

N° d'ordre : 622

50376
1984
HH

50376
4984
44

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Annie CAHOUR

Chargée de Recherches au C.N.R.S.

**ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE
DES CHAINES GLYCANNIQUES DES IgM NORMALES ET
DE DEUX CLASSES D'IgM DE MACROGLOBULINEMIE
DE WALDENSTROM**



Présentée le 19 Juin 1984 devant la Commission d'Examen

| | | |
|---------------------------|----|-----------|
| Président et Rapporteur : | J. | MONTREUIL |
| Rapporteurs : | G. | BISERTE |
| | D. | STROSBURG |
| Examineurs : | G. | SPIK |
| | G. | STRECKER |

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. JOURNAL 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 atmosphériques |
| M. MAHIEU Jean-Marie | Physique atomique et moléculaire |
| 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

*" Ne désespérez jamais.
Faites infuser davantage..."*

Henri MICHAUX

(Tranches de Savoir, 1953)

Ce travail a été initié dans le laboratoire de Chimie Clinique et Biologie Moléculaire (Unité I.N.S.E.R.M. n° 202 et Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. n° 696) de l'Institut Biomédical des Cordeliers (PARIS VI) sous la direction du Professeur Lucien HARTMANN.

Le sujet a été développé à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, sous la direction du Professeur Jean MONTREUIL, directeur du laboratoire de Chimie Biologique (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure-fonction des constituants membranaires).

A Monsieur le Professeur Lucien HARTMANN.

Vous avez bien voulu m'accepter puis m'intégrer dans votre laboratoire, et ma nomination au CNRS témoigne de votre soutien constant durant ces années d'apprentissage du métier de chercheur. Après m'avoir confié ce sujet de recherches vous m'avez permis d'obtenir les aides nécessaires à son développement. Qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde gratitude .

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL.

Depuis quelques années vous m'avez guidée et encouragée dans mon travail en acceptant d'être "mon parrain" de CNRS. Vous avez bien voulu m'accueillir en 1981 dans le laboratoire de Chimie Biologique pour la poursuite de mes recherches. Vous m'avez permis durant ces trois années de partager la vie du C-9 et de bénéficier d'un environnement scientifique efficace et communicatif par son enthousiasme envers la "Biologie Moléculaire des Glycoconjugués". Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée. J'ai pu apprécier votre haute autorité scientifique toujours accompagnée d'encouragements et de conseils avisés. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux attachement car je vous dois beaucoup .

A Monsieur le Professeur Gérard BISERTE.

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de me faire profiter de votre haute compétence en jugeant ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude .

A Monsieur le Professeur Denis STROSBERG.

Malgré les multiples tâches qui vous accaparent vous me faites l'honneur de bien vouloir être rapporteur de cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

A Madame le Professeur Geneviève SPIK.

Vous avez toujours manifesté à mon égard une grande amabilité et une extrême gentillesse même lors d'interruptions des travaux auxquels vous êtes si ardemment attachée. Votre présence dans ce jury est à mes yeux la marque d'un grand honneur. Permettez-moi de vous témoigner ma sincère reconnaissance.

A Monsieur Gérard STRECKER, Maître de recherches au CNRS.

J'ai toujours trouvé auprès de vous une grande disponibilité et un très profond enthousiasme à faire partager votre expérience dans le domaine des structures glycaniques. Je suis très reconnaissante du bénéfice tiré de votre apport scientifique. Je voudrais vous exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail, et vous témoigner ma profonde amitié .

J'exprime mes plus vifs remerciements à

Bernard FOURNET, Professeur à l'IUT de Lille, qui m'a accueillie dans son équipe de Recherches, me faisant ainsi bénéficiaire de sa compétence scientifique et d'un climat d'amitié et de confiance qui m'ont permis d'éviter les périodes de découragement.

Philippe DEBEIRE, qui m'a apporté sa collaboration précieuse et efficace et m'a si souvent stimulée dans l'orientation de mes travaux .

José PAZ PARENTE, **Yves LEROY** et **Guy RICART** de l'aide fructueuse qu'ils m'ont offerte avec tant de sympathie dans les domaines de la HPLC et de la méthylation .

Je ne saurais oublier

le Professeur **J.F.G. Vliegenthart** ainsi que tout son groupe, en particulier le Docteur **H.VAN HALBEEK**, pour leur collaboration efficace dans les analyses en RMN .

le Professeur **Jacques ELION** pour ses encouragements et ses conseils éclairés en divers domaines .

Messieurs **P. BOIVIN**, **C. MIHAESCO** et **J.P. SOULIER** pour la gentillesse avec laquelle ils ont toujours mis à ma disposition les prélèvements nécessaires à la réalisation de ce travail.

Madame **M.P. HARTMANN**, ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Biologie Clinique de l'Institut Biomédical des Cordeliers dont la collaboration m'a été précieuse .

Mes remerciements s'adressent également à

Pierrette MARCON, **Louissette DUTAILLY**, **Martine LAPOUMEROLIE**, **Jean-François MASSIAS** et **Jocelyne CELEN** qui ont participé avec gentillesse à la réalisation du document final .

Je voudrais enfin associer dans une même pensée d'estime toutes les personnes qui ont contribué à créer une ambiance chaleureuse qui m'a été si précieuse pour achever ce travail .

A B R E V I A T I O N S

Ac : Anticorps
Ag : Antigène
Ala: Alanine
Asn : Asparagine
Asp : Acide aspartique
Chaînes H : Lourdes
 L : Légères
 J : de jonction
Con A : Concanavaline
CN Br : Bromure de cyanogène
Dol : Dolichol
Dol-P : Dolichol phosphate
Dol-P-P : Dolichol pyrophosphate
Dol-P-Man : Dolichol phosphate D-Mannose
Fab : Fragment de liaison avec l'antigène
Fc : Fragment cristallisable
Fractions (N),(MS),(DS) : neutre, monosialylée, disialylée
Fuc : L-Fucose
F-T : Fucosyltransférase
Gal : D-Galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
Gal-T : Galactosyltransférase
Glc : D-Glucose
GLC : Chromatographie en phase gazeuse
GlcNAc : N-acétylglucosamine
Gn-T (I,II,III,III',IV) : N-acétylglucosaminyltransférases
[Gn Gn(Gn)] : Structure biantennée porteuse d'une GlcNAc
 intercalaire
Ig (M,G,A,E,D) : Immunoglobulines de différentes classes
IgM-7 , IgM-8 , IgM-9 , IgM-10 : Ig possédant 7,8,9,10 % de
 monosaccharides
Lys : Lysine
Man : D-Mannose
NeuAc : Acide N-acétylneuraminique
PM : Poids moléculaire

Régions V : variable

C : constante

RER : Reticulum endoplasmique rugueux

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Ser : Sérine

SRE : Système réticulo-endothélial

Sialyl-T : Sialyltransférase

Thr : Thréonine

TLC : Chromatographie sur couche mince

μ_m : chaîne μ membranaire

μ_s : chaîne μ de sécrétion

TABLE DES MATIERES

| | | |
|--|----|----------|
| INTRODUCTION..... | p. | 1 |
| GENERALITES..... | | 7 |
| CHAPITRE I : MATERIEL ETUDIE : IGM NORMALES - IGM | | |
| PATHOLOGIQUES..... | | 9 |
| I - <u>IGM NORMALES.....</u> | | 9 |
| II - <u>IGM PATHOLOGIQUES.....</u> | | 10 |
| A - <u>LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTROM.....</u> | | 10 |
| 1.- Définition..... | | 10 |
| 2 - Symptomatologie..... | | 10 |
| a - Clinique..... | | 10 |
| b - Biologique..... | | 10 |
| c - Anatomique..... | | 11 |
| 3 - Modifications biochimiques résultantes.. | | 11 |
| 4 - Traitement..... | | 11 |
| B - <u>NOTION DE MONOCLONALITE.....</u> | | 12 |
| C - <u>RAPPELS SUR LA DIFFERENCIATION ET LA NATURE</u> <u>DES CELLULES B.....</u> | | 12 |
| CHAPITRE II : STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES M | | |
| I - <u>LES CHAINES POLYPEPTIDIQUES.....</u> | | 15 |
| A - <u>LES CHAINES LEGERES.....</u> | | 15 |
| 1 - 2 types λ et κ | | 15 |
| 2 - 2 régions V et C de la chaîne polypepti- dique..... | | 15 |

| | | |
|---|----|----|
| B - <u>LES CHAINES LOURDES</u> | p. | 18 |
| 1 - Notion de classes d'Immunoglobulines ... | | 18 |
| 2 - 2 régions V et C de la chaîne poly-peptidique | | 18 |
| a - Zone variable N-terminale | | 20 |
| b - Zone constante C-terminale..... | | 20 |
| C - <u>LA PIECE DE JONCTION</u> | | 21 |
| D - <u>L'UNITE STRUCTURALE DES IMMUNOGLOBULINES</u> ... | | 24 |
| E - <u>POLYMERISATION DES IGM</u> | | 26 |
| F - <u>LES ZONES CHARNIERES ET LA SUSCEPTIBILITE AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES</u> | | 28 |
| II - <u>LES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES</u> | | 29 |
| A - <u>CLASSIFICATION DES GLYCANNES EN 2 GROUPES</u> .. | | 29 |
| 1 - Glycannes liés O-glycosidiquement..... | | 29 |
| a - Liaison glycanne-hydroxyproline (hydroxylysine)..... | | 30 |
| b - Liaison glycanne-sérine (thréonine) | | 30 |
| 2 - Glycannes liés N-glycosidiquement..... | | 30 |
| a - Noyau pentasaccharidique interne... | | 31 |
| b - Partie variable ou substitution du noyau..... | | 31 |
| α - glycannes de type oligomannosidique..... | | 31 |
| β - glycannes de type N-acétyllactosaminique..... | | 31 |
| γ - glycannes de type mixte..... | | 33 |

| | | |
|---|----|----|
| B - <u>CARACTERISTIQUES DES GLYCANNES DES</u> <u>IMMUNOGLOBULINES</u> | p. | 33 |
| 1 - Séquence peptidique "signal" de glycosylation : le "séquon"..... | | 33 |
| a - Son unicité..... | | 33 |
| b - Facteurs influençant sa glycosy- lation..... | | 34 |
| c - Les limites de sa variabilité..... | | 35 |
| 2 - Sites de fixation des glycannes sur les chaînes polypeptidiques..... | | 35 |
| C - <u>CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES GLYCANNES</u> <u>CONSTITUTIFS DES IGM</u> | | 36 |
| 1 - Période de localisation des sites de glycosylation..... | | 36 |
| 2 - Apogée des méthodes classiques de détermination de structure..... | | 37 |
| 3 - Développement de la résonance magnéti- que nucléaire..... | | 39 |
| III - <u>CONFORMATION DES IGM ET LOCALISATION DES</u> <u>GLYCANNES</u> | | 42 |
| A - <u>NOTION DE DOMAINE</u> | | 42 |
| 1 - Hypothèse émise par Edelman (1969)..... | | 42 |
| 2 - Définition d'un domaine..... | | 42 |
| 3 - Structure d'un domaine..... | | 43 |
| B - <u>CONFORMATION DES IGM</u> | | 45 |
| 1 - Structure tertiaire d'une sous-unité d'immunoglobuline..... | | 45 |
| 2 - Structure quaternaire d'une IgM..... | | 49 |

| | |
|---|-------|
| C - <u>LOCALISATION DES GLYCANNES DANS LES</u> <u>IMMUNOGLOBULINES</u> | p. 51 |
| IV - <u>CONCLUSIONS</u> | 51 |
| CHAPITRE III : BIOSYNTHESE DES IMMUNOGLOBULINES M..... | 54 |
| I - <u>BIOSYNTHESE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES</u> | 54 |
| A - <u>DUALITE V ET C : ORGANISATION MOLECULAIRE</u> <u>DES GENES</u> | 54 |
| B - <u>RECOMBINAISON SOMATIQUE : GENE ACTIF</u> <u>V-C</u> | 55 |
| 1 - Assemblage V-J..... | 55 |
| a - Pour les chaînes légères..... | 55 |
| b - Pour les chaînes lourdes..... | 57 |
| 2 - Assemblage V-C = gène actif..... | 57 |
| C - <u>DIVERSITE DES STRUCTURES ET REGULATION</u> <u>DE LA BIOSYNTHESE</u> | 57 |
| 1 - Diversité des structures..... | 57 |
| 2 - Régulation de la biosynthèse..... | 59 |
| D - <u>LOCALISATION DE LA SYNTHSE DES CHAINES</u> <u>POLYPEPTIDIQUES</u> | 61 |
| II - <u>BIOSYNTHESE DES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES</u> | 62 |
| A - <u>REACTION ENZYMATIQUE DE BASE</u> | 62 |
| 1 - Les glycosyltransférases..... | 62 |

| | | |
|---|----|----|
| 2 - Le donneur..... | p. | 62 |
| 3 - L'accepteur..... | | 63 |
| | | |
| B - <u>BIOSYNTHESE DES GLYCANNES LIES N-</u> | | |
| <u>GLYCOSIDIQUEMENT</u> | | 63 |
| | | |
| 1 - Le cycle des dolichols..... | | 63 |
| 2 - Transfert en bloc de l'oligosaccharide sur la protéine..... | | 65 |
| 3 - Maturation de la chaîne glycanique..... | | 65 |
| a - Elagage des monosaccharides terminaux..... | | 65 |
| b - Evolution vers un glycanne mixte ou complexe..... | | 66 |
| | | |
| C - <u>REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES</u> | | |
| <u>GLYCANNES</u> | | 66 |
| | | |
| 1 - Au niveau génétique..... | | 66 |
| 2 - Au niveau de la concentration intracel- lulaire des substrats..... | | 68 |
| 3 - Au niveau de la structure de l'accepteur | | 68 |
| a - Influence de la nature de l'accepteur protéique..... | | 68 |
| b - Influence de la structure du glycanne lui-même..... | | 68 |
| 4 - Au niveau de l'activité des glycosyl- transférases..... | | 69 |
| 5 - Au niveau de la compartimentation des glycosyltransférases..... | | 70 |
| | | |
| D - <u>LOCALISATION DE LA GLYCOSYLATION</u> | | 70 |
| | | |
| III - <u>BIOSYNTHESE DES IgM</u> | | 71 |

| | |
|--|----|
| - Les inhibiteurs de la glycosylation..... p. | 71 |
| - Les inhibiteurs du transport intra- cellulaire..... | 72 |
| A - <u>ASSEMBLAGE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES ET POLYMERISATION.....</u> | 72 |
| 1 - Formation d'un monomère..... | 72 |
| 2 - Polymérisation..... | 72 |
| B - <u>GLYCOSYLATION DES IGM.....</u> | 72 |
| 1 - Glycosylation initiale..... | 73 |
| 2 - Maturation des chaînes glycaniques..... | 73 |
| C - <u>RELATION ENTRE POLYMERISATION, ADDITION DE LA CHAINE J ET GLYCOSYLATION.....</u> | 73 |
| D - <u>EXPRESSION DES IGM : NOTION DE TRANSPORT INTRACELLULAIRE.....</u> | 73 |
| E - <u>REGULATION DE L'EXPRESSION DES IGM.....</u> | 74 |
| F - <u>CORRELATION ENTRE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE DES CELLULES B ET LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES IGM</u> | 76 |
| IV - <u>CONCLUSIONS.....</u> | 77 |
| | |
| CHAPITRE IV : <u>ROLE BIOLOGIQUE DES GLYCANNES</u> | 79 |
| | |
| I - <u>ROLE DES GLYCANNES DANS LES GLYCOPROTEINES.....</u> | 81 |
| | |
| A - <u>ROLE PHYSICO-CHIMIQUE : SYNTHÈSE PROTÉIQUE ET STABILISATION DE LA CONFORMATION.....</u> | 81 |

| | |
|--|--------|
| 1 - Terminaison de la synthèse protéique.....p. | 81 |
| 2 - Sécrétion des glycoprotéines..... | 81 |
| 3 - Stabilisation de la conformation..... | 82 |
| 4 - Protection des protéines contre l'attaque protéolytique..... | 82 |
| 5 - Stabilisation des membranes biolo- giques | 83 |
| 6 - Contrôle de la perméabilité membra- naire | 83 |
| 7 - Rôle de l'acide sialique dans la vis- cosité | 84 |
| B - <u>INTERVENTION DES SUCRES DANS LES PHENOMENES</u> <u>DE RECONNAISSANCE</u> | 84 |
| 1 - Transport intracellulaire | 84 |
| 2 - Les glycannes sont porteurs de signaux de reconnaissance | 85 |
| 3 - Les glycannes sont des messages destinés à des cellules cibles | 85 |
| 4 - Les glycannes sont responsables de l'adhésion cellulaire | 87 |
| 5 - Les glycannes jouent un rôle déterminant... 88 | |
| a - dans la durée de vie d'une glyco- protéine | 88 |
| b - dans la durée de vie d'une cellule circulante..... | 88 |
| c - dans la distribution de certaines cel- lules dans les organes spécifiques..... | 88 |

II - ROLE DES GLYCANNES DANS LES IGM..... p. 88

A - DIFFERENCIATION FONCTIONNELLE DES DOMAINES..... 89

1 - Les domaines du fragment Fab ("antigen binding")..... 89

2 - Les domaines du fragment Fc..... 91

a - domaine C_H^2 91

b - domaine C_H^3 et C_H^4 91

α - domaine C_{μ}^3 91

β - domaine C_{μ}^4 93

(1) - activation de la voie classique du complément..... 93

(2) - action cytophilique vis à vis des cellules B..... 93

(3) - polymérisation des IgM..... 96

c - rôle des ponts disulfures dans les fonctions des IgM..... 96

d - conclusion..... 97

B - FONCTIONS ATTRIBUABLES AUX CHAINES GLYCANNIQUES DES IGM..... 97

1 - Les glycanes et la stabilisation de structure des IgM..... 97

a - leurs relations avec la chaîne polypeptidique..... 97

b - leur rôle dans la stabilisation et les changements de conformation : espaceurs inter-domaines..... 98

| | |
|---|------------|
| c - le rôle des glycanes dans la sécrétion des IgM..... p. | 99 |
| 2 - Les glycanes comme signaux de reconnaissance..... | 100 |
| a - catabolisme des complexes immuns... | 100 |
| b - contrôle de l'homéostasie des IgM... | 102 |
| 3 - Conclusions..... | 103 |
| CHAPITRE V : CONCLUSIONS..... | 104 |

MATERIEL ET METHODES

| | |
|---|-----|
| I - <u>ORIGINE DES IMMUNOGLOBULINES.....</u> | 107 |
| A - <u>IGM PATHOLOGIQUES.....</u> | 107 |
| B - <u>IGM NORMALES.....</u> | 107 |
| II - <u>PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES.....</u> | 107 |
| A - <u>IGM PATHOLOGIQUES.....</u> | 107 |
| 1 - Classification physico-chimique des IgM | 107 |
| a - Test de Sia..... | 108 |
| b - Test de cryoprécipitation..... | 108 |
| d - Test de pyoprécipitation..... | 108 |
| 2 - Préparation des euglobulines..... | 108 |

| | |
|--|---------|
| 3 - Préparation des cryoglobulines | p. 109 |
| 4 - Préparation des pyroglobulines | 109 |
| 5 - Préparation des macro-pseudoglobulines | 109 |
| B - <u>IGM NORMALES</u> | 110 |
| 1 - Préparation de l'adsorbant | 110 |
| a - Activation du Sepharose | 110 |
| b - Couplage Sepharose 4B-Protamine | 110 |
| 2 - Isolement des IgM | 111 |
| a - Adsorption des IgM sériques | 111 |
| b - Elution des protéines | 111 |
| C - <u>PURIFICATION DE LA FRACTION ENRICHIE EN IGM</u> | 112 |
| D - <u>VERIFICATION DE L'HOMOGENEITE DES IGM PREPAREES</u> | 112 |
| 1 - Electrophorèse sur acétate de cellulose | 112 |
| 2 - Immunoélectrophorèse sur gélose | 112 |
| 3 - Immunodiffusion double | 113 |
| 4 - Immunodiffusion radiale | 113 |
| III - <u>STRATEGIE D'ETUDE DES IMMUNOGLOBULINES</u> | 113 |
| A - <u>CARACTERISATION CHIMIQUE DES IGM PURIFIEES</u> | 113 |
| 1 - Composition en acides aminés | 113 |
| 2 - Composition centésimale en monosaccharides | 114 |
| a - Dosage des oses neutres | 114 |
| b - Dosages des osaminés | 114 |

| | |
|---|---------|
| c - Dosage des acides sialiques totaux..... | p. 114 |
| 3 - Composition molaire en monosaccharides..... | 114 |
| 4 - Caractérisation des acides sialiques..... | 115 |
| 5 - Caractérisation des chaînes légères et leur glycosylation éventuelle..... | 116 |
| a - Immunoélectrophorèse..... | 116 |
| b - Séparation des chaînes légères et lourdes..... | 116 |
| c - Purification des chaînes légères sur immunoabsorbant..... | 116 |
| d - Etude d'une glycosylation éventuelle des chaînes légères..... | 117 |
| B - <u>PREPARATION DES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES</u> | 117 |
| 1 - Hydrazinolyse..... | 117 |
| 2 - Réduction et purification des glycanes..... | 118 |
| 3 - Fractionnement des oligosaccharides purifiés | 118 |
| 4 - Caractérisation des oligosaccharides après fractionnement..... | 119 |
| C - <u>APPROCHE STRUCTURALE DES OLIGOSACCHARIDES</u> | 119 |
| 1 - Sous-fractionnement des fractions obtenues sur colonne de Con A..... | 119 |
| a - Chromatographie liquide haute pression..... | 120 |
| b - Electrophorèse à haut voltage sur papier..... | 120 |

| | |
|--|--------|
| 2 - Etude structurale des oligosac- | |
| charides..... | p. 120 |
| D - <u>BILAN QUANTITATIF ET COMPARATIF ENTRE</u> | |
| <u>LES FAMILLES D'IGM NORMALES ET PATHO-</u> | |
| <u>LOGIQUES.....</u> | 122 |

RESULTATS - DISCUSSION

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE I : PREPARATION ET CARACTERISATION DES IMMUNO- | |
| GLOBULINES M | 136 |
| | |
| I - <u>PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES M.....</u> | 136 |
| | |
| A - <u>IGM PATHOLOGIQUES</u> | 136 |
| 1 - Euglobulines | 136 |
| 2 - Les immunoglobulines thermolabiles | 136 |
| 3 - Précipitation au sulfate d'ammonium | 139 |
| B - <u>IGM NORMALES</u> | 139 |
| C - <u>CONTROLE DE LA PURETE DES IGM</u> | 139 |
| D - <u>CONCLUSIONS</u> | 143 |
| | |
| II - <u>CARACTERISATION DES IMMUNOGLOBULINES</u> | 143 |
| | |
| A - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u> | 143 |
| | |
| B - <u>COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES</u> | 145 |
| 1 - Composition centésimale | 145 |
| 2 - Composition molaire | 150 |
| 3 - Comparaison entre familles d'IgM | 150 |

| | |
|--|--------|
| C - <u>CARACTERISATION DE LA LIAISON GLYCANNE- PROTEINE</u> | p. 154 |
| D - <u>CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES</u> | 154 |
| E - <u>CARACTERISATION DES CHAINES LEGERES</u> | 154 |
| 1 - Identification..... | 154 |
| 2 - Préparation des chaînes légères..... | 154 |
| 3 - Purification des chaînes légères..... | 156 |
| 4 - Recherche d'une glycosylation éven- tuelle des chaînes légères purifiées..... | 156 |
| F - <u>CONCLUSIONS</u> | 157 |

**CHAPITRE II : PREPARATION ET CARACTERISATION DES CHAINES
GLYCANNIQUES..... 158**

| | |
|--|-----|
| I - <u>PREMIERE APPROCHE ANALYTIQUE</u> | 158 |
| II - <u>SELECTION DE 3 IGM</u> | 159 |
| III - <u>ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES CHAINES GLYCANNIQUES</u> | 164 |
| 1 - Hydrazinolyse des glycopeptides + réduction.. | 164 |
| 2 - Fractionnement des chaînes oligosaccha- ridiques..... | 164 |
| 3 - Caractérisation des différentes fractions.... | 164 |

CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES 177

| | |
|---|-----|
| I - <u>IGM-7 (ZAJ)</u> | 177 |
| A - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES SUR CON A</u> | 177 |

| | | |
|---|----|-----|
| 1 - Electrophorèse à haut voltage sur papier | p. | 177 |
| 2 - Chromatographie liquide haute performance (HPLC)..... | | 178 |
| B - <u>CARACTERISATION DES SOUS-FRACTIONS</u> | | 178 |
| 1 - Structures N-acétyllactosaminiques | | 178 |
| 2 - Structures oligomannosidiques | | 178 |
| C - <u>ETUDE STRUCTURALE</u> | | 178 |
| 1 - Fraction A | | 209 |
| 2 - Fraction B | | 209 |
| 3 - Fraction C | | 211 |
| D - <u>CONCLUSION</u> | | 213 |
| II <u>ETUDE DE L'HETEROGENEITE STRUCTURALE DES 3 IGM...</u> | | 213 |
| A - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT ET CARACTERISATION</u> | | 213 |
| 1 - Fraction A..... | | 213 |
| 2 - Fraction B..... | | 213 |
| 3 - Fraction C..... | | 214 |
| B - <u>ETUDE STRUCTURALE</u> | | 214 |
| 1 - Fraction A | | 232 |
| a - Dérivés méthylés et peracétylés..... | | 232 |
| b - Présence éventuelle de structures très complexes..... | | 233 |
| c - Action des exo-glycosidases..... | | 237 |
| 2 - Fraction B..... | | 238 |
| 3 - Fraction C..... | | 239 |

CHAPITRE IV : ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES FAMILLES

D'IGM p. 242

| | |
|--|-----|
| I - <u>ASPECT STRUCTURAL</u> | 242 |
| 1 - Aspect qualitatif..... | 242 |
| 2 - Aspect quantitatif | 242 |
| 3 - Conclusions | 243 |
| II - <u>INTERPRETATION DES DIFFERENCES OBSERVEES</u> | 246 |
| A - <u>HETEROGENEITE STRUCTURALE</u> | 247 |
| 1 - Hétérogénéité majeure | 247 |
| 2 - Hétérogénéité mineure | 252 |
| 3 - Signification biologique de cette hétérogénéité | 252 |
| B - <u>PROBLEMES POSES AU PLAN DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCANNES</u> | 253 |
| 1 - Problèmes particuliers liés à la présence de N-acétylglucosamine intercalaire dans les structures biantennées..... | 253 |
| a - Travaux de Schachter et Narasimhan.... | 254 |
| b - Interprétation de nos résultats en fonction de ces données..... | 259 |
| 2 - Problèmes généraux concernant la régulation de la glycosylation..... | 260 |
| a - Régulation de la glycosylation..... | 260 |
| b - Glycosylation post-traduction..... | 262 |
| c - Conclusions..... | 264 |
| C - <u>INCIDENCE PATHOLOGIQUE</u> | 267 |
| 1 - Pathologie des glycoconjugués : résultats acquis..... | 267 |
| a - Les glycoprotéinoses..... | 267 |
| b - Transformation maligne des cellules... | 269 |

| | | |
|---|----|-----|
| 2 - L'incidence de nos résultats..... | p. | 272 |
| a - La présence éventuelle d'un marqueur glycannique..... | | 272 |
| b - Les limites de nos résultats et les perspectives..... | | 274 |
| 3 - Conclusions..... | | 278 |
| a - Vérification de nombreuses données.... | | 278 |
| b - Apport de nos résultats dans la "Biolo- gie Moléculaire des Glycoconjugués"... | | 281 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| CONCLUSIONS GENERALES | 282 |
|-----------------------------|-----|

| | |
|---------------------|-----|
| BIBLIOGRAPHIE | 287 |
|---------------------|-----|

INTRODUCTION

Les Immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines qui se distinguent selon leur classe par leur taux différent en monosaccharides et, parfois au sein d'une même classe, par le nombre et la nature de leurs chaînes glycaniques, alors que leurs structures peptidiques présentent de nombreuses homologues de séquence.

Depuis quelques années seulement la copule glucidique des Ig ainsi que celle de nombreuses glycoprotéines a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs qui ont ainsi établi les bases d'une "Biologie Moléculaire" et d'une "Pathologie moléculaire des glycoconjugués".

Des rôles biologiques très divers ont été attribués aux glycoprotéines grâce à une multitude d'observations, tandis que parallèlement, la structure primaire de nombreux glycannes était déterminée par la mise au point de méthodologies de plus en plus adaptées à de faibles quantités de produit (voir la revue de Montreuil, 1982).

Les Immunoglobulines synthétisées par des cellules immunocompétentes soumises à une transformation néoplasique, constituent un bon modèle d'étude structurale des chaînes glycaniques ; sécrétées en quantité très importante elles sont "homogènes" car elles proviennent de l'expansion maligne d'un clone cellulaire normal. Elles ne possèdent pas d'activité anticorps prévisible car leur production est induite spontanément. Néanmoins plusieurs cas d'activité anticorps portés par des Ig myélomateuses ont été décrits par Seligman et Brouet (1973). Certains auteurs, en particulier Kunkel et Prendergast (1966), ont

démontré la validité d'une extrapolation des résultats obtenus avec des protéines myélomateuses, aux Ig normales.

Notre travail s'inscrivant dans le cadre de l'étude des dysprotéïnémies entreprise depuis plusieurs années dans le laboratoire du Professeur L. Hartmann, l'obtention d'échantillons pathologiques d'IgM de macroglobulinémie de Waldenström de différentes régions nous a été facilitée. Les 3 propriétés principales de ce matériau ont déterminé notre choix :

1 - la forte concentration sérique des IgM lors de cette affection ;

2 - la teneur en monosaccharides la plus élevée de toutes les classes d'Ig (7 - 15 % d'après Clamp et Johnson, 1972) ;

3 - son origine : humaine, qui est évidemment appréciable pour l'étude de son incidence pathologique.

Nos travaux ont été motivés par plusieurs faits expérimentaux :

1 - l'observation d'un polymorphisme parmi les macroglobulines de Waldenström (Filitti-Wurmser *et al*, 1964 ; 1967), par distinction après ultracentrifugation analytique de 95 sérums de sujets atteints de la maladie de Waldenström, de 2 variétés moléculaires possédant des coefficients de sédimentation à l'équilibre de 17 S et de 18,3 S ;

2 - la mise en évidence par Davie et Osterland (1968), après étude de 8 IgM de Waldenström, de 2

groupes basés sur leur composition en monosaccharides (colorimétrie) :

- le groupe I : à 10,70 p. 100 de glucides ;
- le groupe II : à 7,70 p. 100 de glucides .

3 - l'observation, par Virella et Lechner (1976) d'une différence importante dans le taux de monosaccharides (10 p.cent et 18 p.cent) de deux IgM pathologiques en corrélation directe avec une différence dans leur mobilité et leur masse moléculaire ;

4 - l'affirmation, par Jouanneau (1978) d'une faible glycosylation des IgM normales (6 p.cent) par rapport aux IgM pathologiques dont la teneur moyenne est de 12 p.cent.

Le rôle significatif, très tôt remarqué (Cohen et Porter, 1964) des IgM dans le système immunologique et leur haut degré de conservation au cours de l'Evolution (Kehry *et al*, 1979), ajoutés à ces observations, nous ont encouragée à orienter nos recherches vers la copule glucidique des IgM afin d'essayer de trouver une signification à son hétérogénéité.

Notre objectif principal était de répondre aux questions suivantes :

- 1 - Existe -t-il, dans un échantillonnage d'IgM pathologiques, des populations correspondant à divers pourcentages de glycosylation ?

- 2 - L'écart dans la teneur en glucides entre IgM normales et IgM pathologiques est-il réel ?
- 3 - Les mêmes types de structures glycaniques sont-ils retrouvés dans les 2 catégories d'IgM ? Si des différences existent, sont-elles qualitatives ou quantitatives ?
- 4 - Existe-t-il une ou plusieurs structures oligosaccharidiques qui permettent de définir l'origine pathologique de la cellule immunocompétente ; ce qui reviendrait à impliquer les glycanes dans une étape de l'oncogénèse ?

Nous avons tenté d'apporter une réponse à ces questions par la connaissance de la structure primaire des chaînes glycaniques des IgM normales et pathologiques.

Dans la première partie de notre mémoire, nous rappellerons l'état actuel des connaissances sur les propriétés physico-chimique des IgM, leur biosynthèse et le rôle de la copule glucidique.

Dans la seconde partie nous exposerons les résultats de nos recherches : celles-ci ont débuté dans le laboratoire du Prof. L. Hartmann et ont été poursuivies dans le laboratoire du Prof. J. Montreuil.

L'ensemble de nos travaux ont fait l'objet des publications suivantes :

1 - A. CAHOUR, L. HARTMANN.

Study of neutral and aminomonosaccharides by gas-liquid differential chromatography : application to three reference glycoproteins.

J. Chromatogr. (1978) 152, 475-486.

2 - A. CAHOUR, M. P. OLLIER - HARTMANN, C. MIHAESCO and L. HARTMANN.

Monosaccharide composition of human monoclonal (18) and normal (8) IgM Immunoglobulins : proposed structural models for their glycan chains.

Biomedicine (1981) 35, 133-136.

3 - A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN and J. MONTREUIL.

Comparative study of the carbohydrate moieties of normal and pathological human immunoglobulins M.

Biochem. J. (1983) 211, 55-63.

4 - A. CAHOUR, P. DEBEIRE, J. PAZ PARENTE, L. HARTMANN and J. MONTREUIL.

Structural basis of the heterogeneity of asparagine-linked oligosaccharides of a Waldenström's macroglobulin M.

Biochim. Biophys. Acta (1984) (sous presse)

5 - A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN, J. MONTREUIL, H. Van HALBEEK and J.F.G. VLIAGENTHART.

Primary structure of the major glycans of the N-acetyllactosamine type derived from the human immunoglobulins M from two patients with Waldenström's macroglobulinemia

FEBS Lett. (1984) (sous presse)

Les communications suivantes ont été présentées :

- 1 - A. CAHOUR et L. HARTMANN.

Proposition de modèles structuraux des chaînes glycaniques des IgM d'après une étude des monosaccharides de 18 IgM monoclonales et de 5 IgM normales.

Congrès d'Automne de la Société de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq, 22-24 septembre 1980.

- 2 - A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN et J. MONTREUIL.

Etude comparative des chaînes glycaniques des IgM humaines normales et pathologiques. Hétérogénéité et différences structurales.

X^{mes} Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Paris ; 5-7 juillet 1982.

- 3 - A. CAHOUR, P. DEBEIRE, L. HARTMANN and J. MONTREUIL.

Comparative study of carbohydrate moieties of normal and pathological human immunoglobulins M.

Proceedings of the 7th. International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Roneby, July 1983.

GENERALITES

Les immunoglobulines (Ig) ont été définies dès 1964 par le Comité International de Nomenclature à l'Organisation Mondiale pour la Santé : "Ce sont des protéines d'origine animale dotées d'une activité anticorps connue". Après remaniement en 1966, son extension a été définitivement adoptée en 1969 : "Certaines protéines apparentées aux Ig (protéines de myélomes, de Bence Jones, sous-unités naturelles des Ig) dépourvues d'une telle activité sont cependant classées dans cette catégorie à cause de leur similitude de structure chimique".

En 1967, Metzger affirmait qu'elles constituaient le système protéique le plus complexe du fait de leur diversité structurale et fonctionnelle, et par la mise en oeuvre d'un système de régulation très sophistiqué de leur biosynthèse.

En 1978, Winkelhake constatait que les Ig se révélaient, au cours de l'Evolution du monde vivant, comme les effecteurs macromoléculaires les plus diversifiés.

En raison de cette extraordinaire complexité, la classification antigénique des immunoglobulines, leur étude structurale et la localisation cellulaire de leurs sites de synthèse n'a pu progresser que grâce à l'étude des populations homogènes :

- populations d'homogénéité restreinte, comme celle des anticorps de spécificité étroite obtenus par immunisation d'un organisme. C'est en effet à titre d'anticorps que les Ig ont été initialement étudiées;
- populations strictement homogènes, comme celles des protéines monoclonales, les unes sécrétées spontanément chez l'Homme par des cellules lymphoplasmocytaires malignes

(cas de myélomes ou de macroglobulinémie de Waldenström), les autres synthétisées chez la Souris après induction chimique de plasmocytomes.

En plus de son homogénéité, ce matériel présente l'avantage d'être très concentré dans le sérum des sujets donneurs.

La molécule d'IgM, plus particulièrement étudiée dans ce travail, est la première qui soit synthétisée au cours de la réponse immunitaire. C'est la plus primitive des Ig, c'est à dire la première apparue dans l'Evolution des Vertébrés, et malgré cela, la mieux conservée parmi les autres classes d'Ig (Marchalonis, 1972). Toutes ces raisons, auxquelles s'ajoute leur teneur élevée en monosaccharides (7-15%), en font un excellent modèle d'étude de la structure et de la synthèse des immunoglobulines.

L'une des principales caractéristiques des Ig est d'être glycosylée, et le problème de la signification physico-chimique, physiologique et pathologique des fractions glycaniques se pose.

Après une brève caractérisation du matériel utilisé (IgM normales et IgM pathologiques) nous rappellerons les principales données actuelles sur la structure des Ig et sur leur biosynthèse. A la lumière de ces dernières acquisitions, s'est développé le concept de plurifonctionnalité des Ig. Jusqu'à présent, le rôle biologique de liaison avec l'antigène lui était essentiellement reconnu; mais d'autres fonctions ont été décrites par la suite, dans lesquelles les glucides sont souvent impliqués. C'est sur cette participation éventuelle de la copule glucidique que nous insisterons dans le dernier chapitre de ces généralités.

CHAPITRE I : MATERIEL ETUDIE : IGM NORMALES -
IGM PATHOLOGIQUES

Nous nous proposons de rappeler, dans ce premier chapitre, les caractéristiques du matériel constituant le support de ce travail, afin de dégager deux concepts essentiels : ceux de la polyclonalité et de la monoclonalité. Ils seront ultérieurement associés aux notions respectives d'hétérogénéité et d'homogénéité, d'une part, de normalité et de pathologie, d'autre part.

I - IGM NORMALES

Les IgM normales représentent une population de molécules hétérogènes dont l'hétérogénéité est en étroite relation avec celle de la population lymphoplasmocytaire responsable de leur biosynthèse. Elles sont représentatives de l'expression de ces cellules soumises à différents stimuli et traduisent une grande variété dans la synthèse des anticorps. C'est pourquoi l'expression "IgM normales" est toujours utilisée au pluriel.

Dans les sérums humains normaux, elles ne représentent que 7% des protéines plasmatiques et leur concentration sérique varie de 0,3 g à 1,0 g/l. Ce sont les premières immunoglobulines détectées après stimulation antigénique.

L'hétérogénéité de ces molécules se traduit par des variations de charge électrique qui expliquent la présence d'une bande relativement large en électrophorèse (Fahey, 1965).

II - IGM PATHOLOGIQUES

A - LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTROM

1 - Définition : Il s'agit d'une maladie immunoproliférative du système réticulo-endothélial, liée à la prolifération maligne d'un clone de cellule lymphoplasmocytaire à différenciation et à maturation diverses, comportant une synthèse d'IgM généralement excrétée (voir la revue de Reyes, 1979).

2 - Symptomatologie : Cette hémopathie offre une triade symptomatique :

a - Clinique . Elle se manifeste par une asthénie générale, une hypertrophie des organes hématopoïétiques (ganglions, rate, foie) et un syndrome hémorragique. Elle atteint plus fréquemment des personnes du sexe masculin ayant dépassé l'âge de la cinquantaine. Son évolution est discrète et son installation souvent insidieuse.

b - Biologique . Elle se caractérise par la sécrétion importante d'une macroglobuline M sérique, monoclonale. Cette IgM, de constante de sédimentation 17-20 S (Filitti-Wurmser et al ., 1964; 1967), est présente à une concentration sérique dépassant 10 g/l et pouvant même atteindre 60 g/l. Cette augmentation d'une immunoglobuline circulante s'accompagne souvent d'une augmentation de la viscosité sanguine. Au plan hématologique, une certaine anémie est observée; le nombre de globules blancs est normal, cependant, la formule leucocytaire peut refléter une inversion au profit des lymphocytes.

C'est sur la base de ces observations cliniques et biologiques que fut décrite la maladie de Waldenström, par Jan G. Waldenström, en 1944.

c - Anatomique . Le diagnostic est fondé, après examen cytologique d'un myélogramme, sur la prolifération intense d'un type cellulaire particulier : la cellule lymphoréticulaire, qui envahit les organes hématopoïétiques. Ce processus d'infiltration, diffus et irréversible, caractérise la malignité de la maladie : il s'agit d'une maladie de système.

La cellule lymphoréticulaire décrite pour la première fois en 1952 par Rohr, peut présenter différents aspects morphologiques (Mallarmé et al., 1957) mais caractéristiques de la lignée lymphoïde. Cette cellule mononucléée, intermédiaire entre le lymphocyte et le plasmocyte, présente les particularités d'une cellule sécrétrice du fait de l'aspect très vacuolaire du cytoplasme et des nombreuses granulations accompagnant un système de reticulum endoplasmique très développé.

3 - Modifications biochimiques résultantes : La stimulation de la synthèse d'IgM s'accompagne de troubles métaboliques dus à un double déficit protéique et lipidique, d'autant plus accentué que la maladie progresse. La diminution des protéines circulantes est réelle malgré la protidémie totale augmentée à cause de la macroglobulinémie. Elle concerne les protéines physiologiques pour lesquelles elle peut descendre jusqu'à 14 g/l, et les immunoglobulines normales. De même, un déficit en lipides (cholestérol, lipoprotéines) (Mebazzaa et al., 1970) est observé.

4 - Traitement : L'évolution de la maladie est presque toujours fatale et les cas de régression spontanée sont très exceptionnels.

Le traitement comporte deux aspects :

- symptomatique, tendant à soustraire la macroglobuline de l'organisme : plasmaphérèse ou chimiothérapie utilisant des radicaux soufrés qui exercent une action dissociante sur la macroglobuline;

- de fond, visant à contrôler la prolifération cellulaire : radiothérapie, chimiothérapie et corticothérapie.

B - NOTION DE MONOCLONALITE

Dans l'exposé de notre travail, les IgM pathologiques étudiées seront souvent précédées de l'adjectif "monoclonales", par opposition aux IgM normales "polyclonales". Dans le cas de la macroglobulinémie de Waldenström, la notion de monoclonalité s'applique à la fois à la cellule lymphoïde maligne, à l'origine de la maladie, mais aussi à la macroglobuline détectée dans le sérum. C'est grâce à l'introduction de l'immunoélectrophorèse par Grabar et Williams en 1953, que cette macroglobuline fut identifiée à une population homogène de molécules : les β_2M ou IgM. La monoclonalité de ces molécules est caractérisée par la présence d'un seul type de chaîne légère (λ ou κ) et d'une seule classe ou sous-classe de chaîne lourde. Elle se traduit par l'apparition d'une bande de migration très étroite en électrophorèse.

C - RAPPELS SUR LA DIFFERENCIATION ET LA NATURE DES CELLULES B

Afin de localiser l'origine de l'affection et de corrélérer la prolifération monoclonale d'une cellule néoplasique et le produit terminal

sécrété dans le plasma, nous rappelons brièvement les principaux stades de différenciation d'une cellule B (Fig. 1 ; p.14). La cellule souche lymphoïde donne naissance à une cellule médullaire appelée pré-B, dans laquelle ni IgM de sécrétion, ni IgM membranaire ne sont exprimées. Le stade suivant est celui du lymphocyte B, dépourvu d'IgM intracytoplasmique mais qui présente peu à peu des immunoglobulines de membrane, les premières à apparaître appartenant aux classes M et D. Sous l'influence d'un antigène ou d'un mitogène, avec une collaboration possible des cellules T, le lymphocyte B mûr, ainsi stimulé, prolifère et se transforme en une grande cellule appelée lymphoblaste. Cette cellule donne naissance aux lymphocytes B porteurs de la mémoire immunologique, d'une part, aux plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines, d'autre part.

En conclusion, la bande étroite observée en électrophorèse au cours du développement de la maladie de Waldenström n'est pas constituée de molécules anormales et correspond à la prédominance anormale d'un type moléculaire normal. Il s'agit donc d'une dysglobulinémie et le terme de "paraprotéines" qui les désignait a été abandonné.

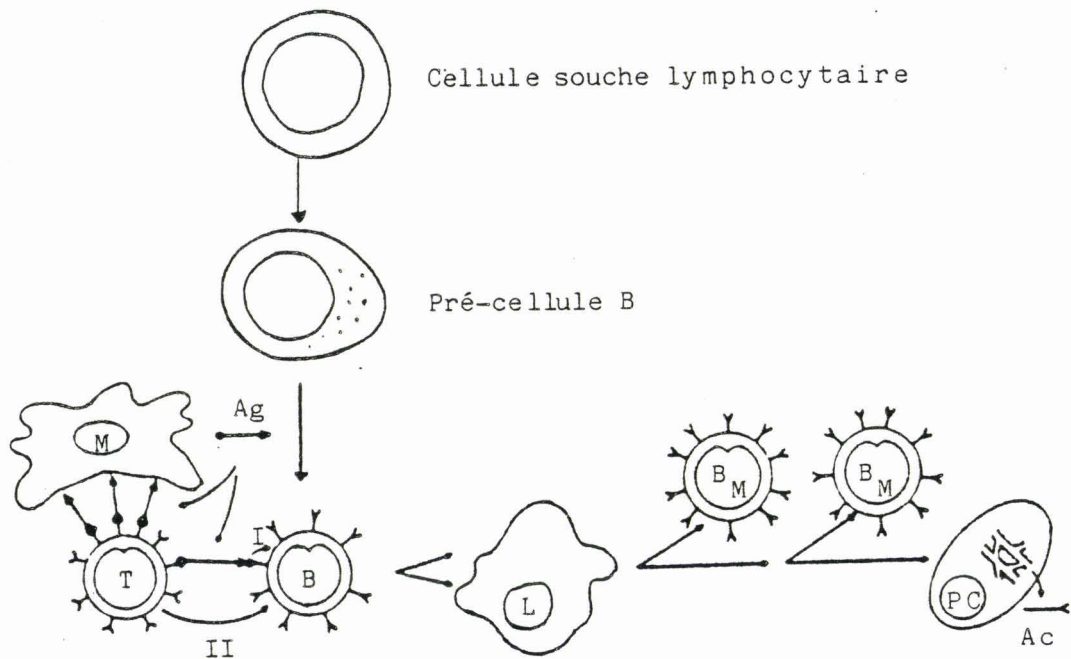


Figure 1 : Prolifération et différenciation des cellules B résultant d'une stimulation antigénique

- (M) monocyte;
- (T) et (B) lymphocytes;
- (L) lymphoblaste;
- (B_M) cellules porteuses de mémoire;
- (CP) cellules plasmatiques;
- (Ag) antigène ; (Ac) anticorps.

CHAPITRE II : STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES M

Dans ce chapitre, nous rappellerons les données générales acquises sur la structure peptidique des immunoglobulines et sur celle des glycanes constitutifs des glycoprotéines, en y incluant les informations récentes concernant, en particulier, la classe des IgM. Une étude conformationnelle des molécules d'immunoglobuline précisera les relations étroites qui existent entre protéine et glycanne.

I - LES CHAINES POLYPEPTIDIQUES

A - LES CHAINES LEGERES

1 - Les deux types λ et κ : Les chaînes légères (L) sont au nombre de 2, de type λ ou κ , selon leurs propriétés antigéniques. Ces 2 types sont communs à toutes les classes d'immunoglobulines et se retrouvent chez tous les Mammifères, mais en proportions variables selon les espèces, par exemple : chez l'Homme, deux tiers des immunoglobulines contiennent des chaînes κ (Maddison, 1972). Une molécule donnée ne possède qu'un type de chaîne légère (L). Ce sont des chaînes peptidiques de petite taille (214 acides aminés) et de poids moléculaire relativement constant : 23 à 25.000 (Fleischman et al., 1963).

2 - Division de la chaîne peptidique en 2 régions V et C : Chaque chaîne légère est subdivisée en 2 régions d'égale longueur : une moitié variable (V_L), N-terminale (résidus 1 à 107)

et l'autre moitié constante (C_L), C-terminale, renfermant les acides aminés 108 à 214 (Fig.2 ; p.17). La séquence complète d'une chaîne légère a été déterminée pour la première fois par Edelman *et al.* en 1969 pour la chaîne κ d'une IgG_1 humaine. Les déterminants antigéniques des chaînes λ et κ sont bien distincts et portés par la région V_L . Les parties constantes sont identiques pour un même type antigénique, mais différentes pour λ et κ . C'est essentiellement dans la zone V_L que les 107 premiers acides aminés varient d'une protéine à l'autre. Cette hétérogénéité se manifeste par l'apparition de multiples bandes lorsqu'un mélange de chaînes légères d'immunoglobulines humaines normales est soumis à une électrophorèse en gel d'amidon à pH alcalin en présence d'urée 8M (Seligman et Klein, 1971).

La division d'une même famille de chaîne L en groupes et sous-groupes a été inévitable après comparaison de la séquence de nombreuses régions variables. C'est ainsi que la chaîne κ a été subdivisée en 3 sous-groupes et la chaîne λ en 5. Köhler *et al.* (1970) ont comparé la séquence des 95 premiers acides aminés de 3 chaînes légères du sous-groupe κ_1 (Fig. 3 ; p.19). La chaîne de référence est une protéine de Bence-Jones (Ag) et les 2 autres appartiennent à 2 immunoglobulines monoclonales : l'IgM Ou et l'IgG Eu. 16 substitutions d'acides aminés sont observées pour l'IgM et 12 pour l'IgG. Des analogies du même ordre ont été démontrées entre espèces telles que l'Homme et la Souris (Stott et Williamson, 1982). Une étude systématique de la fréquence de variabilité des 100 premiers résidus a été effectuée sur de nombreuses chaînes légères humaines, par Kabat *et al.* (1976), et les résultats obtenus, rassemblés en histogrammes de variabilité,

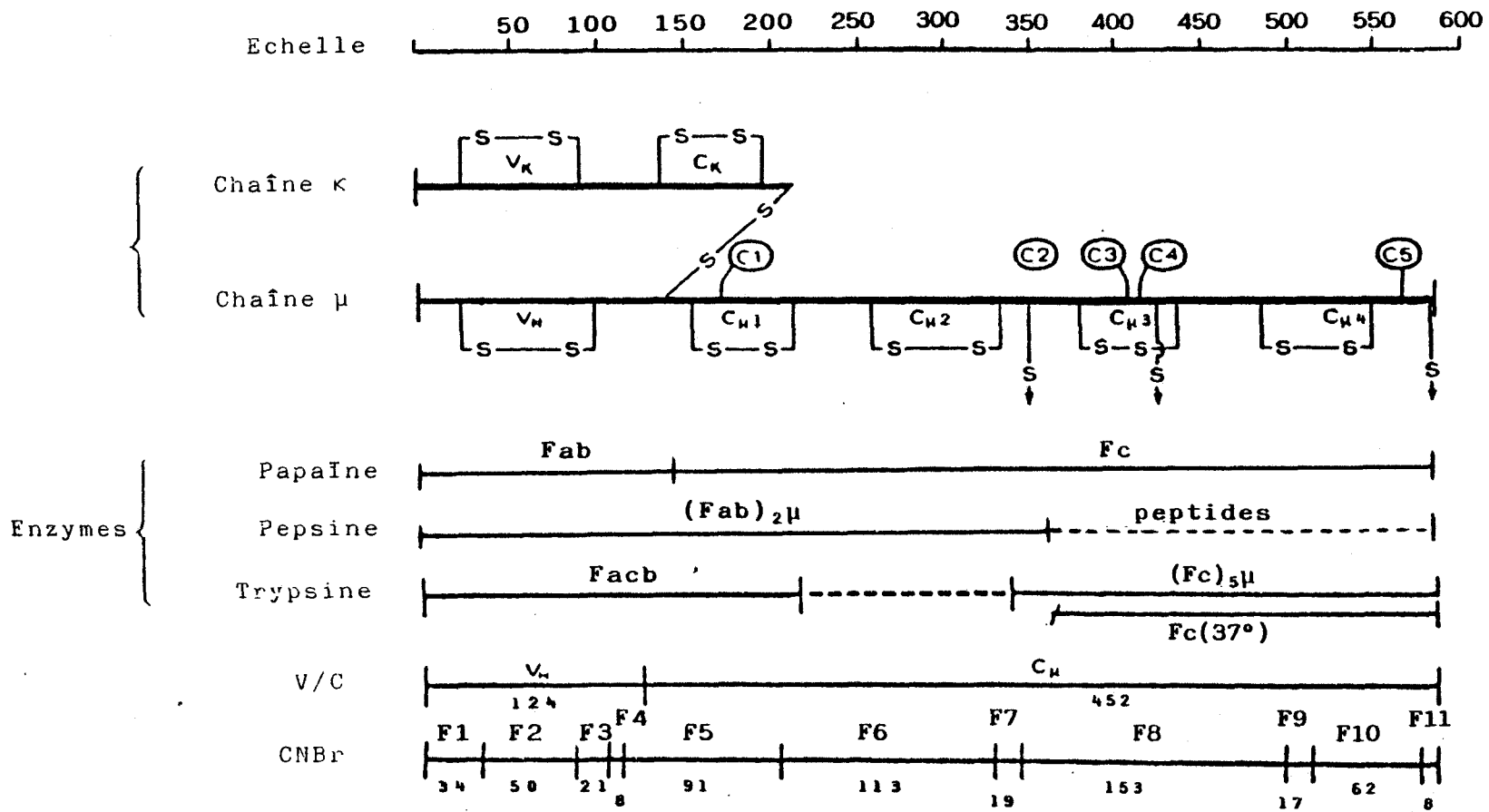


Figure 2 : Structure schématique d'une demi sous-unité de l'IgM Ou (chaîne H+L) (selon Putnam, 1973) .

ont permis de dénombrer 3 zones d'hypervariabilité dans la région V_L , correspondant aux positions 27-34, 50-56 et 91-96. Ces zones sont séparées par des régions pour lesquelles la constance de certains groupements de résidus d'acides aminés permet de définir les sous-groupes de chaînes légères.

B - LES CHAINES LOURDES

1 - Notion de classe d'immunoglobulines :

Les chaînes lourdes (H) sont responsables de la spécificité biologique des immunoglobulines et permettent de définir les 5 classes suivantes selon leur nature : IgG (chaîne γ); IgM (chaîne μ); IgA (chaîne α); IgE (chaîne ϵ) et IgD (chaîne δ). Leur poids moléculaire varie de 55 000 pour les chaînes γ à 80.000 pour les chaînes μ (Fleischman et al., 1963). Ces dernières étant les plus lourdes sont aussi les plus longues, avec 576 acides aminés.

2 - Subdivision en 2 régions V et C : Comme pour les chaînes légères, la subdivision en zone variable, N-terminale (V_H) et en zone constante C-terminale (C_H) existe (Fig.2 ; p.17), mais au profit de la partie constante qui, dans le cas de la chaîne μ , possède quatre fois plus d'acides aminés que la partie variable (452 contre 124). Cette zone, relativement invariable, possède les séquences d'acides aminés caractéristiques de chaque classe d'immunoglobulines, groupées en 4 zones homologues (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}) d'environ 110 résidus et d'un fragment C-terminal composé de 20 résidus (Kehry et al., 1979). La région variable des chaînes lourdes est indépendante de la notion de classe, 3 ou 4 zones hypervariables sont localisées sensiblement aux mêmes emplacements que pour les chaînes légères (Kabat et al., 1976). La séquence complète d'une

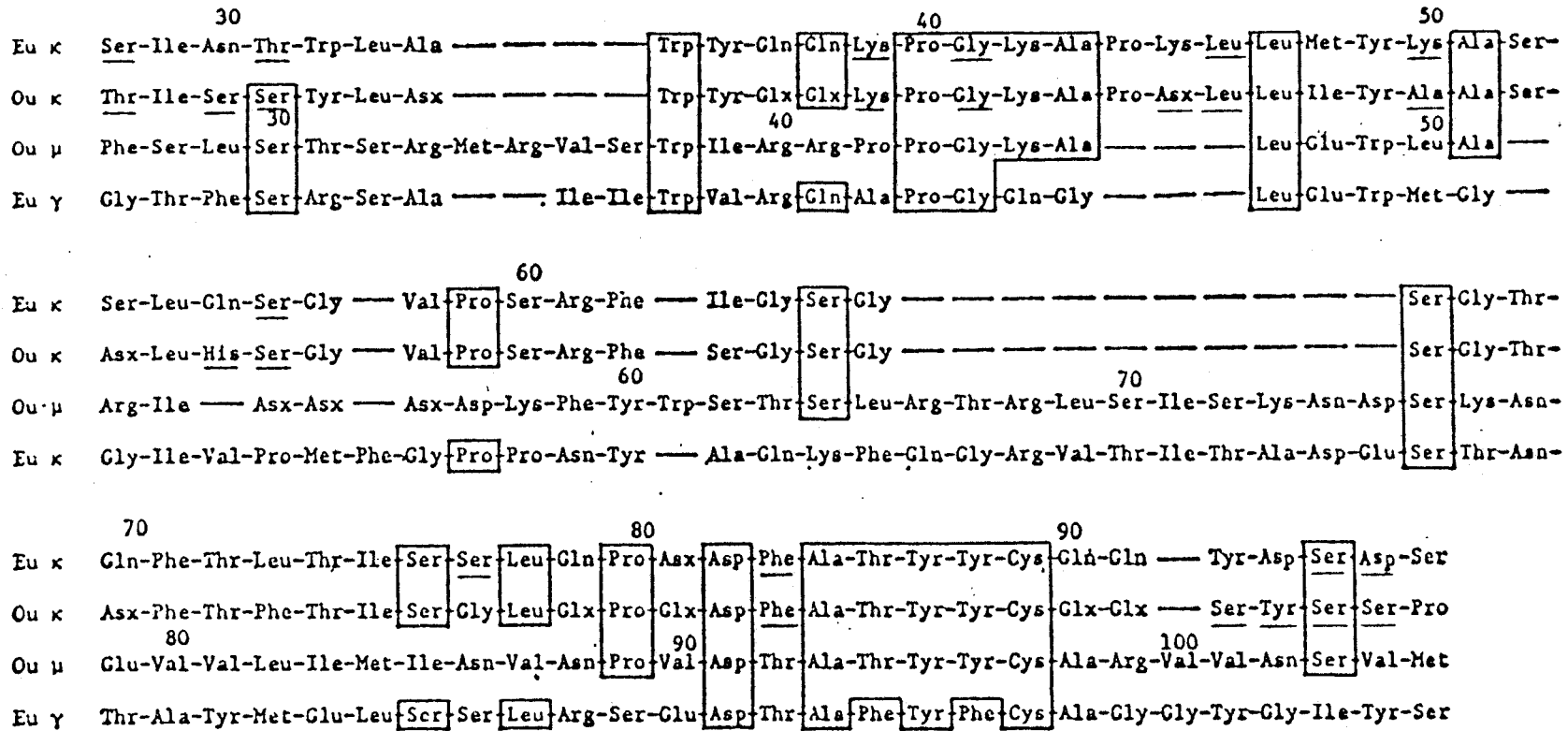


Figure 3 : Comparaison des parties N-terminales des chaînes humaines

- légères : de type κ (Eu et Ou) ;
- lourdes : μ (Ou)
- γ (Eu)
- les acides aminés soulignés correspondent à ceux qui sont différents dans la protéine de Bence Jones prise comme référence.

chaîne μ a été déterminée pour la première fois - avec celle de la chaîne κ qui lui est associée - pour l'IgM humaine Ou, par Putnam et al. en 1973.

a - Zone variable N-terminale . Comme pour les chaînes légères, les termes de groupes et sous-groupes sont utilisés. Köhler et al. (1970), en comparant la séquence des 104 premiers acides aminés des chaînes lourdes de plusieurs immunoglobulines, ont montré que 2 chaînes μ de la même sous-classe possédaient seulement 33% d'identité dans la zone V_H , alors que 2 chaînes de spécificité différente, μ et γ_1 , en possédaient 73%. Cette observation implique que certains sous-groupes de chaînes sont semblables dans leur partie variable à des sous-groupes de chaînes γ . De même, ils ont montré (Fig.3 ; p.19) que les immunoglobulines Ou (IgM) et Eu (IgG), bien que pourvues de nombreuses séquences homologues dans la partie V_L (κ), ne possédaient pas pour autant une identité de structure dans la zone V_H (seulement 30%). Ainsi était démontré le fait qu'il n'y avait pas plus d'homologie de séquence primaire entre les zones variables des chaînes L et H d'une même molécule qu'entre les zones variables de chaînes L et H de molécules différentes.

Des similitudes structurales observées entre IgM d'espèces différentes (Homme et Chien) ont permis à Wasserman et Capra (1977) d'en déduire un degré de conservation très élevé de la séquence V_H III à travers les espèces et un fort pourcentage d'homologie de séquence des parties variables (85 à 90%), l'hétérogénéité due aux régions hypervariables étant exclue.

b - Zone constante C-terminale . La partie C_H des immunoglobulines semble avoir conservé une

homologie de séquence au cours de l'évolution, et principalement la chaîne μ (Marchalonis et al., 1972). La démonstration a été apportée pour l'espèce humaine par Florent et al., (1974) qui ont comparé les séquences C terminales de 4 IgM monoclonales et d'un mélange d'IgM normales. Ils ont observé une similitude entre les différents fragments étudiés ainsi qu'une identité immunologique, ce qui tend à prouver qu'il n'existe pas de sous-classe de la chaîne μ dans cette région. Ces résultats ont été renforcés par ceux de Wasserman et Capra (1978) et de Kehry et al. (1979) qui ont comparé des fragments Fc - obtenus par digestion tryptique à 60°C (voir le paragraphe consacré aux digestions enzymatiques, p.28) - entre différentes espèces de Mammifères. Ils ont constaté qu'il existait un gradient croissant d'homologie structurale de la région C, de la partie N - terminale vers la partie C - terminale. L'équipe de Wasserman a trouvé plus de 82% d'homologie pour les fragments Fc appartenant à des chaînes μ humaine et canine (Fig. 4 ; p.22) avec respectivement : 68% d'homologie entre les résidus 305 et 350; 86% entre les résidus 351 et 450; 85% entre les résidus 451 et 576, et 92% entre les résidus 500 et 576. Kehry et coll. ont comparé les fragments Fc (μ) des espèces humaine, murine et canine, et ont observé que la partie C-terminale était mieux conservée (tableau I ; p.23). Ils ont en outre noté que la constance de certains acides aminés dans la portion Fc, tels que le tryptophane (au nombre de 7 chez la Souris; 8 chez l'Homme, et 5 chez le Chien) et la cystéine (au nombre de 2 chez l'Homme et la Souris et 8 chez le Chien) devait avoir une signification dans le maintien d'une certaine conformation.

C - LA PIECE DE JONCTION

Une troisième chaîne peptidique mise en

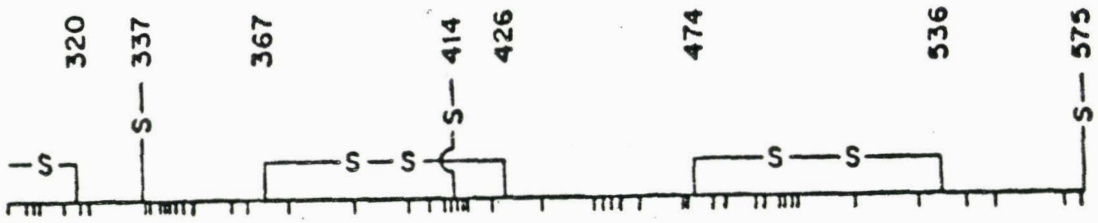


Figure 4 : Homologie de séquence de la partie C-terminale des fragments Fc appartenant aux chaînes μ d'IgM humaine et canine (selon Wasserman et Capra, 1978).
(homologie traduite par les traits verticaux)

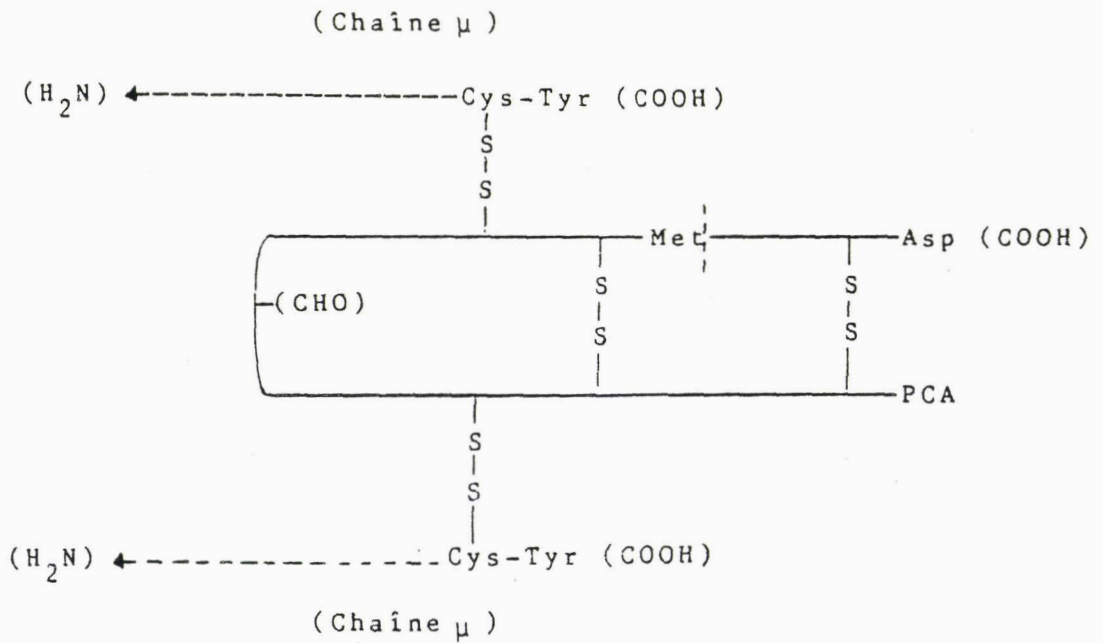


Figure 5 : Site d'attachement de la chaîne γ à la molécule polymérique d'IgM humaine (selon MestECKY et al., 1974) .

TABEAU I

COMPARAISON DES HOMOLOGIES DE MATRICE DES DOMAINES DES CHAINES LOURDES (μ) DE L'HOMME, LA SOURIS, ET DU CHIEN (Selon Kehry *et al.*, 1979)

| Comparaison | V | C _H ¹ | C _H ² | C _H ³ | C _H ⁴ | C-terminal |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| Souris 104E et Humain Ou | 38% 116/116 | 48% 106/106 | 59% 106/106 | 53% 107/107 | 78% 111/111 | 89% 19/19 |
| Chien Moo et Humain Ou | 38% 112/112 | | 69% 36/106 | 79% 107/107 | 79% 111/111 | 89% 19/19 |
| Souris 104E et Chien Moo | 44% 108/108 | | 56% 36/106 | 56% 107/107 | 72% 111/111 | 79% 19/19 |

Les chaînes μ sont divisées en quatre unités d'homologie: C_H¹, résidus 127-232; C_H², résidus 233-339; C_H³, résidus 340-446; C_H⁴, résidus 447-557; et région C-terminale, résidus 558-576; Pour chaque carré :

- le chiffre donné en haut à gauche indique le pourcentage d'homologie;
- en bas, à droite, est précisé le nombre d'acides aminés comparés dans la séquence homologue/sur le nombre d'acides aminés constituant la totalité de l'unité étudiée.

évidence par Halpern et Koshland en 1970 et dont la structure primaire a été déterminée en 1977 (Mole et al.), s'est révélée indispensable à la formation des immunoglobulines polymériques telles que les IgM et les IgA sériques et de sécrétion (Della Corte et Parkhouse, 1973). Elle renferme 129 acides aminés et son poids moléculaire moyen est de 15 600. Bien que synthétisée par les plasmocytes, elle ne révèle aucune homologie structurale avec les chaînes H et L précédemment décrites. Elle possède 2 ponts disulfures intracaténaux et contracte 2 liaisons intercaténaux avec les résidus cystéinyles 575 (avant dernier acide aminé) des chaînes H des IgM (Mestecky et al., 1974). Une représentation en est donnée dans la figure 5; p.22. Du fait de son implication dans l'étape de polymérisation des IgM, la chaîne J "joining chain" semble avoir conservé sa structure à travers l'évolution; la comparaison structurale d'une chaîne J humaine et d'une chaîne J murine par Cann et al. (1982), a révélé 74% d'homologie.

D - L'UNITE STRUCTURALE DES IMMUNOGLOBULINES

Dans toutes les espèces, même les plus primitives, les immunoglobulines possèdent une unité structurale de base symétrique, d'un poids moléculaire d'environ 180 000, constituée de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures (Fig.6 ; p.25) et des liaisons non covalentes. La chaîne μ renferme un grand nombre de résidus de cystéine (14) qui permet la formation de ponts disulfures intracaténaux et intercaténaux. Ces derniers sont, avec les régions homologues décrites précédemment, les éléments les mieux conservés des immunoglobulines au cours de l'Evolution, car ils sont essentiels à la conformation des chaînes peptidiques (voir le paragraphe consacré à la conformation, p.45). La séquence complète de

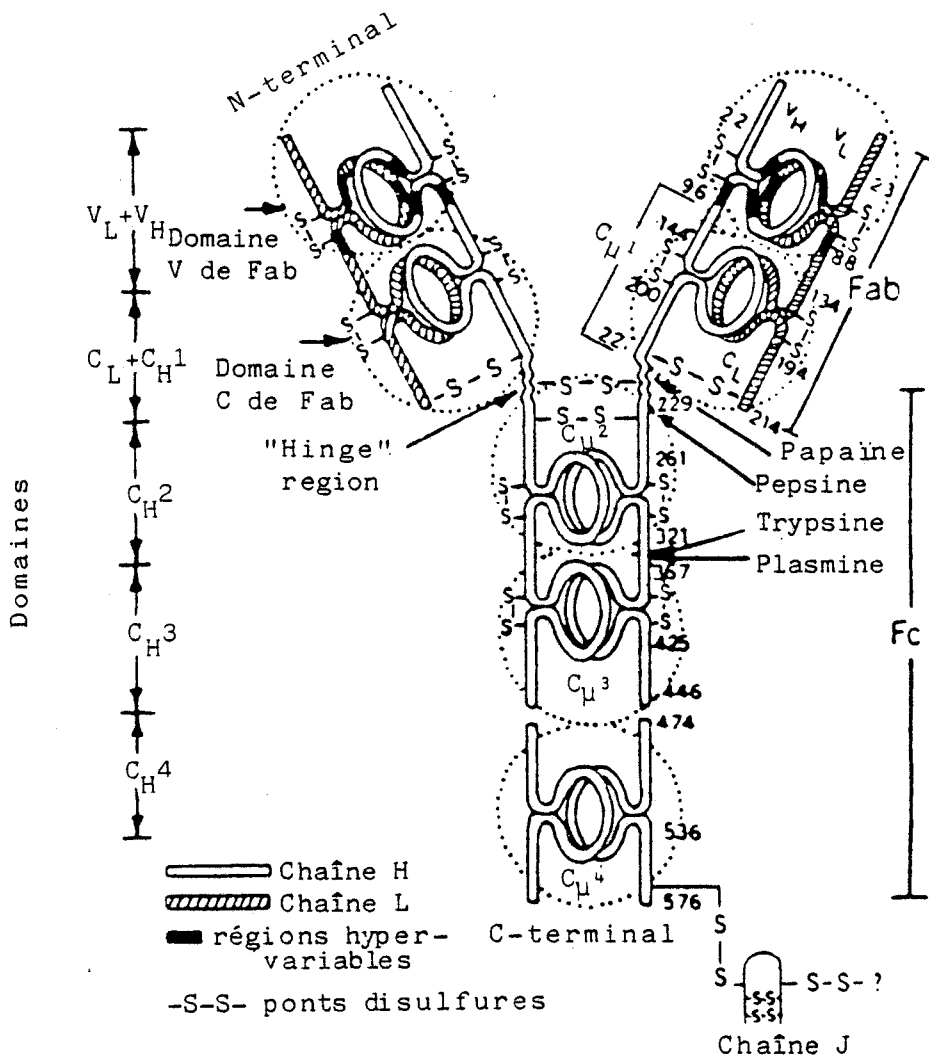


Figure 6 : Unité structurale d'une IgM (selon Winkelhake, 1978)

(Fab et Fc) : fragments papainiques).

l'IgM Ou (Putnam et al., 1973) a permis de localiser les résidus cystéine (Fig.2 ; p.17). Dix d'entre eux sont impliqués dans la formation des ponts intracaténaux délimitant les 5 régions homologues et 4 autres contractent des ponts intercaténaux : 1 entre les chaînes H et L (cystéine 140 : chaîne μ et cystéine 214 : chaîne κ); 2 entre les chaînes H (cystéine 337 et cystéine 414 de part et d'autre) et, le dernier, en position 575, responsable de la polymérisation des IgM. Celui-ci relie l'avant dernière cystéine de la chaîne μ , soit à celle de la chaîne μ d'une autre sous-unité d'IgM, soit à celle de la chaîne J impliquée dans ce phénomène.

E - POLYMERISATION DES IGM

Sauf quelques exceptions concernant le Poisson chat (Acton et al., 1971) et le Xenopus (Parkhouse et al., 1970), pour lesquelles les IgM apparaissent respectivement sous forme de tétramère et d'hexamère, la molécule d'IgM circulante se présente sous forme de pentamère : 5 sous-unités 7S sont associées par des ponts disulfures et maintenues grâce à la pièce de jonction. La figure 7; p.27 représente le modèle de Chapis et Koshland (1974) ou "clasp model". Elle illustre les deux voies possibles de polymérisation des sous-unités monomériques. La première (1) concerne un assemblage de 4 sous-unités via des ponts intercaténaux au niveau C-terminal, suivi de l'addition de la cinquième sous-unité porteuse de la chaîne J, celle-ci contractant, dans une étape finale, une liaison covalente avec la première sous-unité. La deuxième voie (2) diffère au niveau de l'addition de la cinquième sous-unité qui se ferait comme celle des 4 précédentes.

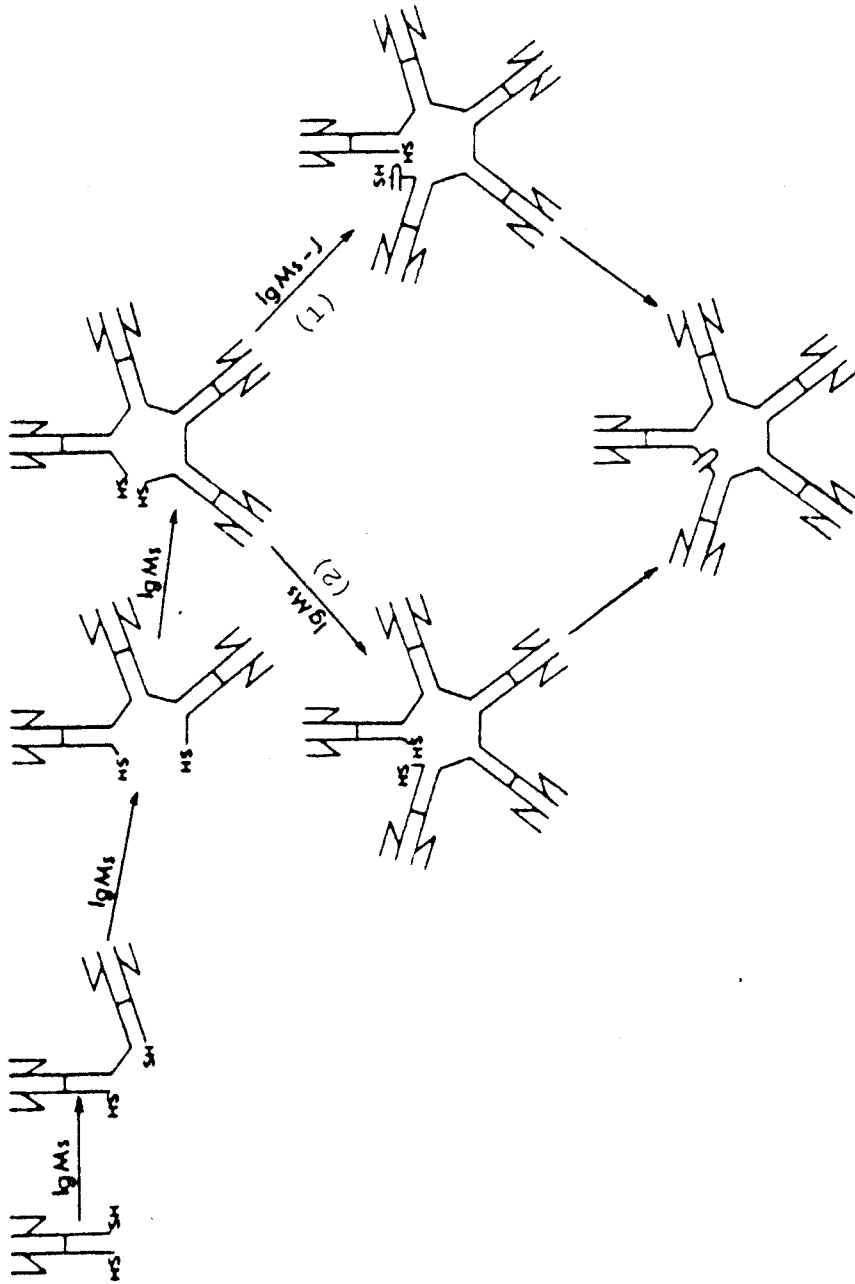


Figure 7 : Polymérisation des IgM selon le modèle de Chapuis et Koshland (1974) ou "clasp model"

- (1) Voie selon laquelle la chaîne J est additionnée avec la cinquième sous-unité;
 - (2) Voie selon laquelle la chaîne J est additionnée dans une phase finale à l'état libre;
- IgM₅ : IgM de sécrétion.

