment Fab,
- les modifications induites par le chauffage à 56° C sont irréversibles, celles liées à l'acidification sont partiellement réversibles.

Les modifications produites par l'incubation à un pH acide (pH 2,8) et leur caractère partiellement réversible lors du retour à un pH neutre, permettent d'expliquer, pour la sous-classe IgG1, le rôle joué par l'acidification dans l'augmentation de la sensibilité à la digestion par la pepsine (voir deuxième partie, Chapitre I, paragraphe D). Nos résultats suggèrent que cette augmentation de sensibilité est liée à des modifications conformationnelles localisées dans le Fc. Les modifications conduisent à une digestion complète de cette partie de la molécule alors que la partie Fab reste résistante à l'hydrolyse pepsique. Cependant, pour la sous-classe IgG2a, les résultats de dichroïsme circulaire ne suggèrent pas de modifications conformationnelles significatives à pH acide. Or, cette sous-classe présente également une augmentation de sensibilité à l'hydrolyse pepsique après une pré-incubation à pH 2,8. Ceci indique qu'il existe vraisemblablement pour la

sous-classe IgG2a des modifications de conformation non détectables par des études de dichroïsme circulaire. Cela est-il lié au fait que les modifications de structure secondaire et tertiaire de l'IgG2a soient moins importantes que celles de l'IgG1 ? Il est difficile d'y répondre. Cependant, il est important de noter que l'utilisation du dichroïsme circulaire ne permet pas dans ce cas la détection de modifications conformationnelles. De même, nous n'avons pu mettre en évidence de changements dans les spectres dichroïques d'IgG dont les ponts disulfure inter-chaînes avaient été réduits par le dithiothréitol (résultats non présentés). Or, il existe de nombreux arguments indiquant l'existence de modifications de la conformation des IgG après réduction des ponts disulfure inter-chaînes : l'augmentation de la sensibilité à l'action de la papaïne, l'altération de nombreuses activités biologiques etc.. Tout ceci suggère que le dichroïsme circulaire ne pourrait mettre en évidence des altérations mineures de la conformation des IgG ; ou bien que cette méthode n'enregistre que des modifications de structure secondaire et tertiaire localisées dans un domaine de l'IgG, mais qu'elle ne peut apprécier des modifications de structure quaternaire : c'est-à-dire, l'orientation des domaines les uns par rapport aux autres, les relations entre Fab et Fc, les contacts entre les domaines.

En dépit de ces remarques, les études de dichroïsme circulaire avaient montré des modifications conformationnelles des sous-classes IgG1 et IgG2c lors du chauffage à 56° C ou après incubation à pH acide. Ces modifications étant localisées dans la partie Fc, on pouvait s'attendre à ce qu'une activité biologique exprimé par la partie Fc, telle que l'affinité pour la protéine A de S.aureus, puisse être altérée. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre IV.

**CHAPITRE IV**

---

**ETUDE DE L'AFFINITE DES SOUS-CLASSES D'IgG DU RAT POUR LA PROTEINE  
A DE S. AUREUS**

Publication n° 8

- RAT IgG SUBCLASSES : DIFFERENCES IN AFFINITY TO PROTEIN A-SEPHAROSE  
J. ROUSSEAU, MT. PICQUE, H. BAZIN et G. BISERTE (1981)  
MOL. IMMUNOL., 18, 639-645.



## RAT IgG SUBCLASSES: DIFFERENCES IN AFFINITY TO PROTEIN A-SEPHAROSE

J. ROUSSEAU,\* M. T. PICQUE,\* H. BAZIN† and G. BISERTE\*

\*Institut de Recherches sur le Cancer, INSERM U 124, BP 311, 59020 Lille Cédex, France; and

†Experimental Immunology Unit, Faculty of Medicine, University of Louvain,  
Clos-Chapelle-aux-Champs, 30-1200, Brussels, Belgium

(Received 19 August 1980; accepted 30 December 1980)

**Abstract**—The binding of rat IgG subclasses: IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c to staphylococcal protein A has been investigated by fractionation of monoclonal rat IgG or normal rat serum on protein A-Sepharose. Elution was performed by buffers of decreasing pH (from 9.0 to 3.0) or by sodium thiocyanate gradients (NaSCN) at pH 7.4. Differences in affinity were found in part to be related to the subclass with the order: IgG2c > IgG1 > IgG2b > IgG2a (the affinity of IgG2b being very weak, and IgG2a having no affinity for protein A). Differences in affinity between monoclonal IgG2cs were also demonstrated, some being eluted at pH 4.0–3.0 (or 1 M NaSCN) and others at pH 6.0 (or 0.5 M NaSCN). Each monoclonal IgG1 also exhibited heterogeneity with fractions eluted at pH 8.0, 7.0 and 6.0. The elution pattern of IgG subclasses from normal rat serum was found to be in agreement with the results obtained from monoclonal IgG. Pure IgG1 and IgG2c were recovered from rat serum at pH 7.0 and 4.0–3.0 respectively.

### INTRODUCTION

Protein A, a cell wall component of most *Staphylococcus aureus* strains binds to the Fc portion of immunoglobulins (Forsgren & Sjöquist, 1966). This property has been found in immunoglobulins of several mammalian species and has proved to be a useful immunological procedure for analytical and preparative purposes [for review see Goding (1978)]. Studies with monoclonal proteins or normal serum have shown that some IgMs in humans (Kronvall & Frommel, 1970; Harboe & Fölling, 1974; Lind *et al.*, 1975), in mice (MacKenzie *et al.*, 1978a) and in rats (Medgyesi *et al.*, 1978) can bind protein A. Interaction between some monoclonal IgAs and protein A has also been demonstrated (Grosv, 1976; Harboe & Fölling, 1974; Medgyesi *et al.*, 1978; Saltvedt & Harboe, 1976) but no relation to subclasses has been found in man (Brunda *et al.*, 1979). Evidence for the protein A reactivity of human IgE (Johansson & Inganas, 1978) but not that of rat (Medgyesi *et al.*, 1978) or mouse IgE (Ey *et al.*, 1978) has also been reported. For IgG immunoglobulins, restriction of the binding to particular IgG subclasses has been defined. In human IgG, the interaction is limited to the IgG1, IgG2 and IgG4 subclasses (Kronvall & Williams, 1969). In the mouse, initial studies (Kronvall *et al.*, 1970; Grey *et al.*, 1971) showed

that IgG2a, IgG2b and IgG3 but not IgG1 could bind protein A. However, more recently, a weak interaction between IgG1 and protein A-Sepharose was found (Goding, 1976; MacKenzie *et al.*, 1978b). The use of thiocyanate gradients has permitted the isolation of pure IgG1 from normal mouse serum (Chalon *et al.*, 1979). Pure mouse IgG1, IgG2a and IgG2b have been isolated from mouse serum by the use of buffers of decreasing pH (Ey *et al.*, 1978). The pH-dependent binding of goat IgG subclasses (Delacroix & Vaerman, 1979; Duhamel *et al.*, 1980) and human IgG subclasses (Duhamel *et al.*, 1979) has also been demonstrated. In the rat, the binding to protein A has been found to involve the IgG1 and IgG2c subclasses but not IgG2a and IgG2b (Medgyesi *et al.*, 1978). Previous reports (Goding, 1978) have shown that only a small amount of normal rat IgG can bind to protein A-Sepharose. In the present work, we have investigated the interaction between rat IgG subclasses and protein A-Sepharose, by the use of monoclonal rat IgG (Bazin *et al.*, 1973; Bazin *et al.*, 1974) and of IgG from normal rat serum. Relations between binding to protein A and IgG subclass or other physico-chemical parameters have been studied. Our results have permitted us to describe a procedure for the isolation of pure IgG1 and IgG2c from normal rat serum.

## MATERIALS AND METHODS

### *Rat serum*

Normal rat serum was obtained from randomly bred Wistar rats.

### *Preparation of rat monoclonal immunoglobulins*

Immunocytomas producing monoclonal immunoglobulins were maintained in LOU/M/Wsl rats as described previously (Bazin *et al.*, 1972), except for the immunocytoma IR 863, producing a monoclonal IgG2b, that was transplanted in (LOU X OKA) F<sub>1</sub> hybrids.

Monoclonal IgG2a and IgG1 were isolated from ascites or sera of rats bearing tumors as described by Bazin *et al.* (1974). Monoclonal IgG2b IR 863 was isolated by chromatography of a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation on a DEAE-cellulose (Whatman DE 32) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. Stepwise elution was performed with increasing molarities of NaCl (0.05 and 0.1 M). Monoclonal IgG2c was isolated by precipitation at 40% ammonium sulphate saturation followed by chromatography on CM-cellulose (Whatman CM 32), equilibrated in 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.2; elution was performed by the same buffer and increasing molarities of NaCl (0.1 and 0.2 M). Monoclonal IgG2c was eluted either with 0.1 M (IR 1012, IR 759) or 0.2 M (IR 759, IR 304) NaCl concentrations.

### *Antisera*

Antisera to normal rat serum proteins were purchased from SEBIA (Issy-les-Moulineaux, France). Monospecific antisera were prepared as described previously (Bazin *et al.*, 1974), except for the antiserum to the  $\gamma_1$ -heavy chain, which was raised by immunizations of rabbits with purified Fc of monoclonal IgG1 (IR 595) and absorbed with monoclonal IgG2a, IgG2b and IgG2c covalently linked to Sepharose 4B (Porath *et al.*, 1973).

### *Protein A-Sepharose chromatography*

Staphylococcal protein A covalently linked to Sepharose CL-4B (protein A-Sepharose) was obtained from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). One-and-a-half grams were swollen in 0.01 M Na-phosphate, 0.15 M NaCl (phosphate-buffered saline, PBS), pH 8.0, containing 0.02% sodium azide, and packed into a 1 x 15 cm glass column. The column was stored at +4°C. Chromatography was usually performed at +4°C and in some cases at room

temperature (20–22°C). Monoclonal IgG (15 mg) or a precipitate of normal rat serum at 40% ammonium sulphate saturation (100 mg protein; 30–35 mg IgG) were applied to the column. The following elution procedures were used:

(1) The column was eluted sequentially with PBS, pH 7.4 (60–70 ml), and with a linear-gradient from 0 to 3 M sodium thiocyanate (NaSCN) (total volume: 300 ml). The shape of the gradient was monitored by measurement of the sodium concentration in the column effluent.

(2) Elution was performed with PBS, pH 8.0 (60–70 ml), PBS, pH 7.4 (50 ml), and PBS, pH 7.4, containing 0.5 M NaSCN (50 ml) and 1 M NaSCN (50 ml).

(3) Elution by buffers of decreasing pH from 8.0 to 3.0 was performed as described by Ey *et al.* (1978). In some experiments, the column was equilibrated with 0.01 M Na-borate, 0.15 M NaCl [(borate-buffered saline), BBS], pH 9.0, and the first step of elution was performed with the same buffer.

All the buffers contained sodium azide at 0.02% concentration.

### *Immunochemical assays*

Ouchterlony analyses and immunoelectrophoretic assays were performed in 1% agarose gels containing 0.078 M sodium barbital buffer, pH 8.2. Single radial immunodiffusions were done as described by Mancini *et al.* (1965). The standard proteins were different to the proteins used for immunizations in order to avoid interference of idiotypic determinants.

### *Polyacrylamide gel electrophoresis*

Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate (PAGE-SDS) was performed on slabs with the buffers described by Laemmli (1970) and the use of the device proposed by Kerckaert (1978). Unreduced samples (in 5% SDS, 0.075 M iodoacetamide) were applied to 7.5% acrylamide gels; samples reduced by 2-mercaptoethanol (5% final concentration) were run on 10% acrylamide gels.

## RESULTS

### *Studies with monoclonal rat IgG*

*IgG2a.* Chromatography of monoclonal IgG2a (proteins IR 33, IR 418, IR 530) in PBS, pH 8.0, showed elution of an unretarded peak of a symmetrical shape. No more protein was eluted

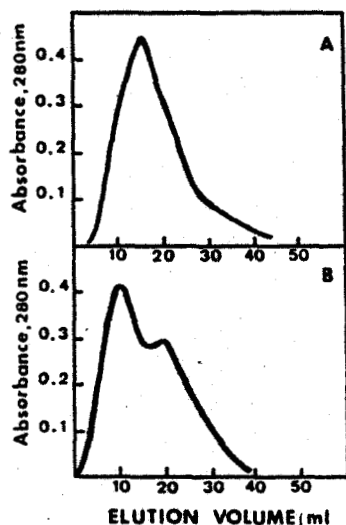


Fig. 1. Chromatography of monoclonal immunoglobulin IgG2b IR 863 (15 mg) on protein A-Sepharose. (A) Elution with PBS, pH 8.0. (B) Elution with BBS, pH 9.0. Flow rate: 15 ml/hr. Fractions of 5 ml were collected.

either by a sodium thiocyanate gradient or by buffers of decreasing pH.

**IgG2b.** Monoclonal IgG2b (IR 863) was eluted from the column at pH 8.0 as a slightly retarded peak of an asymmetrical shape (Fig. 1(A)). Chromatography at pH 9.0 showed elution of two unresolved peaks [Fig. 1(B)]. These two fractions gave the same pattern in PAGE-SDS.

**IgG1.** Chromatography of monoclonal IgG1 (IR 27, IR 595) in PBS, pH 8.0, showed elution of a slightly retarded and asymmetric peak (Fig. 2). Another peak was observed at the beginning of an NaSCN gradient from 0 to 3 M [Fig. 2(A)]. Stepwise elution with 0.5 and 1 M NaSCN led to the recovery of protein at the 0.5 M but not at the 1 M concentration [Fig. 2(B)]. The results were the same when chromatography was performed at +4°C or at room temperature, except that at room temperature a small amount of material was eluted at pH 7.4. With buffers of decreasing pH, elution of monoclonal IgG1 was obtained at pH 8.0, 7.0 and 6.0 [Fig. 2(C)]. All the fractions eluted from the column reacted positively with an anti- $\gamma_1$  antiserum when tested by Ouchterlony analysis. Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS of the fractions reduced by 2-mercaptoethanol showed a different pattern between the fraction unretarded at pH 8.0 (fraction 1) and the protein retained by the column and eluted either by 0.5 M NaSCN or by buffers of pH 7.0 and 6.0. Fraction 1 showed an additional protein band to the light and heavy chain bands, suggesting partial proteolysis; two bands of the heavy chain were also observed: one

(major) of mol. wt 55,000 and the second (minor) of mol. wt 52,000. On the contrary, fractions retained on the column at pH 8.0 have a heavy chain of mol. wt 55,000 only (Fig. 3).

**IgG2c.** Chromatography of monoclonal IgG2c (IR 304, IR 759, IR 1012) showed elution of protein at pH 8.0 as a peak of symmetrical shape. The protein unretarded from the column did not react with an anti- $\gamma_{2c}$  antiserum but reacted positively with an anti- $\gamma_{2a}$  antiserum and therefore corresponded to contaminated normal IgG2a in the preparations. IgG2c IR 304 was eluted at the end of the NaSCN (0-3 M) gradient (Na concentration 950-1050 m-equiv/l.). Stepwise elution with 0.5 and 1 M NaSCN

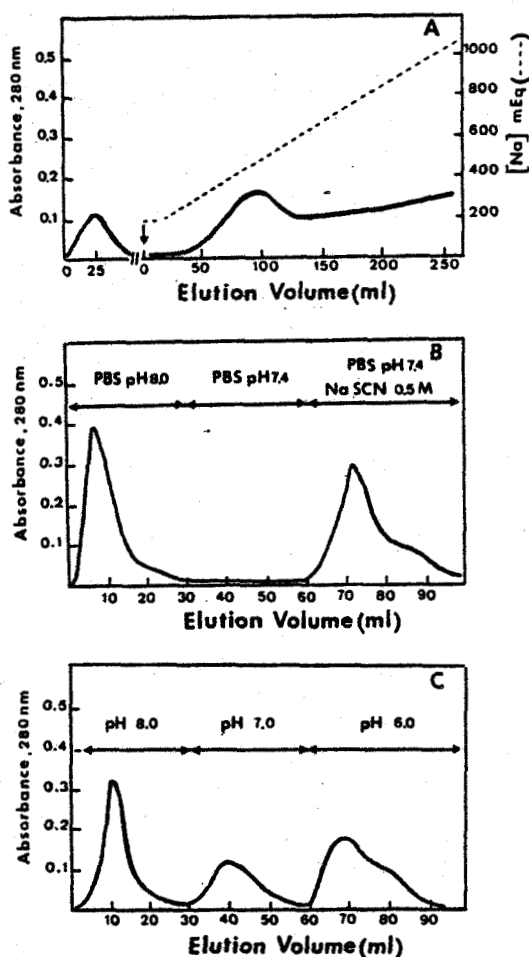


Fig. 2. Chromatography of monoclonal immunoglobulin IgG1 IR 595 (15 mg) on protein A-Sepharose. (A) Elution with PBS, pH 8.0 (70 ml), followed by a linear gradient from 0 to 3 M NaSCN (total volume: 300 ml). The shape of the gradient was monitored by determination of Na concentrations (m-equiv/l.) in the collected fractions. (B) Elution with PBS, pH 8.0 (70 ml), followed by PBS, pH 7.4 (50 ml), PBS, pH 7.4, containing 0.5 M NaSCN (50 ml) and 1 M NaSCN (50 ml). (C) Sequential elution with 0.14 M Na-phosphate, pH 8.0 and 7.0, and 0.1 M Na-citrate pH 6.0 (30 ml of each buffer). Flow rate: 15 ml/hr. Volume of collected fractions: 5 ml.

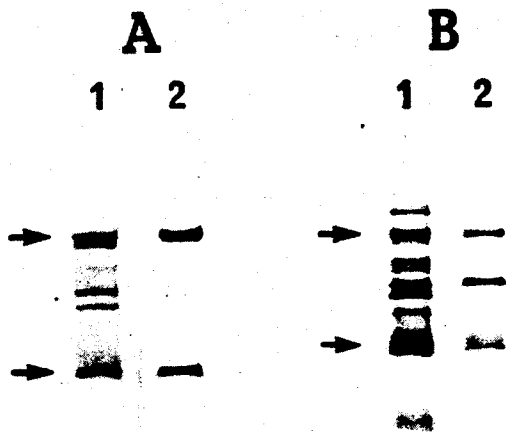


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS (10% acrylamide) of monoclonal rat IgG1 IR 595 eluted from protein A-Sepharose column. (A) [Refer to Fig. 2(B)] 1—fraction eluted with PBS, pH 8.0; 2—fraction eluted with PBS, pH 7.4, containing 0.5 M NaSCN. (B) [Refer to Fig. 2(C)] 1—fraction eluted with 0.14 M Na-phosphate, pH 8.0. 2—fraction eluted with 0.1 M Na-citrate, pH 6.0. Protein reduced by 2-mercaptoethanol (5% final concentration). Arrows indicate the position of heavy (H) and light (L) chains.

showed a peak at the 1 M concentration (Fig. 4). Additional protein was eluted with 2 M NaSCN or with the transfer of the column from 4°C to room temperature. When more IgG2c (50 mg) than the usual amount (15 mg) was applied to the column, part of the protein was eluted with 0.5 M NaSCN. With buffers of decreasing pH, elution of IgG2c IR 304 was observed at pH 3.0 (Fig. 4).

The two other monoclonal IgG2c gave somewhat different results. IgG2c IR 1012 was eluted with 0.5 M NaSCN or with a buffer of pH 6.0. IgG2c IR 759 was eluted partly with 0.5 M and partly with 1 M NaSCN (Fig. 4). PAGE-SDS analysis showed no obvious differences between the patterns of the fractions obtained from the three monoclonal IgG2cs studied.

*Fractionation of normal rat IgG or normal rat serum*

IgG2a isolated from normal rat serum by chromatography on DEAE-cellulose was eluted at pH 8.0 from the protein A-Sepharose column. No more material was eluted either by increasing

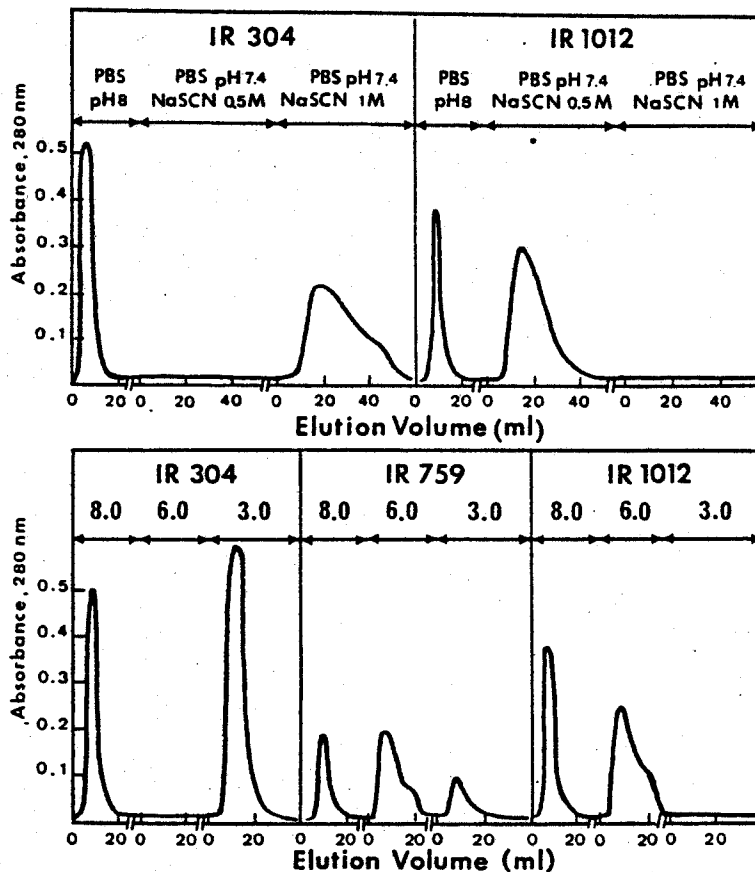


Fig. 4. Chromatography of monoclonal immunoglobulins IgG2c IR 304, IR 759, IR 1012 (15 mg) on protein A-Sepharose. (A) Sequential elution with PBS, pH 8.0 (70 ml), PBS, pH 7.4 (50 ml, not shown), and PBS, pH 7.4, containing 0.5 and 1 M NaSCN (volume of each buffer: 50 ml). (B) Sequential elution with 0.14 M Na-phosphate, pH 8.0, 0.1 M Na-citrate, pH 6.0 and 3.0 (volume of each buffer: 30 ml).

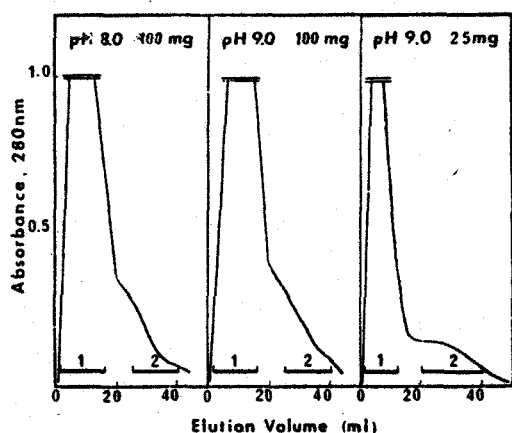


Fig. 5. Elution of proteins from a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation of normal rat serum on protein A-Sepharose column. The amount of material applied was determined by Bio-Rad protein assay. Flow rate: 15 ml/hr.

molarities of NaSCN or by buffers of decreasing pH.

A precipitate of normal rat serum at 40% ammonium sulphate saturation (100 mg protein, 35 mg IgG) was eluted at pH 8.0 as a peak of asymmetrical shape with a shoulder after a main peak. This shoulder was resolved as a second peak when less material was applied to the column and the pH raised to 9.0 (Fig. 5). Immunoelectrophoresis of the two peaks showed that the main peak (fraction 1) contained non immunoglobulin material in addition to IgA, IgM and IgG2a. The second peak (fraction 2) contained IgG1 and IgG2b but not IgM, IgA and IgG2a.

Figure 6 shows the elution profile obtained by the use of increasing molarities of NaSCN (0.5 and 1 M). Immunoelectrophoretic analysis showed that fractions eluted at 0.5 and 1 M NaSCN both contained IgG1 and IgG2c. Quantitative analysis showed that the fraction eluted at 0.5 M NaSCN contained mainly IgG1 (about 80%) and 20% of IgG2c (see Fig. 6). On

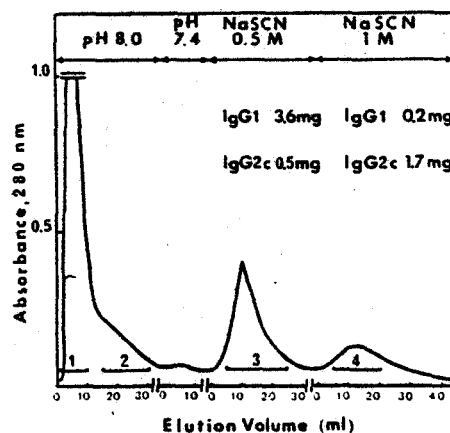


Fig. 6. Elution of proteins from a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation of normal rat serum on protein A-Sepharose column. Sequential elution with PBS, pH 8.0 (70 ml), PBS, pH 7.4 (50 ml), PBS, pH 7.4, containing 0.5 M NaSCN (50 ml) and PBS, pH 7.4, containing 1 M NaSCN (50 ml). The levels of IgG1 and IgG2c in fractions 3 and 4 were determined by single radial immunodiffusion.

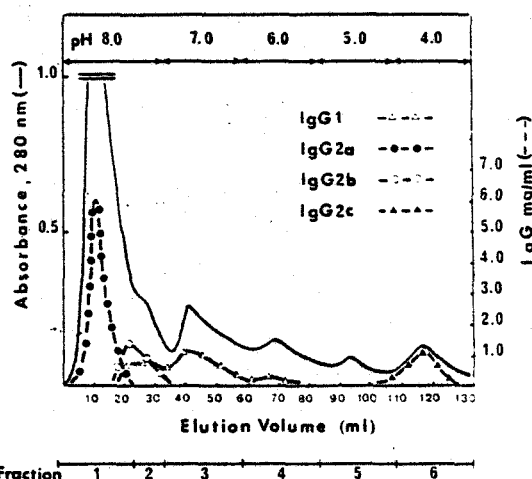


Fig. 7. Elution of proteins (100 mg) from a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation of normal rat serum on a protein A-Sepharose column. Sequential elution with 0.14 M Na-phosphate, pH 8.0 and 7.0, and 0.1 M Na-citrate, pH 6.0, 5.0 and 4.0 (no protein was eluted by 0.1 M Na-citrate buffer of pH 3.0). Broken lines indicate the elution profile of the IgG subclasses (determined by measurement of the IgG concentration in each of the collected fractions). Flow rate: 15 ml/hr.