Dans une dernière étape, la chaîne J à l'état libre, se fixerait entre la première et la cinquième sous-unité en établissant des ponts disulfures avec les chaînes μ . Cette deuxième voie serait prédominante.

F - LES ZONES CHARNIERES ET LA SUSCEPTIBILITE
AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Les zones charnières, ainsi appelées car elles sont situées entre des zones homologues compactes, sont plus flexibles et donc plus accessibles aux enzymes protéolytiques. La zone charnière la plus importante, appelée "hinge region", est située entre les zones homologues C_{H1} et C_{H2} . Elle est surtout développée dans les IgA, avec 4 résidus de cystéine et 14 résidus de proline sur 38 résidus, et dans les IgG, avec 3 résidus de cystéine et 5 résidus de proline sur 16 résidus. Elle est plus réduite dans les IgM avec un seul résidu de cystéine et quelques résidus de proline (Putnam et al., 1973). L'action sélective de différentes endopeptidases sur la chaîne μ est rapportée dans la figure 2; p.17. L'hydrolyse papainique d'une sous-unité monomérique effectuée selon Porter (1959), libère 3 fragments de tailles différentes : 2 fragments Fab de PM 50.000 et 1 fragment Fc de PM 80.000. Selon Florent et al. (1974), la trypsine agit spécifiquement à 60°C en coupant la chaîne peptidique entre les résidus d'arginine 325 et de glycine 326, libérant un seul fragment $(Fab')_2$ et un autre fragment $(Fc)_{5\mu}$. L'attaque peptidique (Nisonoff, 1960) au niveau de la chaîne μ produit deux nouveaux fragments $(Fab')_2$ et Fc' . Bien que l'action des protéases soit générale pour toutes les IgM, celles-ci semblent présenter des susceptibilités différentes vis-à-vis de chaque enzyme (Jouanneau, 1978). Ce comportement semble imputable aux caractéristiques mêmes des chaînes μ traitées, les fragments décrits précédemment subissant, dans certains cas, une dégradation poussée en petits fragments peptidiques.

La chaîne peptidique possédant en outre plusieurs résidus de méthionine, peut subir l'action du bromure de cyanogène (Gross, 1967) pour donner de nouveaux fragments analysables pour leur structure primaire. C'est par l'étude séquentielle, grâce à l'utilisation de séquenceurs automatiques, de cette collection de fragments, et par divers recoupements que des séquences primaires de chaînes peptidiques entières comprenant jusqu'à 576 résidus ont pu être établies. Ensuite, des comparaisons entre séquences ont été effectuées et, aux erreurs d'expérimentation près, des structures homologues ont été mises en évidence entre espèces différentes.

II - LES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES

A - CLASSIFICATION DES GLYCANNES EN 2 GROUPES

suivant le type de liaison (O- ou N-glycosidique avec la protéine).

Les immunoglobulines contiennent les mêmes constituants monosaccharidiques que la plupart des autres glycoprotéines plasmatiques : la N-acétylglucosamine, le mannose, le galactose, le fucose, l'acide N-acétylneuraminique et, beaucoup plus rarement, la N-acétylgalactosamine. Cela laisse supposer que les chaînes oligosaccharidiques sont liées aux chaînes polypeptidiques par les deux types de liaisons covalentes glycanne-protéine actuellement distinguées :

- les liaisons de type O-glycosidique, alcalilabiles,
- les liaisons de type N-glycosidique, alcalistables.

Les unités oligosaccharidiques des immunoglobulines appartiennent au groupe des isoglycannes ou glycannes ramifiés par opposition aux n-glycannes ou glycannes

linéaires, tels qu'on les trouve dans les protéoglycannes (Montreuil, 1974). Pour une classification des structures correspondantes, voir les revues de Montreuil (1975; 1980a; 1982), de Kornfeld et Kornfeld (1976; 1980), d'Horowitz et Pigman (1977; 1978) et de Strecker et Montreuil (1979).

1 - Glycannes liés O-glycosidiquement : Ce type de glycanne peu représenté parmi les immunoglobulines et jamais observé dans la classe d'IgM, sera brièvement décrit. Il concerne deux types de glycoprotéines selon la nature du résidu d'acide aminé lié à la fraction glucidique :

a - Liaison glycanne-hydroxylysine (ou hydroxyproline). Ce type de liaison concerne les glycoprotéines constitutives du collagène, dans lesquelles l'acide aminé est substitué par un résidu de galactose ou par le disaccharide Glc(α 1-2)-Gal (Butler, 1978).

b - Liaison glycanne-sérine (ou thréonine). Elle est le plus fréquemment rencontrée dans les mucines (Gottschalk, 1972) mais aussi dans de nombreuses autres glycoprotéines. C'est la N-acétylgalactosamine qui est très souvent engagée dans la liaison avec l'acide aminé. Les chaînes glycaniques observées présentent une grande hétérogénéité : elles peuvent être très simples comme le glycanne [Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-3)-Ser] rencontré dans une IgA sérique humaine (Baenziger et Kornfeld, 1974 a,b), ou très complexes, avec addition de résidus de galactose et d'acide N-acétylneuraminique comme l'ont montré Pierce-Crétel et al. (1981) dans des IgA de sécrétion du lait de femme.

2 - Glycannes liés N-glycosidiquement : Les glycannes de ce type possèdent un noyau pentasaccharidique

commun lié par un résidu de N-acétylglucosamine via une liaison β -glycosylaminique à 1 résidu d'asparagine de la chaîne polypeptidique. C'est le seul type de branchement actuellement caractérisé pour les protéines N-glycosylées. Sur ce noyau constant se greffe une fraction glycanique variable sous forme de branches externes appelées "antennes" (Montreuil, 1974).

a - Le noyau pentasaccharidique interne.

Il est invariable et résulte de l'association d'un mannotriose et du di-N-acétylchitobiose selon la structure présentée dans la figure 8a ; p. 32 .

b - La partie variable ou substitution du noyau. Selon la nature des motifs oligosaccharidiques fixés aux résidus mannose 4 et 4', on distingue :

α - les glycannes de type oligomannosidique ou simples : lorsque le substituant est uniquement du mannose; le nombre de résidus peut varier de 3 à 9 et leur mode de branchement peut se faire en position C-2, C-3 ou C-6 sur le mannose terminal (voir la revue générale de Cohen et Ballou (1980) et la figure 8b; p. 32).

β - les glycannes de type N-acétyllactosaminique ou complexes, bi, tri, tétra et pentaantennés, sont formés par la substitution en position C-2, C-4 et/ou C-6 des mannoses 4 et 4' du noyau pentasaccharidique par respectivement 2,3,4 et 5 unités N-acétyllactosaminiques [β Gal 1-4 β GlcNAc] (Fig. 8c; p. 32). Sur ces structures de base, peut s'ajouter un nombre variable d'unités N-acétyllactosaminiques liées en β -1,3, de résidus de

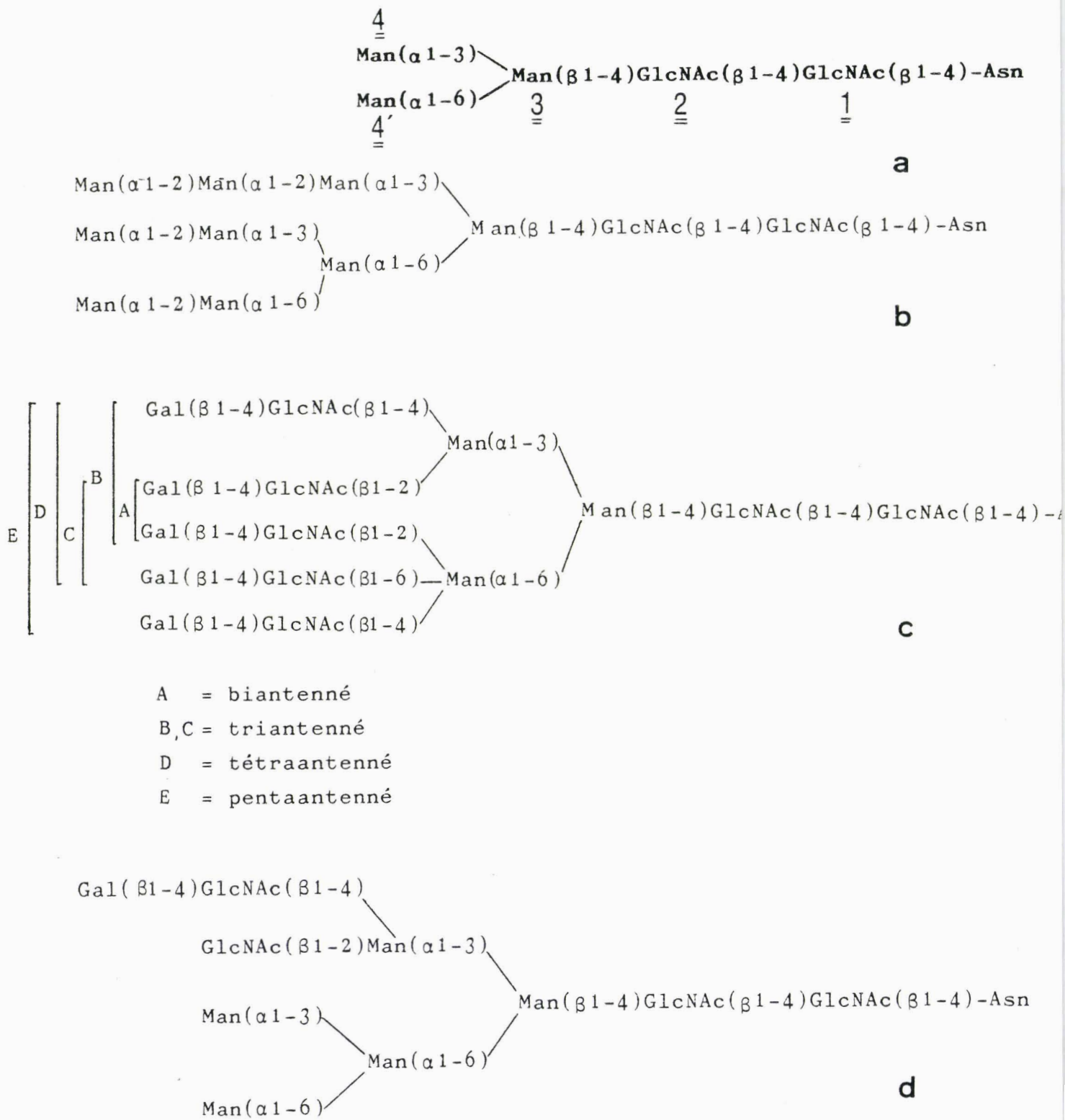


Figure 8 : Les différents types de structures glycaniques

galactose, d'acide sialique et/ou de fucose, selon les règles de substitution bien précises (voir le paragraphe consacré à l'addition séquentielle des monosaccharides et aux exclusions mutuelles entre résidus p. 69).

γ - les glycanes de type mixte ou hybride : ils constituent un compromis entre les deux types précédemment décrits. Un exemple est donné (Fig.8 d; p.32) pour le glycopeptide GP-I de l'ovalbumine dont la structure a été déterminée par Yamashita et al.(1978).

B - CARACTERISTIQUES DES CHAINES GLYCANNIQUES DES IMMUNOGLOBULINES

Les immunoglobulines constituent une famille de glycoprotéines très variée dont la répartition sérique est très différente d'une classe à l'autre. Elles se distinguent par leur teneur en glucides : 2 à 3% pour les IgG, 5 à 10% pour les IgA, 8 à 12% pour les IgM, 11% pour les IgD et 10% pour les IgE (Clamp et Johnson, 1972). L'hétérogénéité s'étend à la nature et à la distribution de leurs chaînes glycaniques. Seules les IgA (Baenziger et Kornfeld, 1974 a,b) et les IgD (Clamp et Johnson, 1972) contiennent les deux types de liaisons O- et N-glycosidiques. Les trois autres classes possèdent des oligosaccharides exclusivement liés N-glycosidiquement. Parmi ces derniers, le type complexe est prédominant, les structures oligomannosidiques n'étant observées que dans les IgM (Chapman et Kornfeld, 1979 a,b), les IgE (Rearick *et al.*, 1983) et les IgD (Ishihara *et al.*, 1983).

1 - Séquence peptidique "signal" de glycosylation : Le "séquen" :

a - Son unicité. En dépit de cette disparité dans la répartition des glycanes, un point leur

est commun : leur site de fixation sur la chaîne polypeptidique; il s'agit d'un tripeptide contenant le résidu d'acide aminé avec lequel l'oligosaccharide contracte une liaison covalente. Dans le cas des glycanes liés N-glycosidiquement, la séquence triplet contenant l'asparagine sur laquelle se fixe la N-acétylglucosamine est la suivante : Asn-X-Ser/Thr (Marshall, 1972). Dans cette séquence X représente n'importe quel acide aminé, exceptée la proline et Ser/Thr signifie que l'un peut remplacer l'autre.

b - Facteurs influençant sa glycosylation.

La conjugaison d'un glycanne se fait spécifiquement sur ce site, mais la présence de ce dernier n'est pas toujours suffisante pour déclencher la glycosylation. Hunt et Dayhoff (1970) ont constaté que 65% des séquons présents dans une glycoprotéine étaient glycosylés. Un exemple en est donné par l'étude de la séquence primaire de chaînes λ appartenant à 2 immunoglobulines : Ha (Shinoda et al., 1970) et Bo (Wikler et Putnam, 1970), possédant respectivement le triplet (Asn-Gly-Thr) et (Asn-Asp-Thr); aucune n'a révélé de trace de glycosylation. Des travaux récents tendent à prouver la nécessité d'une coexistence d'un site éventuel de glycosylation (triplet) et d'un microenvironnement (séquence primaire et conformation) conféré par la chaîne polypeptidique pour qu'il y ait glycosylation. Glabe et al. (1980) ont évalué à 30, pour l'ovalbumine, le nombre minimal d'acides aminés du côté C-terminal permettant la glycosylation d'un site situé sur la chaîne en cours d'élongation. Cette séquence minimale correspondrait à la longueur de la chaîne peptidique nécessaire pour traverser la bicouche phospholipidique membranaire du reticulum endoplasmique rugueux. L'influence directe de la conformation de la chaîne peptidique sur la glycosylation de l'asparagine 312 a été démontrée, en outre :

à l'état natif, le site est inaccessible aux glycosyltransférases alors que la dénaturation de la chaîne polypeptidique lève l'inhibition. Cela semble s'expliquer par le fait que beaucoup de sites de glycosylation sont localisés dans des coudes de structure β , de la chaîne protéique (Beeley, 1977). Anderson et Grimes (1982) ont démontré, pour 1 IgM monoclonale de Souris, qu'il existait un gradient de maturation des chaînes glycaniques décroissant de la partie N- vers la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique.

c - Les limites de sa variabilité.

L'intégralité de la séquence "signal" ne serait pas toujours requise pour qu'il y ait fixation des glycanes. En 1979, Kehry et al., en étudiant la séquence primaire d'1 IgM canine, ont observé la présence d'un glycanne de type oligomannosidique, près de la zone hypervariable h_{V_2} de la chaîne μ , au niveau de l'asparagine 57. La séquence du site de fixation est la suivante : (Asn-Gly-Gly-Thr). La nature de l'acide aminé substituant ceux du triplet de base (Ser/Thr) semblerait cependant influencer la positivité de la réaction car les mêmes auteurs ont montré que la substitution du résidu sérine par 1 méthionine n'entraînait pas de glycosylation.

2 - Les sites de fixation des glycanes

sur les chaînes peptidiques : La plupart des immunoglobulines sont glycosylées sur la partie constante de leurs chaînes lourdes. Cependant, la présence de glycanes sur certaines chaînes légères a été rapportée par Spiegelberg et al. (1970), Sox et Hood (1970) et plus récemment par Jouanneau (1978). Sox a affirmé que 15% des chaînes légères étudiées appartenant à des molécules monoclonales étaient glycosylées

sans relation apparente avec le type de la chaîne L ni celui de la chaîne H qui lui est solidaire. Dans tous les cas, le site responsable de cette glycosylation se situe dans la partie V_L . Le nombre de sites de glycosylation varie selon la classe d'Ig : il est par exemple de 1 pour les IgG et le plus souvent de 5 pour les IgM (Shimizu et al., 1971). Un exemple de leur localisation est donné, Fig. 2 ; p. 17 pour 1 IgM. La pièce de jonction J qui intervient dans la polymérisation des IgA et des IgM est, elle aussi, glycosylée (Niedermeier et al., 1972) : elle contient 7,5% de monosaccharides assemblés en une chaîne glycanique localisée sur l'asparagine 43 (Mole et al., 1977). Sa composition est précisée dans le paragraphe suivant.

C - CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES GLYCANNES CONSTITUTIFS DES IGM

C'est grâce au développement relativement rapide, depuis ces dix dernières années, des méthodes d'études structurales des chaînes oligosaccharidiques, qu'actuellement la structure primaire de plus d'une centaine de glycanes est établie, et les immunoglobulines n'échappent pas à cet essor. Trois principales périodes se dégagent dans l'obtention de ces résultats :

1 - Période de localisation des sites de glycosylation : Cette première période coïncide avec la détermination des structures primaires des chaînes peptidiques des immunoglobulines. En plus de la caractérisation chimique des oligosaccharides, par colorimétrie et chromatographie en phase gazeuse (voir revues générales : Montreuil et Spik, 1963;1967), une localisation exacte des sites de glycosylation était rendue possible grâce aux différents procédés de détermination des séquences peptidiques.

- En 1968, Davie et Osterland ont distingué deux groupes, parmi les 8 IgM monoclonales étudiées, fondés sur leur composition en monosaccharides : le groupe I avec une teneur moyenne de 10,69% et le groupe II avec une teneur de 7,7%.

- En 1971, les mêmes auteurs étudient les sites de fixation des glycanes d'une IgM appartenant au groupe I : ils en localisent deux sur la chaîne H et un autre sur la chaîne L.

- Toujours en 1971, Shimizu et al. identifient 5 sites de fixation des oligosaccharides sur la partie constante de la chaîne μ d'une IgM humaine monoclonale Ou (Fig. 2 ; p. 17) ; les glycopeptides C_1 , C_2 , C_3 correspondent à des structures complexes comportant tous les monosaccharides, alors que les deux autres, C_4 et C_5 , ne contiennent que du mannose et de la N-acétylglucosamine.

- En 1973, Putnam et al. élucident pour la première fois la séquence primaire complète de l'IgM Ou et confirment la localisation des 5 glycanes avancée en 1971.

- En 1973, Hurst et al. obtiennent les mêmes résultats pour l'euglobuline Dau : 5 sites de fixation avec 2 glycopeptides simples du côté C-terminal et 3 glycopeptides complexes sur la partie Fc restante.

- Plus tard, Florent et al. (1974) et Kehry (1979) ont démontré qu'il existait une analogie dans les sites de fixation des glycanes sur les chaînes peptidiques μ entre les espèces humaine, canine et murine.

2 - Apogée des méthodes classiques de détermination de structure :

- La première structure fut proposée en 1972 par Hickman et al. Elle concerne un glycanne complexe biantenné, fucosylé, et plus ou moins sialylé (Fig.9a ; p.38). Ce résultat a été obtenu grâce à la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse, de la perméthylation suivie

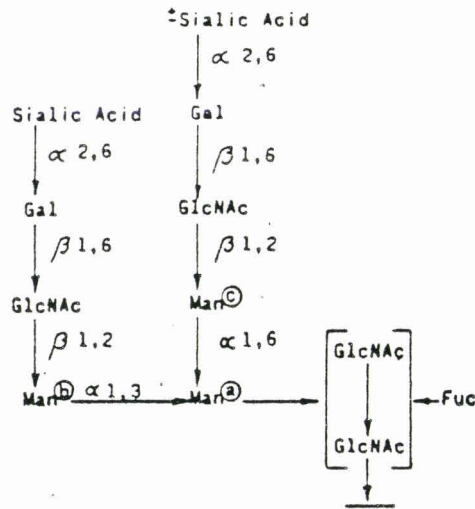


Figure 9a : Structure de type biantenné décrite dans une IgM monoclonale par Hickman et al. (1972).

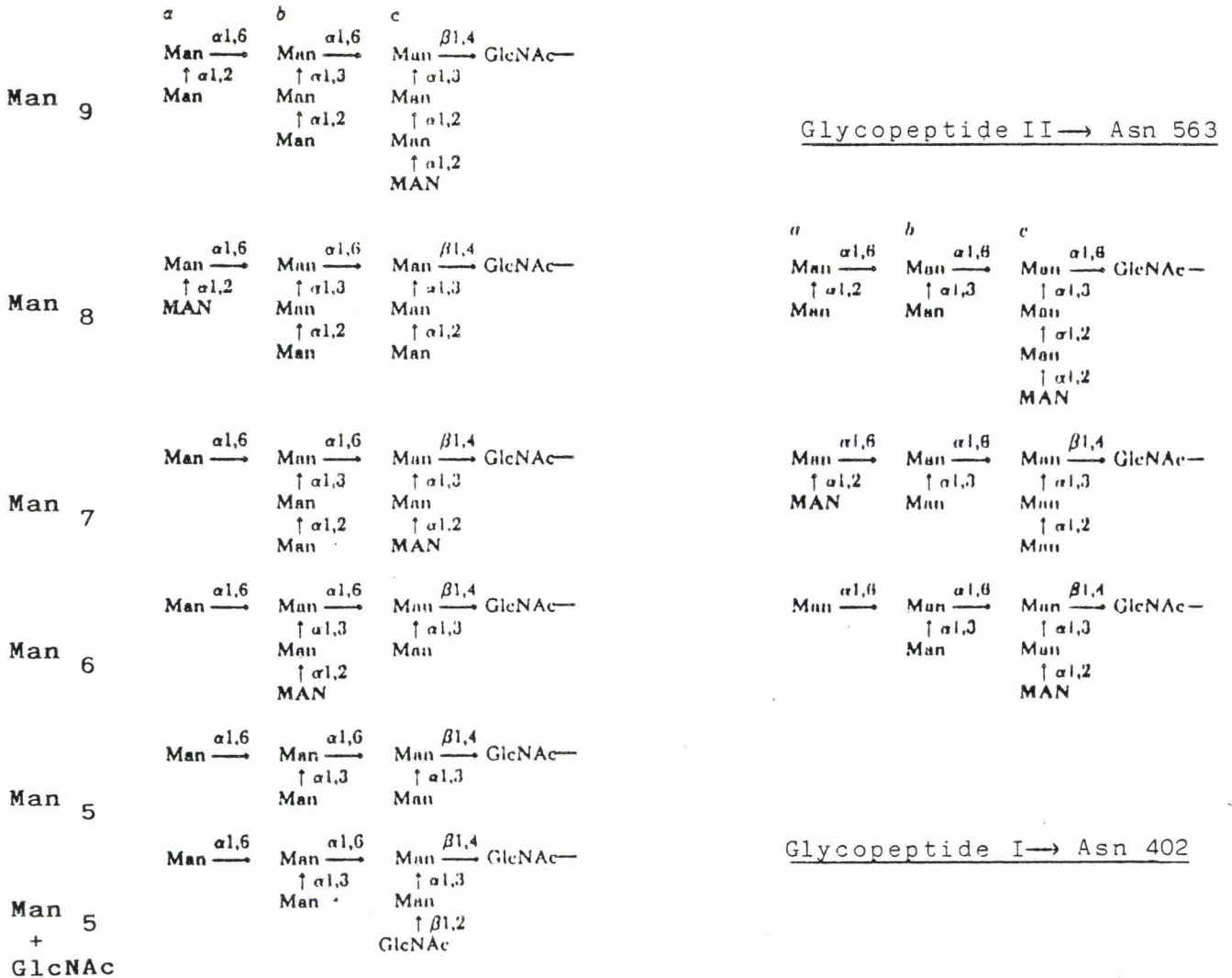


Figure 9b : Structures oligomannosidiques décrites dans l'IgM monoclonale (Wa) par Chapman et Kornfeld (1979a).

d'une analyse en spectrométrie de masse, de l'oxydation périodique, et des dégradations récurrentes par les exoglycosidases spécifiques.

- En 1979, Chapman et Kornfeld donnent la structure primaire des glycopeptides de type oligomannosidique isolés d'une IgM monoclonale Wa. Ils observent une hétérogénéité due au nombre de résidus de mannose qui varie de 4 à 9, et identifient une structure intermédiaire comprenant 5 résidus de mannose et 1 de N-acétylglucosamine fixé sur un mannose externe (Fig.9b p.38).

- 1979 est aussi l'année où Baenziger a établi la structure de l'oligosaccharide constitutif de la chaîne J (Fig.10; p.40). Il s'agit d'une structure biantennée, non fucosylée, dont l'hétérogénéité est liée à la quantité d'acide N-acétylneuraminique.

- En 1980, Brenckle et Kornfeld ont étudié les oligosaccharides d'une IgM murine provenant d'un plasmocytome; en plus des oligomannosides et du glycanne bi-antenné qu'ils avaient déjà observés dans une IgM humaine, ils ont isolé un glycanne triantenné, mono-fucosylé et disialylé.

- En 1981, Jouanneau et al. ont décrit dans l'IgM monoclonale Du, un glycopeptide de type oligomannosidique contenant 10 résidus de mannose dont 5 sont liés en α -1,2.

3 - Développement de la résonance magnétique nucléaire : L'adaptation des méthodes classiques d'étude à des microquantités de produit, en particulier la mise au point de la méthode de micro-méthylation par Paz Parente et al.(1984 a) a permis l'étude structurale de matériaux purifiés en quantité très faible. Mais, c'est surtout la technique de résonance magnétique nucléaire du proton à 360 ou à 500 MHz

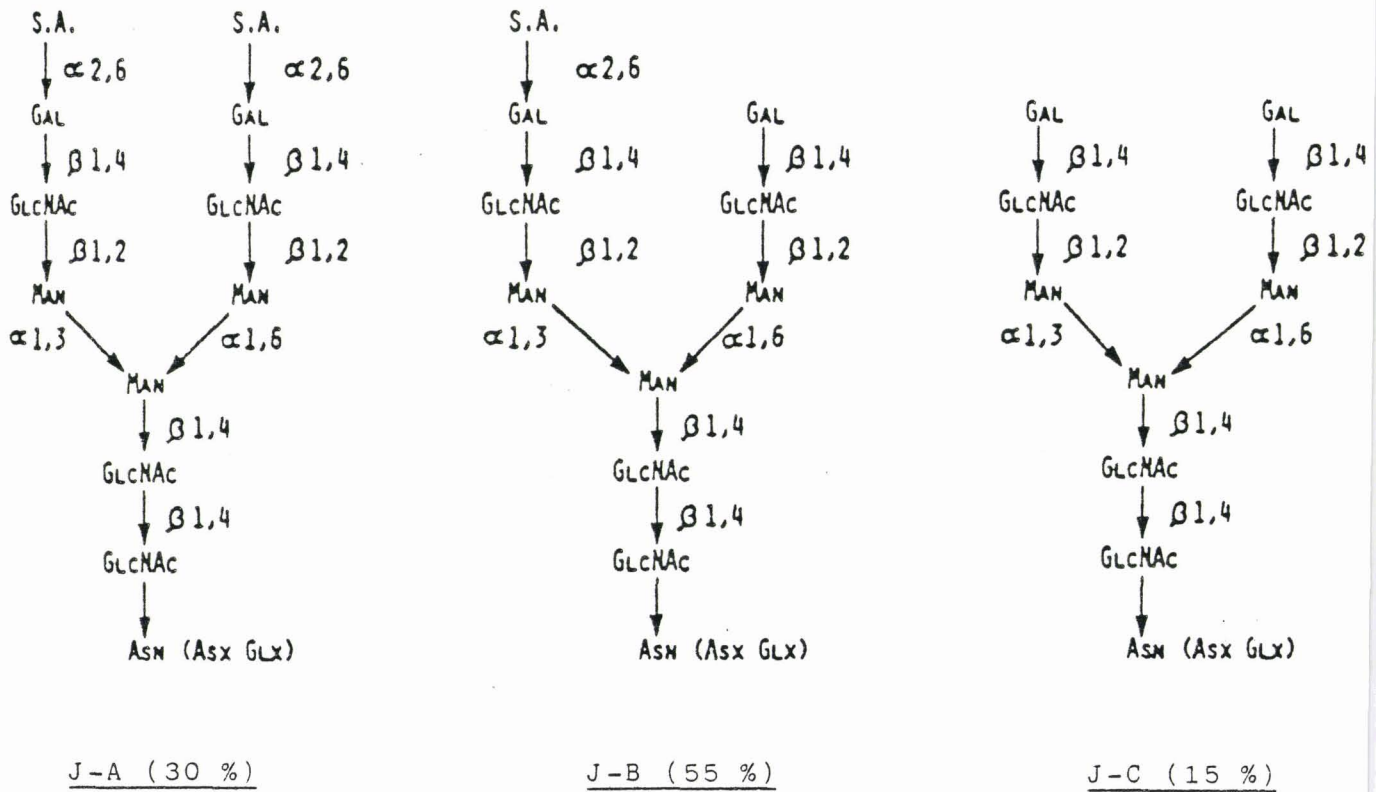


Figure 10 : Structures des différents variants glycaniques constituant la chaîne J d'une IgM humaine (Selon Baenziger, 1979)

qui a fourni d'importants résultats depuis quelques années. En outre, elle est applicable à de faibles quantités de produit, à condition que ce dernier soit absolument pur, et permet de le récupérer après analyse pour le recycler dans d'autres voies. En ce qui concerne les IgM, cette méthode a principalement été appliquée aux glycanes de type oligomannosidique (Cohen et Ballou, 1980; Van Halbeek et al., 1981b). Son application à certaines structures complexes fait partie de notre travail et sera exposée dans la partie "Travaux Personnels" (p.217).

En conclusion de cette revue bibliographique des travaux concernant les chaînes glycaniques des IgM humaines, réalisés depuis une quinzaine d'années, nous constatons que peu de structures différentes ont été décrites jusqu'à présent malgré l'hétérogénéité structurale proclamée par la plupart des auteurs. Les figures 9; p.38, et 10; p.40 , rassemblent les structures glycaniques observées chez les IgM de l'espèce humaine. Seul le type oligomannosidique semble relativement bien exploré car tous les stades de maturation ont été détectés. En ce qui concerne les structures N-acétyllactosaminiques, les informations sont plus réduites puisque seul un glycanne complexe de type biantenné, avec une hétérogénéité due au fucose et à l'acide N-acétylneuraminique, a été décrit (Hickman 1972).

III - CONFORMATION DES IGM ET LOCALISATION DES GLYCANNES

Sa structure tétracaténaire confère une certaine conformation à la sous-unité d'IgM. En réalité, cette conformation définitive est la résultante d'interactions précises entre la partie protéique et la partie glucidique car nous avons vu qu'au cours de l'Evolution, la molécule avait conservé des séquences homologues d'acides aminés et des sites de fixation d'oligosaccharides.

A - NOTION DE DOMAINE

1 - Hypothèse émise par Edelman (1969) :

Après avoir rapporté la séquence primaire intégrale des chaînes légères et lourdes d'une IgG humaine (Eu), Edelman a observé :

- que la portion constante de la chaîne H contenait 3 régions homologues de taille similaire et chacune homologue à la région constante de la chaîne L,
- que les chaînes H et L supportaient un arrangement linéaire parfait, entraînant une correspondance sur l'une et l'autre des ponts intracaténaires disposés périodiquement, et des résidus de cystéine contractant les ponts intercaténaires.

D'après ces observations, il a émis l'hypothèse que la structure tridimensionnelle des régions homologues devait constituer un domaine compact et porteur au minimum d'un site actif.

2 - Définition d'un domaine : L'hypothèse d'Edelman repose, à l'origine, sur l'homologie des séquences d'acides aminés et sur la symétrie de la

molécule; mais d'autres observations vont venir la renforcer d'un point de vue conformationnel. En 1970, Bourgeois et Fougereau ont montré que les deux ponts disulfures intracaténares des chaînes légères délimitaient des boucles peptidiques renfermant une soixantaine d'acides aminés. Certaines contraintes structurales ont été mises en évidence par plusieurs auteurs : elles concernent en particulier, la constance des sites de fixation des chaînes glycaniques sur la chaîne polypeptidique (Torano et al., 1977 et Debüire et Putnam, 1982) et la limitation des points d'attaque par les enzymes protéolytiques. Une définition un peu plus large peut donc être donnée d'un domaine : il s'agit d'une structure globulaire compacte constituée d'une seule région homologue (segment d'environ 110 acides aminés), stabilisée par un pont disulfure et possédant sa propre conformation.

Le nombre de domaines est de 2 (V_L et C_L) pour les chaînes légères de type λ ou κ ; il est de 4 pour les chaînes lourdes γ , α et δ (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) et de 5 pour les chaînes μ ($+ C_{\mu 4}$) (Putnam et al., 1973) et les chaînes ϵ ($+ C_{\epsilon 4}$) (Bennich et al., 1974).

3 - Structure d'un domaine : La structure d'un domaine a été établie par Poljak et al. (1973) pour une IgG1. Il occupe le volume d'un parallélépipède d'environ $40 \times 25 \times 25 \text{ \AA}$; il comprend deux feuillettes parallèles constitués chacun de segments peptidiques anti-parallèles de structure β plissée, reliés entre eux par des segments variables de structure plus ou moins organisée (Fig.11, p. 44). Les deux plans ainsi formés sont reliés par un pont disulfure intracaténaire et délimitent une zone intérieure hydrophobe. La continuité entre deux domaines sur la même chaîne est assurée par des fragments peptidiques inorganisés. Lorsqu'ils sont fixés au niveau

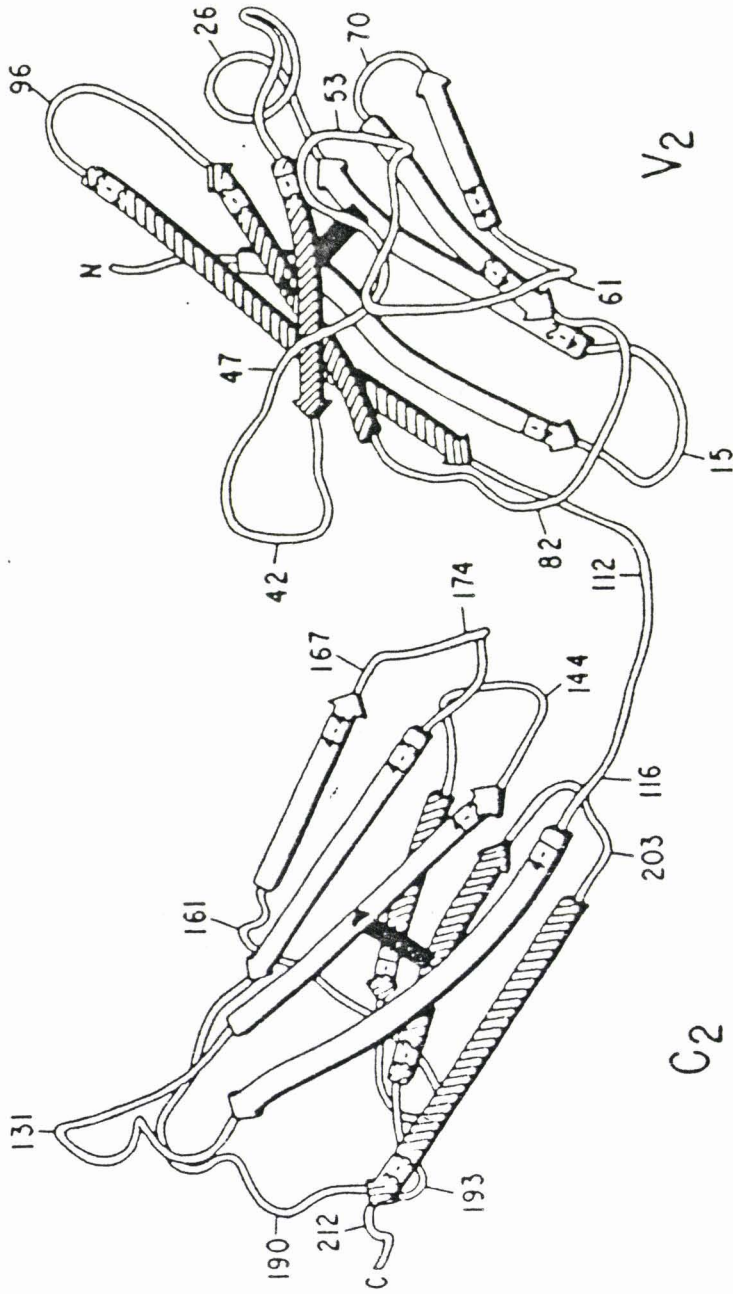


Figure 11 : Représentation des deux domaines contigus V et C d'une chaîne légère (selon Edmundson et al., 1976)

Structure tridimensionnelle établie par diffraction aux RX;

(C₂) domaine constant;

(V₂) domaine variable.

d'un domaine, les glycanes, du fait de leur hydrophilie, sont situés à l'extérieur de la zone délimitée par le domaine.

Plusieurs domaines équivalents, comparés dans des Ig différentes, ont révélé des similitudes structurales (Padlan et Davies, 1975; Colman et al., 1976). Prenant en considération ces observations et les résultats des analyses séquentielles d'acides aminés exposés précédemment, une conservation importante des structures tridimensionnelles des domaines est observée au cours de l'évolution, même dans les parties variables de la molécule. Par contre, une certaine diversité apparaît dans l'arrangement des différents domaines dans l'espace moléculaire.

B - CONFORMATION DES IGM

Les premières études conformationnelles des Ig sont dues à la complémentarité des méthodes chimiques (détermination de séquences, marquage par affinité) et des méthodes physiques (microscopie électronique, dispersion optique rotatoire et dichroïsme circulaire). Ce n'est cependant que depuis quelques années que la technique d'analyse cristallographique par diffraction des rayons X, et encore plus récemment la résonance magnétique nucléaire (RMN) à deux dimensions, ont permis d'obtenir des modèles de structure atomique tridimensionnelle, représentatifs des immunoglobulines.

1 - Structure quaternaire d'une sous-unité d'immunoglobuline : Les premiers travaux ont été effectués sur les fragments résultant de protéolyses enzymatiques et principalement le fragment Fab (Poljak et al., 1976). Une même structure globale

a été retenue après l'examen de fragments provenant de plusieurs classes d'Ig, c'est à dire un arrangement tétraédrique de sous-unités homologues liées covalentement en paires (V_L à C_L et V_H à C_H^1) par une zone linéaire étirée appelée "switch region".

Mais c'est surtout grâce à la possibilité d'étudier la molécule intacte que des progrès ont été réalisés, en particulier pour la molécule d'IgG parce qu'elle est la plus simple et peut être considérée comme la sous-unité de base. Elle apparaît comme une structure compacte avec peu de liberté intramoléculaire de rotation : la flexibilité est limitée à la zone charnière entre les fragments Fab et le fragment Fc, avec une amplitude de 113 à 170° (Silverton et al., 1977) pour l'angle formé entre les deux fragments Fab (correspondant aux formes respectives en "Y" et en "T") et aux zones interdomaines responsables des interactions entre les domaines. D'une chaîne à l'autre, les domaines sont appariés (sauf les domaines C_H^2) (Fig. 12a ; p.47) grâce à des liaisons non covalentes. Ce sont les interactions latérales qui sont les plus importantes; les interactions longitudinales réduites assurent à la molécule un "minimum de désordre" (Huber et al., 1976).

Les sucres jouent un rôle central dans la conformation des Ig (Fig. 12 b ; p.47) : ils établissent un contact principal avec et entre les domaines C_H^2 et interviennent dans l'interaction entre fragments Fc et Fab en empêchant à leur interface un contact direct entre les domaines C_H^1 et C_H^2 . Des études récentes combinant la diffraction aux rayons X (Warin et al., 1979), la RMN à double dimension (Brisson et Carver, 1983a) et les calculs exo-anomériques selon le modèle de la sphère compacte (Bock et al., 1982), ont montré que les glycanes adoptaient des conformations préférentielles en solution. Ces conformations dépendent de l'orientation des antennes (Montreuil, 1980a,b; 1982; 1983 a,b,)

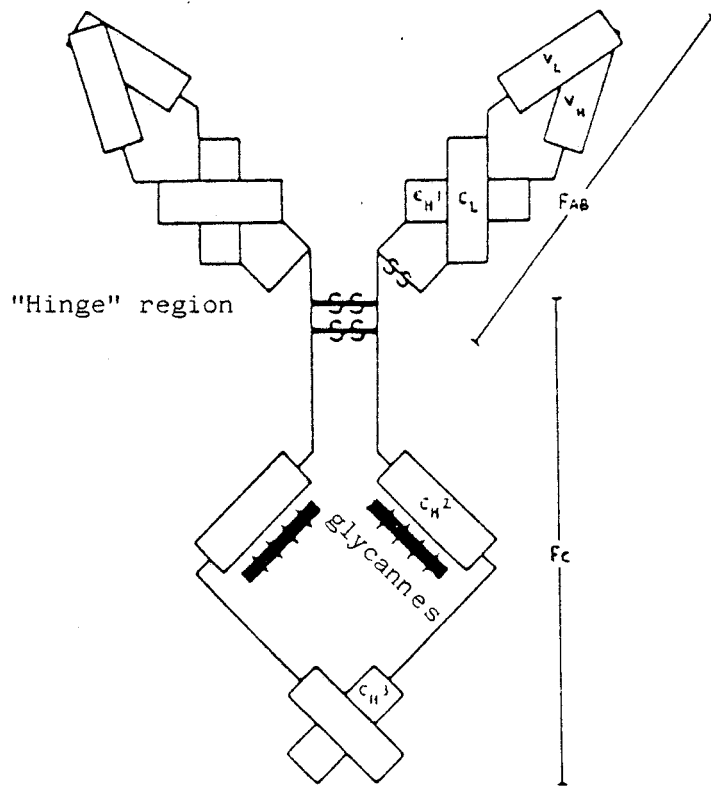


Figure 12a: Modèle proposé par Marquart et Deisenhofer (1982) pour la sous-unité de base d'une IgG (tous les domaines sont arrangés en paires exceptés les domaines C_H2).

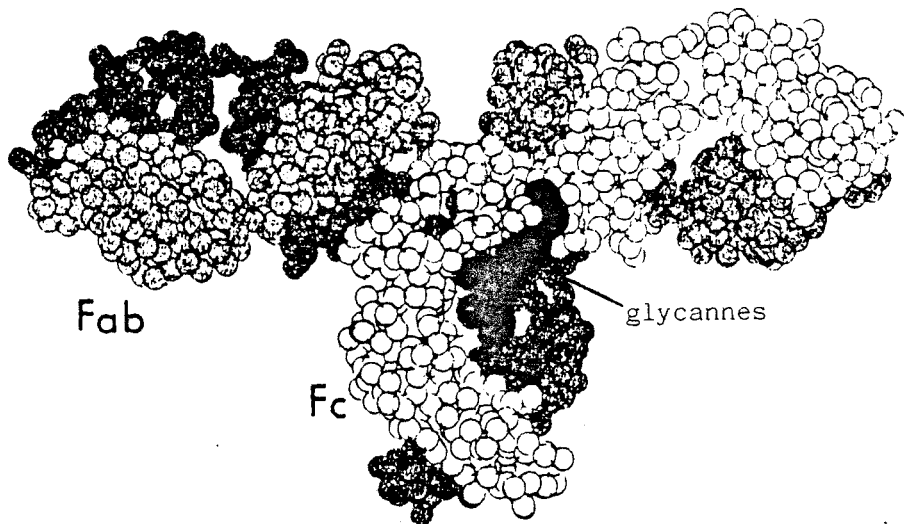


Figure 12b : Modèle proposé par Silvertown et al. (1977) pour l'IgG Dob
- chaînes lourdes: en blanc et gris foncé;
- chaînes légères: en gris clair.

par rapport au trisaccharide terminal $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ qui est plan et rigide. La rigidité des antennes liées en $\alpha-1,3$, postulée depuis 1975 (Montreuil), a été démontrée expérimentalement (Warin et al. , 1979; Homans et al. , 1982; Rademacher et al. , 1983); Warin et al. ont montré par diffraction aux rayons X que le résidu $\text{Man } \alpha-1,3$ est disposé perpendiculairement au plan formé par le trisaccharide (Warin et al. , 1979). La flexibilité du glycanne revient donc entièrement à la possibilité de rotation dans l'espace de l'antenne liée en $\alpha-1,6$ (Davoust et al. , 1981). Fondées sur ces observations, trois conformations principales ont été obtenues (interconvertibles en solution selon Douy et al. , 1980) en créant toutes les liaisons hydrogène possibles thermodynamiquement à partir d'un modèle moléculaire de base : celui du glycanne biantenné de la séro-transferrine humaine. Il s'agit des conformations en Y (Montreuil, 1975), en T (Montreuil et al., 1978) et en "oiseau" (Montreuil, 1980 b). Sur la base de cette dernière structure tridimensionnelle, la construction d'un modèle moléculaire pour un glycanne tetraantenné a été proposée et qualifiée de conformation en "ombrelle" par Montreuil (1980 b). Selon ce modèle, les quatre antennes sont disposées perpendiculairement à un même plan, mais parallèlement à la surface protéique. Cette hypothèse a été confirmée, depuis, par les travaux de Bock et al. (1982) et ceux de Li et al. (1983) sur l' α_1 -glycoprotéine acide.

Récemment, Carver (communication personnelle) a proposé la conformation en "oiseau blessé" pour rendre compte de la structure biantennée contenant 1 N-acétylglucosamine "intercalaire" liée en $\beta-1,4$ sur le mannose 3 du noyau pentasaccharidique. La présence de ce résidu supplémentaire de N-acétylglucosamine entraînerait une

retombée de l'antenne liée en α -1,6 le long du trisaccharide terminal.

Les modèles décrits permettent de préciser, par comparaison de la taille et de la surface des glycanes à celles de la protéine, que les unités lactosaminiques sont très étalées et largement répandues dans l'espace de façon à recouvrir la protéine (Montreuil, 1983 a); elles ne présentent aucune interaction.

2 - Structure quaternaire d'une IgM : Les IgM possèdent un domaine supplémentaire $C_{\mu}4$; le domaine $C_{\mu}3$ correspondrait au domaine $C_{\gamma}2$ des IgG et le domaine $C_{\mu}2$ n'ayant pas d'équivalent chez les IgG serait remplacé par la zone charnière qui est en effet très développée chez les IgG et les IgA qui ne possèdent que trois domaines dans la région constante. Dans le cas des IgM, ce sont donc les domaines $C_{\mu}3$ qui n'ont aucun contact entre eux. Grâce à l'étude cristallographique par diffraction aux RX, et en s'inspirant du modèle établi par Deisenhofer et al. (1976), Feinstein et al. (1976) ont proposé un modèle pour les IgM : les domaines $C_{\mu}4$ forment un anneau central compact et symétrique (Fig.13a; p. 50). En 1980, Wilhelm et al. ont obtenu par la même technique, pour l'IgM monoclonale Gal en solution, un modèle étoilé (Fig.13 b; p. 50); il s'agit d'un corps géométrique : les bras Fab des cinq monomères sont arrangés régulièrement aux coins d'un dodécagone régulier. Ces deux modèles se ressemblent et confirment les images obtenues en microscopie électronique (Shelton et Smith, 1970; Feinstein et al. , 1971).

La flexibilité de la molécule d'IgM est très difficile à évaluer, mais le fait que de faibles changements dans la conformation des fragments Fab soient sensibles sur les courbes de dispersion de densité électronique,

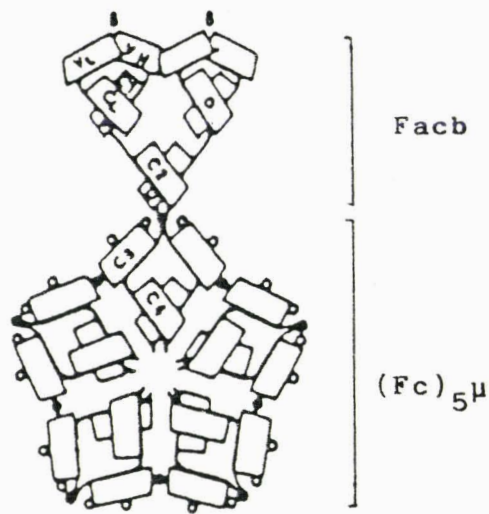


Figure 13(a) : Modèle proposé par Feinstein et al. (1976) pour les fragments Facb et (Fc)₅μ, après cristallographie aux RX.

- : ponts disulfures intercatenaires;
- : sites d'attachement des chaînes glycaniques;
- ◻ : domaines délimités par les chaînes polypeptidiques (les domaines C_μ₃ ne sont pas appariés).

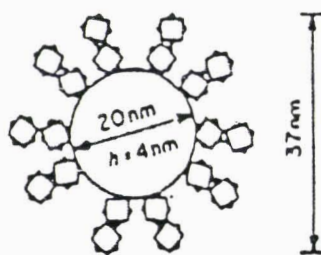


Figure 13 (b) : Modèle étoilé obtenu par diffraction aux RX d'une IgM monoclonale (Gal) (selon Wilhelm et al., 1980).

prouve qu'il y a des orientations préférentielles des fragments Fab. Zagjansky (1975) a observé une augmentation de la flexibilité des Ig au cours de l'Evolution des espèces. Il a émis l'hypothèse que, en vue de la survie des espèces, une sélection pouvait se faire au cours de l'Evolution moléculaire; l'augmentation de la flexibilité des Ig, facilitant l'interaction d'un anticorps polyvalent avec différents antigènes, en serait un exemple.

C - LOCALISATION DES GLYCANNES DANS LES IMMUNOGLOBULINES

La figure 14 ; p. 52 , selon Torano et al. (1977) et Debuire et Putnam (1982), rapporte qu'au cours de l'évolution des espèces, il y a eu à la fois préservation de la séquence triplet acceptrice des glycanes, et conservation des sites de fixation de ces unités oligosaccharidiques (7 positions dénombrées par Torano) sur les chaînes peptidiques lourdes:

- conservation entre classes d'Ig : bien que les Ig humaines diffèrent par le nombre et la nature de leurs glycanes, les sites de fixation sont souvent homologues;
- conservation entre espèces animales (cf. paragraphe précédent): Barker et Dayhoff (1980) expliquent ces homologies par une origine ancestrale commune des chaînes H. Un gène commun aurait subi au cours de l'Evolution trois phénomènes de duplication indépendants, donnant naissance aux quatre domaines. Les chaînes les plus courtes γ et α auraient perdu le segment génomique correspondant au second domaine.

IV - CONCLUSIONS

Les immunoglobulines, de par leur taille importante, (PM approchant le million pour les IgM) présentent

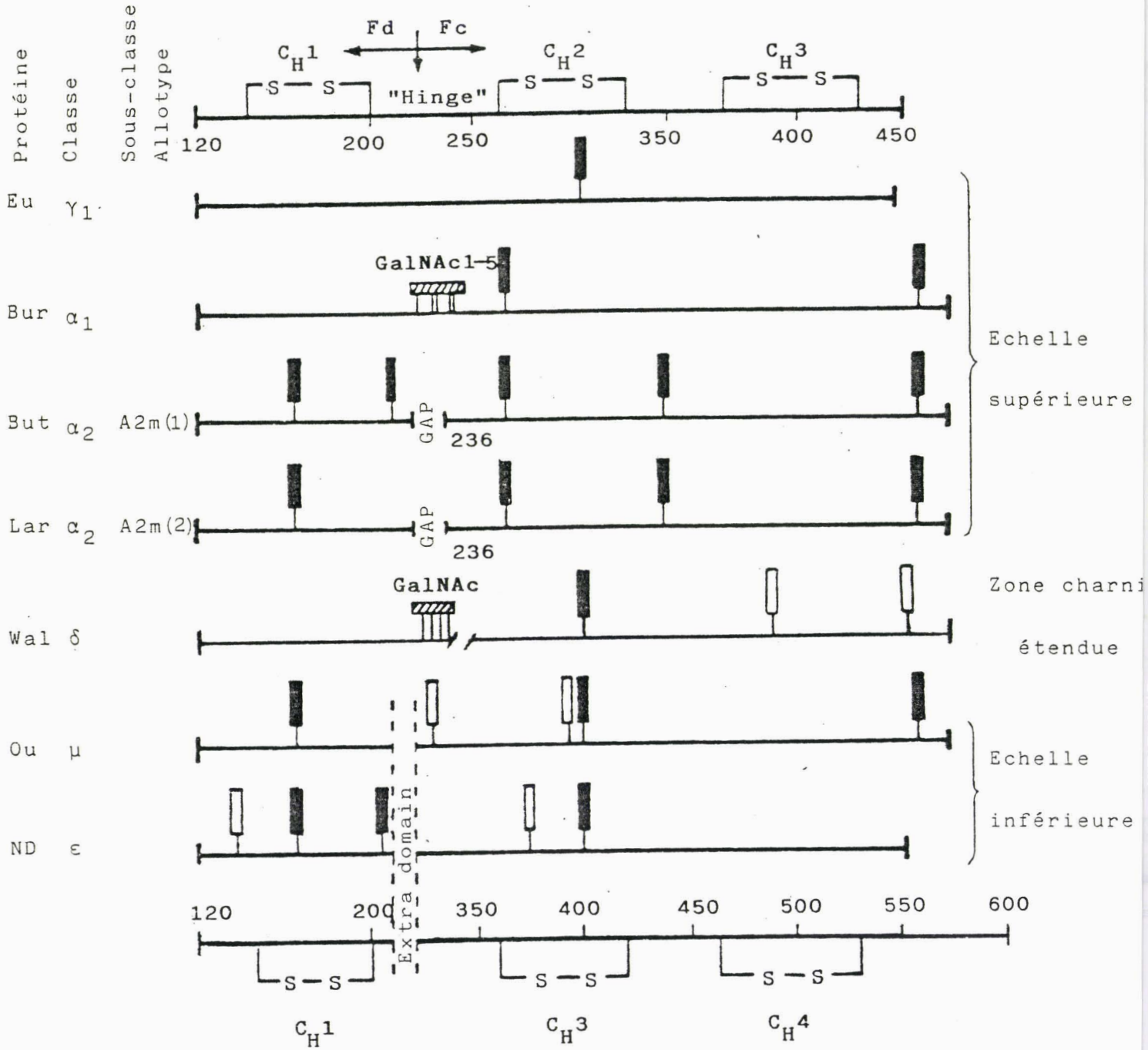


Figure 14 : Localisation des glycanes sur les chaînes lourdes des différentes classes d'IgM (d'après Torano *et al.*, 1977, et Debuire et Putnam, 1982)

■ → Glycanes conservés dans 2 ou plusieurs chaînes.

une grande hétérogénéité structurale. Paradoxalement, cette complexité n'est qu'apparente car au cours de l'Evolution, un certain nombre d'homologies ont été conservées entre espèces à l'intérieur d'une même classe d'Ig, mais aussi entre classes d'Ig, concernant :

- la partie protéique : c'est la notion de domaines et la quasi constance du "séquen" correspondant au site de fixation des glycanes;
- la partie glycanique : c'est la limitation du nombre de structures différentes et surtout l'invariabilité de la séquence glycanique du point d'attache sur la chaîne polypeptidique.

Une dualité remarquable est attribuable aux deux composantes de la molécule d'Ig :

- pour la partie protéique, une partie variable N-terminale et une partie constante C-terminale;
- pour la fraction glycosylée, une partie constante près du point d'attache et une partie variable à la périphérie des chaînes oligosaccharidiques.

Toutes ces observations structurales contribuent à une meilleure compréhension des étapes de la synthèse, elle aussi très complexe, de ces molécules. La présence de nombreuses homologies permet d'envisager la mise en oeuvre de mécanismes biosynthétiques communs ainsi que l'exercice de fonctions biologiques semblables.

CHAPITRE III : BIOSYNTHESE DES IMMUNOGLOBULINES M

Du fait de leur dualité de nature, protéique et glucidique, les immunoglobulines sont synthétisées en 2 étapes principales :

- la première concerne l'élaboration des chaînes polypeptidiques,

- la deuxième constitue la phase de glycosylation des chaînes; les oligosaccharides fixés en des sites définis ne peuvent, en effet, être synthétisés qu'ultérieurement.

I - BIOSYNTHESE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES

Elle consiste en un déchiffrement du code génétique contenu dans une séquence génomique et comprend les 3 étapes interdépendantes de réplication, transcription et traduction.

A - DUALITE V ET C : ORGANISATION MOLECULAIRE DES GENES

Qu'aucune homologie de structure n'ait été observée entre les régions V et C implique qu'elles sont codées par 2 gènes différents. Il y a une dizaine d'années, quand les études structurales commençaient à se développer, les immunologistes pensaient que la diversité structurale observée pour les anticorps se traduisait au niveau génomique par la présence d'une multitude de gènes adjacents codant pour les parties V et C. Cela rendait difficilement compte de la constance de la partie

C par rapport à la variabilité de la partie V. En 1965, Dreyer et Bennett ont émis l'hypothèse que les régions V et C étaient codées séparément, qu'il y avait plusieurs gènes pour la région variable et un seul pour la région C, celui-ci pouvant s'associer à n'importe lequel des gènes codant pour la région V. En 1976, grâce à l'essor des techniques d'études séquentielles de l'ADN (hybridation et utilisation des endonucléases de restriction), Hozumi et Tonegawa ont confirmé l'hypothèse de Dreyer-Bennett et ont prouvé que les 2 zones V et C étaient codées par 2 gènes différents correspondant à des fragments d'ADN distants dans les cellules embryonnaires. Ces fragments sont associés au cours de la différenciation cellulaire des lymphocytes B par une série de recombinaisons spécifiques produisant une unité de transcription.

B - RECOMBINAISON SOMATIQUE : FORMATION DU GENE ACTIF V-C (voir la revue générale de Rabbits, 1983)

Le premier modèle d'organisation avant et après l'expression d'un locus codant pour la chaîne λ de Souris, a été donné en 1978 par Brach et al. (Fig.15 ; p.56). C'est le modèle le plus simple, mais adaptable aux loci plus complexes qui n'en diffèrent que dans le détail. Des séquences-signal inhérentes à ce modèle sont les substrats des enzymes médiateurs de l'expression du génôme et sont déchiffrées dans un ordre bien défini.

1 - Assemblage V-J

a - Pour les chaînes légères. La région variable d'une chaîne L comprend 108 acides aminés, or les séquences d'ADN étudiées, codant cette région, correspondent à la traduction des 95 premiers résidus. En

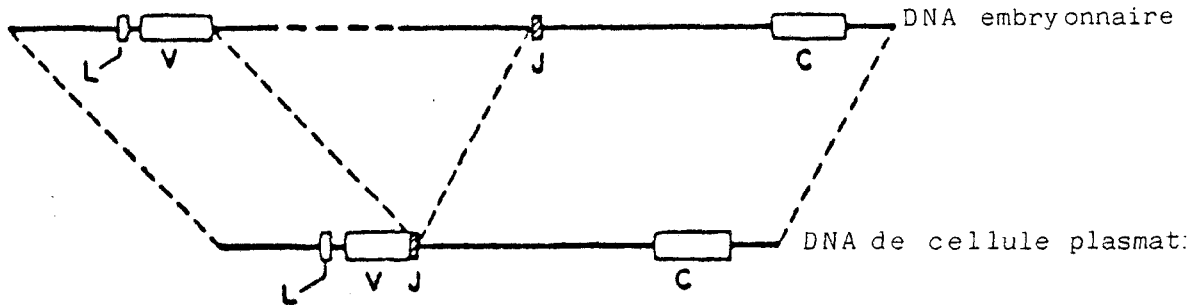


Figure 15 : Organisation des gènes codant pour une chaîne λ de Souris (d'après Brack *et al.*, 1978)

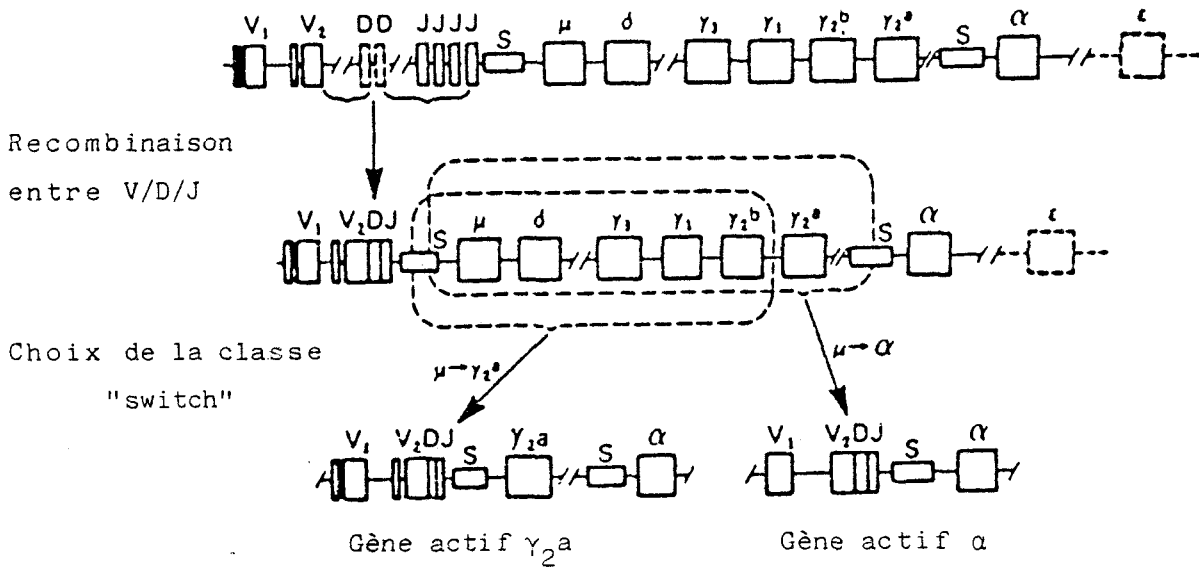


Figure 16 : Organisation des gènes V-C codant pour les chaînes lourdes.

1979, Sakano et al. ont découvert le segment d'ADN codant pour le reste de la partie V (96-108) en étudiant l'organisation du génôme d'une chaîne κ de Souris. Ils l'ont désigné segment J et ont démontré que la jonction entre les segments V et J (résultat d'une recombinaison et de l'excision d'un fragment d'ADN) constituait le signal nécessaire à l'association V-C.

b - Pour les chaînes lourdes. Le même phénomène est observé pour les chaînes lourdes avec cependant la découverte d'un gène supplémentaire : le gène D (Early et al., 1980) qui code la zone correspondant à la troisième région hypervariable (résidus 102 à 106). La séquence 1-101 correspond à la traduction du gène V et la zone 107-123 à celle du gène J.

2 - Assemblage V-C = gène actif : L'assemblage terminal V-C constituant l'unité active de transcription implique de nombreux phénomènes de recombinaisons. Dans le cas des chaînes lourdes, le processus se complique au niveau du choix de la classe synthétisée (Fig.16 ; p.56). Une séquence signal S serait impliquée, provoquant, dans une étape finale de maturation du lymphocyte, une orientation de la synthèse vers les chaînes γ , α ou ϵ aux dépens de la chaîne μ qui est exprimée initialement. Ces signaux S seraient constitués par des séquences de bases répétitives (Kataoka et al., 1980).

C - DIVERSITE DES STRUCTURES ET REGULATION DE LA BIOSYNTHESE

1 - Diversité des structures : Elle s'explique par les nombreuses possibilités de recombinaisons entre les gènes de structure pour constituer l'unité de transcription. Un exemple est donné (Fig.17 ; p.58) de

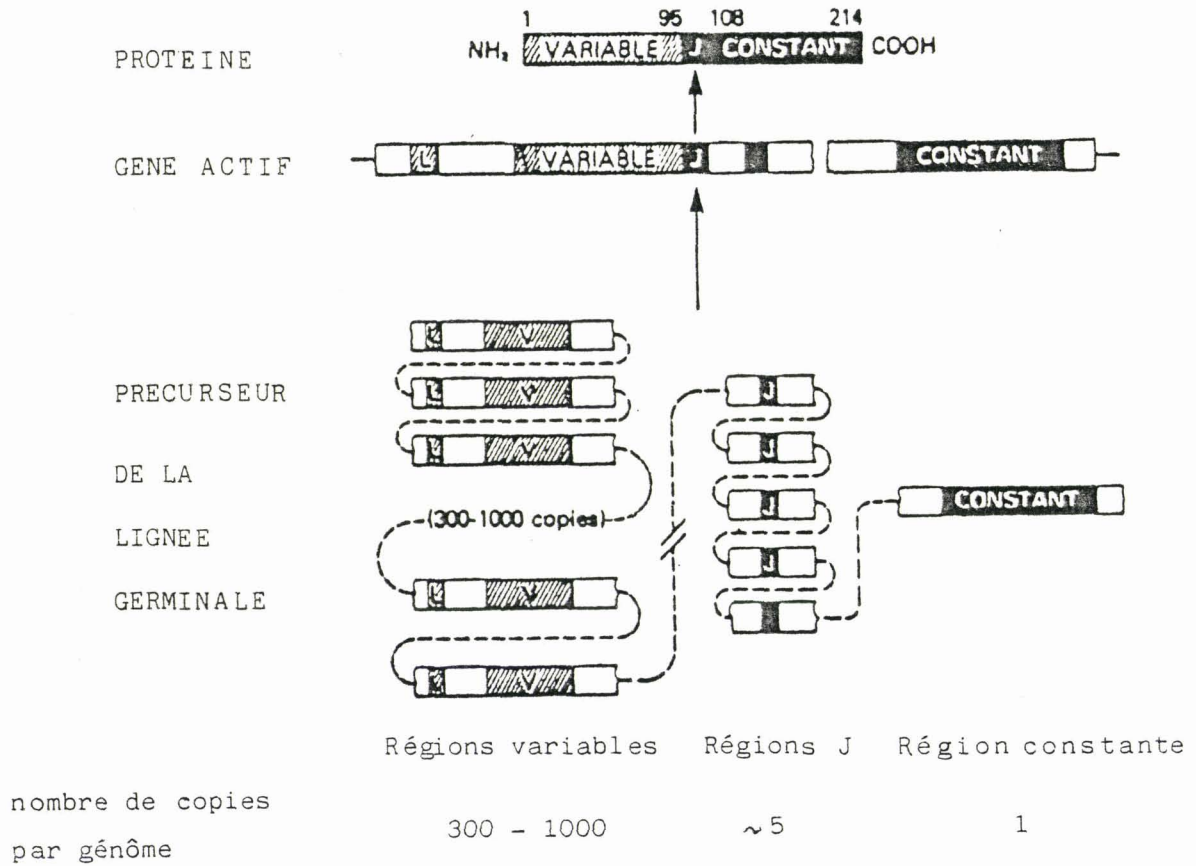


Figure 17 : Diagramme représentatif des configurations du gène codant pour une chaîne κ , comme gène actif et parmi les précurseurs de la lignée germinale.

l'unité codant pour une chaîne L(κ); il y a possibilité de choix d'un segment V parmi 300 à 1000 autres dans le génôme embryonnaire, et d'un segment J parmi 4 (1 étant inactif), ce qui donne lieu à de nombreuses combinaisons V-J possibles pour s'associer ensuite à l'unique segment C. Dans le cas d'une chaîne H, la diversité est augmentée (Fig.16 ; p.56) :

- pour le segment V_H-J_H : par l'insertion nécessaire d'un segment D choisi parmi deux séquences possibles.
- pour le segment C_H : par le choix d'un gène structural parmi huit autres correspondant aux classes et sous-classes d'Ig (Lawton et al., 1975).

2 - Régulation de la biosynthèse : Un exemple de régulation au niveau post-transcriptionnel a été mis en évidence par Singer et al. (1980); il s'agit du contrôle de la synthèse des chaînes μ évoluant vers une IgM de membrane (μ_m) ou vers une IgM sécrétée (μ_s) au cours de la différenciation des lymphocytes B, par l'intermédiaire de 2 ARN messagers spécifiques de chaque forme, C_μ étant commun. Rogers et al. (1980) ont montré en effet que les 2 formes μ_m et μ_s , bien que semblables dans leur partie N-terminale, différaient par la nature d'un fragment peptidique de queue du côté C-terminal, traduit après le gène structural correspondant au domaine $C_\mu 4$ (Fig.18a ; p. 60).

- μ_s contient un fragment terminal de 20 résidus d'acides aminés (Kehry et al. , 1979), hydrophile et donnant à l'IgM sécrétée son caractère de protéine globulaire hydrophile. μ_s contient en outre une chaîne glycanique de type oligomannosidique fixée sur la N-acétylglucosamine 563.

- μ_m contient un peptide M de 41 résidus (Kehry et al., 1980), divisé en 3 régions : 1 fragment externe de 12 résidus

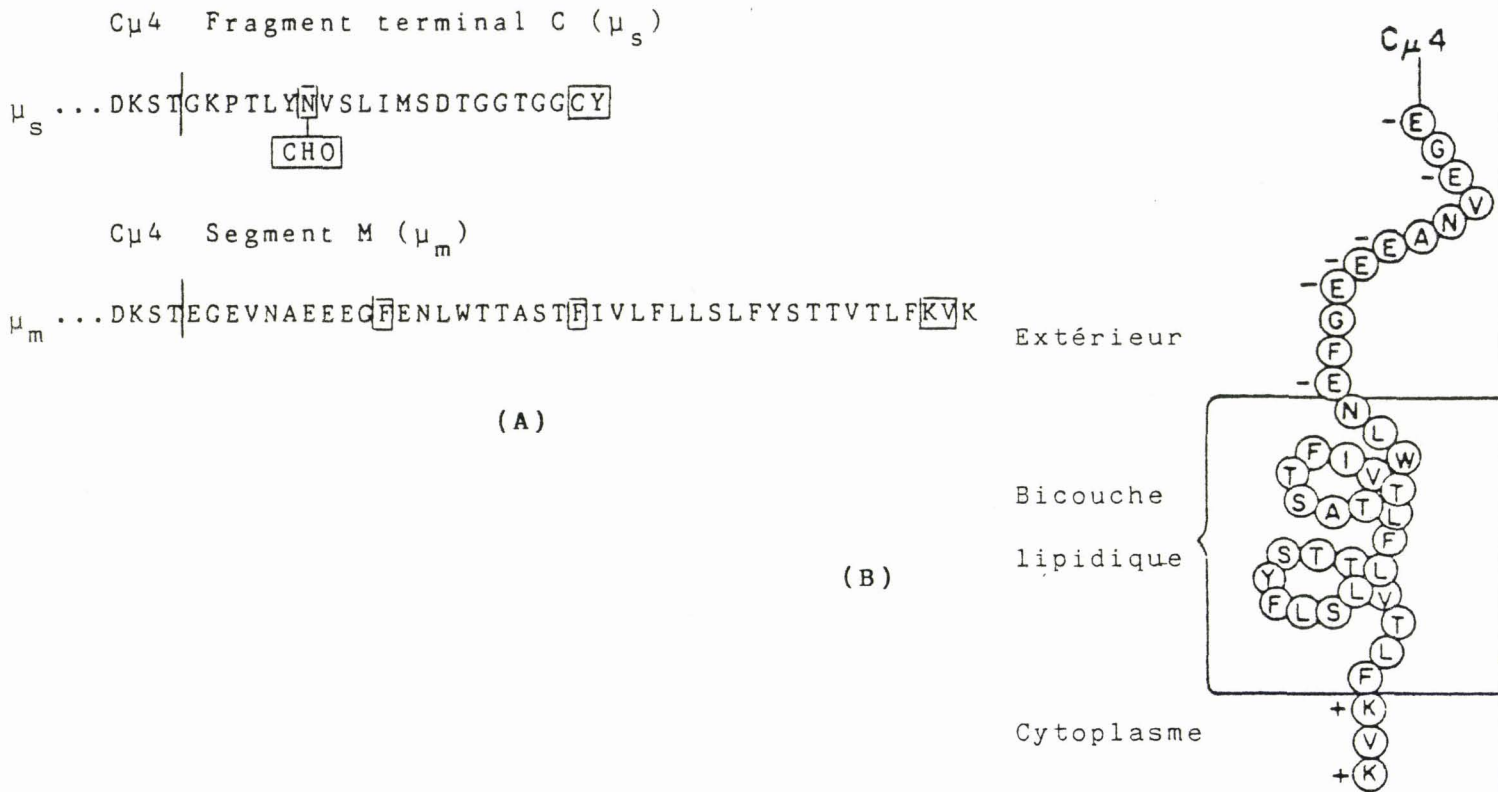


Figure 18 : Structure peptidique du segment (M) membranaire C-terminal d'une IgM (selon Kehry et al., 1980)

(A)-Comparaison des séquences peptidiques des segments C-terminaux des chaînes μ_s (20 résidus) et μ_m (41 résidus);

(CHO): site d'attachement de la chaîne glycanique;

Les résidus d'acides aminés sont désignés par les lettres correspondant à la nomenclature internationale, selon Dayhoff (1976).

(B)-Configuration possible du segment M au niveau de la membrane plasmique (les résidus hydrophobes sont supposés traverser la membrane selon une configuration en hélice α).

chargés négativement, 1 fragment interne de 26 résidus, neutre, avec un noyau central hydrophobe et un triplet terminal constitué d'acides aminés chargés positivement (Gly-Lys-Lys) et ancré à l'intérieur du cytoplasme (Fig.18b ; p.60). Ce segment M ne contient pas le triplet accepteur de glycanne; il possède les caractéristiques d'un peptide transmembranaire dont un exemple est donné par la glycophorine, glycoprotéine membranaire du globule rouge (Tomita et Marchesi, 1975).

Le même mécanisme de contrôle semblerait invoqué pour les Ig membranaires (IgM et IgD) et sécrétées des différentes classes (Cushley et al. , 1982); il pourrait aussi rendre compte de l'orientation d'une cellule vers la synthèse d'une classe plutôt qu'une autre.

En conclusion, le système immunitaire, afin de produire la diversité de réponse à une stimulation antigénique, agit à deux niveaux :

- au niveau de l'ADN, par une multitude de recombinaisons entre gènes structuraux;
- au niveau de l'ARNm, par une sélection entre différentes possibilités d'expression.

D - LOCALISATION DE LA SYNTHÈSE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES

Les chaînes polypeptidiques sont synthétisées par les polysomes liés aux membranes du reticulum endoplasmique rugueux (RER). La chaîne peptidique en croissance traverse la bicouche lipidique membranaire pour atteindre la lumière du reticulum endoplasmique où un début de glycosylation est observé.

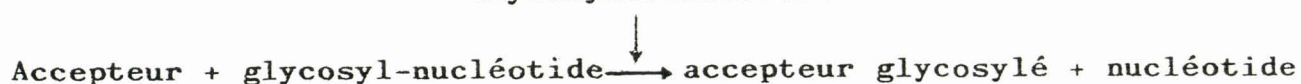
II - BIOSYNTHESE DES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES

Contrairement à la synthèse protéique, l'assemblage des structures oligosaccharidiques ne dépend pas de la traduction directe d'une information contenue dans le génôme de la cellule; il procède par addition séquentielle des monosaccharides sous la dépendance d'un système enzymatique très complexe.

A - REACTION ENZYMATIQUE DE BASE

Quelle que soit l'étape de glycosylation concernée, elle évolue selon le schéma suivant :

Glycosyltransférase



Les partenaires de la réaction sont les suivants :

1 - Les glycosyltransférases : Ce sont des enzymes intracellulaires, en général intégrés aux membranes dans un ordre défini, comparable aux enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries, afin d'agir séquentiellement. C'est ce qui explique le terme de "multi-transférase" (MGT-system) donné par Roseman (1970) à ce système enzymatique. Les glycosyltransférases sont spécifiques vis à vis du sucre précurseur et du résidu glycosyl, situé à la partie terminale non réductrice de l'accepteur, avec lequel une liaison covalente doit être formée (voir la revue de Schachter et Roseman, 1980).

2 - Le donneur : Les monosaccharides sont activés par une liaison à un nucléotide mono- ou diphosphate sous forme de glycosylnucléotide (ex : GDP- α -mannose, UDP- β -galactose, CMP- α -acide N-acétylneuraminique) ou à un lipide poly-isoprénoïde de type rétinol ou dolichol sous forme de glycolipide.

3 - L'accepteur : Ce peut être une protéine, une glycoprotéine ou un glycolipide comme il est décrit plus loin.

B - BIOSYNTHESE DES GLYCANNES LIES N-GLYCOSIDI- QUEMENT

Malgré la grande diversité de structure des glycanes ainsi liés aux glycoprotéines, il a été démontré que leur biosynthèse s'effectuait selon le même schéma général (voir la revue de Staneloni et Leloir, 1982). Les immunoglobulines contenant la plupart de ces structures de base sont donc considérées comme soumises au même mécanisme. 3 étapes principales se distinguent :

1 - Le cycle des dolichols : (voir la revue de Parodi et Leloir, 1979). Cette étape concerne la synthèse d'un oligosaccharide sur un transporteur isoprénique de type dolichol (taille importante de la chaîne carbonée) par la formation d'une liaison pyrophosphate. L'oligosaccharide intermédiaire, commun aux différentes structures glycaniques ($\text{Glc}_3 \text{Man}_9 \text{GlcNAc}_2$ - P-P-Dol) a été mis en évidence par Hubbard et Robbins (1979). Les sucres constitutifs sont additionnés séquentiellement selon la réaction enzymatique modèle décrite précédemment (Fig.19 ; p.64). Les 2 premières N-acétylglucosamine sont apportées successivement sous forme de précurseur GDP-GlcNAc suivies de 1 à 9 résidus de mannose. Chapman et al. (1980) ont montré que dans un premier temps, les 5 premiers résidus sont fournis sous forme de GDP-Man alors que les autres résidus complétant la chaîne à 9 résidus sont fournis par le Dol-P-Man. De même, les 3 résidus de glucose terminaux sont apportés sous forme de Dol-P-Glc (Staneloni et al. , 1980). La formation de cet intermédiaire lipidique de la

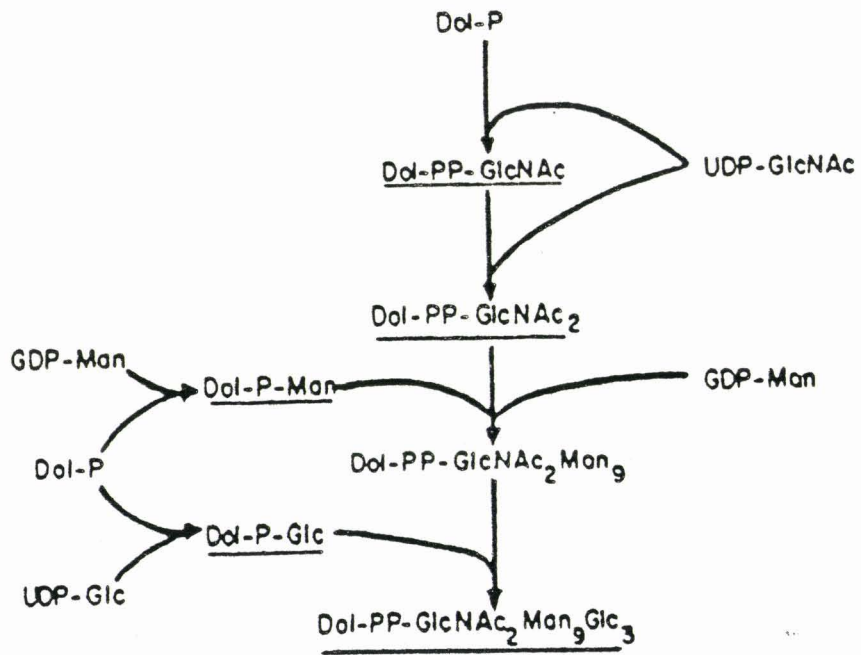


Figure 19 : Cycle des Dolichols .

glycosylation a été localisée au niveau du RER sur la face cytoplasmique de la membrane (Snider et al., 1980).

2 - Transfert en bloc de l'oligosaccharide sur la protéine : Cette étape procède toujours selon le même mécanisme enzymatique. L'enzyme membranaire est une transférase : la dolichol diphosphoryl oligosaccharide-protéine oligosaccharidyltransférase, spécifique du donneur (l'oligosaccharide-P-P-Dol qui doit être glycosylé) (Kornfeld et al., 1979), et de l'accepteur (la chaîne polypeptidique en cours d'élaboration, n'ayant pas acquis sa conformation définitive, afin de rendre le triplet accepteur [Asn-X-Ser/Thr] accessible) (Pless et Lennarz, 1977).

La localisation de ce transfert, en étroite relation avec la synthèse de la chaîne peptidique, selon de nombreux arguments, aurait lieu dans la partie lumineuse du RER.

3 - Maturation de la chaîne glycanique : L'obtention de la chaîne glycanique définitive nécessite un double remaniement de l'intermédiaire lipidique commun à tous les oligosaccharides, compte-tenu des connaissances acquises sur les structures glycaniques. Cette transformation comporte une phase d'élagage de certains monosaccharides et une phase d'allongement de la nouvelle structure tronquée. Cette série de modifications s'effectue au cours du transport intracellulaire de la glycoprotéine en croissance dans les différents compartiments cellulaires.

a - Elagage des monosaccharides terminaux. Le glycanne transféré sur la protéine en cours de synthèse possède 3 résidus de glucose excédentaires pour

devenir du type oligomannosidique. Ces résidus sont excisés par 2 glucosidases différentes localisées au niveau du RER : la glucosidase I (Elting et al., 1980) libère le résidu externe et la glucosidase II (Reitman et al., 1982) les deux résidus restants. Les structures du type oligomannosidique possédant de 5 à 9 résidus mannose, les 4 résidus les plus externes sont relativement labiles; ils sont liés en α -1,2 et sont libérés par une α -mannosidase golgienne, spécifique de cette liaison (Tabas et Kornfeld, 1982).

b - Evolution vers un glycanne mixte ou complexe. Pour la plupart des glycoprotéines N-glycosylées, les oligomannosides évoluent vers les structures complexes par l'excision de 2 résidus mannose supplémentaires et par l'intervention de glycosyltransférases golgiennes spécifiques (voir Fig. 20 ; p. 67) d'après Goldberg et Kornfeld (1983). Les glycosyltransférases provoquent un allongement du glycanne par addition séquentielle de monosaccharides et lui confèrent son originalité (Atkinson et al., 1981). La présence de structures hybrides telles que celles de l'ovalbumine (Yamashita et al., 1978), s'expliquerait par une faible activité de la N-acétylglucosaminyltransférase I (Harpaz et Schachter, 1980a,b) ou des α -mannosidases "tardives".

C - REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCANNES

La diversité des structures oligosaccharidiques liées à une même protéine nécessite un contrôle exercé par la cellule à différents niveaux :

1 - Au niveau génétique : Ce contrôle est indirect, comparativement à la synthèse protéique, car il

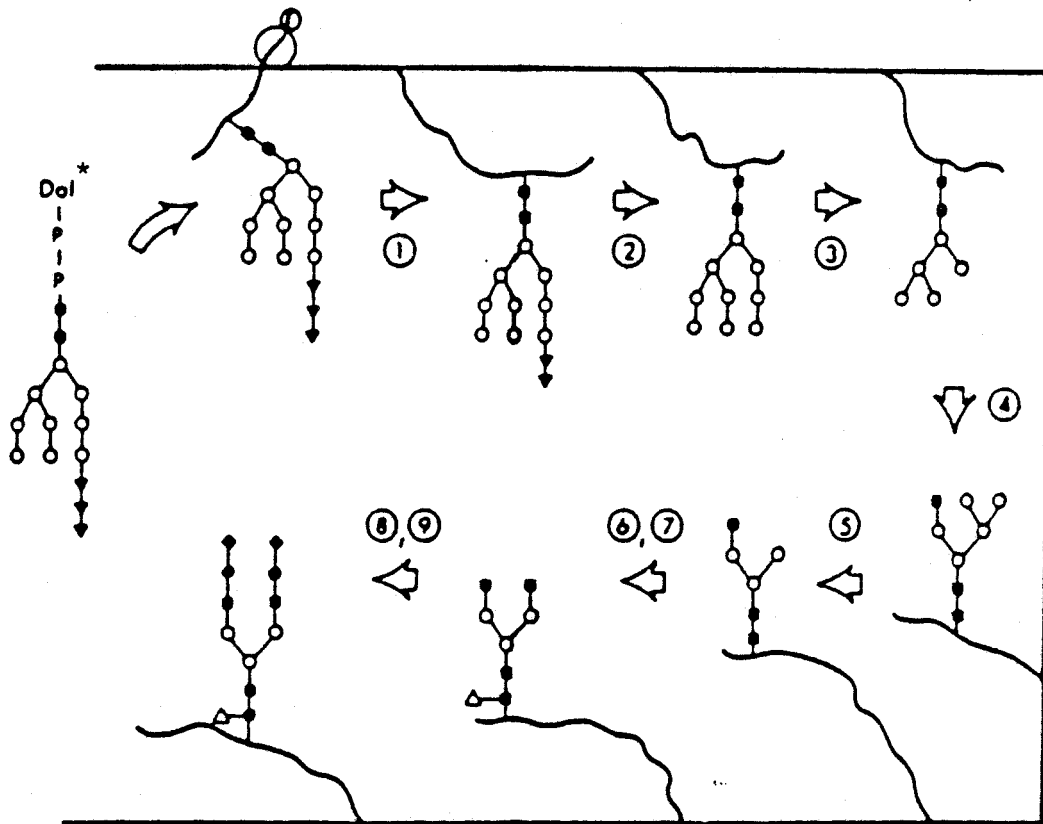


Figure 20 : Séquence des événements qui président à la biosynthèse d'un N-glycane sur une chaîne polypeptidique en cours d'élongation (Goldberg et Kornfeld, 1983)

(■)GlcNAc, (○)Man, (△)Fuc, (◆)NeuAc, (●)Gal, (▼)Glc;

(*)Oligosaccharide intermédiaire (précurseur):

$Glc_3Man_9GlcNAc_2-P-P-Dol$;

Les enzymes impliqués sont les suivants: (1)glucosidase I, (2)glucosidase II, (3) α -mannosidase I, (4) N-acétylglicosaminyltransférase I, (5) α -mannosidase II, (6)N-acétylglicosaminyltransférase II, (7) fucosyltransférase, (8)galactosyltransférase, (9) sialyltransférase.

ne peut s'effectuer qu'au niveau de la synthèse des glycosyltransférases, elles-mêmes ensuite responsables de la formation des liaisons osidiques. Il s'agit de la théorie émise par Roseman (1970) : "un gène-une liaison glycosidique".

2 - Au niveau de la concentration intracellulaire des substrats : La concentration en donneurs résulte d'un équilibre entre leur synthèse et leur dégradation par les pyrophosphatases. Le Dol-P apparaît comme un accepteur dont la concentration intracellulaire peut devenir un facteur limitant; il existe en faible quantité dans les tissus et est sensible à l'hydrolyse d'une phosphatase qui dans ce cas inhibe son recyclage après transfert de l'oligosaccharide.

3 - Au niveau de la structure de l'accepteur : Au cours du transfert en bloc de l'intermédiaire glycanique, c'est la chaîne polypeptidique qui sert d'accepteur par son séquen pour ensuite laisser ce rôle à la chaîne oligosaccharidique en voie de maturation. Cela laisse entrevoir l'extrême interdépendance qui existe entre les 2 composantes d'une glycoprotéine.

a - Influence de la structure de l'accepteur protéique. Cet aspect de la régulation a déjà été traité à la page 34 .

b - Influence de la structure du glycanne lui-même. Elle se manifeste essentiellement dans la sélectivité d'intervention des glycosyltransférases :

a - au cours de l'étape de transfert en bloc de l'oligosaccharide intermédiaire sur le peptide : la transférase responsable n'est stimulée que si le substrat est glycosylé (nécessité des 3 résidus glucose terminaux);

β - durant la maturation du glycanne :
son élongation résulte de l'interdépendance des glycosyltransférases et des deux α -mannosidases résiduelles; la N-acétylglucosaminyltransférase I, fixant la N-acétylglucosamine 5 en β -1,2 sur le Man 4, est nécessaire à l'action de ces 2 α -mannosidases, conditionnant l'addition des autres monosaccharides (Harpaz et Schachter 1980a,b). Narasimhan et al. (1981) ont décrit 2 N-acétylglucosaminyltransférases III et III' qui, en fixant 1 N-acétylglucosamine en β -1,4 sur le Man 3 (N-acétylglucosamine intercalaire), bloquent la maturation de la chaîne. L' α -1,6 fucosyltransférase n'est active que lorsque la première N-acétylglucosamine (5) est fixée sur le noyau pentasaccharidique, ce qui explique pourquoi les glycanes de type oligomannosidique ne sont jamais fucosylés. De même, les résidus de galactose (Rao et Medicino, 1978) et d'acide N-acétylneuraminique (Van Den Eijnden et al., 1980) ne sont transférés que dans un ordre défini;

γ - en fin de synthèse oligosaccharidique : certains monosaccharides s'excluent mutuellement. Ce phénomène localisé du côté de la séquence terminale non réductrice des glycanes a été démontré par Beyer et al. (1979) pour les résidus de fucose (lié en α -1,3 sur le résidu galactose d'une unité lactosaminique) et d'acide N-acétylneuraminique pouvant aussi se fixer sur ce même résidu de galactose par une liaison α -2,6, à condition qu'il ne soit pas déjà substitué par un fucose.

4 - Au niveau de l'activité des glycosyltransférases : Les glycosyltransférases requièrent la présence de cations divalents (Mn^{2+} , Mg^{2+}) mais leur dépendance la plus étroite est tournée vers l'activité des nucléotides pyrophosphatases présentes dans le milieu (Spik et al., 1979). Ces deux activités sont difficilement

dissociables et peuvent entraîner des erreurs d'interprétation. Les deux exemples suivants montrent comment une activation des glycosyltransférases peut être obtenue indirectement par une protection du substrat ; celui-ci est en effet préservé car les nucléotides pyrophosphatases ont été inhibées : soit par un excès de nucléotides cycliques dans le milieu (Debeire et al. , 1977), soit par la présence d'acide folique ou de 5'AMP (Geren et Ebner, 1974).

5 - Au niveau de la compartimentation des glycosyltransférases : Goldberg et Kornfeld (1983) ont démontré une corrélation parfaite entre la séquence des évènements de la glycosylation et la localisation des enzymes responsables de chaque étape. Ils ont, en outre, observé un haut degré d'organisation du complexe golgien en sous-fractionnant, dans un gradient de sucrose, 4 régions membranaires porteuses de spécificités enzymatiques. Une telle ségrégation physique des enzymes pourrait servir de contrôle de la glycosylation car, à la spécificité intrinsèque des glycosyltransférases, s'ajouterait une compétitivité entre elles permettant d'orienter la biosynthèse cellulaire vers trois possibilités : la synthèse de glycoprotéines phosphorylées lysosomiales (Varki et Kornfeld, 1980), de glycoprotéines membranaires ou de glycoprotéines de sécrétion.

D - LOCALISATION DE LA GLYCOSYLATION

Il est actuellement admis, du fait de l'interaction étroite existant entre chaîne polypeptidique et chaîne glycanique d'une même glycoprotéine, que leurs processus de synthèse - respectivement de traduction et de glycosylation - bien que très différents dans leur principe, sont étroitement dépendants l'un de l'autre dans l'espace et dans le temps. Ils évoluent au cours

du transport de la glycoprotéine dans les différents compartiments cellulaires. Cet aspect, concernant les IgM, est développé dans le paragraphe suivant.

III - BIOSYNTHESE DES IgM

Les différentes étapes de la maturation de la chaîne peptidique et des chaînes oligosaccharidiques, ainsi que leur assemblage sont explorés à l'intérieur de la cellule sécrétrice d'IgM (la cellule B) par combinaison des techniques de chasse après marquage radioactif, de fractionnement intracellulaire, d'autoradiographie en microscopie électronique, et grâce à l'action spécifique d'inhibiteurs.

a - les inhibiteurs de la glycosylation :

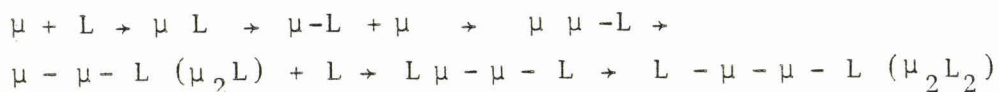
- le cholestérol et le coenzyme Q, sont des inhibiteurs de la synthèse du Dol-P;
- la tunicamycine : antibiotique analogue de l'UDP-GlcNAc, inhibe le transfert de la N-acétylglucosamine sur le Dol-P (Takatsuki et al., 1971);
- le déoxyglucose : analogue du glucose et du mannose; *in vivo*, il forme un glycosylnucléotide qui entre en compétition avec le GDP-Man et l'UDP-Glc, inhibant le transfert du mannose et du glucose sur le Dol-P;
- l'amphotricine : antibiotique qui forme un complexe avec le Dol-P et inhibe sa déphosphorylation, nécessaire à son recyclage.

b - les inhibiteurs du transport intracellulaire :

- le carboxy-cyanure m-chlorophényl hydrazone inhibe la sortie de la glycoprotéine du RER;
- la nonensine ionophore inhibe la sortie de la glycoprotéine des citernes de l'Appareil de Golgi.

A - ASSEMBLAGE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES ET
POLYMERISATION (selon Tartakoff et al. , 1979)

1 - Formation d'un monomère : Elle peut être résumée par les étapes suivantes :



Les chaînes L, présentes à l'état libre et en quantité élevée dans les citernes du RER, s'associent de façon non covalente, puis covalente par formation de ponts disulfures intercaténaux, avec les chaînes μ en cours d'élongation (celles-ci, encore fixées sur le ribosome, sont ancrées dans la bicouche lipidique membranaire du RER). Les chaînes μ sont rarement détectées à l'état libre et jamais sous forme de dimère μ_2 . L'association avec une deuxième chaîne μ commence avant la terminaison de la liaison covalente entre les 2 premières chaînes μ et L.

2 - Polymérisation : L'assemblage des chaînes en monomère est relativement rapide et suivi en quelques minutes par la polymérisation des sous-unités. Cette vitesse de polymérisation suggère qu'elle a lieu au niveau du RER et est illustrée par le fait que moins de 1% des IgM intracellulaires correspondent à la forme monomérique. La chaîne J, nécessaire à la polymérisation n'est retrouvée sous forme libre qu'à l'intérieur du RER; dans le cytoplasme, elle est toujours associée à la forme pentamérique de l'IgM.

B - GLYCOSYLATION DES IgM

La durée de la glycosylation complète d'une IgM est supérieure à celle de l'obtention d'une chaîne peptidique complète, car ce phénomène est en partie post-

traductionnel.

1 - Glycosylation initiale : Elle est cotraductionnelle (Kiely et al., 1976). Elle concerne la synthèse de l'oligosaccharide intermédiaire, son transfert sur la chaîne peptidique, et les premières étapes de dégradation récurrente des résidus terminaux glucose et mannose. Elle est localisée exclusivement au niveau du RER, du côté luminal de la membrane.

2 - Maturation des chaînes glycaniques : Elle se poursuit au niveau du reticulum lisse et s'achève dans le complexe golgien grâce à la ségrégation très précise d'un système multienzymatique (Goldberg et Kornfeld, 1983); cette étape est posttraductionnelle.

C - RELATION ENTRE POLYMERISATION, ADDITION DE LA CHAÎNE J ET GLYCOSYLATION

La polymérisation apparaît avant la fin de la glycosylation sans gêner les dernières additions de monosaccharides car les glycanes en cours de maturation sont situés à l'extérieur de la molécule, donc accessibles aux différents éléments participant à la réaction. La chaîne J nécessaire à cette polymérisation est synthétisée de la même façon que la chaîne^H, ce qui implique que sa glycosylation se termine juste avant l'excrétion de l'IgM, et ne semble donc pas nécessaire à la polymérisation; cela a été confirmé par l'emploi de la tunicamycine (Tartakoff et al., 1979) : il n'y a inhibition ni de la polymérisation ni de la sécrétion des IgM en l'absence des glycanes; il y a simplement un ralentissement de leur cinétique.

D - EXPRESSION DES IgM : NOTION DE TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Leur glycosylation terminée, les IgM vont être

transportées de l'appareil de Golgi vers leur destination finale (le milieu extracellulaire ou la surface de la cellule) par un système de transport intramembranaire dans différents compartiments cellulaires : c'est le "membrane flow", annoncé en 1975 par Palade, et revu par Gogstad et Helgeland en 1982. Ce transport est unidirectionnel (Gueuze et al. , 1977) : RER → membrane cytoplasmique via l'appareil de Golgi, et dépend de l'information portée par la structure de la glycoprotéine (l'IgM). Le transfert de matériel par diffusion latérale membranaire est facilité par la possibilité d'interconversion des membranes cellulaires (voir la revue de Morre et al., 1979). Sa migration s'effectue d'une façon discontinue, par l'intermédiaire de vésicules transportrices qui mettent en oeuvre un système sophistiqué de reconnaissance entre site membranaire récepteur vésiculaire et la partie glycosylée de la molécule à transporter (voir les revues de Waksman et al. , 1980 et Olden et al., 1982). Les molécules de destinée commune sont regroupées dans des régions particulières de la membrane (phénomène de "capping"), entraînant une série de bourgeonnements et fusions membranaires entre les différents compartiments cellulaires, puis un recyclage des vésicules transportrices après avoir déversé leur contenu. C'est par ce mécanisme général que les IgM seraient véhiculées vers la membrane cytoplasmique où elles sont exprimées, soit par intégration à la surface de cette membrane [IgM(m)], soit excrétées de la cellule [IgM(s)] (voir Fig. 21 ; p. 75).

E - REGULATION DE L'EXPRESSION DES IGM

Selon Strous et Lodish (1980), la vitesse d'obtention d'une glycoprotéine membranaire active est deux

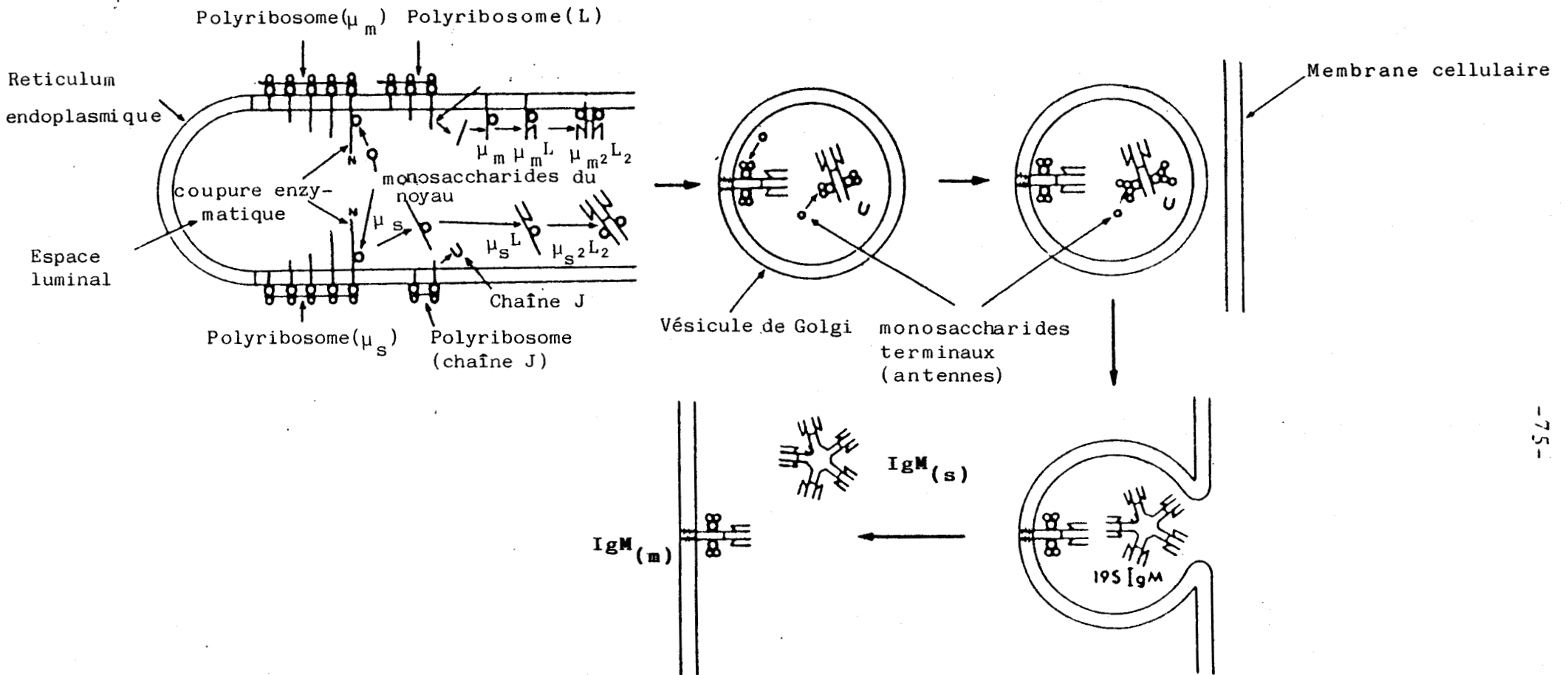


Figure 21 : Mécanisme de synthèse des $IgM_{(m)}$ et $IgM_{(s)}$ proposé par Stott et Williamson (1982), incluant la synthèse des chaînes polypeptidiques et glycaniques, le transport intracellulaire, et la libération d'une IgM

- intégrée à la membrane : $IgM_{(m)}$;
- sécrétée à l'extérieur : $IgM_{(s)}$;

(\sim) terminaisons hydrophobes de la chaîne polypeptidique en cours d'élongation.

fois plus rapide que celle de la même glycoprotéine sécrétée, impliquant une divergence dans leur biosynthèse à un moment donné. De même, pour les 2 catégories d'IgM, le fait que l'IgM(m) échappe à l'étape de polymérisation pour s'intégrer à la membrane et celui que l'IgM(s), au contraire, soit polymérisée bien avant sa sécrétion, suffisent à écarter l'hypothèse selon laquelle l'IgM(m) serait précurseur de l'IgM(s) (Vassali et al. , 1980). Dulis et al. (1982) ont montré que l'expression des IgM dépendait de modifications post-traductionnelles, les plus importantes étant l'assemblage entre les chaînes peptidiques H et L, leur polymérisation, la glycosylation terminale et l'étape finale d'insertion membranaire ou de sécrétion. Ils ont affirmé que l'expression des 2 formes d'IgM était donc sous contrôle post-traductionnel. Dulis, en 1983, a prouvé par l'emploi d'inhibiteurs de la vitesse et de l'extension de ces modifications, que c'est l'assemblage des chaînes en monomères μ_2L_2 pour les IgM(m) et en pentamères $(\mu_2L_2)_5$ pour les IgM(s) qui est décisif pour l'évolution vers une forme ou une autre. Elle réalise ainsi une protection de la molécule nouvellement formée contre la protéolyse intracellulaire et permet sa maturation complète (fin de la glycosylation et insertion membranaire ou sécrétion), afin de la rendre fonctionnelle.

F - CORRELATION ENTRE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE
DES CELLULES B ET LA REGULATION DE L'EXPRESSION
DES IgM

Toute cellule B synthétise les 2 formes de chaîne (μ_s et μ_m) dont le destin dépend du stade de différenciation de la cellule. Dans les cellules pré-B, aucune chaîne L n'étant synthétisée, aucun assemblage ne peut se faire et les 2 chaînes μ sont rapidement catabolisées. Dans les cellules B porteuses de la

mémoire, plusieurs chaînes μ_m s'assemblent avec des chaînes L en monomères μ_2L_2 et sont exprimées comme IgM(m) tandis que les chaînes μ_s sont rapidement dégradées. Dans les cellules B sécrétrices, grâce au développement de facteurs de maturation (synthèse de chaîne J et activation des oxydases des groupements sulfhydryles), la pentamérisation des IgM(s) est rendue possible ainsi que leur sécrétion.

En fait, il existe une continuité dans l'expression des IgM car les IgM(m) sont fonctionnelles avant les IgM(s). Cet ordre chronologique est rendu nécessaire par la réponse même à une stimulation antigénique : c'est par l'intermédiaire de l'IgM(m), récepteur cellulaire primaire de l'antigène, que le signal est transmis à la cellule immune pour déclencher la sécrétion d'IgM(s) (Vitetta et Uhr, 1975).

IV - CONCLUSIONS

Les Immunoglobulines, de par leur structure très complexe, laissent entrevoir la difficulté d'élucider les mécanismes impliqués dans leur biosynthèse et sa régulation. Leur dualité structurale se retrouve au niveau de la synthèse. Si l'élaboration de la chaîne polypeptidique est maintenant bien connue, la compréhension des différentes étapes de la glycosylation (en accord avec celle des glycoprotéines en général) a progressé ces dernières années grâce à des cinétiques de marquage couplées à une exploration autoradiographique et à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

De nombreuses questions concernent néanmoins la régulation de cette biosynthèse, compte-tenu de l'extrême interdépendance partie protéique-partie glycanique. De plus, si les notions de "complexité" et de

"variabilité"de structure peuvent être associées, il est étonnant d'observer que pour la partie protéique, c'est la zone N-terminale, synthétisée en premier, qui porte la variabilité, contrairement à la partie glycanique qui affiche une diversité de structure en fin de chaîne; le noyau pentasaccharidique qui assure l'ancrage du glycanne sur la chaîne polypeptidique est relativement invariable .

CHAPITRE IV : ROLE BIOLOGIQUE DES GLYCANNES

Les glycoprotéines, très répandues dans la nature, apparaissent sous forme soluble (enzymes, hormones, immunoglobulines et autres produits de sécrétion), ou intégrées aux membranes cellulaires et se manifestent par des fonctions biologiques très diverses. Le rôle exact de la fraction glucidique est encore très mal défini et sa signification biologique reste inconnue. Cependant, les propriétés structurales, conformationnelles et métaboliques des glycanes constitutifs des glycoprotéines, traitées dans les chapitres précédents, ont permis d'en dégager la conservation de certaines caractéristiques au cours de l'Evolution des espèces:

- du point de vue structural : c'est la constance du triplet accepteur de la glycosylation et la limitation des structures de base des chaînes glycaniques;

- du point de vue conformationnel : c'est l'extrême interdépendance entre chaîne polypeptidique et copule glucidique;

- du point de vue métabolique : c'est l'uniformité malgré la complexité des oligosaccharides, du processus de biosynthèse, impliquant la partie protéique et un système "multienzymatique" très complexe (système multiglycosyltransférase de Roseman ou MGS) et qui représente donc un avantage hautement sélectif.

Ces caractéristiques suggèrent une participation physiologique universelle des glycanes, contrairement à l'hypothèse de "gadget" émise en 1969 par Gottschalk qui considérait la présence d'oligosaccharides dans une protéine comme un accident métabolique qui survenait lorsque les conditions de la glycosylation étaient réunies. Une telle hypothèse supposait que les structures glycaniques s'assemblaient au hasard et ne pouvait

justifier les règles de substitution des monosaccharides qui ont été définies depuis.

La plupart des informations obtenues sur la fonction des sucres sont dues à l'utilisation :

- d'inhibiteurs spécifiques de la glycosylation, le plus utilisé étant la tunicamycine car il n'atteint pas la partie peptidique;
- de mutants déficients en glycosyltransférases (Trowbridge et al. , 1978);
- de glycosidases spécifiques afin de déterminer l'implication des différents monosaccharides dans la fonction d'une structure glycanne donnée;
- de lectines (Kornfeld et Kornfeld, 1978 ; Montreuil et al. , 1983) qui possèdent des propriétés de fixation spécifique vis à vis de motifs oligosaccharidiques;
- d'anticorps (Ac) monoclonaux aglycosylés (Nose et Wigzell, 1983).

Malgré la confusion entraînée par la multitude de résultats (souvent contradictoires) obtenus depuis une quinzaine d'années, il est de plus en plus admis que les glycannes exercent 2 rôles principaux : celui de marqueurs de reconnaissance biologique et celui de stabilisateurs de la conformation protéique. Dans une première partie, nous décrivons ces deux aspects fonctionnels communs à toutes les glycoprotéines; pour de plus amples détails, se reporter aux revues générales : Sharon (1975);Schauer *et al.* (1979);Sharon et Lis(1980);Strecker et Montreuil (1979); Berger et al. (1982) ; Montreuil (1982). En seconde partie, nous rapportons les rôles attribués aux glycannes, plus particulièrement dans les IgM.

I - ROLE DES GLYCANNES DANS LES GLYCOPROTEINES

A - ROLE PHYSICO-CHIMIQUE : SYNTHÈSE PROTÉIQUE
ET STABILISATION DE LA CONFORMATION :

voir les revues de Gibson et al. (1980) et Hemming (1982).

1 - Terminaison de la synthèse protéique :

Une protéine ne peut devenir fonctionnelle qu'après avoir acquis certains éléments structuraux autres que le simple enchaînement des liaisons peptidiques. Gibson et al. (1981) ont montré l'importance de la glycosylation dans l'évolution de la synthèse protéique en étudiant l'effet de la tunicamycine sur l'assemblage du virus de la stomatite vésiculaire : la protéine G de l'enveloppe, non glycosylée dans ce cas, se concentre dans la cellule hôte et s'aggrège sans atteindre la surface, cette étape étant nécessaire à l'assemblage des virus.

2 - Sécrétion des glycoprotéines : En 1965, puisqu'aucune fonction spécifique n'était attribuée aux glycanes dans les glycoprotéines biologiquement actives, Eylar a suggéré un rôle plus général pour les oligosaccharides : celui de passeport nécessaire à la sécrétion des protéines. L'emploi de la tunicamycine a permis l'obtention de nombreux résultats, la plupart contrariant cette hypothèse. Certains auteurs ont montré que l'inhibition de la glycosylation par l'antibiotique n'excluait pas la libération de la protéine correspondante, non glycosylée, dans le milieu

extérieur : ainsi pour la transferrine (Struck *et al.*, 1978), pour l'ovalbumine (Keller et Swank, 1978), pour l'interféron humain (Mizrahi *et al.*, 1978), pour la glycophorine (Gahmberg *et al.*, 1980)... Ce problème n'est cependant pas encore définitivement résolu car d'autres auteurs ont montré que l'exportation de certaines protéines était enrayée par défaut de glycosylation, par exemple : les glycoprotéines membranaires du Semliki Forest Virus (Leavitt *et al.*, 1977), la procollagène (Housley *et al.*, 1980) et la thyroglobuline (Seagar *et al.*, 1980). Une explication peut être donnée à la variabilité de ces résultats (Olden *et al.*, 1982) annonçant les deux paragraphes suivants : les protéines sécrétées en présence de tunicamycine n'ont pas la même conformation ni la même résistance aux agents protéolytiques que la glycoprotéine native; donc plutôt qu'un "signal" nécessaire à la libération des protéines, les glycannes apparaissent comme un complément nécessaire à leur intégralité moléculaire.

3 - Stabilisation de la conformation : Elle est très bien illustrée par les glycoenzymes. Dans le cas de la carboxypeptidase Y de levure (Chu et Maley, 1982), un glycane de type oligomannosidique est responsable de la stabilisation de sa structure, donc de son activité. D'autres enzymes sont au contraire inactifs sous leur forme zymogène et deviennent fonctionnels par la perte d'un glycopeptide constitutif; c'est le cas du pepsinogène (Neumann *et al.*, 1969) transformé en enzyme actif : la pepsine.

4 - Protection des protéines contre l'attaque protéolytique : La copule glucidique, par sa masse hydrophile, offre une résistance à la protéolyse en isolant la partie protéique du solvant (Florent

et al. , 1974). De nombreux exemples démontrent l'augmentation de la susceptibilité à la protéolyse de protéines synthétisées en présence de tunicamycine, donc non glycosylées; c'est le cas de la fibronectine (Olden et al., 1978) et du récepteur de l'acétylcholine (Prives et Olden, 1980). Dans un même but, Meyer et al. (1975) ont démontré que la fixation chimique de chaînes de dextran sur des enzymes tels que la fixation chimique de chaînes de dextran sur des enzymes tels que le lysozyme, la trypsine et la chymotrypsine, augmente leur résistance à la protéolyse.

5 - Stabilisation des membranes biologiques :

Les glycanes constitutifs des glycoprotéines intégrées dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires joueraient un rôle primordial dans le maintien de la forme et de la rigidité des cellules (Bretscher, 1973; Mescher et Strominger, 1976; Mescher, 1981).

6 - Contrôle de la perméabilité membranaire :

Les glycoconjugués de membranes contrôleraient l'orientation des molécules d'eau et le mouvement des sels minéraux et substances de faible poids moléculaire au niveau membranaire. Ce contrôle est directement lié au rapport entre résidus hydrophiles d'acide sialique et résidus hydrophobes de fucose; mais la structure glycanique elle-même semble impliquée dans cette régulation. Un exemple est donné par la glycoprotéine antigél d'un poisson de l'Antarctique (voir la revue générale de Feeney et Yeh, 1978) capable d'abaisser le point de congélation du sang de ce poisson de 1,8°C. Cette glycoprotéine contient des séquences peptidiques répétitives (Ala-Ala-Thr) dont les résidus Thr sont substitués via une liaison α -1,3 par des unités disaccharidiques Gal(β 1-3)GalNAc (Vandenheede et al., 1972). Toute

modification chimique de ces unités par acétylation ou oxydation des groupements OH des monosaccharides entraîne une perte de l'activité antigél (Ahmed et al., 1973). Sugget a proposé en 1975 une explication selon laquelle il y aurait interaction principale soluté-solvant (donc empêchement du développement de cristaux de glace) par la formation de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les groupements OH des sucres. Cette interaction est influencée par l'orientation des molécules et la taille du glycanne.

7 - Rôle de l'acide sialique dans la propriété de viscosité de certaines glycoprotéines : Du fait de la faible valeur de leur pK (2,2), les groupes carboxyliques de l'acide sialique sont dissociés aux pH physiologiques. Les chaînes peptidiques porteuses de nombreux groupements glycaniques sialylés sont maintenues en structures "en batonnets" possédant un rapport axial élevé. En conséquence, leurs solutions sont visqueuses comme le sont, par exemple, les solutions de mucines sous-maxillaires (Aminoff et al., 1979; Van Halbèek et al., 1981a) dont la protéine comporte 800 unités disaccharidiques NeuAc (α 2-6)GalNAc.

B - INTERVENTION DES GLYCANNES DANS LES PHENOMENES DE RECONNAISSANCE (voir les revues de Olden et al., 1982; Marshall et Johnson, 1983; Rauvala, 1983).

Cette reconnaissance résulte de la complémentarité entre une séquence oligosaccharidique (marqueur) et la structure protéique de reconnaissance et d'association (lectine).

1 - Transport intracellulaire : Ce phénomène déjà décrit dans le chapitre consacré à la biosynthèse (p. 73), se traduit par un flux entre membranes intracellulaires (Palade, 1975), mettant en jeu des composants

complémentaires et associés de façon non covalente. La plupart des produits impliqués étant de nature glycoprotéique (protéines lysosomales, membranaires et de sécrétion), il y aurait interaction entre un motif oligosaccharidique de la glycoprotéine transportée et un récepteur membranaire spécifique de la séquence glycosylée (Olden et al., 1982).

2 - Les glycanes sont porteurs de signaux de reconnaissance : Un exemple est donné par l'étude des activités de groupes sanguins à la surface des hématies (Winzler, 1970; Hughes, 1976). Les déterminants antigéniques M et N sont portés par des chaînes oligosaccharidiques liées O-glycosidiquement à la glycoprotéine constitutive majeure de la membrane érythrocytaire : la glycophorine.

3 - Les glycanes sont des messages destinés à des cellules cibles : Ils fixent la destinée des protéines extracellulaires. Cette hypothèse a été vérifiée par le groupe d' Ashwell (Morell et al. , 1968; Ashwell et Morell, 1971, 1974, 1977 et 1978) qui a démontré que les glycoprotéines circulantes pouvaient être spécifiquement reconnues par la membrane cytoplasmique des cellules, puis fixées sur celle-ci, endocytées et dégradées dans les lysosomes. Ce mécanisme met en jeu, d'une part les glycanes glycoprotéiques, d'autre part des récepteurs membranaires qui reconnaissent spécifiquement ces monosaccharides ou ces motifs oligosaccharidiques. Ces récepteurs, souvent de nature glycoprotéique, ont été purifiés et qualifiés de lectines membranaires (Kawasaki et Ashwell, 1976; Monsigny et al., 1979) car ils en présentent toutes les caractéristiques (Lis et Sharon, 1977). Cinq exemples de pinocytose-endocytose par interaction cellule-molécule sont décrits dans le tableau II p.86 .

TABLEAU II

SYSTEMES DE RECONNAISSANCE FAISANT INTERVENIR DES RESIDUS GLYCOSYLS SPECIFIQUES DANS LE PHENOMENE DE PINOCYTOSE (INTERACTION CELLULE-MOLECULE)

| TYPE CELLULAIRE IMPLIQUE | SPECIFICITE DU RECEPTEUR DE LA SURFACE CELLULAIRE | LIGANDS RECONNUS PAR LE RECEPTEUR (EXEMPLES) | REFERENCES |
|---|---|--|--|
| Hépatocytes de Mammifères | Galactose (β -galactosyl-) | Asialoglycoprotéines plasmatiques (ex:asialoceruloplasmine) | Morell <u>et al.</u> , 1968 |
| Hépatocytes de Mammifères | α -Fucosyl (1 + 3) | Asialotransferrine fucosylée | Prieels <u>et al.</u> , 1978 |
| Hépatocytes aviaires | N-acétylglucosamine | Agalactoorosomucoïde | Lunney et Ashwell, 1976 |
| Fibroblastes humains | Mannose-6-phosphate | Enzymes lysosomiaux (ex: β -hexosaminidases, β -glucuronidase) | Neufeld <u>et al.</u> , 1975 |
| Cellules du système réticuloendothélial des Mammifères et macrophages | Mannose/N-acétylglucosamine | Agalactoorosomucoïde enzymes lysosomiaux (ex: β -glucuronidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase) | Stahl <u>et al.</u> , 1978 Stahl et Schlesinger, 1980 |

4 - Les glycanes sont responsables de l'adhésion cellulaire : Le concept d'Ashwell (interaction glycanne-récepteur) peut être étendu à la reconnaissance entre 2 types cellulaires différents mettant en jeu le récepteur d'une cellule et le ligand lié sur l'autre cellule. Des modèles simples illustrant ce phénomène de reconnaissance puis d'adhésion cellulaire ont été rapportés et concernent la fixation de cellules de microorganismes sur les cellules eucaryotes. En 1960, Gottschalk décrit la liaison du virus de l'Influenza au globule rouge par l'intermédiaire de l'acide N-acétylneuraminique. De même, l'adhésion des bactéries telles qu'*Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* aux cellules épithéliales intestinales se fait par l'intermédiaire de motifs oligomannosidiques situés sur la surface de ces dernières (Barshavit et al., 1977; Eshdat et al., 1978; Firon et al., 1983). Dans des systèmes cellulaires plus complexes, tels que chez les Mammifères, l'interaction entre les cellules, qui préside à la formation des tissus, a son importance dans la morphogénèse et la différenciation cellulaire (Järnefelt et al., 1978; Hakomori, 1981). Notons le cas de la fibronectine, glycoprotéine majeure de la surface du fibroblaste, qui est directement impliquée dans le phénomène d'adhésion cellulaire (Vaheri et al., 1978). Sa synthèse, déficiente dans une souche mutante de fibroblastes de hamsters (les cellules BHK) entraîne de profondes modifications morphologiques et adhésives des cellules (Hughes et Pena, 1978). De nombreux autres cas, en faveur du rôle primordial joué par la partie saccharidique des glycoprotéines dans le mécanisme de reconnaissance entre 2 cellules, aboutissant à leur adhésion, sont revus par Hughes (1976) et Frazier et Glaser (1979).

5 - Les glycanes jouent un rôle déterminant :

a - Dans la durée de vie d'une glycoprotéine circulante, comme nous l'avons vu précédemment p. 85 au sujet des récepteurs d' Ashwell;

b - Dans la durée de vie d'une cellule circulante . C'est la cas des érythrocytes dont l'absence d'acide sialique sur la surface accélère leur élimination et leur phagocytose par les macrophages (Jancik et Schauer, 1974).

c - Dans la distribution de certaines cellules dans les organes spécifiques . Un exemple est donné par la localisation splénique des lymphocytes natifs de rat et leur rapide évacuation vers le foie après action des glycosidases (Woodruff et Woodruff, 1976).

II - ROLE DES GLYCANNES DANS LES IGM

Les Immunoglobulines ou anticorps (Ac) présentent une double fonction; voir les revues générales de Winkelhake (1978) et Stott et Williamson (1982) :

- une fonction adaptative de liaison avec la molécule étrangère ou antigène (Ag), avec un haut degré de spécificité;

- de nombreuses autres interactions ayant pour but la protection de l'hôte (par inactivation de l'Ag et son élimination de l'organisme), et le contrôle de l'homéostasie.

C'est Porter, en 1959, qui fut le pionnier d'une telle distinction de fonction attribuable à des régions topographiques différentes de la molécule. En 1974, Spiegelberg simplifiait le problème en qualifiant la liaison avec l'Ag (revenant au fragment Fab) de fonc-

tion primaire, et les autres fonctions, portées par le fragment Fc de secondaires. En fait, nous allons voir, dans la suite de cet exposé, que dans l'appréciation des relations structure-fonctions apparaît toute une série de séquences dynamiques dont la liaison avec l'Ag n'est qu'une étape parmi ces événements. Si l'on se réfère à Edelman (1970) qui proposait que chaque domaine avait évolué en vue d'exercer une fonction particulière, la multiplicité fonctionnelle une Ig doit être rattachée à son découpage structural en domaines compacts.

Après avoir brièvement décrit les fonctions portées par chacun des domaines d'une IgM, nous essaierons de fixer les rôles revenant plus particulièrement à la partie glycanique. Pendant longtemps, les biochimistes ont considéré l'hétérogénéité des glycopeptides isolés des chaînes lourdes des Ig trop élevée pour qu'un rôle puisse être attribué aux glycanes. Ce n'est qu'après les travaux de Torano et al. (1977) et Kehry et al. (1979), démontrant une certaine homologie de structure des chaînes, et sa conservation au cours de l'Evolution, que cette attitude a été révisée au profit d'une importance fonctionnelle significative de la copule glucidique.

A - DIFFERENCIATION FONCTIONNELLE DES DOMAINES

1 - Les domaines du fragment Fab ("antigen-binding") : Les 2 domaines variables appartenant aux chaînes H et L (V_H et V_L) sont principalement responsables de la fixation de l'Ag. C'est la séquence en acides aminés des 3 régions hypervariables des chaînes H et L, avec toutes les modifications qu'elle est susceptible de subir, qui confère sa taille et sa forme au site de combinaison, donc sa spécificité (Haimovich et al., 1970; Poljak et al., 1973). L'idéal, pour un immunochimiste est de définir

une propriété ou une fonction portée par une molécule d'Ac en termes de structure tri-dimensionnelle. C'est ce qui a été obtenu pour le site de liaison Ac-Ag grâce aux études cristallographiques aux rayons X. Il ressemble à un cône tronqué, de dimensions : $35 \times 10-15 \times 6-10 \text{ \AA}$ (Poljak et al., 1973), dans lequel les résidus aromatiques tyrosine 38 et phénylalanine 101 de la chaîne H et de la chaîne L occupent une position clef vis à vis du solvant et des molécules à lier (Edmunson et al., 1975). Cette cavité est délimitée par les régions hyper-variables et diffère selon les caractéristiques de l'Ag à fixer : elle peut varier de l'aspect d'une crevasse pour les Ac dirigés contre un Ag hydrophobe (Winkelhake et Voss, 1970) à celui d'une gouttière peu profonde si l'Ag est au contraire de nature hydrophile (Davies et Padlan, 1975). L'intervention des 2 chaînes H et L est maintenant reconnue dans l'interaction avec l'Ag (Liberti, 1975) même si la réaction est promue par la chaîne H (Amzel et al., 1974).

Toujours dans le même but d'établir des relations structure-fonctions, les premiers domaines des régions constantes des chaînes H et L, respectivement C_H1 et C_L , constitutifs du fragment Fab semblent jouer un rôle dans la formation des sites actifs par stabilisation des structures secondaire et tertiaire de ces sites (Dorrington et Smith, 1972). En 1977, Dorrington et Painter ont suggéré que ces deux domaines servaient d'espaceurs entre le site de liaison de l'Ag et les domaines du fragment Fc. Ils doivent donc être considérés comme des structures homologues majeures qui ont évolué afin de permettre l'expression de la molécule d'immunoglobuline.

2 - Les domaines du fragment Fc ("cristallisable")

a - Domaine C_H2

Les fonctions effectrices des différents domaines des Ig ont principalement été étudiées chez les IgG. C'est pourquoi le rôle exact du domaine C_μ2 n'est pas connu car ce dernier n'a pas d'équivalent chez les IgG : il serait remplacé par la zone charnière. Il contrôlerait donc la stabilisation de la conformation moléculaire.

b - Domaines C_H3 et C_H4

a - Le domaine C_μ3 ne possède pas de fonction propre : il semble impliqué avec le domaine C_μ4 dans les phénomènes de cytophilie et de cytotropisme vis à vis de certaines cellules réceptrices, et dans l'homéostasie des IgM.

Le catabolisme des Ig est soumis à un processus de régulation très complexe incluant à la fois des mécanismes communs à la dégradation de toutes les protéines plasmatiques et d'autres, plus sélectifs, participant à l'élimination de molécules endommagées. Du point de vue global, pour l'ensemble de l'organisme, la régulation est encore mal définie; deux mécanismes non spécifiques sont actuellement connus, le principal étant celui du métabolisme basal qui influence la vitesse de dégradation des molécules si le niveau d'équilibre est déplacé, et l'autre, l'ultrafiltration glomérulaire, au niveau rénal, qui tient compte de la charge et de la taille des molécules. Les processus empruntant une voie plus spécifique sont activés par des systèmes effecteurs incluant des récepteurs qui assurent la liaison d'une Ig par reconnaissance de sites rendus accessibles par des modifications structurales de la molécule d'immunoglobuline. Ces mécanismes

peuvent entraîner une relation entre la concentration sérique en Ig et sa vitesse de dégradation. Pour les IgM, contrairement aux IgG, la demi-vie (de 6 jours) est indépendante de sa concentration sérique : elle est donc identique chez les sujets atteints d'agammaglobulinémie ou de paraprotéïnémie. En fait, après sa sécrétion hors de la cellule productrice, chaque classe d'Ig possède sa propre vitesse de disparition de la circulation. Le catabolisme des IgM est principalement localisé au niveau du foie (Waldmann et Strober, 1969) mais il ne peut se limiter à un site anatomique unique; il occupe une place diffuse dans tout l'organisme par l'intermédiaire du système réticulo-endothélial (SRE) ou système phagocytaire (Benaceraff et al. , 1959), faisant intervenir des cellules porteuses de récepteurs spécifiques des molécules à éliminer. Dans le cas le plus simple de cytophilie, il y a interaction directe de l'Ig avec le récepteur cellulaire suivie de la capture de la molécule par endocytose, de son transport transcellulaire pendant lequel s'effectue la protéolyse, et de l'excrétion des catabolites dans le milieu extérieur. Ce phénomène a principalement été décrit pour les IgG (Unkeless et Eisen, 1975; Dorrington, 1976); de nombreux résultats, souvent contradictoires du fait de l'utilisation de systèmes hétérologues, ont été obtenus pour les IgM, tendant à prouver leur faible affinité pour les récepteurs portés par les macrophages; certains auteurs : Rhodes (1973) pour les IgM monomériques, et Lay et Nussenzweig (1969); Askenase et Hayden (1974) pour les IgM polymériques, ont cependant démontré la fixation de complexes IgM-Ag-complément sur les macrophages; il s'agit dans ce cas du phénomène de cytotropisme, responsable de l'évolution de la réponse immune vers une inflammation localisée. Le ligand, sous cette forme complexe, provoque une concentration de l'Ag à la surface du macrophage; il s'ensuit une activation du macrophage

qui déclenche le processus de pinocytose-exocytose (Leslie, 1980). Knutson et al.(1977) ont démontré que c'est la fixation du ligand sur le récepteur cellulaire qui est le facteur limitant du catabolisme cellulaire des Ig car la vitesse de dégradation intracellulaire est constante quelle que soit la taille du ligand; d'autre part, les récepteurs sont communs aux Ig monomériques et aux complexes immuns, avec cependant une affinité plus élevée pour les derniers, ce qui explique l'élimination rapide des complexes immuns par rapport aux Ig seules. Les marqueurs du catabolisme des IgG ont été localisés tantôt sur le domaine $C_{\gamma}2$ (Winkelhake et Nicolson, 1976), tantôt sur le domaine $C_{\gamma}3$ (Yasmeen et al. , 1976), alors que Mc Nabb et al.(1976) et Arend et Webster (1977) ont démontré la nécessité d'une association des 2 domaines. En ce qui concerne les IgM, le fragment Fc a été globalement impliqué dans cette fonction effectrice, sans en dégager une responsabilité particulière à un domaine ou à un autre.

β - Le domaine $C_{\mu}4$ est porteur de 3 fonctions essentielles :

- activation de la voie classique du complément par fixation du composant C1q ;
- cytophilie vis à vis des cellules B déclenchant la réponse immune;
- polymérisation des IgM; les deux dernières fonctions s'excluant mutuellement car elles reviennent respectivement aux IgM membranaire et de sécrétion.

(1)Activation de la voie classique du complément : Le complément est un système multiprotéique composé de 11 protéines sériques. L'activation de sa voie classique se traduit par l'interaction de la première sous-fraction C1q du composant C1 du complément avec un complexe immun

IgM-Ag soluble ou fixé sur une surface cellulaire (Augener et al. , 1971). Ensuite, viennent se fixer les 2 autres sous-fractions C1r et C1s, avec une conversion de cette dernière en C1 estérase, entraînant une série d'activations, chacune étant responsable de la conversion d'un composant pré-curseur en enzyme actif. L'évènement final est une lyse cellulaire si le complexe a été formé sur la membrane cellulaire, d'une bactérie par exemple, ou la formation de catabolites responsables de l'inflammation. Les structures des IgM responsables de cette fixation ont été étudiées par les groupes de Hurst et al. (1974, 1975) et de Bubb et Conradie (1976) : le premier a défini une séquence de 24 résidus d'acides aminés communs aux fragments $C_{\mu}4$ et $CNBr_5$, localisée du côté N-terminal du domaine C-terminal. Le deuxième groupe a démontré que le fragment $Fc_{5\mu}$ fixait plus facilement le composant C1q que la protéine native, prouvant que la conformation native n'était pas absolument requise, qu'elle devait plutôt masquer en partie le site actif; de même, le fragment $C_{\mu}4$, réduit et alkylé, et même déglycosylé, conserve son activité. Johnson et Thames (1976) et Isenman et al.(1977) ont observé une corrélation entre l'exposition des résidus aromatiques tyrosine et tryptophane et la fixation du C1q, démontrant le rôle primordial de la partie peptidique dans cette fonction effectrice. Récemment, Birshtein et al.(1982) l'ont confirmé en démontrant que les domaines responsables de cette fonction étaient inactivés dans une molécule hybride obtenue à partir d'1 IgGa et d'1 IgGb.

(2) Action cytophilique vis à vis des cellules B : La nature de la cellule du système réticulo-endothélial sur laquelle se lie l'Ig détermine l'effet physiologique. Nous avons vu précédemment que les macrophages

phagocytèrent les complexes immuns grâce à leurs récepteurs spécifiques du fragment Fc des Ig. La présence de ces récepteurs est détectée par la formation de "rosettes" : des complexes érythrocyte-Ac anti-érythrocyte sont incubés en présence de la population cellulaire à étudier; si les cellules possèdent des récepteurs Fc; il y a adhérence des érythrocytes à la cellule par l'intermédiaire de l'Ac formant une rosette. Dans le cas des macrophages, la région Fc de l'Ig participe à l'évolution de la réponse immune; nous allons voir que dans le cas des IgM monomériques, elle est aussi impliquée dans sa promotion. Différents auteurs (Moretta et al., 1975; Mc Connell et Hurd, 1976; Conradie et Bubb, 1977 et Bubb et Conradie, 1978) ont découvert à la surface des lymphocytes T la présence d'un récepteur spécifique du fragment C_μ4. L'intégralité structurale de ce domaine est requise pour son activité, mais la chaîne oligosaccharidique ne semble pas intervenir (Bubb et Conradie, 1978). Ces résultats recourent les données actuelles concernant les IgM monomériques de surface (voir p.61). Celles-ci présentent selon Kehry et al. (1980), les caractéristiques d'un récepteur membranaire. On peut donc supposer qu'après interaction avec son récepteur Fc, l'IgM(m) se fixe sur la membrane lymphocytaire et devient à son tour récepteur de l'Ag. Après interaction avec l'Ag, elle provoque une stimulation du lymphocyte induisant sa division et sa différenciation dont la phase finale est la synthèse et la sécrétion d'IgM polymériques de même spécificité : c'est l'expansion clonale. Celle-ci influence la quantité d'Ac synthétisée (Stott et Williamson, 1982). Les lymphocytes B possèdent 10⁴ à 10⁵ molécules d'IgM(m) à leur surface (d'une demi-vie d'environ 1 jour). Les lymphocytes différenciés sécrètent environ 2000 molécules d'IgM(s) par seconde.

(3) Polymérisation des IgM : Cette fonction est spécifique des IgM(s) qui possèdent une cystéine en avant dernière position C-terminale (575) de la chaîne μ_s , responsable de la formation des liaisons disulfures entre les unités monomériques des IgM. La chaîne μ_m constitutive des IgM(m), plus longue de 21 résidus d'acides aminés (v. Fig. 18b; p. 60) est dépourvue de ce résidu cystéine : la position 575 est occupée par une sérine.

c - Rôle des ponts disulfures et de la zone charnière dans les fonctions des IgM. L'importance des liaisons disulfures intra- ou intercaténares dépend de la nécessité de conservation de la structure du site actif responsable d'une fonction donnée. Hong et Nisonoff ont montré en 1966 que la réduction des ponts disulfures n'entravait pas l'efficacité des relations stéréochimiques entre Ag et site récepteur du fragment Fab. De même, les fonctions contrôlant le catabolisme des IgM semblent indépendantes de l'intégralité des liaisons disulfures (Dorrington, 1978). Par contre, les résultats concernant la fixation du composant C1q sur le fragment Fc ont été longtemps contradictoires : certains auteurs (Schur et Christian, 1964) ont montré que cette activité était conservée en absence de ponts disulfures, d'autres ont démontré le contraire (Isenman et al. , 1975). En fait, Ellerson et al. (1976) ont observé que c'est la liaison entre les 2 chaînes lourdes (donc concernant le fragment Fc) qui importait dans l'interaction de l'Ig avec le C1q.

La zone charnière, située entre les fragments Fab et Fc est directement impliquée dans la flexibilité de la molécule; elle participe donc à l'activation des

fonctions effectrices (Klein et al. , 1981).

d - Conclusion. De cette étude fonctionnelle des domaines, il résulte que relativement peu d'activités sont exprimées par des fragments représentatifs d'un seul domaine. La majorité d'entre elles implique une collaboration entre différents domaines et semblerait même modulée par des fragments distants dans la molécule. Cela laisse aussi supposer qu'une information sous la forme de modifications conformationnelles pourrait être transmise d'un domaine à l'autre à l'intérieur d'une sous-unité. C'est ainsi que graduellement la molécule d'Ig est apparue régie dans ses relations structure-fonctions par des interactions plus subtiles que celles sous-entendues par l'hypothèse des domaines d'Edelman.

B - FONCTIONS ATTRIBUABLES AUX CHAINES GLYCANNIQUES DES IGM

1 - Les glycanes et la stabilisation de structure des IgM :

a - Leurs relations avec la chaîne polypeptidique.

En 1972, Marshall annonçait que les glycanes augmentaient la solubilité des Ig, de même que Leavitt et al. (1977). Chou et Fasman, en 1974, ont montré que le triplet accepteur Asn-X-Ser/Thr de la glycosylation avait peu d'affinité pour une conformation en hélice α ou en feuillet β ; sa préférence pour les structures courbes β , arrangées en "épingle à cheveu" ou en "coude", tend à disposer les chaînes glycaniques à la surface de la protéine, comme nous l'avons déjà noté (p. 49). Les glycanes forment ainsi une couche protectrice de la partie protéique contre le solvant et contre les agents protéolytiques. En 1978, Kaverzneva

et al. ont établi un parallélisme entre la destruction de la conformation native et la perte de 30 à 40% des glycanes constitutifs d'IgM.

b - Leur rôle dans la stabilisation et les changements de conformation : espaceurs inter-domaines.

En 1971, Shimizu et al. notaient que les chaînes oligosaccharidiques "créaient des espaces entre les sous-unités, évitant toute interférence stérique possible entre les multiples sites de liaison et favorisant donc l'efficacité de leur expression". Huber et al. (1976) ont montré que dans les IgG, les glycanes empêchaient un contact peptidique interchaîne entre les domaines $C_{\gamma} 2$ et entre les domaines $C_{\gamma} 1$ et $C_{\gamma} 2$ d'une même chaîne γ . Dans le cas des IgM ce sont les domaines $C_{\mu} 3$ qui n'ont aucun contact. Deisenhofer (1981) a démontré par étude cristallographique aux rayons X du fragment Fc d'une IgG que les antennes des structures glycaniques liées en $\alpha-1,6$ sur le noyau pentasaccharidique sont responsables des interactions glycanne-protéine tandis que les antennes liées en $\alpha-1,3$ sont impliquées dans les interactions glycanne-glycanne. Rademacher et al. (1983) ont observé parmi les structures oligosaccharidiques du fragment Fc de plusieurs IgG (Homme et Lapin) une certaine rigidité des antennes liées en $\alpha-1,3$ par rapport à une relative liberté d'orientation des antennes liées en $\alpha-1,6$. Plus particulièrement sur une IgG de Lapin, après avoir démontré une hétérogénéité structurale du noyau, réputé invariable, et des résidus externes, ils n'ont obtenu aucune cristallisation du fragment Fc, sélective de ces différentes structures. Les auteurs en ont déduit que les séquences spécifiques d'oligosaccharides n'influençaient pas le

maintien de la conformation protéique mais qu'elles devaient, ainsi que les antennes liées en α -1,6, participer à l'élaboration de "variants structuraux" responsables des phénomènes de reconnaissance dans lesquels les immunoglobulines sont impliquées.

Les oligosaccharides jouent aussi un rôle décisif dans les modifications de la conformation. Nous l'avons déjà annoncé p. 82 , mais nous lui donnons ici toute son importance du fait de son impact sur les fonctions effectrices des IgM. Deisenhofer et al. (1976) et Huber et al. (1976) ont démontré par diffraction aux rayons X que les glycanes intervenaient directement dans la conversion de l'Ac sous forme libre, flexible, "Y", en forme complexée (avec l'Ag), rigide, "T". A la suite de cette transformation, la flexibilité des chaînes glycaniques est augmentée (William et al. , 1977) entraînant inévitablement un changement de conformation de la région Fc (Schlessinger et al. , 1975; Brown et Koshland, 1975; Chiang et Koshland, 1979). De telles modifications structurales provoquent une activation des fonctions effectrices portées par le fragment Fc (Nose et Wigzell, 1983).

c - Le rôle des glycanes dans la sécrétion des IgM.

La théorie d'Eylar est aussi discutée pour les Ig que pour les autres glycoprotéines car les résultats varient selon la classe considérée (Hickman et al. , 1977; Hickman et Kornfeld, 1978). Une hiérarchie de l'inhibition de leur sécrétion par la tunicamycine a pu être établie pour les différentes classes (IgM > IgE > IgA > IgG) reflétant directement la glycosylation des chaînes H impliquées : la conclusion suivante s'imposait : le degré de glycosylation d'1 IgM détermine l'importance de la nécessité des glycanes dans son transport et sa sécrétion. Les



Les travaux de Sidman (1981) devaient rapidement la contredire car ils démontraient la possibilité de sécrétion d'IgD en présence de tunicamycine; or il est bien connu que la chaîne δ est autant glycosylée que la chaîne μ (Neuberger et Rajewsky, 1981). Rappelons que Tartakoff et al. (1979) ont observé, en présence de tunicamycine, la synthèse de chaînes μ_s , leur polymérisation et la sécrétion d'IgM non glycosylées par la cellule, avec toutefois un ralentissement dans la cinétique.

L'interprétation de ces résultats est la même que pour les glycoprotéines en général (voir p. 81) : c'est donc plutôt du point de vue fonctionnel que synthétique (passeport pour l'excrétion) que la nécessité des glycannes doit être considérée.

2 - Les glycannes comme signaux de reconnaissance :

a - Catabolisme des complexes immuns.

Morell et Riesen (1981) ont suivi la dégradation des complexes immuns depuis le moment de leur fixation sur le récepteur membranaire de la cellule phagocytaire jusqu'à leur digestion dans le milieu intracellulaire, par l'étude de la diminution progressive de la radioactivité liée à ces complexes. Leurs résultats sont en accord avec le phénomène de pinocytose décrit par Leslie (1980) : après ingestion du complexe par endocytose, celui-ci est transporté intracellulairement dans des vésicules; par fusion avec les lysosomes, suivie d'une digestion par les enzymes lysosomiaux il est dégradé en sous-produits qui sont excrétés hors de la cellule par exocytose (voir Fig. 22 p. 101). Ce schéma catabolique est ressemblant au phénomène de transport intracellulaire décrit par Gogstad et Helgeland (1982) faisant intervenir des systèmes de

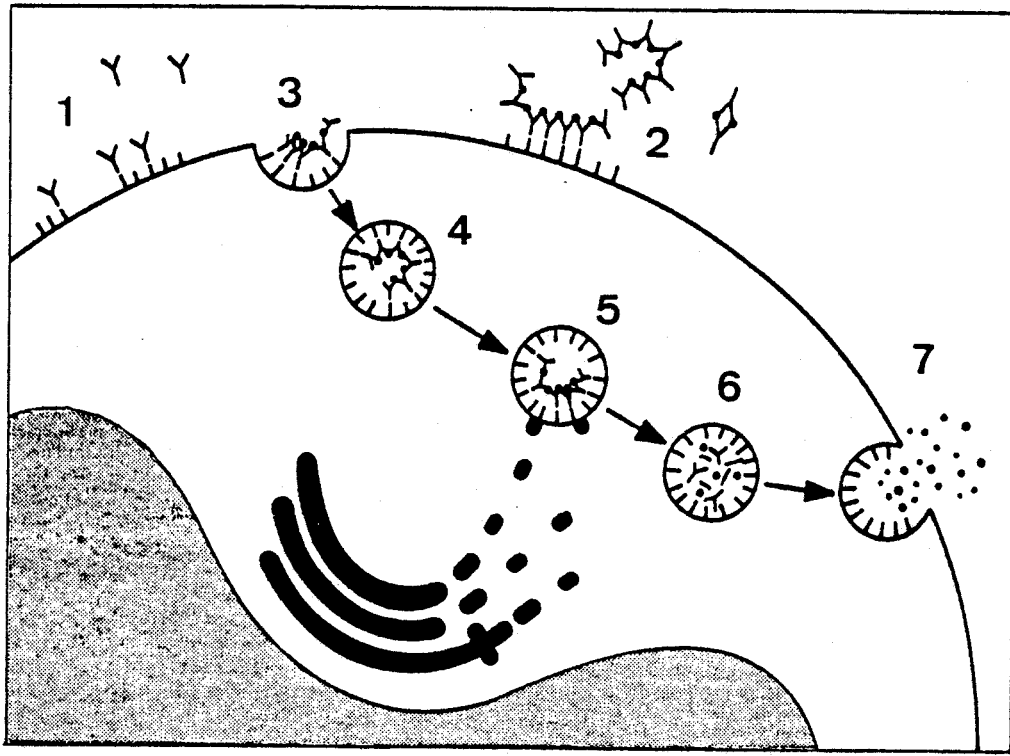


Figure 22 : Schéma représentant les différentes étapes impliquées dans le catabolisme des complexes immuns solubles (d'après Leslie, 1980)

- (1) Attachement des IgG monomériques aux récepteurs Fc;
- (2) Attachement des complexes immuns sur ces récepteurs;
- (3) Ingestion;
- (4) Transport intracellulaire sous forme de pinosomes;
- (5) Fusion avec des lysosomes;
- (6) Digestion des ligands;
- (7) Excrétion des catabolites .

reconnaissance impliquant les oligosaccharides : les ligands (complexes immuns) seraient, grâce à des motifs oligosaccharidiques portés par leur fragment Fc, reconnus par les récepteurs membranaires correspondants, déclenchant ensuite le processus d'invagination de la membrane et l'évolution catabolique du phénomène. Actuellement, l'intervention directe des glycanes dans ce mécanisme n'a pas encore été mise en évidence, les résultats des travaux de l'équipe de Baynes impliquant, d'une part les résidus mannose dans l'élimination des complexes immuns à IgM (Day et al. , 1980) et d'autre part les résidus de galactose dans l'élimination des complexes à IgG (Thornburg et al. , 1980) ayant récemment été infirmés (Baynes , 1983). Rappelons que Knutson et al. (1977) ont affirmé que l'étape de reconnaissance et de fixation du complexe sur le récepteur cellulaire était décisive. On peut donc penser que similairement au système de reconnaissance mannose/N-acétylglucosamine des enzymes lysosomiaux, porté par les macrophages (Stahl et al. , 1978), les complexes immuns sont éliminés par les macrophages, les cellules du foie (cellules de Kupffer) et les cellules du système réticulo endothélial (cellules de la rate et de la moelle osseuse) par le même phénomène de reconnaissance spécifique entre motifs glucidiques.

b - Contrôle de l'homéostasie des IgM.

La durée de vie d'une immunoglobuline est dépendante de l'intégralité de la fraction glycanique, de la même façon que celle d'une glycoprotéine plasmatique. Winkelhake et Nicolson (1976) ont démontré l'élimination rapide de la circulation d'Ac aglycosylés; par l'utilisation d'exo-glycosidases spécifiques ils ont noté que les Ac désialylés étaient rapidement captés par le foie alors que ceux amputés du galactose ou de la N-acétylglucosamine étaient retrouvés au niveau des reins. C'est la région Fc qui semble responsable de

ces phénomènes de reconnaissance de modèles altérés et plus particulièrement le domaine C γ 2 chez les IgG, le seul à être glycosylé.

3 - Conclusion :

Les oligosaccharides ne semblent pas essentiels à la sécrétion des immunoglobulines des cellules productrices; leur rôle est à considérer plutôt à l'extérieur de la cellule que lors du transport intracellulaire de l'Ig en cours de maturation. Il est triple :

- soit indirect : d'une part dans le maintien d'une certaine conformation (avec l'aide des ponts disulfures et de la région charnière), et d'autre part dans l'établissement de ponctuations entre les domaines, assurant une coopération avec les chaînes polypeptidiques envers les fonctions effectrices, par des changements structuraux subtils, après fixation de l'Ag et avant la reconnaissance du complexe immun par le récepteur Fc;
- soit direct : en impliquant certains résidus ou motifs monosaccharidiques dans des phénomènes de reconnaissance cellulaires.

Ces nombreux exemples prouvent que les glycannes sont de plus en plus impliqués dans des phénomènes à médiation cellulaire, comme des marqueurs porteurs d'une information et d'une reconnaissance discrètes.

CHAPITRE V : CONCLUSIONS

De la revue générale que nous venons de présenter, il ressort que les glycoconjugués sont très répandus dans le monde vivant et que les progrès concernant leur partie glycosylée se sont considérablement développés durant la dernière décennie. Malgré cela, les connaissances acquises sur les glycoprotéines accusent encore actuellement un certain retard sur celles obtenues sur les acides nucléiques et les protéines; les raisons de la lenteur de ce développement proviennent certainement du fait que les glucides constitutifs des glycoconjugués ont pendant longtemps été considérés comme des substances de réserve ou de support structural. Ce n'est que lorsque quelques scientifiques ont compris que seule la connaissance de la structure primaire des glycannes était à la base d'une "biologie moléculaire" et d'une pathologie des glycoprotéines que se sont développées les méthodes d'investigations structurales, physiques, chimiques et enzymatiques.

Grâce à cette technologie, depuis une dizaine d'années, de nombreuses structures glycanniques ont été décrites et ont permis de proposer des "lois structurales"; celles-ci concernent la substitution d'un noyau pentasaccharidique commun par des structures oligosaccharidiques ou antennes portant la spécificité biologique des glycannes. Les principales variables observées concernent :

- le nombre et la nature des antennes;
- la nature, le nombre et la distribution des liaisons glycosidiques des monosaccharides en position terminale, c'est à dire : pour l'acide N-acétylneuraminique en α -2,6 et/ou en α -2,3; pour le fucose en α -1,3 et/ou

en α -1,6; et pour le galactose en β -1,4 et/ou en β -1,3; -le nombre et le type structural des glycanes liés à la protéine.

A la lumière de toutes ces études structurales certaines règles de substitution et d'exclusion mutuelle entre résidus glucidiques se sont dégagées (Montreuil, 1982), facilitant l'élucidation d'une structure ou permettant même sa prédiction. Malgré un nombre de schémas structuraux très restreint, les possibilités de diversification mineure sont nombreuses et peuvent parfois entraîner une hétérogénéité structurale importante à l'intérieur d'une même glycoprotéine.

D'une autre façon, l'étude de nombreuses structures glycaniques a permis d'élucider les différentes étapes de la biosynthèse des protéines N-glycosylées, le phénomène de glycosylation semblant universel.

Le rôle biologique exact des glucides est par contre moins bien résolu. Cependant, aucun doute ne subsiste sur sa réalité si l'on considère la conservation à travers l'Evolution des espèces de certaines structures glycaniques et de leur procédé biosynthétique, ce dernier nécessitant un déploiement énorme d'information génétique pour la production d'enzymes, de substrats et de cofacteurs.

Compte-tenu des données actuelles, les structures oligomannosidiques, co-translationnelles, apparaissent comme des intermédiaires métaboliques dans la maturation des protéines ne jouant un rôle biologique qu'accessoire; elles seraient plutôt utilisées pour maintenir une certaine conformation moléculaire de la protéine au cours de son transport intracellulaire, la protégeant des nombreuses dégradations protéolytiques auxquelles elle est exposée. Les structures complexes, au contraire, constituent l'essentiel des modifications post-translationnelles de la glycosylation et sont por-

teuses de spécificités biologiques. La participation la plus importante revient aux monosaccharides externes tels que le fucose et l'acide N-acétylneuraminique, ce dernier pouvant contracter de nombreuses liaisons différentes. Ils servent de signaux de reconnaissance et leur élimination de la molécule entraîne souvent une perte de la fonction biologique correspondante.