Table 1. Immunoglobulin G content of fractions obtained by chromatography on protein A-Sepharose of a 40% ammonium sulphate precipitate of normal rat serum, (elution by buffers of decreasing pH<sup>a</sup>)

Fraction <sup>b</sup>	pH	IgG1 (mg)	IgG2a (mg)	IgG2b (mg)	IgG2c (mg)
1	8.0	0.50	10.70	N.D.	N.D.
2	8.0	2.41	0.50	2.22	N.D.
3	7.0	4.31	N.D.	N.D.	N.D.
4	6.0	0.75	N.D.	N.D.	N.D.
5	5.0	0.39	N.D.	N.D.	0.27
6	4.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.80
Total recovered (mg)		8.36	11.20	2.22	2.07
Total applied (mg)		13.60	14.70	2.40	4.25

<sup>a</sup> Ig levels determined by radial immunodiffusion.

<sup>b</sup> Refer to Fig. 7.

N.D.: Not detectable (less than 0.05 mg).



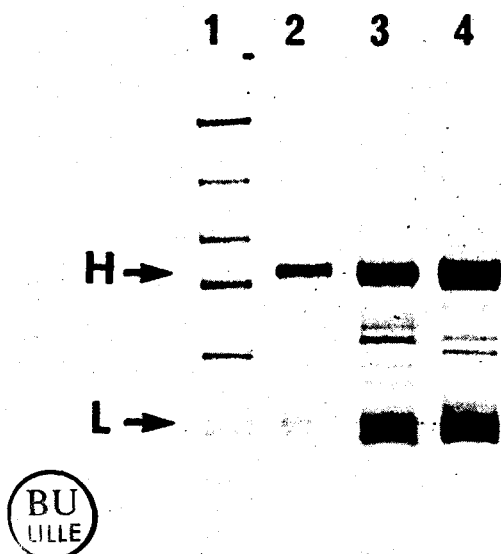


Fig. 8. Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS (7.5% acrylamide) of fractions from a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation of normal rat serum, eluted from a protein A-Sepharose column by buffers of decreasing pH (refer to Fig. 7): 1—fraction 1 eluted at pH 8.0; 2—fraction 2 eluted at pH 8.0; 3—fraction 4 eluted at pH 6.0; 4—fraction 6 eluted at pH 4.0. Proteins reduced by 2-mercaptoethanol (5% final concentration).

the contrary, the fraction eluted with 1 M NaSCN contained almost only IgG2c (about 90%).

The elution profile of rat serum obtained by the use of buffers of decreasing pH is shown in Fig. 7, with the quantitative analysis of each collected fraction for IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c. Table 1 gives the quantitative analysis of IgG subclasses in the pooled fractions. The results indicate that IgG2b and part of IgG1 are eluted at pH 8.0 in the second peak. The fraction eluted at pH 7.0 contained only IgG1 and the fraction eluted at pH 4.0 only IgG2c. A low proportion of IgG2c was also eluted at 5.0. Examination of the fractions by PAGE-SDS showed that the first peak at pH 8.0 (fraction 1) contained other proteins than IgG, whereas only IgG and after reduction H- and L-chains were observed in the other fractions. The  $\gamma$ -heavy chain in fraction 1 has a mol. wt of 52,000, characteristic of IgG2a; in fraction 2, the H-chain mol. wt is 55,000, characteristic of IgG1 and IgG2b (Fig. 8) (Rousseaux *et al.*, in preparation).

#### DISCUSSION

Results of these studies have shown that the interaction between rat IgG and protein A is in part related to the subclass but also depends on

many other factors. As previously demonstrated by Medgyesi *et al.* (1978), our studies have shown that both IgG1 and IgG2c bind protein A. However, another subclass, IgG2b, was found slightly retarded at pH 8.0 or 9.0 on the protein A-Sepharose column and therefore demonstrated a weak affinity for protein A. The use of buffers of decreasing pH or of increasing molarities of NaSCN has also shown that monoclonal (or normal) IgG2c has a greater affinity for protein A than IgG1. However differences within each of these two subclasses were found. Studies with monoclonal IgG2c showed that some proteins bind more strongly to protein A than others. This heterogeneity was also observed with the IgG2c molecules from normal rat serum; but, in the latter case, the IgG2c population having the strongest affinity for protein A seems to predominate. We have also noticed that monoclonal IgG2cs with high affinity for protein A are more basic proteins than the others: they have the slowest electrophoretic mobility, they require the highest salt concentrations for elution from CM-cellulose at pH 4.2. We do not know whether these charge differences are directly related to the differences in affinity for protein A or whether they reflect structural differences within the Fc part of the IgG molecule.

Heterogeneity of binding within the IgG1 subclass was also demonstrated. Each monoclonal IgG1 can be divided into different fractions; for example, with buffers of decreasing pH, three populations eluted at pH 8.0, 7.0 and 6.0 respectively were observed. The protein eluted at pH 8.0 exhibited some physico-chemical differences from the protein retained on the protein A-Sepharose column; in particular, partial proteolysis and a heavy chain of a different mol. wt were found. Such a heterogeneity has also been observed for mouse IgG1. Ey *et al.* (1978) found in normal mouse serum two populations respectively eluted at pH 7.0 and 6.0 from a protein A-Sepharose column. McKenzie *et al.* (1978) showed that a part of monoclonal IgG1 is not bound at pH 7.4 (and evidenced partial proteolysis), whereas most of the protein is eluted by 0.5 M NaSCN. In the case of rat IgG, one notices that a part of IgG1 behaves exactly as IgG2b (i.e. slightly retarded at pH 8.0), whereas another part behaves as some IgG2c molecules (i.e. elution by buffer of pH 6.0 or by 0.5 M NaSCN).

The elution pattern of rat IgG from the protein A-Sepharose column also depends on the

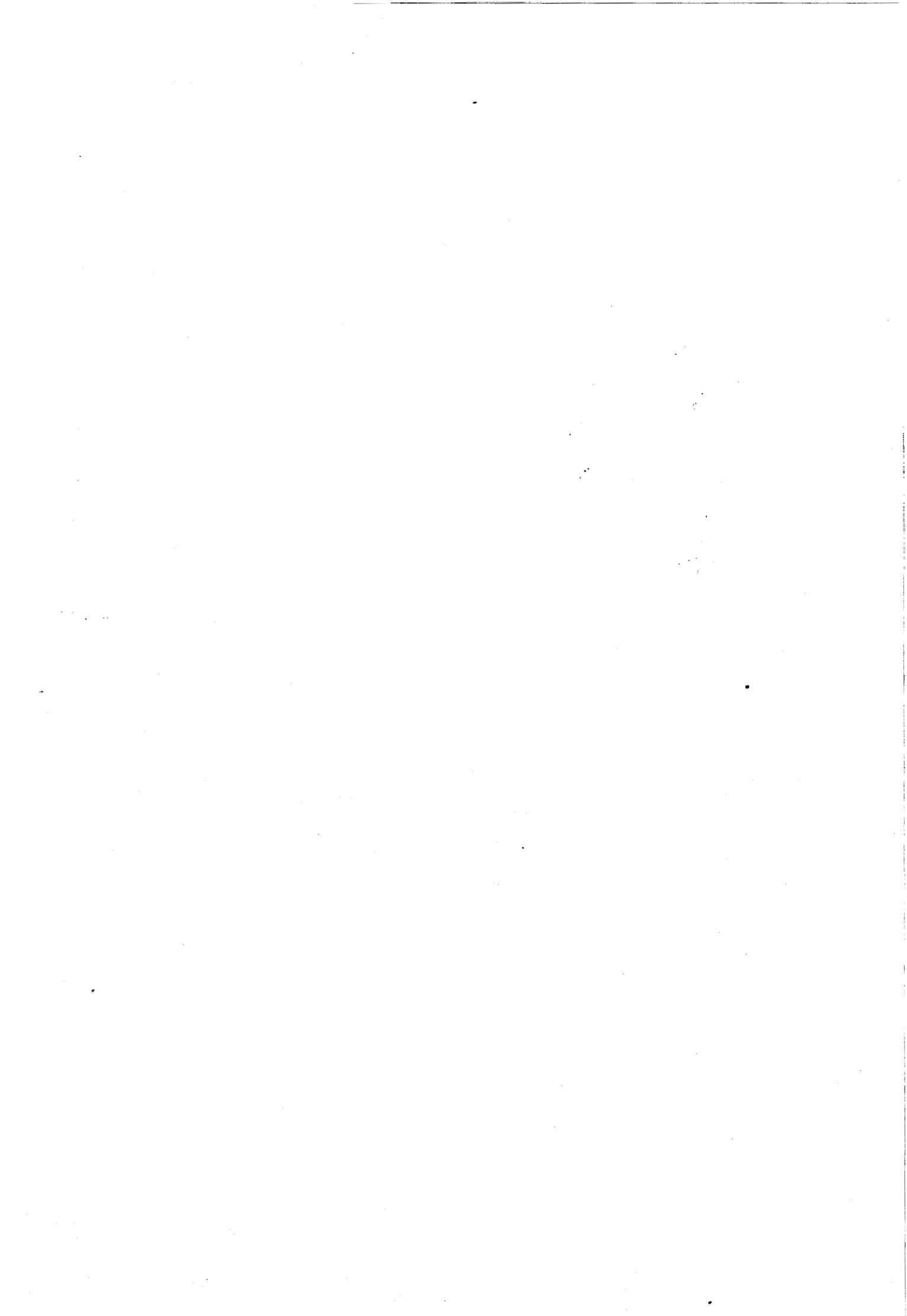
amount of material applied. For example, when large amounts of monoclonal IgG2c IR 304 are put on a column, part of the protein is eluted with 0.5 M NaSCN, whereas this is not the case when lower amounts are used. The second peak observed at pH 8.0 or 9.0 with normal rat IgG is only noticed when low amounts of protein (less than 100 mg) are applied to the column. Similar results have been observed with mouse IgG (Chalon *et al.*, 1979) and goat IgG (Delacroix & Vaerman, 1979; Duhamel *et al.*, 1980).

In conclusion, the interaction between rat IgG and protein A is not entirely subclass-specific. However, our studies have shown that it is possible to isolate pure IgG1 and IgG2c from normal rat serum, the best procedure being the use of buffers of decreasing pH. Only IgG1 is eluted at pH 7.0 and only IgG2c at pH 4.0–3.0. Partial purification of IgG2b can also be achieved by elution at pH 8.0 or better at pH 9.0. However, such a purification can only be obtained with no more than 100 mg of protein from a precipitate at 40% ammonium sulphate saturation. Perhaps the combination of protein A–Sepharose chromatography with ion-exchange chromatography could lead to a complete purification of IgG2b from normal rat serum.

*Acknowledgements*—The helpful technical assistance of A. M. Debevere and J. Herno is gratefully acknowledged. This work was supported by the INSERM (Contrat de Recherche Libre No. 80.30.28) and the CNRS (L.A. No. 268, Pr. G. Biserte).

#### REFERENCES

- Bazin H., Beckers A., Deckers C. & Heremans J. F. (1972) Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. I—general features of LOU/Wsl strain immunocytomas and their monoclonal proteins. *Eur. J. Cancer* **10**, 568–580.
- Bazin H., Beckers A., Deckers C. & Moriamé M. (1973) Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. V—monoclonal immunoglobulins secreted by 250 ileocaecal immunocytomas in LOU/Wsl rats. *J. nat. Cancer Inst.* **51**, 1359–1361.
- Bazin H., Beckers A. & Querinjean P. (1974) Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immun.* **4**, 44–48.
- Bruna M. J., Minden P. & Grey H. M. (1979) Heterogeneity of binding of human IgA subclasses to protein A. *J. Immun.* **123**, 1457–1461.
- Chalon M. P., Milne R. W. & Vaerman J. P. (1979) Interactions between mouse immunoglobulins and Staphylococcal protein A. *Scand. J. Immun.* **9**, 359–364.
- Delacroix D. & Vaerman J. P. (1979) Single purification of goat IgG1 and IgG2 subclasses by chromatography on protein A–Sepharose at various pH. *Molec. Immun.* **16**, 837–840.
- Duhamel R. C., Meezan E. & Brendel K. (1980) The pH-dependent binding of goat IgG1 and IgG2 to protein A–Sepharose. *Molec. Immun.* **17**, 29–36.
- Duhamel R. C., Schur P. H., Brendel K. & Meezan E. (1979) pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A–Sepharose. *J. Immun. Meth.* **31**, 211–217.
- Ey P. L., Prowse S. J. & Jenkin C. R. (1978) Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A–Sepharose. *Immunochemistry* **15**, 429–436.
- Forsgren A. & Sjoquist J. (1966) 'Protein A' from *S. aureus*. I—pseudo-immune reaction with human  $\gamma$ -globulin. *J. Immun.* **97**, 822–827.
- Goding J. W. (1976) Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. *J. Immun. Meth.* **13**, 215–226.
- Goding J. W. (1978) Use of Staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immun. Meth.* **20**, 241–253.
- Grey H. M., Hirst J. W. & Cohn M. (1971) A new mouse immunoglobulin: IgG3. *J. exp. Med.* **133**, 289–304.
- Grov A. (1976) Human colostrum IgA interacting with staphylococcal protein A. *Acta path. microbiol. scand.* **C84**, 71–72.
- Harboe M. & Fölling I. (1974) Recognition of two distinct groups of human IgM and IgA based on different binding to staphylococci. *Scand. J. Immun.* **3**, 471–482.
- Johansson S. G. O. & Inganas M. (1978) Interaction of polyclonal human IgE with protein A from *Staphylococcus aureus*. *Immun. Rev.* **41**, 248–260.
- Kerckaert J. P. (1978) Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **84**, 354–360.
- Kronvall G. & Fromel D. (1970) Definition of staphylococcal protein A reactivity for human immunoglobulin and fragments. *Immunochemistry* **7**, 124–127.
- Kronvall G., Grey H. M. & Williams R. C. (1970) Protein A reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between mouse and human immunoglobulins. *J. Immun.* **105**, 1116–1123.
- Kronvall G. & Williams R. C. (1969) Differences in anti-protein A reactivity among IgG subclasses. *J. Immun.* **103**, 828–833.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lind I., Harboe M. & Fölling I. (1975) Protein A reactivity of two distinct groups of human monoclonal IgM. *Scand. J. Immun.* **4**, 843–848.
- Mancini G., Carbonara A. D. & Heremans J. F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235–254.
- McKenzie M. R., Gutman G. A. & Warner N. L. (1978a) The binding of murine IgM to staphylococcal A protein. *Scand. J. Immun.* **7**, 367–370.
- McKenzie M. R., Warner N. L. & Mitchell G. F. (1978b) The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal protein A. *J. Immun.* **120**, 1495–1496.
- Medgyesi G. A., Füst G., Gergely J. & Bazin H. (1978) Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. *Immunochemistry* **15**, 125–129.
- Porath J., Aspberg K., Drevin H. & Axén R. (1973) Preparation of cyanogen bromide-activated agarose gels. *J. Chromat.* **86**, 53–56.
- Saltvedt E. & Harboe M. (1976) Binding of IgA to protein A-containing staphylococci: relationship to subclasses. *Scand. J. Immun.* **5**, 1103–1108.





L'affinité des immunoglobulines, plus particulièrement celle des IgG, pour la protéine A, constituant de la paroi bactérienne de nombreuses souches de Staphylococcus aureus, représente une propriété biologique dont les applications analytiques et préparatives se sont développées de façon considérable ces dernières années. Cette affinité se limite à certaines sous-classes d'IgG, comme l'ont montré les études réalisées chez l'Homme et dans diverses espèces animales (première partie, Chapitre III). Parmi les sous-classes qui se lient à la protéine A, des différences d'affinité ont également été mises en évidence. Ceci présente le grand intérêt de rendre possible la purification d'anticorps appartenant à une seule sous-classe parmi une population hétérogène. Chez le Rat, l'étude de l'interaction entre protéine A et sous-classes d'IgG, présentait également l'intérêt de définir les conditions et les limites de son utilisation (analytique ou préparative) avec les anticorps monoclonaux de classe IgG. Lorsque nous avons entrepris ce travail, deux publications avaient rapporté l'affinité des IgG ou des sous-classes d'IgG du Rat pour la protéine A. GODING (1978) montrait que la très grande majorité des IgG du sérum de Rat ne se fixe pas sur une colonne de protéine A-Sépharose à pH 7,4. MEDGYESI et al. (1978) mettaient en évidence une interaction entre la protéine A et deux sous-classes d'IgG : IgG1 et IgG2c. Ces auteurs utilisaient comme techniques la précipitation IgG-protéine A en milieu gélifié et l'adsorption sur des suspensions bactériennes de S. aureus. Dans notre étude, nous avons utilisé la chromatographie sur colonnes de protéine A couplée au Sépharose (Protéine A-Sépharose, Pharmacia). L'interaction entre protéine A et sous-classes d'IgG a été étudiée :

- d'une part, avec des immunoglobulines monoclonales ou des anticorps monoclonaux,
- d'autre part, avec des IgG du sérum de Rat.

Nous avons recherché si l'affinité des IgG pour la protéine A dépendait uniquement de la nature de la sous-classe ou si d'autres facteurs pouvaient intervenir. Le rôle joué par la dénaturation des IgG sur l'interaction avec la protéine A a également été étudié.

## A - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le détail des méthodes utilisées est indiqué dans la publication n° 8. Nous rappelons ici brièvement les différents procédés employés pour analyser l'interaction entre IgG du Rat et protéine A. La chromatographie sur protéine A-Sépharose (Pharmacia) a été effectuée habituellement à + 4° C. Environ 15 mg d'IgG purifiée ont été déposés sur une colonne de 6 ml. Dans le cas d'un précipité du sérum de rat par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation, 100 mg de protéine, soit environ 30 à 35 mg d'IgG, ont été appliqués. Dans le cas où un sérum (ou une ascite) ont été déposés directement sur la colonne, le volume de sérum (ou d'ascite) était 1 ml à 1,5 ml.

Trois protocoles d'élution ont été utilisés :

- 1° La colonne est lavée par 60 - 70 ml de tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M (sérum physiologique tamponné), pH 8 puis un gradient de thiocyanate de sodium (NsSCN) de 0 à 3 M (volume total 300 ml) est appliqué.
- 2° L'élution est réalisée successivement par du sérum physiologique tamponné de pH 8 (70 ml), puis de pH 7,4 (50 ml), puis le même tampon contenant du thiocyanate de sodium (NaSCN) 0,5 M et 1 M (50 ml de chaque).
- 3° L'élution est réalisée successivement pour les tampons : phosphate de sodium 0,14 M, pH 8 (40 ml) et pH 7 (35 ml) ; citrate de sodium 0,1 M de pH 6 ; 5 ; 4 et 3 (35 ml de chaque tampon).

Dans certaines expériences, la colonne a été équilibrée par du tampon borate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M de pH 9 et l'élution réalisée par ce même tampon.

## B - AFFINITE DES IgG MONOCLONALES POUR LA PROTEINE A

### 1. IgG2a

La chromatographie de différentes IgG2a monoclonales (IR 33, IR 418, IR 530) sur protéine A-Sépharose à pH 8, met en évidence un seul pic de

profil symétrique, non retardé (résultats non présentés). Aucun matériel protéique supplémentaire n'est élué par un gradient de concentration en thiocyanate ou par des tampons de pH décroissants (pH 7 à 3).

### 2. IgG2b

L'IgG2b monoclonale IR 863 est éluée à pH 8,0 sous forme d'un pic légèrement retardé et de forme asymétrique (voir la figure 1 de l'article n° 8, page 215). La chromatographie à pH 9,0 met en évidence deux pics incomplètement séparés. Ces deux fractions ont le même comportement en électrophorèse en acrylamide-SDS. Elles donnent une réaction d'identité totale avec un antisérum anti-IgG (résultats non présentés).

### 3. IgG1 (voir la figure n° 2 de l'article n° 8)

La chromatographie de différentes IgG1 monoclonales purifiées (IR 27, IR 595, IR 766), à pH 8, met en évidence un pic légèrement retardé et asymétrique. Un autre pic est observé au début d'un gradient à NaSCN 0 à 3 M (voir la figure 2 A). L'élution successive avec du NaSCN 0,5 M et 1 M aboutit à une récupération de la protéine à la concentration 0,5 M, mais pas à la concentration 1 M (voir la figure 2 B). Ces résultats obtenus sont similaires si l'élution est effectuée à + 4° C ou à la température ambiante, excepté qu'à température ambiante, une partie de la protéine est éluée à pH 7,4. Avec des tampons de pH décroissants, l'élution des IgG1 monoclonales est obtenue à pH 8, 7 et 6 (voir figure 2 C). Le pourcentage de protéine éluée à pH 8 et 7 peut être très variable, et ceci pour une même IgG1 monoclonale. Dans certains cas, la quantité éluée à pH 8 peut être très faible, et on peut observer l'absence de matériel protéique élué à pH 7. Dans d'autre cas, le matériel élué à pH 8 peut être très important. Toutes les fractions donnent un arc de précipitation en immunoélectrophorèse avec un antisérum anti-IgG (chaînes lourdes + chaînes légères). Elles réagissent avec un antisérum anti- $\gamma$  1 et ne donnent pas de précipitation avec un antisérum anti- $\gamma$  2a. L'électrophorèse en gel d'acrylamide SDS montre pour les fractions éluées à pH 8 en présence de bandes supplémentaires aux chaînes lourdes et légères, suggérant une protéolyse partielle de la protéine (figure 3 de l'article n° 8, page 216).

La figure 48 montre les profils d'élution obtenus lorsqu'une ascite contenant un anticorps monoclonal IgG1 à activité anti-DNP est chromatographiée sur protéine A-Sépharose. On observe que l'anticorps monoclonal IgG1 est élué ; d'une part, à pH 8 sous forme d'un deuxième pic, qui suit un premier pic où se trouvent les autres protéines de l'ascite ; d'autre part à pH 6.

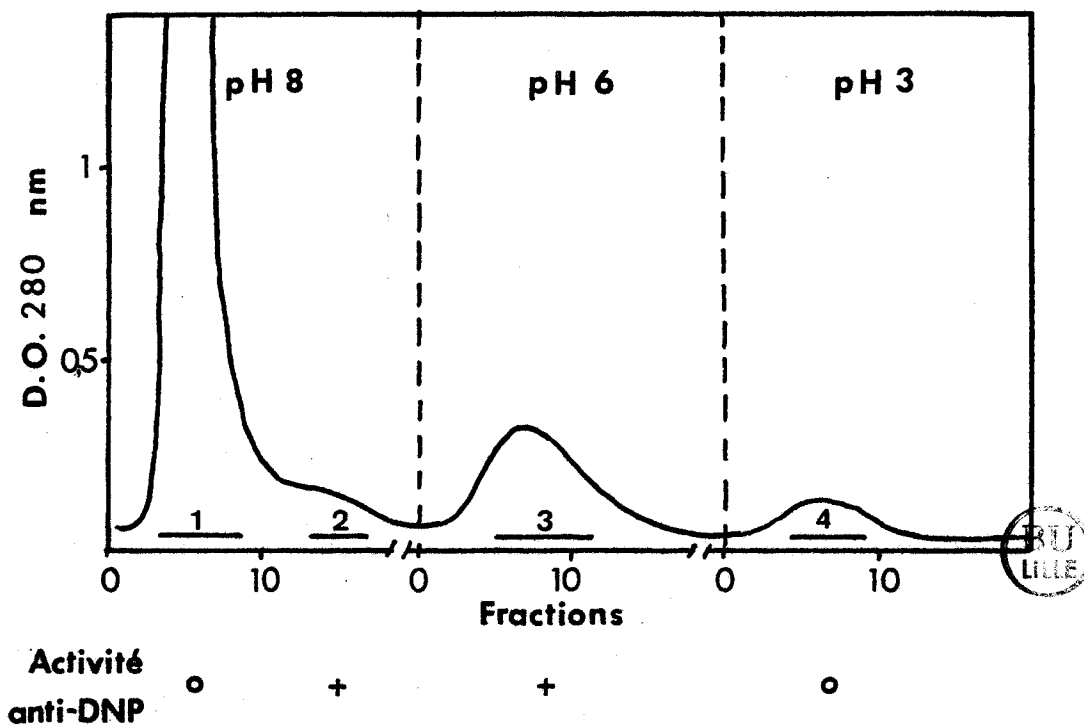
#### 4. IgG2c

La chromatographie de différentes IgG2c monoclonales (IR 304, IR 759, IR 1012) met en évidence un pic non retenu à pH 8 (voir la figure 4 de l'article n° 8, page 216). Ce matériel ne réagit pas avec un antisérum anti- $\gamma$ 2c, mais réagit avec un antisérum anti- $\gamma$ 2a. Ceci suggère qu'il correspond à de l'IgG2a contaminant la préparation d'IgG2c. L'IgG2c IR 304 est éluee à la fin d'un gradient de NaSCN 0 à 3 M. Lorsque l'élution est réalisée successivement par le NaSCN 0,5 M et le NaSCN M, l'IR 304 est éluee par la concentration 1 M. Avec des tampons de pH décroissant, l'IR 304 est éluee par le tampon de pH 3. Lorsque la quantité de protéine déposée est de 50 mg au lieu de 15 mg, une partie de l'IgG2c IR 304 est éluee par le NaSCN 0,5 M (ou un tampon de pH 6) (résultats non présentés).

Les deux autres IgG2c monoclonales testées donnent des résultats différents. L'IR 1012 est éluee par le NaSCN 0,5 M ou un tampon de pH 6 (voir figure 4 de l'article n° 8, page 216). L'IR 759 est éluee en partie avec du NaSCN 0,5 M et en partie avec du NaSCN M. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS des différentes fractions obtenues par les IgG2c monoclonales testées ne met pas en évidence de différences significatives.

### C - FRACTIONNEMENT DES SOUS-CLASSES D'IgG DU SERUM DE RAT

L'affinité des sous-classes d'IgG du sérum de Rat pour la protéine A a été étudiée de deux façons différentes :



**Figure 48.-** Elution d'une ascite contenant un anticorps monoclonal IgG1 à activité anti-DNP sur colonne de protéine A-Sépharose (6 ml). L'activité anti-DNP a été recherchée par immunodiffusion double en gélose avec comme antigène la sérumalbumine bovine dinitrophénylée (DNP<sub>48</sub>-BSA, Calbiochem). Elutions successives par les tampons phosphate de Na 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 8 ; citrate de Na 0,1 M, pH 6 et pH 3 (débit : 15 ml/h ; volume des fractions : 3 ml).

- certaines sous-classes d'IgG purifiées totalement ou partiellement par chromatographie d'échange ionique sur DEAE-Cellulose ont été chromatographiées sur colonne de protéine A-Sépharose ;

- le sérum de Rat, ou un précipité de ce sérum par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation, ont été directement fractionnés sur protéine A-Sépharose.