Malgré l'avancement rapide des découvertes dans le domaine des glycoconjugués, de nombreuses questions restent à résoudre. Elles concernent, nous l'avons vu, le rôle exact des glycannes dans les glycoprotéines, mais aussi la biosynthèse même des glycannes, du fait de la complexité de ses réactions, et sa régulation :

- pourquoi un intermédiaire lipidique transporteur (Do1-P-P) ?

- pourquoi la présence de glucose (3 résidus terminaux) dans le précurseur alors qu'il n'est pratiquement jamais retrouvé dans une glycoprotéine mature ?

- pourquoi un précurseur si long puisqu'il doit ensuite être raccourci par l'action de glycosidases spécifiques ?

Ce n'est que par l'étude structurale étendue à des glycoprotéines de sources très diverses, et par l'emploi de nouveaux outils tels que les anticorps monoclonaux et certains mutants bien définis que ces différents problèmes pourront être élucidés.

Toutefois, la méthodologie d'investigation structurale est maintenant suffisamment maîtrisée pour entreprendre des études comparatives entre glycoprotéines normales et pathologiques, afin d'en dégager des informations sur la pathologie des glycannes, donc sur leur métabolisme. C'est ce que nous avons essayé d'obtenir au cours de nos travaux.

MATERIEL ET METHODES

I - ORIGINE DES IMMUNOGLOBULINES

Les immunoglobulines IgM qui constituent le matériau utilisé lors de cette étude ont été préparées à partir de prélèvements individuels.

A - IgM PATHOLOGIQUES

Les échantillons d'IgM purifiées, provenant de patients atteints de macroglobulinémie de Waldenström (ESP, DUB, SCH, LAU, MOS, CAI, LET, GIR, DEN, COL) nous ont aimablement été fournis à l'état lyophilisé par le Dr Mihaesco (Hôpital Saint-Louis, Paris; Unité INSERM U 108 : Immunochimie et Immunopathologie).

Deux sérums de malades atteints de la même affection (GRA) et (ZAJ) nous ont été envoyés par le Dr Saleun (Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Brest), et les 6 autres prélèvements (DID, ROS, COU, REN, VAS, LEC) nous ont été confiés sous forme de plasmaphères par le Prof. Boivin (Hôpital Beaujon, Paris; Unité INSERM U 160 : Enzymologie des cellules sanguines).

B - IgM NORMALES

Les IgM normales ont été isolées de 8 sérums normaux individuels, dons du Dr Soulier (Centre National de Transfusion Sanguine, Paris).

II - PREPARATION DES IgM

A - IgM PATHOLOGIQUES

1 - Classification physico-chimique des IgM:

Leur préparation consiste, dans un premier temps, à obtenir une fraction enrichie en IgM. Auparavant, un échantillon de chaque prélèvement est soumis à trois

tests physicochimiques qui permettent de caractériser le type d'immunoglobuline étudiée.

a - Test de Sia (1924). Caractéristique d'une euglobuline. Le test est positif quand 2 ou 3 gouttes de sérum ou de plasma forment un précipité blanchâtre en tombant dans un tube contenant de l'eau distillée.

b - Test de cryoprécipitation. Caractéristique d'une cryoglobuline (Lerner et Watson, 1947). Un échantillon sérique ou plasmatique, laissé au repos à 4°C, précipite ou gélifie dans le cas d'une cryoglobuline.

c - Test de pyroprécipitation. Caractéristique d'une pyroglobuline (Martin et Mathieson, 1953). Inversement, un échantillon contenant une pyroglobuline peut précipiter à température ordinaire ou à une température comprise entre 20 et 56°C.

Cette classification permet une orientation du mode de préparation des IgM à isoler. En ce qui concerne les plasmaphérèses, une défibrination doit être effectuée avant toute étape de purification : un caillot de fibrine est obtenu, selon Haupt *et al.* (1970), après addition de 12 ml de CaCl_2 1,3 M par litre de plasma; après un repos d'une heure à 4°C, le caillot est éliminé par centrifugation à froid, 30 min. à 7000 tours/min.

2 - Préparation des euglobulines: Les conditions maximales de précipitation de l'IgM à étudier sont déterminées en traçant une courbe de Vargues (1955). Celle-ci traduit l'insolubilité des immunoglobulines en fonction du pH et permet de sélectionner un pH optimum de précipitation, plutôt alcalin (ex : pH 7,8) pour 1 IgM euglobulinique contaminée par 1 IgG, celle-ci précipitant souvent à un pH plus acide (ex : pH 6). Selon cet exemple,

l'IgM sera précipitée par dialyse du sérum dilué 10 fois, contre du tampon universel de Britton et Robinson 0,005 M à pH 7,8, pendant une nuit à 4°C. Le précipité recueilli par centrifugation est redissous dans un minimum de NaCl 0,15 M. La même opération de précipitation-dissolution est répétée 3 fois.

3 - Préparation des cryoglobulines:

Elle repose sur la propriété de l'immunoglobuline de précipiter à froid et sur la réversibilité de la réaction. Le sérum, réparti dans des pots à centrifuger, est laissé au repos une nuit à 4°C. Le précipité formé est recueilli par ultracentrifugation à froid pendant 30 min. à 36 000 tours/min. (Beckman Spinco 50, rotor 40); il est redissous à 37°C dans du tampon phosphate de potassium 0,3 M, NaCl 0,1 M, pH 7,3 et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Après quatre cycles : lavage du précipité-centrifugation, la dernière ultracentrifugation est effectuée pendant 50 min. à 46 000 tours/min. (rotor 50). Le précipité est alors redissous dans un minimum de NaCl 0,15 M.

4 - Préparation des pyroglobulines: Dans ce cas, la propriété de l'IgM de précipiter à la chaleur ne peut être utilisée car la réaction est irréversible. La préparation est donc la même que pour une IgM non thermolabile et dépend uniquement de son caractère eu- ou pseudoglobulinique.

5 - Préparation des macro-pseudoglobulines:

Par opposition aux macro-euglobulines, elles précipitent en présence de concentrations salines élevées, notamment entre 40 et 50% de saturation en sulfate d'ammonium pour les IgM. Une solution de sulfate d'ammonium saturée est ajoutée au sérum avec agitation magnétique; le précipité recueilli par centrifugation et redissous dans une solution de NaCl 0,15 M, est soumis

à une nouvelle précipitation. Le précipité final est lavé abondamment par dialyses successives contre de l'eau distillée, pour éliminer le sulfate d'ammonium et redissous dans un minimum de solution NaCl 0,15 M; il est dialysé pendant 24 h à 4°C contre cette même solution.

B - IgM NORMALES

La concentration en IgM d'un sérum normal étant faible (0,5 à 1 g/l), nous avons suivi la méthode de Wichman et Borg (1977) qui propose un enrichissement en IgM par chromatographie d'affinité sur une colonne de protamine-Sepharose 4B. L'IgM interagit avec la protamine à pH neutre et est éluée de la colonne par augmentation de la force ionique à l'aide de NaCl.

1 - Préparation de l'adsorbant:

a - Activation du Sepharose. Elle est réalisée selon March et al. (1974) par réaction à froid (agitation pendant 2 min. exactement) d'une solution de bromure de cyanogène dans l'acétonitrile (1 g/ml d'acétonitrile) avec une solution de Sépharose 4B dans du carbonate de potassium 2 M, à raison de 250 mg de CNBr par ml de Sepharose à activer. La suspension est lavée abondamment à l'eau froide par filtration sur verre fritté pour éliminer toute trace de bromure de cyanogène.

b - Couplage Sepharose 4B-protamine. 0,44g de protamine libre (grade IV de chez Sigma), en solution dans 50 ml de bicarbonate de sodium 0,1 M, est ajoutée, après ajustement de pH à 8,9, à 100 ml de Sepharose 4B activé. Une agitation magnétique est maintenue pendant 18 h à la température du laboratoire. La suspension est ensuite lavée intensivement sur filtre en verre fritté par 1 l de solution froide de bicarbonate de sodium 0,1 M.

Le Sepharose, repris ensuite par 400 ml d'une solution de glycolle M et agité pendant 2 à 3 h. à la température ambiante, est filtré, lavé à l'eau distillée et équilibré avec le tampon de chromatographie de gel filtration. (Le glycolle a pour but de bloquer les groupements fonctionnels résiduels du Sepharose).

2 - Isolement des IgM:

a - Adsorption des IgM sériques. La première étape de la purification consiste à mélanger dans un erlenmeyer (100 ml) de protamine - Sepharose 4B équilibrée avec du tampon phosphate pH 7,4 (I) (phosphate de sodium 0,08 M, NaCl 0,077 M, azide de sodium 0,02 %) et un volume d'eau distillée (200 ml). La suspension est agitée pendant 3 h. à 4°C.

b - Elution des protéines. Le gel est ensuite filtré et lavé à température ordinaire avec 400 ml de tampon phosphate pH 7,4 (I) dilué (1 volume tampon / 2 volumes H₂O). Le gel est ensuite versé dans une colonne de 160 ml (2,6 x 30 cm); il est bleuté du fait de l'adsorption de la céruloplasmine sérique. L'élution des protéines non adsorbées est suivie par lecture de la DO à 280 nm dans le liquide effluent; quand l'absorption devient nulle l'élution des protéines adsorbées est amorcée par passage sur la colonne du tampon phosphate pH 7,4 (II) non dilué (phosphate de sodium 0,08 M, NaCl 1,1 M, azide de sodium 0,02 %).

Les fractions absorbant à 280 nm sont rassemblées, dialysées contre du tampon Tris HCl 0,1 M, NaCl 1 M, glycine 0,01 M pH 8,0 (azide de sodium 0,02 %), et concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote, dans une cellule Diaflo, sur membrane Amicon (UM 10).

C - PURIFICATION DE LA FRACTION ENRICHIE EN IgM.

La dernière étape de purification des fractions enrichies en IgM, obtenues dans les différents cas, est une gel-filtration à 4°C sur colonne de Sepharose 6B (Pharmacia - Fine Chemicals) (5 x 100 cm) stabilisée dans le tampon Tris HCl pH 8,0, décrit précédemment. Le débit de l'éluion est réglé à 20 ml/h et les fractions recueillies ont un volume de 4 ml. Celles correspondant à l'IgM sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration (Diaflo), et dialysées contre une solution de NaCl 0,15 M.

D - VERIFICATION DE L'HOMOGENEITE DES IgM PREPAREES.

La pureté des préparations d'IgM a été établie par contrôle des critères immunologiques obtenus par différentes techniques. La concentration protéique des échantillons est déterminée par la méthode de Lowry *et al.*(1951).

1- Electrophorèse sur acétate de cellulose : Elle est réalisée selon Kaplan et Savory (1965) à température ambiante, dans du tampon véronal 0,09 M pH 8,6 pendant 17 min. à 250 V. Les protéines sont révélées par une coloration au rouge ponceau.

2 - Immunoélectrophorèse sur gélose : Nous avons utilisé la microtechnique de Scheidegger (1955) adaptée à la méthode de Grabar et Williams (1955). La première étape, électrophorétique est effectuée à la température du laboratoire, en tampon véronal 0,1 M pH 8,2 pendant 2 h. sous une tension de 21 Volts. La deuxième étape, immunologique, consiste en une diffusion des protéines qui ont migré contre un sérum de lapin anti IgM et contre un sérum humain normal. Elle se développe pendant 48 h, toujours à température ambiante. Les protéines sont révélées par le réactif à l'Amidoschwartz.

3 - Immunodiffusion double : Le procédé d'Ouchterlony (1949) permet, par une diffusion de 48 h à 18-20°C en gel d'agar, de repérer les complexes Anticorps-Antigène (Ac-Ag) sous forme d'un trait de précipitation. Une variante de cette technique (Hartmann et Toilliez, 1957) peut être adaptée à un dosage semi-quantitatif d'antigène (Ag) ou d'anticorps (Ac).

4 - Immunodiffusion radiale : La méthode proposée par Mancini *et al.* (1965) est quantitative. Elle consiste en une diffusion radiale (48 h à température ambiante) dans l'agarose contenant l'anticorps, de l'antigène correspondant, déposé dans un puits ; autour de ce puits se forme un halo clair souligné d'un arc de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la quantité d'Ag.

II - STRATEGIE D'ETUDE DES IgM

Le travail que nous avons entrepris concernant plusieurs IgM, la même méthodologie sera appliquée à chacune d'elles, depuis sa purification jusqu'à l'analyse structurale d'une chaîne glycanique donnée. Des comparaisons seront donc autorisées entre les résultats obtenus au cours des différents stades d'investigation. Quatre étapes principales se dégagent de cette démarche :

A - CARACTERISATION CHIMIQUE DES IgM PURIFIEES.

1 - Composition en acides aminés : La composition des IgM en acides aminés est déterminée par chromatographie sur résines échangeuses d'ions (autoanalyseur Beckman 120 C), selon Spackman *et al.* (1958). Les IgM sont soumises à une hydrolyse acide (HCl 6N) en tube scellé sous vide à 105°C pendant 22, 48, 72 et 96 h. Les osamines sont libérées par une hydrolyse plus douce (HCl 4N 4 h. à 100°C). La cystéine et la méthionine sont déterminées après oxydation périodique, respectivement en acide cystéique et en méthionine sulfone selon Moore (1963).

2 - Composition centésimale en monosaccharides

La composition centésimale en oses est obtenue par application des méthodes colorimétriques décrites dans la monographie de Montreuil et Spik (1963)

a - Dosage des oses neutres. Les oses neutres totaux sont déterminés par leur réaction avec l'orcinol sulfurique selon la méthode de Tillmans et Philippi (1929) modifiée par Rimington (1931).

b - Dosage des osamines. Les osamines libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N 4h. à 100°C) sont dosées après neutralisation, par le procédé d'Elson et Morgan (1933), modifié par Belcher *et al.*(1954).

c - Dosage des acides sialiques totaux. Les acides sialiques libres ou conjugués sont dosés par le réactif de Dische (1930) à la diphénylamine, selon la méthode de Werner et Odin (1952).

3 - Composition molaire en monosaccharides :

Les rapports molaires des résidus glycidiques sont obtenus par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse selon un procédé personnel décrit dans l'article N° 1 page 124 . Celui-ci permet une étude différentielle des oses neutres et aminés, ces derniers étant identifiés par un détecteur thermoionique sélectif des composés azotés et phosphorés. Au cours des étapes ultérieures d'études structurales la méthode de Zanetta *et al.*(1972) a été utilisée sans diminuer la validité des premiers résultats.

Fournet *et al.*(communication personnelle) ont adapté la technique de Zanetta à des microquantités de produit (ex. 5 μ g d'oligosaccharide auxquels sont ajoutés 2 μ g d'étalon interne : le mésoinositol) introduites dans un fragment de pipette Pasteur bouché en forme de cône et lui-même placé dans un petit tube à méthanolyse.

Après lyophilisation le produit est méthanolysé pendant 24 h. à 85°C en prenant soin de saturer le milieu extérieur avec du méthanol chlorhydrique 0,5 N. Après évaporation sous azote le résidu est repris par 20 µl de dichlorométhane et 20 µl d'anhydride trifluoroacétique, et le milieu extérieur est saturé avec ce même mélange réactionnel. Une étude cinétique de la réaction de trifluoroacétylation a prouvé qu'elle était complète après un séjour de 2 h. à l'étude à 37°C.

4 - Caractérisation des acides sialiques :

Les glycoprotéines animales contiennent des acides sialiques le plus souvent sous la forme N-acylée. La distribution des radicaux N-acyl semble limitée au radical N-acétyl chez l'Homme (voir la revue générale de Montreuil, 1982), et au radical N-glycolyl chez les autres animaux. Le dernier groupement a été identifié par Brenckle et Kornfeld (1980) dans une IgM de plasmocytome de Souris par Aminoff *et al.* (1979) dans une glycoprotéine sécrétée par la glande sous-maxillaire de Porc, et par Inoue *et al.* (1979) dans un oligosaccharide constitutif de l'oeuf de Truite. Afin de vérifier la nature des acides sialiques contenus dans les IgM étudiées nous avons utilisé la méthode décrite par Schauer (1978) qui permet de différencier les deux radicaux N-acétyl et N-glycolyl, contrairement à l'étude en chromatographie en phase gazeuse. Dans ce dernier cas les radicaux N-acyl libérés par méthanolyse sont systématiquement N-réacétylés dans l'étape suivante. La technique de Schauer consiste en une hydrolyse formique douce (ajustage du milieu réactionnel à pH 2,2 avec de l'acide formique 1N) 1 h. dans un bain marie à 70°C. Après dessalage sur résine Dowex 50 W X 2 (200-400 mesh) et concentration au Bucchi en présence de méthanol, les acides sialiques recueillis sont soumis à une chromatographie sur couche mince sur plaque de cellulose (Merck). La plaque est soumise à une pré-migration dans HCl 0,1N, l'échantillon est déposé, et une migration ascendante est effectuée dans le système solvant : n-butanol, n-propanol, HCl 0,1N (1/2/1 ; v/v).

Les acides sialiques sont révélés à 110°C en atmosphère humide, après pulvérisation du réactif orceinol/FeCl₃ décrit par Schauer.

5 - Caractérisation des chaînes légères et leur glycosylation éventuelle :

a - Immunoélectrophorèse. Les chaînes légères sont identifiées par immunoélectrophorèse de l'IgM native contre les sérums immuns de lapin anti-chaîne L (DAKO-immunoglobulins, Denmark).

b - Séparation des chaînes légères et lourdes. Elle est réalisée par réduction et alkylation de l'IgM d'après Suzuchi et Deutsch (1967). Les ponts disulfures intercaténaux sont rompus par un agent réducteur : le β-mercaptoéthanol 1M sous azote, à pH 8,0 pendant 3 h. à la température du laboratoire. Les groupements SH ainsi libérés sont bloqués par un agent alkylant l'iodoacétamide 1M à pH 8,0 pendant 1 h. à température ambiante. Les réactifs en excès sont éliminés par dialyse contre une solution d'acide acétique 1M. Après concentration par ultrafiltration le mélange des chaînes est soumis à une gel-filtration sur une colonne de Sephadex G 100 (2,6 x 80 cm) éluée par de l'acide acétique 1M.

c - Purification des chaînes L sur immuno-adsorbant. Le premier pic élué de la colonne ci-dessus, correspondant aux chaînes L, est purifié sur un immuno-adsorbant contenant un sérum immun de lapin monospécifique anti-chaîne κ humaine ou anti-chaîne λ (produits Dako) selon le type étudié. Le couplage du sérum immun sur le Sepharose 4B, préactivé au bromure de cyanogène (Pharmacia Fine Chemicals) est effectué selon le procédé de Axén *et al.* (1967) : il a lieu en tampon bicarbonate de sodium 0,1M, NaCl 0,5 M, pH 8,5 par agitation douce une nuit à 4°C. Il est suivi par la mesure de l'absorption du

du surnageant à 280 nm. Après un lavage destiné à éliminer le matériel non fixé les groupements actifs du Sepharose laissés libres sont bloqués par action d'une solution d'éthanolamine 1M pendant 2 h. à pH 8,0. Le gel est versé dans une colonne en verre (1 x 13 cm) et rincé abondamment par une solution de NaCl 0,15 M. L'immunoabsorption est réalisée par contact du produit à purifier dans un volume équivalent aux 3/4 de celui du gel, environ 1 h. à température ambiante. La colonne est ensuite lavée par 3 fois son volume de NaCl 0,15 M (la DO à 280 nm étant suivie dans l'éluat) et la substance immunoabsorbée (chaîne L) est décrochée par du tampon glycolle HCl 0,1M pH 2,8. Le gel est ensuite lavé avec du tampon glycolle pH 2,2 et rééquilibré avec la solution de NaCl 0,15 M. Après dialyse contre une solution de NaCl 0,15 M et concentration par ultrafiltration, chaque chaîne légère est soumise à une immunoélectrophorèse pour contrôler sa pureté.

d - Etude d'une glycosylation éventuelle des chaînes L. Selon Shimizu *et al* (1971) 15 % des chaînes légères sont glycosylées parmi les immunoglobulines humaines. Nous avons donc recherché cette éventualité en analysant les sucres libérés après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse.

B - PREPARATION DES CHAINES OLIGOSACCHARIDIQUES.

1 - Hydrazinolyse : Les unités oligosaccharidiques sont obtenues directement à partir de l'IgM native par hydrazinolyse selon Bayard et Montreuil (1974). l'hydrazine anhydre coupe la liaison amide unissant la partie glucidique à la chaîne polypeptidique. Les conditions de la réaction ainsi que le traitement des hydrazinolysats sont décrits p.166. Les groupements "amine" des glycanes obtenus étant N-désacétylés, une N-réacétylation est effectuée selon la méthode de Reading

et al (1978). La fraction glycanique est dissoute dans 1 ml de bicarbonate de sodium saturé et N-réacétylée par 5 additions successives, toutes les 20 min., d'anhydride acétique. Une purification est effectuée par gel filtration sur colonne de Bio-Gel P-2 (1,5 x 32 cm) et élution par une solution aqueuse d'acide acétique à 1 % (v/v).

2 - Réduction et purification des glycannes :

Les conditions expérimentales de la réduction par le borohydrure tritié, selon Takasaki et Kobata (1978) sont décrites p.166. La fraction oligosaccharidique ainsi traitée est soumise à un dessalage sur une colonne de Bio-Gel P-2 (1,5 x 70 cm) dans l'eau distillée. Lors de leur élution de la colonne les glycannes sont repérés par pulvérisation avec le réactif à l'orcinol sulfurique (200 mg d'orcinol dans 100 ml d'une solution aqueuse à 20 % d'acide sulfurique) des spots correspondant aux fractions recueillies et déposées sur un fragment de gel de silice.

3 - Fractionnement des oligosaccharides purifiés

La résolution des oligosaccharides en différentes fractions par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline A (Con A) immobilisée sur Sepharose 4B est décrite p.166. Ce fractionnement a été réalisé en tenant compte de l'affinité différenciée de la Con A pour certains motifs glycaniques, propriété décrite par Debray et Montreuil (1978) ; Narasimhan *et al* (1979) ; Montreuil *et al* (1983) ; Debray *et al* (1983) et Debray *et al* (1984). Un calibrage de la colonne avec des structures connues (cf. p.166) a permis d'individualiser trois fractions :

- une fraction A non retenue, éluee avec le tampon d'équilibration, constituée de structures tri- et tétraantennées ;

- une fraction B faiblement retenue, éluée avec une molarité de 0,01 M en α - méthyl - D glucoside, composée de structure biantennées ;

- une fraction C fortement retenue, éluée avec une molarité en α - méthyl - D - glucoside de 0,3 M, ne contenant que des structures oligomannosidiques.

4 - Caractérisation des oligosaccharides

après fractionnement : Après leur résolution sur ConA les fractions glyconiques sont soumises à une analyse quantitative par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et par comptage de leur radioactivité (tritium). Parallèlement une analyse qualitative est effectuée par chromatographie sur couche mince (TLC) sur plaque de gel de silice 60 (Merck) dans les systèmes solvants suivants :

- solvant rapide (Bayard *et al*, 1979), pour les structures N-acétyllactosaminiques : éthanol, n-butanol, pyridine, eau, acide acétique (100/10/10/30/3; v/v) ;

- solvant "lent" (Palo et Savolainen, 1972), pour les structures oligomannosidiques : n-butanol, acide acétique, eau (2/1/1 ; v/v).

Les structures de référence, utilisées comme témoins de migration sont indiquées p.167 .

C - APPROCHE STRUCTURALE DES OLIGOSACCHARIDES.

1 - Sous-fractionnement des fractions obtenues sur colonne de ConA : Une amélioration de la résolution des différents groupes structuraux s'imposait avant de leur appliquer les techniques d'étude structurale. Les

modalités de ce sous-fractionnement différent selon le type de glycanne auquel il s'adresse :

a - Chromatographie liquide haute pression.

Une résolution des fractions oligomannosidiques est effectuée par chromatographie liquide haute pression sur une colonne Amino AS-5 A de 5 μm (Touzart et Matignon) selon Paz-Parente *et al* (1982a); l'élution des oligomannosides de tailles différentes est obtenue par un gradient acétonitrile-eau. Les conditions expérimentales de cette séparation sont décrites p.183 .

b - Electrophorèse à haut voltage sur papier. Les fractions de type N-acétyllactosaminique sont séparées en sous-fractions neutre (N), monosialylée (MS) et disialylée (DS) par électrophorèse préparative à haut voltage (75 V/cm) sur papier Whatman 3 MM, en tampon acétate de pyridine pH 5,4, 3 h. à 4°C selon la méthode de Grimmonprez et Montreuil (1968). Le voltage est maintenu constant à 4 KV et l'intensité est réglée entre 60 mA et 100 mA de façon à ne pas atteindre ni dépasser une puissance de 400 W. Après une migration de 3 h. à 4°C les témoins de migration : neutre (S₀), monosialylé (S₁) et disialylé (S₂) de la sérotransferrine (cf.p.167) sont révélés par la méthode au nitrate d'argent selon Trevelyan *et al* (1950). Le reste de la feuille est découpé en bandes de 1 cm et les produits étudiés sont repérés après élution des bandes dans 1 ml d'eau distillée et comptage de la radioactivité par addition de 4 ml de liquide scintillant (AqualyteTM : J.T. Baker Chemicals BV, Deventer, The Netherlands).

2 - Etude structurale des oligosaccharides :

L'approche structurale de nombreux glycannes a été possible grâce à l'application des méthodes classiques de détermination des structures, et parfois, grâce à la

"miniaturisation" de certaines de ces techniques. Nous avons déjà mentionné la microméthanolyse (cf. p.114); nous y ajoutons la microméthylation mise au point par Paz-Parente *et al* (1984a). Pour cette dernière, le principe de la méthode décrite par Hakomori (1964), ainsi que l'analyse des dérivés méthylés, méthanolysés et peracétylés, effectuée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon Fournet *et al* (1981) ; sont toujours valables ; cependant, l'utilisation du méthyl sulfinyl potassium carbanion (Finne *et al* 1980) comme base de méthylation, ainsi que l'observation de nombreuses précautions concernant la vaisselle et la qualité des réactifs utilisés permettent d'analyser des microquantités de produit (ex : 10 μ g).

A ce niveau d'expérimentation les différents types de liaisons glycosidiques présents dans le glycanne sont définis. Restent à préciser l'anométrie de ces liaisons et la séquence des résidus monosaccharidiques. Cela a été réalisé par dégradation récurrente des structures oligosaccharidiques à l'aide d'exo-glycosidases spécifiques dont le protocole expérimental est détaillé p.185. Les produits obtenus après digestion enzymatique sont caractérisés par comparaison de leur migration avec celle d'oligosaccharides de structure connue, soit par chromatographie ascendante sur couche mince, soit par chromatographie descendante sur papier. Les conditions expérimentales de ces opérations sont décrites p.185. Cette technique est classiquement utilisée car elle permet d'obtenir des informations à partir de très faibles quantités de substrats, à condition qu'ils soient marqués. Sa précision est cependant limitée : elle ne permet pas par exemple de définir si l'antenne supplémentaire dans le cas d'une structure tri-antennée est fixée sur le Man 4 ou le Man 4' ; l'utilisation de méthodes

analytiques complémentaires, dont l'acétolyse partielle (Fournet *et al*, 1980) est alors nécessaire. La résonance magnétique nucléaire (RMN) apparaît comme la méthode de choix pour répondre rapidement à cette question. La RMN du proton à 500 MHz est appliquée aux glycanes préalablement traités par l'eau lourde (D₂O), permettant un échange entre les hydrogènes mobiles. Les détails en sont donnés dans les revues générales suivantes : Vliegenthart *et al* (1981) et Vliegenthart *et al* (1983).

La structure primaire de certains glycanes purifiés en quantité suffisante a été déterminée par la combinaison des résultats obtenus par la perméthylation et la résonance magnétique nucléaire à 500 MHz. Dans les autres cas lorsque l'analyse en RMN était impossible, l'action des exo-glycosidases a été utilisée afin de préciser certaines structures suggérées après perméthylation.

La Fig. 23; p. 123 résume les différentes étapes de fractionnement et de purification des chaînes oligosaccharidiques constitutives d'une IgM ; elle précise en outre les techniques d'étude structurale qui ont pu être appliquées à chacune d'elles.

D - BILAN QUANTITATIF ET COMPARATIF ENTRE LES FAMILLES D'IgM :

Le marquage radioactif des chaînes glycaniques a permis de quantifier les différents types structuraux et d'en déduire leur répartition dans les familles d'IgM étudiées. Une étude comparative est donc rendue possible, d'une part entre IgM pathologiques, et d'autre part entre IgM normales et pathologiques.

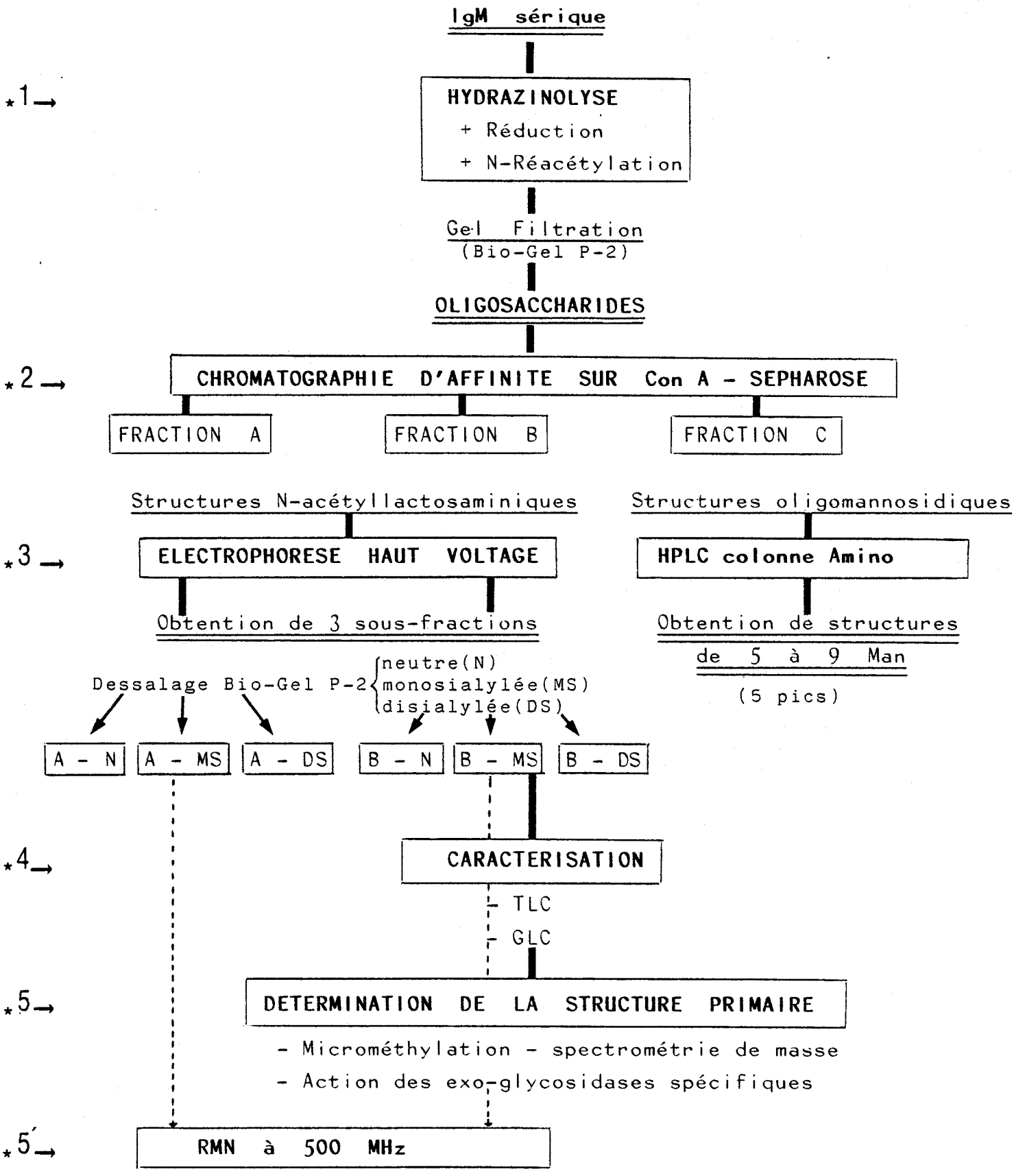


Figure 23 : Schéma expérimental de fractionnement et d'étude des glycanes constitutifs des IgM.

Reprinted from

Journal of Chromatography, 152 (1978) 475-486

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 10,703

STUDY OF NEUTRAL AND AMINOMONOSACCHARIDES BY GAS-LIQUID DIFFERENTIAL CHROMATOGRAPHY: APPLICATION TO THREE REFERENCE GLYCOPROTEINS

A. CAHOUR and L. HARTMANN

Chimie Clinique et Biologie Moléculaire, Institut Biomédical des Cordeliers, 15 Rue de l'École de Médecine, 75270 Paris Cedex 06 (France)

(Received September 19th, 1977)

SUMMARY

A method is described for the determination of protein sugars by gas-liquid differential chromatography. After methanolysis and trimethylsilylation with trimethylsilylimidazole, the neutral monosaccharides are determined by flame ionization detection and the aminomonosaccharides by thermionic detection (nitrogen-phosphorus selective detection).

This technique was applied to three reference glycoproteins (ovalbumin, ovomucoid and uromucoid); the results obtained in 48 h, using 0.2-0.6 mg of protein, were satisfactory.

INTRODUCTION

The systematic analysis of the molecular composition of glycoprotein sugars demands the use of a simple and rapid technique. Gas-liquid chromatography (GLC)¹⁻³ is often preferred to the classical colorimetric methods applied to different preparative techniques⁴.

There are two essential steps in the determination of protein sugars by GLC. Firstly, the O-glycosidic bonds must be chemically broken by an acid: aqueous acid hydrolysis requires different conditions for each type of monosaccharide (neutral monosaccharides, aminomonosaccharides and sialic acids)⁴, whereas methanolysis liberates all sugars in a single step without either inducing their breakdown or attacking the peptide chain. In a second step, the sugars are converted into volatile derivatives⁵ by methylation, acetylation, trimethylsilylation^{6,7} or trifluoroacetylation^{8,9}, all of which substitute a more stable radical in place of the active hydrogen atoms of the hydroxyl and amino groups.

This paper describes a differential technique for the study of protein sugars (amino and neutral) by trimethylsilylation of the O-methylglycosides. The aminomonosaccharides are determined with the use of a thermionic detector (nitrogen-phosphorus selective detector, NPSD)^{10,11}, which functions as a flame-ionization detector (FID) except that the flame is reinforced by the combustion of an alkali

A. CAHOUR, L. HARTMANN

metal salt (potassium chloride). The ionization current or chromatographic signal that results is selectively modified by the presence of alkaline complexes formed with the nitrogen- and phosphorus-containing compounds.

EXPERIMENTAL

Methanolysis

The methanolysis conditions adopted were those described by Clamp and co-workers^{7,3,14} in which anhydrous methanolic hydrochloric acid (1.5 M) reacts with the dry glucidic residue for 22 h at 85° in a sealed ampoule. After neutralization of the excess of acid with silver carbonate, re-acetylation of the hexosamines with acetic anhydride and washing with methanol of the precipitate formed, the pooled supernatants are evaporated to dryness.

Trimethylsilylation

The reagent (trimethylsilylimidazole, TSIM) was provided by Regis Co. (Morton Grove, Ill., U.S.A.). All other reagents were obtained from Merck (Darmstadt, G.F.R.), except the reference glucides, which were products of Sigma (St Louis, Mo., U.S.A.).

The trimethylsilylation reaction is performed according to a previously described procedure¹⁵ in tubes kept overnight in a desiccator. A 20- μ l volume of reagent is added to the dry residue, which is dissolved by grinding and then taken up in 80 μ l of doubly distilled water and 50 μ l of carbon disulphide. After mixing the solution, it is left to stand and two phases separate; the excess of TSIM remains in the aqueous phase, leaving the derivatives in the organic phase. A 0.5-1 μ l volume of the latter phase is injected directly into the apparatus.

Gas-liquid chromatography

Apparatus and materials. The stationary phases and supports were purchased from Touzart and Matignon (Paris, France) and Carlo Erba (Milan, Italy). Columns of stainless steel, with an internal diameter of 2 mm and rolled into a spiral, were used. All analyses were performed with a Carlo Erba Fractovap Linea 1300 chromatograph equipped with an electrometer, a two-column oven, both an FID and an NPSD and a temperature programmer.

Analytical conditions. The neutral monosaccharides were studied in a 2-m column filled with 3% (w/w) of OV-17 as stationary phase on Gas-Chrom Q (100-120 mesh). The operating conditions for the FID detector were as follows: column temperature, 130°; temperature of the injector and detector, 250°; gas flow-rates, nitrogen (carrier gas) 1.65 kg/cm² (13 ml/min), hydrogen 0.55 kg/cm² (26 ml/min) and air 1.10 kg/cm² (350 ml/min). It should be noted that in studies of oligosaccharides, these conditions must be modified either by shortening the column or by increasing the temperature.

The aminomonosaccharides were analysed in a column of the same dimensions as above (2 m \times 2 mm), but containing 4% (w/w) of SE-30 on Chromosorb W HP (80-100 mesh). The operating conditions were as follows for the NPSD: column temperature, 175° for 30 min, then increased at 1°/min to 200°, which was maintained for 10 min; temperature of injector and detector, 250°; gas flow-rates (which must be

DIFFERENTIAL GLC OF MONOSACCHARIDES

carefully maintained as they determine the constancy of the ionizing flux of molten potassium chloride in the flame), nitrogen (carrier gas) 3 kg/cm² (30 ml/min), hydrogen 0.70 kg/cm² (30 ml/min) and air 0.85 kg/cm² (300 ml/min). The adjustment of the height of the potassium salt and the polarization electrode above the flame is performed so that the salt is at its maximal ionization and the electrode is sufficiently high to reduce the standing current and to select the nitrogen-containing substances.

Choice of internal standard. For the OV-17 phase as an exception, the two anomeric forms of methylglucose are mixed. Because of this α -methyl-D-glucose is used for the analysis of neutral monosaccharides in known samples. On the other hand, for unknown test samples the standard is inositol. This choice avoids errors due to the presence (although very rare) of glucose in the carbohydrate moiety or as a contaminant in complex preparations (saccharose, ficoll).

For the aminomonosaccharides, it is essential to use a nitrogenous standard as a thermionic detector gives a very poor response to compounds that lack a nitrogen atom. To achieve this, we used rancephedrine (the optical isomers are not separated by GLC).

Interpretation of chromatograms. Each sugar is characterized relative to the internal standard, by the retention time of each of its isomers and by the coefficient of the relative molar response (RMR).

The areas of the peaks are calculated manually by triangulation. The reproducibility of the measurements and the significance of the difference between the values obtained and those in the literature are obtained by statistical analysis.

RESULTS

GLC of standard monosaccharide mixtures

Neutral monosaccharides. In the GLC of a mixture of free monosaccharides after trimethylsilylation (Fig. 1a and Table I), when all of the sugars are present together overlapping of certain peaks is observed (for instance, the first xylose with the second fucose peak and the first glucose with the third galactose peak), but their areas can nevertheless be calculated by taking into account the constancy of the relative proportions of the isomers at equilibrium in aqueous solution⁶.

In the GLC of a mixture of trimethylsilylated (TMS) monosaccharides after methanolysis (Fig. 1b and Table I), all monosaccharides are completely resolved. Only one peak is observed for methylxyloside, although this may be due to the polarity of OV-17, as two isomeric forms are found on SE-30.

Aminomonosaccharides. In the GLC of a mixture of free monosaccharides after trimethylsilylation (Fig. 2a and Table II), inositol was used as an internal standard as rancephedrine is not detected directly by trimethylsilylation but only after methanolysis. The sialic acids were studied by direct injection of the reaction mixture, including the TSIM as solvent¹⁶, otherwise they are soluble in the aqueous phase owing to their very polar carboxyl radical, which is blocked with difficulty by the TSIM.

The GLC of a mixture of trimethylsilylated monosaccharides after methanolysis was carried out with both an FID (Fig. 2b and Table II) and an NPSD (Fig. 2c and Table II). Carbon disulphide is an ideal solvent for flame ionization as it gives a very feeble response for the injection peak, but on the other hand it alters the stability

A. CAHOUR, L. HARTMANN

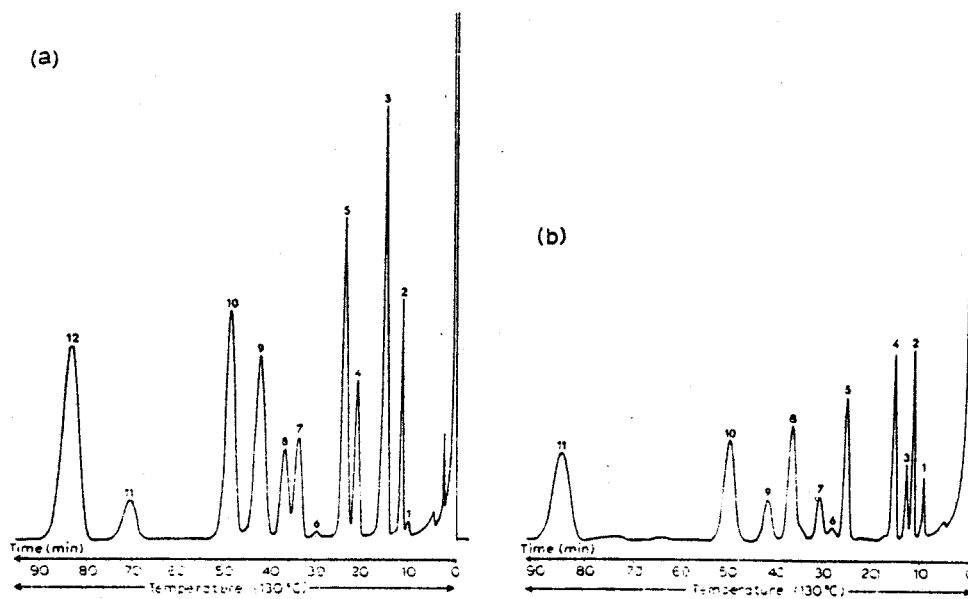


Fig. 1. Separation by GLC of neutral monosaccharides commonly occurring in glycoproteins. GLC conditions as defined in the text. (a) GLC resolution of the TMS derivatives of standard sugars. The peaks are numbered in their order of emergence: 1, 2, 3 = fucose; 3, 4 = xylose; 5, 8 = mannose; 6, 7, 9 = galactose; 9, 11 = glucose; 10 = α -methyl-D-glucoside; 12 = inositol. (b) GLC resolution of the TMS derivatives of O-methylglycosides. Peaks: 1, 2, 3 = fucose; 4 = xylose; 5, 6 = mannose; 7, 8, 9 = galactose; 10 = α -methyl-D-glucoside; 11 = inositol.

of the NPSD flame and *n*-hexane is to be preferred. Consequently, the compounds studied in a carbon disulphide medium are evaporated nearly to dryness under a stream of nitrogen and the residue is dissolved in the necessary amount of *n*-hexane.

After methanolysis, N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids have the same retention times. Contrary to the usual method^{13,14}, two peaks are observed, which are common in the two instances but with a different anomerization ratio (see Table II). A control experiment using mass spectrometry is under investigation in order to verify that these two peaks belong to sialic acids.

Determination of the coefficient of the relative molar response (RMR) for each sugar

This coefficient is a measure of the particular behaviour of the detector for each sugar with respect to the internal standard under defined operating conditions. It is represented by the slope of the graph of the total peak area ratio against the molar ratio.

The RMRs are given in Table III. There is a slight variation of the correlation coefficient (*r*) according to the osides studied; *r* = 0.99 for the hexoses, *r* = 0.98 for the hexosamines and *r* = 0.96 for the sialic acids. Also, the RMRs for the amino-monosaccharides with respect to methylracedrine differ according to their mode of detection. This can be explained by the fact that the sensitivity of the NPSD for amino compounds depends on the nitrogen content of their molecule¹⁰.

DIFFERENTIAL GLC OF MONOSACCHARIDES

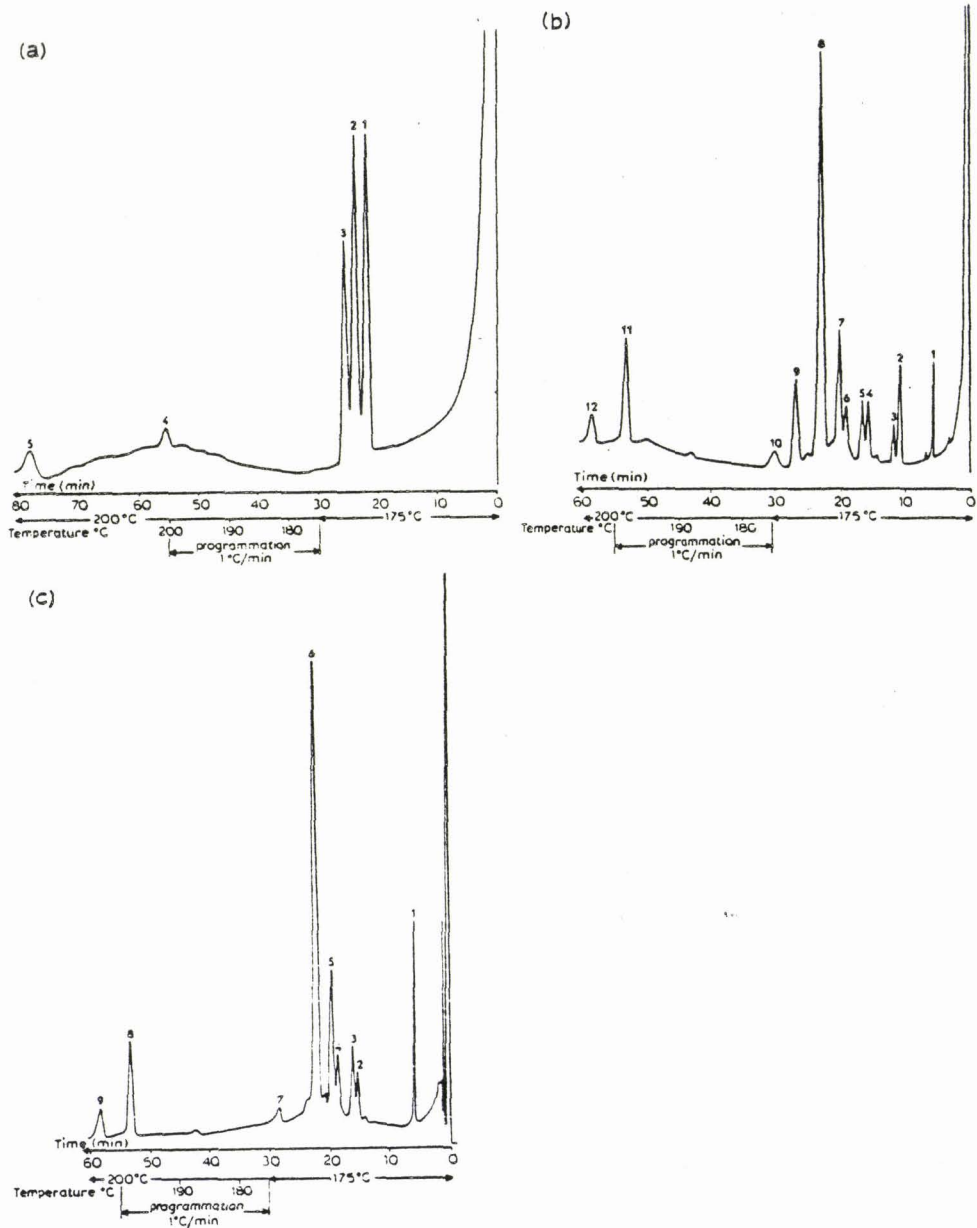


Fig. 2. Separation by GLC of aminomonosaccharides commonly occurring in glycoproteins. GLC conditions as defined in the text. (a) GLC resolution of the TMS derivatives of standard sugars. The peaks are numbered in their order of emergence: 1 = N-acetylgalactosamine; 2 = N-acetylglucosamine; 3 = inositol; 4 = N-acetylneuraminic acid; 5 = N-glycolylneuraminic acid. (b) GLC resolution of the TMS derivatives of O-methylglycosides with FID. Peaks: 1 = rancephedrine; 2, 3 = α -methyl-D-glucoside; 4, 6, 8, 10 = N-acetylglucosamine; 5, 7 = N-acetylgalactosamine; 9 = inositol; 11, 12 = N-acetylneuraminic acid. (c) GLC resolution of the TMS derivatives of O-methylglycosides with NPSD. Peaks: 1 = rancephedrine; 2, 4, 6, 7 = N-acetylglucosamine; 3, 5 = N-acetylgalactosamine; 8, 9 = N-acetylneuraminic acid; 8, 9 = N-glycolylneuraminic acid.

TABLE I

GAS CHROMATOGRAPHIC PROPERTIES OF SOME NEUTRAL MONOSACCHARIDES (COMMONLY OCCURRING IN GLYCOPROTEINS AND GLYCOPEPTIDES) AND THEIR DERIVATIVES

| Parent monosaccharide | Free monosaccharides* | | | O-Methylglycosides | | |
|------------------------------|---|---|--|---|---|---|
| | Retention time of isomer** relative to α -methyl-D-glucoside ($R_t = 50$ min) | Retention time of isomer relative to inositol ($R_t = 85$ min) | Percentage distribution of isomer*** | Retention time of isomer relative to α -methyl-D-glucoside ($R_t = 50$ min) | Retention time of isomer relative to inositol ($R_t = 85$ min) | Percentage distribution of isomer |
| Xylose | 0.33 0.44 | 0.20 0.26 | 43 \pm 0.02 57 \pm 0.02 | 0.31 | 0.18 | 100 |
| Fucose | 0.21 0.24 0.31 | 0.12 0.15 0.18 | 3.1 \pm 0.10 39.3 \pm 0.02 57.6 \pm 0.02 | 0.19 0.23 0.26 | 0.11 0.14 0.16 | 11.1 \pm 0.05 61.8 \pm 0.03 27.1 \pm 0.02 |
| Mannose | 0.49 0.76 | 0.29 0.45 | 66.3 \pm 0.03 33.7 \pm 0.05 | 0.51 0.57 | 0.30 0.33 | 88 \pm 0.02 12 \pm 0.11 |
| Galactose | 0.61 0.70 0.87 | 0.35 0.41 0.51 | 4.2 \pm 0.10 38.2 \pm 0.03 57.6 \pm 0.02 | 0.62 0.74 0.84 | 0.37 0.44 0.50 | 14 \pm 0.04 59 \pm 0.02 27 \pm 0.04 |
| Glucose | 0.87 1.40 | 0.51 0.84 | 40 \pm 0.03 60 \pm 0.02 | 1.00 | 0.59 | 100 |
| α -Methyl-D-glucoside | 1.00 | 0.59 | 100 | 1.00 | 0.59 | 100 |
| Inositol | 1.70 | 1.00 | 100 | 1.70 | 1.00 | 100 |

* Free monosaccharides trimethylsilylated directly.

** Configuration of isomers not defined.

*** Peak area of each isomer expressed as a percentage of the total peak area.

A. CAHOUR, L. HARTMANN

TABLE II

GAS CHROMATOGRAPHIC PROPERTIES OF SOME AMINOMONOSACCHARIDES (COMMONLY OCCURRING IN GLYCOPROTEINS AND GLYCOPEPTIDES) AND THEIR DERIVATIVES

| Parent monosaccharide | Free monosaccharides* | | | O-Methylglycosides | | | | | |
|---------------------------|---|---|------------------------------------|--|---|--|----------------------|--|----------------------|
| | FID** | | | FID | | | NPSD*** | | |
| | Retention time of isomer [†] relative to inositol ($R_t = 2.6$ min) | Retention time of isomer relative to perseitol ($R_t = 4.2$ min) | Percentage of isomer ^{††} | Retention time of isomer relative to inositol ($R_t = 2.6$ min) | Retention time of isomer relative to perseitol ($R_t = 4.2$ min) | Retention time of isomer relative to methylracephedrine ($R_t = 6$ min) | Percentage of isomer | Retention time of isomer relative to methylracephedrine ($R_t = 6$ min) | Percentage of isomer |
| N-Acetylglucosamine | 0.93 | 0.57 | 100 | 0.59 | 0.37 | 2.76 | 7.5 ± 0.15 | 2.76 | 5.2 ± 0.18 |
| | | | | 0.73 | 0.46 | 3.38 | 7.3 ± 0.16 | 3.38 | 7.5 ± 0.11 |
| | | | | 0.86 | 0.54 | 4.00 | 80.2 ± 0.03 | 4.00 | 84.3 ± 0.02 |
| N-Acetylgalactosamine | 0.82 | 0.50 | 100 | 1.13 | 0.71 | 5.28 | 3 ± 0.20 | 5.28 | 3 ± 0.16 |
| | | | | 0.63 | 0.39 | 2.92 | 32.5 ± 0.06 | 2.92 | 32.5 ± 0.06 |
| | | | | 0.76 | 0.48 | 3.55 | 67.5 ± 0.03 | 3.55 | 67.5 ± 0.03 |
| N-Acetylneuraminic acid | 2.20 | 1.38 | 100 | 2.00 | 1.23 | 9.15 | 74.2 ± 0.05 | 9.15 | 74.2 ± 0.05 |
| | | | | 2.20 | 1.35 | 10.10 | 25.8 ± 0.15 | 10.10 | 25.8 ± 0.15 |
| N-Glycolylneuraminic acid | 3.08 | 1.90 | 100 | 2.00 | 1.23 | 9.15 | 62.3 ± 0.06 | 9.15 | 62.3 ± 0.06 |
| | | | | 2.20 | 1.35 | 10.10 | 37.7 ± 0.18 | 10.10 | 37.7 ± 0.18 |
| Racephedrine | — | — | — | 0.22 | 0.13 | 1.00 | 100 | 1.00 | 100 |
| Inositol | 1.00 | 0.61 | 100 | 1.00 | 0.63 | 4.67 | 100 | 4.67 | 100 |
| Perseitol | 1.64 | 1.00 | 100 | 1.60 | 1.00 | 7.42 | 100 | 7.42 | 100 |

* Free monosaccharides trimethylsilylated directly.

** Flame-ionization detection.

*** Nitrogen-phosphorus selective detection.

† Configuration of isomers not defined.

†† Peak area of each isomer expressed as a percentage of the total peak area.

TABLE III

RELATIVE MOLAR RESPONSE FACTORS OF MONOSACCHARIDES COMMONLY OCCURRING IN GLYCOPROTEINS AND GLYCOPEPTIDES

| Parent monosaccharide | Neutral monosaccharides* | | Aminomonosaccharides** | | | | Nitrogen (%)*** |
|------------------------------|--|--|--|---|--------------------|-------------------|------------------|
| | FID [†] | | FID | | NPSD ^{††} | | |
| | Relative molar response factor ^{†††} (relative to α -methyl-D-glucoside) | Relative molar response factor ^{†††} (relative to inositol) | Relative molar response factor [†] (relative to α -methyl-D-glucoside) | Relative molar response factor (relative to inositol) | Free sugar | O-Methylglycoside | |
| Xylose | 0.94 | 0.59 | | | | | |
| Fucose | 0.95 | 0.57 | | | | | |
| Mannose | 1.00 | 0.60 | | | | | |
| Galactose | 0.98 | 0.59 | | | | | |
| Glucose | 1.00 | 0.60 | | | | | |
| Racedrine | — | — | 0.73 | — | 0.50 | 1.00 | 1.00 |
| α -Methyl-D-glucoside | 1.00 | 0.60 | 1.00 | 0.71 | 0.72 | 1.35 | — ^{†††} |
| Inositol | 1.55 | 1.00 | 1.48 | 1.00 | 1.00 | 2.00 | — ^{†††} |
| N-Acetyl-glucosamine | | | 0.65 | 0.42 | 0.45 | 0.85 | 0.62 |
| N-Acetyl-galactosamine | | | 0.66 | 0.42 | 0.43 | 0.82 | 0.60 |
| N-Acetyl-neuraminic acid | | | 0.45 | 0.25 | 0.31 | 0.57 | 0.40 |
| N-Glycol-neuraminic acid | | | — ^{††} | — ^{††} | 0.30 | 0.58 | 0.37 |

* GLC was performed isothermally at 130°.

** GLC conditions as defined in the text.

*** Percentage of nitrogen in the molecule.

† FID = flame-ionization detection.

†† NPSD = nitrogen-phosphorus selective detection.

††† RMR defined for trimethylsilyl derivatives of free monosaccharides and O-methylglycosides.

† RMR defined for trimethylsilyl derivatives of O-methylglycosides.

†† Not determined.

††† Near to zero.

A. CAHOUB, L. HARTMANN

DIFFERENTIAL GLC OF MONOSACCHARIDES

Application to three glycoproteins of known composition

The GLC analysis of standard mixtures of monosaccharides has contributed to the elaboration of the method, but in order to test the value of this technique we

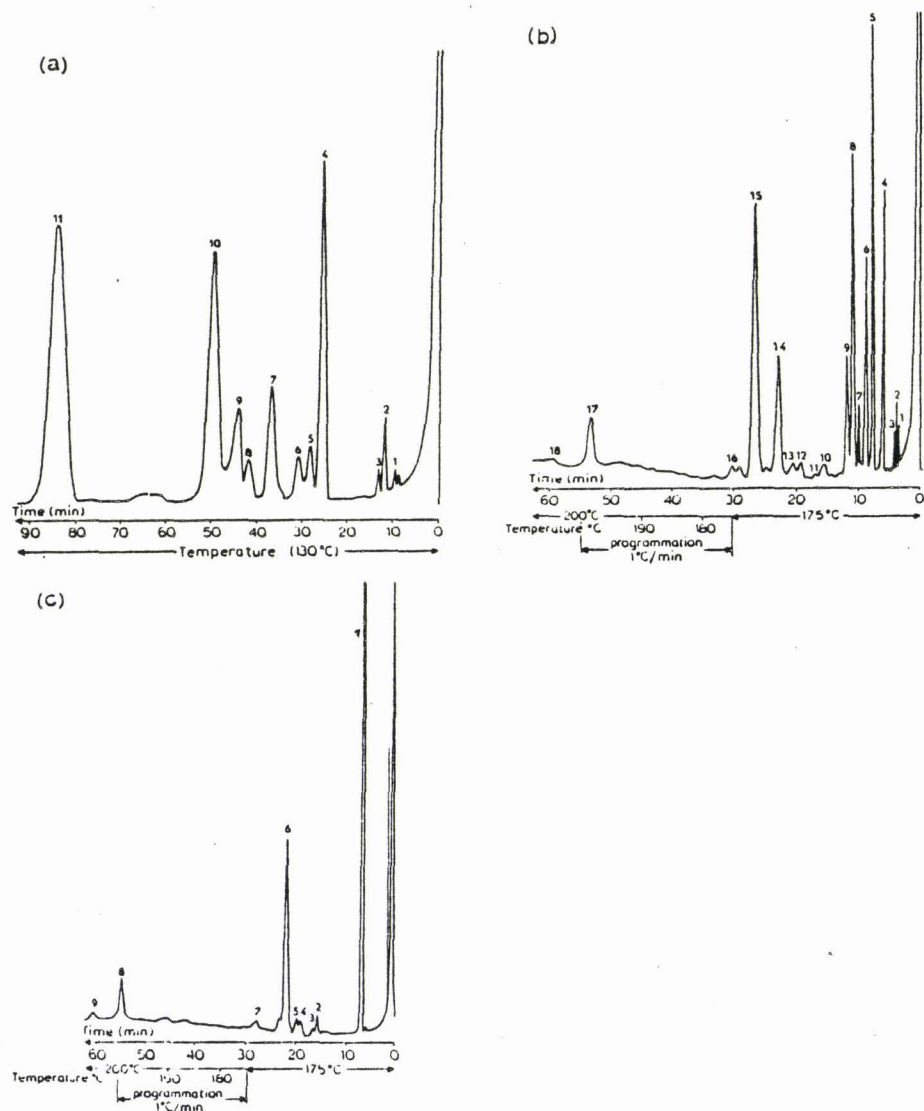


Fig. 3. GLC after trimethylsilylation of the methanolysis residue from Tamm and Horsfall glycoprotein. Conditions of chromatography as defined in the text. (a) GLC of neutral monosaccharides. The peaks numbered in their order of emergence: 1, 2, 3 = fucose; 4, 5 = mannose; 6, 7, 8 = galactose; 9 = methylracephedrine; 10 = α -methyl-D-glucoside; 11 = inositol. (b) GLC of amino-monosaccharides with FID. Peaks: 1, 2, 3 = fucose; 4 = methylracephedrine; 5, 6 = mannose; 6, 7 = galactose; 8, 9 = α -methyl-D-glucoside; 10, 12, 14, 16 = N-acetylglucosamine; 11, 13 = N-acetylgalactosamine; 15 = inositol; 17, 18 = N-acetylneuraminic acid. (c) GLC resolution of amino-monosaccharides with NPSD. Peaks: 1 = methylracephedrine; 2, 4, 6, 7 = N-acetylglucosamine; 3, 5 = N-acetylgalactosamine; 8, 9 = N-acetylneuraminic acid.

TABLE IV
CARBOHYDRATE COMPOSITION OF GLYCOPROTEINS

| Monosaccharide | Ovalbumin ^a | | Ovomucumoid ^b | | T and H ^c | |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| | Reported | Found | Reported | Found | Reported | Found |
| Neutral monosaccharides (5.0) | (5.10) | (5.8) | (8.5) | (8.5) | (12.34) | (9.94) |
| Fucose | | | | (8.5) | (14.1) | (11.08) |
| Hexoses | | | | | 0.82 | 1.1 |
| Mannose | 5.0 | 5.8 | 8.5 | 8.5 | 5.76 | 9.94 |
| Galactose | | | | | 6.5 | 5.8 |
| Ratio Man/Gal ^d | | | | | 6.5 | 4.6 |
| Hexosamines | | | (5/1) | (5/1) | (1/1) | (1.3/1) |
| N-Acetylglucosamine | 3.0 | 3.1 ^e -3.7 ^f | 14 | 12.4 ^g -15.2 ^h | (11.04) | (11.26) ^h |
| N-Acetylgalactosamine | | | | | 9.6 | 8.12 ⁱ |
| amine | | | | | 1.10 | 0.98 ⁱ |
| Ratio GlcNAc/ GalNAc ^j | | | | | (9/1) | (8.3/1) |
| Sialic acid | | | | | | (7.4/1) |
| N-Acetylneuramic acid | | | | | | |
| Total | 8.0 | 8.95 | 8.9 | 9.1 | 23.4 | 21.4 |
| | | | 0.5 | 0.5 | 4.63 | 6.1 |
| | | | 21.6 | 21.6 | 28.01 | 30.8 |
| | | | | | | 5.9 |
| | | | | | | 27.1 |

^a Values are given in moles per mole of protein.
^b Values are given as a percentage of dried protein.
^c According to Johansen *et al.*¹⁸
^d According to Zanetta *et al.*⁵
^e According to Adam-Chossion and Montreuil¹⁹
^f According to Fletcher *et al.*²⁰
^g According to Stevenson and Kent²¹
^h Determined as free hexosamines by classical colorimetry according to Montreuil and Spik⁴.
ⁱ Determined as free hexosamines with a Beckman 120C amino acid Autoanalyser after hydrolysis for 4 h in 4 N hydrochloric acid at 100°.
^j Not determined.
^k Ratio mannose/galactose.
^l Ratio N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine.

DIFFERENTIAL GLC OF MONOSACCHARIDES

applied it to the analysis of the glycans of three well known glycoproteins: ovalbumin, ovomucoid and uromucoid or Tamm and Horsfall (T and H) protein. The first two proteins were Sigma products (ovalbumin, grade V, and ovomucoid, trypsin inhibitor type II-O); the T and H was prepared in the laboratory from normal urines by precipitation with 0.58 M sodium chloride solution¹⁷ and its purity was controlled by immunochemistry and electron microscopy.

The measurements were carried out at least six times on each batch of protein using 0.2–0.6 mg of material. All of the monosaccharides studied were from the same sample: firstly, 1–2 μ l of each carbon disulphide extract was injected to give a chromatogram of the neutral monosaccharides (Fig. 3a), then secondly, the aminomonosaccharides were analysed by injection of 1–2 μ l of the extract in n-hexane (Figs. 3b and 3c).

The values found by GLC were compared with those in the literature (Table IV); colorimetric titrations carried out in parallel served as a control. All of the results, which are accurate to within 5%, are close to the literature values^{8, 18–21} and the few differences observed, which are hardly significant, are due to technical factors.

DISCUSSION

The utilisation of TSIM as a silylating agent has several advantages over the classical reaction mixture⁶ (pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane, 5:1:1). It is easy to use as it reacts instantaneously, it causes no precipitation and elimination of an excess of it suppresses a long tail at the level of the injection peak. It can be used to give highly reproducible determinations and a better conservation of the TMS derivatives than in pyridine medium, where their hydrolysis is evident after 24 h.

The advantages of methanolysis, discussed in many papers^{7–9, 13, 14}, were confirmed by this work.

Of particular interest is the use of the NPSD in the study of the aminomonosaccharides. The selectivity of this detector for these compounds is greater (by a factor of 100 in the present case) and the sensitivity of their detection is therefore enhanced (about 5-fold) in comparison with the FID analysis. All of the peaks of non-nitrogenous compounds are virtually eliminated from the chromatograms, facilitating their interpretation, and the baseline is nearly horizontal.

The NPSD is operated in the same manner as the FID, but some precautions must be taken in order to maintain its performances. We have established, for instance, that the carrier gas flow-rate must be 30 ml/min in order to obtain good results, as it conditions the ionization current of substances that burn in the flame. Also, the adjustment of the height of the salt and the polarization electrode over the flame is very important as it allows, depending on the type of analysis required, a preferential modification of either the selectivity or the sensitivity of response. In our study, the selectivity is of greater importance than the sensitivity because the amino sugars and the neutral monosaccharides are found in the same extract. Before each series of analyses a check of the NPSD adjustment is necessary.

The preparation of the samples can be simplified in some instances because non-nitrogenous compounds are not detected. We have shown that all of the usual buffers (veronal, Tris, citrate), in addition to sodium chloride and EDTA, have no influence under the operating conditions chosen.

A. CAHOUR, L. HARTMANN

When performing a differential study of the neutral monosaccharides and aminomonosaccharides, the NPSD allows a considerable saving of time and avoids the loss of material which occurs in the technique involving the separation of the hexosamines and neutral monosaccharides after running a hydrolysate through a cationic resin.

The use of the NPSD, which is already employed extensively in the screening of nooanaleptics and pesticides, could be extended to the analysis of sugars, among which there is a wide variety of nitrogen- and phosphorus-containing compounds. This work was limited to the sugars of glycoproteins. Nevertheless, from our first results we can conclude that the NPSD gives better performances with phosphorus- than with nitrogen-containing compounds. Hence it can be recommended for the determination of phosphorus-containing sugars.

Finally very small amounts of proteins are necessary for a complete analysis, for the results are adequate for quantitative purposes with 10 ng of each sugar. The number of successive steps is limited, favouring good reproducibility, and an accuracy of 2-3% is obtained for ten replicate experiments using the same standard solution. The standard deviation is therefore small in comparison with errors due to the calculation of the areas, which are about 2%. These results confirm the validity of the proposed method.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank particularly Mr. R. Bourillon, Mr. J. P. Lafarge and Mrs. M. Lemonnier for their advice during the preparation of this work.

REFERENCES

- 1 W. W. Wells, C. C. Sweeley and R. Bentley, in H. A. Szymanski (Editor), *Biomedical Applications of Gas Chromatography*, Plenum Press, New York, 1964, p. 169.
- 2 C. T. Bishop, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 19 (1964) 95.
- 3 J. W. Berry, *Advan. Chromatogr.*, 2 (1966) 271.
- 4 J. Montreuil and G. Spik, in *Microdosage des Glucides*, Monographie No. 1 (1963), Fascicule No. 3 (1967), Monographie No. 3, (1968), Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences, Lille.
- 5 A. E. Pierce, in *A Technique for Gas Phase Analysis — Silylation of Organic Compounds*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 1969, p. 258.
- 6 C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 7 J. R. Clamp, T. Bhatti and R. E. Chambers, *Methods Biochem. Anal.*, 19 (1969) 229.
- 8 J. P. Zanetta, W. C. Breckenridge and G. Vincendon, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 291.
- 9 J. P. Zanetta, *Thèse de Docteur Ingénieur*, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, 1972.
- 10 G. R. Verga and F. Poy, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 17.
- 11 V. V. Brazhnikov and E. B. Shmidel, *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 527.
- 12 N. Mellor, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 396.
- 13 T. Bhatti, R. E. Chambers and J. R. Clamp, *Biochim. Biophys. Acta*, 222 (1970) 339.
- 14 R. E. Chambers and J. R. Clamp, *Biochem. J.*, 125 (1971) 1009.
- 15 A. Cahour, J. Lebbe and L. Hartmann, *Clin. Chim. Acta*, 55 (1974) 139.
- 16 H. P. Buscher, J. Casals-Stanzel and R. Schauer, *Eur. J. Biochem.*, 50 (1974) 71.
- 17 I. Tamm and F. L. Horsfall, Jr., *J. Exp. Med.*, 95 (1952) 71.
- 18 P. G. Johansen, R. D. Marshall and A. Neuberger, *Biochem. J.*, 78 (1961) 518.
- 19 A. Adam-Chosson and J. Montreuil, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1881.
- 20 A. P. Fletcher, A. Neuberger and W. A. Ratcliffe, *Biochem. J.*, 120 (1970) 417.
- 21 F. K. Stevenson and P. W. Kent, *Biochem. J.*, 116 (1970) 791.

RESULTATS-DISCUSSION

CHAPITRE I : PREPARATION ET CARACTERISATION DES IMMUNO- GLOBULINES M

I - PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES M

A - IgM PATHOLOGIQUES (voir tableau III ; p.137)

1 - Euglobulines : Bien qu'elle soit une caractéristique de la plupart des macroglobulines de Waldenström, la capacité de précipiter à faible force ionique n'a été observée que pour 2 IgM parmi les prélèvements mis à notre disposition (GRA) et (DID). Une courbe de Vargues a été tracée pour chaque échantillon. La Fig. 24 ; p.138 représente celle obtenue pour le prélèvement GRA, avec une précipitation optimale à pH 7,5 pour l'IgM et à pH 6,0 pour l'IgG contaminante. Pour l'échantillon DID les pH sont fixés à 8,0 pour l'IgM et à 5,5 pour l'IgG. Les étapes suivantes de dialyse et de purification par gel filtration sur colonne de Sepharose 6B sont décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes" p. 112 . Le rendement de la préparation est de 75 % pour l'IgM GRA et de 69 % pour l'IgM DID .

2 - Les Immunoglobulines thermolabiles :

L'IgM GRA est une pyroglobuline : elle précipite irréversiblement à 56°C et est donc préparée comme il est décrit précédemment puisqu'elle présente aussi un test de Sia positif.

2 autres IgM (ZAJ) et (ROS) précipitent à 4°C et sont préparées par plusieurs cycles de précipitation -ultracentrifugation à froid- redissolution à 37°C (cf. matériel et méthodes p. 109). Le rendement du procédé est d'environ 80 %.

TABLEAU III

CARACTERISTIQUES DES PRELEVEMENTS CONCERNANT LES IGM PATHOLOGIQUES

| IgM | Nature du prélèvement ^(a) | Propriété Physico-chimique ^(b) | Taux de protéines sériques (mg/ml) | Concentration en IgM ^(c) (mg/ml) | Nature de la chaîne légère |
|-----|--------------------------------------|---|------------------------------------|---|----------------------------|
| ESP | P | pseudo Ig | ↑ 100 (d) ↓ | ↑ 20-30 (d) ↓ | κ |
| DUB | P | euglobuline | | | κ |
| SCH | P | pyro Ig | | | λ |
| LAU | P | cryo Ig | | | κ |
| MOS | P | pseudo Ig | | | κ |
| CAI | P | pseudo Ig | | | κ |
| LET | P | cryo Ig | | | κ |
| GIR | P | pseudo Ig | | | κ |
| DEN | P | pseudo Ig | | | κ |
| COL | P | pseudo Ig | | | κ |
| GRA | S | { pyro Ig euglobuline | 120 | 57 | λ |
| ZAJ | S | cryo Ig | 108 | 33 | κ |
| DID | P | euglobuline | 95 | 13 | κ |
| ROS | S | pseudo Ig | 78 | 4,5 | κ |
| COU | S | pseudo Ig | 86 | 15,5 | κ |
| REN | S | pseudo Ig | 87 | 5 | κ |
| VAS | P | pseudo Ig | 76 | 25 | κ |
| LEC | S | pseudo Ig | 90 | 16,6 | κ |

(a) P = plasmaphérèse; S = sérum.

(b) pseudo Ig = pseudoglobuline ; pyro Ig = pyroglobuline ; cryo Ig = cryoglobuline.

(c) concentration déterminée par la méthode de Laurell (1972).

(d) Il s'agit de concentrations moyennes observées.

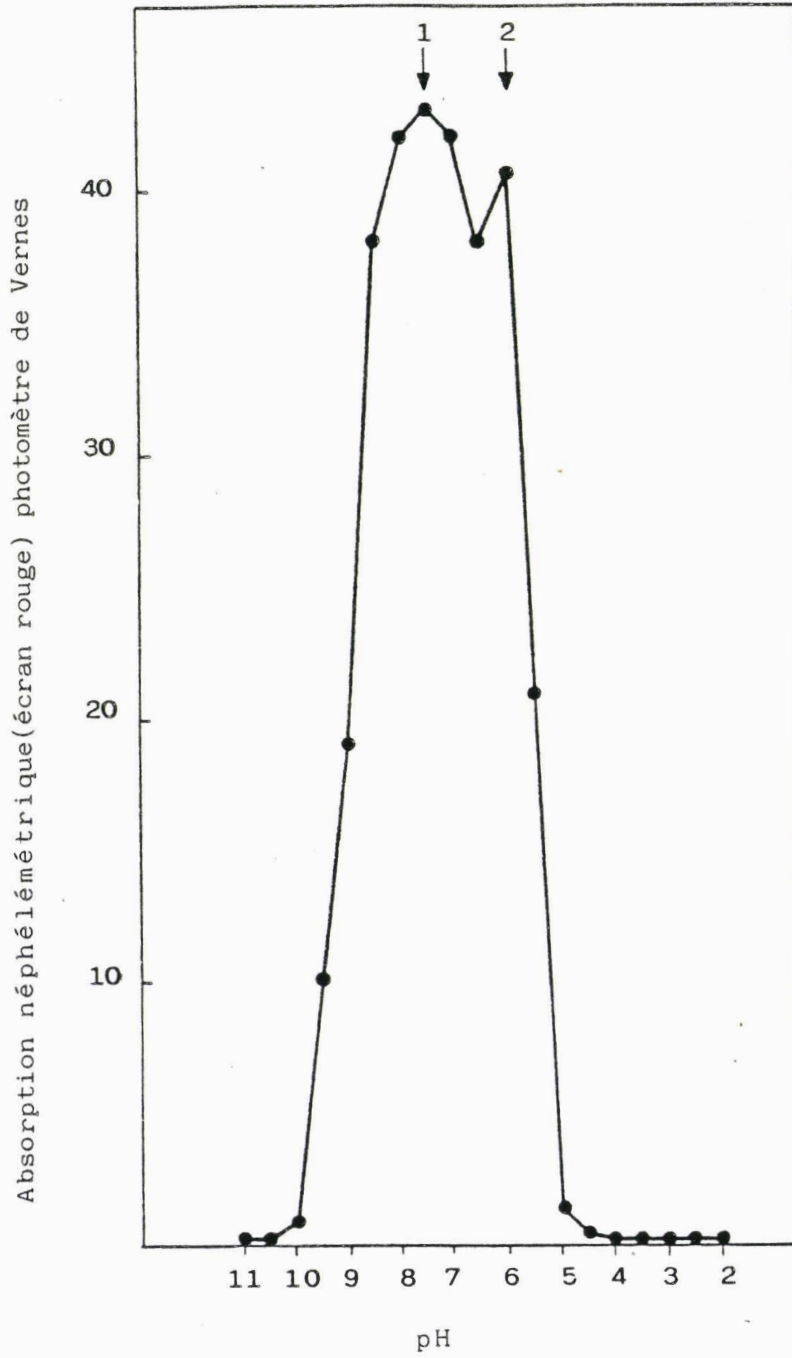


Figure 24 : Courbe de Vargues effectuée lors de la préparation de l'IgM GRA (IgM-10)

1 → IgM : précipite à pH 7,5;

2 → IgG : précipite à pH 6,0.