### 1. AFFINITE POUR LA PROTEINE A DE SOUS-CLASSES D'IgG DU SERUM DE RAT (PARTIELLEMENT OU TOTALEMENT PURIFIEES)

La chromatographie sur DEAE-Cellulose d'un précipité du sérum de Rat par le sulfate d'ammonium à 40 % permet de séparer certaines sous-classes d'IgG :

- l'IgG2a est éluée par un tampon phosphate de sodium 0,005 M, pH 7,8,
- une fraction contenant IgG2a et IgG2b en proportions variables (le plus souvent dans un rapport 1/1) est éluée par le tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,8,
- les fractions éluées par les tampons phosphate 0,05 M et 0,1 M contiennent essentiellement de l'IgG2a et de l'IgG1.

Ces différentes fractions ont été chromatographiées sur colonne de protéine A-Sépharose.

L'IgG2a n'est pas retenue sur la colonne à pH 8. Elle est éluée sous forme d'un pic symétrique et non retardé.

La chromatographie de la fraction contenant IgG2a et IgG2b (voir figure 49) montre la présence de deux pics incomplètement séparés à pH 8. Ce premier pic contient IgG2a et IgG2b, le second ne contient que de l'IgG2b, comme le montrent les dosages effectués par immunodiffusion radiale. Une quantité très faible est éluée par des tampons de pH décroissant (élution à pH 3).

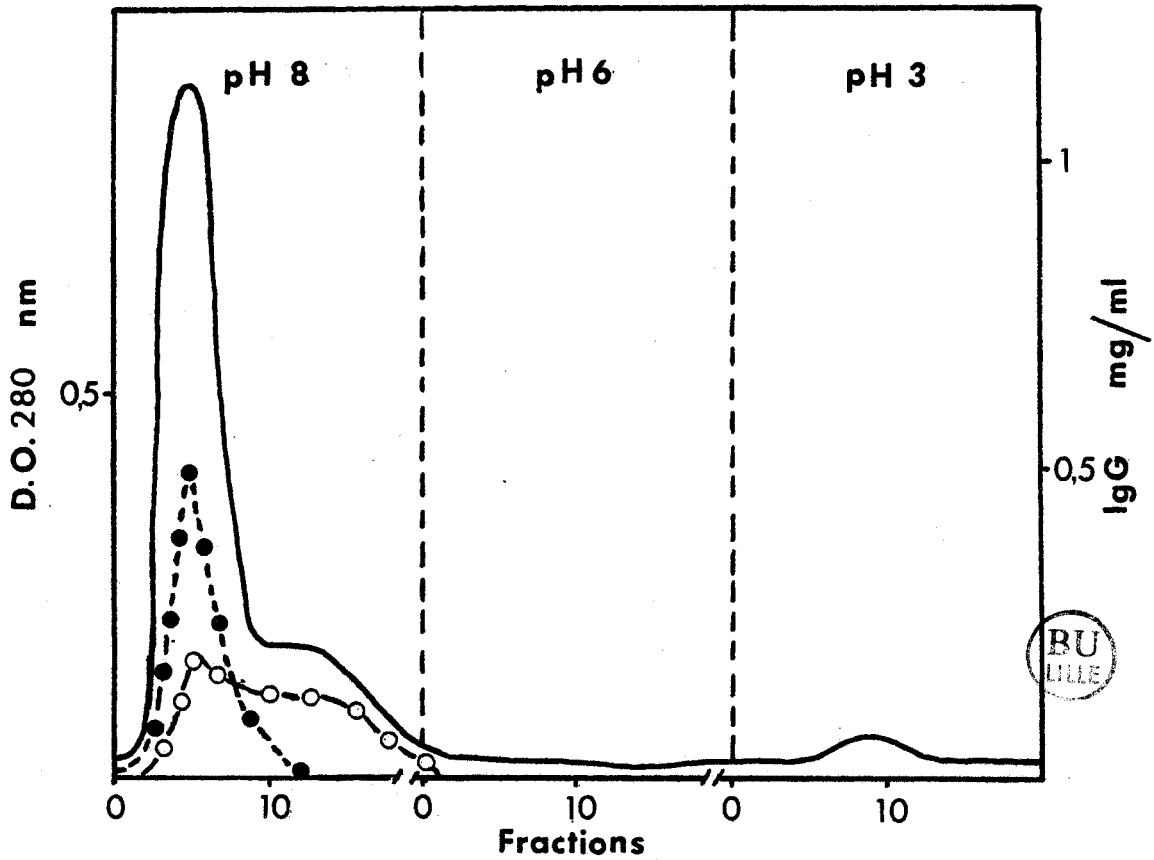


Figure 49.- Chromatographie sur protéine A-Sépharose d'une fraction du sérum de Rat contenant de l'IgG2a et de l'IgG2b (fraction éluée par le phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,8 d'une colonne de DEAE-Cellulose). Les courbes en pointillés représentent les dosages des sous-classes IgG2a et IgG2b par immunodiffusion radiale (-●-●-, IgG2a ; -o-o-, IgG2b).

Une fraction contenant IgG1 et IgG2a a été chromatographiée sur protéine A-Sépharose. L'élution par des tampons de pH 8 à 3 est présentée dans la figure 50. L'IgG2a est éluee à pH 8 alors que l'IgG1 est éluee à pH 7 et 6.

## 2. CHROMATOGRAPHIE DU SERUM DE RAT SUR PROTEINE A-SEPHAROSE

La figure 5 de l'article n° 8 montre le profil d'élution obtenu à pH 8 et pH 9, par chromatographie sur protéine A-Sépharose d'un précipité du sérum de Rat par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. Un pic majeur suivi d'un épanchement sont observés à pH 8. Cet épaulement se transforme en un deuxième pic si l'on dépose moins de protéine sur la colonne (25 mg au lieu de 100 mg) et si l'élution est réalisée à pH 9. Le contrôle du premier pic par immunoelectrophorèse met en évidence des protéines autres que les immunoglobulines ainsi que de l'IgG2a, de l'IgM et de l'IgA. Le second pic contient de l'IgG1, de l'IgG2b mais ne contient pas d'IgG2a, d'IgA et d'IgM.

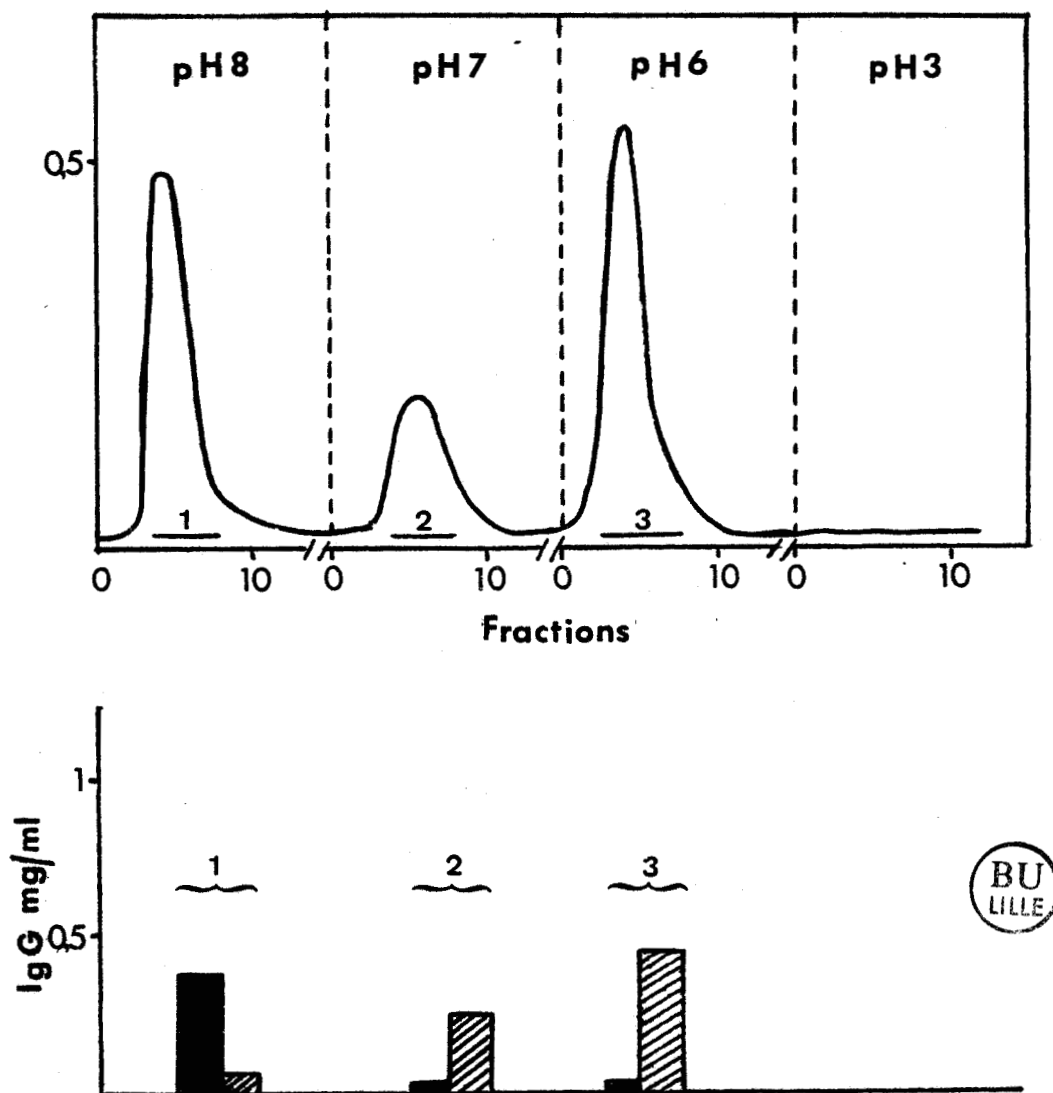
Le profil d'élution obtenu par l'utilisation de molarités de NaSCN 0,5 M et 1 M est présenté dans la figure 6 de l'article n° 8. Les deux fractions contiennent IgG1 et IgG2c comme le montrent les contrôles en immunoelectrophorèse (résultats non présentés). Mais le dosage des sous-classes par immunodiffusion radiale montre que la fraction éluee par le NaSCN 0,5 M contient principalement de l'IgG1 (environ 80 %) alors que la fraction éluee par le NaSCN 1 M contient presque exclusivement de l'IgG2c.

La figure 51 présente le profil d'élution obtenu par des tampons de pH décroissants (8 à 3). L'analyse quantitative des fractions collectées montre que l'IgG2a est éluee à pH 8 dès son premier pic ; l'IgG2b et l'IgG1 sont éluees également à pH 8 mais dans un deuxième pic. Une autre partie de l'IgG1 est éluee à pH 7 et à pH 6. L'IgG2c est éluee essentiellement à pH 4.

Deux remarques importantes sont à faire sur ces résultats :

- La proportion d'IgG1 éluee à pH 8 peut être très variable selon les chromatographies. Il en est de même pour les fractions obtenues à pH 7 et 6.
- Une quantité faible d'IgG2c peut être éluee à pH 6.





**Figure 50.**- Chromatographie sur protéine A-Sépharose (colonne de 6 ml) d'une fraction du sérum de Rat (20 mg de protéine) contenant de l'IgG2a et de l'IgG1 (fraction éluee par le tampon phosphate de Na 0,05 M, pH 7,8 d'une colonne de DEAE-Cellulose). Elution par les tampons phosphate de Na 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 8 ; phosphate de Na 0,14 M, pH 7 ; citrate de Na 0,1 M, pH 6. La partie inférieure de la figure représente les dosages d'IgG1 (▨) et d'IgG2a (■) dans les fractions 1, 2 et 3 (dosages par immunodiffusion radiale).

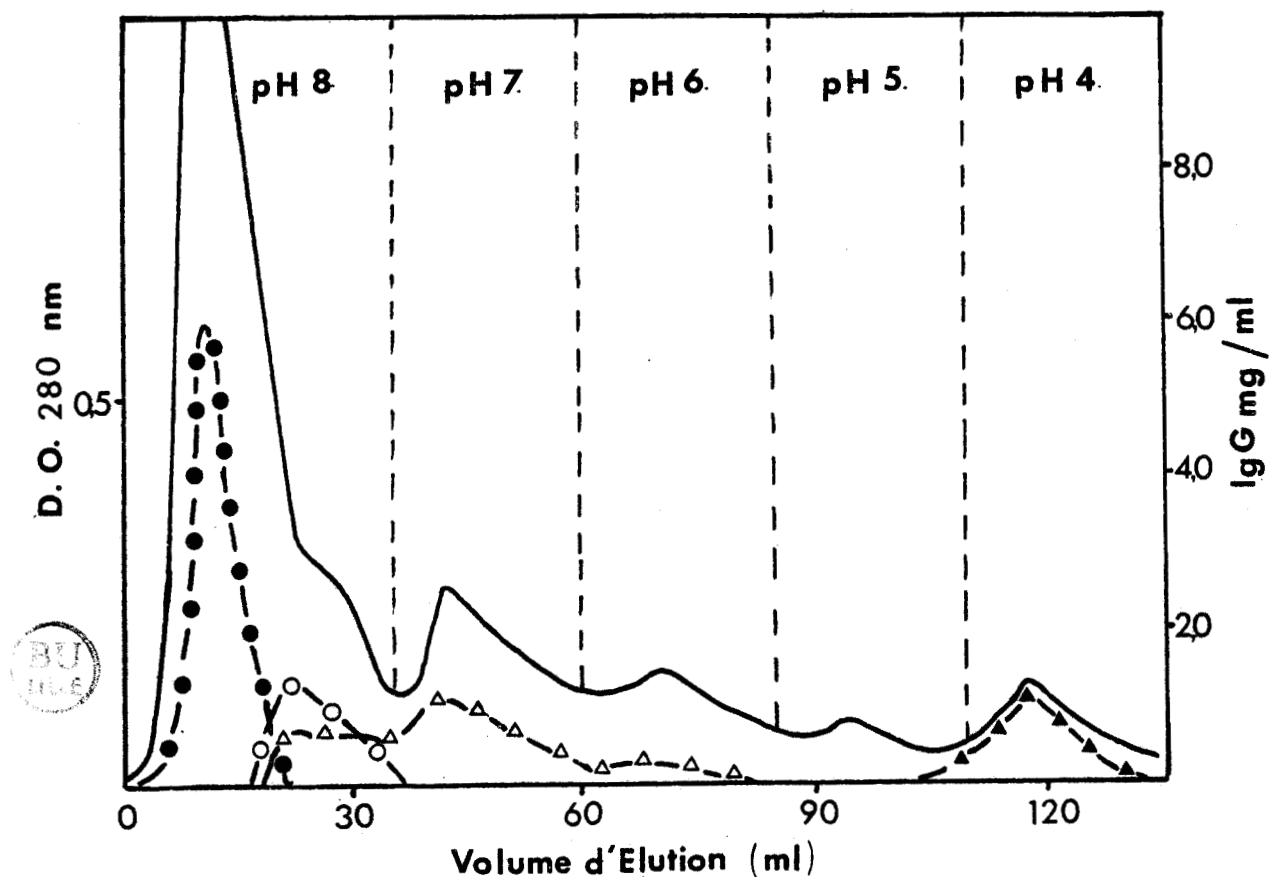


Figure 51.- Profil d'élution obtenu par chromatographie sur protéine A-Sépharose (colonne de 6 ml) d'un précipité du sérum de Rat par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation (100 mg). Les courbes en pointillés représentent les taux des différentes sous-classes déterminés par immunodiffusion radiale. -●-●-, IgG2a ; -○-○-, IgG2b ; -Δ-Δ-, IgG1 ; -▲-▲-, IgG2c

Des résultats similaires sont obtenus si l'on applique sur la colonne de protéine A-Sépharose le sérum de rat, équilibré à pH 8 (et non un précipité par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation).

### 3. PROTOCOLE DE PREPARATION DES SOUS-CLASSES D'IGg DU SÉRUM DE RAT UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE SUR PROTEINE A-SEPHAROSE ET LA CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE CELLULOSE

Les résultats obtenus par chromatographie du sérum de Rat sur protéine A-Sépharose montraient qu'il était possible par cette méthode de purifier la sous-classe IgG1 (élution par les tampons de pH 7 et 6) et la sous-classe IgG2c (élution à pH 4). Par chromatographie sur protéine ASépharose, on ne pouvait à l'inverse purifier les sous-classes IgG2a et IgG2b. La sous-classe IgG2a est facilement purifiée du sérum par chromatographie sur DEAE-Cellulose (élution par le phosphate de sodium 0,005 M, pH 7,8). La difficulté résidait dans la purification de l'IgG2b. Celle-ci peut être complètement purifiée en utilisant deux chromatographies successives : la première sur protéine A-Sépharose permet d'obtenir à pH 8 une fraction contenant IgG1 et IgG2b. La chromatographie de cette fraction sur DEAE-Cellulose et l'élution par les tampons phosphate 0,005 M ; 0,01 M ; 0,05 M, pH 7,8, permet d'obtenir l'IgG2b purifiée à la molarité 0,01 M (figure 52).

La figure 53 résume de façon schématique le protocole de fractionnement des sous-classes d'IgG du sérum de Rat utilisant la chromatographie sur protéine A-Sépharose et la chromatographie sur DEAE-Cellulose.

### D - ROLE DE LA DENATURATION DES IgG SUR L'AFFINITE POUR LA PROTEINE A

Lors de la chromatographie d'IgG monoclonales ou d'IgG du sérum sur protéine A-Sépharose, nous avons observé pour les sous-classes IgG1 et IgG2c des résultats indiquant une affinité variable. Par exemple, la même IgG1 monoclonale peut être éluée soit principalement à pH 8 soit à pH 6. De même, certaines préparations d'IgG2c IR 304 étaient éluées de la colonne de protéine A-Sépharose à pH 8 et 6 alors qu'habituellement, l'élution s'effectue à pH 3. Ces variations dans les résultats obtenus pouvaient être liées à

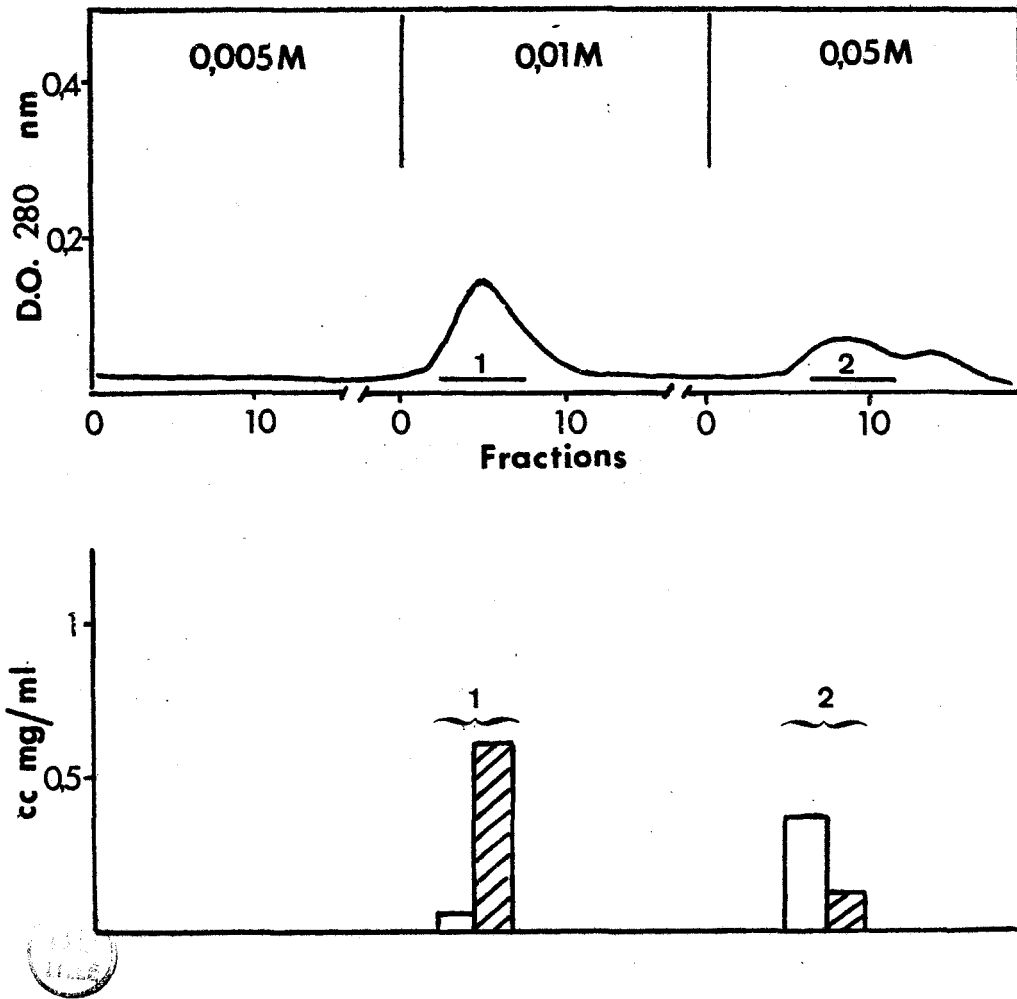


Figure 52.- Chromatographie sur DEAE-Cellulose (colonne 2 x 15 cm, débit : 20 ml/h ; volume des fractions : 5 ml) de la 2ème fraction obtenue par chromatographie sur protéine A-Sépharose du sérum de Rat à pH 8 (fraction contenant IgG1 et IgG2b, voir la figure 51). Elution par les tampons phosphate de Na 0,005 M, 0,01 M et 0,05 M, pH 7,8. La partie inférieure de la figure représente le dosage des sous-classes IgG1 (□) et IgG2b (▨) par immunodiffusion radiale.

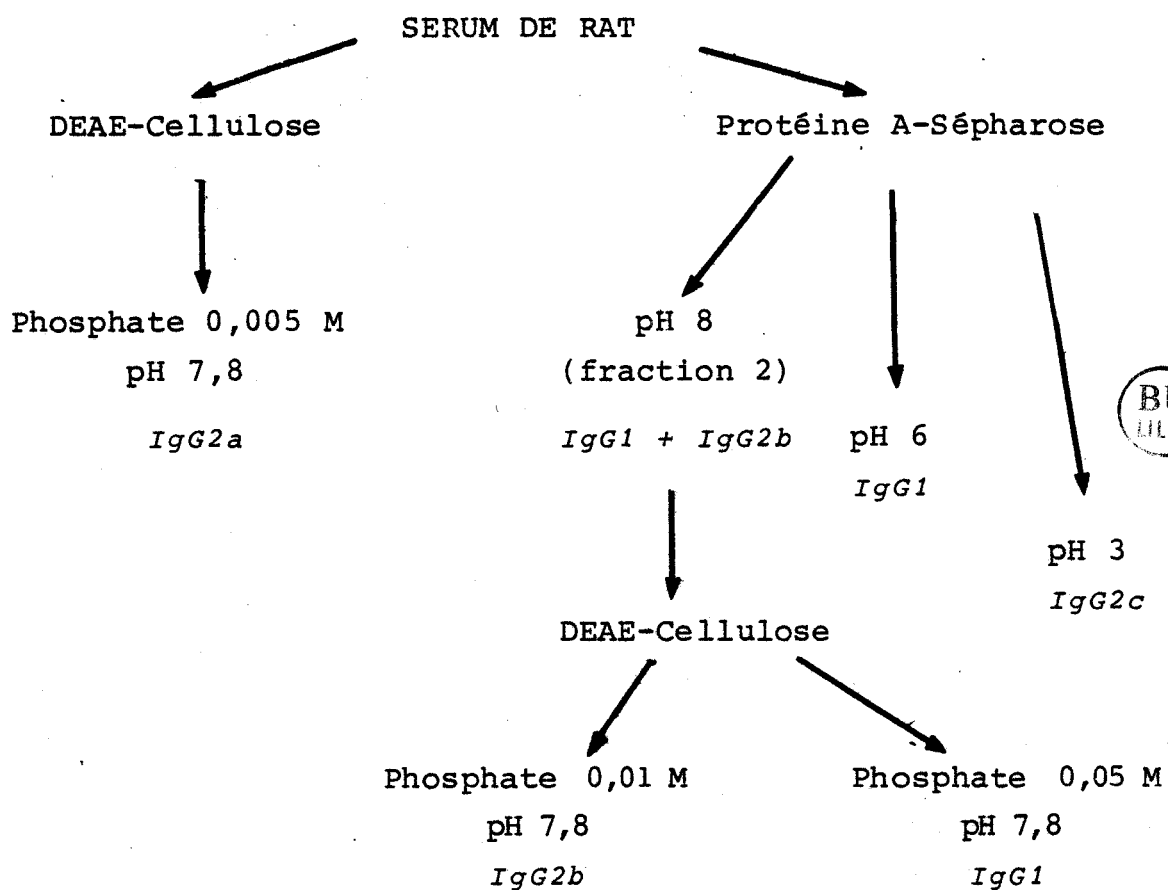


Figure 53.- Schéma résumant le protocole de fractionnement des sous-classes d'IgG du Rat utilisant la chromatographie sur DEAE-Cellulose et la chromatographie sur protéine A-Sépharose.

l'existence de molécules protéolysées ; en effet, il a été montré que l'affinité des IgG pour la protéine A nécessite l'intégrité structurale de la partie Fc (voir première partie, Chapitre III). Les résultats obtenus pour les IgG1 monoclonales indiquaient la présence de molécules protéolysées dans la fraction éluée à pH 8. Cependant les IgG protéolysées ne représentaient qu'une faible proportion de l'IgG non retenue à pH 8.

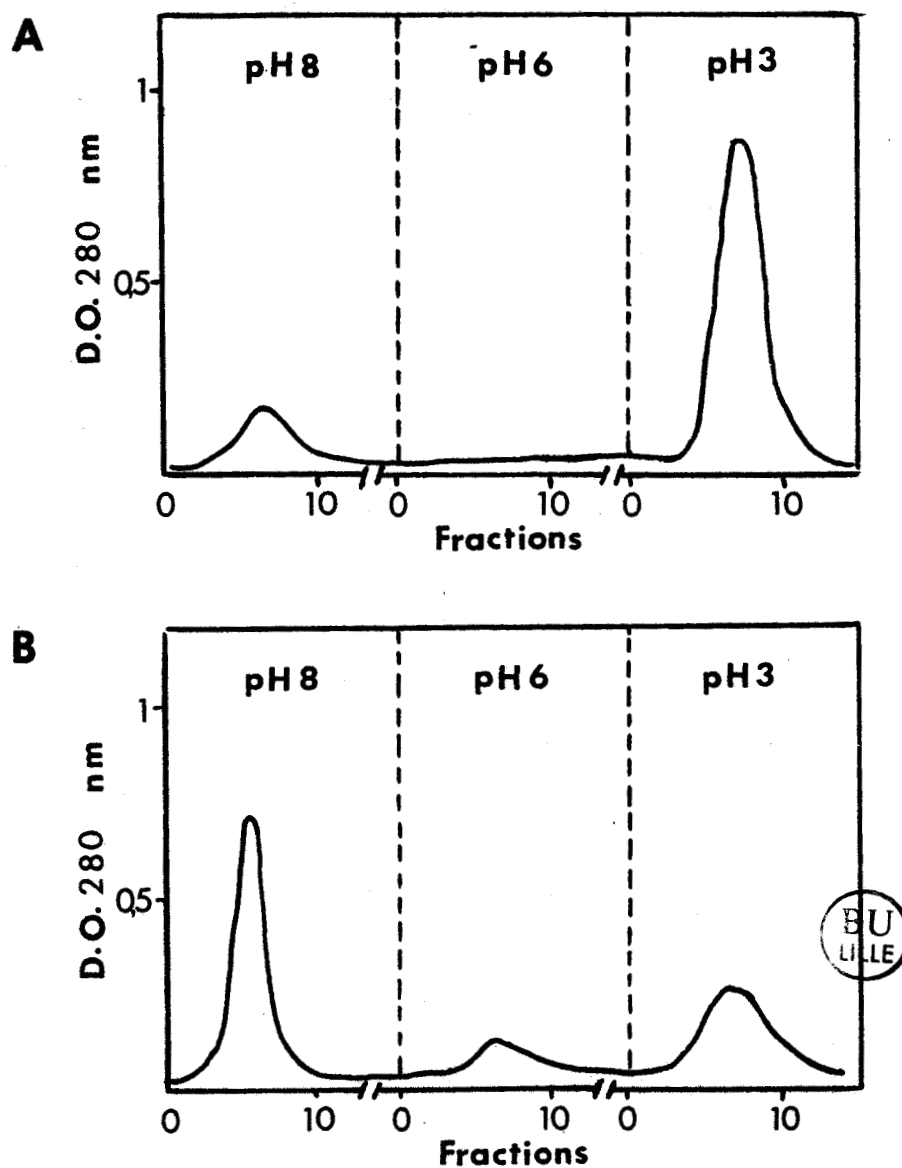
Une autre application pouvait être que des modifications conformationnelles des IgG liées à la dénaturation lors de leur préparation altèrent leur affinité pour la protéine A. Nous avons observé au chapitre III, que les protéines de sous-classe IgG1 et IgG2c étaient les plus sensibles à la dénaturation thermique et par le pH acide et que les modifications conformationnelles étaient localisées dans le Fc. Cela nous a incité à rechercher si ces modifications pouvaient perturber l'interaction avec la protéine A.

#### 1. AFFINITE POUR LA PROTEINE A d'IgG1 ET D'IgG2c CHAUFFEES A 56° C

Après chauffage à 56° C pendant 2 heures de l'IgG2c monoclonale IR 304, on observe une proportion beaucoup plus importante de protéine éluée à pH 8 que pour l'IgG2c non chauffée (figure 54). Des résultats similaires ont été notés pour l'IgG1 IR 766. Ceci suggère donc que la dénaturation résultant du chauffage à 56° C aboutit à la formation de molécules ayant perdu leur affinité pour la protéine A. Le chauffage à 56° C induisant la formation de polymères de l'IgG (voir Chapitre III), on peut penser que ce sont les polymères ou agrégats qui ont perdu leur affinité pour la protéine A.

#### 2. AFFINITE POUR LA PROTEINE A D'IgG RENATUREES APRES INCUBATION A pH ACIDE (pH 2,8)

L'IgG1 monoclonale IR 766 et l'IgG2c IR 304 ont été incubées à pH 2,8 (16 heures à 4° C) puis dialysées contre le tampon phosphate de sodium 0,14 M de pH 8. La chromatographie sur protéine A-Sépharose de l'IgG ainsi traitée montre que la totalité est éluée à pH 8 (figure 55). Nous avons pu vérifier que cette perte d'affinité pour la protéine A n'est pas liée à une protéolyse "spontanée" de la molécule. Ainsi l'acidification à pH 2,8 qui



**Figure 54.-** Chromatographie sur protéine A-Sépharose (colonne de 6 ml) de l'IgG2c monoclonale IR 304 (10 mg) native (A) ou chauffée à 56°C pendant 2 h (B). Elution par les tampons phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 8 ; citrate de Na 0,1 M, pH 6 et 3.

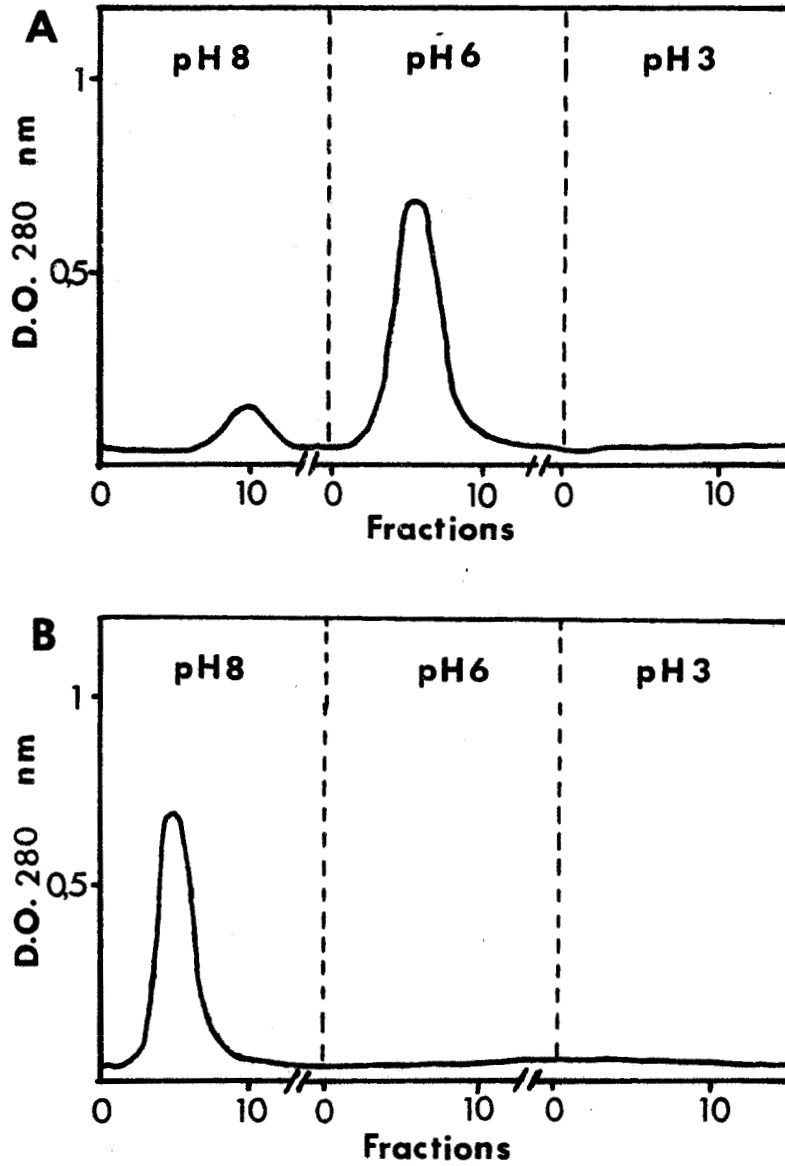


Figure 55.- Chromatographie sur protéine A-Sépharose (colonne de 6 ml) de l'IgG1 monoclonale IR 766 native (A) et d'IgG1 IR 766 préalablement acidifiée à pH 2,8, puis rééquilibrée contre le tampon phosphate de Na 0,14 M, pH 8 (B).



modifie les contacts entre domaines C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3 (STEWART et STANWORTH, 1975 ; STEWART et al., 1977), même après renaturation à pH neutre, fait disparaître complètement la possibilité d'interaction entre IgG1 (et IgG2c) et protéine A. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la zone de contact entre protéine A et IgG est située à l'interface entre les domaines C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3 (voir première partie, Chapitre III). Toute modification dans la conformation de cette zone pourrait donc altérer l'interaction entre IgG et protéine A.

## E - CONCLUSIONS

Nos résultats montrent que l'interaction entre IgG du Rat et protéine A de S.aureus est en partie liée à la nature de la sous-classe mais dépend aussi de plusieurs autres facteurs. Deux sous-classes IgG1 et IgG2c se lient à la protéine A. Ces résultats sont en accord avec ceux de MEDGYESI et al. (1978). L'affinité de l'IgG1 et de l'IgG2c de Rat ressemble à celle de l'IgG1 et de l'IgG3 de Souris respectivement (EY et al., 1978 ; SEPPALA et al., 1981). En effet, IgG1 de Rat et de Souris sont éluées d'une colonne de protéine A-Sépharose à pH 6 ; IgG2c et IgG3 sont éluées par un tampon de pH 4. Ces résultats suggèrent une analogie structurale entre ces sousclasses de la Souris et du Rat. Il faut noter qu'il existe d'autres arguments en faveur d'une analogie de ces sous-classes. Les IgG1 de Souris et de Rat sont toutes deux résistantes à l'hydrolyse par la papaïne (voir deuxième partie, Chapitre I, paragraphe D) et ont des vitesses de catabolisme similaires (FAHEY et SELL, 1965 ; PEPPARD et ORLANS, 1980) ; elles possèdent des motifs antigéniques communs (PEPPARD et ORLANS, 1980 ; BAZIN, communication personnelle) ; elles sont produites de façon préférentielle en réponse aux antigènes thymo-dépendants (SLACK et al., 1980 ; DER BALIAN et al., 1980). IgG2c et IgG3 sont toutes deux des euglobulines (GREY et al., 1971 ; BAZIN et al., 1974) ; elles présentent des communautés antigéniques (NAHM et al., 1980) et sont produites en réponse aux antigènes thymo-indépendants de type 2 (PERLMUTTER et al., 1978 ; SLACK et al., 1980 ; DER BALIAN et al., 1980).

Une autre sous-classe, l'IgG2b présente également une affinité faible pour la protéine A. En effet, elle est retardée d'une colonne de protéine A-Sépharose à pH 8 ou à pH 9. D'autres auteurs ont également rapporté l'existence d'une affinité de l'IgG2b pour la protéine A (MEDGYESI et al., 1980 ; NILSSON et al., 1982). Cependant, les résultats obtenus par ces auteurs indiquent qu'une partie de l'IgG2b est éluée soit à pH 7 et 6 (NILSSON et al., 1982), soit à pH 6 (MEDGYESI et al., 1980), d'une colonne de protéine A-Sépharose. Nous n'avons pu mettre en évidence une telle affinité. Ni une IgG2b monoclonale (IR 863), ni une fraction du sérum contenant de l'IgG2a et de l'IgG2b, ne sont capables de se fixer sur une colonne de protéine A-Sépharose à pH 8. De même, le fractionnement des IgG du sérum sur protéine A-Sépharose ne montre l'existence de l'IgG2b que dans la fraction éluée à pH 8. Comment expliquer cette discordance entre nos résultats et ceux d'autres auteurs ? Une première explication pouvait être que les IgG2b étudiées par MEDGYESI et al. (1980) et NILSSON et al. (1982) diffèrent par leur allotype des IgG2b analysées dans notre travail. En effet, SEPPALA et al. (1981) ont montré pour les IgG2a de Souris l'existence de différences d'affinité au sein de cette sous-classe, liées à la nature de l'allotype. Cependant les résultats de NILSSON et al. ont été également obtenus avec des IgG de Rat LOU/Wsl (NILSSON, communication personnelle), lignée du Rat que nous avons également étudiée. Les différences de résultats pourraient aussi s'expliquer par le protocole utilisé par NILSSON et al. (1982). En effet, ces auteurs ont utilisé une méthodologie assez complexe comportant une première chromatographie du sérum sur protéine A-Sépharose. Le matériel non retenu à pH 7,3 est chromatographié sur DEAE-Cellulose. La fraction éluée par le tampon phosphate 0,015 M de pH 8 (contenant IgG2a et IgG2b) est à nouveau fractionnée sur protéine A-Sépharose ; une partie de l'IgG2b est éluée à pH 7 et 6. Il est possible que ce protocole sélectionne une sous-population d'IgG2b ayant une affinité plus grande pour la protéine A. Enfin, il n'est pas exclu de penser que l'identification de l'IgG2b étant réalisée par ces auteurs à l'aide d'antisérums spécifiques de sous-classe, une réactivité faible de l'antisérum anti- $\gamma$ 2b pour la sous-classe IgG1 pourrait entraîner une erreur dans l'interprétation des résultats. Il faut signaler que, dans nos expériences, la nature de la sous-classe présente dans différentes fractions a été confirmée par l'analyse de ses caractéristiques immunochimiques, c'est-à-dire, par exemple, pour

IgG2b : le poids moléculaire de la chaîne lourde (55 000 daltons), la sensibilité à la protéolyse trypsique et à la protéolyse par la protéase V8 de S.aureus, propriétés qui la distinguent sans ambiguïté des autres sous-classes d'IgG (voir le chapitre I de cette deuxième partie).

Notre étude a également montré que la sous-classe IgG2c présente une plus grande affinité pour la protéine A que l'IgG1. Ceci rend possible la séparation de ces deux sous-classes à partir du sérum de Rat. Cependant, au sein de chacune de ces sous-classes, une hétérogénéité d'affinité a été démontrée. Dans le cas de l'IgG2c, des différences d'affinité selon l'immunoglobuline monoclonale ont été observées ; l'affinité pour la protéine A semble progresser dans l'ordre du caractère basique de l'IgG2c monoclonale ; en effet, l'IgG2c la plus basique, l'IR 304 se lie la plus fortement à la protéine A. Nous n'avons pas établi actuellement si les différences observées pour les IgG2c monoclonales sont dues à des différences d'affinité de la partie Fc ou à une certaine réactivité de la partie Fab.

Des variations dans les résultats ont également été notées selon la quantité de matériel déposée sur la colonne. Cette quantité influence notamment la présence d'un deuxième pic à pH 8. Des résultats similaires ont été rapportés pour les IgG de Souris (CHALON et al., 1979) et les IgG de Chèvre (DELACROIX et VAERMAN, 1979).

Enfin, le point le plus important et le plus critique réside dans la possibilité de variations des résultats pour une même IgG monoclonale (IgG1 ou IgG2c). L'existence d'une proportion variable d'IgG ne se liant pas à la protéine A dans une préparation d'IgG1 ou d'IgG2c tient probablement à l'existence ou non d'une dénaturation de la molécule. En effet, nous avons pu montrer que les traitements dénaturants comme le chauffage à 56° C ou l'acidification modifient significativement l'affinité pour la protéine A des IgG1 et IgG2c monoclonales. Ceci suggère que la fraction ne se liant pas à la protéine A dans une préparation d'IgG1 ou d'IgG2c correspond à des molécules dénaturées. S'agit-il de formes polymérisées de l'IgG dans lesquelles les sites de liaison sont masqués ? Ou de molécules dans lesquelles la conformation des domaines C $\gamma$  2 et C $\gamma$  3, et plus particulièrement les contacts entre C $\gamma$  2 et C $\gamma$  3, sont altérés ? Nous espérons pouvoir le définir dans un proche avenir.

En conclusion, l'interaction entre IgG du Rat et protéine A n'est pas entièrement dépendante de la sous-classe. Cependant nos études ont montré qu'il est possible de l'utiliser en association avec la chromatographie d'échange ionique sur DEAE-Cellulose pour purifier toutes les sous-classes d'IgG du sérum de Rat.

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---

Le but principal de notre travail était de définir les caractéristiques immunochimiques des sous-classes d'IgG du Rat et de mettre au point des techniques d'isolement simples de ces sous-classes ainsi que de certains de leurs fragments issus de la protéolyse enzymatique.

Nous avons pu mettre en évidence des différences immunochimiques entre sous-classes d'IgG qui rendent possible leur identification : plus particulièrement le poids moléculaire de leurs chaînes lourdes  $\gamma$ , et leur comportement vis-à-vis de l'action de divers enzymes protéolytiques. La sensibilité (ou la résistance) à la protéolyse enzymatique peut varier selon la sous-classe et selon l'enzyme utilisé ; les fragments obtenus peuvent également être différents. Ces propriétés permettent un typage chimique des sous-classes d'IgG du Rat, qui peut être très utile pour compléter l'identification réalisée à l'aide d'antisérums monospécifiques. Notre étude a également défini quelles sont les conditions optimales pour la préparation de différents fragments issus de la protéolyse enzymatique : Fab,  $F(ab')_2$ ,  $F(ab')$ , Fc, pFc' principalement. Ces conditions, qui peuvent varier significativement selon la sous-classe, sont très importantes à connaître si l'on veut préparer avec le meilleur rendement ces fragments, principalement Fab et  $F(ab')_2$ , à partir d'anticorps monoclonaux de Rat.

A l'occasion de cette étude, nous avons pu observer l'existence d'une fragmentation tout à fait inhabituelle des immunoglobulines IgG1 et IgG2a par la trypsine. Les fragments obtenus, identifiés, l'un au domaine variable  $V_H$ , l'autre à l'IgG dépourvue de ses domaines  $V_H$ , n'ont pas été décrits dans les études réalisées sur les IgG d'autres espèces animales (sauf exceptionnellement sur quelques IgG monoclonales humaines). Ce clivage tryptique permet donc la préparation aisée d'un fragment correspondant au domaine variable  $V_H$  à partir d'immunoglobulines monoclonales IgG1 ou IgG2a. L'une des perspectives de ce travail pourrait être l'étude structurale de domaines variables  $V_H$  provenant d'anticorps monoclonaux de spécificité connue (par exemple anti-DNP), afin de définir dans le modèle expérimental du rat les bases structurales de la spécificité anticorps ainsi que celle de l'expression des déterminants idiotypiques.

Nous avons décrit des différences selon la sous-classe dans la sensibilité aux agents dénaturants : chaleur et pH acide. Deux sous-classes, IgG1 et IgG2c, subissent des changements conformationnels qui ne sont pas détectés dans les deux autres sous-classes d'IgG. La dénaturation thermique semble être liée à la formation de polymères de l'IgG. Les modifications observées sont localisées dans la partie Fc de la molécule. La dénaturation des sous-classes IgG1 et IgG2c affecte l'expression d'une activité biologique, l'affinité pour la protéine A de S. aureus.

L'étude de l'interaction entre sous-classes d'IgG du Rat et protéine A de S. aureus a montré l'existence de différences d'affinité liées à la sous-classe : l'IgG2c a la plus forte affinité ; l'IgG1 une affinité plus faible. Une très faible réactivité de la sous-classe IgG2b a également été mise en évidence. Ces différences permettent l'isolement des sous-classes IgG1 et IgG2c (monoclonales ou du sérum de Rat) par simple chromatographie sur protéine A-Sépharose. Pour les deux autres sous-classes : IgG2a et IgG2b, la chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose représente une alternative (IgG2a) ou une étape supplémentaire (IgG2b). Notre étude a également montré l'existence d'une hétérogénéité d'affinité au sein des sous-classes IgG1 et IgG2c. Cette hétérogénéité correspond soit à des différences d'affinité entre IgG monoclonales d'une même sous-classe, soit même à l'existence de plusieurs fractions d'affinités différentes au sein d'une préparation d'IgG monoclonale. Cette dernière éventualité pourrait expliquer les variations dans les résultats obtenus par chromatographie sur protéine A-Sépharose. L'existence d'une dénaturation partielle de la molécule d'IgG semble l'explication la plus vraisemblable pour rendre compte de cette hétérogénéité d'affinité observée au sein d'une préparation d'IgG monoclonale.

Un certain nombre de point de notre travail pourrait être complété et représente donc les perspectives possibles "à court terme". Tout d'abord, le mécanisme de la résistance à la protéolyse enzymatique n'a pas été clairement élucidé. Dans le cas des enzymes n'agissant que sur un nombre très limité de résidus d'acides aminés (trypsine, protéase V8 de S. aureus), l'absence de clivage dans la région charnière de l'IgG peut s'expliquer par l'absence d'un résidu d'acide aminé susceptible d'être clivé par l'enzyme. Dans le cas

de la papaïne, l'accessibilité de la région charnière à la protéolyse semble être le facteur limitant l'action de l'enzyme. Nous avons évoqué la possibilité que la longueur de la région charnière détermine la plus ou moins grande sensibilité à la protéolyse par la papaïne. Il serait donc nécessaire, pour comprendre le mécanisme d'action des différents enzymes protéolytiques, de déterminer la structure primaire de la région charnière des différentes sous-classes d'IgG.

Un autre point qui pourrait être développé, serait d'étudier si la résistance à la protéolyse enzymatique liée à l'accessibilité de la région charnière, telle qu'elle a été décrite pour l'action de la papaïne, se retrouve pour d'autres enzymes, en particulier les protéases bactériennes. En effet, le clivage de l'IgG dans la région charnière représente une inactivation de la molécule, et dans ce sens, la résistance d'une sous-classe d'IgG à la protéolyse enzymatique permettrait de conserver des molécules "actives", par exemple lors d'une infection bactérienne. C'est ce qu'ont suggéré TORANO et PUTNAM (1978) pour les sous-classes d'IgA humaines, IgA1 et IGA2 : leur existence pourrait être liée au fait que l'une, IgA1, est résistante aux protéases du tube digestif, alors que l'autre, IgA2, est résistante aux protéases bactériennes.

Nous avons décrit dans notre travail l'isolement d'un certain nombre de fragments issus de la protéolyse enzymatique par des techniques "conventionnelles" : chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose, de filtration sur gel, éventuellement complétées par la chromatographie sur protéine A-Sépharose. Il est certain que dans beaucoup de cas, ces techniques pourraient être avantageusement remplacées par la méthode préconisée par BAZIN et al. (1984)<sub>a,c</sub> pour l'isolement des IgG de Rat, qui consiste à utiliser des immunoabsorbants fabriqués à partir d'anticorps monoclonaux de Souris anti-chaînes légères Kappa de Rat. Ces immunoabsorbants ont l'avantage d'une très grande capacité et permettent l'isolement à une seule étape de l'IgG monoclonale avec un rendement très élevé. Il pourrait être utilisé pour la purification des fragments Fab, F(ab')<sub>2</sub> et F(ab'), et il est très vraisemblable que le rendement serait nettement meilleur que celui des techniques "conventionnelles".



Nous avons pu montrer que certaines sous-classes sont plus particulièrement sensibles à la dénaturation thermique et qu'elles forment des polymères lors du chauffage à 56° C. Ceci entraîne une diminution de réactivité avec la protéine A de S. aureus. Il serait intéressant de rechercher si d'autres activités biologiques comme la liaison aux macrophages sont altérées par la formation de polymères liée au chauffage. Un autre point nous paraît également susceptible d'être absorbé à la lumière de ces résultats. Il s'agit de la relation entre l'aptitude à former des polymères et la vitesse de catabolisme. Il existe en effet chez l'Homme et dans diverses espèces animales des différences de vitesse de catabolisme entre sous-classes d'IgG. C'est ainsi que l'IgG3 humaine est catabolisée beaucoup plus rapidement que les autres sous-classes d'IgG. De même, l'IgG1 du Rat présente une vitesse de catabolisme deux à trois fois plus grande que l'IgG2a (PEPPARD et ORLANS, 1980). Les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer ces différences ne sont pas clairement établis. Le rôle joué par des différences structurales localisées dans la partie Fc n'est pas évident, puisque, par exemple chez l'Homme, les Fc des quatre sous-classes d'IgG sont catabolisés à la même vitesse. On pourrait suggérer l'hypothèse selon laquelle l'aptitude plus ou moins grande à former des agrégats en solution pourrait expliquer des différences dans la vitesse de catabolisme, les molécules agrégées étant plus rapidement catabolisées que l'immunoglobuline monomère. Il faut en ce sens noter que la tendance à former facilement des agrégats en solution est une propriété bien connue de l'IgG3 humaine.

Nous avons pu montrer qu'il existe des différences d'affinité pour la protéine A de S. aureus, liées à la sous-classe d'IgG, ainsi que l'existence d'une hétérogénéité d'affinité au sein de certaines sous-classes. Cette étude pourrait être complétée par l'analyse des éléments de structure qui expliquent les différences d'affinité. Dans le cas des IgG humaines, il a été montré que plusieurs résidus d'acides aminés des domaines C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3 sont impliqués dans la liaison à la protéine A, mais qu'un résidu d'histidine du domaine C $\gamma$ 3 est essentiel pour que l'affinité soit maintenue. Il serait donc intéressant de rechercher si l'existence d'un résidu d'histidine homologue de celui des IgG humaines, peut expliquer l'affinité des sous-classes IgG1 et IgG2c de Rat et l'absence d'affinité (ou la faible réactivité) des sous-classes

IgG2a et IgG2b. Enfin, l'origine des différences d'affinité pour la protéine A, observées pour des IgG monoclonales de sous-classe IgG2c, serait à rechercher, en analysant si ces différences correspondent à des différences d'affinité du Fc ou à l'existence d'une réactivité de la partie Fab de la molécule.

Quelles sont les perspectives possibles de ce travail à plus long terme ? Deux points nous paraissent les plus intéressants :

- Il existe depuis quelques années un regain considérable d'intérêt pour les sous-classes d'IgG lié à la découverte que leur synthèse est différemment sollicitée suivant la nature de l'antigène et la nécessité ou non d'une coopération avec les lymphocytes T (PERLMUTTER et al., 1978 ; SLACK et al., 1980 ; DER BALIAN et al., 1980). Les différences de synthèse des sous-classes sont liées à l'existence de sous-populations de lymphocytes B, correspondant vraisemblablement à des niveaux de maturation différents (voir les revues récentes de KLINMAN, WYLE et TEALF, 1981 ; COUTINHO et al., 1982 ; DE FRANCO, KUNG et PAUL, 1982 ; HUBER, 1982 ; Mc KEARN et al., 1982 ; MOND, 1982 ; ROSENBERG, 1982 ; SCHER, 1982 ; SINGER et al., 1982 ; KUNG et PAUL, 1983). Il a également été suggéré que le répertoire de gènes variables  $V_H$  pourrait être différent selon la sous-population de lymphocytes B, ce qui expliquerait pour certaines d'entre elles leur réponse limitée à certaines catégories d'antigènes (DER BALIAN et al., 1980). L'isolement des sous-classes d'IgG à partir du sérum de Rat, tel que nous l'avons défini dans notre travail, permettrait d'analyser les séquences des parties variables  $V_H$  de ces sous-classes chez un individu "normal" et de définir si par exemple un sous-groupe de variabilité est utilisé préférentiellement par une sous-classe d'IgG. Les niveaux de maturation différents des sous-populations de lymphocytes B se manifestent par la présence de motifs antigéniques distincts au niveau de la membrane. Est-ce que cela ne pourrait pas également se refléter au niveau de la structure de l'IgG, plus particulièrement dans la structure de sa copule glucidique ? La possibilité d'isolement des sous-classes d'IgG du sérum de Rat (ou du sérum de Souris) permet d'envisager une étude de leur composition (et éventuellement de leur structure) glucidique, et de déterminer s'il existe des différences liées à la nature de la sous-classe.