3 - Précipitation au sulfate d'ammonium : Les IgM constitutives des quatre plasmaphères restantes, ne se distinguant par aucune autre propriété facilitant leur préparation, sont extraites par une précipitation au sulfate d'ammonium à 40 % suivie des étapes nécessaires de purification (cf. p. 109). Le rendement moyen est relativement faible : 50 %.

B - IgM NORMALES

Les 8 sérums individuels provenant de sujets normaux ont été adsorbés sur une colonne de protamine-Sepharose 4B selon la méthode de Wichman et Borg (1977) (cf. p.110) afin d'en isoler les IgM constituantes par chromatographie d'affinité (Fig.25 ; p.140) Le Tableau IV;p.142, rend compte de l'enrichissement de chaque échantillon en IgM après purification par gel filtration sur Sepharose 6B (Fig. 26 ; p.141). Le rendement moyen de ce fractionnement est de 32 %.

C - CONTROLE DE LA PURETE DES IgM

Les techniques décrites p. 112 sont appliquées aux différentes préparations d'IgM afin d'en vérifier l'homogénéité.

a - En électrophorèse sur acétate de cellulose, une seule bande de faible migration électrophorétique correspondant à la migration d'1 IgM témoin est révélée au rouge ponceau.

b - En immunoélectrophorèse sur gélose, un seul arc de précipitation est obtenu contre un sérum anti-protéines humaines totales et un sérum anti-IgM.

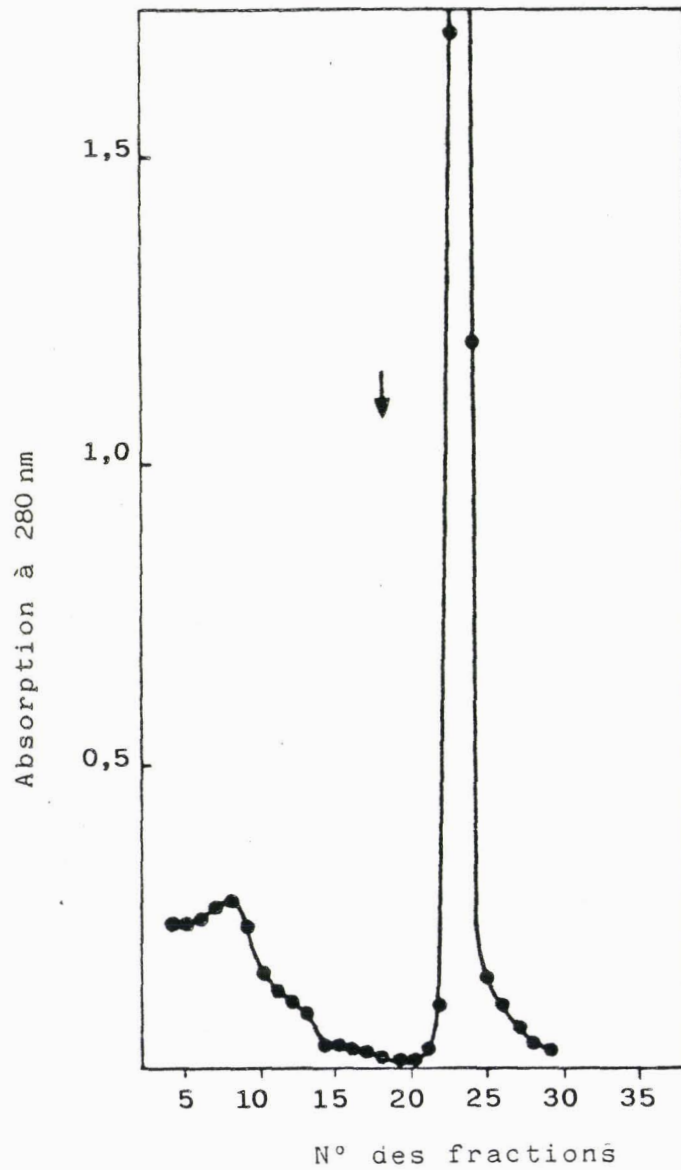


Figure 25 : Préparation des IgM normales par chromatographie d'affinité sur Protamine-Sepharose 4 B (selon Wichman et Borg, 1977)

Dimensions de la colonne : 2,6x30 cm; Vol. des fractions : 5ml;

(↓) Elution des protéines adsorbées par le tampon phosphate de sodium 0,08M, NaCl 1,1M, azide de sodium 0,02% .

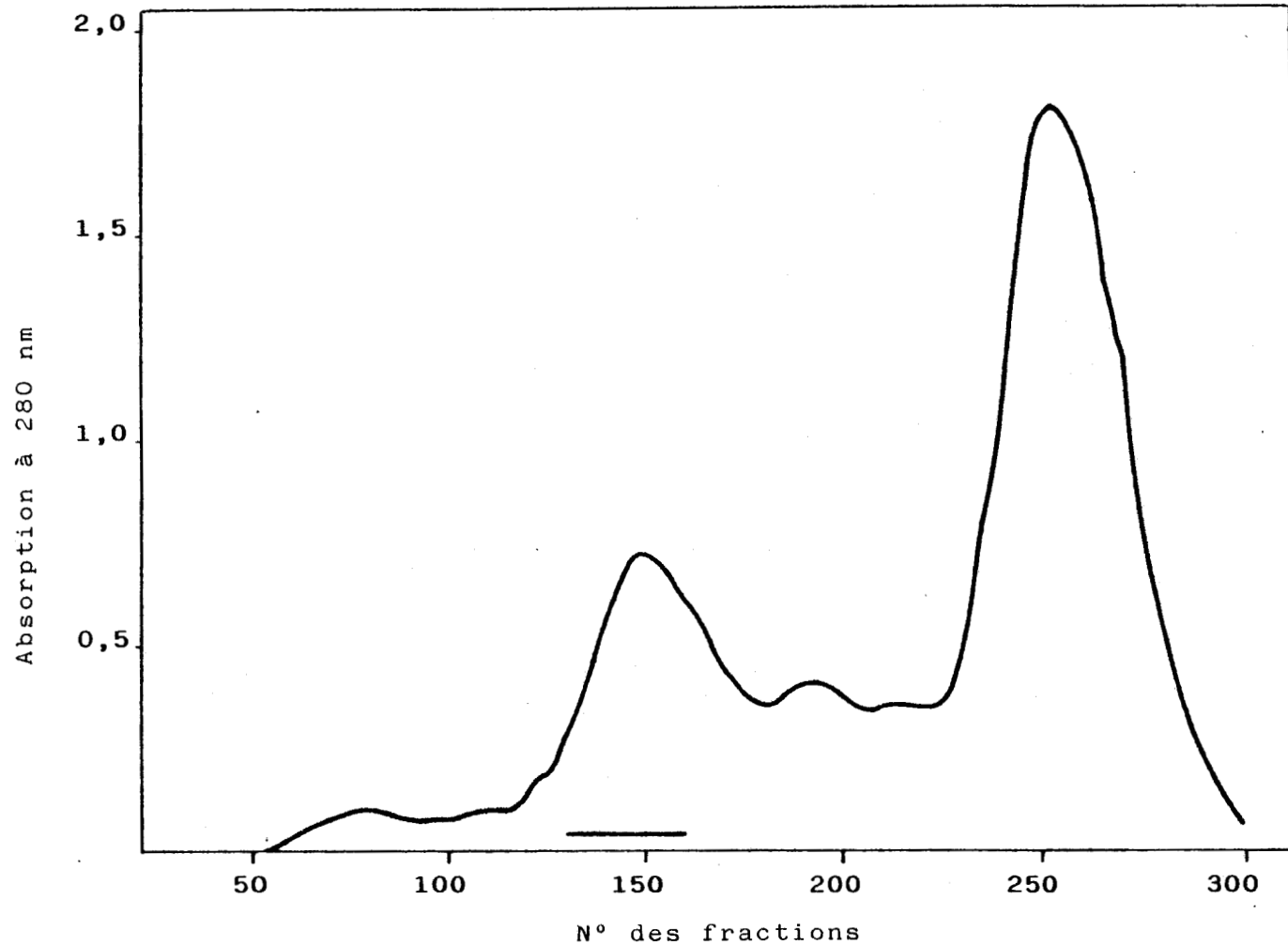


Figure 26 : Purification des IgM normales par gel filtration sur Sepharose 6 B

Dimensions de la colonne: 5x100 cm; Tampon d'éluion: Tris HCl 0,1M, NaCl 1M, glycine 0,01M pH 8,0 (azide de sodium 0,02%); Débit: 20ml/H;

Vol. des fractions: 4 ml;

— : Fractions conservées comme IgM normales.

TABEAU IV

TABEAU RECAPITULATIF DE LA PREPARATION DES IGM NORMALES

| Echantillon (sérum) | Volume (ml) | Concentration IgM ^(a) (g/l) | Quantité IgM au départ(mg) | Volume de préparation purifiée(ml) | Concentration IgM purifiée ^(b) (g/l) | Quantité IgM (mg) | Rendement (%) |
|------------------------|----------------|---|----------------------------------|--|---|----------------------|-------------------|
| I | 190 | 0,20 | 38 | 5 | 3,62 | 18 | 47 |
| II | 210 | 0,69 | 144 | 6,5 | 7,0 | 45,5 | 32 |
| III | 150 | 0,43 | 64,5 | 4,2 | 4,2 | 17,6 | 27 |
| IV | 182 | 0,48 | 87,4 | 4 | 6,62 | 26,5 | 30 |
| V | 200 | 0,50 | 100 | 3,8 | 8,54 | 32,5 | 33 |
| VI | 210 | 0,84 | 176,4 | 3,8 | 10,66 | 40,5 | 23 |
| VII | 230 | 0,38 | 87,4 | 7 | 6,05 | 42 | 48 |
| VIII | 190 | 0,54 | 102,6 | 5 | 6,56 | 32,8 | 32 |
| Total | 1562 | - | 800 | - | - | 255,4 | 32 ^(c) |

(a) Selon Mancini *et al.*. (1965)

(b) Selon la méthode de Lowry *et al.*. (1951)

(c) Rendement moyen

c - En immunodiffusion, par contre, des traces de contamination sont décelables et parfois quantifiables. Les principaux contaminants sont, par ordre décroissant : les IgG (de 0,5 à 2 %), les IgA (de 0,2 à 1 %), l' α_2 -macroglobuline (\simeq 0,1 %), l'orosomucoïde (< 0,1 %), et les constituants suivants à l'état de traces : albumine, haptoglobine, fibrinogène.

D - CONCLUSIONS

L'homogénéité des différentes préparations d'IgM, variant de 95 à 98 %, s'est avérée suffisante pour entreprendre une approche structurale. De plus la taille de l'échantillonnage d'IgM en notre possession permet d'envisager des comparaisons entre molécules normales et molécules pathologiques, ou entre molécules pathologiques.

II - CARACTERISATION DES IMMUNOGLOBULINES

A - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés, déterminée pour 4 des IgM pathologiques purifiées, et pour le mélange des IgM normales est reportée dans le Tableau V p.144. Les IgM étudiées présentent un caractère nettement acide avec un taux élevé : de 14,7 à 19,9 % d'acides aminés acides (acide aspartique, acide glutamique) ; cette caractéristique, générale à l'ensemble des Immunoglobulines, a été observée par Mestecky *et al* en 1972. Les différentes classes d'Ig de référence possèdent des pourcentages équivalents : 17,7 % (IgM), 19 % (IgG) et 16,7 % (IgA). Les valeurs obtenues pour les différentes IgM pathologiques sont en accord avec

TABLEAU V

COMPARAISON DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES^(a) DES IgM NORMALES ET PATHOLOGIQUES AVEC CELLES D' IMMUNOGLOBULINES DE REFERENCE .

| Acides aminés | I g M | | | | | | I g G ^(d) | I g A ^(d) | |
|----------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------------------------|----------------------|----------------------|---------|
| | IgM pathologiques | | | | | IgM normales | | | |
| | IgM ref. ^(b) | ZAJ | DUB | ESP | GRA | référence ^(c) | | | étudiée |
| Lys | 4,9 | 4,0 | 4,1 | 4,7 | 5,3 | 8,7 | 5,4 | 7,0 | 4,5 |
| His | 1,8 | 1,6 | 1,8 | 1,7 | 2,1 | 3,0 | 2,1 | 2,3 | 1,9 |
| Arg | 5,1 | 5,6 | 5,9 | 5,8 | 4,7 | 1,4 | 4,5 | 4,0 | 4,5 |
| Asp | 7,1 | 6,7 | 6,5 | 8,5 | 7,9 | 9,3 | 8,5 | 7,7 | 6,1 |
| Thr | 7,2 | 6,7 | 6,9 | 6,7 | 7,6 | 7,0 | 8,1 | 7,2 | 7,6 |
| Ser | 7,0 | 6,9 | 7,2 | 7,7 | 9,0 | 7,4 | 9,0 | 9,7 | 7,9 |
| Glu | 10,6 | 8,8 | 8,2 | 10,9 | 11,0 | 12,0 | 11,4 | 11,3 | 10,5 |
| Pro | 5,3 | 4,4 | 4,5 | 4,7 | 4,9 | 5,9 | 5,9 | 6,0 | 6,3 |
| Gly | 3,1 | 2,8 | 2,8 | 3,6 | 3,5 | 5,2 | 3,8 | 3,3 | 3,2 |
| Ala | 3,5 | 3,3 | 3,4 | 4,2 | 4,7 | 5,0 | 4,8 | 3,2 | 3,9 |
| Cys($\frac{1}{2}$) | 1,6 | 1,5 | 1,2 | 1,1 | 1,5 | 1,8 | 1,9 | 2,2 | 2,1 |
| Val | 6,5 | 6,1 | 5,6 | 6,3 | 6,6 | 5,4 | 7,4 | 8,1 | 6,0 |
| Met | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 0,8 | 1,7 | 0,8 | 0,85 | 0,8 |
| Ile | 2,7 | 2,5 | 2,7 | 2,7 | 2,5 | 2,6 | 2,6 | 2,1 | 1,7 |
| Leu | 6,3 | 5,3 | 6,5 | 7,4 | 6,9 | 5,2 | 7,6 | 7,2 | 7;8 |
| Tyr | 4,2 | 3,6 | 2,9 | 3,3 | 4,1 | 4,4 | 3,9 | 6,0 | 4,4 |
| Phe | 4,0 | 3,5 | 3,7 | 2,3 | 3,9 | 4,9 | 4,0 | 4,3 | 3,7 |
| Total ^(e) | 83,3 % | 76,9 % | 77,6 % | 86,5 % | 87,0 % | 90,9 % | 91,7 % | 92,4 % | 85,1 % |

(a) Composition centésimale en acides aminés (en g.p.100g de protéine)

(b) Selon Schultze et Heremans (1966)

(c) Selon Jouanneau (1978)

(d) Selon Heimburger *et al.*, (1964)

(e) La précision est de 3 %

les 2 IgM de référence et ne présentent pas de différences significatives entre elles, que ce soit dans le pourcentage total, ou au niveau de chaque résidu d'acide aminé. Il en est de même pour les IgM normales qui ressemblent à celles décrites par Jouanneau (1978) exceptée la teneur en résidu arginine (4,5 % au lieu de 1,4 %), qui se rapproche plutôt de celle obtenue pour les IgM pathologiques.

En conclusion une certaine homogénéité est observée dans la composition globale en acides aminés, dans toutes les classes d'immunoglobulines, mais aussi à l'intérieur d'une même classe, entre molécules normales ou pathologiques. Il faut cependant noter que la composition centésimale moyenne en acides aminés observée pour les IgM normales (91,3 %) est légèrement supérieure à celle obtenue pour les IgM pathologiques (82,2 %) sans que ce soit au profit d'un résidu en particulier. Une interprétation de cette différence est délicate à ce niveau d'expérimentation car il s'agit d'une composition globale et se rapportant à une molécule dont le PM approche le million.

B - COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES

1 - Composition centésimale : Les pourcentages obtenus pour chaque résidu par colorimétrie sont en accord avec ceux déterminés par chromatographie en phase gazeuse et rapportés dans le Tableau I ; article n° 2 ; p. 147 . C'est sur la base de ces compositions qu'est apparue la notion de familles d'IgM. L'article n° 2 ; p.146 décrit la ségrégation des IgM étudiées en 3 familles principales :

- la famille des IgM normales, avec une teneur moyenne de $7,2 \pm 0,4$ % de monosaccharides ;
- la famille d'IgM pathologiques à $7,3 \pm 0,4$ % de glucides ;
- la famille d'IgM pathologiques à $10 \pm 0,9$ % de glucides ;

MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF HUMAN MONOCLONAL (18) AND NORMAL (8) IGM IMMUNOGLOBULINS: PROPOSED STRUCTURAL MODELS FOR THEIR GLYCAN CHAINS

by Annie Cahour*, Marie-Paule Ollier-Hartmann*, C. Mihaesco** and L. Hartmann*

(Laboratoire de Chimie Clinique et Biologie Moléculaire, Université Pierre-et-Marie-Curie*; Laboratoire d'Hématologie et d'Immuno-pathologie, Centre Hayem, Hôpital Saint-Louis**, Paris)

SUMMARY

The carbohydrate composition of 18 monoclonal IgM (Waldenström macroglobulinemia) was determined by gas-liquid chromatography. Two populations occurred with mean sugar contents of 7.3 % (12 IgM) and 10 % (6 IgM). A value of 7.2 % was obtained for 8 IgM prepared from 8 normal sera. On the basis of mean molar ratios established for each monosaccharide residue, structural models for oligosaccharide units are proposed. The number of complex glycan chains (N-acetylglucosaminic type) is higher in the 10 % population, which would correspond to IgM with a mean sedimentation constant of 18.3S_{20,w}⁰. On the other hand, the 7.3 % population has a lower content of « mature » chains and its sedimentation constant would be inferior: 17S_{20,w}⁰.

RÉSUMÉ

L'analyse des monosaccharides neutres et aminés par chromatographie gaz liquide de 18 IgM monoclonales (macroglubulinémie de Waldenström) met en évidence deux populations ayant respectivement une teneur moyenne de 7,3 % (12 IgM) et de 10 % (6 IgM).

Une valeur de 7,2 % est obtenue pour 8 IgM préparées à partir de 8 sérums normaux. D'après des rapports molaires moyens établis pour chaque résidu sucré des modèles structuraux des chaînes oligosaccharidiques sont proposés. Le nombre de chaînes glycaniques complexes (de type N-acétyllactosamine) est plus élevé dans la population à 10 % qui correspondrait aux IgM ayant une constante de sédimentation

moyenne de 18.3S_{20,w}⁰. A l'opposé, la population à 7.3 % possède un nombre de chaînes « matures » moindre et sa constante de sédimentation moyenne serait inférieure : 17S_{20,w}⁰.

INTRODUCTION

Monoclonal IgM by definition correspond to populations of homogenous molecules. Depending on their origin, however, differences in mobility (26), molecular weight (8), antibody activity (27), etc., can occur. Considering the relative high carbohydrate content of IgM, it appeared interesting to determine if a variable glycosylation would allow their distinction, especially since it occurs on the Fc fragment of the molecule, admitted to be constant (9).

Monosaccharide analysis was thus systematically performed by gas-liquid chromatography for several monoclonal and normal IgM.

MATERIALS AND METHODS

Pathologic IgM were prepared from sera or plasmaphereses of patients with Waldenström's macroglobulinemia. Initially, an IgM-rich precipitate was obtained by various physical procedures. Cryoglobulins were precipitated at -4° C and pyroglobulins were insolubilized at 37° C. In the absence of temperature-dependent properties, a Sia reaction was performed on an aliquot of each sample in order to detect the presence of macroeuglobulin: precipitation was obtained by dialysis against distilled water. In the cases of macropseudoglobulinemia, IgM were precipitated with 50 % saturated ammonium sulfate.

Subsequently, the precipitates obtained were washed and then purified by gel filtration on Sepharose 6B, except for the cryoglobulins, which were purified by several cycles of re-resolution (37° C) and precipitation (4° C).

Normal IgM were isolated from individual sera of normal subjects affinity chromatography on Sepharose 4B-protamine system (28). Purification was achieved by gel filtration on sepharose 6B.

For each IgM preparation the protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (17) and purity was checked by cellulose acetate (microzone) electrophoresis (13), immunoelectrophoresis (microtechnique) (22), diffusion in agarose (10) and electro-immunodiffusion (16). A qualitative and quantitative analysis of impurities (albumin, fibrinogen, orosomucoid, α2-macroglobulin, α2-neuraminoglycoprotein, IgA and IgG) was systematically performed with specific antisera.

Monosaccharide composition was determined after methanolysis (3) (1.5 N-methanolic HCl in sealed ampoules under nitrogen at 85° C for 22 hours) by gas-liquid chromatography (2). After trimethylsilylation of O-methylated glycosides by trimethylsilylimidazole (TSIM), neutral and amino sugars were assayed separately with high sensitivity for the latter using a thermionic detector specific for nitrogen—and phosphorus—containing compounds.

Each value is furnished with a 5 % precision from the average of 4 to 5 determinations.

* 15, rue de l'École-de-Médecine, 75720 Paris Cedex 6, France.

** 2, place du Dr.-Fournier, 75475 Paris Cedex 10, France.

IGM : MONOSACCHARIDE COMPOSITION

RESULTS

The percent sugar composition of normal and pathologic IgM is shown in Table I. Among the monoclonal IgM studied, two populations can be distinguished; a major one (12 IgM) with a sugar content of 7.3 % and the other (6 IgM) with a mean content of 10 %. Normal IgM had a sugar content of 7.2 %. Mean molar ratios (number of carbohydrate residues per heavy (H) chain) were calculated for each monosaccharide on the bases of one pentameric IgM molecule of 10⁶ molecular weight, supposing that only H chains are glycosylated.

No N-acetylgalactosamine residue was found leading us to expect that the oligosaccharide units are linked N-glycosidically to the polypeptide backbone. Taking into account our estimated ratios and the recent findings on the primary structure of the glycans (19, 20, 21) we have proposed structural patterns reported in Table II.

DISCUSSION

The present work exhibits several particularities and guaranties as a result of its first conception: the study of monosaccharides of two relatively large samplings of monoclonal and normal IgM, the utilization of one reliable analytical technique, allowing the comparison of the results obtained.

Three populations were thus distinguished: two for monoclonal IgM (7.3 % and 10 % sugar) and one mean population (7.2 %) for normal IgM. The latter value obtained with a sampling of eight IgM isolated from eight different normal sera agrees with that of 6 % (11), to our knowledge the only published data concerning normal IgM. These results have enabled us to formulate schemes of structure in agreement with earlier findings in this field (23, 14, 4). We have included the terms « mature » and « immature » in order to be consistent with recent informations (24, 15) on the biosynthesis of the oligosaccharide chains of monoclonal IgM. According to these data, oligomannosidic-type glycans would act as the intermediates in the synthesis of complex structures through the transfer from a lipid acceptor to the nascent polypeptide chain. On the basis of these initial investigations, we observe that normal IgM of which glycosylation is relatively low reveal some homogeneity (although the same serum contains a mixture of IgM) in carbohydrate composition (7.2 ± 0.4 %) and in the maturation of glycan chains. On the contrary, the sugar content of pathologic IgM is included in the range of 7 to 10 % and their heterogeneity, for the two families occurs in respective ratios between « mature » and « immature » chains: the number of complex structures increases with a more complete glycosylation of the molecule (Fig. 1).

TABLE I
Monosaccharide composition (%) of purified IgM.

| | Sample | Fuc | Man | Gal | GlcNAc | NANA | Total | Average | | |
|----------------|------------|-------|------|------|--------|------|-------|-----------|-----|-----------|
| Monoclonal IgM | DID | 0.88 | 4.3 | 1.3 | 2.7 | 2.1 | 11.3 | 10 = 0.9 | | |
| | ROS | 0.55 | 4.1 | 1.2 | 2.9 | 1.8 | 10.6 | | | |
| | COU | 0.53 | 3.9 | 1.07 | 3.2 | 1.9 | 10.6 | | | |
| | GRA | 0.78 | 4.8 | 1.30 | 2.3 | 1.10 | 10.3 | | | |
| | DUB | 0.53 | 4.6 | 1.01 | 2.27 | 0.71 | 9.1 | | | |
| | COL | 0.57 | 4.4 | 1.02 | 2.2 | 0.77 | 9.0 | | | |
| | REN | 0.36 | 3.9 | 0.93 | 2.2 | 0.97 | 8.3 | 7.3 ± 0.4 | | |
| | VAS | 0.48 | 3.9 | 0.89 | 2.1 | 0.72 | 8.1 | | | |
| | LET | 0.48 | 3.8 | 0.82 | 2.06 | 0.71 | 7.9 | | | |
| | GIR | 0.47 | 3.8 | 0.88 | 1.76 | 0.61 | 7.5 | | | |
| | SCH | 0.44 | 3.5 | 0.99 | 1.9 | 0.64 | 7.5 | | | |
| | DEN | 0.36 | 3.3 | 0.78 | 2.17 | 0.66 | 7.3 | | | |
| | LEC | 0.42 | 3.1 | 0.92 | 1.50 | 0.93 | 6.9 | | | |
| | ZAJ | 0.31 | 3.1 | 0.77 | 2.06 | 0.52 | 6.8 | | | |
| | LAU | 0.38 | 3.0 | 0.91 | 1.7 | 0.77 | 6.8 | | | |
| | MOS | 0.42 | 3.2 | 0.76 | 1.9 | 0.49 | 6.8 | | | |
| | ESP | 0.405 | 3.2 | 0.69 | 1.9 | 0.50 | 6.7 | | | |
| | CAI | 0.55 | 3.1 | 0.75 | 1.56 | 0.63 | 6.6 | | | |
| | Normal IgM | I | 0.53 | 3.6 | 1.30 | 1.42 | 0.97 | | 7.9 | 7.2 ± 0.4 |
| | | II | 0.55 | 2.7 | 1.11 | 1.45 | 1.0 | | 6.8 | |
| III | | 0.47 | 2.85 | 0.9 | 1.75 | 0.91 | 6.9 | | | |
| IV | | 0.59 | 2.4 | 0.94 | 1.5 | 1.2 | 6.6 | | | |
| V | | 0.59 | 3.2 | 0.99 | 1.70 | 1.01 | 7.5 | | | |
| VI | | 0.47 | 3.1 | 1.01 | 1.45 | 0.83 | 6.9 | | | |
| VII | | 0.66 | 2.9 | 1.09 | 1.98 | 1.23 | 7.8 | | | |
| VIII | | 0.52 | 3.0 | 1.12 | 1.40 | 1.2 | 7.3 | | | |

A. CAHOUR, M.-P. OLLIER-HARTMANN, C. MIHAESCO AND L. HARTMANN

TABLE II
Proposed structural schemes for the carbohydrate moiety of IgM.

| Group | Molar monosaccharide composition per single heavy chain | Structural schemes of glycans |
|------------------------------|---|--|
| Monoclonal IgM (10 % sugar) | 4 Fuc, 24 Man, 6 Gal, 11 GlcNAc, 4 NANA. | 5 carbohydrate chains: 3 complex structures N-acetyllactosaminic type, « mature », biantennary. 2 simple structures oligomannosidic type, « immature ». |
| Monoclonal IgM (7.3 % sugar) | 3 Fuc, 19 Man, 5 Gal, 9 GlcNAc, 2 NANA. | 4 or 5 carbohydrate chains: 2 complex structures N-acetyllactosaminic type, « mature », biantennary. 2 or 3 simple structure oligomannosidic type, « immature ». |
| Normal IgM (7.2 % sugar) | 3 Fuc, 16 Man, 5 Gal, 7 GlcNAc, 3 NANA. | 3 carbohydrate chains: Complex structures N-acetyllactosaminic type, « mature » mono-orbiantennary. |

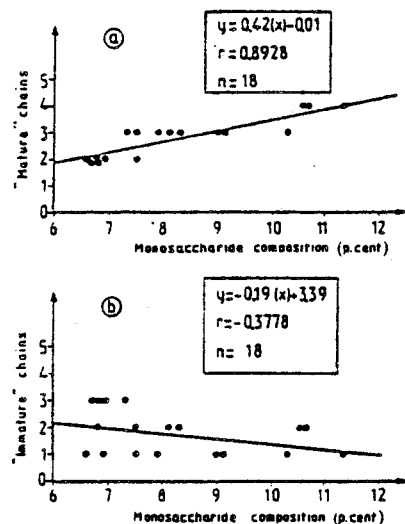


FIG. 1.

Regression curves plotting:

- a) number of complex glycan chains against molecular monosaccharide composition (positive and significant correlation $r = 0.8928$);
- b) number of simple glycan chains against molecular monosaccharide composition (negative and non significant correlation as expected $r = -0.3778$).

The present results concerning monoclonal IgM were compared to those published by us in the field of analytical ultracentrifugation (6, 7). A sampling of 95 sera of patients with Waldenström's macroglobulinemia exhibited a bimodal distribution of IgM sedimentation constant at $17S_{20,w}^0$ and $18.35S_{20,w}^0$. It is thus possible to deduce a correlation between the two

groups: the first would correspond to IgM with 7.3 % glycosylation with a mean sedimentation constant of $17S_{20,w}^0$, while the second would be composed of IgM with 10 % glycosylation with a mean sedimentation of $18.35S_{20,w}^0$. Research is currently under way to confirm this possibility.

The patterns proposed here are hypothetical, since they are based on means of residues; each IgM possesses its own individuality within a sampling. These models must be verified by structural analysis of several purified glycopeptides. Nevertheless, the size of the sampling presently studied seems to be sufficient enough to accept the tripartate distribution of IgM.

Certain aspects of this work on the elaboration of structural schemes require discussion. We arbitrarily chose a mean molecular weight of 10^6 , whereas it can vary to 8.5×10^5 to 1.15×10^6 (2), depending on the IgM. We have considered that only the heavy chains (μ) were glycosylated, while it is known that 15 % of the light (κ or λ) chains are glycosylated as well (25). Since IgM are very large molecules, many preparations could not be entirely freed of glycoprotein contaminants, some of which exhibiting a low sugar content (IgG), but others being richer ($\alpha 2$ -macroglobulin and IgA). They were immunologically detected in only trace amounts (≤ 1 %) but could not interfere with the interpretation of our results in regards of the confidence limits furnished by the calculations. We observed that the number of GlcNAc residues per H chain was relatively low in all cases, which could have led us to postulate the occurrence of a tetrasaccharide core (3 Man-GlcNAc \sim As). This « non-orthodox » structure has been described several times in the cases of

IGM : MONOSACCHARIDE DE COMPOSITION

pathologic IgM (18, 12) and IgE (1). The fact that GlcNAc residue was systematically lacking, led us to admit a deficient liberation of GlcNAc (Fournet, B., personal communication). The covalent N-acetylglucosamine-asparagine linkage is very stable and so we verified it was not cleaved towards our experimental conditions of methanolysis (see Table III).

TABLE III
N-acetylglucosamine composition of ovalbumin and of one pathologic IgM obtained in different conditions.

| Method | Ovalbumin | | Monoclonal IgM (VAS) | |
|--------------------------------------|-----------|-------------|----------------------|-------------|
| | percent | molar ratio | per cent | molar ratio |
| Acid hydrolysis (4 hours, 100° C) | | | | |
| 4 N HCl | 2.2 | 4.2 | 3.4 | 154 |
| 4 N HTFA | 2.2 | 4.2 | 3.2 | 145 |
| Methanolysis (22 hours, 85° C) | | | | |
| 1.5 N methanolic HCl | 1.5 | 3.2 | 2.2 | 100 |

This type of segregation of pathologic IgM was reported in 1968 by Davie and Osterland (5) concerning 8 IgM (group I: 5 IgM containing 10.69 % sugar and group II: 3 IgM with 7.71 % sugar) but no interpretation was proposed.

The present work suggests that the observed glycosylation differences involve the number and the composition of the glycan units rather than the variation of one residue in relation to the others in oligosaccharide chains. Further investigations of the structure are required to confirm our predictions. Thus as it was the aim settled on by several laboratories, an approach to the mechanism of the cause of cancer could be expected to involve some specific function of the carbohydrate units in biological activity of immunoglobulins. The fact that oligomannosidic structures are only presumed to occur in pathologic molecules or in a lower amount if present in normal IgM could reflect some deficiency in the processing of glycans.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. P. Boivin for supplying us with plasma from patients with Waldenstrom's macroglobulinemia and Pr. J.-P. Soulier for the samples of normal plasma. This study was supported by grants from Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (FRA.1), Centre National de la Recherche Scientifique (ERA.696) and Association Claude-Bernard (C 20).

REFERENCES

- Baenziger J., Kornfeld S. & Kochwa S. Structure of the carbohydrate units of IgE immunoglobulins. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 1889.
- Canour A. & Hartmann L. Study of neutral and aminomonosaccharides by gas-liquid differential chromatography: application to three reference glycoproteins. *J. Chromat.*, 1978, 152, 475.
- Chambers R. E. & Ciamp J. R. An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochem. J.*, 1971, 125, 1009.
- Chapman A. & Kornfeld R. Structure of the high mannose oligosaccharides of a human IgM myeloma protein. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 816.
- Davie J. M. & Osterland C. K. Chemical characterization of glycopeptides from human γ M-globulins. *J. exp. Med.*, 1968, 128, 699.
- Filitti-Wurmser S., Gentou C. & Hartmann L. Existence de deux variétés 17S et 18.3S de γ M et d'une augmentation de globulines 6.6S sériques dans la maladie de Waldenstrom. *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 1964, 9, 398.
- Filitti-Wurmser S., Gentou C. & Hartmann L. Polymorphisme des macroglobulines de Waldenstrom. *Clin. Chim. Acta*, 1967, 15, 253.
- Filitti-Wurmser S. & Hartmann L. Poids moléculaires des immunoglobulines IgM humaines et de leurs sous-unités. *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 1968, 13, 967.
- Florent G., Lehman D., Lockart D. & Putman F. Identity of the Fc fragments of pathological and normal immunoglobulin M. *Biochemistry*, 1974, 13, 3372.
- Hartmann L. & Toilliez M. Microméthode d'étude en gelose de la réaction antigène-anticorps (variante du procédé d'Ouchterlony). *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 1957, 2, 197.
- Jouanneau J. Etude des chaînes oligosaccharidiques des IgM de Waldenstrom. Préparation et caractérisation des IgM. Analyse structurale des glycopeptides. Thesis, University of Paris VII, 1978.
- Jouanneau J. & Bourillon R. Characterization of a glycopeptide from pathological human IgM, with an unusual oligosaccharide core. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 91, 1057.
- Kaplan A. & Savory J. Evaluation of a cellulose acetate electrophoresis system for serum proteins fractionation. *Clin. Chem.*, 1965, 11, 937.
- Kornfeld R., Keller J., Baenziger J. & Kornfeld S. The structure of the glycopeptide of human γ G myeloma proteins. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 3259.
- Kornfeld S., Gregory W. & Chapman A. Class E Thy-1 negative mouse lymphoma cells utilize an alternate pathway of oligosaccharide processing to synthesize complex-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 11649.
- Laurell C. B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. biochem.*, 1966, 15, 45.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- Miller F. Glycopeptides of human immunoglobulins. *Immunochimistry*, 1972, 9, 217.
- Montreuil J. Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implications. *Pure appl. Chem.*, 1975, 42, 431.
- Montreuil J. & Vilgenthart J. F. G. Primary structure and conformation of glycans N-glycosidically linked to peptide chains in glycoconjugate research. P. 35, in: Proc. 4th Intern. Symp. Glycoconjugates. Woods Hole (1977). Vol. 2. J. D. Gregory & R. W. Jeanloz, eds., Academic Press, New York, 1979.
- Montreuil J. Primary structure of glycoprotein glycans-basis for the molecular biology of glycoproteins. P. 157, in: Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, Vol. 37. R. S. Tipson & D. Horton, eds., Academic Press, New York, 1980.
- Schwaegler J. J. Une microméthode de l'immunoelectrophorese. *Int. Arch. Allergy*, 1955, 7, 103.
- Shimizu A., Putman F. W., Paul C., Ciamp J. R. & Johnson I. Structure and role of the five glycopeptides of human IgM immunoglobulins. *Nature New Biol.*, 1971, 231, 73.
- Tabas I., Schlessinger S. & Kornfeld S. Processing of high mannose oligosaccharides to form complex type oligosaccharides of the newly synthesized polypeptides of the vesicular stomatitis virus G protein and the IgG heavy chain. *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 716.
- Tabas I. & Kornfeld S. Purification and characterization of a rat liver Golgi- α -Mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 11655.
- Virella G. & Lechner M. C. Two IgM paraproteins differing in carbohydrate content in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin. Chim. Acta*, 1976, 67, 137.
- Warner N. L., Mackenzie M. R. & Fudenberg H. H. Anti-antibody activity of a monoclonal macroglobulin. *Proc. nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 1971, 68, 2846.
- Wickman A. & Borv H. Purification of human immunoglobulin M by affinity chromatography on protamine-sepharose. *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 440, 363.

2 - Composition molaire : Les rapports molaires obtenus pour chacun des résidus monosaccharidiques sont donnés dans le Tableau VI ; p.151 pour les IgM normales et dans le Tableau VII; p.152 pour les IgM pathologiques. Ils n'ont pu être calculés sur la base de 3 résidus de mannose du fait de la présence simultanée des structures N-acétyllactosaminiques et oligomannosidiques dans les IgM. Les valeurs obtenues pour les IgM monoclonales sont en accord avec celles relevées dans la littérature ; par contre une différence relativement importante concernant les résidus de N-acétylglucosamine, de fucose et d'acide N-acétylneuraminique est observée entre les valeurs obtenues pour les IgM normales provenant des 8 sérums différents et celle donnée par Jouanneau (1978), la seule publiée à notre connaissance au sujet des IgM normales.

3 - Comparaison entre familles d'IgM :

Une comparaison est possible entre les différentes familles définies par leur composition centésimale en sucres. Les IgM normales qui sont représentatives d'une population statistique, possèdent des rapports molaires supérieurs à ceux des IgM pathologiques (Tableau VIII ; p.153) :

- en galactose : 1,46 contre 1,13 et 1,14 ;
- en fucose : 0,83 contre 0,69 et 0,63 ;
- en acide N-acétylneuraminique : 0,84

contre 0,79 et 0,54. Les IgM pathologiques, au contraire, possèdent un rapport molaire plus élevé en mannose (4,31 et 4,60 contre 4,09) ; or ce rapport, lorsqu'il est supérieur à 3, est directement représentatif des structures oligomannosidiques dont la caractéristique essentielle est d'être immatures.

Une comparaison entre les deux familles d'IgM pathologiques ne révèle pas de différences significatives à ce niveau d'expérimentation.

TABLEAU VI

COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES DES IgM NORMALES

| Serum N° | Composition molaire | | | | | Composition centésimale (rappel) |
|-------------|---------------------|------|------|--------|-------|--|
| | Fuc | Gal | Man | GlcNAc | NeuAc | |
| I | 0,73 | 4,5 | 1,62 | 2,45 | 0,71 | 7,9 |
| II | 0,88 | 3,93 | 1,62 | 2,72 | 0,85 | 6,8 |
| III | 0,75 | 4,12 | 1,31 | 3,07 | 0,77 | 6,9 |
| IV | 0,99 | 3,64 | 1,43 | 2,86 | 1,06 | 6,6 |
| V | 0,86 | 4,24 | 1,31 | 2,83 | 0,78 | 7,5 |
| VI | 0,74 | 4,44 | 1,45 | 2,69 | 0,69 | 6,9 |
| VII | 0,92 | 3,70 | 1,39 | 3,06 | 0,92 | 7,8 |
| VIII | 0,78 | 4,14 | 1,54 | 2,57 | 0,96 | 7,3 |

} 7,2±0,4

TABLEAU VII

COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES DES IgM PATHOLOGIQUES

| | Composition molaire | | | | | Composition centésimale (rappel)* |
|-----------|---------------------|------|------|--------|-------|-----------------------------------|
| | Fuc | Gal | Man | GlcNAc | NeuAc | |
| DID | 0,87 | 3,87 | 1,17 | 2,98 | 1,10 | 11,3 |
| ROS | 0,58 | 3,97 | 1,16 | 3,28 | 1,01 | 10,6 |
| COU | 0,57 | 3,80 | 1,04 | 3,54 | 1,08 | 10,6 |
| GRA | 0,82 | 4,54 | 1,24 | 2,79 | 0,61 | 10,3 |
| DUB | 0,62 | 4,89 | 1,07 | 2,97 | 0,44 | 9,1 |
| COL | 0,68 | 4,78 | 1,11 | 2,95 | 0,49 | 9,0 |
| } 10±0,9 | | | | | | |
| REN | 0,47 | 4,62 | 1,10 | 3,12 | 0,69 | 8,3 |
| VAS | 0,64 | 4,71 | 1,07 | 3,06 | 0,51 | 8,1 |
| LET | 0,66 | 4,73 | 1,02 | 3,09 | 0,52 | 7,9 |
| GIR | 0,67 | 4,90 | 1,13 | 2,85 | 0,46 | 7,5 |
| SCH | 0,63 | 4,56 | 1,29 | 3,02 | 0,49 | 7,5 |
| DEN | 0,54 | 4,48 | 1,06 | 3,41 | 0,52 | 7,3 |
| LEC | 0,67 | 4,47 | 1,33 | 2,75 | 0,78 | 6,9 |
| ZAJ | 0,50 | 4,51 | 1,12 | 3,44 | 0,44 | 6,8 |
| LAU | 0,61 | 4,39 | 1,33 | 3,02 | 0,65 | 6,8 |
| MOS | 0,66 | 4,61 | 1,09 | 3,22 | 0,41 | 6,8 |
| ESP | 0,65 | 4,66 | 1,00 | 3,25 | 0,42 | 6,7 |
| CAI | 0,89 | 4,58 | 1,11 | 2,87 | 0,54 | 6,6 |
| } 7,3±0,4 | | | | | | |

* Les IgM sont réparties dans les deux populations définies selon leur composition centésimale (voir Tableau 1; article 2; p.147) .

TABEAU VIII

COMPARAISON DES IGM NORMALES ET DES IGM PATHOLOGIQUES FONDÉE SUR LA VALEUR MOYENNE DE LEURS RAPPORTS MOLAIRES .

| Monosaccharides | IGM NORMALES | | IGM PATHOLOGIQUES | | | | | |
|-----------------|--------------|------------------|-------------------|--------|---------|------------------|------|-------|
| | Ref (a) | valeurs extrêmes | m-N* | Ou (b) | Dau (c) | valeurs extrêmes | m-7* | m-10* |
| - Fuc | 0,31 | 0,73 - 0,99 | 0,83 | 0,65 | 0,50 | 0,47 - 0,89 | 0,69 | 0,63 |
| - Gal | 1,3 | 1,33 - 1,62 | 1,46 | 1,30 | 1,2 | 1,00 - 1,3 | 1,13 | 1,14 |
| - Man | 3,9 | 3,64 - 4,5 | 4,09 | 3,9 | 5,0 | 3,80 - 4,90 | 4,31 | 4,60 |
| - GlcNAc | 4,2 | 2,45 - 3,07 | 2,78 | 3,2 | 2,4 | 2,75 - 3,54 | 3,08 | 3,09 |
| - NeuAc | 0,31 | 0,69 - 1,06 | 0,84 | 1,0 | 0,88 | 0,41 - 1,10 | 0,79 | 0,54 |

(a) Selon Jouanneau (1978);

(b) Selon Shimizu *et al.*(1971);

(c) Selon Niedermeier *et al.*(1972).

(*) m-N; m-7; m-10 : moyennes obtenues respectivement pour les Igm normales et pathologiques à 7 % et 10 % de monosaccharides.

C - CARACTERISATION DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTEINE

Jusqu'à présent la coexistence de glycanes O- et N-glycosylés parmi les Immunoglobulines, n'a été détectée que dans les IgA (IgA sérique : Baenziger et Kornfeld 1974 a et b) ; IgA de sécrétion : Pierce-Crétel *et al* 1981) et dans les IgD (Clamp et Johnson, 1972). L'analyse en chromatographie en phase gazeuse de notre échantillonnage d'IgM, aussi bien normales que pathologiques, n'a révélé la présence d'aucun résidu de N-acétylgalactosamine, confirmant la présence exclusive de liaisons N-glycosidiques entre la fraction glucidique et la fraction protéique des IgM.

D - CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES

La recherche de la nature des acides sialiques présents dans les 2 IgM pathologiques ZAJ et GRA et dans un mélange d'IgM normales par hydrolyse acide formique ménagée (voir matériel et méthodes p.115) a révélé la présence unique d'acide N-acétylneuraminique, confirmant l'idée précédemment énoncée selon laquelle seul le groupement N-acétyl était trouvé dans les glycoprotéines appartenant au genre humain.

E - CARACTERISATION DES CHAINES LEGERES

1 - Identification : La nature des chaînes légères est déterminée par immunoélectrophorèse sur gélose et reportée dans le Tableau III;p.137.

2 - Préparation des chaînes légères :

Les chaînes légères des IgM sont préparées par réduction des ponts disulfures et alkylation des groupements thiols libérés (voir matériel et méthode p.116) et séparées des chaînes lourdes par gel filtration sur une colonne de Sephadex G-100, éluée par de l'acide acétique 1M. Un exemple est donné (fig.27a ; p.155 pour l'IgM GRA.

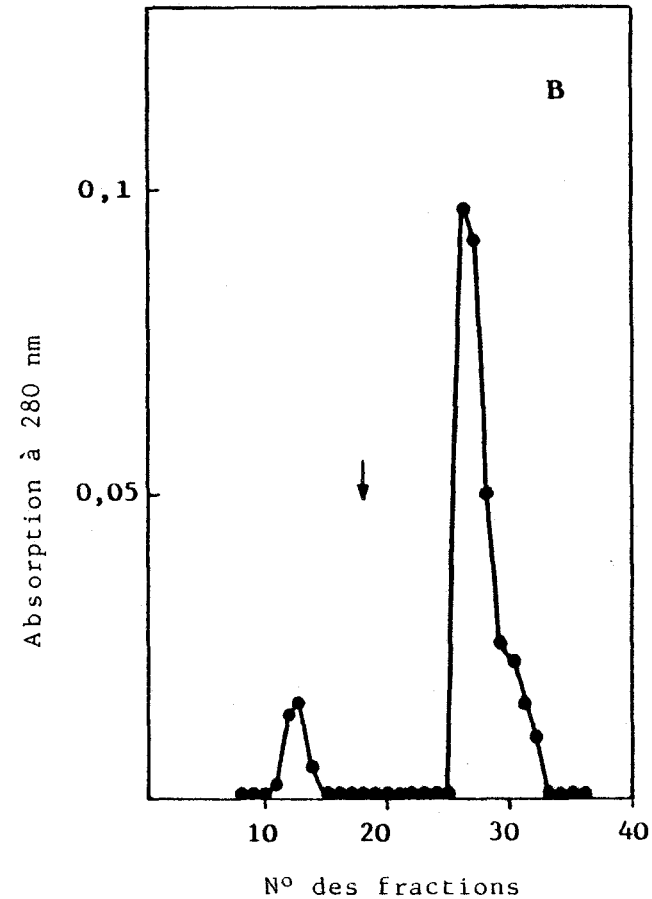
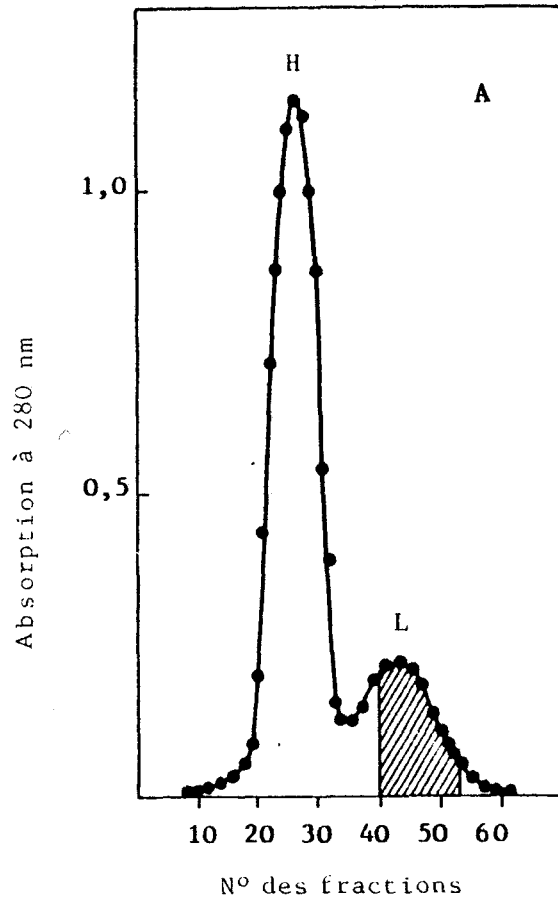


Figure 27: Préparation et purification des chaînes légères

A- Séparation des chaînes légères et lourdes après réduction et alkylation;
Chromatographie sur Sephadex G-100 (2,6x80 cm); Elution par de l'acide acé-
tique 1M; Débit 8ml/H; Vol. des fractions: 3ml .

B- Purification des chaînes légères sur immunoadsorbant;
Dimensions de la colonne : 1x13 cm; Vol. des fractions: 1ml; Lavage de la colon-
ne par NaCl 0,15M; Elution (↓) des chaînes L adsorbées par du tampon glyco-colle
HCl 0,1M pH 2,2 .

3 - Purification des chaînes légères :

Un contrôle immunologique (immunoélectrophorèse et immunodiffusion) de la fraction correspondant à la partie hâchurée sur la Fig. 27a ; p.155 a révélé une hétérogénéité importante. Une purification par immunoabsorption comme elle a été décrite précédemment p. 116 a été entreprise (voir Fig. 27b ; p.155). Il est en effet nécessaire d'éliminer toute trace de chaîne H ou de chaîne J, toutes deux étant glycosylées. La contamination par la chaîne H est évidente ; la persistance de traces de chaîne J est tout aussi probable malgré sa faible représentation dans une IgM (1 chaîne J/10 chaînes L) (Niedermeier *et al*, 1972) mais son écart pondéral avec la chaîne L est plus faible que celui observé entre chaînes H et L (voir p.21). Bien que le rendement de cette seconde opération ait été relativement faible (30 %) l'homogénéité de la chaîne légère λ de l'IgM GRA s'est révélée positive.

4 - Recherche d'une glycosylation éventuelle des chaînes légères purifiées :

La présence de sucres est recherchée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse de 500 μ g de chaîne L purifiée. Aucune trace de glycosylation n'a été détectée sur les chaînes légères des 3 IgM ZAJ, VAS et GRA étudiées. Ces IgM possédant un taux de glycosylation différent (6,8 %, 8,1 % et 10,3 %) respectivement, il ne semble pas qu'une glycosylation importante de la molécule soit responsable de la fixation de glycannes sur la chaîne L, comme on aurait pu le supposer. Le type même de la chaîne (λ ou κ) ne paraît pas non plus favoriser sa glycosylation ; ceci est en accord avec les résultats d'Edmunson *et al* (1968) qui ont constaté que les 2 types λ et κ présentaient la même susceptibilité à une glycosylation éventuelle.

F - CONCLUSIONS

Les IgM préparées possèdent une composition en acides aminés relativement homogène, en accord avec les études rapportées dans la littérature.

Toutefois des différences appréciables sont observées au niveau de leur composition centésimale en monosaccharides, permettant de définir deux familles parmi les IgM pathologiques : l'une faiblement glycosylée (IgM-7) et l'autre fortement glycosylée (IgM 10). La troisième famille, constituée des IgM normales, présente une certaine uniformité (cf. Tableau I ; p.147)

L'examen des rapports molaires obtenus pour les différents monosaccharides ne révèle pas de différence significative pour un résidu particulier ; ceci laisse entrevoir une possibilité d'interprétation des différences observées dans les compositions glucidiques, plutôt envers le nombre et la structure des chaînes oligosaccharidiques constitutives des IgM que vis à vis d'un résidu donné.

Conformément à la littérature les glycanes des IgM étudiées sont liés exclusivement par l'intermédiaire d'une liaison N-glycosidique à la partie protéique.

CHAPITRE II : PREPARATION ET CARACTERISATION DES CHAINES GLYCANNIQUES

I - PREMIERE APPROCHE ANALYTIQUE

Une première estimation globale de leur composition en chaînes oligosaccharidiques a été tentée sur des IgM caractéristiques de l'échantillonnage à notre disposition. Pour ce faire, les IgM suivantes ont été utilisées à l'état natif, à raison de 1 mg par Ig : 4 IgM normales (II, IV, VI, VIII), et 4 IgM pathologiques représentatives des principaux pourcentages en monosaccharides (7, 8, 9 et 10 %), telles que ZAJ (6,8 %), VAS (8,1 %), COL (9,0 %) et GRA (10,3 %).

Une hydrazinolyse suivie d'une réduction par le borohydrure tritié ont été réalisées selon les conditions expérimentales décrites p.117 . Après purification par gel filtration sur une colonne de Bio-Gel P-2 les échantillons obtenus sont concentrés par évaporation rotative sous vide au Bucchi. Une partie aliquote de chacun est utilisée pour caractériser leurs chaînes oligosaccharidiques constitutives par chromatographie sur couche mince (TLC) sur plaque de gel de silice (Kieselgel 60, Merck) dans le solvant rapide décrit p.119 , et en présence de témoins, de migration (voir Fig. 1 ; article n° 3 ; p.168). Ces résultats préliminaires, décrits p.168 donnent un aperçu de la composition en chaînes glycaniques des différentes populations d'IgM. Les profils de migration obtenus sont sensiblement les mêmes ; c'est essentiellement d'un point de vue quantitatif que des différences se dégagent à ce niveau d'expérimentation. En effet dans tous les cas 8 bandes de migration sont identifiées et une observation attentive de leurs intensités respectives permet de formuler la corrélation suivante : à une IgM

fortement glycosylée correspondent les structures glycaniques les plus lourdes, et inversement, les IgM faiblement glycosylées sont enrichies en structures légères. C'est ainsi que la bande IV prédomine dans l'IgM-7 (ZAJ) et la bande VI dans l'IgM-10 (GRA) ; les IgM-8 et IgM-9 présentent des profils intermédiaires, de même que les IgM normales. Au sujet de ces dernières, précisons qu'un seul exemple est présenté dans la figure car les 4 échantillons utilisés ont donné des profils identiques.

Puisqu'aucune différence n'est apparue entre les sérums individuels normaux, et en tenant compte des deux faits suivants :

- que les IgM d'un sérum normal constituent une population hétérogène,

- que la concentration sérique en IgM d'un sérum normal est très faible,

nous avons eu tout avantage à mélanger toutes les préparations d'IgM normales afin d'obtenir une quantité appréciable (200 mg) d'une population statistique.

II - SELECTION DE 3 IgM

A la suite de cette première étape notre choix s'est limité à 3 IgM que nous possédions en quantité suffisante : IgM normales (200 mg : voir ci-dessus), ZAJ : IgM-7 (300 mg) et GRA : IgM-10 (500 mg) pour pouvoir leur appliquer entièrement notre stratégie d'étude structurale, exposée dans le chapitre "matériel et méthodes", p. 113 .

Il faut noter que dans un premier temps la plus grande partie des préparations correspondant

aux 3 IgM avait été soumise à deux hydrolyses protéasiques successives (papaine + pronase) dans le but de réaliser le fractionnement habituel des différents glycopeptides par gel filtration et chromatographie sur résines échangeuses d'ions.

- Une hydrolyse papainique a été effectuée selon Porter (1959) en tampon Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,15M pH 7,5 à 37°C pendant 4h, en présence de chlorhydrate de cystéine 0,1M nécessaire au maintien d'un milieu réducteur favorable à l'activité de l'enzyme. Celui-ci est utilisé dans un rapport enzyme/substrat : 1/50 ; il est activé par addition d'une solution d'EDTA 0,002M. Le pH est maintenu à 7,5 pendant toute la durée de la réaction par addition de solution Tris 1M. Une atmosphère de toluène empêche toute contamination bactérienne. La réaction est arrêtée par acidification à pH 4,5 par addition de 2 gouttes d'acide acétique glacial et congélation à -20°C. L'hydrolysate est analysé par gel filtration sur une colonne de Sephadex G-100 (2,8 x 80 cm) et élution par de l'acétate de pyridine 0,1M à pH 5,3 (voir Fig. 28 ; p.161). Le dosage des protéines dans chaque fraction est effectué par une mesure de l'absorption à 280 nm, et celui des hexoses par une lecture de la DO à 492 nm, après avoir pratiqué une réaction selon Dubois *et al* (1956) en présence de phénol sulfurique sur une partie aliquote (200µl) de chacune des fractions. La Fig. 28 correspond au profil d'élution obtenu pour l'hydrolysate de l'IgM ZAJ ; le premier pic, ne contenant pas de glycannes doit correspondre au fragment Fab, des molécules d'IgM éventuellement non hydrolysées seraient exclues tout à fait en début d'élution. Le second pic , le seul à posséder des glucides, est constitué par l'ensemble des glycopeptides de l'IgM ZAJ. Le dernier pic dont le poids moléculaire est le plus faible correspond aux peptides et acides aminés libérés après dégradation papainique .

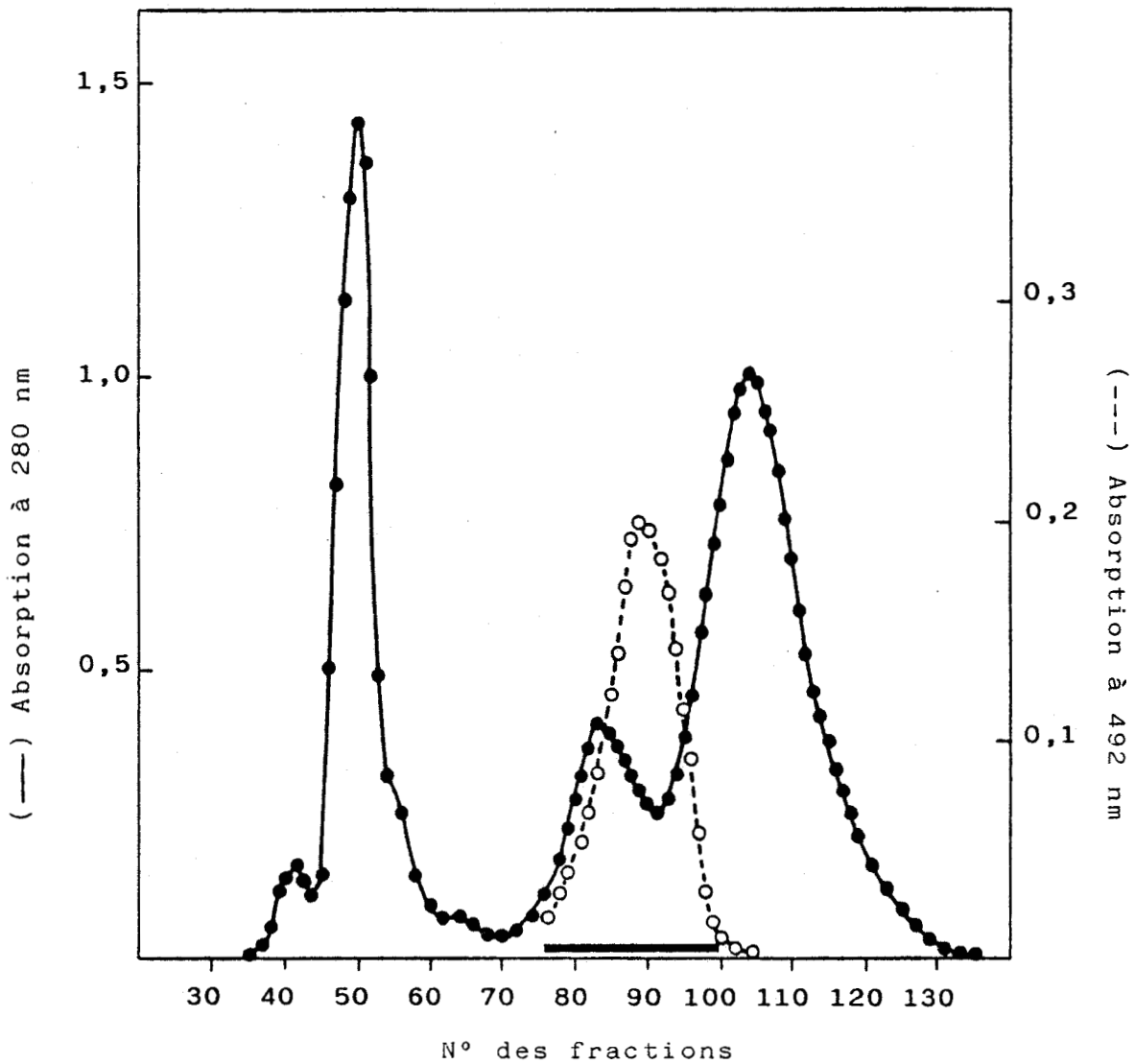


Figure 28 : *Hydrolyse paraïnique de l'IgM ZA7*

*Chromatographie par gel filtration sur Sephadex G-100 (2,8x80 cm); Elution par de l'acétate de pyridine 0,1M pH 5,3; Débit:8ml/H; Vol. des fractions :5ml;
— :Fraction glycopeptidique conservée.*

- Une hydrolyse pronasique a été effectuée selon Jouanneau (1978) sur la fraction glycopeptidique brute obtenue ci-dessus après hydrolyse papaïnique. La protéolyse est réalisée en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1M pH 8,0, sous atmosphère de toluène, le rapport Enz/S étant encore de 1/50. La présence d'ions Ca^{2+} (apportée par des traces d'acétate de calcium) est nécessaire à l'activation de l'enzyme. L'hydrolyse s'effectue à 37°C pendant 6h. avec une deuxième addition d'enzyme au bout de 3h ; le pH est maintenu à 8,5 pendant toute la durée de la réaction grâce à une solution de soude 0,1N. La réaction est arrêtée par acidification à pH 4,5 et congélation à -20°C. L'hydrolysats est analysé par gel filtration dans les mêmes conditions que pour l'hydrolysats papaïnique (voir Fig.29 p.163). Le but de cette seconde hydrolyse était d'obtenir des glycopeptides avec un nombre limité d'acides aminés; c'est ce qui se traduit sur le profil d'éluion obtenu: le pic correspondant aux glycopeptides absorbe très peu à 280 nm , contrairement au deuxième pic (dont l'absorption à 492 nm est nulle) qui n'est constitué que de petits peptides et d'acides aminés provenant de la dégradation des glycopeptides obtenus lors de la première hydrolyse enzymatique.

Entre temps nous avons vu qu'il était possible d'isoler les chaînes glycaniques du reste de la protéine par hydrazinolyse ; nous avons donc appliqué cette technique aux lots glycoprotéiques correspondant à chaque IgM. Les résultats obtenus (article n° 3 ; Fig. 3 a, b ; p.170 ; dépôts 2,5, 8) sont identiques à ceux observés pour les IgM correspondantes utilisées à l'état natif (Fig.1 ; p.168; dépôts 1,36). Nous aurions pu espérer une réactivité des glycopeptides à l'hydrazine anhydre supérieure à celle de la molécule intacte ; en fait le réactif agit progressivement : il dégrade la chaîne polypeptidique, libérant les hydrazides

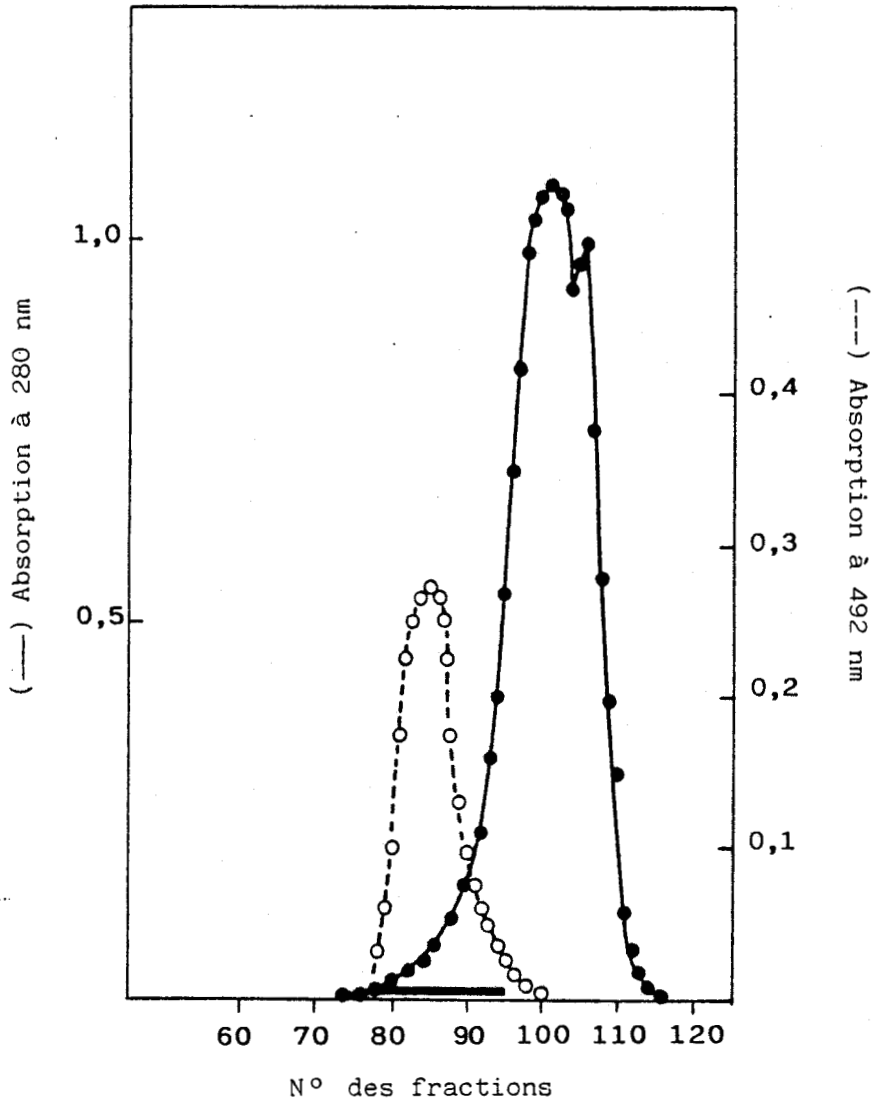


Figure 29 : *Hydrolyse pronasique de la fraction glyco-peptidique brute obtenue après hydrolyse papaïnique (IgM ZAG)*

Chromatographie par gel filtration sur Sephadex G-100 (2,8x80 cm); Elution par de l'acétate de pyridine 0,1M pH 5,3; Débit: 8ml/H ; Vol. des fractions: 5ml; — : Fraction glycopeptidique conservée.

correspondant aux acides aminés constitutifs et rendant donc accessibles tous les séquons porteurs de chaînes glycaniques.

Cette constatation nous conduit à envisager dorénavant l'utilisation directe de l'action de l'hydrazine anhydre sur la glycoprotéine native. Ce procédé fournira un double avantage : d'une part, un gain de temps considérable, d'autre part l'obtention directe de chaînes glycaniques.

III - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES CHAINES GLYCANNIQUES.

La suite de nos démarches concernant l'étude structurale des glycanes constitutifs des 3 IgM sélectionnées consiste en un premier fractionnement sur une colonne de ConA ; suivi d'une caractérisation des fractions obtenues. Cela fait l'objet de l'article n°3; p.165 dans lequel sont décrites les 3 principales étapes :

1 - L'hydrazinolyse des glycopeptides suivie de la réduction par le borohydrure tritié ;

2 - Le fractionnement des chaînes oligosaccharidiques par chromatographie d'affinité sur colonne de Con A ;

3 - La caractérisation de ces différentes fractions :

a - quantitative : par comptage de leur radioactivité;

b - qualitative :

- par détermination des rapports molaires des monosaccharides les constituant;

- par comparaison de leur migration en TLC avec des glycanes de structure connue.

Comparative study of the carbohydrate moieties of normal and pathological human immunoglobulins M

Annie CAHOUR,* Philippe DEBEIRE,† Lucien HARTMANN*‡ and Jean MONTREUIL†

**Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Chimie Clinique et de Biologie Moléculaire (U.202 I.N.S.E.R.M. and ERA 696 C.N.R.S.), 15 Rue de L'École de Médecine, 75270 Paris Cédex 06, France, and*

†*Université des Sciences et Techniques de Lille I, Laboratoire de Chimie Biologique (LA 217 C.N.R.S.), 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

(Received 2 August 1982/Accepted 10 December 1982)

The well-known heterogeneity of normal and pathological immunoglobulins M was investigated in a study involving the characterization of their carbohydrate moieties. Oligosaccharide units were released from the native molecule by hydrazinolysis, and they were fractionated by affinity chromatography on a concanavalin A-Sepharose column to yield separate *N*-acetyl-lactosaminic-type and oligomannosidic-type structures. Further identification of these oligosaccharides was attempted by t.l.c. on silica gel and by determination of their monosaccharide compositions. A comparative study of the oligosaccharide units belonging to each population of immunoglobulin M was possible. Similarities were found in the occurrence of both types of oligosaccharide structures, and, in addition, a common double heterogeneity could be demonstrated for *N*-acetyl-lactosaminic-type structures: they could be resolved by affinity chromatography into bi-, tri- and tetra-antennary structures, and they also showed differences in *N*-acetylneuraminic acid content. Though some variations were observed in the exact composition of the oligosaccharide units within each population, it was possible to consider a representative oligosaccharide-unit composition of normal immunoglobulin M as a standard for comparison. On this basis a predominance of multi-antennary structures was observed in the more glycosylated pathological immunoglobulins M (10% carbohydrate content), whereas oligomannosidic structures were increased in pathological immunoglobulins M with a lower content of carbohydrates (7%). These variations are thought to reflect differences in the biosynthetic processing pathway of the carbohydrate units of the pathological immunoglobulins M or the enhanced expression of a molecular clone.

Human IgM molecules are glycoproteins with large amounts of carbohydrate (7-15%) (Clamp & Johnson, 1972). In a recent investigation (Cahour *et al.*, 1981) a sampling of 18 monoclonal IgM species was resolved into two populations on the basis of their carbohydrate content: 12 IgM species contained 7.3% carbohydrate and six IgM species contained 10%. An average value of 7.2% carbohydrate content has been found for normal IgM. It is well known that these plasma proteins (Jouanneau *et al.*, 1970; Shimizu *et al.*, 1971; Hickman *et al.*, 1972), as do many glycoproteins (for a review see Montreuil, 1982), contain both-*N*-acetyl-lactosaminic-type and oligomannosidic-type asparagine-bound carbohydrate chains.

Commonly, the techniques used for structural investigations of the carbohydrate moieties of immunoglobulins include a digestion with Pronase and subsequent fractionation of the resultant glycopeptides by gel filtration and ion-exchange chromatography.

In the present investigation, by using the combination of hydrazinolysis, affinity chromatography and g.l.c., the oligosaccharide units obtained directly from the native IgM were studied. Their resolution and their characterization in each IgM population were monitored by t.l.c. on silica gel.

The IgM oligosaccharide units could play a biological role either by interaction with membrane receptors or by acting directly on the conformation of the molecules, and we were interested in making a comparison of these structures both in normal and pathological IgM species. Some preliminary results

Abbreviation used: IgM, immunoglobulin M.

‡ To whom correspondence should be addressed.

relevant to this aspect are reported in the present paper.

Experimental

Materials

Silica gel 60 thin-layer plates (0.2mm layer), solvents and chemicals of analytical grade were products of Merck (Darmstadt, Germany). Concanavalin A-Sepharose 4B was supplied by Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden), and methyl α -D-glucoside by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). NaB^3H_4 (36 Ci/mmol) was purchased from the Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay, France), and the scintillation mixture (AqualyteTM) was a product from J. T. Baker Chemicals BV (Deventer, The Netherlands). Bio-Gel P-2 (200–400 mesh) was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, U.S.A.), and hydrazine was obtained from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, U.S.A.).

Reference oligosaccharides

The following standard compounds (Table 1) were used for a provisional identification of carbohydrate units assayed by t.l.c. Oligosaccharides S_0 , S_1 and S_2 were bi-antennary structures, respectively desialylated, monosialylated and disialylated, obtained from human serum transferrin by the procedure of Spik *et al.* (1975). Oligosaccharides O_3 and O_4 were tri- and tetra-antennary asialoglycans respectively obtained from human plasma α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid) (Fournet *et al.*, 1978). Oligomannosides with four to nine mannose residues (oligosaccharides M'_4 – M'_9) were isolated from urine of patients with mannosidosis (Strecker *et al.*, 1976).

Preparation of immunoglobulins

IgM species were prepared and checked for homogeneity as described previously (Cahour *et al.*, 1981). Monoclonal IgM species were obtained from plasmaphereses of patients with Waldenström's macroglobulinaemia, and polyclonal IgM species were isolated from individual normal sera.

Hydrazinolysis

Specific cleavage of *N*-acetylglucosamine–asparagine *N*-glycosylaminic linkages was performed as described previously (Bayard & Montreuil, 1974) by the action of anhydrous hydrazine on native protein (1 mg) for 20 h at 85°C. *N*-Deacetylated glycans were obtained after drying of the hydrazinolysate under N_2 and elimination of traces of the reaction products under vacuum in the presence of conc. H_2SO_4 , and after a further desalting on a Bio-Gel P-2 column (1.5 cm \times 32 cm) they were eluted with aq. 1% (v/v) acetic acid. *N*-Reacetylation was

A. Cahour, P. Debeire, L. Hartmann and J. Montreuil

performed with acetic anhydride as described by Reading *et al.* (1978), and the oligosaccharide fractions were purified on Bio-Gel P-2.

Radioisotopic labelling of oligosaccharides

Reduction with NaB^3H_4 was performed as described by Takasaki & Kobata (1978). About 100 nmol of oligosaccharide was reduced with 8 nmol (0.30 mCi) of NaB^3H_4 in 300 μ l of 10 mM-NaOH for 4 h at 25°C. Then 10 mg of NaBH_4 was added and the sample was kept for a further 2 h at 25°C. The reaction was stopped by adding 1 drop of acetic acid, and after the mixture had been passed through a small column of Dowex 50W X8 (H^+ form) the boric acid was removed by co-distillation under vacuum three times with methanol. Next, descending paper chromatography for 16 h on Whatman no. 1 paper with the solvent system butan-1-ol/ethanol/water (16:1:4, by vol.) removed radioactive contaminants derived from the NaB^3H_4 . Reduced oligosaccharides were eluted with water and purified on Bio-Gel P-2.

Affinity chromatography of oligosaccharides on concanavalin A-Sepharose

NaB^3H_4 -reduced oligosaccharides were applied to a concanavalin A-Sepharose column (1.5 cm \times 9.5 cm) equilibrated with 10 mM-sodium acetate buffer, pH 5.0, containing 1 mM- CaCl_2 , 1 mM- MgCl_2 , 1 mM- MnCl_2 and 0.1 M-NaCl. Fractionation was performed by stepwise elution with methyl α -D-glucoside, with reference to previous studies of the binding capacities of concanavalin A for carbohydrate structures (Debray & Montreuil, 1978; Narasimhan *et al.*, 1979). For this purpose a previous calibration of the concanavalin A-Sepharose column was monitored with oligosaccharides of known structures. The tri- and tetra-antennary glycans oligosaccharides O_3 and O_4 (see Table 1), with no affinity for the column, were eluted with starting buffer. Bi-antennary oligosaccharides (i.e. reference oligosaccharides of serum transferrin) were bound with low affinity by the lectin and were eluted with 0.01 M-methyl α -glucoside, whereas oligomannosidic oligosaccharides (see Table 1) were strongly bound by concanavalin A and needed 0.3 M-methyl α -glucoside for their elution. ^3H radioactivity was counted in 3 ml of scintillation solution in a Beckman liquid-scintillation spectrometer.

T.l.c.

Oligosaccharides were resolved on silica gel 60 thin-layer plates with the following solvent systems: F, a fast one (Bayard *et al.*, 1979), ethanol/butan-1-ol/pyridine/water/acetic acid (100:10:10:30:3, by vol.), for *N*-acetyl-lactosaminic oligosaccharides, and S, a slow one (Palo & Savolainen, 1972), butan-1-ol/acetic acid/water

Carbohydrate moieties of human immunoglobins M

Table 1. Reference oligosaccharides used for i.l.c.

| | |
|-------------------|---|
| Type of structure | Bi-antennary <i>N</i> -acetyl-lactosaminic type |
| Origin | Human serum transferrin |
| Structures | $\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharide S₀</p> $\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharide S₁</p> $\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharide S₂</p> |
| Type of structure | Tri- and tetra-antennary <i>N</i> -acetyl-lactosaminic type |
| Origin | Human plasma α_1 -acid glycoprotein |
| Structures | $\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \end{array}} \right\} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharide O₃*</p> $\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2) \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharide O₄</p> |
| Type of structure | Oligomannosidic type |
| Origin | Urines of oligomannosidosis patients |
| Structures | $\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharide M₁</p> $\left[\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-2) \left[\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \right] \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \end{array}} \right\} \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc} \end{array} \right]_{1-4}$ <p style="text-align: center;">Oligosaccharides M₆-M₇</p> |

* Asialo tri-antennary glycans or orosomucoid may possess an additional fucose residue α -1,3-linked to the *N*-acetylglucosamine residue 7 (oligosaccharide O₃F).

(2:1:1, by vol.), for oligomannosidic glycans. Migrating bands were detected by using orcinol (200mg of orcinol in 100ml of aq. 20% H₂SO₄) spray reagent with heating at 110°C for 10 min.

G.l.c.

Conditions for g.l.c. were those described by Zanetta *et al.* (1972). *O*-Methylated glycosides were analysed as trifluoroacetate compounds on a glass column packed with 3% OV 210, with a temperature gradient of 2°C/min from 100 to 220°C. *meso*-Inositol was used as internal standard.

Desialylation

Desialylation was performed by mild acid hydrolysis (0.1M-trifluoroacetic acid for 30 min at 80°C) and was checked by t.l.c. with solvent F. Untreated oligosaccharide served as the control.

Results

Comparative t.l.c. of the whole oligosaccharide chains

Hydrazinolysis was performed on normal IgM species and on pathological IgM species with increasing contents of carbohydrates, i.e. 7% (IgM-7), 8% (IgM-8), 9% (IgM-9) and 10% (IgM-10). The released oligosaccharides were analysed by t.l.c. on silica gel in the solvent F (Fig. 1). All preparations of normal IgM exhibited the same pattern, an example of which is given (see Fig. 1, slot 1). For both polyclonal and monoclonal preparations of pathological IgM, patterns essentially consisted of the same bands, numbered I to VIII. A classification

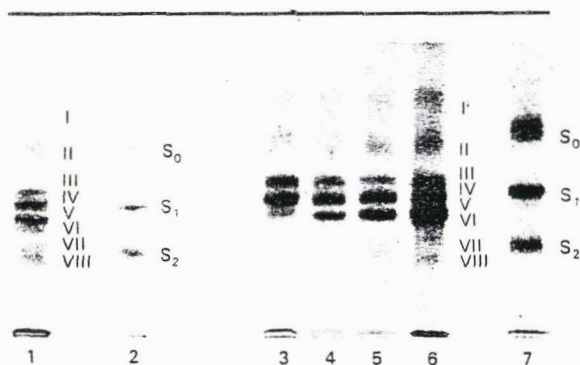


Fig. 1. Comparative t.l.c. of the whole glycans liberated by hydrazinolysis from normal and pathological IgM species

For full experimental details see the text. Solvent system F was used. Slot 1, normal IgM; slots 2 and 7, standards of asialo (S₀), monosialo (S₁) and disialo (S₂) bi-antennary glycans from serum transferrin; slots 3-6, pathological IgM species containing 7%, 8%, 9% and 10% carbohydrate respectively.

within three groups could be made: the first one included IgM-8 and IgM-9, t.l.c. profiles of which resembled that obtained with normal IgM; the

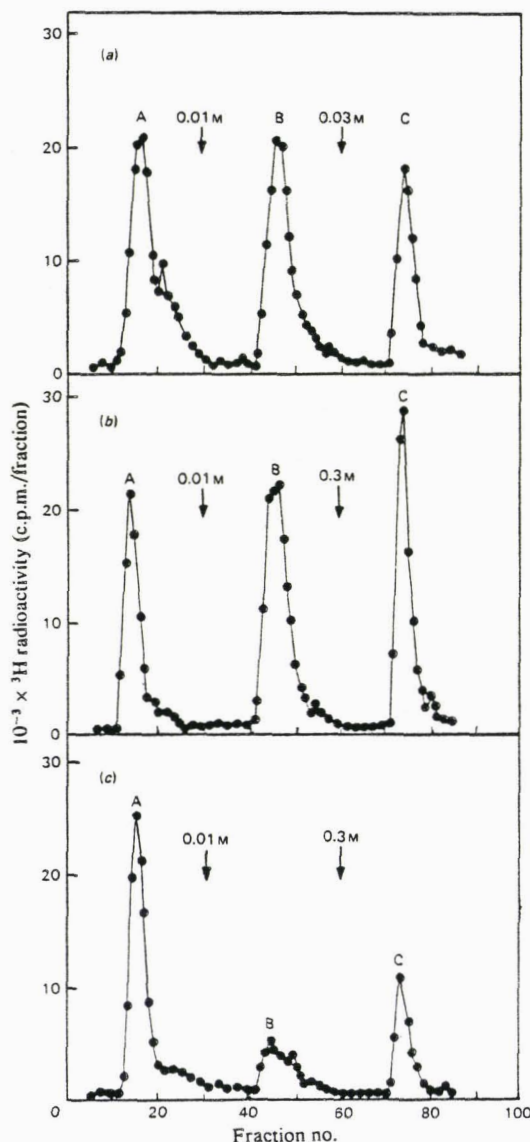


Fig. 2. Fractionation by affinity chromatography on a concanavalin A-Sepharose 4B column (1.5 cm x 9.5 cm) of the oligosaccharides liberated by hydrazinolysis of IgM species

For full experimental details see the text. The flow rate was 9 ml/h. Fractions of volume 1 ml, numbered in order of their emergence from the column, were collected and counted for radioactivity. Arrows indicate the starting of the elution of fractions B and C with 0.01 M- and 0.3 M-methyl α-D-glucopyranoside respectively. Profiles obtained: (a) for normal IgM; (b) for pathological IgM-7; (c) for pathological IgM-10.

Carbohydrate moieties of human immunoglobins M

second and the third groups were represented by monoclonal IgM-7 and IgM-10, with characteristic patterns different from those of the first group. Enrichments of band IV for IgM-7 and of band VI for IgM-10 were observed. These variations were not accompanied by significant differences in the molar monosaccharide composition (Table 2).

Fractionation of oligosaccharides by affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose

Because of the small quantity of IgM-8 and IgM-9 at our disposal, further studies were limited to normal IgM and to the pathological IgM-7 and IgM-10. Fractionation on concanavalin A-Sepharose of glycans released by hydrazinolysis, *N*-reacetylated and then reduced gave three elution patterns corresponding to the three families of IgM (Fig. 2). Each profile possessed the three fractions A, B and C eluted with starting buffer, 0.01 M-methyl α -glucoside and 0.3 M- α -methyl glucoside respectively.

Qualitatively the pattern obtained for polyclonal IgM resembled that of pathological IgM-7, but quantitatively marked differences were observed in the percentage distribution of fractions (see Table 2). On the one hand *N*-acetyl-lactosaminic units (fractions A and B) were predominant in normal IgM and pathological IgM-10, with 80% of the label. On the other hand, pathological IgM-7 was enriched in high-mannose oligosaccharides (32% against 20% for the two other populations). In addition, for

N-acetyl-lactosaminic glycans variations were observed in the proportions of tri- and tetra-antennary structures (fraction A) and bi-antennary structures (fraction B). The proportions were equivalent for polyclonal IgM, but the degree of branching was increased for monoclonal IgM-10 whereas it was decreased for monoclonal IgM-7.

Characterization of the carbohydrate chains

To investigate the extent of the heterogeneity exhibited by the carbohydrate moieties of IgM, oligosaccharidic fractions were submitted to g.l.c. after methanolysis (Table 2). The molar proportions obtained were in good agreement with those expected after fractionation of the hydrazinolysates on concanavalin A-Sepharose, and were characteristic of chiefly tri-antennary structures for fraction A, bi-antennary structures for fraction B and oligomannosidic structures for fraction C.

In addition, the usefulness of the t.l.c. method in the further qualitative resolution of IgM oligosaccharide is demonstrated in Fig. 3. In fraction A (Fig. 3a), for the three samples essayed, four migrating oligosaccharides were identified (bands IV, V, VI and VIII), with a predominance of band VI. A double band in the position for this band VI was noted with polyclonal IgM. This double band might represent oligosaccharides with similar structure but with a possible additional fucose residue on the component forming the slower-migrating band.

Table 2. Carbohydrate compositions of native IgM glycans and of oligosaccharidic fractions produced by affinity chromatography on immobilized concanavalin A after hydrazinolysis of IgM

For full experimental details see the text. Results for native IgM glycans obtained after g.l.c. were the same for both native IgM glycans and hydrazinolysates: data for normal IgM and pathological IgM-7 and IgM-10 are corrected and expressed in terms of the sum of the percentage distribution of the fractions A, B and C. Results for the concanavalin A-Sepharose fractions are normalized to 3.0 mannose residues for fractions A and B and of 2.0 *N*-acetylglucosamine residues for fraction C. L refers to structures of the *N*-acetyl-lactosaminic type, and M to structures of the oligomannosidic type.

| | Carbohydrate composition (molar proportions) | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--|--------------------------|-----|-----|------------------|--------------------------|------|-----|------------|------------|------------|--------------------------|------|-----|
| | Normal IgM | | | | Pathological IgM | | | | | | | | | |
| | Native IgM | Concanavalin A fractions | | | Native IgM | Concanavalin A fractions | | | Native IgM | Native IgM | Native IgM | Concanavalin A fractions | | |
| | | A | B | C | | A | B | C | | | | A | B | C |
| % of radioactivity | ... | 40 | 40 | 20 | — | 27 | 41 | 32 | — | — | — | 58 | 24 | 18 |
| % of L and M structures | ... | 80 | | 20 | — | 68 | | 32 | — | — | — | 82 | | 18 |
| Fucose | 0.67 | 0.77 | 0.4 | — | 0.52 | 0.80 | 0.70 | — | 0.76 | 0.73 | 0.79 | 0.98 | 0.78 | — |
| Mannose | 4.1 | 3.0 | 3.0 | 6.2 | 4.1 | 3.0 | 3.0 | 7.2 | 4.5 | 4.4 | 4.1 | 3.0 | 3.0 | 4.5 |
| Galactose | 1.6 | 2.2 | 1.8 | — | 1.2 | 2.1 | 1.6 | — | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 2.0 | 1.4 | — |
| <i>N</i> -Acetylglucosamine | 3.1 | 4.7 | 3.0 | 2.0 | 3.5 | 4.8 | 3.6 | 2.0 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 4.5 | 3.7 | 2.0 |
| <i>N</i> -Acetylneuraminic acid | 0.78 | 1.3 | 1.0 | — | 0.47 | 1.0 | 0.5 | — | 0.51 | 0.61 | 0.64 | 0.85 | 0.50 | — |

A. Cahour, P. Debeire, L. Hartmann and J. Montreuil

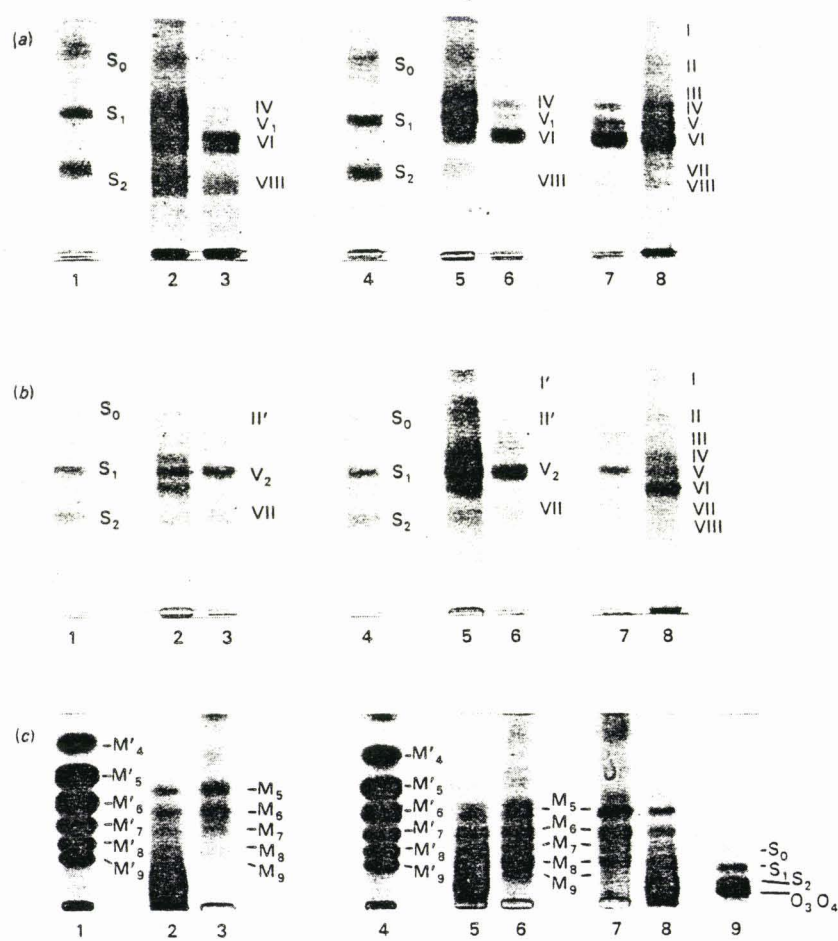


Fig. 3. T.L.C. of fractions A, B and C obtained by affinity chromatography on immobilized concanavalin A of oligosaccharides liberated by hydrazinolysis of normal and pathological IgM species

For full experimental details see the text. (a) T.L.C. of fraction A in solvent system F. Slots 1 and 4, standards of asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin: slots 2, 5 and 8, oligosaccharides released by hydrazinolysis from normal IgM (slot 2), from pathological IgM-7 (slot 5) and from pathological IgM-10 (slot 8); slots 3, 6 and 7, oligosaccharides of fraction A obtained from normal IgM (slot 3), from pathological IgM-7 (slot 6) and from pathological IgM-10 (slot 7). (b) T.L.C. of fraction B in solvent system F. Slots 1 and 4, standards of asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin: slots 2, 5 and 8, oligosaccharides released by hydrazinolysis from normal IgM (slot 2), from pathological IgM-7 (slot 5) and from pathological IgM-10 (slot 8); slots 3, 6 and 7, oligosaccharides of fraction B obtained from normal IgM (slot 3), from pathological IgM-7 (slot 6) and from pathological IgM-10 (slot 7). (c) T.L.C. of fraction C in solvent system S. Slots 1 and 4, standards of urinary oligomannosides (M'_4 - M'_9); slots 2, 5 and 8, oligosaccharides released by hydrazinolysis (M_5 - M_9) from normal IgM (slot 2), from pathological IgM-7 (slot 5) and from pathological IgM-10 (slot 8); slots 3, 6 and 7, oligosaccharides of fraction C obtained from normal IgM (slot 3), from pathological IgM-7 (slot 6) and from pathological IgM-10 (slot 7) (the bands that migrate above M_5 have been identified as heavy contaminants of methyl α -D-glucoside); slot 9, reference oligosaccharides having a slight migration in this solvent system, i.e. asialo (S_0), monosialo (S_1) and disialo (S_2) bi-antennary glycans from serum transferrin, and asialo tri-antennary (O_3) and asialo tetra-antennary (O_4) glycans from α_1 -acid glycoprotein. N.B. Bands V_1 and V_2 migrated as compound V but exhibited different affinities for concanavalin A; bands I and II contained a mixture of both *N*-acetyl-lactosaminic and oligomannosidic structures because the components were not fractionated on concanavalin A, whereas bands I' and II' were exclusively of the bi-antennary type. With regard to the oligomannosidic glycans, M'_4 - M'_9 designated pathological urinary oligosaccharides lacking one *N*-acetylglucosamine residue and M_5 - M_9 designated hydrazinolysate complete oligosaccharides.

Carbohydrate moieties of human immunoglobins M

All these glycans were expected to contain more than two antennae. With fraction B (Fig. 3b), the chromatographic behaviour of its oligosaccharides, which were assumed to be bi-antennary, could be compared with that of serum transferrin glycans (oligosaccharides S_0 , S_1 and S_2). Four bands, numbered I', II', V_2 and VII, were observed for pathological IgM species, band I' being absent from the normal IgM pattern. Compound V_2 was predominant in all the IgM species and possessed the same t.l.c. mobility as monosialylated and bi-antennary standard oligosaccharide S_1 . Bands I' and II' migrated in the same zone as oligosaccharide S_0 , which is the bi-antennary oligosaccharide with the highest mobility because it is desialylated. Migration of band VII was compared with that of disialylated reference oligosaccharide S_2 . Fraction C (Fig. 3c) gave rise to numerous oligosaccharides, which were predicted to be of the oligomannosidic type in view of their strong affinity for concanavalin A-Sepharose. These oligosaccharides were analysed by t.l.c. with solvent S. In this solvent, *N*-acetyl-lactosaminic glycans are known to migrate poorly and they stayed (slot 9) near to the origin. It could be verified for the three samples of fraction C studied that there were no such structures left after fractionation by affinity chromatography (slots 3, 6 and 7) by comparison with the corresponding whole range of oligosaccharides before fractionation (slots 2, 5 and 8). The chromatographic mobilities of these high-mannose units were checked with appropriate standards, i.e. urinary oligomannosides (see Table 1). It should be noted that, because of their origin, these reference compounds lack one *N*-acetylglucosamine residue at the reducing end, and consequently exhibited a slightly higher mobility than the corresponding oligosaccharides possessing the additional *N*-acetylglucosamine residue. We have estimated this difference in migration by comparing the behaviour of such pathological IgM oligosaccharides with that of bovine lactotransferrin oligomannosides obtained after hydrazinolysis (Van Halbeck *et al.*, 1981) in the same t.l.c. system. It was approximately equivalent to the effect of the loss of one mannose residue of the largest oligomannosidic structure, with a progressive enhancement in the upper region of the plate. Taking this rule into account, we were able to identify the bands numbered M_5 - M_9 as oligosaccharides containing five to nine mannose residues respectively; there was a predominance of larger oligomannosides for pathological IgM-7 and a predominance of smaller oligomannosides for normal IgM and pathological IgM-10.

Further structural investigation was performed on *N*-acetyl-lactosaminic units by eliminating the heterogeneity due to the presence of *N*-acetylneuraminic acid residues and by then making a

provisional identification of the structures of the residual oligosaccharides. Desialylation with trifluoroacetic acid was performed on fractions A and B for each IgM sample, and t.l.c. migration of their asialoglycans was compared with that of neutral reference oligosaccharides (Fig. 4). On such treatment of fraction A it was found that all the oligosaccharides obtained migrated more slowly than did the neutral bi-antennary standard oligosaccharide S_0 . The major compound obtained (X_2) had the same chromatographic behaviour as the fucosylated asialo triantennary glycan of orosomucoid (oligosaccharide O_3F) and as oligosaccharide IV (Fig. 3a). As visualized for pathological IgM-10 (slot 3), the compound X_1 , which migrated between oligosaccharides O_3 and S_0 , was smaller than oligosaccharide O_3 , and the oligosaccharide X_3 , which migrated the same distance as did oligosaccharide O_4 , was presumed to be a tetra-antennary unit. On desialylation of fraction B, as expected, all structures were converted into glycans that migrated in the same zone as oligosaccharide S_0 (zone X_4 - X_5). From these results it can be concluded that fraction A is chiefly composed of tri-antennary oligosaccharides accompanied by a smaller amount of tetra-antennary ones, and that fraction B is essentially constituted of bi-antennary oligosaccharides. The oligosaccharides derived from pathological IgM-10 exhibited the greater heterogeneity of structure.

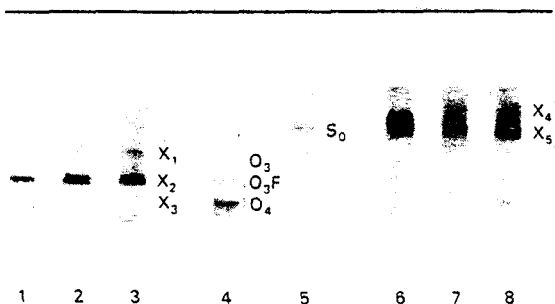


Fig. 4. T.l.c. of oligosaccharides of desialylated fractions A and B

For experimental details see the text. Solvent system F was used. Slots 1, 2 and 3, asialo-glycans from fraction A from normal IgM (slot 1), from pathological IgM-7 (slot 2) and from pathological IgM-10 (slot 3); slots 4 and 5, reference oligosaccharides from α_1 -acid glycoprotein [asialo triantennary (O_3 and O_3F) and asialo tetra-antennary (O_4) glycans] (slot 4) and from serum transferrin [asialo bi-antennary glycan (S_0) (slot 5)]; slots 6-8, asialoglycans from fraction B from normal IgM (slot 6), from pathological IgM-7 (slot 7) and from pathological IgM-10 (slot 8).

Discussion

In the present study, by using reproducible and sensitive methodology, a comparison between the numerous glycans present in various IgM species was possible in spite of their well-known heterogeneity.

The application of these rapid procedures to small quantities of native immunoglobulins indicates the coexistence of both *N*-acetyl-lactosaminic type and oligomannosidic type of structures for each IgM population studied, suggesting that oligomannosides are not a typical feature of pathological IgM molecules, as has been suggested (Jouanneau *et al.*, 1981). T.l.c. allows the identification of at least 13 migrating oligosaccharides for each IgM treated, in agreement with the structural heterogeneity previously reported by Chapman & Kornfeld (1979a,b). According to those authors, all high-mannose intermediate oligosaccharides seem to be present as revealed by t.l.c. in solvent S (see Fig. 3c). However, further structural investigations are needed to verify the identity of such structures.

In the present work affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose was introduced as an extremely useful tool for the fractionation of glycans from the complex mixtures and for the determination of their respective distribution in IgM families (Table 2). Qualitatively and quantitatively polyclonal IgM species show an intermediate behaviour, presumably reflecting a statistical cellular production of a balanced range of oligosaccharide units. This approach was used as the basis for interpretation of the distribution patterns of oligosaccharides obtained from pathological IgM families. In this regard, monoclonal IgM-7 exhibits a predominance of smaller oligosaccharides, whereas IgM-10 appears to be enriched in complex glycans.

From consideration of both the origin of the IgM studied and previously published data on the biosynthesis of oligosaccharide units (Kornfeld *et al.*, 1978; Li *et al.*, 1978; Tabas *et al.*, 1978; Tabas & Kornfeld, 1978; Parodi & Leloir, 1979), a possible interpretation of the differences observed can be proposed. Normal IgM species reflect their polyclonal origin and can be considered as a statistical population, whereas a monoclonal IgM appears as the expression of one single immunoglobulin-producing cell activity among the multipotentiality due to the diversity of cells. Since it is firmly established that oligomannosidic units serve as intermediates in the biosynthesis of *N*-acetyl-lactosaminic glycans, it can be postulated that the extent of processing of high-mannose oligosaccharides along the pathway towards the formation of complex oligosaccharides is different within each IgM population. On taking the polyclonal IgM glycans as a standard for comparison, results for monoclonal IgM-10 suggest an 'over-processing'

leading to a higher production of more complex units, whereas a smaller degree of elaboration of the oligosaccharide chains seems to occur for monoclonal IgM-7. This might be due to altered activity either of the *N*-acetylglucosaminyltransferase, responsible for the substitution of one mannose residue on the core pentasaccharide, or of the α -mannosidase.

The most probable interpretation of the differences observed between normal and pathological IgM species is that regulating factors are involved in the sequence of the metabolic events (i.e. mannose removal and addition of the outer residues) leading to the biosynthesis of glycans. One could imagine that in pathological cases (e.g. in the present case of Waldenström's macroglobulinaemia) such control mechanisms are altered. The factors implicated remain to be determined.

In conclusion, in the field of investigations of structure-function relationships, the information available on the structures of glycans still does not allow an elucidation of their biological role; nevertheless, as in the present study, by comparing the structures of normal and pathological IgM species it is possible to make an approach towards an understanding of the mechanisms involved in their metabolism.

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) (Laboratoire Associé no. 217: Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Equipe de Recherche Associée no. 070696: Immunochimie et Biologie Moléculaire), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Unité de Recherches no. 202: Immunochimie et Biologie Moléculaire) and by the Fondation pour la Recherche Médicale. We are very much obliged to Professor G. Spik, Professor B. Fournet and Dr. G. Strecker for their generous supply of standards for t.l.c. We are also grateful to Y. Leroy and J. F. Massias for their skilful assistance.

References

- Bayard, B. & Montreuil, J. (1974) in *Methodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugués* (Montreuil, J., ed.), pp. 209-218. Editions du C.N.R.S., Paris
- Bayard, B., Kerckaert, J. P., Roux, D. & Strecker, G. (1979) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.* 27, 153-156
- Cahour, A., Ollier-Hartmann, M. P., Mihaesco, C. & Hartmann, L. (1981) *Biomedicine* 35, 133-136
- Chapman, A. & Kornfeld, R. (1979a) *J. Biol. Chem.* 254, 816-823
- Chapman, A. & Kornfeld, R. (1979b) *J. Biol. Chem.* 254, 824-828
- Ciamp, J. R. & Johnson, I. (1972) in *Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function*, 2nd edn. (Gottschalk, A. J., ed.), pp. 612-652. Elsevier, Amsterdam

Carbohydrate moieties of human immunoglobins M

- Debray, H. & Montreuil J. (1978) *Biochimie* **60**, 697-704
- Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P. & Schmid, K. (1978) *Biochemistry* **17**, 5206-5214
- Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C. K. & Kornfeld, S. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 2156-2163
- Jouanneau, J., Rasafimahaleo, E. & Bourrillon, R. (1970) *Eur. J. Biochem.* **17**, 72-77
- Jouanneau, J., Fournet, B. & Bourrillon, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **667**, 277-284
- Kornfeld, S., Li, E. & Tabas, J. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7761-7778
- Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7762-7770
- Montreuil, J. (1982) *Compr. Biochem.* **19B**, part II, 1-188
- Narasimhan, S., Wilson, J. R., Martin, E. & Schachter, H. (1979) *Can. J. Biochem.* **57**, 83-96
- Palo, J. & Savoianen, H. (1972) *J. Chromatogr.* **65**, 447-450
- Parodi, A. P. & Leloir, L. F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 1-37
- Reading, C. L., Penhoet, E. & Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5600-5616
- Shimizu, A., Putnam, F. W., Paul, C., Clamp, J. R. & Johnson, I. (1971) *Nature (London) New Biol.* **213**, 73-76
- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* **50**, 296-299
- Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J. L. & Farriaux, J. P. (1976) *Biochimie* **58**, 579-586
- Tabas, J. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7779-7786
- Tabas, J., Schlesinger, S. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 716-722
- Takasaki, S. & Kobata, A. (1978) *Methods Enzymol.* **50**, 50-54
- Van Halbeck, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Cheron, A. & Montreuil, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **675**, 293-296
- Zanetta, J. P., Breckenridge, W. C. & Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* **69**, 291-304

La répartition quantitative des différentes fractions :

- A : non retenue sur Con A,
- B : faiblement retenue,
- C : fortement retenue,

donnée dans le Tableau 2 ; article 3 ; p. 169 , a été vérifiée par une estimation quantitative, possible à partir des résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse (Tableau IX ; p.175). L'identité des résultats confirme les conclusions énoncées à la p. 172 qui utilisent les IgM normales comme base de référence ; elles sont en effet représentatives d'un état d'équilibre. Comparativement aux IgM normales, les IgM pathologiques apparaissent (voir Tableau 2 ; article 3 ; p. 169 , et Tableau IX ; p.175) :

- soit enrichies en structures les "plus complexes"
(fraction A) : c'est le cas de l'IgM-10 qui possède 58 % d'oligosaccharides non retenus sur Con A, contre 40 % pour les IgM normales. Ces 2 populations d'IgM possédant 80 % de structures du type N-acétyllactosaminique, l'augmentation de la fraction A dans l'IgM-10 se fait au détriment de la fraction B (biantennée).

- soit enrichies en structures oligomannosidiques
(fraction C) : c'est le cas de l'IgM-7 qui possède 32 % d'oligomannosides contre 20 % pour les IgM normales. Les pourcentages de structures biantennées étant identiques dans les 2 populations, l'augmentation de la fraction C dans l'IgM-7 se fait aux dépens de la fraction A (27 % contre 40 % pour les IgM normales).

TABLEAU IX

COMPARAISON DES ESTIMATIONS QUANTITATIVES DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE Con A PAR DEUX METHODES DIFFERENTES :

- Comptage de la radioactivité: [³H] cpm
- Chromatographie en phase gazeuse : GLC

| | Immunoglobulines (fractions obtenues sur Con A) | Estimation quantitative de chaque fraction (%) | |
|--|---|--|----------|
| | | [³ H] cpm | GLC |
| I G M N O R M A L E S | <u>IgM normales</u> : | | |
| | - Fraction A | 40 | 42 |
| | - Fraction B | 40 | 44 |
| | - Fraction C | 20 20 | 14 14 |
| | | } 80 | } 86 |
| I G M P A T H O L O G I Q U E S | <u>IgM-7</u> : | | |
| | - Fraction A | 27 | 35 |
| | - Fraction B | 41 | 37 |
| | - Fraction C | 32 32 | 28 28 |
| | | } 68 | } 72 |
| | <u>IgM-10</u> : | | |
| - Fraction A | 58 | 63 | |
| - Fraction B | 24 | 20 | |
| - Fraction C | 18 18 | 17 17 | |
| | | } 82 | } 83 |

Une interprétation de ces premiers résultats peut être donnée en fonction des connaissances actuelles sur la glycosylation des glycoprotéines. Sachant que les structures oligomannosidiques sont les intermédiaires nécessaires à la synthèse des structures N-acétyllactosaminiques, un mécanisme de régulation différent pour chaque IgM pathologique, serait impliqué dans l'évolution des chaînes oligosaccharidiques:

- s'agissant de l'IgM-10, il y aurait une différenciation rapide des oligomannosides vers les structures les plus complexes ;

- s'agissant de l'IgM-7, l'évolution de ces structures riches en mannose serait, au contraire, enrayée .

CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES

La première étape de fractionnement des chaînes glycaniques nous oblige déjà à revoir la notion de relative homogénéité qui se dégageait des compositions molaires en monosaccharides des différents IgM préparées. La caractérisation des oligosaccharides par chromatographie sur couche mince révèle en effet une grande hétérogénéité de leurs structures, un minimum de 13 bandes de migration étant observé. Cette variété est retrouvée dans chaque famille d'IgM et ne semble donc pas traduire une défaillance dans leur préparation ni leur purification ; elle reflète plutôt la complexité de la biosynthèse des glycanes (Hatton et Regoezi, 1983).

Afin d'évaluer l'étendue de cette hétérogénéité dans chaque famille, et d'essayer d'en dégager une signification biologique, une approche structurale s'imposait. Auparavant la résolution entre les différentes structures a été améliorée par une nouvelle étape de sous-fractionnement.

I - IgM-7 (ZAJ)

A - SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS OBTENUES SUR ConA

Deux techniques différentes sont utilisées selon le type de glycanne concerné : une méthode électrophorétique pour les composés chargés ou une séparation par chromatographie liquide haute pression pour les oligosaccharides neutres.

1 - Electrophorèse préparative à haut voltage sur papier.

Cette technique est appliquée aux fractions A (tri- et tétra-antennées) et B (biantennées) obtenues sur colonne de ConA afin de les résoudre en sous-fractions neutre (N), monosialysée (MS) et disialysée (DS). Les conditions expérimentales de cette opération sont décrites p.120 . Les Figs. 1A et 1B ; article 4 ; p.188 représentent les profils de migration obtenus respectivement pour les fractions A et B de l'IgM ZAJ.

2 - Chromatographie liquide haute pression (HPLC) :

Elle est appliquée à la fraction C (oligomannosidique) obtenue sur ConA afin de séparer les différents glycanes selon leur taille. La technique adaptée à celle de Paz Parente (1982a) est décrite p.183 . Le profil d'élution obtenu pour la fraction C de l'IgM ZAJ est représenté par le Fig.1C;p.188.

B - CARACTERISATION DES SOUS-FRACTIONS

1 - Les structures N-acétyllactosaminiques :

Les sous-fractions N, MS et DS obtenues respectivement pour les fractions A et B sont caractérisées chimiquement par leurs rapports molaires en monosaccharides par GLC après méthanolyse. Les résultats sont rapportés dans le tableau 1 ; p.187 . ainsi que la distribution quantitative de chaque sous-fraction par comptage de leur radioactivité (^3H).

2 - Les structures oligomannosidiques : Une étude analytique identique à celle décrite précédemment effectuée sur les différentes sous-fractions individualisées pour la fraction C après élution de la colonne amino par HPLC (tableau 3 ; p.200

C - ETUDE STRUCTURALE

Comme nous l'avons exposé dans la partie "Matériel et Méthodes" (p.120) la méthodologie est commune à toute investigation structurale. Les sous-fractions obtenues sont dans un premier temps soumises à un contrôle de leur homogénéité par examen de leur profil de migration par TLC (Figs 2 ; p.190 et 4 ; p.196). et de leurs rapports molaires en monosaccharides (Tableaux 1 ; p.187 et 3 ; p.200).

L'article 4 p.179, décrit l'application de cette démarche expérimentale aux sous-fractions les plus caractéristiques des fractions A, B, C obtenues sur le ConA pour l'IgM ZAJ.

STRUCTURAL BASIS OF THE HETEROGENEITY OF ASPARAGINE-
LINKED OLIGOSACCHARIDES OF A WALDENSTROM'S MACROGLO-
BULINEMIA IMMUNOGLOBULIN M

Annie CAHOUR[†], Philippe DEBEIRE^{**}, José PAZ PARENTE^{**},
Lucien HARTMANN^{*} and Jean MONTREUIL^{**}

* Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Chimie
Clinique et Biologie Moléculaire (U. INSERM n° 202 and
ERA CNRS n° 696), 15, rue de l'Ecole de Médecine, 75270
Paris Cedex 06, France;

** Université des Sciences et Techniques de Lille I,
Laboratoire de Chimie Biologique (LA CNRS n° 217)
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

SUMMARY

The extent of the heterogeneity of glycans present in the pathological human immunoglobulin M Za has been studied using oligosaccharides released by hydrazinolysis from the purified glycoprotein. After reduction with NaB^3H_4 , the oligosaccharides were separated by affinity chromatography on a concanavalin A column into both asparagine-linked carbohydrate chains of the oligomannosidic and N-acetyllactosaminic types. Glycans of the oligomannosidic type were further fractionated by h.p.l.c. and those of the N-acetyllactosamine type by preparative high-voltage electrophoresis. The primary structure of the main oligosaccharides was investigated on the basis of micro-methylation analysis, mass-spectrometry and sequential exo-glycosidase digestion. Glycans of the oligomannosidic type varied in size from $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ to $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Glycans of the N-acetyllactosaminic type were found of the biantennary, bisected-biantennary, and triantennary types. Their microheterogeneity was reinforced, due to the presence of a

[†]
[†] to whom correspondence should be addressed.

variable number of NeuAc and Fuc residues.

The structures we report add themselves to the major biantennary one we previously described on the basis of methylation analysis and 500 MHz ^1H -NMR spectroscopy (Cahour et al., 1984) : NeuAc (α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3) [Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4) [Fuc(α 1-6)]GlcNAc.

INTRODUCTION

Although different classes of human immunoglobulins differ considerably in their carbohydrate content (Clamp and Johnson, 1972), the glycosylation sites are often homologous and are related to the basic immunoglobulin domain structure (Torano et al., 1977). In particular, for IgM, one of the most glycosylated classes (7-15%), the Fc regions of several human μ chains have been compared. In all cases, the same asparagine residues, respectively Asn 171, 332, 395, 403 and 563 were conjugated with glycans (Florent et al., 1974; Kehry et al., 1979). If primary amino acid sequence of IgMs is now well known, on the contrary, there is less information concerning the structure of the oligosaccharides attached to their heavy chains, especially for carbohydrate chains of the N-acetyllactosamine type. Only one kind of the latter glycans has been described : the N-acetyllactosamine structure of the biantennary type, either fucosylated (Hickman et al., 1972), or not (Baenziger, 1979). Since, another one of the triantennary type has been found in a mouse myeloma IgM (Brenckle and Kornfeld, 1980). In contrast, oligosaccharides of the oligomannosidic type have been more studied in monoclonal human IgMs (Chapman and Kornfeld, 1979 a,b; Cohen and Ballou, 1980; Jouanneau et al., 1981; Van Halbeek et al., 1981) and also in a mouse IgM secreted by a plasmocytoma (Brenckle and Kornfeld, 1980).

In a previous report (Cahour et al., 1983), by comparing the carbohydrate moieties of normal and pathological human IgMs, differences have been observed and thought to reflect any changes in the general pathway of oligosaccharide processing. Structural elucidation of the oligosaccharides was a prerequisite to gain in sight into those expected biological events at the biosynthetic level.

In the present paper, we attempt to lay the basis of the structural heterogeneity of the oligosaccharides of a particular monoclonal and weakly glycosylated (7% carbohydrates) IgM Za. In a recent work (Cahour et al., 1984), 500 MHz ^1H -NMR spectroscopy led to the determination of the structure of the major (25% of total oligosaccharides) monosialylated and monofucosylated biantennary glycan of this IgM. But, for other minor oligosaccharides, because of the limited amount and the important heterogeneity of sample available for high resolution ^1H -NMR spectroscopy, the anomery of glycosidic linkages was determined by micromethylation and by stepwise digestion with specific exo-glycosidases.

EXPERIMENTAL

. Materials

All reagents were of analytical grade. Biogel P2 (200-400 mesh) and resins Dowex 50W X 8, Dowex 1 X 8 and Ag 1 X 2 were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Silica gel 60 thin-layer plates (0.2 mm layer) were products of Merck (Darmstadt, Germany). NaB^3H_4 (36 Ci/mmol) was obtained from the Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay, France). α -D-mannose and Jack bean N-acetyl- β -D-glucosaminidase were from Sigma (St-Louis, MO, USA) and V. cholerae α -neuraminidase from Calbiochem-Behring Corp. (La Jolla, CA, USA). Jack bean α -mannosidase and β -galactosidase prepared as described by Li and Li (1972) were a gift

from Prof. S. Bouquelet.

The standard compounds for h.p.l.c. analysis, were the oligomannosides $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ to $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ isolated from urine of patients with mannosidosis (Strecker et al., 1976) and reduced by NaB^3H_4 . $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAcitol}$ was prepared by reduction and α -mannosidase digestion of oligomannosides obtained by hydrazinolysis of bovine lactotransferrin (Van Halbeek et al., 1981). $\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAcitol}$ (oligosaccharide 1) and $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAcitol}$ (oligosaccharide 2) were prepared by reduction and enzyme digestion of the monosialylated biantennary glycan obtained from human Factor VIII (Debeire et al., 1983). Biantennary reference oligosaccharides, respectively asialylated (S_0), monosialylated (S_1) and disialylated (S_2) were obtained by hydrazinolysis of human serum transferrin (Spik et al., 1975). The triantennary standard GM1 (G_3), structure of which is as follows : $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)[\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)]\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, was isolated from urine of patients with gangliosidosis and was kindly given by Dr. G. Strecker.

. Preparation of the IgM Za oligosaccharide samples

IgM Za was prepared and checked for homogeneity as previously reported (Cahour et al., 1981). Isolation and characterization of its carbohydrate chains were described in a previous work (Cahour et al., 1983). Oligosaccharide units were released from the native molecule by hydrazinolysis and reduced by NaB^3H_4 . They were fractionated by affinity chromatography on a concanavalin A-Sepharose column (Debray et al., 1983) into the three following fractions : Fraction A, non-affine

for Con A, eluted with starting buffer and containing the most complex glycans of the N-acetyllactosaminic type; Fraction B, weakly reactive with Con A, eluted with 0.01 M methyl α -D-glucoside and composed of N-acetyllactosaminic structures, exclusively of the bi-antennary complex type; Fraction C, strongly reactive with Con A, eluted with 0.3 M methyl α -D-glucoside and chiefly composed of oligosaccharides of the oligomannosidic type (Fig. 1, upper pannel).

. High performance liquid chromatography of glycans

Analysis was carried out with a Spectra Physics model-700 liquid chromatograph, equipped with an UV 8400 variable wavelength detector connected to a 4100 computing integrator. H.p.l.c. was performed on primary amine bound silica : a 5- μ m Amino AS-5A column (0.4 X 25 cm, Chromatem 33; Touzart et Matignon) (Paz Parente et al., 1982). A 1 mg amount of standard mixture of oligosaccharides dissolved in 10 μ l of distilled water, was injected on the column; for preparative chromatography oligosaccharides (200.000 3 H cpm) dissolved in 20 μ l of water were injected. The column was equilibrated with the initial solvent (acetonitrile-water, 60:40, v:v). After injection, isocratic conditions were applied for 20 min, followed by a linear gradient to acetonitrile-water (45:55, v:v) during 80 min, at a flow rate of 1 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected, and aliquots were counted for their radioactivity. Standard oligosaccharides were detected at 200 nm.

. Chromatography and electrophoresis conditions

Ascending thin-layer chromatography (t.l.c.) was carried out on Silica gel 60 plates for 5 h in solvent I : ethanol-butanol-pyridine-acetic acid-water (100:10:10:3:30, by vol.) (Bayard et al., 1979). Descending chromatography was performed on Whatman n° 1 paper, for

19 h in solvent II : butanol-pyridine-water (4:3:4, by vol.) (Chapman and Kornfeld, 1979). Preparative high-voltage electrophoresis on Whatman 3MM was conducted in the buffer pyridine- acetic acid-water (18:6:2320, by vol.; pH 5.4) (Grimmonprez and Montreuil, 1968) at 75 V/cm for 3 h at 4°C.

Standard compounds were revealed either by the alkaline silver nitrate technique (Trevelyan et al., 1950) or by the aniline oxalate technique (Partridge, 1950) for paper chromatography, and by spraying the plate with the H_2SO_4 -orcinol reagent (200 mg of orcinol in 100 ml of aq. 20% H_2SO_4) for t.l.c.. Labeled compounds were localized by cutting 1 cm sections of paper or 0.4 cm regions of the thin layer plates into vials containing 0.3 ml water and 3 ml of scintillation fluid Aqualyte TM.

. Carbohydrate composition

The molar composition of oligosaccharides was determined by gas liquid chromatography (g.l.c.) of trifluoroacetylated methyl-glycosides as previously described (Zanetta et al., 1972).

. Micromethylation analysis

Oligosaccharides were methylated according to Finne et al. (1980) as modified by Paz Parente et al. (1984). After methanolysis, the liberated methyl-mono-saccharides were peracetylated as described by Fournet et al. (1981). Resulting compounds were separated and analysed by g.l.c. coupled to mass spectrometry under the following experimental conditions : Girdel (model 300) apparatus (Suresnes, France); capillary glass column coated with OV 101 (0.03 X 250 cm); temperature programme from 150 to 240°C with a temperature gradient of 4°C/min; Riber-Mag 10-10 mass spectrometer (Rueil-

Malmaison, France); electron energy 70 V; ionization current : 0.2 mA; chamber temperature 190°C.

. Sequential exo-glycosidase digestion

NaB^3H_4 -reduced oligosaccharides (2-6 10^3 cpm, about 0.2-0.6 nmol) were digested at 37°C with glycosidases in 20 μl of the appropriate buffer with a toluene atmosphere, as follows : (1) α -mannosidase (final concentration of enzyme : 15 units/ml) in 0.05 M sodium acetate buffer pH 4.6 must be concentrated (Li and Kornfeld, 1978) in order to get complete digestion; equal additions of enzyme were made at 48 h intervals with a 3 days incubation for structures containing 5-6 mannose residues and with another 3 days incubation for structures containing more than 6 mannose residues. (2) α -neuraminidase was added in the same buffer to the final concentration of 1 U/ml and the mixture was incubated for 24 h. (3) β -galactosidase was used at a final concentration of 2 U/ml in 0.1 M sodium citrate 0.2 M sodium phosphate buffer pH 3.5; incubation time 24 h. (4) N-acetyl- β -D-glucosaminidase was used at the high final concentration of 30 U/ml in 0.1 M sodium citrate 0.2 M sodium phosphate buffer pH 4.5 with four additions of enzyme; incubation time 96 h. Reactions were stopped by heating the digestion mixture in a boiling water bath for 2 min. Before analysis by paper chromatography or thin-layer chromatography, the reaction mixture was desalted in batches by using successively Dowex 50W X 8 (25-50 mesh) (H^+ form) and Dowex 1 X 8 (25-50 mesh) (formiate form). For NeuAc removal, after α -neuraminidase digestion, Ag 1 X 2 (200-400 mesh) (acetate form) was used.

RESULTS

Sub-fractionation of the three fractions A,B,C, produced by affinity chromatography on concanavalin A column, by h.p.l.c. or high-voltage electrophoresis,

as described in "Experimental" gave the following results (Fig. 1).

. Fraction A : "bisected" biantennary glycans and triantennary glycans.

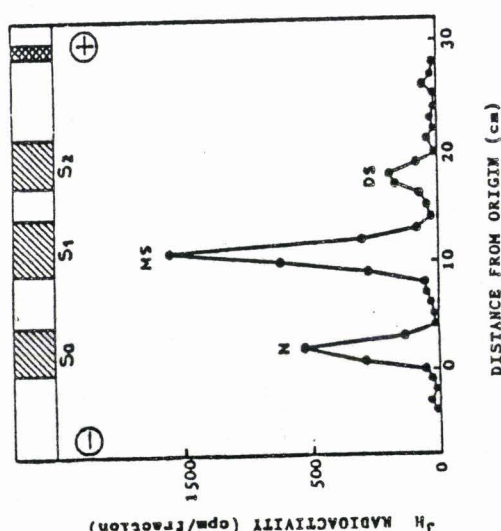
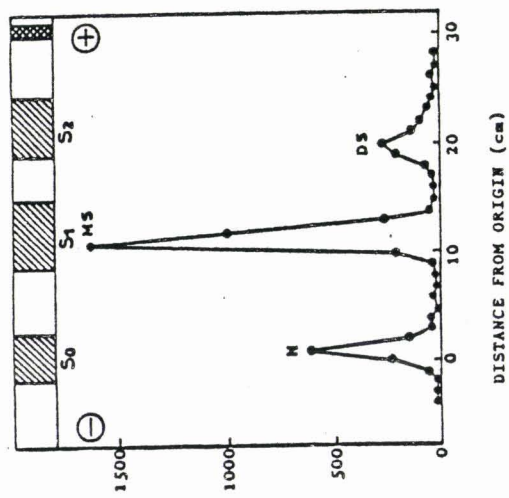
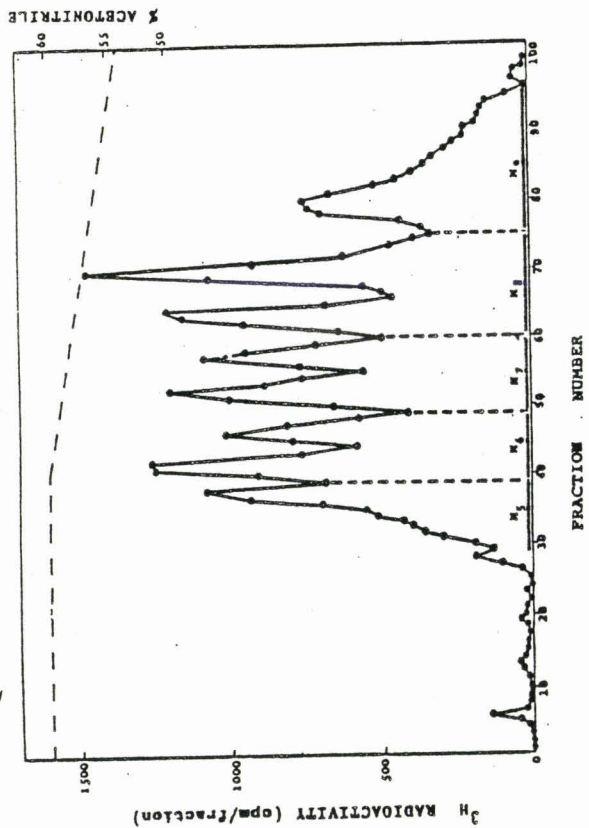
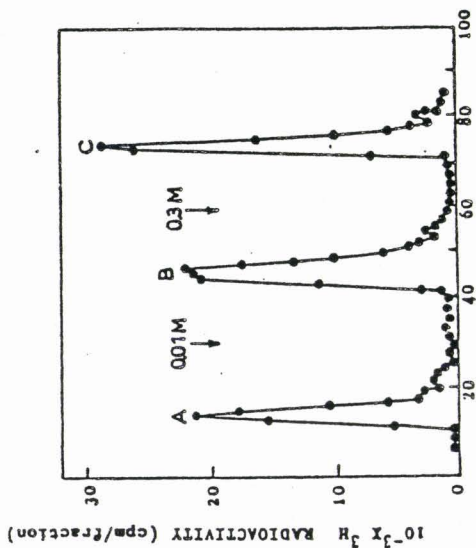
Unbound fraction A on Con A was submitted to high-voltage electrophoresis (Fig. 1A). Three sub-fractions were obtained, respectively, neutral (N), monosialylated (MS) and disialylated (DS). Their relative proportion and carbohydrate composition are given in Table 1. An excess of N-acetyl- β -glucosamine (five residues) is observed, compared with galactose (only two residues). The purity of each fraction was checked by t.l.c. analysis on Silica gel 60 plates (Fig. 2); some heterogeneity could be verified for neutral and monosialylated fractions (see Fig. 2 A-N and A-MS). In particular, neutral fraction seemed to possess a glycan migrating near to the position of disialylated structures and containing 20% of the whole radioactivity. Concerning the disialylated fraction, only one migrating band was observed (Fig. 2 A-DS). Further characterization was required to precise the extent of heterogeneity in the three fractions. A micromethylation with a subsequent analysis by g.l.c. coupled to mass spectrometry were performed on the major monosialylated fraction (A-MS) (Table 2). Results are consistent with a mixture of both bisected and triantennary structures of the N-acetylglucosamine type. The presence of "bisecting" N-acetyl- β -glucosamine was deduced by the identification of both 2-mono-methyl derivate of mannose and 3,4,6-tri-O-methyl derivate of GlcNAc. In addition, triantennary structures were suggested by the detection of the following methylated derivatives of mannose : 3,4,6-tri-O-methyl, 3,6-di-O-methyl and 3,4-di-O-methyl. As only the 2,3,4-tri-O-methyl derivative of galactose has been detected, the terminal NeuAc residue is linked to the inner galactose via 2,6 linkage.

Table 1

Percentage distribution of ^3H radioactivity and carbohydrate composition of sub-fractions obtained by high-voltage electrophoresis of oligosaccharide fractions A and B produced by affinity chromatography on concanavalin A column.

- (a) percentage distribution relative to ^{the} fraction studied
 (b) percentage distribution relative to the total IgM oligosaccharide content:
 (total = 27% for fraction A and 41% for fraction B)
 (c) molar ratios calculated on the basis of 3 mannose residues/molecule

| Oligosaccharide fractions | High-voltage electrophoresis | | G.l.c. (molar ratios) | | | | | |
|---------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------|-----|--------------------|--------|------------|-------|
| | %/fraction ^(a) | %/IgM ^(b) | Fuc | Gal | Man ^(c) | GlcNAc | GlcNAcitol | NeuAc |
| <u>Fraction A</u> | | | | | | | | |
| N | 29 | 7.8 | 1,3 | 2,3 | 3,0 | 3,8 | 0,45 | - |
| MS | 57 | 15.4 | 1,0 | 1,8 | 3,0 | 3,4 | 0,52 | 0,47 |
| DS | 14 | 3.8 | 0,8 | 2,2 | 3,0 | 3,6 | 0,7 | 1,3 |
| <u>Fraction B</u> | | | | | | | | |
| N | 23 | 9.4 | 0,88 | 1,8 | 3,0 | 2,8 | 0,89 | - |
| MS | 61 | 25 | 1,2 | 1,9 | 3,0 | 2,8 | 0,73 | 0,79 |
| DS | 16 | 6.6 | 0,84 | 2,2 | 3,0 | 3.0 | 0.59 | 1,4 |



FRACTION N°

DISTANCE FROM ORIGIN (cm)

DISTANCE FROM ORIGIN (cm)

FRACTION NUMBER

% ACRYLONITRILE

$10^{-3} \times {}^3\text{H}$ RADIOACTIVITY (cpm/fraction)

${}^3\text{H}$ RADIOACTIVITY (cpm/fraction)

${}^3\text{H}$ RADIOACTIVITY (cpm/fraction)

Fig. 1 - Preparation of oligosaccharide fractions

Upper pannel : Fractionation by affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose 4B column (1.5 cm X 9.5 cm) of the carbohydrate chains liberated by hydrazinolysis of IgM Za (from Cahour et al., 1983 a).

(A) Sub-fractionation of N-acetyllactosaminic fraction A from Con A column by preparative paper high-voltage electrophoresis. Products were separated on Whatman 3MM paper in pyridine-acetic acid-water (18:6:2320 by vol.; pH 5.4) at 75 V/cm for 3 h at 4°C. Areas with diagonal lines indicate standards of asialylated (S_0), monosialylated (S_1) and disialylated (S_2) biantennary glycans from human serum transferrin, and cross-hatched areas show the front of migration (bromophenol blue). Radioactive strips were cut and eluted with water. N : neutral, MS : monosialylated and DS : disialylated sub-fractions.

(B) Sub-fractionation of N-acetyllactosaminic fraction B from Con A column by preparative paper high-voltage electrophoresis. Experimental conditions are the same as those described above. N : neutral, MS : monosialylated and DS : disialylated sub-fractions.

(C) Sub-fractionation of oligomannosidic fraction C from Con A column by preparative h.p.l.c. Elution pattern obtained on 5- μ m Amino AS-5A column. For chromatographic conditions, see section "Experimental". Flow rate : 1 ml/min. Fractions of 0.5 ml volume were counted for their radioactivity and pooled as indicated by the bars (M_5 - M_9), comparatively to an elution pattern obtained with a standard mixture of reduced oligomannosides from urine of mannosidosis.

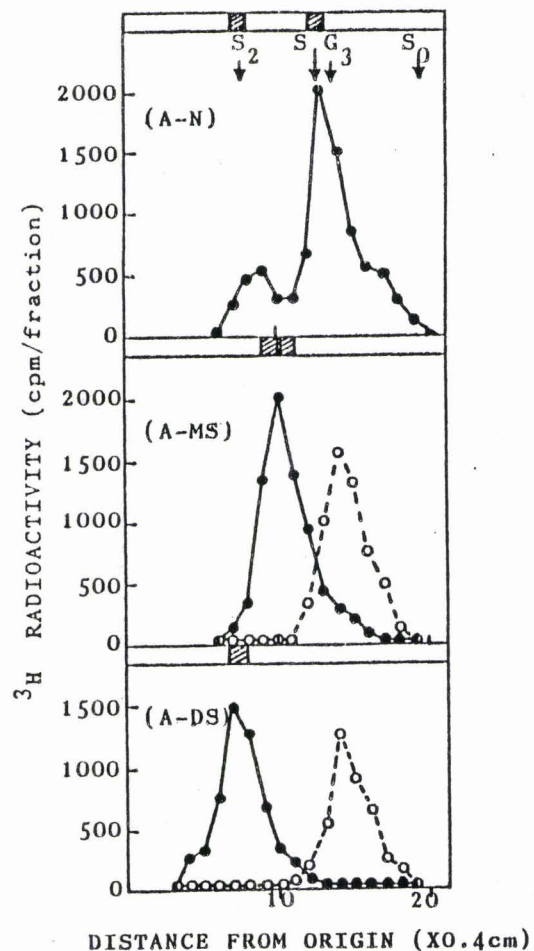


Fig. 2 - Thin-layer chromatography of sub-fractions obtained by high-voltage electrophoresis of fraction A from Con A column.

Solvent system I : ethanol-butanol-pyridine-acetic acid-water (100:10:3:30, by vol.) was used. 0.4 cm regions of thin-layer plates were cut and counted for their radioactivity. A-N : neutral, A-MS : monosialylated, and A-DS : disialylated fractions. These two last fractions were obtained before (\bullet) and after (\circ) α -neuraminidase digestion respectively. The upper areas with diagonal lines in each panel show the migrating band corresponding to initial material (\bullet) revealed by spraying the orcinol reagent on the plate. Arrows indicate the position of the standards of asialylated (S_0), monosialylated (S_1) and disialylated (S_2) biantennary glycans from human serum transferrin and of asialylated triantennary oligosaccharide GM_1 (G_3) from urine of gangliosidosis (see text).

By this procedure, the kind of branching between sugar residues was deduced but their sequence remained to be elucidated. It was established by using sequential stereo-specific exo-glycosidase digestion (Fig. 3). In a first step, when reduced, oligosaccharide fraction was treated successively with α -neuraminidase and β -galactosidase, resulting material analysed by descending paper chromatography (Fig. 3b) migrated with a faster mobility than the initial product. Incubation of this mixture digest with N-acetyl- β -glucosaminidase (Fig. 3c) liberated material co-migrating in part with the pentasaccharide core unit fucosylated in C-6 position of the N-acetylglucosaminitol residue : $\text{Man}(\alpha 1-3)$ $[\text{Man}(\alpha 1-6)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAcitol}$. The non-completion of the hexosaminidase digestion of product in (b) could be partly explained, taking into account the presence of the bisected structure suggested by methylation data, with the previous report by Irimura et al. (1981) relating the difficulty to yield a release of N-acetylglucosamine residues with hexosaminidase treatment, probably due to the presence of the "bisecting" GlcNAc. In a last step, a fourth addition of hexosaminidase was done to enzyme digest, at the same time as α -mannosidase (Fig. 3d). This treatment converted material obtained in (c) to a compound moving as the authentic standard : $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAcitol}$. A preliminary incubation of the initial monosialylated material with α -mannosidase did not produce any decrease in size, suggesting that mannose is not a terminal monosaccharide in carbohydrate chains. This series of results is compatible with the following sequence :

$$\alpha\text{-NeuAc} \rightarrow \beta\text{-Gal} \rightarrow \beta\text{-GlcNAc} \rightarrow \alpha\text{-Man} \rightarrow \beta\text{-Man} \rightarrow$$

Taking into account exo-glycosidase digestion results and percentage distribution of permethylated derivatives reported in Table 2, a good evidence was given for the presence of bisected component which appeared predominant among the monosialylated oligosaccharides from the fraction A (A-MS). Thereby, triantennary structures are minor in this fraction as in the disialylated

Table 2

Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of permethylated oligosaccharides isolated from major monosialylated sub-fraction (MS) obtained by high-voltage electrophoresis of oligosaccharide fractions A and B produced by affinity chromatography on concanavalin A column.

| Monosaccharide methyl ethers | Molar ratios in sub-fractions | |
|--|-------------------------------|---------------------|
| | A-MS ^(a) | B-MS ^(b) |
| <u>Fucose</u> | | |
| (2,3,4)-Me ₃ -Fuc | 0.45 | 0.7 |
| <u>Galactose</u> | | |
| (2,3,4,6)-Me ₄ -Gal | 0.86 | 0.9 |
| (2,3,4)-Me ₃ -Gal | <u>1.0</u> | 1.3 |
| <u>Mannose</u> | | |
| (3,4,6)-Me ₃ -Man | 1.43 | <u>2.0</u> |
| (3,6)-Me ₂ -Man | 0.10 | - |
| (3,4)-Me ₂ -Man | 0.18 | - |
| (2,4)-Me ₂ -Man | 0.37 | 1.1 |
| (2)-Me ₁ -Man | 0.76 | - |
| <u>N-acetylglucosamine</u> | | |
| (1,3,5)-Me ₃ -GlcN(Me)Ac-itol | 0.28 | 0.7 |
| (3,4,6)-Me ₃ -GlcN(Me)Ac | 0.89 | - |
| (3,6)-Me ₂ -GlcN(Me)Ac | 2.48 | 2.9 |
| <u>N-acetylneuraminic acid</u> | | |
| (4,7,8,9)-Me ₄ -Neu(Me)Ac | 0.6 | 0.9 |

(a) calculated on the basis of 1 residue of (2,3,4)-Me₃-Gal.

(b) calculated on the basis of 2 residues of (3,4,6)-Me₃-Man.

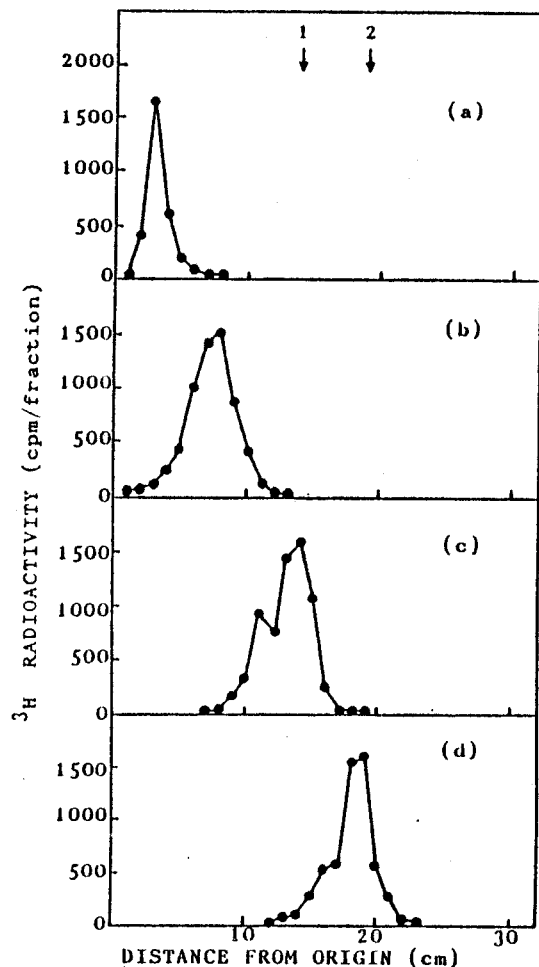


Fig. 3 - Stepwise exo-glycosidase digestion of mono-sialylated sub-fraction (A-MS) obtained by high-voltage electrophoresis of fraction A from Con A column.

Reduced and radioactive oligosaccharides were submitted to descending paper chromatography in solvent II for 19 h; 1 cm sections were cut and counted for their radioactivity. Arrows indicate the positions of authentic standards : (1) $\text{Man}(\alpha 1-3) [\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)] \text{GlcNAcitol}$; (2) $\text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)] \text{GlcNAcitol}$. (a) : initial product; (b) : product released by digestion with α -neuraminidase and then β -galactosidase of material in (a); (c) : material liberated by treatment of product in (b) with N-acetyl- β -glucosaminidase; (d) radioactive peak obtained after incubation of material in (c) with N-acetyl- β -glucosaminidase and α -mannosidase.

one (A-DS) on which only qualitative micromethylation analysis (because of limited amount of material) has been made. The results obtained were the same as for A-MS fraction except for galactose residues which were all substituted by N-acetylneuraminic acid and gave the 2,3,4-tri-O-methyl derivate only. Concerning the neutral fraction (A-N), no methylation could be performed because of the yield of not enough purified product but t.l.c. analysis (Fig. 2A-N) revealed a minor (1.56% of total oligosaccharides) "more complex" structure than bisected and triantennary ones with regard to its slower migration. This structure does not seem to exist in A-MS and A-DS fractions as shown in Fig. 2A-MS and A-DS : each fraction treated with α -neuraminidase was completely converted to faster material than the one corresponding to the unknown structure, migrating with about the same mobility as the standard GM₁(G₃) (see Experimental).

Nevertheless, on the basis of micromethylation and enzymatic digestion data, the following structures can be proposed (Fig. 6_{3a,b}) for the main oligosaccharides contained in fraction A produced by affinity chromatography on Con A column. Concerning the inner part of the carbohydrate units, beyond α -linked mannose residues, we have concluded to the usual tetrasaccharide sequence : Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4) [Fuc(α 1-6)] GlcNAc, taking into account the large distribution of this structure in glycoproteins from several other sources (for a recent review, see Montreuil, 1982), and g.l.c. and micromethylation data. In addition, the same monosialylated and monofucosylated bisected-biantennary structure as one of those described in Fig. 6₂ has been isolated from another monoclonal human IgM Gra in which it is predominant. This structure has been confirmed by 500 MHz ¹H-NMR spectroscopy in a recent work (Cahour et al., 1984).

. Fraction B : biantennary glycans.

Oligosaccharides B, weakly reactive with Con A, were separated by preparative high-voltage paper electrophoresis into three sub-fractions as follows (see Fig. 1B) : neutral fraction (N), monosialylated fraction (MS) and disialylated fraction (DS). Percentages of radioactivity and carbohydrate composition of each fraction are given in Table 1. T.l.c. analysis (Fig. 4) suggests that the samples are homogeneous and differ only in their NeuAc content. Monosialylated (B-MS) and disialylated (B-DS) fractions were treated with α -neuraminidase (Fig. 4 B-MS and B-DS, respectively) and released material, analysed on Silica gel 60, migrated with the same mobility as the neutral fraction in Fig. 4 B-N. These results lead to the conclusion that the fraction B eluted from Con A contains a unique structure of which the only heterogeneity observed is due to the NeuAc content.

In a previous work (Cahour et al., 1984), the structure of the major monosialylated fraction (B-MS) of that IgM has been described, based on methylation and 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy data. In this report, our aim was to verify the validity of sequential exoglycosidase digestion in the approach of the above structure. Such a serially degradation was applied to fraction B-MS and digested products were located by descending paper chromatography (see Fig. 5). The first step (Fig. 5b) related the conversion of initial NaB^3H_4 -reduced oligosaccharide (B-MS) treated successively with α -neuraminidase and β -galactosidase to material with a faster mobility. Incubation of this mixture digest with N-acetyl- β -glucosaminidase (Fig. 5c) liberated material co-migrating with the hexasaccharide standard (1) (see "Experimental"). In a last step product in (c) digested with α -mannosidase was converted to a compound moving as the authentic standard : $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAcitol}$ (Fig. 5d). Based on this series of results,

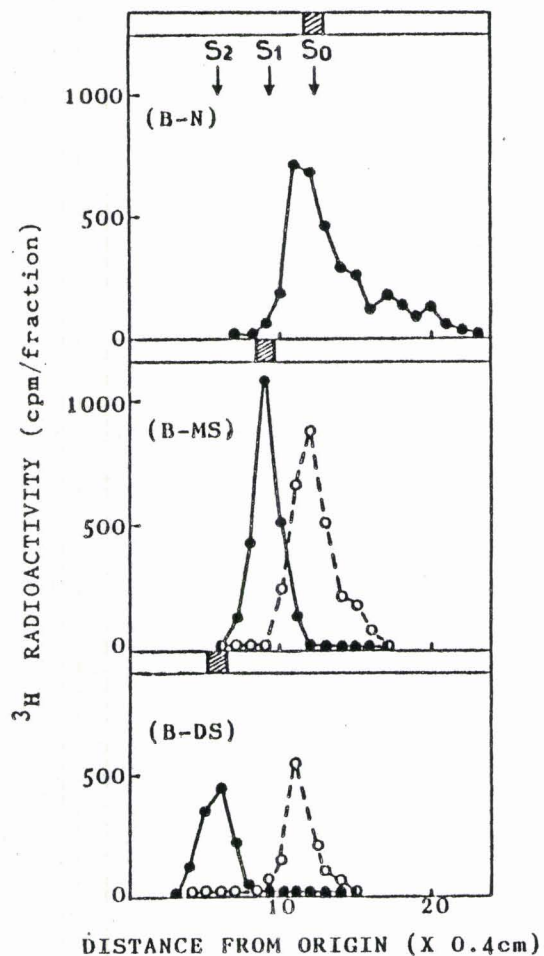


Fig. 4 - Thin-layer chromatography of sub-fractions obtained by high-voltage electrophoresis of fraction B from Con A column.

Solvent system I (see text) was used and 0.4 cm regions of thin-layer plates were cut and counted for their radioactivity. B-N : neutral, B-MS : mono-sialylated; B-DS : disialylated fractions; these two last fractions, before (●) and after (○) α -neuraminidase digestion respectively. Arrows indicate the position of the standards of asialylated (S_0), mono-sialylated (S_1) and disialylated (S_2) biantennary glycans from human serum transferrin. Upper areas with diagonal lines correspond to the initial material (●).

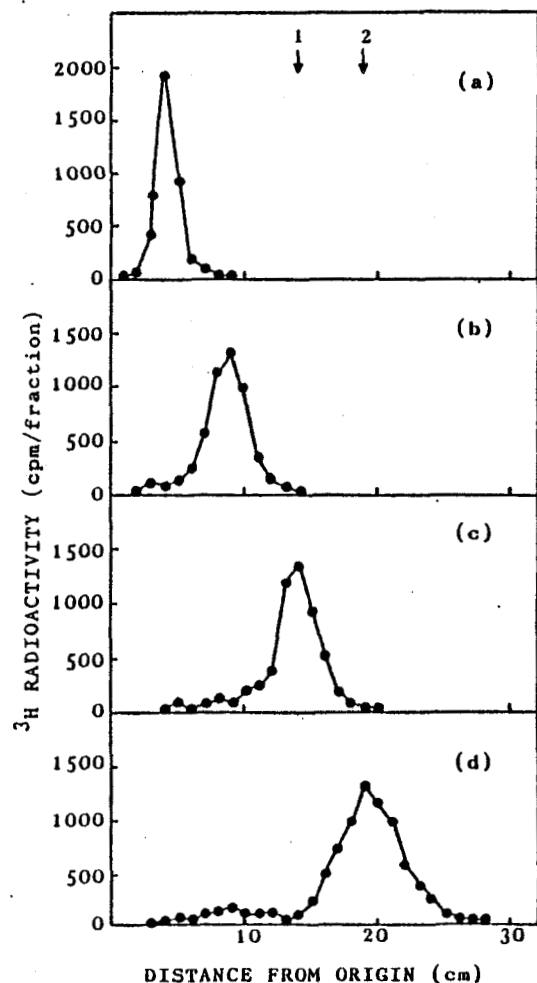


Fig. 5 - Stepwise exo-glycosidase digestion of mono-sialylated sub-fraction (B-MS) obtained by high-voltage electrophoresis of fraction B from Con A column.

Reduced and radioactive oligosaccharides were submitted to descending paper chromatography in solvent II for 19 h; 1 cm sections were cut and counted for their radioactivity. Arrows indicate the positions of authentic standards : (1) $\text{Man}(\alpha 1-3) [\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)] \text{GlcNAcitol}$; (2) $\text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) [\text{Fuc}(\alpha 1-6)] \text{GlcNAcitol}$. (a) : initial product; (b) : product released by successive digestion with α -neuraminidase and β -galactosidase of material in (a); (c) : material liberated by treatment of product in (b) with N-acetyl- β -glucosaminidase; (d) radioactive peak obtained after incubation of material in (c) with α -mannosidase.

the anomeric configuration and monosaccharide sequence of the monosialylated glycan (B-MS) can be written : $\alpha\text{-NeuAc} \rightarrow \beta\text{-Gal} \rightarrow \beta\text{-GlcNAc} \rightarrow \alpha\text{-Man} \rightarrow \beta\text{-Man} \rightarrow$. These results compiled with those of micromethylation, recalled in Table 2, allowed us to propose the structures shown in Fig. 6₁. These last ones are in good agreement with the one determined by using NMR spectroscopy.

. Fraction C : glycans of the oligomannosidic type.

Fraction C, highly reactive with Con A, was further resolved by h.p.l.c. into five different sub-fractions pooled comparatively with a standard mixture profile elution, and numbered M₅ through M₉ as indicated in Fig. 1C. Experimental conditions were those described in "Experimental". All fractions were quantified for their relative proportions and chemically characterized by g.l.c. (Table 3). They exhibited an increased content in mannose residues in direct relation with their retention time.

After exhaustive digestion with Jack bean α -mannosidase, these fractions all gave material co-migrating with the authentic trisaccharide $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAcitol}$ by paper chromatography, allowing us to conclude that the linkages between all the Man residues are α -linkages. None of the glycans was found partially resistant to α -mannosidase indicating the absence of either glucose-containing high-mannose oligosaccharide (Li and Kornfeld, 1978) or "hybrid" structure as described in myeloma IgM (Chapman et al., 1979 b). In addition, a permethylation procedure performed on the initial mixture of oligomannosides gave the following methyl ethers : 1,3,5,6-tetra-O-methyl and 3,6-di-O-methyl derivatives for N-acetylglucosamine residues, and 2,3,4,6-tetra-O-methyl-, 3,4,6-tri-O-methyl- and 2,4-di-O-methyl-derivates for mannose residues. Neither permethylated glucose nor permethylated N-acetylglucosamine have been detected giving another evidence

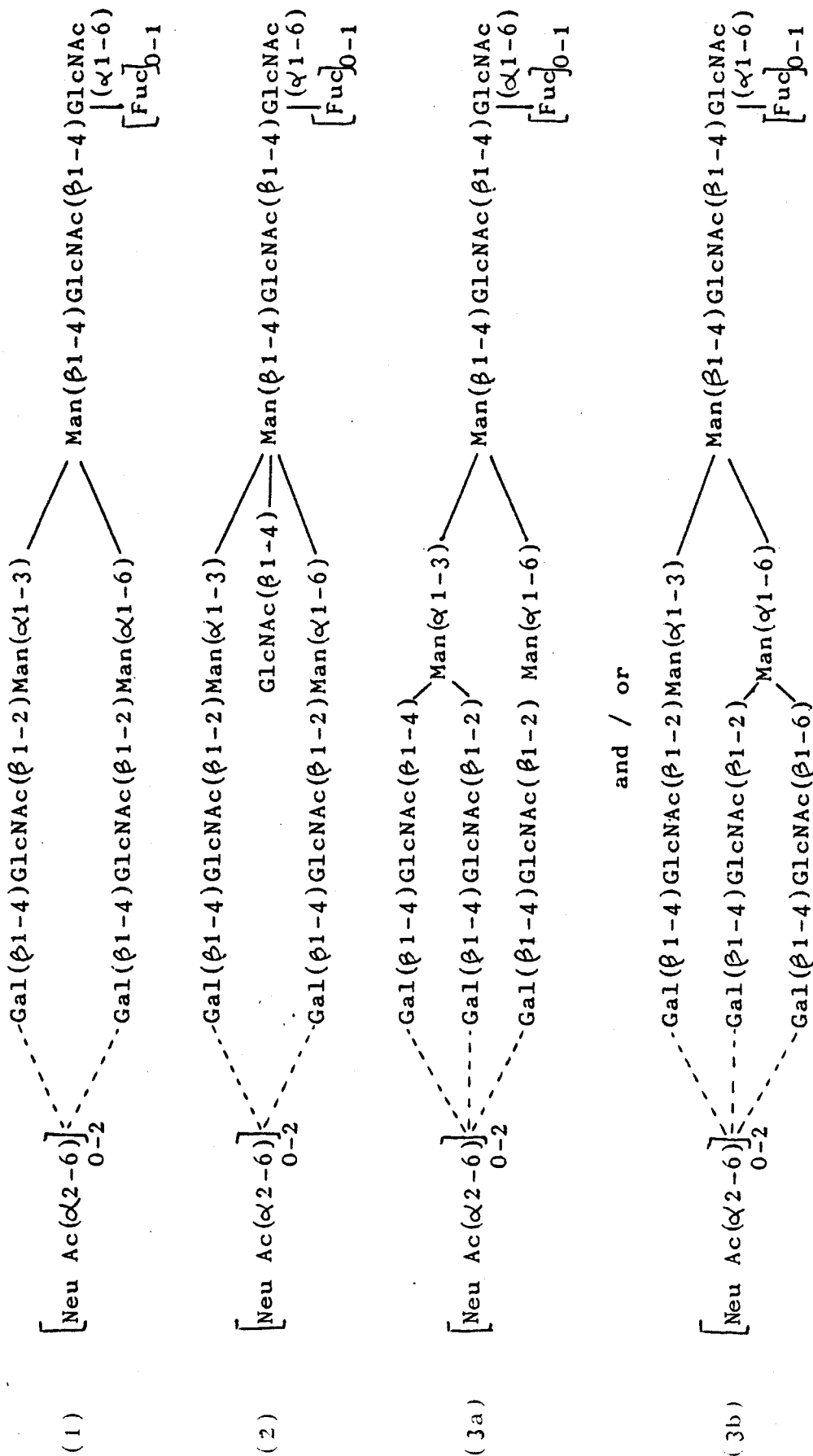


Fig. 6 - Proposed structures of the most important N-acetylglucosaminic glycans isolated from IgM Za : of the biantennary type (1); of the bisected-biantennary type (2); of the triantennary type (3a and/or 3b).