- L'aspect le plus intéressant à développer serait d'étudier une activité biologique exprimée par la sous-classe IgG2a, qui est son affinité pour les mastocytes. En effet, les relations entre structure et activité anaphylactique des anticorps IgG de différentes espèces animales ont été très peu abordées. La préparation par BAZIN et al. (1984 b) d'anticorps monoclonaux de sous-classe IgG2a à activité anti-DNP et l'existence d'une interaction de l'IgG2a avec le même récepteur que celui pour l'IgE rend particulièrement intéressante une étude des éléments de structure de l'IgG2a qui interagissent avec le récepteur mastocytaire. Plusieurs points pourraient être abordés de façon précise grâce aux anticorps monoclonaux : le rôle des ponts disulfure inter-chaînes dans le maintien de l'activité biologique ; la participation respective des domaines C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3 à la liaison au récepteur mastocytaire ; les résidus d'acides aminés ou les séquences peptidiques impliquées dans l'interaction avec le récepteur. Cette étude pourrait compléter un travail actuellement réalisé dans notre laboratoire, qui essaie d'identifier les séquences peptidiques de l'IgE de Rat impliquées dans la liaison au récepteur mastocytaire.

APPENDICE TECHNIQUE



PLAN DE L'APPENDICE TECHNIQUE

<b>A - <u>TRANSPLANTATION DES IMMUNOCYTOMES. RECUEIL DES SERUMS ET ASCITES</u></b>	
<b><u>CONSERVATION DES CELLULES TUMORALES</u></b>	
1. Transplantation par voie intra-péritonéale.....	249
2. Transplantation par voie sous-cutanée.....	249
3. Recueil des sérums et ascites.....	250
4. Conservation des cellules tumorales.....	250
<b>B - <u>PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES</u></b>	
1. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	251
2. Chromatographie sur DEAE-Cellulose ou DEAE-Trisacryl M...	251
3. Chromatographie sur CM-Cellulose ou CM-Trisacryl M.....	255
4. Chromatographie sur Ultrogel AcA 34.....	257
5. Chromatographie sur Protéine A-Sépharose.....	258
<b>C - <u>PREPARATION DES ANTISERUMS SPECIFIQUES</u></b>	
1. Protocoles de préparation.....	259
2. Immunisations.....	261
3. Préparation des immuno-absorbants.....	262
4. Immuno-absorptions.....	263
<b>D - <u>TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES</u></b>	
1. Immunodiffusion double.....	264
2. Immunoélectrophorèse.....	266
3. Immunodiffusion radiale.....	268
<b>E - <u>TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES</u></b>	
1. Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS.....	269
2. Electrophorèse en gradient d'acrylamide.....	273
<b>F - <u>DIGESTIONS ENZYMATIQUES</u></b>	
1. Digestion par la papaïne.....	274
2. Digestion par la pepsine.....	275
3. Digestion par la pepsine après acidification à pH 2,8....	276
4. Digestion par la trypsine.....	277
5. Digestion par la protéase V8 de <u>S. aureus</u> .....	278

A - TRANSPLANTATION DES IMMUNOCYTOMES. RECUEIL DES SERUMS ET ASCITES :  
CONSERVATION DES CELLULES TUMORALES

Les immunocytomes sécrétant des immunoglobulines monoclonales apparaissent de façon spontanée dans la souche de Rat LOU/C/Wsl et chez certains hybrides (BAZIN et al., 1972, 1973). Ces immunocytomes sont transplantables chez des rats LOU/M/Wsl, histocompatibles avec les rats LOU/C/Wsl ou chez des hybrides de première génération (LOU/Wistar par exemple). La tumeur peut être transplantée par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale. Cette dernière est la plus intéressante, car elle permet le recueil d'une ascite (environ 20 à 30 ml par Rat en moyenne), le plus souvent riche en immunoglobuline monoclonale. La voie sous-cutanée sert à maintenir une lignée tumorale ou éventuellement peut fournir les cellules nécessaires pour un passage ultérieur sous forme ascitique.

1. TRANSPLANTATION PAR VOIE INTRAPERITONEALE

Les Rats porteurs de tumeur ascitique sont anesthésiés à l'éther, décapités pour recueillir le sang et l'ascite est collectée après incision abdominale. 0,5 ml de l'ascite obtenue sont dilués à 5 ml par du milieu de culture MEM 199 puis les cellules tumorales sont numérées dans une cellule de Thoma. Après numération, l'ascite est éventuellement diluée pour obtenir 15 à 20 millions de cellules par ml. 0,5 ml d'ascite sont injectés par voie intra-péritonéale. La tumeur se développe en environ 15 jours à 3 semaines.

2. TRANSPLANTATION PAR VOIE SOUS-CUTANEE

Les Rats porteurs de tumeur sous-cutanée sont anesthésiés à l'éther, décapités pour recueillir le sang puis la tumeur sous-cutanée située au niveau du pli inguinal est excisée ; un fragment de tumeur est découpé, finement repris par 5 ml de milieu MEM 199, et les débris tissulaires éliminés par passage sur un filtre de nylon. La suspension de cellules tumorales

ainsi obtenue est réinjectée par voie sous-cutanée (0,5 ml par Rat) au niveau du creux inguinal. La tumeur se développe en 3 semaines à 1 mois environ.

### 3. RECUEIL DES SERUMS ET ASCITES

Le sang obtenu après décapitation est centrifugé (3000 t/minutes pendant 10 minutes). Le sérum est conservé à -20° C. L'ascite est centrifugée immédiatement après le recueil (3000 t/minutes pendant 10 minutes) puis conservée à -20° C.

### 4. CONSERVATION DES CELLULES TUMORALES

Les cellules tumorales peuvent être conservées indéfiniment dans l'azote liquide. Leur congélation doit être réalisée de façon très progressive, de préférence à l'aide d'un congélateur dont la température peut être abaissée par paliers de 1° C toutes les minutes jusque -40° C avant le transfert dans l'azote liquide (BAZIN et al., 1972). Si cela n'est pas possible, on peut également utiliser les étapes successives suivantes : refroidissement à 4° C pendant 30 minutes ; congélation à -20° C pendant 2 heures ; congélation à -40° C pendant quelques minutes, transfert dans l'azote liquide. La décongélation se fait par transfert du tube contenant les cellules congelées à température ambiante pendant 10 minutes puis dans un bain-marie à 37° C. Le développement d'une tumeur palpable à partir de cellules conservées dans l'azote liquide peut être long (jusqu'à 2 mois après l'injection).

### B - PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES IgG MONOCLONALES

Toutes les étapes de la préparation sont effectuées à +4° C pour minimiser les risques de dénaturation et de protéolyse des IgG.

## 1. PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

### 1.1. REACTIFS

- Sulfate d'ammonium saturé, pH 7
  - . sulfate d'ammonium 767 g
  - . eau distillée 1 litre

Chauffer pour dissoudre le sulfate d'ammonium puis laisser cristalliser à +4° C. Ajuster à pH 7 par addition d'ammoniaque.

- NaCl 9 %
- NaCl 20 %

### 1.2. PROTOCOLE

La précipitation des immunoglobulines est réalisée par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. Trois précipitations successives sont réalisées :

- première précipitation : à un volume de sérum ou d'ascite est ajouté un volume de NaCl 9 % , puis 1,33 volume de sulfate d'ammonium saturé, pH 7. La solution est laissée une nuit à +4° C puis centrifugée 45 minutes à 3000 t/minutes (à +4° C). Le précipité est redissous dans du NaCl 9 % (ou 20 % dans le cas des IgG2c monoclonales) de telle façon d'obtenir un volume identique au volume initial du sérum.
- deuxième et troisième précipitations : on ajoute 1,33 volume de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  saturé, pH 7, on laisse 1 heure à +4° C et on centrifuge à 3000 t/minutes. Après la troisième précipitation, le précipité est lavé deux fois par du sulfate d'ammonium à 40 % de saturation, pH 7, puis redissous dans du NaCl 9 % (ou 20 % dans le cas des IgG2c).

## 2. CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE OU DEAE-TRISACRYL M

La chromatographie sur DEAE-cellulose DE 32 utilisée initialement dans nos expériences est actuellement avantageusement remplacée par la chromatographie sur DEAE-Trisacryl M (IBF) échangeur de plus grande capacité et d'utilisation plus commode (pas de nécessité de régénération "intensive" de l'échangeur après chaque chromatographie).



## 2.1. CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DE 32

### 2.1.1. MATERIEL

- DEAE-cellulose DE 32 (Whatman)
- Trisacryl GFO5 (IBF)
- Tampons :
  - . Tris-HCl 0,5 M, PH 8 (solution stock conservée à 4° C pendant 15 jours maximum)
    - Tris                    60,5 g
    - H<sub>2</sub>O    environ 700    ml
    - Ajouter à pH 8 avec HCl N
    - Diluer 1 litre
    - Ajouter 1 ml d'acide de sodium 20 %
  - . Tris-HCl 0,05 M, 0,05 M ; NaCl 0,05 M ; 0,1 M ; 0,1 M, NaCl 0,1 M ; 0,1 M, NaCl 0,2 M ; 0,1 M NaCl 0,5 M, pH 8.
    - Tampons préparés par dilution de la solution stock et addition si nécessaire d'une solution de NaCl M pour obtenir les concentrations finales 0,1 M ; 0,2 M ou 0,5 M. Ces tampons sont réajustés à pH 8 par addition d'HCl N.
    - Addition d'azide de sodium 20 % (1 ml par litre de tampon)
- Colonne chromatographique : 3 x 50 cm ou 4 x 50 cm
- Adaptateur supérieur pour la colonne chromatographique.

### 2.1.2. PROTOCOLE

#### - Préparation de la colonne de DEAE-cellulose

La DEAE-cellulose est préparée (précyclage ou régénération ; élimination des fines) selon les indications du fabricant. L'équilibration est réalisée par le tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 8 sur verre fritté avec contrôle du pH de l'effluent. La suspension de DEAE-cellulose est ensuite soigneusement dégazée, puis transférée en une seule fois dans la colonne pourvue d'un adaptateur supérieur, et tassée à un débit de 50 ml/cm<sup>2</sup>/heure à l'aide d'une pompe connectée à la partie supérieure de l'ensemble colonne + adaptateur. Après tassage de la DEAE-cellulose, l'adaptateur supérieur est enlevé, la colonne de DEAE-cellulose ajustée

à une hauteur d'environ 30 cm, et un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8 est passé à travers la colonne (débit 50 ml/cm<sup>2</sup>/heure). Après passage de 6 fois le volume de la colonne, l'échangeur est considéré comme équilibré.

- Equilibration de l'échantillon à déposer

La solution obtenue par précipitation par le sulfate d'ammonium est équilibrée contre le tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8 par passage sur une colonne de Trisacryl GFO5 (IBF) équilibrée dans le même tampon. Le volume déposé est de l'ordre du quart du volume de la colonne. Après lecture de la densité optique à 280 nm de l'effluent, le pic de protéine est concentré à environ 30 ml (pour une chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose de 3 x 30 cm), par ultrafiltration sur membrane Amicon PM30.

- Chromatographie sur DEAE-cellulose

Le débit de la colonne de DEAE-cellulose est de 30 à 40 ml/heure pour une colonne de 3 x 30 cm ; 60 - 70 ml/heure pour une colonne de 4 x 30 cm. La quantité déposée est d'environ 200 à 250 mg de protéine pour une colonne de 3 x 30 cm, de 500 mg pour une colonne de 4 x 30 cm. Après dépôt de l'échantillon, le protocole d'élution varie selon les IgG monoclonales :

- . IgG2a monoclonales de mobilité lente (type IR 33, IR 530) :  
élution par le tampon Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8.
- . IgG2a monoclonales de mobilité rapide (type IR 418) et IgG2b monoclonales : élution par le tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8 pendant environ 6 heures, puis par le tampon Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8.
- . IgG1 monoclonales : élution par un gradient de molarité au NaCl produit par un varigrad à 9 chambres (150 ml/chambre) :

Chambres 1 et 2 : Tris-HCl 0,05 M, pH 8

Chambre 3 : Tris-HCl 0,1 M, pH 8

Chambre 4 à 7 : Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 8

Chambres 8 et 9 : Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8

. Après chaque chromatographie, l'échangeur est vidé de la colonne et régénéré selon les indications données par le fabricant.

## 2.2. CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-TRISACRYL M

### 2.2.1. MATERIEL

- DEAE-Trisacryl M (IBF)
- Trisacryl GF05
- Tampons : identiques à ceux utilisés pour la chromatographie sur DEAE-cellulose, plus le tampon Tris-HCl 0,05 M, NaCl M, pH 8.
- Colonne chromatographique.

### 2.2.2. PROTOCOLE

La suspension de DEAE-Trisacryl M est préparée selon les conditions indiquées par le fabricant. La colonne chromatographique est remplie à la pression atmosphérique. L'équilibration de l'échangeur est obtenue par passage sur la colonne d'1,5 volume de tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 8 puis de 3 volumes de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8, à un débit de 60 ml/heure pour une colonne de 3 x 30 cm. L'équilibration de l'échantillon et le protocole d'élution est le même que pour la chromatographie sur DEAE-cellulose. La quantité d'échantillon déposée est d'environ 1 à 1,5 gr de protéine pour une colonne de 3 x 30 cm, d'environ 2 à 3 gr pour une colonne de 4 x 30 cm.

Après chromatographie, la colonne est régénérée par passage de 1 à 1,5 volume de Tris-HCl 0,05 M, NaCl M, pH 8. Environ toutes les 15 chromatographies, la colonne est vidée et régénérée par passages successifs dans :

- NaOH 0,2 M : 2 volumes/volume d'échangeur (30 minutes) ; rinçage à l'eau distillée jusque pH 7.
- HCl 0,5 N : 0,5 volume (30 minutes) ; rinçage à l'eau distillée jusque pH 7.
- Acétate de Na 0,2 M, NaCl M, pH 4 : 1 volume (30 minutes) ; rinçage à l'eau distillée jusque pH 7.
- Urée 8 M desionisée : 1 volume ; rinçage à l'eau distillée.

L'échangeur est ensuite équilibré comme un échangeur "neuf".

### 3. CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE OU CM TRISACRYL-M

Cette chromatographie est utilisée pour la préparation des IgG2c monoclonales. La CM-cellulose (CM 32) est avantageusement remplacée actuellement par l'échangeur CM-Trisacryl-M qui permet la chromatographie de quantités plus importantes de protéine et dont l'utilisation est plus commode.

#### 3.1. CHROMATOGRAPHIE SUR CM-CELLULOSE

##### 3.1.1. MATERIEL

- CM-cellulose CM 32

- Trisacryl GF 05

- Tampons :

. Acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2

Acide acétique 12 ml

H<sub>2</sub>O distillée environ 700 ml

Ajuster à pH 4,2 par addition de NaOH M

Diluer à 1 litre

. Acétate de sodium 0,2 M, NaCl 0,1 M ou NaCl 0,2 M, pH 4,2

Acide acétique 12 ml

NaCl (molarité finale 0,1 M) 5,8 gr

NaCl (molarité finale 0,2 M) 11,6 gr

H<sub>2</sub>O distillée environ 700 ml

Ajuster avec NaOH M à pH 4,2

Diluer à 1 litre

. Acétate de sodium 0,5 M, pH 4,2

Acide acétique 30 ml

H<sub>2</sub>O distillée environ 500 ml

Ajuster à pH 4,2 avec NaOH M

Diluer à 1 litre

- Colonne chromatographique de 3 x 50 cm ou 4 x 50 cm avec un adaptateur supérieur.

### 3.1.2. PROTOCOLE

#### - Préparation de la colonne chromatographique

L'échangeur est précyclé (ou régénéré), les "fines" sont éliminées comme indiqué par le fabricant. L'équilibration (sur verre fritté) se fait par passage d'un tampon acétate de sodium 0,5 M, pH 4,2 et contrôle du pH de l'effluent. L'échangeur est dégazé, et transféré en une seule fois dans la colonne chromatographique pourvue de son adaptateur. La CM-cellulose est tassée à un débit de 50 ml/cm<sup>2</sup>/heure. Une fois tassée, l'adaptateur supérieur est enlevé, et la colonne est équilibrée (le même débit) par passage de 6 volumes de tampon acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2.

#### - Equilibration de l'échantillon

Le précipité par le sulfate d'ammonium est d'abord dialysé contre un tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,35 M, pH 8 (5 litres) puis chromatographié sur une colonne de Trisacryl GF 05 équilibrée en acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2 (ou dialysé contre ce tampon). L'étape de dialyse contre le tampon de pH 8 est nécessaire, car l'équilibration directe contre le tampon acétate de sodium, pH 4,2, aboutit à la formation d'une quantité très importante de matériel insoluble.

#### - Chromatographie sur CM-cellulose

La colonne est soumise à un débit d'élution de 30 ml/heure pour une colonne de 3 x 30 cm, de 50 ml/heure pour une colonne de 4 x 30 cm. Après dépôt de l'échantillon (environ 200-250 mg de protéine pour une colonne de 3 x 30 cm), l'élution est réalisée successivement par :

- . Acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2 pendant environ 16 h
- . Acétate de sodium 0,2 M, NaCl 0,1 M, pH 4,2 (environ 8 h)
- . Acétate de sodium 0,2 M, NaCl 0,2 M, pH 4,2 (environ 16 h)

Les IgG2c monoclonales sont éluées soit par le deuxième, soit par le troisième tampon.

Après chaque chromatographie, la colonne est vidée et l'échangeur régénéré selon les instructions du fabricant.

### 3.2. CHROMATOGRAPHIE SUR CM-TRISACRYL-M

#### 3.2.1. MATERIEL

- CM-Trisacryl M (IBF)
- Trisacryl GF05 (IBF)
- Tampons : identiques à ceux utilisés pour la chromatographie sur CM-cellulose avec en plus le tampon acétate de sodium 0,2 M, NaCl M, pH 4,2.

#### 3.2.2. PROTOCOLE

L'échangeur est préparé selon les instructions du fabricant. La colonne est équilibrée par passage d'un tampon acétate de sodium 0,5 M, pH 4,2 (1,5 volume) puis d'un tampon acétate de sodium 0,2 M, pH 4,2 (3 volumes).

L'équilibration de l'échantillon est identique à celle indiquée ci-dessus. La quantité déposée est de 1 à 1,5 gr de protéine pour une colonne de 3 x 30 cm, et de 2 à 3 gr pour une colonne de 4 x 30 cm. Les conditions d'élution sont identiques à celle utilisée pour la CM-cellulose.

Après chaque chromatographie, l'échangeur est régénéré par passage d'acétate de sodium 0,2 M, NaCl M, pH 4,2 (1,5 volume). Toutes les 15 chromatographies environ, une régénération plus "intensive" est appliquée. L'échangeur est vidé de la colonne, et les traitements successifs identiques à ceux utilisés par la régénération de l'échangeur DEAE-Trisacryl M sont appliqués.

### 4. CHROMATOGRAPHIE SUR ULTROGEL Aca 34

#### 4.1. MATERIEL

- Ultrogel Aca 34 (IBF)
- Tampon phosphate 0,01 M ; NaCl 0,15 M, pH 7 (PBS, pH 7,4)
  - . phosphate de sodium ( $\text{Na}_2 \text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) 1,78 gr
  - . NaCl 8,70 gr
  - .  $\text{H}_2\text{O}$  environ 700 ml

- . Ajuster à pH 7,4 avec  $H_3PO_4$  M
  - . Diluer à 1 litre, ajouter 1 ml d'azide de sodium à 20 %
- Colonne chromatographique de 2,5 x 90 cm ou 2,5 x 190 cm pourvue d'un adaptateur supérieur et inférieur (Pharmacia AC-25).

#### 4.2. PROTOCOLE

Le gel d'Ultrogel Aca 34 est préparé, dégazé et la colonne chromatographique tassée selon les conditions indiquées par le fabricant. Une fois tassée, la colonne est mise en écoulement ascendant et le débit réglé à 15 - 20 ml/heure. L'échantillon est équilibré par dialyse contre le tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 ou par passage sur une colonne de Trisacryl GF 05 placée entre le réservoir de tampon et la pompe. Environ 70 - 80 mg dans 5 à 10 ml de tampon sont déposés sur une colonne de 2,5 x 90 cm (et le double pour une colonne de 2,5 x 190 cm).

#### 5. CHROMATOGRAPHIE SUR PROTEINE A-SEPHAROSE

Cette chromatographie permet la purification finale des IgG1 et IgG2c monoclonales. Les IgG1 monoclonales sont éluées à pH 6 (une proportion variable peut être également éluée à pH 8). Les IgG2c monoclonales sont éluées à pH 3 et/ou à pH 6.

##### 5.1. MATERIEL

- Protéine A-Sépharose (Pharmacia) : flacon de 1,5 gr

- Tampons :

- . Phosphate de Na 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 8 (PBS, pH 8)

Phosphate de sodium ( $Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) : 1,78 gr

NaCl 8,70 gr

$H_2O$  environ 500 ml

Azide de sodium 20 % : 1 ml

Ajuster à pH 8 avec  $H_3 PO_4$  M

Diluer à 1 litre

- . Citrate de Na 0,1 M, pH 6 et 3

Acide citrique : 21 gr

$H_2O$  environ 500 ml

Azide de sodium 20 % 1 ml





qui permet d'éliminer les anticorps dirigés contre les déterminants communs aux classes ou sous-classes). Dans certains cas, la spécificité peut être obtenue par passage sur un immuno-absorbant contenant l'antigène ayant servi pour l'immunisation (cas des antisérums anti-Fab). Le contrôle de la spécificité de l'antisérum est réalisé par immunoélectrophorèse et par immunodiffusion double en utilisant des immunoglobulines monoclonales purifiées appartenant aux différentes classes et sous-classes, et des fragments Fab et Fc purifiés.

### 1.2. EXEMPLES

Les protocoles varient selon la nature de l'antisérum à obtenir. Pour un même type d'antisérum, les résultats peuvent être très variables et nécessiter ou non des étapes complémentaires. Quelques exemples de préparation sont indiqués ici :

- Antisérum anti-IgM (spécifique de la chaîne lourde  $\mu$ )

Cet antisérum a été préparé par immuno absorption d'un sérum de Lapin obtenu après immunisation par une IgM monoclonale (IR 968) sur une colonne d'IgG monoclonale (IgG2a IR 530) ou sur une colonne contenant les protéines du sérum précipitées par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation (contenant essentiellement de l'IgG et peu d'IgM). Cette immuno-absorption élimine l'activité anti-chaînes légères. L'effluent obtenu ne réagit qu'avec l'IgM et ne donne pas d'arc de précipitation avec les IgA et les différentes sous-classes d'IgG.

- Antisérum anti-IgG (spécifique de la chaîne lourde  $\gamma$ ) ou anti Fc  $\gamma$

Cet antisérum est préparé à partir d'un sérum obtenu par immunisation avec une IgG monoclonale (ou de l'IgG de sérum de Rat) ou avec un fragment Fc d'IgG. Quel que soit l'antigène utilisé pour l'immunisation, l'immuno absorption doit aboutir à la production d'un antisérum qui ne réagit qu'avec la partie Fc des 4 sous-classes d'IgG. Nous avons utilisé comme antigène l'IgG2a monoclonale IR 33, l'IgG2a du sérum de Rat et son fragment Fc. L'immuno-absorption a été réalisée soit sur une colonne contenant de l'IgM monoclonale, soit sur une colonne contenant du Fab d'IgG, pour éliminer l'activité anti-chaînes légères. L'effluent de ces colonnes contient des anticorps qui

ne réagissent pas avec les IgM et IgA, et réagissent avec toutes les sous-classes d'IgG. Cette réactivité est dirigée contre la partie Fc et non contre la partie Fab (contrôle réalisé en immunoélectrophorèse avec des fragments Fab et Fc purifiés).

- Antisérum anti-Fab

Cet antisérum est préparé par immunisation avec un fragment Fab d'IgG2a de sérum de Rat. L'immuno-absorption sur colonne de Fab d'IgG permet d'éliminer dans l'effluent les éventuels anticorps anti-Fc et de retenir les anticorps anti-Fab qui sont ensuite élués de la colonne.

- Antisérums spécifiques de sous-classe d'IgG

Ces antisérums sont obtenus après immunisation avec des IgG monoclonales appartenant à l'une des 4 sous-classes d'IgG, ou avec des sous-classes d'IgG isolées du sérum de Rat. Leur préparation comporte deux étapes principales :

1° Immuno-absorption sur colonne d'IgM ou de Fab d'IgG pour éliminer l'activité anti-chaînes légères.

2° Immuno-absorption sur des colonnes contenant des IgG monoclonales appartenant aux autres sous-classes d'IgG. Par exemple, un antisérum spécifique de la sous-classe IgG1 est obtenu par immuno-absorption sur colonne d'IgG2a puis éventuellement sur colonne d'IgG2b et/ou d'IgG2c. Cette étape est la plus difficile car il existe dans un antisérum beaucoup plus d'anticorps dirigés contre des déterminants communs aux sous-classes que d'anticorps spécifiques d'une seule sous-classe d'IgG.

## 2. IMMUNISATIONS

L'immunisation des Lapins est réalisée par injection intramusculaire au niveau sous-claviculaire de 0,5 mg d'antigène dans 0,5 ml de tampon PBS pH 7,4 mélangé à 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (DIFCO). Trois injections séparées de 8 jours sont réalisées, puis une injection de rappel au bout d'un mois après la troisième injection. Le sang est prélevé au niveau de la veine de l'oreille tous les 15 jours après la troisième injection.