Table 3

Distribution of ³H radioactivity among sub-fractions of high-mannose oligosaccharides and characterization of their carbohydrate chains.

- (a) percentage distribution relative to high-mannose glycans
- (b) percentage distribution relative to the total IgM oligosaccharide content (total = 32% for oligomannosidic fraction).
- (c) molar ratios calculated on the basis of 1 N-acetylglucosamine residue

| Oligosaccharide fractions | h.p.l.c. | g.l.c.(molar ratios) | | |
|---------------------------|----------|-------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| | | %/oligoman- nosides (a) | %/IgM ^(b) | Man GlcNAc ^(c) GlcNAcitol |
| M ₅ | 15.0 | 4.8 | 5.0 | 1 0.52 |
| M ₆ | 22.5 | 7.1 | 5.5 | 1 0.48 |
| M ₇ | 21.8 | 7.0 | 7.2 | 1 0.55 |
| M ₈ | 22.2 | 7.1 | 8.0 | 1 0.67 |
| M ₉ | 18.8 | 6.0 | 9.1 | 1 0.5 |

that these two residues do not exist as outer chain monosaccharides. Micromethylation data showed that oligomannosides contain the same linkages as those found in several glycans of the oligomannosidic type (Li and Kornfeld, 1979; Chapman and Kornfeld, 1979 a,b; Cohen and Ballou, 1980; Jouanneau et al., 1981; Van Halbeek et al., 1981) i.e. 1,2-, 1,3- or 1,6-linked mannose residues and 1,4-linked N-acetylglucosamine residue.

DISCUSSION

The classical technics, i.e. micromethylation analysis, mass spectrometry and sequential exo-glycosidase digestion have been successfully used in the approach of the structural heterogeneity of oligosaccharides present in the human monoclonal IgM Za. The same general protocol has been followed to elucidate the different structures, except for the step of subfractionation of fractions obtained from Con A column; high-voltage electrophoresis was performed on fractions A and B, of the N-acetylglucosamine type, and h.p.l.c. was applied to oligomannosidic fraction C.

Concerning the oligosaccharides of the oligomannosidic type, the goal of the present study was to precise the size of the glycans and to characterize eventual unusual structures. Our results confirm that monoclonal IgM Za contains "typical" structures of the oligomannosidic type as aforesaid by Chapman and Kornfeld (1979 a,b); Ballou et al. (1980); Jouanneau et al. (1981) and Van Halbeek et al. (1981), with 5 to 9 mannose residues of which all are α -linked, except the innermost one, which is β -linked to a GlcNAc residue. No intermediate glycan has been found, therefore no further structural investigation was required.

Regarding oligosaccharides of the N-acetylglucosamine type, the biantennary glycan is the simplest structure which occurs in majority under the monosialylated and monofucosylated form as earlier described in a human myeloma

IgM by Hickman et al. (1972) and in almost other classes of immunoglobulins as in numerous human glycoproteins (for recent review, see Montreuil, 1982). The micro-heterogeneity of biantennary structures is reinforced, due only to variable content in NeuAc and Fuc, and not to the nature of their linkage. NeuAc can be either α -2,6- or α -2,3-linked to galactose residues as described in a rat IgE by Rearick et al. (1983). For fucose residues, the occurrence of both α -1,6-linkage to the GlcNAc conjugated to asparagine, and α -1,3-linkage to the GlcNAc taking part of the N-acetyllactosamine residue of the α -1,6 antennae, has been described in a secretory human milk IgA (Pierce-Crétel et al., 1982). Concerning the IgM Za, the presence of only α -2,6-linked NeuAc and α -1,6-linked Fuc residues has been found by using micromethylation technics, discarding the possible occurrence of any other described types of linkages.

Concerning the more complicated glycans of the N-acetyllactosamine type, all have in common a biantennary basic structure. Their heterogeneity is due, on the one hand, to an additional GlcNAc residue β -1,4-linked to the innermost mannose residue, giving a "bisected-type" oligosaccharide. This latter one is predominant in the studied monosialylated fraction (A-MS), though it has never been found to occur till now in any human IgM. Nevertheless, such a structure has been described in several immunoglobulin classes, i.e. in human serum IgE (Baenziger et al., 1974 a,b), IgA (Baenziger and Kornfeld, 1974 c,d) and IgD (Ishihara et al., 1983) and in secretory human milk IgA (sIgA) (Pierce-Crétel et al., 1984).

On the other hand, an additional antennae of the N-acetyllactosamine type is linked to the α -1,3- or α -1,6-Man residue, giving a triantennary glycan. Such a structure with the third β -1,4-linked outer chain has been reported in a myeloma mouse IgM (Brenckle and Kornfeld, 1980) but not yet in a human IgM. NeuAc and Fuc linkages are the same as those reported for biantennary glycans. A minor and somewhat more complicated oligosaccharide can be observed

in the neutral fraction (A-N) but no further structural identification could be attempted because of the limited quantity we isolated.

In order to precise the extent of oligosaccharide heterogeneity, and to establish the biological significance, if any, of such a phenomenon, the same methodology is now applied to individualized fractions obtained from the three IgM families previously described (Cahour et al., 1981). This work is under investigation and will be further reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (Laboratoire Associé n° 217 : Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Equipe de Recherche Associée n° 696 : Immunochimie et Biologie Moléculaire), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (Unité de Recherches n° 202 : Immunochimie et Biologie Moléculaire) and by the Fondation pour la Recherche Médicale. The authors are grateful to Professor G. Spik and Dr G. Strecker for their generous supply of standards for chromatographic studies and to Professor S. Bouquelet for his generous gift of glycosidases . They are very much obliged to Professor B. Fournet for helpful discussions about gas-liquid chromatography analysis of monosaccharides and derivatives. The authors are indebted to Y. Leroy (CNRS Technician) and to J-F Massias for their skilful assistance, and to P. Marcon for her help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Baenziger, J., Kornfeld, S. and Kochwa, S. (1974 a)
J. Biol. Chem. 249, 1889-1896.
- Baenziger, J., Kornfeld, S. and Kochwa, S. (1974 b)
J. Biol. Chem. 249, 1897-1903.
- Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1974 c) J. Biol. Chem.
249, 7260-7269.
- Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1974 d) J. Biol. Chem.
249, 7270-7280.
- Baenziger, J.U. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4063-4071.
- Bayard, B., Kerckaert, J.P., Roux, D. and Strecker,
G. (1979) Protides Biol. Fluids Proc. Colloq. 27, 153-156.
- Brenckle, R. and Kornfeld, R. (1980) Arch. Biochem.
Biophys. 201, 160-173.
- Cahour, A., Ollier-Hartmann, M.P., Mihaesco, C. and
Hartmann, L. (1981) Biomedicine 35, 133-136.
- Cahour, A., Debeire, Ph., Hartmann, L. and Montreuil, J.
(1983) Biochem. J. 211, 55-63.
- Cahour, A., Debeire, Ph., Hartmann, L., Montreuil, J.,
Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) FEBS
Letters (in press).
- Chapman, A. and Kornfeld, R. (1979 a) J. Biol. Chem. 254,
816-823.
- Chapman, A. and Kornfeld, R. (1979 b) J. Biol. Chem. 254,
824-828.
- Clamp, J.R. and Johnson, I. (1972) in Glycoproteins : Their
Composition, Structure and Function, 2nd edn. (Gottschalk,
A.J., ed.), pp. 612-652, Elsevier, Amsterdam.

- Cohen, R.E. and Ballou, C.E. (1980) *Biochemistry* 19, 4345-4358.
- Debeire, Ph., Montreuil, J., Samor, B., Mazurier, C., Goudemand, M., Van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1983) *FEBS Lett.* 151, 22-26.
- Debray, H., Pierce-Crétel, A., Spik, G. and Montreuil, J. (1983) in "Lectins" (T.C. Bg. Hansen and G.A. Spengler eds.) Vol. III, pp. 335-350, W. de Gruyter, Berlin, New York.
- Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339.
- Florent, G., Lehman, D., Lockhart, D. and Putnam, F. (1974) *Biochemistry* 13, 3372-3381.
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502.
- Grimmonprez, L. and Montreuil, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 843-855.
- Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C.K. and Kornfeld, S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 2156-2163.
- Irimura, T., Tsuji, T., Tagami, S., Yamamoto, K. and Osawa, T. (1981) *Biochemistry* 20, 560-566.
- Ishihara, H. and Tejima, S. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 181-186.
- Jouanneau, J., Fournet, B. and Bourrillon, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 667, 277-284.
- Kehry, M., Sibley, C., Fuhrman, J., Schilling, J. and Hood, L.E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2932-2936.

- Kornfeld, R., Keller, J., Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3259-3268.
- Li, Y.T. and Li, S.C. (1972) *Methods Enzymol.* 28 B, 702-713.
- Li, E. and Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1600-1605.
- Miller, F. (1972) *Immunochemistry* 9, 217-228.
- Montreuil, J. (1982) *Compr. Biochem.* 19 B, part II, 1-188.
- Partridge, S.M. (1950) *Biochem. Soc. Symp.* 3, 52-61.
- Paz-Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J. and Fournet, B. (1982) *J. of Chromatogr.* 249, 199-204.
- Paz-Parente, J., Leroy, Y., Montreuil, J. and Fournet, B. (1984) *Anal. Biochem.* (in press).
- Pierce-Crétel, A., Pamblanco, M., Strecker, G., Montreuil, J., Spik, G., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125, 383-388.
- Pierce-Crétel, A., Debray, H., Montreuil, J., Spik, G., Van Halbeek, H., Mutsaers, J.H.G.M. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) *Eur. J. Biochem.* (in press).
- Rearick, J.I., Kulczycki, A. Jr. and Kornfeld, S. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 220, 95-105.
- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* 50, 296-299.
- Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dhondt, J.L. and Farriaux, J.P. (1976) *Biochimie* 58, 579-586.
- Torano, A., Tsuzukida, Y., Liu, Y-S.V. and Putnam, F.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 2301-2305.
- Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrison, J.S. (1950) *Nature (London)* 166, 444-445.

- Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G.,
Jouanneau, J. and Bourillon, R. (1981) *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. 99, 886-892.

- Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G.
(1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-301.

Les résultats obtenus peuvent être ainsi résumés :

1 - **Fraction A** : La combinaison des résultats obtenus après microméthylation et digestions enzymatiques successives a révélé la présence simultanée dans cette fraction d'une structure biantennée porteuse d'une N-acétylglucosamine (GlcNAc) liée en β -1,4 sur le β mannose du noyau pentasaccharidique et de structures triantennées. Cette GlcNAc supplémentaire est appelée "intercalaire" ("bisecting" ou "intersecting" GlcNAc dans la nomenclature internationale) à cause de sa position de bissectrice par rapport aux deux branches d'une structure biantennée. L'analyse structurale a été effectuée sur la fraction monosialylée, majoritaire (57%) dans la fraction A (A-MS). La structure biantennée porteuse d'1 GlcNAc intercalaire est largement dominante (90%) dans la sous-fraction ; sa présence est confirmée par l'obtention des 2 spectres caractéristiques en spectrométrie de masse : celui de l'osamine triméthylée en 3, 4, 6, et celui du mannose monosubstitué en 2 (Fig. 30 ; p. 210). C'est la première fois qu'une telle structure a été identifiée dans une IgM humaine (v. article 4 ; p. 179).

Les structures triantennées sont mineures mais la présence des 2 types (avec 1 antenne liée en β - 1,4 ou en β - 1,6) confirmée par l'observation des spectres de masse correspondants : d'une part celui du dérivé triméthylé en 3, 4, 6 du mannose, et d'autre part ceux des 2 dérivés diméthylés en 3,6 et en 3,4. De plus la fraction A apparaît très hétérogène puisque la sous-fraction neutre (A-N) possède une structure complexe de migration plus lente que les structures triantennées (Fig. 2; p. 190), non caractérisée du fait de sa faible distribution (20,2% dans la sous-fraction A-NS, mais équivalente en réalité à 1,58% de la fraction glucidique de l'IgM ZAJ).

2 - **Fraction B** : Les résultats la concernant caractérisent la présence exclusive de structures N-acétyllactosaminiques de type biantenné. L'hétérogénéité observée dans la Fig. 1 B ; p. 188 par la subdivision en sous-fraction N, MS et DS est uniquement due à la teneur en acide sialique :

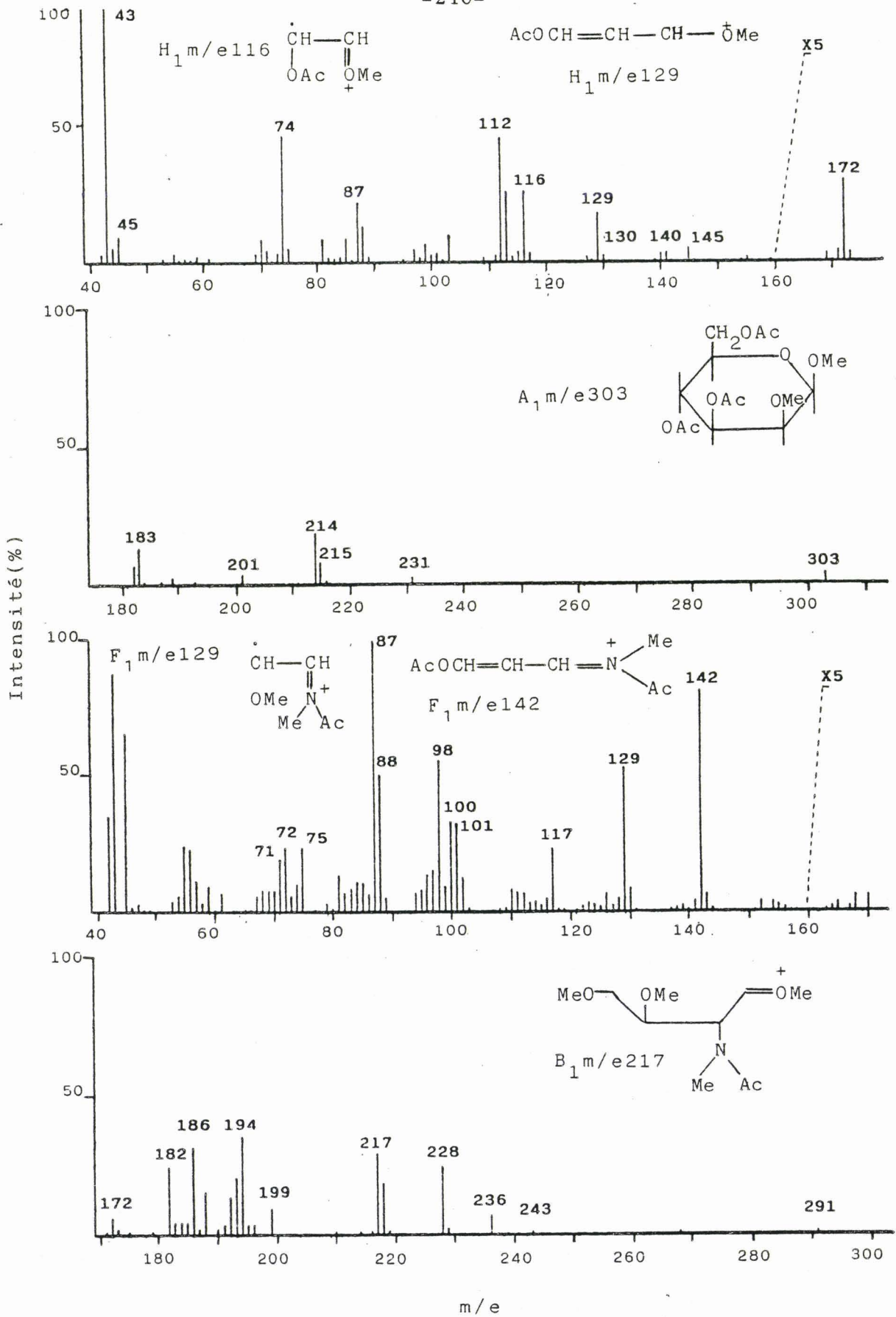


Figure 30 : Spectres de masse caractéristiques des dérivés méthylés et peracétylés:

- (A) 2-monométhyl, 3,4,6-triacétyl mannose;
- (B) 3,4,6-triméthyl, N-méthyl-acétylglucosamine.

une désialylation par l' α -neuraminidase des sous-fractions B-MS et B-DS fournit dans les deux cas la structure B-N (Fig. 2 ; p.190).

Cette fraction étant abondamment représentée dans l'IgM ZAJ (41%), une étude en RMN a pu être effectuée sur la sous-fraction B-MS (25%), confirmant les résultats obtenus par la méthodologie classique (cf. article n° 5 ; p.217).

Cette structure du type biantennée, a déjà été observée dans des IgM pathologiques ; c'est le seul exemple de structure complexe décrit dans les IgM humaines, soit fucosylé et plus ou moins sialylé, par Hickman *et al.* (1972), soit non fucosylé (chaîne J), par Baenziger (1979).

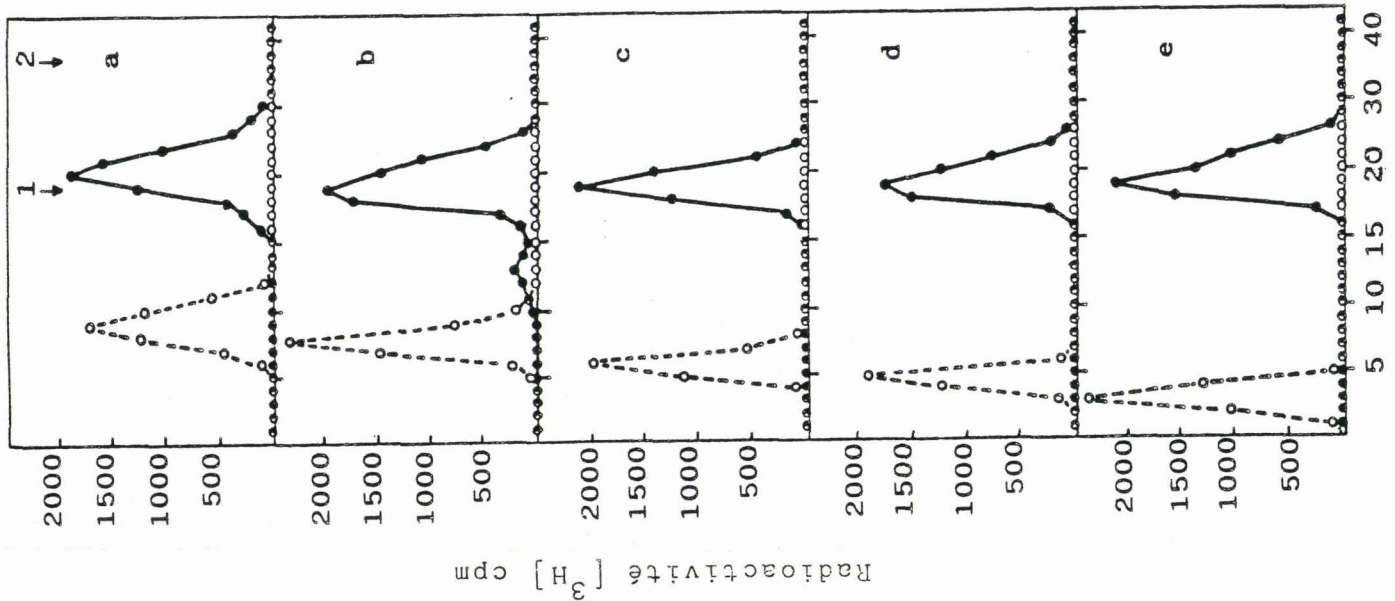
3 - **Fraction C** : Déjà caractérisés du type oligomannosidique à cause de leur forte affinité pour la ConA et par la détermination de leurs rapports molaires en monosaccharides (ceux-ci étant limités au Man et à la GlcNAc), les glycanes de la fraction C se répartissant selon leur taille dans les différents pics élués de la colonne amino par HPLC. Les rapports molaires dans les différentes sous-fractions obtenues par GLC (Tableau 3 ; p.200) sont représentatifs de chaînes glycaniques contenant de 5 à 9 résidus de Man. L'action de l' α -mannosidase de Jack bean sur chacune des sous-fractions, décrite p.185 et représentée Fig. 31 ; p.212, confirme l'anométrie de type α des liaisons entre les résidus Man. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (cf. p.201). Notons, de plus, que la digestion enzymatique a été complète dans tous les cas étudiés ; elle suggère l'absence de structure intermédiaire (ou mixte) entre un glycanne de type oligomannosidique et un glycanne N-acétyllactosaminique, du type $\text{GlcNAc}(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2$ (la première GlcNAc externe étant liée en β -1,2 sur le Man 4), observée dans un IgM de Waldenström (Chapman et Kornfeld, 1979 b). De même, aucune structure immature, du type $(\text{Glc})_{1-3}(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$, telle que celle qui est transférée du Dol-P-P sur la chaîne peptidique en cours d'élongation, n'a été décelée.

Figure 31 : Action de l' α -mannosidase de Jack bean sur les différentes sous-fractions obtenues après HPLC pour les structures oligomannosidiques (chromatographie sur papier)

(---) \rightarrow structure native*
(—) \rightarrow structure obtenue après dégradation enzymatique;
Témoins de migration:

- (1) Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAcitol;
- (2) α -D-Man.

* 5Man(a), 6Man(b), 7Man(c), 8Man(d), 9Man(e)



Une telle glucosylation résiduelle a été récemment identifiée dans une IgD par Mellis et Baenziger (1983).

C - CONCLUSION

Ces résultats montrent qu'une telle méthodologie, utilisant les techniques classiques de détermination de structure, permet d'apprécier l'hétérogénéité structurale des chaînes glycaniques d'une IgM donnée. La Fig.6 ; p.199 représente les structures proposées pour l'IgM-7(ZAJ). L'application possible de la RMN à certains glycannes apporte un complément d'informations et permet de valider les résultats obtenus par utilisation des exo-glycosidases.

II - ETUDE DE L'HETEROGENEITE STRUCTURALE DES 3 IGM

A - SOUS-FRACTIONNEMENT ET CARACTERISATION

Ils sont effectués pour chaque fraction éluee de la colonne de ConA, et dans les mêmes conditions pour les 3 IgM.

1 - Fraction A : Le profil de migration des sous-fractions N, MS et DS, obtenu par électrophorèse à haut voltage est, dans chacun des cas, semblable à celui obtenu pour l'IgM-7 (Fig. 1A ; article 4 ; p.188). Seules les proportions respectives des sous-fractions varient et sont rassemblées dans le tableau 1 ; p.187 ainsi que les rapports molaires de leurs monosaccharides.

Dans cette série de valeurs il résulte une prédominance des structures monosialylées A-MS ; les IgM normales sont les plus riches en structures disialysées. Les rapports molaires, principalement ceux du galactose et de la N-acétylglucosamine reflètent une certaine hétérogénéité de structure.

2 - Fraction B : Les profils de migration électrophorétique obtenus pour chaque IgM ressemblent à celui obtenu pour la fraction B de l'IgM-7 (Fig. 1B ; article 4 ; p. 188). La distribution des sous-fractionN, MS et DS, et leurs rapports molaires en monosaccharides sont rapportés dans le tableau 1 ; p. 187 .

En ce qui concerne les structures sialylées, une conclusion identique à celle de la fraction A est obtenue. Les rapports molaires traduisent une homogénéité structurale et sont caractéristiques de structures biantennées ; ils confirment les prévisions déjà formulées pour la fraction B d'après ses propriétés d'éluion de la ConA. Seule une microhétérogénéité due au fucose (Fuc) et à l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) est enregistrée.

2 - Fraction C : Dans chacun des cas cette fraction est soumise à une chromatographie liquide à haute pression et donne un profil d'éluion ressemblant à celui de la Fig. 1C ; article 4 ; p. 188 . Les rapports molaires en monosaccharides déterminés pour chaque sous-fraction, sont caractéristiques de structures oligomannosidiques contenant de 5 à 9 résidus de Man ; cependant leur répartition varie d'une population à l'autre comme l'indiquent les 3 histogrammes de fréquence (Fig. 32 ; p. 215). Les profils obtenus pour les IgM normales et l'IgM-10 sont similaires : les glycanes courts de 5 à 6 Man prédominent. Cette observation serait en faveur d'une évolution normale de la glycosylation des chaînes vers des structures N-acétyllactosamiques, compte tenu des données acquises à ce sujet (cf. p. 65). Un élagage progressif des structures de 9 à 5 résidus Man permettrait la fixation du premier résidu de GlcNAc sur le Man 4 (Tabas *et al.*, 1978 ; Li et Kornfeld, 1978).

L'histogramme obtenu pour l'IgM-7 traduit au contraire un "blocage" à un certain niveau de la chaîne réactionnelle ; cela se manifeste par une accumulation des structures oligomannosidiques, les plus lourdes atteignant progressivement le taux des plus légères. Une interprétation de ce phénomène sera donnée dans le chapitre IV .

B - ETUDE STRUCTURALE

L'étude structurale des IgM normales et de l'IgM-7 s'est déroulée selon une démarche expérimentale identique à celle adoptée pour l'IgM ZAJ . Lorsque cela a été possible, les résultats concernant les 3 IgM , pour une fraction donnée , ont été regroupés dans un même tableau . De plus une analyse

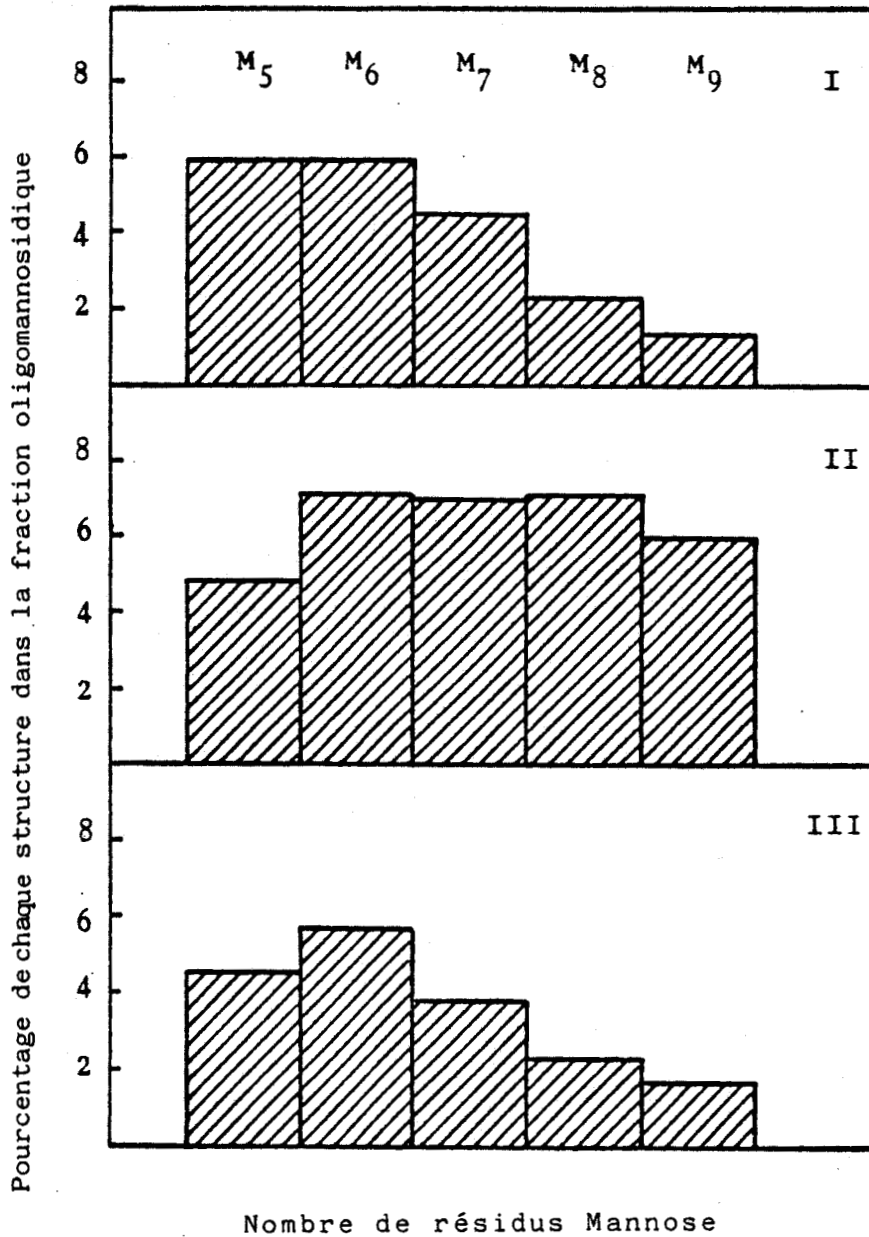


Figure 32 : *Histogrammes de fréquence des structures oligomannosidiques isolées des*
- *IgM normales (I);*
- *IgM-7 (II);*
- *IgM-10 (III).*

en RMN a été effectuée sur les sous-fractions les plus représentatives des IgM pathologiques :

- la sous-fraction B-MS(25 %) de la fraction biantennée (B), pour l'IgM-7 (ZAJ),
- la sous-fraction A-MS(42,3 %) de la fraction plus complexe (A), pour l'IgM-10 (GRA) .

Les résultats obtenus par RMN à 500 MHz font l'objet de l'article N° 5 p. 217 .

PRIMARY STRUCTURE OF THE MAJOR GLYCANS OF THE N-ACETYLLACTOSAMINE
TYPE DERIVED FROM THE HUMAN IMMUNOGLOBULINS M FROM TWO
PATIENTS WITH WALDENSTROM'S MACROGLOBULINEMIA

A. Cahour,^{*+} P. Debeire^{**}, L. Hartmann,^{*} J. Montreuil^{**}, H. Van
Halbeek^{***} and J.F.G. Vliegthart^{***}.

- * Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Chimie
Clinique et Biologie Moléculaire (U. 202 INSERM and ERA
CNRS n° 696), 15, rue de l'Ecole de Médecine, F-75270
Paris Cedex 06, France,
- ** Université des Sciences et Techniques de Lille I, Labo-
ratoire de Chimie Biologique (LA CNRS n° 217), F-59655
Villeneuve d'Ascq Cedex, France,
- *** Department of Bio-Organic Chemistry, University of Utrecht,
Croesestraat 79, NL-3522 AD Utrecht, The Netherlands.

The carbohydrate chains of the pathological human im-
munoglobulins M from two patients with Waldenström's macro-
globulinemia were released by hydrazinolysis. The N-acetyl-
lactosamine-type glycans were obtained by affinity chroma-
tography on Concanavalin A and fractionated by high-voltage
paper electrophoresis. The primary structure of the major
compounds was elucidated on the basis of carbohydrate ana-
lysis, methylation analysis, including mass-spectrometry,
and 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy. For both patients, this
appeared to be a monosialyl monofucosyl biantennary struc-
ture; the compounds differed by the presence of an intersecting
N-acetylglucosamine residue.

Key words : Immunoglobulin M, Waldenström's macroglobulinemia,
N-glycosidic glycans, 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy.

*+To whom correspondence should be addressed.

1. Introduction

Immunoglobulins M (IgMs) are glycoproteins that have a relatively high (7-15%) carbohydrate content and show a large chemical heterogeneity of the oligosaccharides conjugated to the heavy chains. In a recent study (1) an illustration of such a heterogeneity has been given : oligosaccharides derived from normal as well as from pathological human IgMs could be fractionated by affinity-chromatography into N-acetyllactosamine-type and oligomannoside-type carbohydrate chains.

The structure of the oligosaccharides of immunoglobulins M has been investigated for more than a decade. Meanwhile, their oligomannoside-type structures are rather well established (2-5); however, as to the N-acetyllactosamine type, so far only a structure of the biantennary type was found, either fucosylated (6) or non-fucosylated; the latter forms part of e.g the J-chain of a pathological human IgM (7). In addition, for mouse plasmocytoma IgM a glycan of the triantennary type was described (8).

Here we report the primary structure of each of the major glycans of the N-acetyllactosamine type, derived from two pathological human IgMs. The structural studies involved hydrazinolysis, followed by determination of carbohydrate composition, methylation analysis including mass-spectrometry, and 500-MHz ^1H -NMR spectroscopy.

2. Materials and methods

Pathological human IgMs were prepared from plasmaphereses of patients (ZAJ) and (GRA) with Waldenström's macroglobulinemia as described (9) i.e. IgM(ZAJ) by cryoprecipitation and IgM(GRA) by euglobulin precipitation. NaB^3H_4 -reduced oligosaccharides obtained from the native molecules by hydrazinolysis and subsequent reduction, were separated by affinity chromatography on a Con A column. The glycans were characterized previously (1), with respect to their binding capacity with Con A (10), as oligomannoside-type and N-acetyllactosamine-type chains. The major fractions

of the latter type of IgM(ZAJ) (41%) and of IgM(GRA) (58%) were further subfractionated by high-voltage electrophoresis on Whatman 3MM paper in the buffer : pyridine-acetic-acid-water (18:6:2320, by vol.; pH 5.4) at 75 V/cm for 3 h at 4°C. Radioactive strips were cut and eluted with water. Standards used were asialyl (N), monosialyl (MS) and disialyl (DS) biantennary structures (11,12) obtained from human serum transferrin by hydrazinolysis.

Molar ratios of monosaccharides were determined after methanolysis and trifluoroacetylation by gas-liquid chromatography (13). Exhaustive methylation of reduced oligosaccharides was carried out according to Finne et al. (14). The methylglycosides obtained by methanolysis of permethylated oligosaccharides were peracetylated and identified by gas-liquid chromatography coupled to mass-spectrometry, as described by Fournet et al. (15).

For NMR analysis, the reduced oligosaccharide fractions were repeatedly treated with D₂O at pD \approx 7 and room temperature. After each exchange treatment, the materials were lyophilized. Finally, each sample was dissolved in 400 μ l D₂O (99.96 atom % D, Aldrich). 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy was performed on a Bruker WM-500 spectrometer (SON hf-NMR facility, Department of Biophysical Chemistry, Nijmegen University, The Netherlands), operating under control of an Aspect-2000 computer. Experimental details have been described (16). The probe temperature was kept at 27 (\pm 0.1)°C. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS), but were actually measured by reference to internal acetone (δ 2.225 in D₂O at 27°C), with an accuracy of 0.002 ppm.

3. Results and discussion

3.1. Separation of N-acetyllactosamine-type glycans by high-voltage electrophoresis

Reduced oligosaccharides obtained from the two pathological IgMs (ZAJ and GRA) were fractionated by affinity chromatography

on a Con A column (10) into biantennary N-acetyllactosamine-type structures exhibiting a weak affinity for Con A and more complex structures having no affinity for Con A. Each of these fractions was submitted to high-voltage paper electrophoresis, affording 3 subfractions (fig. 1). The latter comigrated with the reference compounds, namely, the neutral (N), monosialyl (MS) and disialyl (DS) oligosaccharides. For IgM (ZAJ), proportions of these sub-fractions were found to be : N : 23%, MS : 61% and DS : 16%, and for IgM(GRA) they were N : 15%, MS : 73% and DS : 12%.

These fractions appeared homogeneous by thin-layer chromatography (TLC) on Silica gel for IgM(ZAJ), but heterogeneous for IgM(GRA).

3.2. Primary structure determination

The primary structure of the major fractions MS obtained from IgMs(ZAJ) and (GRA) was established on the basis of sugar composition (table 1), the results of methylation analysis (table 2) and 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy.

500-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded of neutral D_2O -solutions of the fractions MS obtained from IgM(ZAJ) and IgM(GRA). The spectrum of the latter is depicted in fig.2. The chemical shifts of the structural-reporter groups for both fractions have been compiled in table 3.

The $^1\text{H-NMR}$ data for the IgM(ZAJ) preparation point to the presence of a monosialyl biantennary oligosaccharide-alditol of the N-acetyllactosamine type. The reasoning is as follows. The reduced $\text{GlcNAc-}\underline{\underline{1}}$ lacks an anomeric proton signal, but instead it has its H-2 signal as structural-reporter group at δ 4.220, among the Man H-2 signals. The N-acetyl singlet at δ 2.057 is ascribed to this $\text{GlcNAc-}\underline{\underline{01}}$ residue (cf. (18-20)). H-1 and the NAc methyl protons of $\text{GlcNAc-}\underline{\underline{2}}$, β (1 \rightarrow 4) linked to $\text{GlcNAc-}\underline{\underline{1-01}}$, were found to resonate at δ 4.714 and δ 2.088, respectively (see table 3). The deviations of these values from those reported previously, namely, δ H-1 4.637 and δ NAc 2.076 (18,19), are attributed to the presence of Fuc in α (1 \rightarrow 6)-linkage to $\text{GlcNAc-}\underline{\underline{1-01}}$.

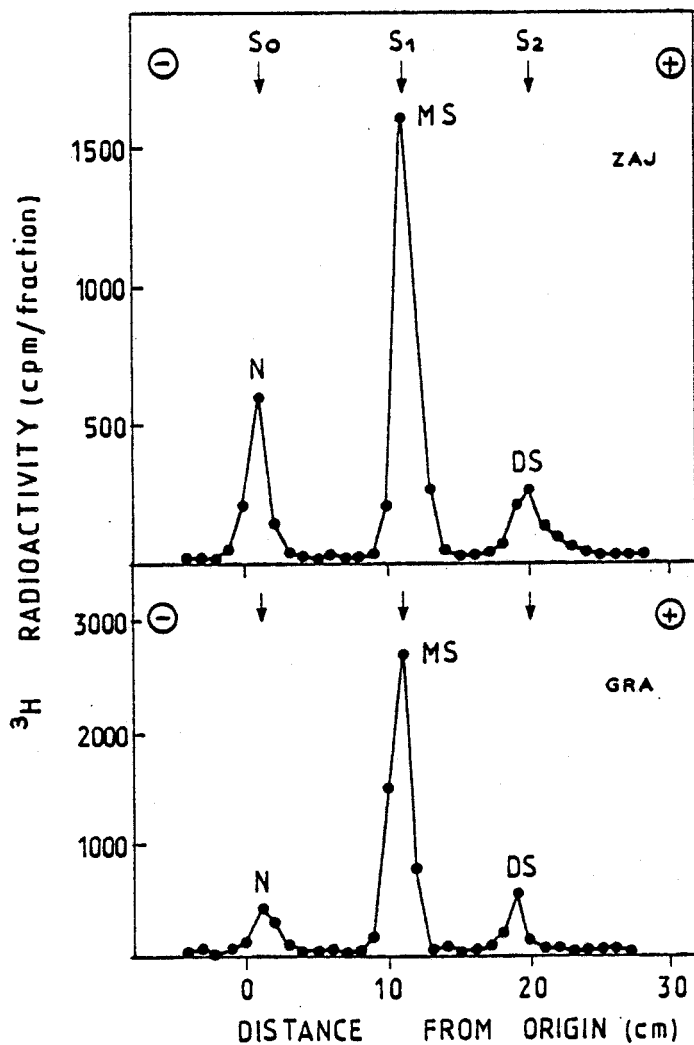


Fig. 1. Radioelectropherogram of the NaB^3H_4 -reduced oligosaccharides derived from IgM(ZAJ) and from IgM(GRA) by hydrazinolysis (for details, see section 3.1.). (N) refers to neutral, (MS) to monosialyl and (DS) to disialyl oligosaccharide fractions, respectively. The arrows indicate the position of the following standards : asialylated (S_0), monosialylated (S_1) and disialylated (S_2) biantennary glycans from human serum transferrin.

Table 1. Molar carbohydrate composition of fractions (MS) obtained by high-voltage electrophoresis from IgM (ZAJ) and IgM (GRA).

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

| Monosaccharide | IgM (ZAJ) | IgM (GRA) |
|----------------|-----------|-----------|
| Fuc | 1.20 | 0.74 |
| Gal | 1.90 | 2.00 |
| Man | 3.00 | 3.00 |
| GlcNAc | 2.80 | 4.00 |
| GlcNAcitol | 0.73 | 0.53 |
| Neu Ac | 0.79 | 0.64 |

Table 2. Molar ratios of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of the permethylated major fractions MS isolated from IgM(ZAJ) and IgM(GRA).

The molar ratios were calculated on the basis of 1 residue of (2,3,4)-Me₃-Gal. (= 2,3,4-tri-O-methyl galactose)..

| Monosaccharide methyl ethers | Fraction MS | Fraction MS |
|---|---------------|---------------|
| | from IgM(ZAJ) | from IgM(GRA) |
| (2,3,4)-Me ₃ -Fuc | 0.5 | 0.4 |
| (2,3,4,6)-Me ₄ -Gal | 0.7 | 0.7 |
| (2,3,4)-Me ₃ -Gal | <u>1.0</u> | <u>1.0</u> |
| (3,4,6)-Me ₃ -Man | 1.5 | 2.2 |
| (3,6)-Me ₂ -Man | — | 0.0* |
| (3,4)-Me ₂ -Man | — | 0.1 |
| (2,4)-Me ₂ -Man | 0.8 | 0.1 |
| (2)-Me ₁ -Man | — | 0.9 |
| (1,3,5)-Me ₃ -GlcN(Me)Acitol | 0.5 | 0.4 |
| (3,4,6)-Me ₃ -GlcN(Me)Ac | — | 0.9 |
| (3,6)-Me ₂ -GlcN(Me)Ac | 2.2 | 2.6 |
| (4,7,8,9)-Me ₄ -Neu(Me)Ac | 0.7 | 0.5 |

* Traces, no determined.

Table 3. ^1H Chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for the monosialylated oligosaccharide-alditols obtained from IgM of patients ZAJ and GRA.

| Reporter group | Residue ^(a) | Chemical shift ^(b,c) in | |
|-----------------|------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | | IgM (ZAJ) | IgM (GRA) |
| | | | |
| H-1 | GlcNAc-2 | 4.714 | 4.716 |
| | Man-3 | 4.76 | 4.705 |
| | Man-4 | 5.136 | 5.077 |
| | Man-4' | 4.924 | 5.005 |
| | GlcNAc-5 | 4.605 | 4.617 |
| | GlcNAc-5' | 4.581 | 4.576 |
| | Gal-6 | 4.445 | 4.444 |
| | Gal-6' | 4.470 | 4.476 |
| | GlcNAc-9 | - | 4.467 |
| | Fuc | 4.896 | 4.904 |
| H-2 | GlcNAc-1-ol | 4.220 | 4.214 |
| | Man-3 | 4.258 | 4.187 |
| | Man-4 | 4.197 | 4.260 |
| | Man-4' | 4.110 | 4.142 |
| H-3ax | NeuAc | 1.720 | 1.722 |
| H-3eq | NeuAc | 2.668 | 2.673 |
| H-5 | Fuc | 4.071 | 4.068 |
| CH ₃ | Fuc | 1.224 | 1.224 ^(d) |
| NAc | GlcNAc-1-ol | 2.057 | 2.055 |
| | GlcNAc-2 | 2.088 | 2.092 |
| | GlcNAc-5 | 2.071 | 2.081 |
| | GlcNAc-5' | 2.048 | 2.042 |
| | GlcNAc-9 | - | 2.066 |
| | NeuAc | 2.031 | 2.031 |

(a) For numbering of monosaccharide residues and complete structures, see Figs. 2 and 3.

(b) Chemical shifts are given for neutral solutions at 27°C, in ppm downfield from internal DSS in D₂O.

(c) Compounds are represented by schematic structures (cf. [16]); ● = GlcNAc; ◀ = Man; ■ = Gal; □ = Fuc and ○ = NeuAc.

(d) A doubling of this doublet (δ 1.224 and 1.220) was observed upon resolution-enhancement of the spectrum. So far this feature could not be explained.

The 4,6-disubstitution of GlcNAc-ol is evident from the results of methylation analysis (table 2). Fuc being linked to C-6 is further substantiated by the magnitude of the downfield shifts of H-1 and NAc of GlcNAc-2 as compared to afucosyl structures (for H-1, $\Delta\delta \sim 0.08$ ppm; for NAc, $\Delta\delta = 0.012$ ppm, c.f. (16)). The coupling constant $J_{1,2}$ for Fuc, being 3.8 Hz, indicates the α -anomeric configuration of this linkage. The set of chemical shift values for the Fuc reporter groups, that are, H-1, H-5 and CH₃, are considerably altered due to the presence of GlcNAc-ol instead of GlcNAc $\beta(1 \rightarrow N)$ -Asn (compare table 3 with (16)). The remaining set of chemical shift values listed for IgM(ZAJ) in table 3, shows a very close resemblance with those reported for a corresponding glycopeptide and reducing oligosaccharide (compounds 31 and 27, (16)). This defines the type of branching to the biantennary, and the NeuAc residue to be $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -linked to Gal-6 rather than to Gal-6' (16).

On the basis of similar features in the spectra obtained from IgM (GRA) (see fig.2) and IgM(ZAJ), the presence of the $(\rightarrow 4)\text{GlcNAc } \beta(1 \rightarrow 4) [\text{Fuc } \alpha(1 \rightarrow 6)]\text{-GlcNAc-ol}$ moiety is concluded. The typical set of Man H-1 and H-2 chemical shifts for IgM(GRA) (see table 3) point to the intersected biantennary type of branching, as was observed before (16,21-23). The typical parameters of the intersecting GlcNAc-9 residue, namely, its H-1 signal at $\delta 4.467$ ($J_{1,2}$ 8.0 Hz), and its NAc singlet at $\delta 2.066$, are not influenced by the reduced nature of GlcNAc-1. As with IgM(ZAJ), the sialic acid residue could readily be located by NMR in $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -linkage to Gal-6 in the $(1 \rightarrow 3)$ -linked branch, because of the specific influences on the chemical shifts of H-1 of Man-4 and Gal-6, and of NAc of GlcNAc-5, as compared to the corresponding asialylated structure (16,21).

The structures of the glycans present in fractions MS from IgM(ZAJ) and IgM(GRA), as deduced by ¹H-NMR spectroscopy in combination with sugar and methylation analyses, are presented in fig.3. In addition, it should be noted

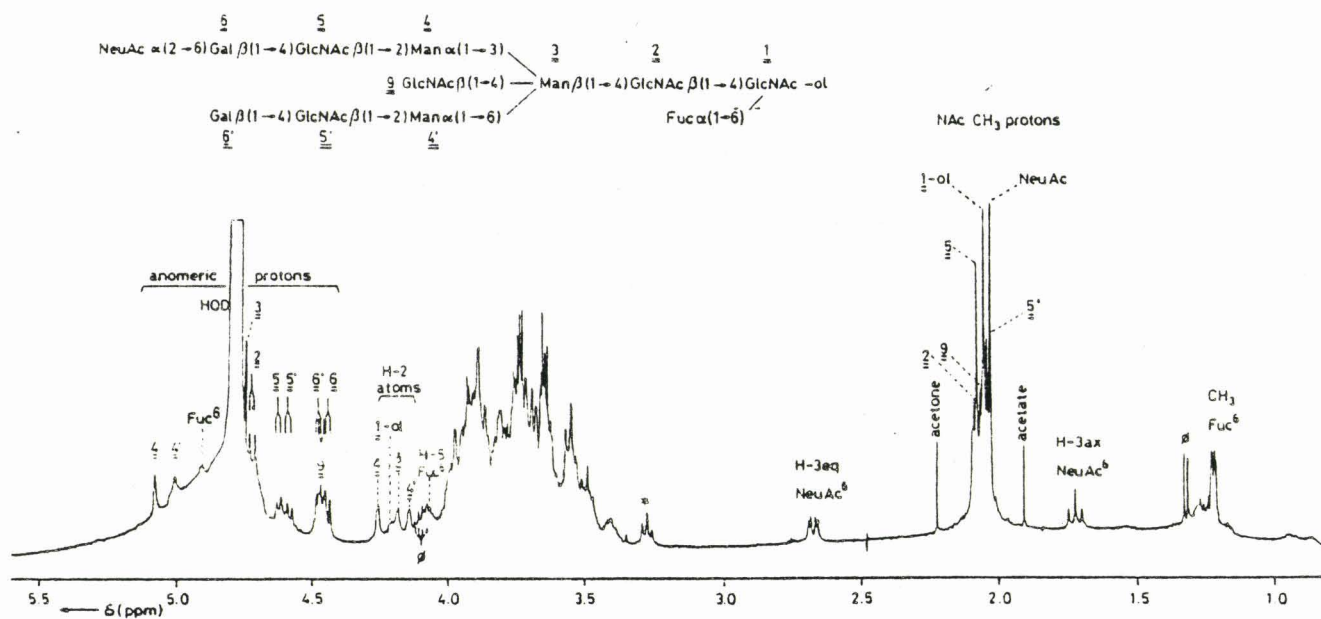


Fig. 2. 500-MHz ¹H-NMR spectrum (D₂O; pD 7; 27°C) of the monosialyl reduced-oligosaccharide fraction obtained from IgM(GRA). The numbers in the spectrum refer to the corresponding residues in the structure. The appearance of the asterisk-marked doublet-of-doublets at δ 3.27, clearly apart from the bulk of skeleton-proton signals, has been proposed (17) to be correlated with the presence of GlcNAc-9 in the structure. So far, this signal could not be assigned unambiguously.

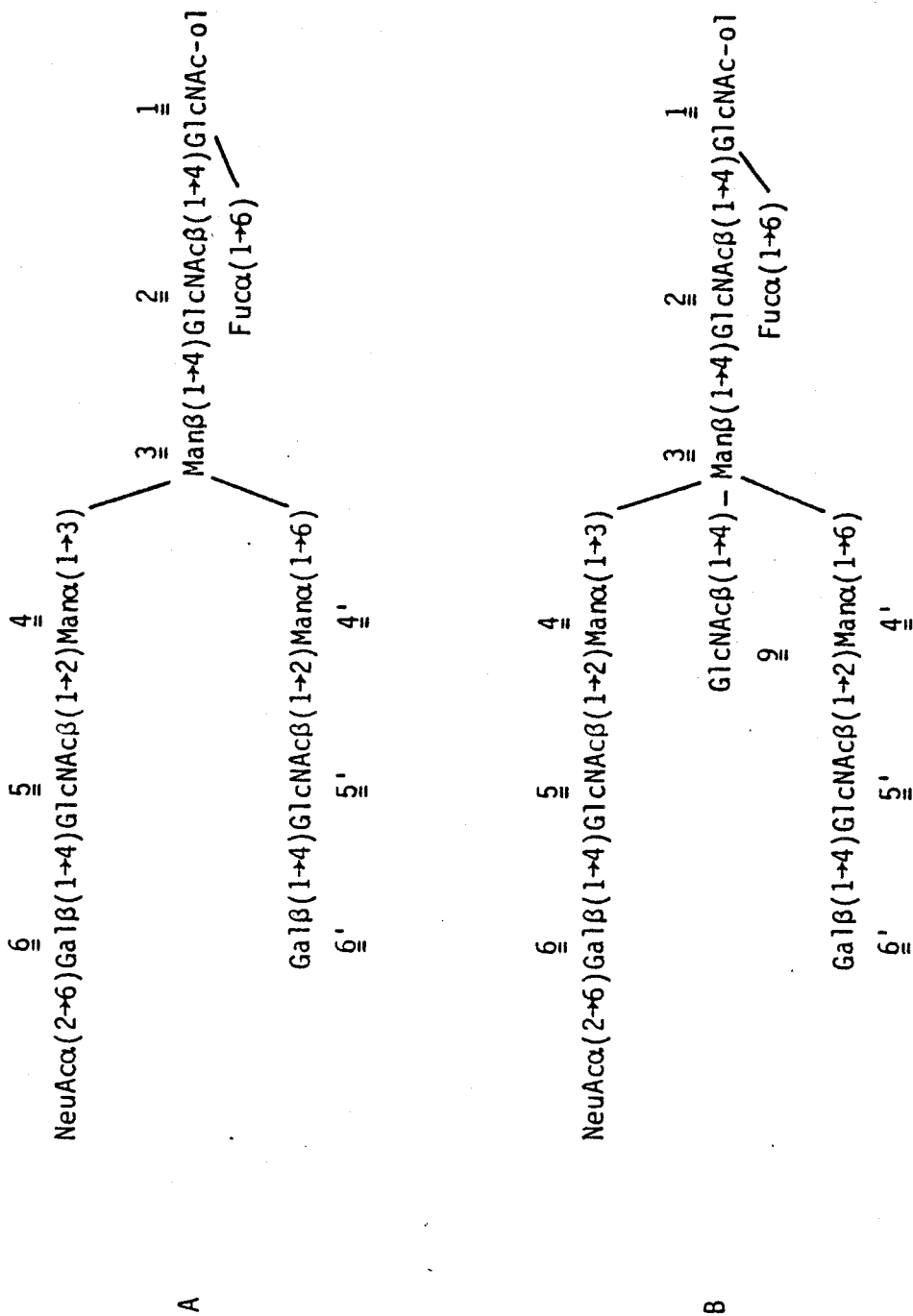


Fig. 3. Primary structures of the major *N*-acetylactosamine-type glycans isolated from IgM(ZAJ) (A) and IgM(GRA) (B), respectively.

that for IgM(GRA), methylation results, in particular the finding of (3,6)-Me₂-Man and (3,4) -Me₂-Man (see table 2), suggested tri- and/or tetraantennary oligosaccharides to occur also in fraction MS, besides the major, intersected biantennary glycan. This is consistent with the fact that this fraction does not react with Con A, and may account for the heterogeneity observed by TLC. Such tri- and/or tetraantennary structures were not detected by NMR spectroscopy, probably due to the low content (10%) of that type of glycans. The percentage can be derived from the ratio of (3,4)-Me₂-Man to (2)-Me₁-Man, being 0.1 to 0.9.

4. Conclusions

The primary structures proposed for the major N-acetylglucosamine-type glycans from pathological IgM(ZAJ) and IgM(GRA) are given in fig. 3. They differ with respect to the intersecting GlcNAc residue. The biantennary type of structure has already been described for human IgM(6,7), and for numerous other glycoproteins (24). The intersected structure has so far been found only in a limited number of glycoproteins e.g. in glycophorin A (25), but mainly in immunoglobulins like human serum IgG (26,27), IgA (28), IgD (29,30) and sIgA (23), but neither in human IgM nor in mouse plasmocytoma IgM.

With respect to the ¹H-NMR features of the compounds, it can be concluded that modification of GlcNAc-1 does not affect the chemical shifts of reporter group signals of residues which are more remote from GlcNAc-1 than the adjacent residues GlcNAc-2 and Fuc. This is in accordance with earlier observations (18,19). The library of reference data compiled for glycopeptides and reducing oligosaccharides ending in GlcNAc-2 (16) retains its validity, also for reduced oligosaccharides ending in GlcNAc-1-ol. It should be emphasized that well-defined oligosaccharide-alditols prepared by reduction of GlcNAc-1 after having accomplished

the release of the oligosaccharide by hydrazinolysis, have to be preferred for structural analysis far above the weakly defined products upon omitting the reduction step (22,31).

The intersecting GlcNAc residue is known to exert a pronounced influence on the conformation and, by consequence, on the biosynthesis of a biantennary oligosaccharide chain (16,32). It remains to be a challenge to find out whether the presence of this intersecting GlcNAc in the carbohydrate chains of pathological IgM is somehow correlated with the clinical features of the patient.

Acknowledgements

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (LA 217 and ERA 696), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U.202), by the Fondation pour la Recherche Médicale by the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON/ZWO) and by the Netherlands Cancer Foundation (KWF), grant UUKC 83-13.

We thank Mr Y. Leroy (Lille) for technical assistance with methylation analysis, Dr J.H.G.M. Mutsaers (Utrecht) for assistance in recording the NMR-spectra, and Miss P.Marcon for typing the manuscript.

References

- (1) Cahour, A., Debeire, P., Hartmann, L. and Montreuil, J. (1983) *Biochem. J.* 211, 55-63.
- (2) Chapman, A. and Kornfeld, R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 816-823 and 824-828.
- (3) Cohen, R.E. and Ballou, C.E. (1980) *Biochemistry* 19, 4345-4358.
- (4) Jouanneau, J., Fournet, B. and Bourrillon, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 667, 277-284.

- (5) Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F.G., Jouanneau, J. and Bourrillon, R. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 886-892.
- (6) Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C.K. and Kornfeld, S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 2156-2163.
- (7) Baenziger, J.U. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4063-4071.
- (8) Brenckle, R. and Kornfeld, R. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 160-173.
- (9) Cahour, A., Ollier-Hartmann, M.P., Mihaesco, C. and Hartmann, L. (1981) *Biomedicine* 35, 133-136.
- (10) Debray, H., Pierce-Crétel, A., Spik, G. and Montreuil, J. (1983) in "Lectins" (T.C. Bøg-Hansen and G.A. Spengler, eds.) Vol. III, pp. 335-350, W. de Gruyter, Berlin/New York.
- (11) Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* 50, 296-299.
- (12) Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B.L., Vliegenthart, J.F.G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. and Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* 77, 15-20.
- (13) Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-301.
- (14) Finne, J., Krusius, T. and Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339.
- (15) Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502.
- (16) Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L. and Van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 209-374.
- (17) Carver, J.P. and Grey, A.A. (1981) *Biochemistry*, 20, 6607-6616.
- (18) Paz Parente, J., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Montreuil, J., Fournet, B., Van Halbeek, H., Dorland, L. and Vliegenthart, J.F.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13173-13176.

- (19) Paz Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., Van Halbeek, H., Dorland, L. and Vliegenthart, J.F.G. (1983) FEBS Lett. 152, 145-152.
- (20) Nakao, Y., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Yamashina, I., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 229, 43-54.
- (21) Michalski, J.-C., Strecker, G., Van Halbeek, H., Dorland, L. and Vliegenthart, J.F.G. (1982) Carbohydr. Res. 100, 351-363.
- (22) Bayard, B., Kerckaert, J.-P., Strecker, G., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1983) Eur. J. Biochem. 137, 319-323.
- (23) Pierce-Crétel, A., Debray, H., Montreuil, J., Spik, G., Van Halbeek, H., Mutsaers, J.H.G.M. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) Eur. J. Biochem. (in press).
- (24) Montreuil, J. (1982) Compr. Biochem. 19B, part II, 1-188.
- (25) Irimura, T., Tsuji, T., Tagami, S., Yamamoto, K. and Osawa, T. (1981) Biochemistry 20, 560-566.
- (26) Kornfeld, R., Keller, J., Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3259-3268.
- (27) Rademacher, T.W., Homans, S.W., Fernandes, D.L., Dwek, R.A., Mizuochi, T., Taniuchi, T. and Kobata, A. (1983) Biochem. Soc. Trans. II, 132-134.
- (28) Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7260-7269 and 7270-7281.
- (29) Ishihara, H. and Tejima, S. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 181-186.
- (30) Mellis, S.J. and Baenziger, J.U. (1983) J. Biol. Chem. 258, 11546-11556.
- (31) Debeire, P., Montreuil, J., Samor, B., Mazurier, C., Goudemand, M., Van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1983) FEBS Lett. 151, 22-26.
- (32) Schachter, H., Narasimhan, S., Gleeson, P. and Vella, G. (1983) Can. J. Biochem. Cell Biol. 61, 1049-1066.

L'hétérogénéité structurale observée pour les 3 IgM est la suivante :

1 - Fraction A : Les rapports molaires obtenus sont rassemblés dans le tableau X; p.234 .

a - Dérivés méthylés et péracétylés : Le Tableau XII ; p.235 réunit les rapports molaires des dérivés des monosaccharides détectés après méthanolise et péracétylation par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, dans la sous fraction majeure A-MS de chaque IgM. Les dérivés identifiés sont identiques dans les 3 IgM ; les plus significatifs sont :

- La perméthylglucosamine et le dérivé monosubstitué du mannose (v. les spectres : Fig.30 ; p.210) caractéristiques de la structure biantennée porteuse d'1 GlcNAc intercalaire liée en β -1,4 sur le Man 3 ;

- Les dérivés diméthylés en 3,6 et 3,4 du Man, caractéristiques de l'addition d'une troisième antenne en β '-1,4 sur le Man 4 ou en β -1,6 sur le Man 4' d'une structure biantennée.

Prenant en considération la coexistence de ces trois types structuraux dans chaque IgM, le galactose trisubstitué en 2, 3, 4 est le seul dérivé méthylé qui demeure constant ; il est donc pris comme base de calcul des rapports molaires.

Les compositions molaires varient d'IgM à l'autre et leur confrontation permet d'estimer les proportions des types structuraux pour 1 IgM donnée. (Tableau XIV ; p. 244 ; et Fig. 34 ; p.245). Il en résulte une prédominance dans la fraction A-MS de la structure biantennée munie d'1 GlcNAc intercalaire, et ceci dans les 3 IgM ; l'IgM-10 est la plus riche (90 % contre 80 % pour l'IgM-7, et 70 % pour les IgM normales). Les structures triantennées sont mineures (≤ 30 %) mais les deux possibilités de fixation de la 3^e antenne existent dans

les 3 IgM. Une prédominance de la structure triantennée en β -1,6 est notée pour les IgM pathologiques ; l'autre structure est au contraire majeure chez les IgM normales.

b - Présence éventuelle de structures très complexes : La présence éventuelle d'une structure tétraantennée est à considérer si l'on tient compte de l'hétérogénéité de la sous-fraction étudiée et de la présence simultanée des 2 dérivés diméthylés du mannose en 3,6 et en 3,4. La présence de structures plus complexes que la structure biantennée porteuse d'1 GlcNAc intercalaire telles que les structures tri- et tétra-antennées munies d'1 GlcNAc intercalaire doit aussi être envisagée. De telles structures ont déjà été décrites (Dorland *et al.*, 1979 ; Paz Parente *et al.*, 1982b ; Paz-Parente *et al.*, 1983). Cependant si elles existent dans les IgM étudiées elles sont minoritaires ; il est impossible d'en déterminer les proportions exactes d'après les rapports molaires obtenus en spectrométrie de masse. C'est pourquoi nous les associons aux structures triantennées dans les histogrammes de fréquence du bilan quantitatif établi pour les différents types structuraux présents dans chaque IgM (Fig.34 ; p.245). Ces glycanes "plus complexes" peuvent cependant être évalués dans la sous-fraction A-N de chaque IgM (Fig. 33 ; p.236) par comptage de la radioactivité de la bande dont la migration est la plus lente et équivalente à celle du témoin S₂ disialylé de la sérotransferrine. Leur représentativité dans la copule glucidique est faible puisqu'elle n'est estimée qu'à 4,4 % pour les IgM normales, à 1,6 % pour les IgM-7 et à 1 % pour les IgM-10. Les fractions A-MS et A-DS laissent envisager des taux encore plus faibles car après désialylation aucune radioactivité résiduelle n'est détectée par TLC au niveau du témoin S₂ (cf. Fig. 2 ; article n° 4 ; p.190 pour l'IgM-7).

TABLEAU X

DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE (^3H) ET COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DANS LES SOUS-FRACTIONS OBTENUES PAR ELECTROPHORESE A HAUT VOLTAGE DE LA FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE A OBTENUE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE Con A.

| Sous-fractions oligosaccharidiques (fraction A) | Electrophorèse à haut voltage | | Chromatographie en phase gazeuse (composition molaire) | | | | | |
|---|-------------------------------|----------------------|--|-----|--------------------|--------|------------|-------|
| | %/fraction ^(a) | %/IgM ^(b) | Fuc | Gal | Man ^(c) | GlcNAc | GlcNAcitol | NeuAc |
| <u>IgM normales</u> | | | | | | | | |
| A-N | 31 | 12,4 | 1,2 | 2,4 | 3,0 | 3,7 | 0,40 | - |
| A-MS | 44 | 17,6 | 0,86 | 2,0 | 3,0 | 3,2 | 0,41 | 0,66 |
| A-DS | 25 | 10 | 1,3 | 2,8 | 3,0 | 3,3 | 0,62 | 1,4 |
| <u>IgM-7 (ZAJ)</u> | | | | | | | | |
| A-N | 29 | 7,8 | 1,3 | 2,3 | 3,0 | 3,8 | 0,45 | - |
| A-MS | 57 | 15,4 | 1,0 | 1,8 | 3,0 | 3,4 | 0,52 | 0,47 |
| A-DS | 14 | 3,8 | 0,8 | 2,2 | 3,0 | 3,6 | 0,7 | 1,3 |
| <u>IgM-10 (GRA)</u> | | | | | | | | |
| A-N | 15 | 8,7 | 1,4 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 0,48 | - |
| A-MS | 73 | 42,3 | 0,74 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 0,53 | 0,64 |
| A-DS | 12 | 7 | 1,3 | 2,7 | 3,0 | 3,7 | 0,45 | 1,4 |

(a) Pourcentage de radioactivité relatif à la fraction A étudiée.

(b) Pourcentage de radioactivité relatif à la teneur globale en oligosaccharides de l'IgM.

(c) Les rapports molaires sont calculés sur la base de 3 résidus de mannose.

TABLEAU XII

COMPOSITION MOLLAIRE DES DERIVES METHYLES ET ACETYLES PRESENTS DANS LA SOUS-FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE MONOSIALYLEE (A-MS) OBTENUE PAR ELECTROPHORESE HAUTE TENSION DE LA FRACTION LA "PLUS COMPLEXE" (A).

| Nature des dérivés méthylés | Fractions A-MS | | |
|--|-----------------|-------------------|--------------------|
| | IgM normales | IgM pathologiques | |
| | | IgM-7 | IgM-10 |
| <u>Fucose</u> | | | |
| (2,3,4)-Me ₃ -Fuc | 0,4 | 0,5 | 0,4 |
| <u>Galactose</u> | | | |
| (2,3,4,6)-Me ₄ -Gal | 0,6 | 0,9 | 0,7 |
| (2,3,4)-Me ₃ Gal ^(a) | <u>1,0</u> | <u>1,0</u> | <u>1,0</u> |
| <u>Mannose</u> | | | |
| (3,4,6)-Me ₃ -Man | 1,6 | 1,7 | 2,2 |
| (3,6)-Me ₂ -Man | 0,2 | 0,1 | 0,0 ^(b) |
| (3,4)-Me ₂ -Man | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| (2,4)-Me ₂ -Man | 0,4 | 0,4 | 0,1 |
| (2)-Me ₁ -Man | 0,7 | 0,8 | 0,9 |
| <u>N-acétylglucosamine</u> | | | |
| (1,3,5)-Me ₃ -GlcN(Me)Acitol | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| (3,4,6)-Me ₃ -GlcN(Me)Ac | 0,7 | 0,9 | 0,0 |
| (3,6)-Me ₂ -GlcN(Me)Ac | 2,5 | 2,5 | 2,6 |
| <u>Acide N-acétylneuraminique</u> | | | |
| (4,7,8,9)-Me ₄ -Neu(Me)Ac | 0,5 | 0,6 | 0,5 |

(a) Les calculs sont effectués sur la base d'un résidu de (2,3,4)-Me₃-Gal.

(b) Traces non déterminées.

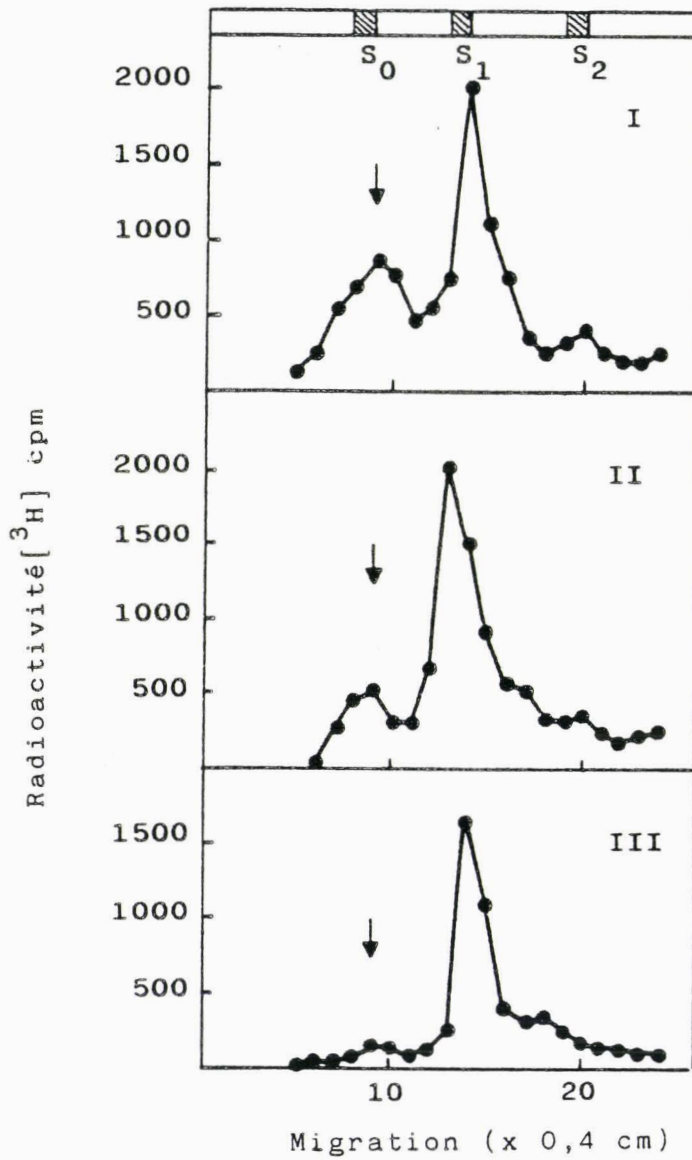


Figure 33 : Chromatographie sur couche mince de la fraction A - N pour les IgM:

- I → IgM normales;
- II → IgM-7;
- III → IgM-10.

Témoins de migration biantennés provenant de la sérotransferrine: neutre (S₀), monosialylé (S₁), disialylé (S₂);

(↓) : Fraction "très complexe" dans chaque population.

c - Action des exo-glycosidases : La dégradation récurrente d'une structure glycanique par l'action d'exo-glycosidases spécifiques est une opération laborieuse. Une première estimation des différentes liaisons contractées par les monosaccharides est effectuée en soumettant la structure à étudier à l'action d'un mélange enzymatique extrait de la souche bactérienne *Bacteriobifidum bifidum** (tampon citrate Na 0,1 M, phosphate Na 0,2 M pH 5,0) contenant les activités α -neuraminidase, β -galactosidase et N-acétyl- β -D-glucosaminidase. D'après ces résultats préliminaires le choix de l'ordre d'action des exo-glycosidases est fixé en tenant compte des structures déjà connues. En ce qui concerne les sous-fractions A-MS, donc les plus complexes, l'hydrolyse enzymatique s'est avérée incomplète : dans tous les cas le produit obtenu possédait une migration chromatographique sur papier inférieure à celle du composé attendu : Man (α 1-3) [Man (α 1-6)] Man (β 1-4) Glc N Ac (β 1-4) [Fuc (α 1-6)] GlcNAcitol

L'action successive de l' α -neuraminidase de *V. cholerae* et de la β -galactosidase de Jack bean* a libéré un produit de mobilité identique à celle du composé obtenu après action du mélange enzymatique bactérien. La dégradation de ce produit, et par conséquent sa migration, n'évoluaient pas après l'addition de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase de Jack bean (produit Sigma). Compte tenu des résultats de la méthylation suggérant la présence d'1 GlcNAc intercalaire, et les observations de Irimura *et al* (1981) concernant l'empêchement stérique de ce résidu

* Nous tenons à remercier le Prof.S.Bouquelet pour les dons du mélange enzymatique extrait de *B. bifidum*, de la β -galactosidase et de l' α -mannosidase de Jack bean .

à l'action de l'hexosaminidase, une concentration de l'enzyme (30 U/ml) a provoqué une hydrolyse effective de la structure jusqu'ici résistante. Dans une dernière étape l'action de l' α -mannosidase a libéré un produit co-migrant avec le témoin
 $\text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAcitol}$, confirmant la séquence: $\alpha \text{NeuAc} \rightarrow \beta \text{Gal} \rightarrow \beta \text{GlcNAc} \rightarrow \alpha \text{Man} \rightarrow \beta \text{Man}$.

Le protocole expérimental suivi pour les digestions enzymatiques est décrit dans l'article n° 4 ; p.185; les résultats concernant la migration des produits obtenus au cours des différentes étapes sont rassemblés dans la Fig. 3 ; article 4 ; p.193 ils correspondent à la sous-fraction A-MS de l'IgM-7 mais ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus pour la même sous-fraction de l'IgM-10 et des IgM normales.

Rappelons que la structure biantennée munie d'1 GlcNAc intercalaire a été confirmée par RMN dans la fraction A-MS de l'IgM-10 (article 5 ; p. 225)

2 - Fraction B : Dans tous les cas la fraction B est celle qui a offert le minimum de difficultés lors de nos investigations structurales. Les rapports molaires obtenus après méthanolyse (Tableau XI; p.240) et après méthylation (Tableau XIII; p.241), sont caractéristiques d'une structure biantennée. L'action de l' α -neuraminidase sur les sous-fractions B-MS et B-DS libérant le glycanne neutre B-N, prouve qu'il s'agit d'une structure unique dont la microhétérogénéité apparente est liée à la teneur en acide N-acétylneuraminique . La Fig. 4 ; article 4 ; p.196 résume cette dernière expérience dans le cas de l'IgM-7, mais les profils obtenus pour l'IgM-10 et les IgM normales sont semblables. Les sous-fractions

B-MS des 3 IgM n'ont opposé aucune résistance à l'action enzymatique du mélange extrait de la souche bactérienne *B. bifidum*, et l'utilisation des exo-glycosidases spécifiques a permis de confirmer la séquence des monosaccharides. Les détails techniques sont décrits dans l'article n° 4 ; p.185 et les résultats obtenus pour chaque IgM peuvent être assimilés à ceux concernant la fraction B-MS pour l'IgM-7 (Fig. 5 ; article 4 ; p.197).

Rappelons que la présence d'une structure biantennée monosialylée et monofucosylée, a été confirmée par RMN dans la fraction B-MS de l'IgM-7 (article 5 ; p.220)

3 - Fraction C : La fraction C de chaque IgM s'est révélée composée de structures oligomannosidiques contenant de 5 à 9 résidus de mannose, habituellement rencontrées dans les IgM pathologiques (v. revue bibliographique p.39). Ceci apporte une réponse négative à la question posée par Jouanneau *et al.* (1981) : la présence de structures oligomannosidiques est-elle associée uniquement au caractère pathologique de la molécule ?

Notre principal objectif concernant cette fraction était, dans un premier temps, de vérifier les différents stades de dégradation (il s'agit en fait d'une maturation) de ces structures par les 2 α -mannosidases tels qu'ils sont impliqués dans l'évolution générale de la glycosylation. Dans un deuxième temps nous espérons identifier des structures intermédiaires, voir même inusuelles ; à ce propos un exemple a été décrit dans une IgM pathologique (Miller, 1972) : il concerne une

TABLEAU XI

DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE (^3H) ET COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DANS LES SOUS-FRACTIONS OBTENUES PAR ELECTROPHORESE A HAUT VOLTAGE DE LA FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE B OBTENUE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE Con A.

| Sous-fractions oligosaccharidiques (fraction B) | Electrophorèse à haut voltage | | Chromatographie en phase gazeuse (composition molaire) | | | | | |
|---|-------------------------------|-----------|--|-----|---------|--------|------------|-------|
| | %/fraction (a) | %/IgM (b) | Fuc | Gal | Man (c) | GlcNAc | GlcNAcitol | NeuAc |
| <u>IgM normales</u> | | | | | | | | |
| B-N | 18 | 7,2 | 0,2 | 1,6 | 3,0 | 2,6 | 0,86 | - |
| B-MS | 54 | 21,6 | 0,6 | 2,0 | 3,0 | 3,0 | 0,90 | 0,64 |
| B-DS | 28 | 11,2 | 0,5 | 2,3 | 3,0 | 2,9 | 0,63 | 1,6 |
| <u>IgM-7 (ZAJ)</u> | | | | | | | | |
| B-N | 23 | 9,4 | 0,88 | 1,8 | 3,0 | 2,8 | 0,89 | - |
| B-MS | 61 | 25 | 1,2 | 1,9 | 3,0 | 2,8 | 0,73 | 0,79 |
| B-DS | 16 | 6,6 | 0,84 | 2,2 | 3,0 | 3,0 | 0,59 | 1,4 |
| <u>IgM-10 (GRA)</u> | | | | | | | | |
| B-N | 24 | 5,8 | 0,65 | 1,9 | 3,0 | 2,7 | 0,72 | - |
| B-MS | 61 | 14,6 | 0,96 | 2,3 | 3,0 | 2,9 | 0,58 | 0,48 |
| B-DS | 15 | 3,6 | 0,67 | 2,2 | 3,0 | 2,7 | 0,83 | 1,5 |

(a) Pourcentage de radioactivité relatif à la fraction B étudiée.