3. PREPARATION DES IMMUNO-ABSORBANTS (modifiée d'après PORATH et al., 1973)

3.1. MATERIEL

- Sépharose 4B (4 % Agarose) (Pharmacia)
- Bromure de cyanogène : dissoudre la totalité d'un flacon de 100 gr dans 103 ml d'acétonitrile. Conserver à  $-20^{\circ}$  C.
- Tampon phosphate 5 M, pH 11,9
  - .  $K_3 PO_4$  70,7 gr
  - .  $K_2 HPO_4$  29,1 gr
  - .  $H_2O$  distillée qsp 100 ml
- Tampon bicarbonate de sodium 0,25 M, pH 9
  - .  $Na HCO_3$  20,9 gr
  - . dissoudre dans 500 ml d'eau distillée
  - . Ajuster à pH 9 avec Na OH N
  - . Diluer à 1 litre avec  $H_2O$
- Tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl M, pH 4
  - .  $CH_3 COO Na$  1 gr
  - . NaCl 58,4 gr
  - . Dissoudre dans  $H_2O$  (environ 500 ml)
  - . Ajuster à pH 4 avec HCl N
  - . Diluer à 1 litre avec  $H_2O$
- Tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,5 M, pH 7
  - .  $Na_2 H PO_4 \cdot 2H_2O$  1,78 gr
  - . NaCl 29,2 gr
  - . Azide de sodium 20 % 1 ml
  - . Dissoudre dans  $H_2O$  environ 500 ml
  - . Ajuster à pH 7 avec  $H_3 PO_4$
  - . Diluer à 1 litre avec  $H_2O$
- Tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3
  - .  $NaHCO_3$  8,4 gr
  - . NaCl 29,2 gr
  - . Dissoudre dans environ 500 ml d'eau distillée
  - . Ajuster à pH 8,3 si nécessaire
  - . Diluer à 1 litre

- Ethanolamine M

- . Ethanolamine 61 ml
- . Ajuster à pH 8 avec HCl N
- . H<sub>2</sub>O distillée qsp 1000 ml

3.2. PROTOCOLE (pour 50 mg d'antigène protéique)

- Laver le Sépharose 4B à l'eau distillée sur verre fritté et l'essorer
- Peser 10 gr de Sépharose 4B et les mettre en suspension dans 10 ml de tampon phosphate 5 M, pH 11,9 ; diluer à 20 ml avec de l'eau distillée refroidie à 4° C ; placer dans un bécher de 50 ml
- Ajouter 0,412 ml de solution de bromure de cyanogène (sous la hotte) par petites portions pendant 2 minutes. Agiter doucement
- Au bout de 10 minutes précises, laver très rapidement (moins de 2 minutes) sur verre fritté par 250 ml d'eau distillée refroidie à 4° C puis par 200 ml de bicarbonate de sodium 0,25 M pH 9
- Transférer le gel dans un tube contenant 50 mg d'antigène protéique dans 5 ml de tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3
- Laisser sous agitation lente (agitateur rotatif) pendant 1 heure à température ambiante, puis une nuit à 4° C
- Essorer le gel et le suspendre dans 150 ml de solution d'éthanolamine M pendant 2 heures
- Le gel est ensuite lavé par les deux tampons suivants :
  - . Acétate de sodium 0,1 M, NaCl M, pH 4 (150 ml)
  - . Phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,5 M, pH 7 (150 ml)Le lavage est répété 3 fois
- Le gel est ensuite transféré dans une colonne chromatographique.

4. IMMUNO-ABSORPTION

- Les sérums obtenus par immunisation sont précipités par un sulfate d'ammonium à 40 % de saturation ; le précipité obtenu est équilibré par dialyse contre du NaCl 0,5 M, puis concentré par ultrafiltration sur membrane AMICON PM 30 jusqu'à la moitié du volume initial de sérum.

- Les immuno-absorptions sont réalisées sur colonnes à température ambiante. L'immunsérum est mis en contact une heure avec le gel (la solution doit remplir les 3/4 de la colonne). L'effluent est ensuite collecté (contrôle de la DO à 280 nm), concentré au 1/20 environ du volume de sérum de départ, puis contrôlé par immunodiffusion double et par immunoélectrophorèse.
- Les anticorps retenus sur la colonne sont élués par le tampon glycocolle-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8 (70 ml par 10 ml de gel). L'éluat est collecté dans un bécher contenant 10 ml de tampon phosphate de sodium M, pH 7,8. Il est ensuite dialysé contre du tampon PBS, pH 7,4 et concentré au 1/20 du volume initial de sérum.
- La colonne d'immuno-absorbant est régénérée par passage d'un tampon glycocolle-HCl 0,2 M, pH 2,2 (environ 40 ml pour 10 ml de gel) puis rééquilibrée en NaCl 0,5 M. Elle est conservée à +4° C en NaCl 0,5 M contenant 0,2 % d'azide de sodium.

#### D - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

##### 1. IMMUNODIFFUSION DOUBLE (méthode d'Ouchterlony) (OUCHTERLONY et NILSSON, 1978)

###### 1.1. MATERIEL

- Plaques de verre de 10 x 10 cm dégraissées à l'alcool
- Chambre humide
- Indubiose A 37 (IBF)
- Pastagarose (Institut Pasteur)
- Tampon véronal pH 8,2
  - . Véronal sodé 16 gr
  - . H<sub>2</sub>O distillée 0,9 ml
  - . Azide de sodium 20 % 1 ml
  - . Ajuster à pH 8,2 avec HCl N
  - . Compléter à 1 litre avec H<sub>2</sub>O distillée
- Citrate trisodique 5 %
- NaCl 9 %

- Solution colorante

- . Bleu de Coomassie R 250                    5 gr
- . Acide acétique                                100 ml
- . Ethanol 96 %                                 450 ml
- . Dissoudre le colorant sous agitation. Laisser une nuit. Filtrer.  
Ajouter 450 ml d'eau distillée.

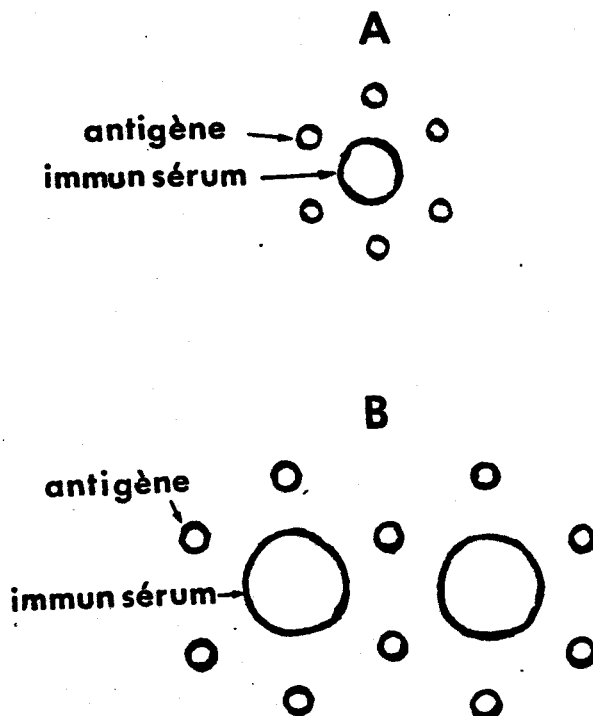
- Décolorant

- . Ethanol                                         900 ml
- . Acide acétique                                100 ml

1.2. PROTOCOLE

- Préparation de la plaque de gélose

Mélanger 125 mg d'Indubiose A 37, 125 mg de Pastagarose et 25 ml de tampon véronal pH 8,2. Mettre au bain-marie bouillant jusqu'à transparence parfaite de la solution, laisser refroidir jusque 70° C. Couler sur une plaque de verre, parfaitement sèche et horizontale, 21 ml de gélose. Laisser 15 minutes à température ambiante à l'air libre, puis placer dans une chambre humide. A l'aide du matériel pour perforation de la gélose, réaliser les trous pour les antisérums et les solutions protéiques. Les schémas ci-dessous sont le plus souvent utilisés.



- Dépôt des échantillons et diffusion

On dépose dans le puit central 0,1 ml (A) ou 0,25 ml (B) d'antisérum et dans les puits périphériques 0,01 ml (A) ou 0,02 ml (B) de solution protéique (10 à 25 mg/ml). La diffusion se déroule à température ambiante pendant 18 à 24 heures.

- Lavages

Après diffusion, la plaque peut être examinée et les arcs de précipitation photographiés. Puis la plaque est lavée par les bains successifs suivants :

- . Citrate trisodique 5 %            3 heures
- . NaCl 9 %                            3 bains d'une heure
- . H<sub>2</sub>O distillée                        4 à 5 bains d'une heure

Les plaques sont ensuite placées sur la pailasse et laissées sécher à l'air.

- Coloration - décoloration

Placer une minute dans la solution colorante, puis laver par plusieurs bains successifs jusqu'à décoloration du fond. Laisser sécher à l'air.

## 2. IMMUNOELECTROPHORESE

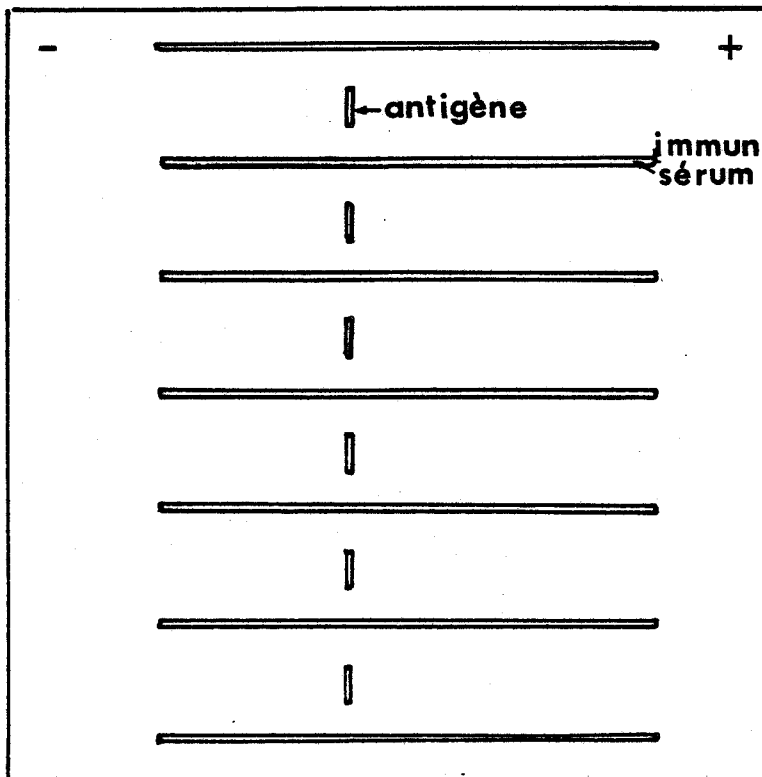
### 2.1. MATERIEL

Identique à celui utilisé pour l'immunodiffusion double, plus une cuve à électrophorèse et de matériel de perforation pour la réalisation des puits et fentes longitudinales.

### 2.2. PROTOCOLE

- Préparation de la plaque de gélose

Protocole identique à celui utilisé pour l'immunodiffusion double. A l'aide du matériel pour perforation de la gélose on réalise les trous pour les dépôts des échantillons et on trace les fentes longitudinales pour les immunosérums (sans les creuser) selon le schéma ci-dessous.



- Electrophorèse

La plaque est placée dans la cuve à électrophorèse. On met de chaque côté un pont de papier constitué par une épaisseur de papier Whatman 1 ou 2 épaisseurs de papier filtre. On dépose dans chaque puit 0,01 ml de solution protéique (10 à 25 mg/ml) et dans un des puits une goutte de bleu de Bromophénol à 0,05 %. Une tension de 20 volts est appliquée aux extrémités de la plaque (contrôle au voltmètre), pendant 2 heures 30 à 3 heures (contrôle de la migration par la position du bleu de Bromophénol).

- Diffusion

On creuse les fentes longitudinales et on y dépose l'immunsérum (0,15 ml par fente). On laisse diffuser en chambre humide à température ambiante pendant 18 à 24 heures.

- Lavages, coloration, décoloration

Protocole identique à celui utilisé pour l'immunodiffusion double.



3. IMMUNODIFFUSION RADIALE (d'après MANCINI, CARBONARA et HEREMANS, 1965)

3.1. MATERIEL

- Agarose Indubiose A 37 (IBF)
- Support plastique circulaire PARTIGEN (Behring)
- Antisérum
- Solution étalon d'immunoglobuline à 1 mg/ml dans le tampon PBS, pH 7,4
- Tampon PBS pH 7,4 : phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4

3.2. PROTOCOLE

- Dissoudre 1'Agarose Indubiose A 37 dans le tampon PBS, pH 7,4 pour obtenir une concentration finale de 1 % ; chauffer au bain-marie bouillant
- Placer la solution d'Agarose au bain-marie à 50° C
- Diluer l'antisérum dans du tampon PBS, pH 7,4 (dilution déterminée par des essais préalables)
- Placer l'antisérum pendant 5 minutes à 50° C puis l'incorporer à la solution d'agarose (0,5 ml pour 7 ml de solution)
- Couler 7,5 ml de solution d'agarose contenant l'antisérum pour une plaque Behring et laisser gélifier (environ 1 heure). L'épaisseur de la gélose ainsi obtenue est de 2 mm.
- Faire des trous de 3 mm de diamètre à l'emporte-pièce et déposer dans les puits 10 µl de solution à doser ou de gamme étalon (la gamme étalon est préparée par dilution de la solution étalon pour obtenir les concentrations finales de 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 et 1 mg par ml)
- Laisser diffuser à température ambiante et mesurer les anneaux de précipitation à différents intervalles de temps (24, 48 et 72 heures) (le temps optimal correspond à l'obtention d'une droite pour la gamme étalon)
- Tracer sur un graphique les valeurs des carrés des diamètres en fonction de la concentration protéique de la gamme étalon et en déduire les concentrations protéiques des échantillons à doser.

E - TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

1. ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE-SDS (LAEMMLI, 1970 ; KERCKAERT, 1978)

1.1. MATERIEL

- Système pour l'électrophorèse

- . plaques de verre 10 x 15 cm
- . cales de plastique de 0,5 x 10 cm et de 0,75 cm d'épaisseur
- . plastique souple
- . soud-sac Calor
- . peigne en plastique

- Solutions pour la réalisation du gel

- . tampons (conservation 8 jours à +4° C) :

. 1 A	. Tris	36,3	gr
	. HCl N	48	ml
	. N N' Tétraméthylène diamine (TEMED)	0,46	ml
	. H <sub>2</sub> O qsp	100	ml
. 1 B	. Tris	5,7	gr
	. H <sub>2</sub> O SO <sub>4</sub> N	25,6	ml
	. H <sub>2</sub> O qsp	100	ml

- . solution stock d'acrylamide (conservation 8 jours à +4° C)

. acrylamide	48	gr
. bisacrylamide	1,28	gr
. H <sub>2</sub> O qsp	100	ml

- . SDS 10 % (conservation à +4° C, chauffer légèrement pour dissoudre)

. SDS recristallisé dans		
1'éthanol	10	gr
. H <sub>2</sub> O qsp	100	ml

- . Persulfate d'ammonium 10 % (préparation extemporanée)

. persulfate d'ammonium	100	mg
. H <sub>2</sub> O	1	ml

- Tampon d'électrophorèse

. glycocolle	14,4	gr
. Tris	3	gr
. SDS	1	gr

- Solution colorante pour les échantillons

- . Tampons 1 B dilué au 1/10            1 ml
- . Glycérol                                    5 ml
- . Bleu de Bromophénol                    3 mg

- Mercaptoéthanol

- Iodoacétamide 0,75 M

- . Iodoacétamide                            14 mg
- . H<sub>2</sub>O distillée                            0,1 ml

- Solution de marqueurs de poids moléculaire

- . Dissoudre dans 0,4 ml de tampon d'électrophorèse : 1 mg de cytochrome C (SIGMA) ; 1 mg d'inhibiteur trypsique du soja (SIGMA) ; 1 mg d'ovalbumine (SIGMA) ; 5 mg de phosphorylase B (BOEHRINGER) ; 1 mg d'IgG2a de Rat ; 1 mg d'IgE de Rat. Ajouter 0,1 ml de solution de glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase (BOEHRINGER).

- Fixateur

- . Acide trichloracétique 50 %            114 ml
- . Acide sulfosalicylique                    17 gr
- . Méthanol                                    150 ml
- . H<sub>2</sub>O distillée                            350 ml

- Colorant

- . Bleu de Coomassie R 250                0,5 gr
- . Acide trichloracétique 50 %            25 ml
- . Méthanol                                    125 ml
- . H<sub>2</sub>O distillée                            250 ml

- Décolorant

- . Méthanol                                    500 ml
- . Acide acétique                            160 ml
- . H<sub>2</sub>O distillée                            1340 ml

1.2. PROTOCOLE

1° Préparation du moule pour le gel d'acrylamide

Le moule pour le coulage du gel d'acrylamide est constitué par 2 plaques de verre de 10 x 15 cm séparées par 2 cales de 0,75 mm d'épaisseur et maintenues par un ruban adhésif TEBU. L'ensemble est enfermé dans un sac plastique transparent lui-même maintenu par 2 cales de verre de 10 x 15 cm et 2 réglottes rigides.

## 2° Préparation des gels d'acrylamide

### - Gel de séparation

Le gel de séparation est soit un gel à concentration fixe d'acrylamide (de 5 à 15 %), soit un gradient linéaire de concentration en acrylamide de 5 à 25 %.

#### - Gel à concentration fixe (exemple 7,5 %)

- . Mélanger 3 ml de solution 2A<sub>2</sub>
  - 5 ml de tampon 1A
  - 12 ml d'eau distillée
  - 0,2 ml de SDS 10 %
  - 0,01 ml de persulfate d'ammonium 10 %
- . Remplir le moule jusqu'à une hauteur d'environ 7 à 8 cm, et recouvrir d'isobutanol.

#### - Gradient d'acrylamide (5 à 25 %)

Il est produit par un système à 2 chambres cylindriques contenant :

- . l'une, connectée au moule pour le gel d'acrylamide, la solution "lourde" (5,2 ml) préparée par mélange de :

. solution 2A <sub>2</sub>	5	ml
. tampon 1A	2,5	ml
. glycérol	2,5	ml
. SDS 10 %	0,1	ml
. TEMED	0,003	ml
. persulfate d'ammonium 10 %	0,03	ml
- . l'autre, la solution légère (9,5 ml)

. solution 2A <sub>2</sub>	1	ml
. tampon 1A	2,5	ml
. H <sub>2</sub> O distillée	6,5	ml
. SDS 10 %	0,1	ml
. TEMED	0,005	ml
. persulfate d'ammonium 10 %	0,07	ml

### - Gel d'espacement

Une fois le gel de séparation polymérisé, l'isobutanol est éliminé, la surface du gel rincée à l'eau distillée et séchée. Le gel d'espacement est préparé par le mélange de :

. solution 2A <sub>2</sub>	1	ml
. tampon 1B	2,5	ml
. H <sub>2</sub> O distillée	6,5	ml
. SDS 10 %	0,1	ml
. TEMED	0,005	ml
. persulfate d'ammonium 10 %	0,07	ml

Le peigne est placé dans le gel d'espacement dès son coulage dans le moule. Après polymérisation, le peigne est enlevé et chaque puit rincé par le tampon d'électrophorèse.

### 3° Préparation des échantillons

La solution protéique à tester est diluée dans le tampon d'électrophorèse à la concentration de 2 mg/ml. 0,05 ml sont prélevés et placés dans un tube en verre. 0,05 ml de SDS 10 % sont ajoutés, puis 0,01 ml d'iodoacétamide 0,75 M, si l'on veut éviter la réduction des ponts disulfure ; ou 0,005 ml de mercaptoéthanol pour obtenir la réduction des ponts disulfure. Le tube est fermé par du papier aluminium et placé 5 minutes à 95° C. Après refroidissement, on ajoute 0,02 ml de solution colorante.

### 4° Pré-électrophorèse du gel

30 minutes à 40 mA par gel.

### 5° Electrophorèse

On dépose dans un des puits 0,005 ml de solution de marqueur de poids moléculaire et dans les autres les solutions protéiques (en général 0,02 ml). La migration s'effectue en 2 heures 30 environ à 40 mA par gel.

### 6° Fixation. Coloration. Décoloration

Le gel est démoulé, placé 1 heure dans le fixateur et une nuit dans le colorant. La décoloration est réalisée par plusieurs bains de décolorant ou par circulation du décolorant sur charbon activé.

2. ELECTROPHORESE EN GRADIENT D'ACRYLAMIDE (d'après MARGOLIS et KENRICK, 1968)

2.1. MATERIEL

- Moule pour le gel d'acrylamide : identique à celui utilisé pour les électrophorèses en acrylamide-SDS.
- Générateur du gradient : il est constitué par deux seringues de 20 ml reliées entre elles par un tube en polyéthylène et dont l'une, qui contiendra la solution "lourde", est pourvue d'un piston, qui maintiendra le volume à 4 ml, et d'une sortie pour le remplissage du moule.
- Solutions d'acrylamide (conservation 8 jours à +4° C)
  - . Solution "lourde" (acrylamide 25 %)

Acrylamide	7,4 gr
Bisacrylamide	0,39 gr
Sucrose	1,24 gr
Tampon Tris-EDTA acide borique pH 8,3	qsp 30 ml
  - . Solution "légère" (acrylamide 4 %)

Acrylamide	0,94 gr
Bisacrylamide	0,05 gr
Tampon pH 8,3	qsp 30 ml
- Tampon Tris-EDTA-acide borique pH 8,3

Tris	10,75 gr
EDTA	0,93 gr
Acide borique	5,04 gr
H <sub>2</sub> O distillée	800 ml
Ajuster à pH 8,3 avec une solution d'acide borique (1 gr/100 ml)	
Diluer à 1 litre	
- Persulfate d'ammonium 10 mg/ml (préparation extemporanée)
- TEMED
- Solutions pour la coloration des échantillons, pour la coloration et la décoloration des gels d'acrylamide : identiques à celles utilisées pour l'électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS.

## 2.2. PROTOCOLE

On coule successivement dans le moule :

- un gel à 25 % d'acrylamide, sur environ 1 à 2 cm

- . solution lourde 5 ml
- . TEMED 0,003 ml
- . Persulfate d'ammonium 1 % 0,03 ml

- le gradient d'acrylamide de 5 à 25 %

On aspire dans la seringue connectée au moule 4 ml de solution constituée par le mélange de 10 ml de solution lourde, 0,003 ml de TEMED et 0,1 ml de persulfate d'ammonium 1 % (solution A). Dans l'autre seringue sont placés 12 ml d'une solution constituée par le mélange de 20 ml de solution légère, 0,005 ml de TEMED et 0,1 ml de persulfate 1 % (solution B).

## F - DIGESTIONS ENZYMATIQUES

### 1. DIGESTION PAR LA PAPAINE (d'après GORINI et al., 1969)

Le protocole décrit ici permet de réaliser la digestion des IgG en présence de papaine (rapport enzyme/protéine 1 ou 5 %) en présence ou non de cystéine 0,01 M.

#### 1.1. MATERIEL

- Mercuripapaine (SIGMA) ou papaine 2 fois cristallisée (WORTHINGTON)

- Tampon phosphate 0,075 M, NaCl 0,075 M, EDTA 0,002 M, pH 7

- .  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  26,9 gr
- . NaCl 4,4 gr
- . EDTA 0,75 gr
- . Dissoudre dans l'eau distillée (700 ml)
- . Ajuster à pH 7 avec  $\text{H}_3\text{PO}_4$  M
- . Diluer à 1 litre

A ce tampon peut être ajouté de la cystéine à la concentration finale 0,01 M (87,5 mg de cystéine pour 100 ml de tampon)

- Iodoacétamide 0,15 M

- . Iodoacétamide 27 mg dans 1 ml d'eau distillée

## 1.2. PROTOCOLE

- L'IgG est dissoute dans le tampon phosphate 0,75 M, NaCl 0,075 M, EDTA 0,002 M, pH 7 (contenant ou non de la cystéine 0,01 M), à la concentration finale de 10 mg/ml et placée à 37° C pendant 30 minutes.
- La papaïne cristallisée (WORTHINGTON) est diluée dans le tampon de digestion (contenant ou non de la cystéine 0,01 M) à la concentration finale de 1 mg/ml ou 5 mg/ml.
- Dans le cas de l'utilisation de mercuripapaïne (SIGMA), la dilution à une concentration finale de 1 mg/ml ou 5 mg/ml est réalisée par addition de tampon contenant de la cystéine 0,01 M.
- La solution d'enzyme est ajoutée à la solution d'IgG (1 volume de solution d'enzyme pour 10 volumes de solution d'IgG ; soit un rapport enzyme/protéine de 1 % ou 5 %).
- L'incubation est réalisée à 37° C pour des durées de 1 à 18 heures.
- Aux aliquotes prélevés à différents intervalles de temps est ajoutée à 0° C une solution d'iodoacétamide 0,15 M (1 volume pour 10 volumes de prélèvement).

## 2. DIGESTION PAR LA PEPSINE (d'après GORINI et al., 1969)

### 2.1. MATERIEL

- Pepsine 2 fois cristallisée (SIGMA)
- Tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,5  
à préparer fraîchement lors de la digestion enzymatique (l'eau distillée doit être bouillie pour éliminer les traces d'acide carbonique)
  - . Acide acétique 6 ml
  - . H<sub>2</sub>O distillée environ 500 ml
  - . Ajuster à pH 4,5 avec NaOH N
  - . Diluer à 1 litre



A ce tampon, peut être ajoutée de la cystéine à la concentration finale 0,01 M (87,5 mg pour 100 ml de tampon)

- NaOH 0,1 N

## 2.2. PROTOCOLE

- L'IgG est dissoute dans le tampon de digestion (contenant ou non de la cystéine 0,01 M) à la concentration finale de 10 mg/ml et placée à 37° C pendant 30 minutes.
- La pepsine est dissoute dans le tampon de digestion (avec ou sans cystéine 0,01 M) à la concentration de 1 mg/ml ou 5 mg/ml.
- La solution d'enzyme est ajoutée à la solution d'IgG (1 volume pour 10 volumes) et l'incubation est réalisée à 37° C pour des temps de 1 à 18 heures.
- Aux aliquotes prélevés à différents intervalles de temps, est ajoutée une solution de NaOH 0,1 N (1,4 volume pour 1 volume), pour amener le pH à 8.

## 3. DIGESTION PAR LA PEPSINE APRES INCUBATION A pH 2,8

Cette digestion est utilisée pour les sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG2a) résistantes à l'hydrolyse pepsique dans les conditions "classiques".

### 3.1. MATERIEL

Identique à celui du paragraphe précédent avec en plus le tampon suivant :

- tampon formiate de sodium 0,1 M, pH 2,8
  - . Acide formique 3,8 ml
  - . H<sub>2</sub>O distillée environ 500 ml
  - . Ajuster avec NaOH N jusqu'à pH 2,8
  - . Diluer à 1 litre.

### 3.2. PROTOCOLE

Les IgG sont dissoutes dans le tampon PBS, pH 7,4 à la concentration finale de 20 mg/ml, puis dialysées à 4° C contre le tampon formate de sodium 0,1 M, pH 2,8 (3 fois 100 volumes pour 1 volume d'IgG). La solution est ensuite dialysée contre le tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,5 (3 fois 100 volumes pour un volume d'IgG). Après cette dialyse, la concentration protéique est ajustée à 10 mg/ml et la digestion par la pepsine est réalisée par addition d'une solution de pepsine à 1 mg/ml (1 volume pour 10 volumes de solution protéique). Des aliquotes sont prélevés à 1, 2 et 4 heures et amenées à pH 8 par addition de NaOH 0,1 N (1,4 volume pour 1 volume de solution prélevée).

## 4. DIGESTION PAR LA TRYPSINE

### 4.1. MATERIEL

- Trypsine TPCK (WORTHINGTON)
- Tampon Tris-HCl 0,1 M, Ca Cl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 7,8
  - Tris           12,1 gr
  - CaCl<sub>2</sub>        2,9 gr
  - Dissoudre dans 600 ml d'eau distillée
  - Ajuster à pH 7,8 avec HCl N
  - Diluer à 1 litre
- Inhibiteur tryptique du soja : solution à 2 mg/ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 7,8 conservée à -20° C.

### 4.2. PROTOCOLE

- La solution d'IgG (10 mg/ml) est placée à 37° C pendant 30 minutes.
- La trypsine est dissoute dans le tampon de digestion à la concentration de 2 mg/ml ou 5 mg/ml.
- La solution d'enzyme est ajoutée à la solution d'IgG (1 volume pour 10 volumes). Le rapport enzyme/substrat est de ce fait de 2 % ou 5 % (poids/poids).

- L'incubation à 37° C s'effectue pour des temps de 1 à 18 heures.
- Aux aliquotes prélevés à différents intervalles de temps, est ajoutée la solution d'inhibiteur trypsique du soja (1 volume pour 5 volumes de solution protéique).

#### 5. DIGESTION PAR LA PROTEASE V8 DE S. AUREUS (d'après DRAPEAU, 1977)

La digestion par cet enzyme permet de préparer un fragment F(ab)<sub>2</sub> et un fragment Fc à partir des IgG monoclonales de sous-classe IgG2b.

##### 5.1. MATERIEL

- Protéase V8 de S. aureus (S. aureus V8 protéase, Miles)  
Dissoudre la totalité du flacon (5 mg) dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M, EDTA 0,002 M, pH 7,8. Répartir en aliquotes de 0,05 ml et congeler à -20° C.
- Tampon phosphate 0,1 M, EDTA 0,002 M, pH 7,8
  - . Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 17,8 gr
  - . EDTA 0,75 gr
  - . eau distillée environ 500 ml
  - . Ajuster à pH 7,8 avec H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> M
  - . Diluer à 1 litre

##### 5.2. PROTOCOLE

- Dissoudre les IgG à la concentration de 10 mg/ml dans le tampon phosphate 0,1 M, EDTA 0,002 M, pH 7,8 et placer la solution à 37° C pendant 30 minutes.
- Ajouter la solution d'enzyme (1 volume pour 30 volumes de solution d'IgG ; soit un rapport enzyme/protéine 1/30).
- Incuber 4 heures à 37° C
- Congeler à -20° C.

## BIBLIOGRAPHIE

---

Les nombres entre parenthèses correspondent aux pages du mémoire.

Les références des publications ne sont pas incluses dans la bibliographie.

1. AALUND, O. (1968)  
Doctoral thesis.  
Royal Veterinary and Agricultural College, Copenhagen (8).
2. ADETUGBO, K. (1978)  
Evolution of immunoglobulin subclasses. Primary structure of a murine myeloma  $\gamma$ 1 chain.  
J. Biol. Chem., 253, 6068-6075 (33,34,188,189).
3. AMBLER, R.P. (1973)  
Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases.  
Methods Enzymol., 25, part B, 143-154 (186,187,189).
4. ANKERST, J., CHRISTENSEN, P., KJELLEN, L. et KRONVALL, G. (1974)  
A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus : absorption of IgG with Staphylococcus aureus.  
J. Infect. Dis., 130, 268-273 (45,47).
5. AQUINO, D., WONG, R., MARGOLIS, R.U. et MARGOLIS, R.K.  
Sialic acid inhibit proteolytic degradation of dopamine  $\beta$  hydroxylase.  
FEBS Lett., 112, 195-198 (146).
6. AUBERT, J.P., BISERTE, G. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976)  
Carbohydrate-peptide linkage in glycoproteins.  
Arch. Biochem. Biophys., 175, 410-418 (193).
7. BACH, M.K., BLOCH, K.J. et AUSTEN, K.F. (1971)  
IgE and IgA antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. II. Interaction of IgG and IgE at the target cell.  
J. Exp. Med., 133, 772-784 (132).
8. BAENZIGER, J. et KORNFELD, S. (1974)  
Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units.  
J. Biol. Chem., 249, 7270-7281 (39).
9. BAICI, A., KNOPFEL, M., FEHR, K., SKVARIL, F. et BONI, A. (1980)  
Kinetics of the different susceptibilities of the four immunoglobulin G subclasses to proteolysis by human lysosomal elastase.  
Scand. J. Immunol., 12, 41-50 (22).
10. BAUMAL, R., POTTER, M. et SCHARFF, M.D. (1971)  
Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. III. Assembly of the three subclasses of IgG.  
J. Exp. Med., 134, 1316-1334 (18).
11. BAZIN, H. (1982)  
Production of rat monoclonal antibodies with the LOU rat non secreting IR 983 F myeloma cell line.  
In : Protids of the Biological Fluids. Vol. 29 pp. 615-618 (Peeters, H. Eds) (2).

12. BAZIN, H. et BECKERS, A. (1976)  
IgE-myelomas in rats.  
In : Nobel Symposium "Molecular and Biological Aspect of the Acute Allergic Reaction" pp 125-151, Plenum Press, New-York (2).
13. BAZIN, H., BECKERS, A., DECKERS, C. et MORIAME, C. (1973)  
Transplantable immunoglobulin secreting tumors in rats. V. Monoclonal immunoglobulins secreted by 250 ileocecal immunocytomas in LOU/Wsl rats.  
J. Natl. Cancer Inst., 51, 1359-1361 (2,249).
14. BAZIN, H., BECKERS, A. et QUERINJEAN, P. (1974a)  
Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins, IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c.  
Eur. J. Immunol., 4, 44-48 (2,7,8,117,236).
15. BAZIN, H., BECKERS, A., URBAIN-VANSANTEN, G., PAUWELS, R., BRUYNS, C., TILKIN, A.F., PLATTEAU, B. et URBAIN, J. (1978 a)  
Transplantable IgD immunoglobulin secreting tumors in rat.  
J. Immunol., 121, 2077-2082 (2).
16. BAZIN, H., CORMONT, F. et DECLERCQ, L. (1984 a)  
Rat monoclonal antibodies. II. Rapid and efficient technique of purification from ascitic fluid or sera.  
J. Immunol. Methods (sous presse) (245).
17. BAZIN, H., DECKERS, A., BECKERS, A. et HEREMANS, J.F (1972)  
Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. I. General features of LOU/Wsl strain rat immunocytomas and their monoclonal proteins.  
Int. J. Cancer, 10, 568-580 (2,249,250).
18. BAZIN, H., PAUWELS, R., PLATTEAU, B., CORMONT, F. et XHURDEBISE, L.M. (1984 b)  
Studies on the passive cutaneous anaphylaxis reactions induced by rat IgG2a monoclonal antibody and their preferential inhibition by IgE molecules.  
Manuscrit en préparation (132,246).
19. BAZIN, H., PLATTEAU, B., BECKERS, A. et PAUWELS, R. (1978 b)  
Differential effect of neonatal injection anti- $\mu$  or anti- $\delta$  antibodies on the synthesis of IgM, IgD, IgE, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c immunoglobulin classes.  
J. Immunol., 121, 2083-2087 (2).
20. BAZIN, H., QUERINJEAN, P., BECKERS, A., HEREMANS, J.F. et DESSY, F. (1974 b)  
Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats. IV. Sixty-three IgE-secreting immunocytoma tumors.  
Immunology, 26, 713-723 (2).
21. BAZIN, H., XHURDEBISE, L.M., BURTONBOY, G., LE BACQ, A.M., DECLERCQ, L. et CORMONT, F. (1984 c)  
Rat monoclonal antibodies. I. Rapid purification from in vitro culture supernatants.  
J. Immunol. Methods (sous presse) (245).

22. BEALE, D. et FEINSTEIN, A. (1976)  
Structure and function of the constant regions of immunoglobulins.  
Q. Rev. Biophys., 9, 135-180 (39).
23. BENACERRAF, B., OVARY, Z., BLOCH, K.J. et FRANKLIN, E.C. (1963)  
Properties of guinea pig 7S antibodies 1. Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies.  
J. Exp. Med., 117, 937-949 (8).
24. BEVAN, M.J., PARKHOUSE, R.M.E., WILLIAMSON, A.R. et ASKONAS, B.A. (1972)  
Biosynthesis of immunoglobulins.  
Progr. Biophys. Mol. Biol., 25, 133-162 (16).
25. BEWLEY, T.A. (1977)  
Optical activity of disulfide bonds in proteins : studies on human choriomammotropin and bovine pituitary somatotropin.  
Biochemistry, 16, 4408-4414 (41).
26. BINAGHI, R.A. (1973)  
Les anticorps anaphylactiques des mammifères. I. Structure et propriétés physicochimiques.  
Bull. Inst. Pasteur, Paris, 71, 249-279 (132).
27. BINAGHI, R.A. et SARANDO de MERLO, E. (1966)  
Characterization of rat IgA and its non-identity with the anaphylactic antibody.  
Int. Arch. Allergy, 30, 589-596 (8).
28. BRAHMS, S. et BRAHMS, J. (1980)  
Determination of protein secondary structure by vacuum ultraviolet circular dichroism.  
J. Mol. Biol., 138, 149-178 (204,205).
29. BUTLER, J.E. et KENNEDY, N. (1978)  
The differential enzyme susceptibility of bovine immunoglobulin G1 and G2 to pepsin and papain.  
Biochim. Biophys. Acta, 535, 125-137 (27).
30. CALAME, K., ROGERS, J., EARLY, P., DAVIS, M., LIVANT, D., WALL, R. et HOOD L. (1980)  
Mouse C $\mu$  heavy chain immunoglobulin gene segment contains three intervening sequences separating domains.  
Nature, 284, 452-455 (12).
31. CATHOU, R.E., KULCZYCKI, A. Jr. et HUBER, E. (1968)  
Structural features of  $\gamma$ -immunoglobulin, antibody, and their fragments. Circular dichroism studies.  
Biochemistry, 7, 3958-3964 (204).
32. CEBRA, J., BRUNHOUSE, R., CORDLE, C., DAISS, J., FECHHEIMER, M., RICARDO, M., THUNBERG, A. et WOLFE, P.B. (1977)  
Isotypes of guinea-pig antibodies : restricted expression and bases for interactions with other molecules.  
Progr. Immun., III, 264-277 (35,36,42).

33. CEBRA, J.J., CORDLE, C.T., DUGAN, E.S., GRAZIANO, S.L., LITS, S.H., MASSEY, G.R., RICARDO, D.E., TRACEY, D.E. et TRISCHMANN, T.M. (1974)  
Anti-hapten antibodies of inbred guinea-pigs : relationships of their structure to specificity and to other biologic activities.  
Proc. R.A. Welch Found. Confs. on Chem. Res., XVIII Immunochemistry, 67-117 (36,42).
34. CEBRA, J.J., RAY, A., BENJAMIN, D. et BIRSHEIN B. (1971)  
Structural studies of heavy chain from guinea-pig immunoglobulin G2.  
Progr. Immun., I, 269-284 (35).
35. CHALON, M.P., MILNE, R.W. et VAERMAN, J.P. (1979)  
Interactions between mouse immunoglobulins and staphylococcal protein A.  
Scand. J. Immunol., 9, 359-364 (47,238).
36. CHAN, L.M. et CATHOU, R.E. (1977)  
The role of inter-heavy chain disulfide bond in modulating the flexibility of immunoglobulin G antibody.  
J. Mol. Biol., 112, 653-656 (144).
37. CHERON, A., FOURNET B., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1976)  
Structure complète de glycopeptides isolés des immunoglobulines IgG1 du colostrum de vache.  
Biochimie, 58, 927-942 (39).
38. COE, J.E. (1968)  
The immune response in the hamster. I. Definition of two 7S globulin classes : 7 S-gamma-1 and 7S-gamma-2.  
J. Immunol., 100, 507-515 (8).
39. COE, J.E., COE, P.R. et ROSS, M.J. (1981)  
Staphylococcal protein A purification of rodent IgG1 and IgG2 with particular emphasis on Syrian hamsters.  
Mol. Immunol., 18, 1007-1012 (48).
40. COLMAN, P.M., DEISENHOFER, J., HUBER, R., PALM, W. (1976)  
Structure of the human antibody molecule KOL (immunoglobuline G1) : an electron density map at 5 A resolution.  
J. Mol. Biol., 100, 257-282 (12,41,144).
41. CONNELL, G.E. et PAINTER, R.H. (1966)  
Fragmentation of immunoglobulin during storage.  
Can. J. Biochem., 44, 371-379 (21).
42. CONNELL, G.E. et PORTER, R.R. (1971)  
A new enzymic fragment (Fab<sub>b</sub>) of rabbit immunoglobulin G.  
Biochem. J., 124, 53P (153).
43. CORDLE, C.T. (1976)  
Segmental flexibility in two isotypes of guinea-pig antibody : characterization, comparison and functional significance.  
Thesis, The Johns Hopkins University, Baltimore (42).



44. COUTINHO, A., BENNER, R., BJORKLUND, M., FORNI, L., HOLMBERG, D., IVARS, F., MARTINEZ-ALONSO, A.C. et PETERSON, S. (1982)  
A "trans" perspective on the control of immunoglobulin C gene expression.  
*Immunol. Rev.*, 67, 87-114 (245).
45. DAMMACO, F., FRANKLIN, E.C. et FRANGIONE, B. (1972)  
An unusual papain fragment containing the V<sub>H</sub> region of an IgG3 myeloma protein.  
*J. Immunol.*, 109, 565-569 (190).
46. DE FRANCO, R.L., KUNG, J.T. et PAUL, W.E. (1982)  
Regulation of growth and proliferation in B cell subpopulations.  
*Immunol. Rev.*, 64, 161-182 (245).
47. DEISENHOFER, J. (1981)  
Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9 and 2.8 Å resolution.  
*Biochemistry*, 20, 2361-2370 (52,53).
48. DEISENHOFER, J., COLMAN, P.M. et HUBER, R. (1976)  
Crystallographic structural studies of a human Fc fragment. II. A complete model based on a Fourier map at 3.5 Å resolution.  
*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 1421-1434 (12,191).
49. DEISENHOFER, J., JONES, T.A., HUBER, R., SJODAHL, J. et SJOQUIST, J. (1978)  
Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by a human Fc fragment and fragment B of protein A from Staphylococcus aureus.  
*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359, 975-985 (52).
50. DE JONG, W.W., ZWEERS, A. et COHEN, L.H. (1978)  
Influence of single amino-acid substitutions on electrophoretic mobility of sodium dodecyl sulfate-protein complexes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 532-539 (130).
51. DELACROIX, D. et VAERMAN, J.P. (1979)  
Simple purification of goat IgG1 and IgG2 subclasses by chromatography on protein A-sepharose at various pH.  
*Mol. Immunol.*, 16, 837-840 (48,49,238).
52. DE PREVAL, C., PINK, J.R.L. et MILSTEIN, C. (1970)  
Interchain bridges of mouse IgG2a and IgG2b.  
*Nature*, 228, 930-932 (34).
53. DER BALIAN, G.P., SLACK, J., CLEVINGER, B.L., BAZIN, H. et DAVIE, J.M. (1980)  
Subclass restriction of murine antibodies III. Antigens that stimulate IgG3 in mice stimulate IgG2c in rats.  
*J. Exp. Med.*, 152, 209-218 (136,245).
54. DISSANAYAKE, S. et HAY, F.C. (1975)  
Pepsin digestion of mouse IgG immunoglobulins subfragments of the Fc region.  
*Immunochemistry*, 12, 373-378 (24).

55. DOI, E. et JIRGENSONS, B. (1970)  
Circular dichroism studies on the acid denaturation of  $\gamma$ -immunoglobulin and its fragments.  
Biochemistry, 9, 1066-1073 (153).
56. DORRINGTON, K.J., BENNICH, H. et TURNER, M.W. (1972)  
Conformational studies on subfragments from the Fc region of human immunoglobulin G.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 512-516 (204,205).
57. DRAPEAU, G.R. (1977)  
Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease.  
Methods Enzymol., 47, 189-191 (161,278).
58. DRAPEAU, G.R., BOILY, Y. et HOUMARD, J. (1972)  
Purification and properties of an extra-cellular protease of staphylococcus.  
J. Biol. Chem., 247, 6720-6726 (165,166).
59. DUHAMEL, R.C., MEEZAN, E. et BRENDDEL, K. (1980)  
The pH-dependent binding of goat IgG1 and IgG2 to protein A-sepharose.  
Mol. Immunol., 17, 29-36 (48,49).
60. DUHAMEL, R.C., SCHUR, P.H., BRENDDEL, K. et MEEZAN, E. (1979)  
pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose.  
J. Immunol. Methods, 31, 211-217 (47).
61. EARLY, P.W., DAVIS, M.M., KABACK, D.B., DAVIDSON, N. et HOOD, L. (1979)  
Immunoglobulin heavy chain gene organization in mice : analysis of a myeloma genonic clone containing variable and constant regions.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 76, 857-861 (12).
62. EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, E.W., GOTTLIEB, P.A. et WAXDAL, N. (1969)  
The covalent structure of an entire  $\gamma$  G1 immunoglobulin molecule.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 63, 78-85 (30,32).
63. ELLERSON, J.R., YASMEEN, D., PAINTER, R.H. et DORRINGTON, K.J. (1972)  
A fragment corresponding to the CH<sub>2</sub> region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity.  
FEBS Lett., 24, 318-322 (155).
64. ENDRESEN, C. (1979a)  
Isolation of enzymatically derived fragments of porcine IgG and an examination of their reactivity against staphylococcal protein A.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C, 87C, 177-184 (49).
65. ENDRESEN, C. (1979b)  
The binding to protein A of immunoglobulin G and of Fab and Fc fragments.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C, 87C, 185-189 (48,50).
66. ENDRESEN, C. et GROV, A. (1976)  
Further characterization of protein A reactive and non-reactive sub-fragments of Fc from human IgG.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C, 84C, 397-402 (50,51).

67. EPP, O., COLMAN, P., FEHLHAMMER, H., BODE, W., SCHIFFER, M., HUBER, R. et PALM, W. (1974)  
Crystal and molecular structure of a dimer composed of the variable portions of the Bence-Jones protein REI.  
Eur. J. Biochem., 45, 513-524.
68. EY, P.L., PROWSE, S.J. et JENKIN, C.R. (1978)  
Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose.  
Immunochemistry, 15, 429-436 (47,48,236).
69. FAHEY, J.L. et SELL, S. (1965)  
The immunoglobulins of mice. V. The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes.  
J. Exp. Med., 122, 41-58 (236).
70. FAHEY, J.L., WUNDERLICH, J. et MISHELL, R. (1964 a)  
The immunoglobulins of mice. I. Four major classes of immunoglobulins : 7S gamma 2, 7S gamma 1, gamma 1A (beta 2A) and 18S gamma 1 M globulins.  
J. Exp. Med., 120, 223-242 (8).
71. FAHEY, J.L., WUNDERLICH, J. et MISHELL, R. (1964 b)  
The immunoglobulin of mice. II. Two subclasses of mouse 7S gamma-2 globulins : gamma-2a and gamma-2b globulins.  
J. Exp. Med., 120, 243-251 (8).
72. FANGER, M.W. et SMYTH, D.G. (1972 a)  
The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Multiple carbohydrate attachment sites.  
Biochem. J., 127, 757-765 (27,41,144).
73. FANGER, H.W. et SMYTH, D.G. (1972 b)  
The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Asymmetric attachment of the C2 oligosaccharide.  
Biochem. J., 127, 767-774 (27,41,144).
74. FEWTRELL, C., GEIER, M., GOETZE, A., HOLOWKA, D., ISENMAN, D.E., JONES, J.F., METZGER, H., NAVIA, E., SIECKMANN, D., SILVERTON, E. et STEIN, K. (1979)  
Mediation of effector functions by antibodies : report of a workshop.  
Mol. Immunol., 16, 741-754 (144).
75. FOLDS, J.D., PRINCE, H. et SPITZNAGEL, J.K. (1978)  
Limited cleavage of human immunoglobulins by elastase of human neutrophil polymorphonuclear granulocytes. Possible modulator of immune complex disease.  
Lab. Invest., 39, 313-321 (22).
76. FORSGREN, A. (1968)  
Protein A from Staphylococcus aureus. VI. Reaction with subunits from guinea-pig gamma-1 and gamma-2 globulin.  
J. Immunol., 100, 927-930 (48).
77. FORSGREN, A. et SJOQUIST, J. (1966)  
Protein A from Staphylococcus aureus. I. Pseudo-immune reaction with human  $\gamma$ -globulin.  
J. Immunol., 97, 822-827 (45).

78. FOUGEREAU, M., BOURGOIS, A., DE PREVAL, C., ROCCA-SERRA, J. et SCHIFF, C. (1976)  
The complete sequence of the murine monoclonal immunoglobulin MOPC-173 (IgG2a) : genetic implications.  
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 127C, 607-631 (33,34,39).
79. GALFRE, G., MILSTEIN, C. et WRIGHT, B. (1979)  
Rat X rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG.  
Nature, 277, 131-133 (2).
80. GERGELY, J., FUDENBERG, H.H. et VAN LOGHEM, E. (1970)  
The papain susceptibility of IgG myeloma proteins of different heavy chain subclasses.  
Immunochemistry, 7, 1-6 (19,134).
81. GERGELY, J., MEDGYESI, G.A. et STANWORTH, D.R. (1967)  
Structural studies of immunoglobulins. II. The varying susceptibility to papain digestion of a group of human myeloma  $\gamma$ G-globulins.  
Immunochemistry, 4, 369-374 (134).
82. GODING, J.W. (1976)  
Conjugation of antibodies with fluorochromes : modifications to the standard methods.  
J. Immunol. Methods, 13, 215-226 (49).
83. GODING, J.W. (1978)  
Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.  
J. Immunol. Meth., 20, 241-253 (47,220).
84. GOODMAN, J.W. (1965)  
Heterogeneity of rabbit  $\gamma$ G-globulin with respect to cleavage by papain.  
Biochemistry, 4, 2350-2357 (27).
85. GORINI, G., MEDGYESI, G.A. et DORIA, G. (1969)  
Heterogeneity of mouse myeloma G-globulins as revealed by enzymatic proteolysis.  
J. Immunol., 103, 1132-1142 (24,134,155,159,273,275).
86. GOUDSWAARD, J., VAN DER DONK, J.A., NOORDZIJ, A., VAN DAM, R.H. et VAERMAN, J.P. (1978)  
Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins.  
Scand. J. Immunol., 8, 21-28 (49).
87. GOUGH, N.M., KEMP, D.J., TYLER, B.M., ADAMS, J.M. et CORY, S. (1977)  
Intervening sequences divide the gene for the constant region of mouse immunoglobulin  $\mu$  chains into segments, each encoding a domain.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 77, 554-558 (12).
88. GRAY, G.D., MICKELSON, H.N. et CRIM, J.A. (1969)  
The demonstration of two gamma globulin subclasses in the goat.  
Immunochemistry, 6, 641-644 (8).
89. GREY, H.M., HIRST, J.W. et COHN, M. (1971)  
A new mouse immunoglobulin : IgG3.  
J. Exp. Med., 133, 289-304 (7,8,236).

90. GREY, H.M. et KUNKEL, H. (1964)  
A chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gamma-globulin.  
J. Exp. Med., 120, 253-266 (8).
91. GROV, A. (1973)  
Studies on the interaction between staphylococcal protein A and the Fc-region of immunoglobulin G.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A, suppl. 236, 77-83 (48,50).
92. GROV, A., MYKLESTAD, B. et OEDING, P. (1964)  
Immunochemical studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus  
I. Isolation and chemical characterization of antigen A.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 61, 588-596 (45).
93. HAAKE, D.A., FRANKLIN, E.C. et FRANGIONE, B. (1982)  
The modification of human immunoglobulin binding to staphylococcal protein A using diethylpyrocarbonate.  
J. Immunol., 129, 190-192 (54).
94. HERMANN, G. et FRIEDRICH, W. (1970)  
Purification of functional immunoglobulin of the Rat by preparative methods and immunoabsorbents.  
In : Protides of the Biological Fluids, 18, 435-438 (Peeters, H. Ed) (8).
95. HILL, R.L., DELANEY, R., FELLOWS, R.E. et LBOVITZ, H.E. (1966)  
The evolutionary origins of immunoglobulins.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, 56, 1762-1769 (39).
96. HJELM, H., HJELM, K. et SJOQUIST, J. (1972)  
Protein A from staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins.  
FEBS Lett., 28, 73-76 (45).
97. HOUMARD, J. et DRAPEAU, G.R. (1972)  
Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69, 3506-3509 (161).
98. HUBER, B.T. (1982)  
B cell differentiation antigens as probes for functional B cell subsets.  
Immunol. Rev., 64, 57-79 (247).
99. HUBER, R., DEISENHOFER, J., COLMAN, P.M., MATSUSHIMA, M. et PALM, W. (1976)  
Cristallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment.  
Nature, 264, 415-420 (12,41,144,191).
100. HUNNEYBALL, I.H. et STANWORTH, D.R. (1975)  
Fragmentation of human IgG by a new protease isolated from the basidiomycete Armillaria mellea.  
Immunology, 30, 579-586 (22).

101. INGANAS, M. (1981)  
Comparison of mechanisms of interaction between protein A from Staphylococcus aureus and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical Fc $\gamma$  and the alternative F(ab') $_2$ - $\epsilon$  protein A interactions.  
Scand. J. Immunol., 13, 343-352 (50).
102. INGANAS, M., JOHANSSON, S.G.O. et BENNICH, H.H (1980)  
Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with protein A from Staphylococcus aureus : demonstration of protein A reactive sites located in the Fab $_2$  fragment of human IgG.  
Scand. J. Immunol., 12, 23-31 (50).
103. ISHITANI, K., NIITSU, Y. et LITKOWSKY, T. (1975)  
Characterization of the different polypeptide components and analysis of subunit assembly in ferritin.  
J. Biol. Chem., 250, 3142-3148 (184).
104. ITO, S., MURAMATSU, T. et KOBATA, A. (1975)  
Release of galactosyl oligosaccharides by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase D.  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 63, 938-944 (39).
105. JEFFERIS, R., WESTON, P.D., STANWORTH, D.R. et CLAMP, J.R. (1968)  
Relationship between the papain sensitivity of human  $\gamma$ G immunoglobulins and their heavy chain subclass.  
Nature, 219, 646-649 (19).
106. JOHNSON, J.S. et VAUGHAN, J.H. (1967)  
Canine immunoglobulins. I. Evidence for six immunoglobulin classes.  
J. Immunol., 98, 923-934 (8).
107. JOHNSON, J.S., VAUGHAN, J.H. et SWISHER, S.N. (1967)  
Canine immunoglobulins. II. Antibody activity in six immunoglobulin classes.  
J. Immunol., 98, 935-940 (8).
108. JOHNSON, P.M., MICHAELSEN, T.E. et SCOPES, P.M. (1975)  
Conformation of the hinge region and various fragments of human IgG3.  
Scand. J. Immunol., 4, 113-119 (41,209).
109. JOHNSON, P.M., SCOPES, P.M., TRACEY, B.M. et WATKINS, J. (1974)  
A comparison of the circular dichroism spectra of the subclasses of human immunoglobulin G.  
Immunology, 27, 27-31 (41).
110. JONES, V.E. (1969)  
Rat 7S immunoglobulins : characterization of gamma-2- and gamma-1 anti-haptens antibodies.  
Immunology, 16, 589-599 (8).
111. KERCKAERT, J.P. (1978)  
Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis.  
Anal. Biochem., 84, 354-360 (269).

112. KICKHOFEN, B., HAMMER, D.K. et SCHEEL, D. (1968)  
Isolation and characterization of gamma-G type immunoglobulines from bovine serum and colostrum.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 1755-1773 (8).
113. KLEIN, M., HAEFFNER-CAVAILLON N., ISENMAN, D.E., RIVAT, C., NAVIA, M.A., DAVIES, D.R. et DORRINGTON, K.J. (1981)  
Expression of biological effector functions by IgG molecules lacking the hinge region.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, 78, 524-528 (52).
114. KLINMAN, N.R., WYLE, D.E. et TEALE, J.M. (1981)  
B-cell development.  
Immunol. Today, 2, 212-216 (245).
115. KORNFELD, R., KELLER, J., BAENZIGER, J. et KORNFELD, S. (1971)  
The structure of the glycopeptide of human  $\gamma$ G myeloma proteins.  
J. Biol. Chem., 246, 3259-3268 (39).
116. KRONVALL, G. et FROMMEL, D. (1970)  
Definition of staphylococcal protein A reactivity for human immunoglobulin G fragments.  
Immunochemistry, 7, 124-127 (50,51).
117. KRONVALL, G., GREY, H.M. et WILLIAMS, R.C. Jr. (1970 a)  
Protein A reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins.  
J. Immunol., 105, 1116-1123 (47).
118. KRONVALL, G., QUIE, P.G. et WILLIAMS, R.C. Jr. (1970 b)  
Quantitation of staphylococcal protein A : determination of equilibrium constant and number of protein A residues on bacteria.  
J. Immunol., 104, 273-278 (54).
119. KRONVALL, G., SEAL, U.S., FINSTAD, J. et WILLIAMS, R.C. Jr. (1970 c)  
Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of  $\gamma$ G globulin using staphylococcal protein A.  
J. Immunol., 104, 140-147 (45).
120. KRONVALL, G., SEAL, U.S., SVENSSON, S. et WILLIAMS, R.C. Jr. (1974)  
Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 82B, 12-18 (45).
121. KRONVALL, G. et WILLIAMS, R.C. Jr. (1969)  
Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups.  
J. Immunol., 103, 828-833 (45,47).
122. KRUZE, D., MENNINGER, H., FEHR, K. et BONI, A. (1976)  
Purification and some properties of a neutral protease from human leucocyte granules and its comparison with pancreatic elastase.  
Biochim. Biophys. Acta, 438, 503-513 (22).
123. KUNG, J.T. et PAUL, W.E. (1983)  
B-lymphocyte subpopulations.  
Immunol. Today, 4, 37-41 (245).

124. LAEMMLI, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature*, 227, 68-685 (269).
125. LANGONE, J.J. (1982)  
Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by Streptococci and Pneumococci.  
*Adv. Immunol.*, 32, 157-252 (46,47).
126. LANGONE, J.J., BOYLE, M.D.P. et BORSOS, T. (1977)  
I25I-protein A : applications to the quantitative determination of fluid phase and cell-bound IgG.  
*J. Immunol. Methods*, 18, 281-293 (45).
127. LASCHINGER, C.A. et CONNELL, G.E. (1978)  
An unusual tryptic cleavage of a myeloma protein.  
*Immunochemistry*, 15, 119-123 (190).
128. LESLIE, R.G.Q., MELAMED, H.D. et COHEN, S. (1971)  
The products from papain and pepsin hydrolyses of guinea-pig immunoglobulins  $\gamma$ 1G and  $\gamma$ 2G.  
*Biochem. J.*, 121, 829-837 (24,26).
129. Mac KEARN, J.P., PASLAY, J.W., SLACK, J., BAUM, C. et DAVIE, J.M. (1982)  
B cell subsets and differential responses to mitogens.  
*Immunol. Rev.*, 64, 5-23 (245).
130. Mac KENZIE, M.R., WARNER, N.L. et MITCHELL, G.F. (1978)  
The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal protein A.  
*J. Immunol.*, 120, 1493-1496 (47).
131. MANCINI, G., CARBONARA, A.D. et HEREMANS, J.F. (1965)  
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.  
*Immunochemistry*, 2, 235-254 (268).
132. MARGOLIS, J. et KENRIK, K.G. (1968)  
Polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient.  
*Anal. Biochem.*, 25, 347-362 (273).
133. MEDGYESI, G.A., FORIS, G., DEZSO, B., GERGELY, J. et BAZIN, H. (1980)  
Fc receptors of rat peritoneal macrophages : immunoglobulin class specificity and sensitivity to drugs affecting the microfilament or microtubule system.  
*Immunology*, 40, 317-323 (118,237).
134. MEDGYESI, G.A., FUST, G., GERGELY, J. et BAZIN H. (1978)  
Classes and subclasses of rat immunoglobulins : interaction with the complement system and with staphylococcal protein A.  
*Immunochemistry*, 15, 125-129 (118,220,236).



135. MEDGYESI, G.A., JAKAB, M., CSECSINAGY, M. et GERGELY, J. (1971)  
Susceptibility of human G immunoglobulins to tryptic fragmentation.  
*Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 6, 405-414 (21,159).
136. MICHAELSEN, T.E., FRANGIONE, B. et FRANKLIN, E.C. (1977)  
Primary structure of the "hinge" region of human IgG3.  
*J. Biol. Chem.*, 252, 883-889 (32).
137. MICHAELSEN, F.E. et NATVIG, J.B. (1971)  
Isolation and characterization of IgG subclass proteins and Fc fragments  
from normal human IgG. A method for utilizing "non a" and non g" as  
genetic markers.  
*Immunochemistry*, 8, 235-242 (19).
138. MICHAELSEN, T.E. et NATVIG, J.B. (1973)  
Characterization of subclass related F(ab)<sub>2</sub>, Fab/C and Fch fragments  
obtained by short papain digestion of human IgG myeloma proteins.  
*Scand. J. Immunol.*, 2, 299-312 (19,20,22).
139. MICUSAN, V.V. et BORDUAS, A.G. (1975)  
Papain hydrolysis of goat IgG immunoglobulins : a means of subclass  
characterization.  
*Immunochemistry*, 12, 345-347 (27).
140. MILON, A., HOUDAYER, M. et METZGER, J.J. (1978)  
Interactions of porcine IgG and porcine lymphocytes with protein  
A-sepharose.  
*Dev. Comp. Immunol.*, 2, 699-711 (49).
141. MILSTEIN, C.P. et FEINSTEIN, A. (1968)  
Comparative studies of two types of bovine immunoglobulin G heavy  
chains.  
*Biochem. J.*, 107, 559-564 (8).
142. MITCHELL, G.F., GODING, J.W. et RICHARD, M.D. (1977 a)  
Studies on immune response to larval cestodes in mice. Increased  
susceptibility of certain mouse strains and hypothymic mice to *Taenia*  
*taeniformis* and analysis of passive transfer resistance with serum.  
*Aust. J. Exp. Biol. Sci.*, 55, 165-186 (47).
143. MITCHELL, G.F., MARCHALONIS, J.J., SMITH, P.M., NICHOLAS, W.L. et  
WARNER, N.L. (1977 b)  
Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Immunoglobulins  
associated with the larvae of mesocestoides corti.  
*Aust. J. Exp. Biol. Sci.*, 55, 187-211 (47).
144. MIYATA, T., YASUNAGA, T., YAMAWAKI KATAOKA, Y., OBATA, M. et HONJO, T.  
(1980)  
Nucleotide sequence divergence of mouse immunoglobulin gamma-1 and  
gamma-2b chain genes and the hypothesis of intervening sequence-  
mediated domain transfer.  
*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 77, 2143-2147 (12,37).

145. MIZUOCHI, T., TANIGUCHI, T., SHIMIZU, A. et KOBATA, A. (1982)  
Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G.  
J. Immunol., 129, 2016-2020 (39).
146. MOND, J.J. (1982)  
Use of the T lymphocyte regulated type 2 antigens for the analysis of responsiveness of Lyb 5+ and Lyb 5- lymphocytes to T lymphocytes derived factors.  
Immunol. Rev., 64, 99-115 (245).
147. MONTGOMERY, P.C., DORRINGTON, K.J. et ROCKEY, J.H. (1969)  
Equine anti-hapten antibody. The molecular weights of the subunits of equine immunoglobulins.  
Biochemistry, 8, 1247-1258 (8).
148. MORRIS, D.H., WILLIAMS, R.E. et YOUNG, N.M. (1974)  
Comparison of three phosphorylcholine-binding mouse myeloma proteins by circular dichroism.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 1167-1173 (206).
149. MORSE, H.C., BLOCH, K.J. et AUSTEN, K.F. (1968)  
Biologic properties of rat antibodies. II. Time-course of appearance of antibodies involved in antigen induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) ; association of this activity with rat IgG<sub>a</sub>.  
J. Immunol., 101, 658-663 (132).
150. MUDD, S. (1971)  
Resistance against Staphylococcus aureus  
J. Am. Med. Assoc., 218, 1671-1673 (45).
151. NAHM, M., DER BALIAN, G.P., VENTURINI, D., BAZIN, H. et DAVIE, J.M. (1980)  
Antigenic similarities of rat and mouse IgG subclasses associated with anti-carbohydrate specificities.  
Immunogenetics, 11, 199-203 (236).
152. NEZLIN, R.S., KRILOV, M.Y. et ROKHLIN, O.V. (1973)  
Different susceptibility of subclasses of rat IgG<sub>2</sub> to tryptic digestion.  
Immunochemistry, 10, 651-652 (159).
153. NILSSON, R., MYHRE, E., KRONVALL, G. et SJOGREN, H.O. (1982)  
Fractionation of rat IgG subclasses and screening for IgG Fc-binding to bacteria.  
Mol. Immunol., 19, 119-126 (237).
154. NISONOFF, A., WISSLER, F.C., LIPMAN, L.N. et WOERNLEY, D.L. (1960)  
Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds.  
Arch. Biochem. Biophys., 89, 230-244 (145).

155. NUSSSENSWEIG, V. et BINAGHI, R.A. (1965)  
Heterogeneity of rat immunoglobulins.  
Int. Archs. Allergy, 27, 355-360 (8).
156. OEDING, P., GROV, A. et MYKLESTAD, B. (1964)  
Immunochemical studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus. 2. Precipitating and erythrocyte-sensitizing properties of protein A (antigen A) and related substances.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 62, 117-127 (45).
157. OLLO, R., AUFRAY, C., MORCHAMPS, C. et ROUGEON, F. (1981)  
Comparison of mouse immunoglobulin  $\gamma$  2a and  $\gamma$  2b chain genes suggests that exons can be exchanged between genes in a multigenic family.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 78, 2442-2446 (12,37).
158. OUCHTERLONY, O. et NILSSON, L.A. (1978)  
Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.  
In : Handbook of Experimental Immunology. Vol 1, Immunochemistry, Chap. 19 (Weir, D.M., Ed) Blackwell Scientific Publ (264).
159. PARR, D.M. et HOFMANN, T. (1980)  
Loss of cryoprecipitability following proteolytic cleavage of the  $V_H$  domains from a human IgG cryoglobulin.  
Mol. Immunol., 17, 1-7 (190).
160. PEPPARD, J.V. et ORLANS, E. (1980)  
The biological half-lives of four rat immunoglobulin isotypes.  
Immunology, 40, 683-686 (238,244).
161. PERLMUTER, R.M., HANSBURG, D., BRILES, D.E., NICOLOTTI, R.A. et DAVIE, J.M. (1978)  
Subclass restriction of murine anticarbohydrate antibodies.  
J. Immunol., 121, 566-572 (238,245).
162. PETERSEN, J.G.L. et DORRINGTON, K.J. (1974)  
An "in vitro" system for studying the kinetics of interchain disulfide bonds formation in immunoglobulin G  
J. Biol. Chem., 249, 5633-5641 (16,131).
163. PINK, J.R.L., BUTTERY, S.H., DE VRIES G.M. et MILSTEIN, C. (1970)  
Human immunoglobulin subclasses. Partial amino-acid sequence of the constant region of a  $\gamma$  4 chain.  
Biochem. J., 117, 33-47 (30).
164. POLJAK, R.J., AMZEL, L.H., AVEY, H.P., CHEN, B.L., PHIZACKERLEY, R.P. et SAUL, F. (1973)  
Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 A resolution.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 70, 3305-3310 (12).
165. PORATH, J., ASPBERG, K., DREVIN, H. et AXEN, R. (1973)  
Preparation of cyanogen bromide-activated agarose gels.  
J. Chromatogr., 86, 53-56 (264).

166. POTTER, M. (1967)  
The plasma cell tumors and myeloma proteins of mice.  
In : Methods in Cancer Research. Vol. 2, pp 105-157, (Busch, H. Ed)  
Academic Press, New-York (22).
167. POTTER, M., APELLA, E. et GEISER, S. (1965)  
Variation in the heavy polypeptide chain structure of gamma myeloma  
immunoglobulin of from an inbred strain of mice and a hypothesis as to  
their origin.  
J. Mol. Biol., 14, 361-372 (8).
168. POULIK, M.D. et SHUSTER, J. (1964)  
Heterogeneity of H chains of myeloma proteins : susceptibility to papain  
and trypsin.  
Nature, 204, 577-579 (19).
169. PRESS, E.M. et HOGG, N.M. (1970)  
The amino-acid sequences of the Fd fragments of two human  $\gamma$ 1 heavy  
chains.  
Biochem. J., 117, 641-660 (32).
170. QUERINJEAN, P., BAZIN, H., KEHOE, J.M. et CAPRA, J.D. (1974)  
Transplantable immunoglobulin secreting tumors in rats. VI. N-terminal  
sequence variability in LOU/C/Wsl rat monoclonal heavy chain.  
J. Immunol., 114, 1375-1378 (184,186).
171. RAO, A.K., GARVER, F. et MENDICINO, J. (1976)  
Biosynthesis of the carbohydrate units of immunoglobulins. I.  
Purification and properties of galactosyltransferases from murine  
mesenteric lymph nodes.  
Biochemistry, 15, 5001-5009 (39).
172. RECHT, B., FRANGIONE, B., FRANKLIN, E. et VAN LOGHEM, E. (1981)  
Structural studies of a human  $\gamma$ 3 myeloma protein (GOE) that binds staph  
protein A.  
J. Immunol., 128, 917-923 (54).
173. ROCKEY, J.M., KLINMAN, N.R. et KARUSH, F. (1964)  
Equine antihapten antibody I. 7S beta 2A and 10S gamma-1 globulin  
components of purified anti-beta lactoside antibody.  
J. Exp. Med., 120, 589-609 (8).
174. RODKEY, L.S. et FREEMAN, M.J. (1969)  
Occurrence and properties of rabbit IgG1 antibody.  
J. Immunol., 102, 713-719 (8,9).
175. ROSENBERG, Y.J. (1982)  
Isotype-specific T cell regulation of immunoglobulin expression.  
Immunol. Rev., 67, 33-58 (245).
176. SAKANO, H., ROGERS, J.M., HOPPI, K., BRACK, C., TRAUNECKER, A., MAKI,  
R., WALL, R. et TONEGAWA, S. (1979)  
Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are  
encoded in separate DNA segments.  
Nature, 277, 627-633 (12).

177. SCHER, I. (1982)  
CBA/N immune defective mice ; evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed.  
*Immunol. Rev.*, 64, 117-136 (245).
178. SEARS, D.W., MOHRER, J. et BEYCHOK, S. (1977)  
Relative susceptibilities of the interchain disulfides of an immunoglobulin G molecule to reduction by dithiothreitol.  
*Biochemistry*, 16, 2031-2035 (16,131).
179. SEGREST, J.P. et JACKSON, R.L. (1972)  
Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.  
*Methods Enzymol.*, 28, 54-63 (123,126).
180. SEGREST, J.P., JACKSON, R.L., ANDREWS, E.P. et MARCHESI, V.T. (1971)  
Human erythrocyte membrane glycoprotein : a reevaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 390-395 (123).
181. SEPPALA, I., SARVAS, H., PETERFY, F. et MAKELA, O. (1981)  
The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using protein A Sepharose.  
*Scand. J. Immunol.*, 14, 335-342 (48,236).
182. SILVERTON, E.W., NAVIA, M.A. et DAVIES, D.R. (1977)  
Three-dimensional structure of a intact human immunoglobulin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 74, 5140-5144 (12,144).
183. SINGER, A., ASANO, Y., SHIGETA, M., HATHCOCK, K.S., AHMED, A., GARRISON-FATHMAN, C. et HODES, R.J. (1982)  
Distinct B cell subpopulations differ in their genetic requirements for activation by helper T cells.  
*Immunol. Rev.*, 64, 137-160 (247).
184. SJOBERG, B., ROSENQVIST, E., MICHAELSEN, T., PAP, S. et OSTERBERG, R. (1980)  
The solution shapes of IgG3 immunoglobulin and its Fc and Fc fragments. A small angle X-Ray scattering study.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 625, 10-17 (41).
185. SJODAHL, J. (1977 a)  
Repetitive sequences in protein A from Staphylococcus aureus. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc binding.  
*Eur. J. Biochem.*, 73, 343-351 (45).
186. SJODAHL, J. (1977 b)  
Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from Staphylococcus aureus.  
*Eur. J. Biochem.*, 78, 471-479 (45).

187. SKVARIL, F. (1960)  
Changes in out-dated human  $\gamma$ -globulin preparations.  
*Nature*, 185, 475-476 (21).
188. SKVARIL, F. (1976)  
The question of specificity in binding human IgG subclasses to protein A-Sepharose.  
*Immunochemistry*, 13, 871-872 (47).
189. SKVARIL, F., ROTH-WICKY, B. et BARANDUM. S. (1980)  
IgG subclasses in human gamma-globulin preparations for intravenous use and their reactivity with staphylococcus protein A.  
*Vox Sang.*, 38, 147-155 (47,50,51).
190. SLACK, J., DER-BALIAN, G.P., NAHM, M. et DAVIE, J.M. (1980)  
Subclass restriction of murine antibodies. II. The IgG plaque forming cell response to thymus independent type 1 and type 2 antigens in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency.  
*J. Exp. Med.*, 151, 853-862 (236,245).
191. SOLOMON, A., GRAMSE, M. et HAVEMANN, K. (1978)  
Proteolytic cleavage of human IgG molecules by neutral proteases of polymorphonuclear leukocytes.  
*Eur. J. Immunol.*, 8, 782-785 (22).
192. SPIEGELBERG, H.L. (1974)  
Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses.  
*Adv. Immunol.*, 19, 259-293 (44).
193. STALENHEIM, G. et MALMHEDEN-ERIKSSON, I. (1971)  
Protein A from Staphylococcus aureus. Complement fixation by aggregates between protein A and IgG1 or IgG2 from guinea-pig.  
*FEBS Lett.*, 14, 82-85 (48).
194. STEWART, G.A., JOHNSON, P.M., BARRETT, M.W., SCOPES, P.M. et STANWORTH, D.R. (1977)  
Circular dichroism studies on proteolytic cleavage fragments from rabbit IgG.  
*Immunochemistry*, 14, 263-268 (153,166,236).
195. STEWART, G.A. et STANWORTH, D.R. (1975)  
The effect of acid treatment upon the susceptibility of rabbit IgG to proteolytic cleavage with various enzymes.  
*Immunochemistry*, 12, 713-721 (151,153,166,236).
196. STANWORTH, D.R. et TURNER, H.W. (1978)  
Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits.  
In : *Handbook Experimental Immunology*. Vol. 1, *Immunochemistry*, Chap 6 (Weir, D.M. Ed), Blackwell Sci. Publ (18,27,133,151).
197. STEWART, G.A., VARRO, R. et STANWORTH, D.R. (1978)  
The influence of enzymatic cleavage and chemical modification of human and rabbit IgG and their reactivity with staphylococcal protein A.  
*Immunology*, 35, 785-791 (50,54).

198. SVASTI, J. et MILSTEIN, C. (1970)  
Interchain bridges of mouse IgG1.  
Nature, 228, 932-934 (34).
199. TAI, T., ITO, S., YAMASHITA, K., MURAMATSU, T. et KOBATA, A. (1975)  
Asparagine-linked oligosaccharide chains of IgG : a revised structure.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 968-974 (39).
200. TAKATSUKI, K. et OSSERMAN, E.F. (1964)  
Structural differences between 2 types of "heavy chain" disease proteins  
and myeloma globulins of corresponding types.  
Science, 145, 499-500 (19).
201. TERRY, W.D. et FAHEY, J.L. (1964)  
Subclasses of human gamma-2-globulin based on differences in the heavy  
polypeptide chains.  
Science, 146, 400-401 (8).
202. TORANO, A. et PUTNAM, F.W. (1978)  
Complete amino-acid sequence of the  $\gamma$  2 heavy chain of a human IgA2  
immunoglobulin of the A2m (2) allotype.  
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 75, 966-969 (245).
203. TRACEY, D.E. et CEBRA, J.J. (1974)  
Primary structure of the CH2 homology region from guinea-pig antibodies.  
Biochemistry, 13, 4796-4803 (35,39).
204. TRISCHMANN, T.M. et CEBRA, J.J. (1974)  
Primary structure of the CH3 homology region from guinea-pig IgG2  
antibodies.  
Biochemistry, 13, 4804-4811 (35).
205. TUCKER, P.W., MARCU, K.B., NEWELL, N., RICHARDS, J. et BLATTNER, F.R.  
(1979)  
Sequence of the cloned gene for the constant region of murine  $\gamma$ 2b  
immunoglobulin heavy chain.  
Science, 206, 1303-1306 (12,33,34,37,40).
206. TURNER, H.W., BENNICH, H.H. et NATVIG, J.B. (1970 a)  
Pepsin digestion of human G-myeloma proteins of different subclasses. I.  
The characteristic features of pepsin cleavage as a function of time.  
Clin. Exp. Immunol., 7, 603-625 (21,153).
207. TURNER, M.W., BENNICH, H.H. et NATVIG, J.B. (1970 b)  
Pepsin digestion of human G-myeloma proteins of different subclasses.  
II. Immunochemical investigations of the products of peptic digestion.  
Clin. Exp. Immunol., 7, 627-640 (16,21,153).
208. VAN DER GIESSEN, M., HOMAN, W.L., VAN KERNEBEEK, G., AALBERSE, R.C. et  
DIEGES, P.H. (1976)  
Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen allergic  
patient during immunotherapy.  
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 50, 625-640 (132).

209. VAN KAMP, G.J. (1979)  
IgA contamination of IgG prepared on a protein A column.  
J. Immunol. Methods, 27, 301-305 (47).
210. VAN TOORENENBERGEN, A.W. et AALBERSE, R.C. (1981)  
IgG4 and passive sensitization of basophil leukocytes.  
Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 65, 432-440 (132).
211. VAN TOORENENBERGEN, A.W. et AALBERSE, R.C. (1982)  
IgG4 and release of histamine from human peripheral blood leukocytes.  
Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 67, 117-122 (132).
212. VIJAY, H.M. et PERELMUTTER, L. (1977)  
Inhibition of reagin-mediated PCA reactions in monkeys and histamine release from human leukocytes by human IgG4 subclass.  
Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 53, 78-87 (132).
213. VIRELLA, G. et COELHO, I.M. (1974)  
Unexpected mobility of human lambda chains in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.  
Immunochemistry, 11, 157-160 (130).
214. VIRELLA, G. et PARKHOUSE, R.M.E. (1971)  
Papaïn sensitivity of heavy chain subclasses in normal human IgG and localization of antigenic determinants for the subclasses.  
Immunochemistry, 8, 243-250 (19).
215. VIRELLA, G. et PARKHOUSE, R.M.E. (1973)  
Sensitivity to reduction of human immunoglobulin G of different heavy chain subclasses.  
Immunochemistry, 10, 213-217 (16,130,131).
216. VIRELLA, G. et YEH, C.J.G. (1977)  
The sensitivity to plasmin digestion of human IgG proteins of different heavy chain subclasses.  
Experientia, 33, 1231-1233 (21).
217. WANG, A.C., TUNG, E. et FUDENBERG, H.H. (1980)  
The primary structure of a human IgG2 heavy chain : genetic, evolutionary and functional implications.  
J. Immunol., 125, 1048-1054 (30,32,39).
218. WARD, C.W. et DOPHEIDE, T.A.A. (1976)  
Size and chemical composition of influenza virus hemagglutinin chains.  
FEBS Lett., 65, 365-368 (123).
219. WARR, G.W. et HART, I.R. (1979)  
Binding of canine IgM and IgG to protein A of Staphylococcus aureus : a simple method for the isolation of canine immunoglobulins from serum and the lymphocyte surface.  
Am. J. Vet. Res., 40, 922-926 (49).



220. WILLIAMSON, A.R. et ASKONAS, B.A. (1968)  
Differential reduction of interchain disulfide bonds of mouse immunoglobulin G.  
Biochem. J., 107, 823-828 (18).
221. WOLFENSTEIN-TODEL, C., FRANGIONE, B., PRELLI, F. et FRANKLIN, E.C. (1976)  
The amino-acid sequence of heavy chain disease protein ZUC. Structure of Fc fragment of immunoglobulin G3.  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 71, 907-914 (30).
222. WRIGHT, J.K., ENGEL, J. et JATON, J.C. (1978)  
Selective reduction and proteolysis in the hinge region of liganded and unliganded antibodies. Identical kinetics suggest lack of major conformational changes in the hinge region.  
Eur. J. Immunol., 8, 309-314 (144).
223. YAMAWAKI-KATAOKA, Y., MIYATA, T. et HONJO, T. (1981)  
The complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin  $\gamma$  2a gene and evolution of heavy chain genes : further evidence for intervening sequence-mediated domain transfer.  
Nucl. Acid. Res., 9, 1365-1381 (12,37,38).
224. YGUERABIDE, J., EPSTEIN, H.F. et STRYER, L. (1970)  
Segmental flexibility in an antibody molecule.  
J. Mol. Biol., 51, 573-590 (144).
225. ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C. et VINCENDON, G. (1972)  
Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoprotein and glycolipids.  
J. Chromatogr., 69, 291-304 (146).
226. ZIKAN, J. (1980)  
Interaction of pig Fab gamma fragments with protein A from Staphylococcus aureus.  
Folia Microbiol. (Prague), 25, 246-253 (49).
227. ZOLLA, S., BUXBAUM, J., FRANKLIN, E.C. et SCHARFF, M.D. (1970)  
Synthesis and assembly of immunoglobulins by malignant human plasmocytes. I. Myeloma producing  $\gamma$ -chains and light chains.  
J. Exp. Med., 132, 148-162 (16).
228. ZVAIFLER, N.J. et BECKER, E.L. (1966)  
Rabbit anaphylactic antibody.  
J. Exp. Med., 123, 935-950 (8,9).