(b) Pourcentage de radioactivité relatif à la teneur globale en oligosaccharides de l'IgM.

(c) Les rapports molaires sont calculés sur la base de 3 résidus de mannose.

TABLEAU XIII

COMPOSITION MOLLAIRE DES DERIVES METHYLES ET ACETYLES PRESENTS DANS LA SOUS-FRACTION OLIGOSACCHARIDIQUE MONOSIALYLEE (B-MS) OBTENUE PAR ELECTROPHORESE HAUTE TENSION DE LA FRACTION BIAN-TENNEE (B).

| Nature des dérivés méthylés | Fraction B-MS | | |
|---|-----------------|-------------------|------------|
| | IgM normales | IgM pathologiques | |
| | | IgM-7 | IgM-10 |
| <u>Fucose</u> | | | |
| (2,3,4)-Me ₃ -Fuc | 0,3 | 0,5 | 0,5 |
| <u>Galactose</u> | | | |
| (2,3,4,6)-Me ₄ -Gal | 0,6 | 0,7 | 1,1 |
| (2,3,4)-Me ₃ -Gal* | <u>1,0</u> | <u>1,0</u> | <u>1,0</u> |
| <u>Mannose</u> | | | |
| (3,4,6)-Me ₃ -Man | 1,7 | 1,5 | 2,1 |
| (2,4)-Me ₂ -Man | 1,1 | 0,8 | 1,1 |
| <u>N-acétylglucosamine</u> | | | |
| (1,3,5)-Me ₃ -GlcN(Me)Acitol | 0,5 | 0,5 | 0,6 |
| (3,6)-Me ₂ -GlcN(Me)Ac | 2,5 | 2,2 | 2,7 |
| <u>Acide N-acétylneuraminique</u> | | | |
| (4,7,8,9)-Me ₄ -Neu(Me)Ac | 0,6 | 0,7 | 0,8 |

* Les calculs sont effectués sur la base d'un résidu de (2,3,4)-Me₃-Gal.

structure biantennée dont le noyau du point d'attache est privé de la GlcNAc 2.

Lors de nos travaux l'action de l' α -mannosidase de Jack bean s'est révélée efficace et complète sur tous les oligosaccharides traités. Il faut cependant préciser qu'une concentration de l'enzyme (15 U/ml) a été nécessaire (comme l'ont noté Li et Kornfeld en 1978) pour obtenir une libération des résidus Man au-delà de la structure (Man)₅(GlcNAc)₂, c'est-à-dire les 2 autres résidus liés en α -1,3 et en α -1,6 ; l'enzyme semble en effet plus spécifique des liaisons en α -1,2. Les différents types de liaison ont été contrôlés par perméthylation du mélange d'oligomannosides ; les éthers méthyliques obtenus pour les résidus Man et GlcNAc sont identiques à ceux rapportés pour la fraction C de l'IgM-7 (article n° 4 ; p.198) et confirment la présence exclusive de structures oligomannosidiques classiques. Nous n'avons donc pas poussé plus loin nos investigations structurales, d'autant plus que le produit obtenu après digestion complète par l' α -mannosidase co-migrerait avec le témoin Man Glc N Ac (β 1-4) Glc N Acitol par chromatographie sur papier ; cela signifie, par analogie avec les structures couramment décrites, que les structures étudiées possèdent toutes le trisaccharide mannodi-chitobiose. La présence de 2 résidus Glc N Ac avait déjà été déduite lors d'essais préliminaires effectués sur une fraction glycopeptidique de l'IgM-10 éluee d'une colonne de Con A par une molarité de 0,5 M en α -méthyl-D-glucoside, donc de nature oligomannosidique. L'action enzymatique de l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase B de *Basidiomyces* * selon

* Don du Dr O. Kol que nous tenons à remercier.

Bouquelet *et al.* (1980) et Kol (1983) a libéré 2 fractions :

-une fraction radioactive (acétylation au tritium de l'Asn du point d'attache), non retenue sur Con A et comigrant avec le témoin GlcNAc-Asn par chromatographie sur papier ;

-une autre fraction retenue sur Con A, éluee par l' α -méthyl-D-glucoside, correspondant à la partie oligomannosidique porteuse de la GlcNAc 2 .

CHAPITRE IV : ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES FAMILLES D'IGM

I - ASPECT STRUCTURAL

La distribution des différents groupes structuraux obtenue pour chaque IgM est rassemblée dans le Tableau XIV ; p.244 et représentée par des histogrammes de fréquence (Fig.34 ; p.245) .

1 - Aspect qualitatif: Un examen attentif de ce bilan structural fournit la conclusion principale de notre travail : les différences observées entre IgM normales et IgM pathologiques ne sont pas qualitatives mais plutôt quantitatives. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par de nombreuses autres équipes comme nous le verrons dans la discussion. Les formules des structures glycaniques communes aux 3 familles d'IgM, qui ont été proposées à la suite de nos investigations, sont décrites Fig. 6 ; article 4 ; p. 199 . Les précisions apportées par la RMN figurent p. 227 .

2 - Aspect quantitatif: Peut-on affirmer que certaines différences observées permettent de caractériser une famille d'IgM ? Des résultats rassemblés dans le Tableau XIV ; p. 244 et la Fig. 34 ; p. 245 il ressort que la structure majoritaire est du type :

- biantenné monosialylé, pour les IgM normales (21,6 %),

- biantenné monosialylé, pour l'IgM-7 (25 %),

- biantenné monosialylé, muni d'une GlcNAc intercalaire pour l'IgM-10 (36,4 %).

Une telle base de comparaison ne permet pas de distinguer les IgM normales de l'IgM pathologique à 7 % de monosaccharides. Il est nécessaire de se référer aux pourcentages relatifs des différentes familles structurales : oligomannosidique et N-acétyllactosaminiques (biantennées et plus complexes) obtenues par chromatographie d'affinité sur Con A (v. Tableau suivant). Les IgM normales sont considérées comme une population statistique, donc comme référence de base. L'IgM-7 possède autant de glycanes biantennés (B) que les IgM normales : ce n'est donc pas la structure biantennée, pourtant majoritaire dans cette IgM, qui la caractérise, mais sa teneur en structures oligomannosidiques (C) de 32 %. L'IgM pathologique contenant 10 % de glucides se distingue des 2 autres IgM par son taux élevé (58 %) de glycanes plus complexes ; la structure biantennée, porteuse d'une GlcNAc intercalaire, monosialylée et monofucosylée, en représente, en réalité, 38,1 %.

3 - Conclusions : Il ressort de cette étude comparative qu'aucune des 2 IgM pathologiques étudiées ne ressemble aux IgM normales, et qu'aucun rapprochement ne peut être fait, même entre IgM monoclonales. Les conclusions tirées confirment celles annoncées lors d'essais préliminaires (article 3 ; p.172) à savoir que les structures oligomannosidiques prédominent chez les IgM pathologiques les moins glycosylées alors que les IgM contenant le plus d'oligosaccharides sont enrichies en structures multiantennées. Bien que la structure majoritaire de l'IgM-10 soit loin d'être multiantennée, elle est considérée , par sa GlcNAc intercalaire, "très complexe" par rapport aux structures biantennées car elle n'interagit pas

TABEAU XIV

TABEAU COMPARATIF DE LA REPARTITION DES DIFFERENTS TYPES STRUCTURAUX DANS LES IGM NORMALES ET PATHOLOGIQUES

| IgM | Pourcentages | Structures oligomannosidiques | | | | | Structures biantennées | | | Structures très "complexes" | | | |
|-------------------|------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------|------|------|-----------------------------|-----|------|-----|
| | | 5 M | 6 M | 7 M | 8 M | 9 M | N | M | S | C(+) | N | M | S |
| IgM NORMALES | % Con A | 20 | | | | | 40 | | | 40 | | | |
| | % sous-fractions | 5,9 | 5,9 | 4,5 | 2,3 | 1,4 | 7,2 | 21,6 | 11,2 | 8 | 4,4 | 12,3 | 5,3 |
| IgM PATHOLOGIQUES | % Con A | 32 | | | | | 41 | | | 27 | | | |
| | % sous-fractions | 4,8 | 7,1 | 7,0 | 7,1 | 6,0 | 9,4 | 25 | 6,6 | 6,2 | 1,6 | 12,3 | 3,1 |
| IgM-10 | % Con A | 18 | | | | | 24 | | | 58 | | | |
| | % sous-fractions | 4,5 | 5,7 | 3,8 | 2,3 | 1,7 | 5,8 | 14,6 | 3,6 | 7,7 | 1,0 | 38,1 | 4,2 |

Abréviations : [GnGn(Gn)] : structure biantennée porteuse d'une GlcNAc intercalaire;

[GnGnGn] : structure triantennée;

C(+) : structures "très complexes."

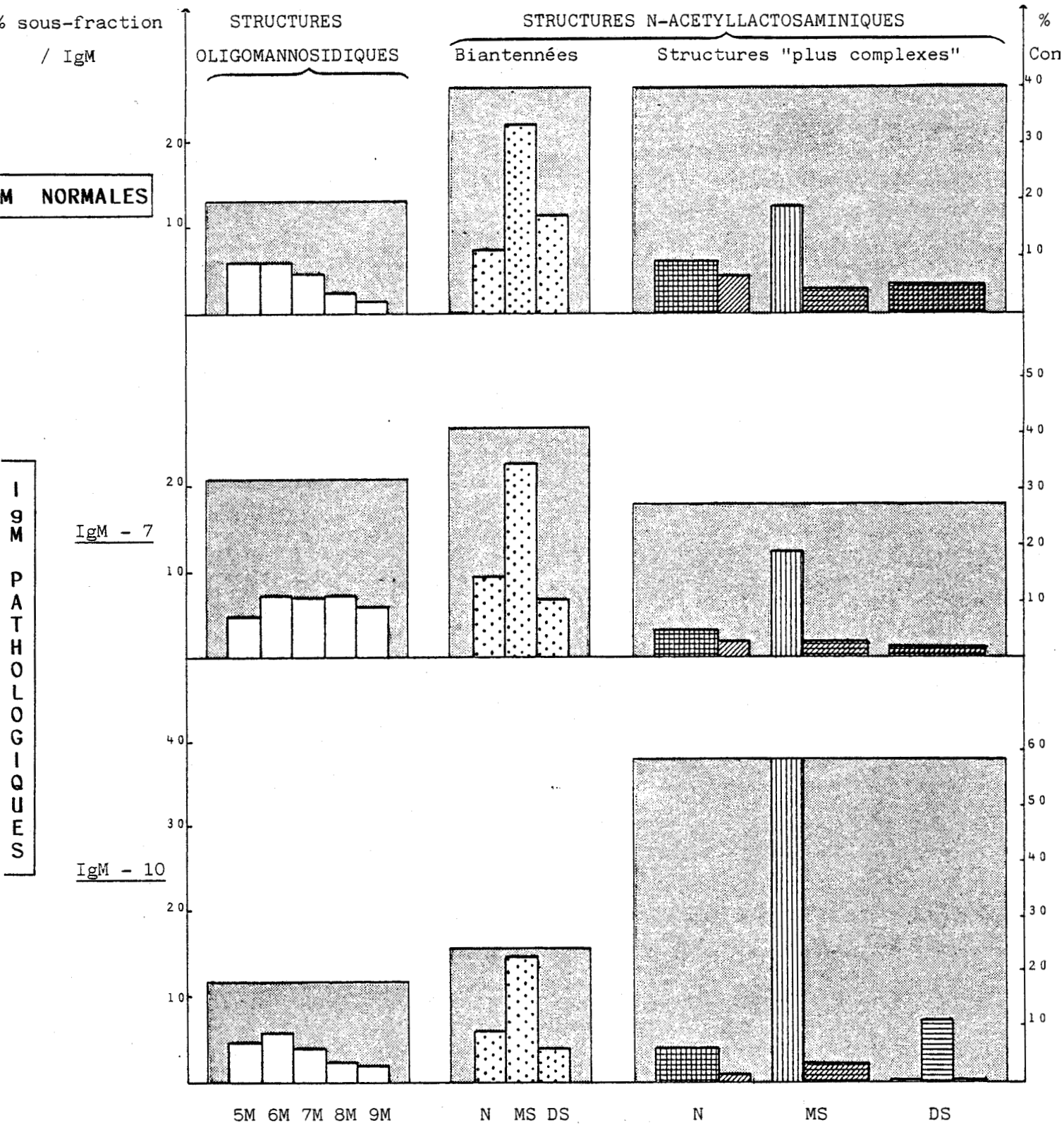


Figure 34 : Histogrammes des fréquences des différentes structures

(N) neutre, (MS) monosialylée (DS) disialylée;

□ Structures oligomannosidiques;

▨ Biantennées;

▩ Biantennées munies d'une GlcNAc intercalaire;

▧ Triantennées;

▦ "Plus complexes";

} Structures N-acétyllactosaminiques

avec la Con A (Narasimhan, 1982 ; Debray *et al*, 1983). Son comportement est à rapprocher de celui d'une structure triantennée (Brisson et Carver, 1983b)

Si nous raisonnons sur la notion réelle de structure pluriantennée, ce sont les IgM normales qui semblent les plus riches (4,4 % contre 1,6 % pour l'IgM-7 et 1 % pour l'IgM-10) dans la fraction neutre A-N ; le pourcentage est inférieur à 1 dans la fraction MS, et négligeable dans la fraction DS. De même les structures N-acétyllactosaminiques disialylées qui reflètent une biosynthèse plus achevée (les résidus Neu Ac sont fixés en fin de maturation des chaînes glycaniques), prédominent parmi les IgM normales.

II - INTERPRETATION DES DIFFERENCES OBSERVEES

Même si la fonction exacte des glucides n'est pas connue, de nombreux faits suggèrent que les possibilités de ramifications de certains oligosaccharides déterminent leur spécificité dans divers phénomènes de reconnaissance cellulaire (v. Généralités : rôle biologique des glycanes p. 79).

Les acides nucléiques et les polypeptides étant des structures linéaires, sont synthétisés selon un mécanisme unique ; les oligosaccharides présentant un aspect multibranché, parfois très complexe, ne peuvent supporter une telle restriction dans leur assemblage. L'obtention d'une telle complexité structurale nécessite l'action concertée de deux types de facteurs :

- des facteurs contrôlant la synthèse des glycoprotéines ;

- des facteurs déterminant la voie synthétique que doit suivre une chaîne glycanique en cours de maturation.

Avant d'aborder le problème de la régulation de la biosynthèse nous allons montrer que nos résultats, obtenus à partir d'IgM normales et pathologiques, n'échappent pas au phénomène non moins important d'hétérogénéité oligosaccharidique observée dans de nombreuses glycoprotéines.

A - HETEROGENEITE STRUCTURALE

1 - Hétérogénéité majeure : Elle concerne la présence simultanée dans les IgM des structures oligomannosidiques et complexes (ou N-acétyllactosaminiques). Elle n'est pas particulière aux IgM puisqu'elle a été observée aussi chez les IgD et chez les IgE (cf. p.33), mais aussi dans certaines glycoprotéines de sécrétion. Elle est plutôt caractéristique des glycoprotéines membranaires (Pollack et Atkinson, 1983). En ce qui concerne les structures N-acétyllactosaminiques l'hétérogénéité s'étend à leur mode de branchement bi-, tri-, et tétraantenné, ou encore plus complexe.

Dans la revue bibliographique concernant les structures glycaniques décrites dans des IgM humaines p. 36 nous concluons que les auteurs

ont le plus souvent observé la présence de 3 chaînes glycaniques complexes, N-acétyllactosaminiques (C-N), et de 2 chaînes oligomannosidiques (O) par chaîne H, ce qui donne un rapport C-N/O de 1,5. Ce rapport peut être calculé pour les trois IgM étudiées à partir des pourcentages obtenus pour chaque fraction glycanique par chromatographie d'affinité sur Con A. La radioactivité repérée correspondant à la Glc N Acitol, est proportionnelle au nombre de chaînes oligosaccharidiques (voir Tableau suivant) :

| Immunoglobulines | IgM normales | | | IgM pathologiques | | | | | |
|---------------------------|--------------|----|----|-------------------|----|----|--------|----|----|
| | | | | IgM-7 | | | IgM-10 | | |
| Fraction Con A | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| Pourcentage radioactivité | 40 | 40 | 20 | 27 | 41 | 32 | 58 | 24 | 18 |
| | 80 | | 20 | 68 | | 32 | 82 | | 18 |
| Rapport C-N/O | 4 | | | 2,1 | | | 4,6 | | |

C'est l'IgM pathologique à 7 % d'oligosaccharides qui possède le rapport le plus voisin (2,1) de celui relevé dans la littérature (1,5). Une interprétation de cette observation est suggérée : le rapport de 1,5 est obtenu uniquement à partir d'IgM pathologiques provenant de macroglobulinémie de Waldenström ; or l'IgM -7 appartient à la famille d'IgM pathologique la plus représentée (67 %) dans l'échantillonnage étudié. Les IgM normales servant de référence, les trois rapports C-N/O définissent un comportement inverse de chacune des IgM pathologiques vis à vis des IgM normales.

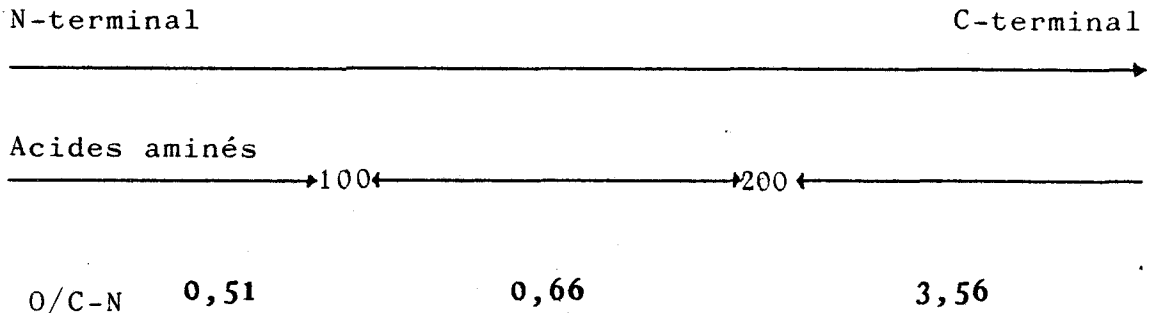
Une telle hétérogénéité de la partie glycanique des glycoprotéines a été observée depuis ces dernières années dans de nombreux cas et apparaît donc comme une réalité de la biosynthèse plutôt qu'un artéfact de préparation (Hatton *et al.*, 1983). Les glycoprotéines plasmatiques (l' α_1 -glycoprotéine acide, l'ovalbumine, la sérotransferrine...) ont été les plus étudiées car elles sont sécrétées donc facilement disponibles. Pour 5 sites de glycosylation l' α_1 -glycoprotéine offre 15 à 20 oligosaccharides différentes (Fournet *et al.*, 1978 ; Van Halbeek *et al.*, 1981c ; Yoshima *et al.*, 1981). Concernant l'ovalbumine une dizaine de glycannes différents a été identifiée pour 1 seul site de glycosylation (Atkinson *et al.*, 1981 ; Carver *et al.*, 1981). La sérotransferrine possède un minimum de 4 structures différentes pour 2 sites de fixation (Spik *et al.*, 1975 ; Dorland *et al.*, 1977 ; Metz-Boutigue *et al.*, 1980 ; März *et al.*, 1982 ; Mac-Gillivray *et al.*, 1983).

L'utilisation de différentes lectines immobilisées sur Sepharose s'est révélée très efficace dans le fractionnement par chromatographie d'affinité des glycannes liés N-glycosidiquement des glycoprotéines (Debray *et al.*, 1983). L'étendue de l'hétérogénéité structurale peut ainsi être déterminée mais son interprétation diffère selon les auteurs. Bayard et Kerckaert proposaient, en 1980, un arrangement uniforme des glycannes complexes sur les sites de glycosylation d'une chaîne polypeptidique. Pour de nombreuses glycoprotéines plasmatiques, au contraire, un arrangement mixte des structures glycaniques a été démontré.

Dans le cas d'une IgM de plasmocytome de Souris MOPC 104 E Anderson et Grimes (1982) ont étudié le degré d'hétérogénéité correspondant à chaque site de glycosylation. La chaîne H contient 5 sites de glycosylation localisés dans la partie constante ; les oligosaccharides sont tous liés N-glycosidiquement aux résidus Asn 171, 332, 364, 403 et 563. En combinant la fragmentation par le CN Br et l'interaction des différents fragments obtenus avec la Con A ils ont observé que les 4 premiers résidus sont occupés par des glycannes complexes de type bi- et triantennés alors que l'Asn 563 n'a fixé que des structures oligomannosidiques. Les principales structures ont été déterminées par la RMN à 500 MHz (Anderson *et al*, 1984) des types: biantenné en position 171, triantenné plus ou moins complets aux positions 332, 364 et 403, et oligomannosidique en position 365.

Ces derniers résultats complètent l'étude de Pollack et Atkinson (1983) effectuée sur une cinquantaine de glycoprotéines dont étaient connus la séquence en acides aminés, les sites de glycosylation, et le type de glycosylation de chacun de ces sites. Ils en ont déduit qu'il existait une dissymétrie de répartition des chaînes N-glycanniques sur la chaîne polypeptidique : la biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques serait plus complète du côté N-terminal où apparaissent plus fréquemment les oligosaccharides complexes. Parmi les résultats qu'ils ont relevés dans la littérature les 105 sites porteurs des structures complexes sont situés en moyenne au niveau de l'acide aminé 109 alors que les sites correspondants aux structures oligomannosidiques

sont localisés au niveau du résidu 224. Les auteurs ont délimité la chaîne polypeptidique en 3 zones et calculé les rapports moyens des pourcentages des structures oligomannosidiques/structures complexes dans ces 3 zones (v. schéma suivant) :



Plus un séquon est éloigné de l'extrémité N-terminale plus il a de chance de porter un glycanne de type oligomannosidique, ceci en étroite relation avec l'évolution de la synthèse protéique. Parmi les Ig contenant les 2 types de glycannes, oligomannosidiques et complexes (IgM, IgE et IgD), une distribution asymétrique identique à celle décrite précédemment a été observée pour les chaînes μ (v. revue générale p. 36) et pour les chaînes ϵ (Baenziger et Kornfeld, 1974 c,d). Exceptionnellement le fragment Fc d'une IgD humaine, porteur de 3 sites de glycosylation, possède les structures oligomannosidiques au site 68 et les structures complexes aux sites 159 et 210 (Mellis et Baenziger, 1983).

Personnellement nous n'avons pas fragmenté les chaînes H des IgM étudiées afin d'identifier la nature des oligosaccharides portés par chaque séquon ; notre but était essentiellement d'apprécier l'étendue de l'hétérogénéité structurale à l'intérieur d'une même IgM et entre populations. Nous venons de traiter la plus importante, sans pour autant ignorer l'existence d'une certaine microhétérogénéité.

2 - Hétérogénéité mineure : Cette hétérogénéité se traduit par des variations dans la teneur en résidus les plus externes (NeuAc et Fuc). Techniquement elle est facilement détectable. En ce qui concerne l'acide sialique une chromatographie sur couche mince en solvant rapide (v.p. 119) ou une électrophorèse à haut voltage en tampon acétate de pyridine, permet de séparer les structures neutres, mono et disialylées. Les structures fucosylées interagissent spécifiquement avec la lectine de lentille (*lens culinaris*) insolubilisée sur Sepharose (Debray et Montreuil, 1981), à condition qu'elles soient sous forme de glycopeptides et non d'oligosaccharides. Dans ce dernier cas les rapports molaires obtenus pour le fucose après méthanolyse et méthylation permettent cependant de définir la quantité et le mode de liaison du fucose.

Un déficit en l'un de ces deux résidus doit être interprété du point de vue métabolique, soit par une synthèse incomplète du glycanne, soit par un début de dégradation *in vivo*. Dans les structures composant les IgM que nous avons étudiées c'est surtout au niveau du NeuAc que cette microhétérogénéité est marquée.

3 - Signification biologique de l'hétérogénéité des glycannes : Quel que soit son caractère majeur ou mineur, elle semble avoir une importance biologique. Baenziger et Fiete (1980) ont démontré l'évolution différente des structures bi- et triantennées dans le système de capture hépatocytaire du Rat : les deux types de glycannes sont reconnus mais seules les structures triantennées exposant 3 résidus de Gal au lieu de 2 peuvent être endocytées. L'effet biologique peut être tout aussi important pour une variation mineure ; nous rappelons à ce propos l'observation de Stanley et Sudo (1981) sur la répercussion de la microhétérogénéité due à la perte d'un résidu Gal sur le phénomène de reconnaissance de structures oligosaccharidiques à la surface cellulaire. Ajoutons

l'importance de l'acide sialique sur le phénomène de sénescence de l'erythrocyte (Aminoff *et al.*, 1977). Atkinson *et al.* (1981) , à propos de microhétérogénéité fonctionnelle, insistent sur l'importance de la détection de subtiles différences structurales entre glycanes , la RMN à 500 MHz se révélant un outil de choix .

Une telle hétérogénéité dans la glycosylation des protéines dépend du système de régulation de la biosynthèse (voir le paragraphe suivant) . Ce qui demeure par contre , une inconnue , c'est la signification biologique d'une telle distribution asymétrique des oligosaccharides sur la chaîne polypeptidique . Le fait qu'elle soit observée dans la plupart des glycoprotéines suggère qu'elle est déterminante dans de nombreux phénomènes de reconnaissance auxquels participent les oligosaccharides (Pollack et Atkinson, 1983). Il pourrait y avoir un système de relai entre les deux types de structure .

Des travaux ultérieurs , annoncés par Anderson et Grimes (1982) devraient permettre d'avancer dans la compréhension de la glycosylation des protéines et son hétérogénéité . Ce seraient par exemple :

- l'étude des structures glycaniques aux mêmes sites de glycosylation d'une IgM intracellulaire et de l'IgM correspondante , intégrée à la membrane cellulaire ;
- l'étude des structures oligosaccharidiques d'IgM produites par des mutants d'une lignée cellulaire provoquant des altérations de la chaîne polypeptidique .

B - PROBLEMES POSES AU PLAN DE LA BIOSYNTHESE DES GLYCANNES

1 - Problèmes particuliers liés à la présence d'une GlcNAc intercalaire dans les structures biantennées : Le résultat principal

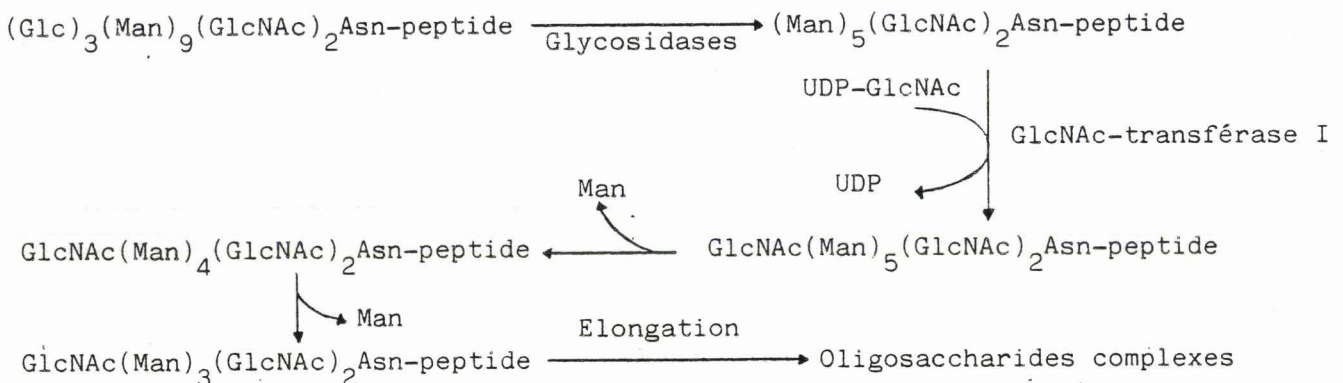
de nos investigations structurales est l'identification de la structure biantennée porteuse d'un résidu de GlcNAc lié en β -1,4 sur le β -mannose du noyau pentasaccharidique.

Ce glycanne a déjà été isolé d'Ig humaines diverses : IgA (Baenziger et Kornfeld, 1974b), IgG (Kornfeld *et al.*, 1971; Rademacher *et al.*, 1983), IgD (Ishihara et Teijima, 1983; Mellis et Baenziger, 1983) et IgA sécrétoires du lait de femme (Pierce-Créteil *et al.*, 1984), ainsi que d'autres glycoprotéines comme la glycophorine A (Yoshima *et al.*, 1980; Irimura *et al.*, 1981), l' α_1 -fetoprotéine de Rat (Bayard et Kerckaert, 1981), l'ovotransferrine de Poule (Dorland *et al.*, 1979), l'ovomucoïde (Paz Parente *et al.*, 1982 b; 1983) et l'ovalbumine de Poule (Tai *et al.*, 1977; Yamashita *et al.*, 1978)

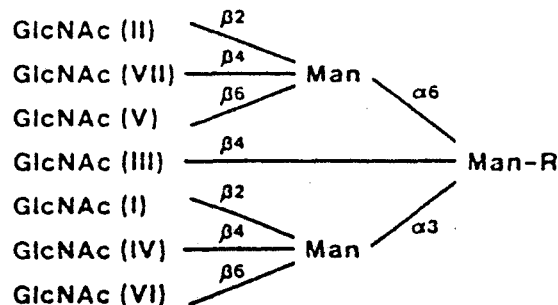
a - Les travaux de Schachter et Narasimhan.

La découverte de plus en plus fréquente de GlcNAc intercalaire depuis quelques années suggère son importance dans la biosynthèse des chaînes glycaniques. C'est ce qui a fait l'objet des recherches de l'équipe de Schachter, spécialisée dans l'étude de l'orientation de la synthèse glycoprotéique au niveau de l'appareil de Golgi; les glycosyltransférases sont impliquées car elles sont responsables de l'élongation d'un précurseur auparavant transformé par l'action de glycosidases, et de son évolution vers une structure complexe. Les travaux de ces auteurs fondés sur la spécificité étroite des glycosyltransférases, reposent sur une méthodologie très fine qui permet la résolution de glycopeptides différant d'un seul monosaccharide, par électrophorèse à haut voltage en tampon borate (Narasimhan *et al.*, 1980)

Le schéma suivant rappelle la séquence des évènements depuis la fixation du précurseur à teneur élevée en mannose, jusqu'à l'obtention d'un glycanne complexe.



La N-acétylglucosaminyltransférase I (Gn-T_I) permet la fixation de la première GlcNAc sur le Man lié en α -1,3 (Man 4) sur le β -Man (Man 3) et la Gn-T_{II} celle de la deuxième GlcNAc sur le Man lié en α -1,6 (Man 4') (Harpaz et Schachter, 1980 a,b) , celui-ci étant rendu libre par l'action des deux α -mannosidases golgiennes . L'équipe de Schachter, ainsi que Tabas et Kornfeld (1978) ont montré que ces deux dernières enzymes dépendent de l'action de la Gn-T_I ; leur substrat ne peut être que le glycopeptide: GlcNAc(Man)₅(GlcNAc)₂-Asn-peptide [Gn M₅-R] . En étudiant l'action des deux Gn-T_I et Gn-T_{II} Harpaz et Schachter (1980 b) ont mis en évidence un substrat porteur d'une GlcNAc intercalaire qui inhibe l'action des deux α -mannosidases golgiennes et donc l'action de la Gn-T_{II}. Ils ont postulé l'existence d'une autre GlcNAc-transférase responsable de l'apport de ce résidu GlcNAc supplémentaire et l'ont appelée Gn-T_{III} . En 1982, Narasimhan a mis en évidence un tel enzyme dans la membrane d'oviducte de Poule. L'année suivante , Gleeson et Schachter (1983) ont découvert dans le même matériau une quatrième GlcNAc-transférase (Gn-T_{IV}), capable d'initier la troisième antenne par incorporation d'un résidu GlcNAc en β -1,4 sur le Man 4, lui-même déjà porteur d'une GlcNAc liée en β -1,2 . D'autres enzymes doivent être responsables de la fixation des résidus GlcNAc initiant les structures tétra- et pentaantennées, mais il n'ont pas encore été isolés de systèmes membranaires . Schachter *et al.*, (1983) ont postulé qu'il pouvait exister 7 Gn-T différentes correspondant aux 7 possibilités de branchements sur les résidus Man du noyau pentasaccharidique (v.schéma suivant):



Narasimhan (1982), après avoir défini les spécificités de la Gn-T_{III} sur de nombreux substrats, a conclu que la structure biantennée possédant une GlcNAc intercalaire [Gn Gn(Gn)] jouait un rôle primordial dans le contrôle de la biosynthèse des glycanes complexes. Nous résumons ci-après les principales fonctions attribuées à cette structure (se référer à la Fig.35 ; p.257 pour les symboles et les différentes étapes):

1°) La GlcNAc intercalaire peut se fixer à 2 niveaux lors de la biosynthèse

- soit sur une structure à 5 Man [Gn M₅-R], entraînant la formation de glycanes hybrides ou mixtes ;
- soit sur une structure à 3 Man [M Gn], entraînant la formation de glycanes avec une GlcNAc intercalaire. Il n'a pas encore été démontré si deux enzymes différents (Gn-T_{III} et Gn-T_{III}' : selon Harpaz et Schachter, 1980 b), ou si le même enzyme (Gn-T_{III} : selon Narasimhan, 1982), intervient dans les deux réactions.

- Fixation de la GlcNAc intercalaire au niveau 5 Man : La Gn-T_{III} présente une affinité pour les deux substrats [M₅-R] et [Gn M₅-R], mais plus importante pour ce dernier, pouvant à elle seule expliquer la présence de structures mixtes observées dans certaines glycoprotéines telles que l'ovalbumine. En effet, une fois fixée en β-1,4 sur le β-Man, la GlcNAc intercalaire inhibe l'action de la Gn-T_I si celle-ci n'a pas encore agit, celle des 2 α-mannosidases résiduelles, et donc celle de la Gn-T_{II}. L'intervention de la Gn-T_{III} à ce stade limite donc les possibilités de synthèse.

- Fixation de la GlcNAc intercalaire au niveau 3 Man : La Gn-T_{III} présente une spécificité maximale pour le substrat trimannosidique porteur de deux résidus GlcNAc liés en β-1,2 sur les Man 4 et 4' [Gn Gn]; son activité est réduite de 85 % en absence de la GlcNAc liée en β-1,2 sur le Man 4' et de 93 % en absence des deux GlcNAc. De plus elle présente une affinité pour le substrat [M Gn(F)] dans

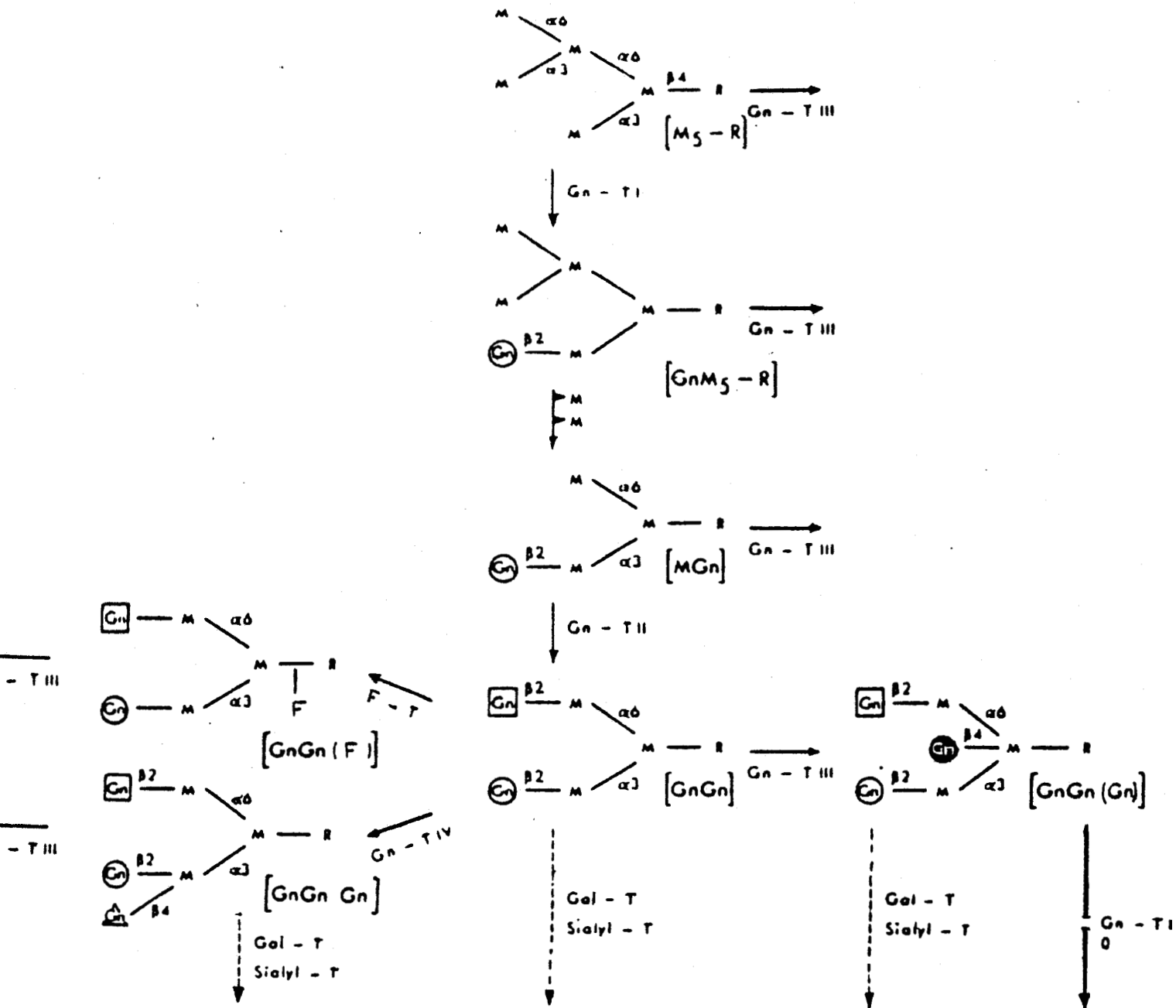


Figure 35 : Voies de synthèse des N-glycannes bi- et triantennés (selon Narasimhan, 1982)

(Réactions démontrées in vitro \longrightarrow ; hypothétiques $---\rightarrow$; réactions qui ne peuvent avoir lieu \dashrightarrow).

M, Man ; Gn, GlcNAc ; F, Fuc ; T, glycosyltransférase ; R, GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1)-Asn-X .

lequel le Fuc ,lié en α -1,6 sur la GlcNAc du point d'attache ,est normalement fixé après l'action de la Gn-T_I et avant même l'action des deux α -mannosidases . La Gn-T_{III} est de plus active sur le substrat [G Gn] et sur le substrat triantenné [Gn Gn Gn] possédant 3 GlcNAc terminales.

2°) La fixation de la GlcNAc intercalaire entraîne de profondes répercussions sur la conformation des glycanes:

- sa position de bissectrice par rapport aux 2 antennes principales d'une structure biantennée provoque des distorsions dans la structure tridimensionnelle de l'oligosaccharide (Brisson et Carver,1983 a): structure en "oiseau blessé" .

- une telle interférence spatiale empêche la reconnaissance de cette structure par la Con A (Debray et al.,1983);

-la présence de ce résidu GlcNAc supplémentaire produit des signaux caractéristiques en RMN à 500 MHz (Carver et Grey,1981; Vliegenthart et al.,1983); et voir article N° 5 ;p.225 .

3°) La présence de la GlcNAc intercalaire modifie l'efficacité d'action de certains enzymes: Brisson et Carver (1983 b) ont montré que la GlcNAc intercalaire recouvrait partiellement l'antenne GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3), provoquant donc un empêchement stérique l'action de nombreux enzymes tels que les deux α -mannosidases golgiennes ,l' α -fucosyltransférase en α -1,6 ,les Gn-T_{II} et Gn-T_{IV} (cette dernière étant responsable de la formation des glycanes triantennés). Par contre elle n'inhibe pas l'action des enzymes impliqués dans l'allongement des chaînes au-delà des résidus GlcNAc tels que la Gal-T et la Sialyl-T :leur site d'action,plus éloigné, n'est pas masqué .

4°) La GlcNAc intercalaire joue un rôle dans l'orientation de la biosynthèse: Elle intervient à différents

stades où des décisions importantes doivent être prises:

- par sa fixation au niveau d'une structure à 5 Man ou à 3 Man, entraînant son évolution vers un glycanne mixte

complexe ;

- par l'inhibition de Gn-transférases responsables de la formation de structures pluriantennées .

Concernant ce dernier point la Gn-T_{III} et la Gn-T_{IV} sont compétitives (Gleeson et Schachter, 1983) car leur spécificité concerne les mêmes substrats : [M Gn], [Gn Gn] et [GGn] ; la présence de deux résidus Gal sur une structure biantennée inhibe leur action. Il ressort de ces observations qu'un laps de temps très court est laissé à chaque enzyme pour agir avant l'autre, donc pour décider du sort du glycanne en cours de synthèse .

Notons cependant l'importance du substrat [Gn Gn] qui se situe à un carrefour de la glycosylation (v. Fig. 35; p. 257) car il est sollicité par l'action d'un minimum de 4 glycosyltransférases : les Gn-T_{IV} et/ou Gn-T_{III}, la Gal-T et la F-T .

b - Interprétation de nos résultats en fonction de ces données. La structure biantennée porteuse d'une GlcNAc intercalaire [Gn Gn(Gn)] n'est pas toujours d'origine pathologique (Strecker *et al.*, 1977; Michalski *et al.*, 1982); elle a été observée dans de nombreuses glycoprotéines normales (v. références p. 228). De même dans notre étude sur les IgM, bien qu'elle soit dominante dans l'IgM pathologique à 10 % de monosaccharides, elle existe aussi dans les IgM normales à un taux équivalent à celui de l'IgM pathologique à 7 % de monosaccharides; elle ne peut donc être utilisée comme critère du degré de pathologie dans nos recherches .

La structure que nous avons identifiée dans les IgM est le plus fréquemment monosialylée en α -2,6 sur le Gal 6 et monofucosylée en α -1,6 sur la GlcNAc 1 (v. Fig. 3 ; article 5 ; p. 227, les résultats obtenus en RMN); elle est d'autre part du type biantenné ce qui implique que la GlcNAc intercalaire s'est fixée sur une structure à 3 Man déjà fucosylée, du type [Gn Gn(F)]. Les autres glycosyltransférases telles que la Gal-T et la Sialyl-T ont ensuite

assuré la fin de la synthèse de la chaîne oligosaccharidique . L'action de la Gn-T_{III} à ce niveau est aussi confirmée par l'absence de structure hybride parmi la fraction A non retenue sur Con A. Nous ne pouvons cependant exclure, parmi les structures les "plus complexes" la présence éventuelle ,mais à l'état de traces ,de structures tri- et tétraantennées possédant une GlcNAc intercalaire ; ceci supposerait que les Gn-T responsables de la fixation des antennes supplémentaires ont agit avant la Gn-T_{III} . La détection,après méthylation , du dérivé (2,4)-Me₂-Man indique cependant la présence de structures complexes dépourvues d'une GlcNAc intercalaire .

2 - Problèmes généraux concernant la régulation de la glycosylation :

a - La régulation de la glycosylation . Nous l'avons vu dans le chapitre consacré à la biosynthèse (p. 62), l'élaboration des chaînes oligosaccharidiques dépend d'un système unique, combinant une structure protéique et un système enzymatique très sophistiqué, dont les principales étapes sont actuellement assez bien connues. L'association de ces nombreux évènements entraîne fréquemment l'obtention d'une grande complexité dans les structures glycaniques des glycoprotéines.

Comment peut s'expliquer une telle hétérogénéité alors que le nombre de structures de base est très restreint ? Les réactions enzymatiques conduisant à une structure donnée : sont parfaitement élucidées. Par contre les mécanismes de régulation (provenant de la structure protéique ou contenus dans l'information cellulaire) qui interagissent pour déterminer le type de structure devant être synthétisée sur un séquen donné, sont moins bien définis. En réalité, selon Atkinson *et al.* (1981) l'hétérogénéité structurale apparait au niveau du RER, après la fixation du précurseur commun : (Glc)₃(Man)₉(GlcNAc)₂ sur la chaîne peptidique, par l'action complémentaire de glycosidases (hydrolases) et

de glycosyltransférases (synthétases).

Nous avons déjà cité p.34 les conditions nécessaires à la glycosylation d'un site ; il existe d'autres facteurs qui déterminent la nature de la chaîne oligosaccharidique qui sera fixée sur ce site. Rappelons les travaux de Pollack et Atkinson (1983) qui affirment que la position du résidu Asn sur la chaîne polypeptidique détermine la nature complexe ou oligomannosidique du glycanne en cours de synthèse. Les résidus situés du côté C-terminal sont en principe occupés par des oligomannosides, mais la proximité de l'extrémité de la chaîne polypeptidique inhibe parfois leur glycosylation du fait de l'attachement de la partie peptidique à la membrane du reticulum (Glabe *et al.*, 1980 ; Lodish *et al.*, 1981). Ainsi Anderson et Grimes (1982) n'ont observé qu'un tiers des chaînes H de l'IgM de plasmocytome de Souris glycosylées sur l'Asn 563, située à 13 résidus de l'extrémité C-terminale.

Hsieh *et al.* (1983a) suggèrent que c'est au niveau de l'appareil de Golgi, c'est-à-dire dans une étape post-traductionnelle, que les enzymes de la glycosylation doivent distinguer les sites de glycosylation qui porteront l'un ou l'autre type de glycanne. Ils notent qu'en effet un site donné possède exclusivement un oligosaccharide soit de type complexe, soit de type oligomannosidique. La présence de faibles quantités d'oligomannosides sur des sites destinés à n'exposer que des structures complexes (Anderson et Grimes, 1982) s'explique par le fait que tous les séquons situés sur les chaînes H d'une même molécule ne sont pas glycosylés à la même vitesse ; donc pour certains les oligomannosides n'ont pas encore évolué vers leur forme complexe définitive. C'est en effet dans la phase post-traductionnelle que le

contrôle de la biosynthèse semble déterminant.

b - Glycosylation et post-traduction .

La glycosylation est considérée comme un des évènements majeurs modifiant la chaîne polypeptidique *a posteriori* avant d'en analyser l'incidence dans les IgM étudiées, nous rappellerons brièvement, l'implication de la post-traduction dans la synthèse glycoprotéique en général (v. les revues de Uy et Wold, 1977 ; Wold, 1981).

La post-traduction se définit par l'ensemble des modifications subies par la protéine après polymérisation des acides aminés. Certaines représentent une adaptation physiologique et donc une facilitation des processus biologiques ; d'autres, au contraire, se produisent spontanément sans que leur rôle soit encore connu. Trois types de modifications sont généralement observés :

- des interactions covalentes telles que la modification chimique de certains résidus d'acides aminés ou de monosaccharides, ou la protéolyse d'un zymogène en enzyme actif ;

- des interactions non covalentes assurant la structure tridimensionnelle de la protéine et la conformation du produit final par assemblage des sous-unités ;

- un phénomène de transport intracellulaire de la protéine depuis son lieu de synthèse jusqu'au compartiment cellulaire où elle acquerra son intégrité structurale et fonctionnelle (v. le phénomène de membrane-flow décrit p. 73).

Après avoir étudié de nombreux systèmes biologiques Wold a défini deux aspects essentiels de la

post-traduction : le transport inévitable de toute protéine de son lieu de synthèse dans le compartiment où doit se réaliser sa "destinée", et l'enchaînement, selon une séquence définie, des différentes réactions de modification. Une telle organisation implique l'existence et l'interdépendance de 3 types de déterminants :

1°) Les déterminants structuraux du substrat

(la protéine à être modifiée) : Il s'agit rarement de l'ensemble des acides aminés, mais plutôt d'une courte séquence de résidus (ex : le séquen de la glycosylation). Son accessibilité est nécessaire : des restrictions conformationnelles non respectées sont parfois limitantes (cf. le cas de l'ovalbumine : Beeley, 1977)

2°) La spécificité et la compartimentation des

enzymes responsables de ces modifications : La plupart des modifications post-traductionnelles étant catalysées par des enzymes (certaines sont cependant spontanées v. la revue générale de Thorpe et Baynes, 1982), elles impliquent la mise en place d'un système multienzymatique très complexe multipliant les signaux de reconnaissance spécifiques. Dans un premier temps la destination (intracellulaire, extracellulaire ou membranaire) de la protéine doit être fixée afin de permettre, dans un deuxième temps, le déroulement des différentes étapes nécessaires à la transformation finale.

3°) Le perpétuel renouvellement des déterminants

structuraux du substrat au cours de l'évolution de la protéine : Il résulte des nombreux changements de conformation et des variations de l'environnement, ce qui augmente la complexité des phénomènes et peut réduire l'efficacité

d'action d'un enzyme du fait de l'état transitoire d'un substrat sous sa forme active . Hsieh *et al.* (1983b) ont observé pour les glycoprotéines du virus Sindbis, l'importance de l'accessibilité physique des oligosaccharides aux glycosyltransférases dans l'évolution d'un type structural plutôt qu'un autre.

S'agissant des IgM, les travaux de Dulis *et al.* (1982) et Dulis (1983) ont contribué à démontrer que l'expression des IgM est sous contrôle post-traductionnel mais que la spécificité de ce contrôle dépend essentiellement de la conformation de la molécule. Dans un premier temps il s'agit de l'assemblage des chaînes peptidiques H et L en sous-unités suivi ou non d'une étape de polymérisation. Le signal est ainsi acquis pour l'évolution, dans un second temps, de l'IgM vers sa destinée de sécrétion ou de composant membranaire, incluant la fin de la glycosylation.

c - Conclusions .

La glycosylation apparait comme la modification post-traductionnelle qui associe le plus de composés covalents (monosaccharides, oligosaccharides et parfois polysaccharides) à la chaîne polypeptidique. Elle est induite par des glycosidases co-traductionnelles et se poursuit par l'intervention de glycosyltransférases essentiellement post-traductionnelles dont la compartimentation cellulaire est très élaborée.

De nombreux facteurs sont impliqués dans le contrôle de ce phénomène ; nous avons mentionné l'effet de la séquence polypeptidique sur la spécificité des glycosyltransférases endomembranaires, et l'accessi-

bilité des substrats. Nous avons vu d'après les travaux de Schachter *et al.* (1983) que l'incorporation d'un monosaccharide dans un oligosaccharide peut transformer un substrat en non-substrat et *vice versa*. Notons que la disponibilité de tous les éléments interagissant (substrats, enzymes et cofacteurs) semble aussi déterminante.

1°) IgM normales : C'est l'intervention de ces nombreux facteurs qui donne leur profil d'équilibre aux IgM normales .

2°) IgM-7 : Concernant l'IgM-7, son enrichissement en structures oligomannosidiques peut être interprété de plusieurs façons :

- Il pourrait y avoir une réduction de l'activité de la Gn-T_I (v. p. 257), mais cette étape devenant limitante, il devrait y avoir accumulation de la structure oligomannosidique la plus courte (à 5 Man), ce qui n'est pas observé dans l'histogramme (Fig. 35 ; p.257) ; tout se passe comme si une régulation par "feed-back" s'exerçait sur les α -mannosidases, établissant un équilibre entre les structures oligomannosidiques;

- L'augmentation des structures oligomannosidiques, (fraction C sur Con A) se fait au détriment de la fraction A ; l'étape limitante peut donc apparaître ultérieurement, soit par défaut de GlcNAc-transférases nécessaires à la fixation de nouvelles antennes sur les structures biantennées, soit par défaut d'autres cofacteurs nécessaires à l'élongation des chaînes. Un "rétro-contrôle" se répercuterait progressivement jusqu'au niveau oligomannosidique ; il devrait agir aussi sur les structures biantennées à moins qu'un taux fixe de ces dernières, situées au carrefour de la glycosylation, soit nécessairement maintenu dans la cellule ;

- La dernière interprétation envisagerait une cinétique de sécrétion des IgM en accord avec les résultats

de Dulis (1983) : la polymérisation des IgM est réalisée immédiatement après la synthèse des différentes chaînes peptidiques, donc bien avant la fin de la glycosylation. Si le transport intracellulaire est très rapide, certaines IgM en cours de maturation n'ont pas le temps d'acquérir leur capital de monosaccharides et seraient sécrétées comme IgM pentamériques sous forme oligomannosidique ou très immature.

1°) IgM-10 : S'agissant de l'IgM-10, l'observation d'un fort pourcentage de structures non retenues sur Con A semble plus facilement interprétable. La teneur en oligomannosides étant semblable à celle des IgM normales, c'est au niveau des structures biantennées que la situation se dégrade, au profit de la fraction la plus complexe. En effet la structure biantennée munie d'1 GlcNAc intercalaire domine toutes les autres structures et l'explication la plus plausible dans ce cas précis est la suivante : par un mécanisme inconnu mais dont le résultat principal serait équivalent à une activation de la Gn-T_{III}, la GlcNAc intercalaire serait fixée sur les structures biantennées en voie de maturation bloquant tout autre branchement d'antenne, mais permettant la maturation normale des 2 antennes initiales de la structure par l'action successive de la Gal-T et de la Sialyl-T.

Toutes ces interprétations ne sont bien sûr qu'hypothétiques et nécessitent, pour la plupart, des investigations au niveau ultrastructural de la cellule immunocompétente, afin d'obtenir des renseignements sur les nombreux facteurs de régulation dont dépend la biosynthèse des chaînes glycaniques, donc leur hétérogénéité .

C - INCIDENCE PATHOLOGIQUE

Parallèlement à l'avancement des études structurales et métaboliques des glycanes , les recherches se sont activement développées dans le domaine de la Pathologie . Un nouvel intérêt a été porté aux glycoprotéines afin de définir le rôle éventuel des glycanes dans la réponse d'un hôte à une maladie . Après avoir rappelé schématiquement l'état actuel des connaissances dans cette discipline , nous nous proposons de vérifier corrélativement cette définition par l'apport de nos résultats .

1 - Pathologie des Glycoconjugués : résultats

acquis : Les recherches ont porté sur deux aspects pathologiques principaux : les maladies métaboliques, grâce au développement des méthodes structurales, et l'oncogénèse, grâce aux progrès obtenus dans le domaine des lectines .

a - Les glycoprotéinoses : Ce sont des maladies métaboliques caractérisées par un déficit en exo-glycosidases lysosomiales et qui se manifestent par une accumulation urinaire et tissulaire d'oligosaccharides résultant d'un catabolisme incomplet de la glycoprotéine d'origine (cf. parmi les revues générales : Walborg, 1978 ; Strecker et Montreuil, 1979 ; Montreuil, 1981 ; Schachter, 1981). Parallèlement à ces recherches entreprises depuis une dizaine d'années les méthodes d'étude structurale se perfectionnant rapidement, la

structure primaire d'une multitude de glycanes pathologiques a été décrite ; citons par exemple les travaux de Strecker et Montreuil (1971) ; Strecker *et al.* (1977) (1979) ; Van Halbeek *et al.* (1980) ; Michalski *et al.* (1982) ; Egge *et al.* (1982).

Des motifs communs aux oligosaccharides d'origine pathologique et aux glycoprotéines natives ont été observés. En tenant compte, à la fois des lois structurales établies et de l'élucidation progressive des différentes étapes de la biosynthèse, et après avoir émis l'hypothèse qu'une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase lysosomiale (Montreuil, 1975 ; Strecker, 1977 ; Montreuil et Vliegthart, 1979) était responsable de la première étape catabolique des glycoprotéines (scission entre les 2 GlcNAc de l'extrémité réductrice, il a été possible de reconstituer de nombreuses structures glycaniques à partir des oligosaccharides accumulés par déficit en exo-glycosidases terminales (Montreuil et Strecker, 1978). Beaucoup de structures ainsi prédites n'ont pas encore été isolées parmi les glycoprotéines exocellulaires : très complexes elles sont probablement d'origine endocellulaire et/ou membranaire.

Les travaux accomplis dans ce domaine présentent d'une part un double avantage : celui de prévoir de nouvelles structures glycaniques qu'il reste à isoler, et celui d'apporter des éléments nouveaux dans la génétique des enzymes responsables de la glycosylation (Watkins, 1980). Ils sont d'autre part à l'origine de l'intérêt grandissant porté aux glycoprotéines membranaires, encore méconnues du fait de leur complexité. Cette importante hétérogénéité permet de supposer que la membrane plasmique pourrait posséder

ses propres glycosyltransférases. Notons à ce sujet les travaux effectués sur les ectoglycosyltransférases :

- de la membrane de lymphocyte splénique de rat : 2 fucosyltransférases (Hoflack *et al.* , 1978) ; une ectogalactosyl- et une ectosialyltransférase (Verbert *et al.* , 1977) ; les ectoglycosyltransférases impliquées dans le métabolisme des intermédiaire lipidiques (Hoflack *et al.* , 1980) ;

- de la surface des neurones en culture (Mandel *et al.* 1981) ;

- de la surface plaquettaire humaine : 2 ectosialyltransférases (Bauvois *et al.* , 1982).

b - Transformation maligne des cellules :

De nombreuses structures glycaniques membranaires restent à identifier mais leur isolement se heurte encore à une technologie rendue délicate à cause de cette intégration membranaire, et de leur grande diversité structurale. C'est le développement des recherches sur les lectines et leur interaction avec les glucides membranaires qui a permis au problème de l'oncogénèse d'être mieux abordé.

Nous avons insisté dans les "Généralités" sur l'importance des glycoprotéines membranaires dans la vie sociale des cellules (v. les revues de Hughes, 1976; Hughes et Pena, 1980). Elles sont impliquées dans la stabilisation mécanique de la bicouche lipidique de la membrane ; la

copule glucidique ayant une exposition extracellulaire, elles sont porteuses des informations données par l'environnement, donc responsables des phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire qui président à la formation des tissus (Lloyd, 1975).

Lors de leur transformation maligne (virale, chimique ou spontanée) les cellules acquièrent de nouvelles propriétés qui entraînent de profonds désordres dans leur organisation sociale et dans les mécanismes de régulation auxquels elles sont soumises (Robbins et Nicolson, 1975). La principale concerne une diminution de l'adhésivité cellulaire (Coman, 1960) qui isole la cellule de l'influence de son environnement et la soustrait au système de contrôle de sa croissance (le plus important étant la perte d'inhibition de contact, responsable d'une multiplication anarchique des cellules, et par suite, de métastases tissulaires). La cellule oncogène est donc porteuse de caractères "antisociaux" mais conserve les mécanismes nécessaires à sa survie et à sa reproduction.

La diminution de l'adhésivité cellulaire des cellules cancéreuses est considérée comme l'un des meilleurs critères physiologiques de la transformation maligne (Nicolson et Winkelhake , 1975).

Cependant, depuis ces dernières années, du fait de l'implication fréquente des glycannes dans les phénomènes de reconnaissance et de l'amélioration des procédés de fractionnement des glycopeptides membranaires, les investigations se sont orientées

vers la démonstration d'une corrélation entre la présence de certaines glycoprotéines membranaires et l'acquisition du caractère oncogène d'une cellule. De nombreux travaux consistent donc à comparer les profils glycopeptidiques membranaires des cellules normales et des mêmes cellules à l'état transformé (cf. les revues générales de Warren *et al.* , 1978 ; Debray, 1979 ; Atkinson et Hakimi, 1980) ; ils avaient pour objet de trouver un marqueur irréfutable de la malignité cellulaire, les diagnostics fondés sur les modifications physiologiques se révélant moins absolus. Les divers résultats obtenus fournissant la conclusion suivante : les cellules transformées possèdent des glycopeptides d'un poids moléculaire supérieur à ceux isolés des cellules normales ; cette différence de taille se traduit dans la plupart des cas par une hypersialylation (Buck *et al.* , 1974) et par une augmentation du nombre des antennes fixées sur le noyau pentasaccharidique.

Ce phénomène, observé sur de nombreux systèmes *in vivo* et *in vitro* , aussi bien sur des systèmes membranaires intracellulaires qu'extracellulaires, ainsi que sur des glycoprotéines membranaires isolées (Tuszynski *et al.* , 1978), démontre que l'ensemble des glycoprotéines membranaires semble impliqué et cela indépendamment de l'agent transformant. En 1980, Blithe *et al.* ont donné une idée de la complexité de la fraction glycopeptidique membranaire en obtenant des profils de résolution contenant 40 glycopeptides, et superposables d'une espèce à l'autre (Homme, Hamster, Souris).

Des travaux d'hybridation cellulaire, effectués par Bramwell et Harris (1978), fournissent les premiers arguments en faveur d'une origine génétique des modifications structurales détectées. Ces dernières années de nombreux autres marqueurs de tumorigénicité ont été détectés, confortant cette base moléculaire du cancer (cf. les travaux de Shilo et Weinberg (1981) Cooper (1982) ; Pulciani *et al.* (1982) ; Tabin *et al.* (1982) ; Land *et al.* (1983). Isolés de tumeurs variées, ils sont appelés oncogènes et correspondent à de courtes séquences de nucléotides (DNA). Ceci expliquerait en partie pourquoi ces transformations qui soustraient la cellule à tout contrôle ne sont pas létales.

Notons aussi que ces variations dans la composition et la structure des glycoprotéines membranaires ont été observées au cours de la croissance cellulaire, parallèlement à la transformation maligne (Atkinson et Hakimi, 1980) (les cellules normales, utilisées comme base de comparaison, sont dans tous les cas des cellules au repos).

2 - L'incidence pathologique de nos résultats :

a - La présence éventuelle d'un marqueur gly- cannique :

Aucun de nos résultats ne peut vraiment avoir de valeur diagnostique dans la macroglobulinémie de Waldenström, que ce soit :

1°) Du point de vue de la teneur en monosaccharides

(Tableau I ; p.147). La glycosylation relativement faible des IgM normales, décrite par Jouanneau (1978) a été confirmée ; son homogénéité sur un échantillonnage de 8 sérums individuels ($7,2 \pm 0,4 \%$) a permis de l'utiliser comme population de référence. Cependant un taux de glycosylation plus élevé n'est pas caractéristique de la malignité puisqu'une population d'IgM contenant $7,3 \pm 0,4 \%$ de glucides a été observée, la valeur isolée la plus faible étant de $6,6 \%$. De même aucun rapport molaire en monosaccharides ne s'est révélé vraiment caractéristique (v. Tableau VI;p.151 Tableau VII;p.152) .

2°) Du point de vue du rapport structures complexes/ oligomannosidiques : (C-N/O)

: Sa variabilité relevée dans la littérature, s'étendant des valeurs 1,5 (Shimizu *et al.* , 1971 ; Hickman *et al.* , 1972 ; Hurst *et al.* , 1973) à 4 (Anderson et Grimes, 1982), pour les IgM, a été confirmée. La dispersion des résultats concernant l'IgM-7 et l'IgM-10 encadrant tous deux la valeur 4 (obtenue lorsqu'il s'agit des IgM normales) ne permet pas d'utiliser ce rapport comme marqueur.

Nous pouvons cependant interpréter ces différences en tenant compte des informations acquises sur la biosynthèse des glycoprotéines selon l'état de différenciation ou de malignité de la cellule :

-concernant l'IgM-7 : Son enrichissement en structures oligomannosidiques peut être analysé d'après

les travaux de Muramatsu *et al.* (1976) ; Ceccarini et Atkinson (1978) et Atkinson et Hakimi (1980). Ces auteurs ont démontré une augmentation des structures oligomannosidiques dans les cellules en croissance, et plus particulièrement des structures à haute teneur en mannose. Ceci traduirait une glycosylation incomplète de glycoprotéines (IgM) et/ou un transit cellulaire très rapide, empêchant toute maturation. L'IgM-7 serait donc le produit d'une biosynthèse accélérée de la cellule immunocompétente.

- concernant l'IgM-10 : son enrichissement en structure biantennée porteuse d'une GlcNAc intercalaire (non retenue sur Con A, donc représentative d'une certaine complexité structurale) traduirait un ralentissement de la biosynthèse, consécutif à l'inhibition de certaines glycosyltransférases par la GlcNAc-Transférase III.

3°) Du point de vue de la présence d'une structure anormale :

Nous avons déjà précisé que la structure biantennée porteuse d'une GlcNAc intercalaire [Gn Gn (Gn)] ne pouvait servir de marqueur de malignité du fait de sa présence dans les 3 familles d'IgM étudiées. Son taux n'est pas plus exploitable car il est identique dans l'IgM-7 et les IgM normales. Quelques glycannes plus complexes que celui cité ci-dessus ont été repérés après TLC et méthylation, mais leur structure n'a pu être déterminée par insuffisance de produit. Peut-être existe-t-il parmi eux une structure inhabituelle et caractéristique d'une population ? Dans ce cas, sa présence à l'état de trace ne saurait servir d'indice irréfutable.

b - Les limites de nos travaux et les perspectives

1°) Les limites : Les résultats obtenus

peuvent être qualifiés de préliminaires dans la recherche d'un marqueur glycanique éventuel de la macroglobulinémie de Waldenström . Cependant il faut considérer, qu'à la différence des glycoprotéines membranaires, les IgM étudiées sont des glycoprotéines plasmatiques donc sécrétées; ce sont des produits finis, non soumis à des remaniements continus .Ce ne sont pas des protéines anormales car elles proviennent de l'expansion anormale d'un clone cellulaire normal .La cellule oncogène devient isolée de son environnement mais conserve ses propres mécanismes vitaux (croissance et reproduction) . L'absence constatée d'une complexité amplifiée des structures glycaniques parmi les IgM pathologiques pourrait s'expliquer ainsi : certains changements dans la régulation de leur biosynthèse entraîneraient des modifications structurales moins importantes que celles subies par les structures membranaires .

Les travaux de Breborowicz *et al.* (1981) dans les cas de cancers hépatiques, et de Krusius et Ruoslahti (1982) concernant les cancers de la membrane vitelline , ont démontré une corrélation entre le rapport des variants obtenus sur colonne de Con A et l'état malin . De la même façon, à défaut de mettre en évidence une structure glycanique "typique" de la maladie, nous aurions souhaité parvenir à des rapports caractéristiques entre les différentes fractions obtenues sur Con A .

Hatton *et al.* (1983) ont défini une relation étroite entre le profil d'hétérogénéité structurale des glycoprotéines plasmatiques et l'état physiopathologique de la cellule sécrétrice (cf. les travaux de Nicollet *et al.*, 1981 et Vaughan *et al.*, 1982). La perméabilité de la membrane plasmique, donc le transport actif de certaines substances sont considérablement modifiés lors de l'oncogénèse, provoquant dans certains cas une sensibilité différente de celle des cellules normales au milieu ambiant (Warren *et al.*, 1982) et à un traitement thérapeutique (Koj *et al.*, 1982) .

Nos travaux sont donc préliminaires, car

nous ne pouvons , à l'heure actuelle, établir aucune corrélation entre nos résultats et les divers paramètres entrevus ci-dessus .

En outre si nous avons justifié la possibilité de mélanger les IgM normales isolées de différents plasmas, nous avons par contre choisi arbitrairement une IgM pathologique représentative de chaque population, en fonction de la quantité de produit à notre disposition . Bien qu'une homogénéité ait été observée dans les rapports molaires en monosaccharides parmi les IgM appartenant à chacune des populations définies, il n'est pas certain que les IgM ZAJ et GRA soient représentatives, par leurs chaînes oligosaccharidiques, de leur population respective .

Ces précisions étant apportées, les premiers résultats acquis permettent d'envisager un champ d'action très étendu .

2°) Les perspectives : Nombreuses, elles sont toutes destinées à définir un marqueur glycanique de la macroglobulinémie de Waldenström .

1 - L'échantillonnage utilisé devra répondre à certaines exigences :

- concernant celui étudié au cours de ce travail, il est nécessaire de vérifier, pour les deux IgM pathologiques décrites, leur représentativité dans la population d'origine; cela consiste, compte tenu des quantités de matériau à notre disposition, à étudier au moins 2 autres IgM appartenant à chaque population (7 % et 10% de monosaccharides);

- pour les échantillonnages à se procurer ultérieurement, il serait préférable d'obtenir des plasmaphères de patients dont le traitement et le stade de l'évolution de l'affection sont voisins;

-chez un même patient, dès le début du diagnostic clinique, des prélèvements pourraient être effectués: à divers stades d'évolution de la maladie, selon le taux d'IgM monoclonale sérique, et suivant la nature du traitement (emploi de corticoïdes ou de chloramino phène), ce dernier paramètre ne paraissant exploitable

qu'à la condition qu'un palier de l'affection soit observé.

2 - L'identité de l'échantillonnage utilisé détermine la validité des résultats qui seront obtenus ultérieurement lors de travaux comparatifs .

Des cinétiques d'étude en fonction des différents paramètres pourront être effectuées . Une amélioration et une systématisation des procédés de fractionnement devraient permettre d'identifier un pic ou une fraction, à l'état de trace, mais inhabituel .

Un affinement de la résolution des structures mineures par HPLC, selon Paz Parente *et al.* (1984 b), et l'application de la microméthylation devraient déjà nous renseigner sur le degré de complexité de ces glycannes .

3 - Une étude structurale des chaînes oligosaccharidiques fixées sur différents sites de glycosylation des chaînes lourdes fournirait peut-être des éléments nouveaux à la notion d'asymétrie de la glycosylation de la chaîne polypeptidique décrite par Pollack et Atkinson (1983) .

4 - Une étude structurale, effectuée parallèlement sur une IgM monoclonale plasmatique donnée, et l'IgM membranaire correspondante, pourrait révéler une glycosylation différente imputable à un ou plusieurs sites de glycosylation .

5 - Des études quantitatives, effectuées au niveau de la cellule immunocompétente, évaluant les rapports entre glycosidases et glycosyltransférases, et la teneur en précurseurs oligomannosidiques, ainsi que des études de cinétique de transport intracellulaire par marquage radioactif, devraient permettre de préciser selon la population, à quelle phase (co-traductionnelle ou post-traductionnelle) de la glycosylation s'effectue une divergence dans la régulation .

6 - Des études ultrastructurales comparatives, associées à des méthodes autoradiographiques, pourraient indiquer des variations dans l'activité des différentes organelles

impliquées dans la biosynthèse des IgM .

7 - Enfin, les deux dernières voies de recherche que nous allons citer, sont peut-être les plus prometteuses:

- Une étude structurale comparative des glycoprotéines intégrées à la membrane plasmique des cellules productrices d'IgM normales et d'IgM pathologiques, devrait aboutir à l'observation de différences plus significatives que celles observées au niveau des IgM (v. la revue de Gahmberg et Andersson , 1982) ;

- La mise en culture de cellules immunocompétentes malignes provenant de donneurs bien définis, permettrait d'obtenir le matériau à étudier d'une façon inépuisable . Les nombreuses possibilités de recherches seraient ainsi encouragées pour atteindre notre objectif et permettraient même d'envisager la découverte de marqueurs génétiques; ces derniers sont de plus en plus reconnus à l'origine de la "Biologie Moléculaire du Cancer"(Weinberg, 1983) .

Ainsi nous constatons que les perspectives d'orientation des recherches, dégagées après l'exploitation de nos résultats, sont nombreuses et variées; leur choix dépend avant tout :

- de l'importance et de l'urgence de l'objectif à atteindre;

- de la facilité d'accès au matériau devant être utilisé ;

- de la systématisation de la méthodologie utilisée, de sa possibilité d'évolution vers la "routine" hospitalière. Nous allons cependant conclure cette discussion en définissant parmi nos résultats leur apport théorique dans le domaine de l'étude des IgM de Waldenström .

3 - Conclusions :

a - Vérification de nombreuses données .

1°) L'absence de structures O-glycosylées ;

2°) La présence d'un système unique de biosynthèse des chaînes glycaniques dans les cellules normales et can-

céreuses, par la mise en évidence de structures oligomanosidiques dont la taille limite est identique (Koide et al., 1979) ;

3°) La présence d'une glycosylation variable des IgM : 6,6-11,3 %, contre 7-15 % (Clamp et Johnson, 1972) ;

4°) La distinction de deux populations parmi les IgM pathologiques, fondée sur leur teneur en monosaccharides, confirmant les travaux antérieurs de Davies et Osterland (1968) ; les pourcentages relatifs des IgM constitutives de chaque population sont inversés mais ce résultat est peut-être à attribuer au nombre des échantillons étudiés :

- résultats personnels : (18 IgM)
 - famille à 7,3 % → 12 IgM (66,6 %)
 - famille à 10 % → 6 IgM (33,3 %)
- résultats de Davies et Osterland : (8 IgM)
 - groupe I : 10,69 % → 5 IgM (62,5 %)
 - groupe II : 7,71 % → 3 IgM (37,5 %)

5°) L'observation d'une grande hétérogénéité structurale dans les chaînes oligosaccharidiques des 3 familles d'IgM : elle était prévisible pour les IgM normales puisqu'il s'agit d'une population hétérogène, mais pas pour les IgM pathologiques qui sont des molécules "homogènes" du fait de leur origine .

Cette hétérogénéité glycanique fait l'objet de la revue de Hatton et al (1983) :

- qu'une glycoprotéine de sécrétion, provenant d'organes divers, possède une structure polypeptidique identique, mais des glycannes différents (Richardson et al, 1973; MacGillivray et al., 1983), peut sembler normal ;

- mais qu'une glycoprotéine sécrétée par une cellule monoclonale présente une hétérogénéité dans ses chaînes glycaniques, plus importante qu'une simple variation dans la teneur en acide sialique (Papaconstantinou et al, 1978), ne supporte aucune explication .

6°) La présence dans les 3 familles d'IgM d'un taux à peu près constant de structure biantennée : Sutton et al (1983)

ont défini celle-ci comme une structure de base, jouant un rôle dans la structure secondaire des IgG . Plus généralement elle correspondrait au produit de glycosylation résultant d'une stimulation physiologique de la cellule en vue de la synthèse des N-glycannes (Hatton *et al.*, 1983). Dans un premier temps elle protégerait la chaîne polypeptidique de la protéolyse lors du transport intracellulaire; dans un deuxième temps elle servirait de substrat aux stimulations assurant la maturation de la glycoprotéine vers sa spécialisation biologique . Rappelons les travaux de Schachter *et al.*(1983) qui ont situé cette structure au carrefour de la glycosylation .

7°) L'observation d'un nombre restreint de glycannes multiantennés (comme dans la plupart des glycoprotéines plasmatiques) qui semblerait s'expliquer par l'absence, presque généralisée, de spécificité d'action des IgM monoclonales de Waldenström .

8°) Nos résultats et la théorie d'Eylar(1965) : l'argumentation de cet auteur, selon laquelle la glycosylation complète d'une protéine est nécessaire à son passage du milieu cellulaire au milieu extracellulaire, n'est pas vérifiée par nos résultats qui reflètent un degré de glycosylation variable parmi les chaînes glycaniques des IgM . Selon Winterburn et Phelps (1972), qui étendent la notion d'espace extracellulaire à la lumière du reticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des diverses vésicules (lysosomes et phagosomes), l'interprétation des événements est plus plausible .C'est d'ailleurs cette dernière observation de l'orientation extracellulaire de la partie glycanique d'une glycoprotéine qui pose le problème si important du transport intermembranaire des nucléotides, précurseurs de l'élongation des chaînes glycaniques, dont la localisation est exclusivement plasmatique .

Entre temps Blobel (1980) a prouvé que la décision d'exportation d'une glycoprotéine était prise au niveau génétique, avant toute trace de glycosylation . En réalité

le problème de la glycosylation dans la sécrétion des protéines demeure complexe car il existe des protéines sécrétées et des glycoprotéines intracellulaires (voir la revue de Hemming ,1982) .

b - Apport de nos résultats dans la "Biologie Moléculaire des Glycoconjugués : Que ce soit au plan de la biosynthèse ou de la structure des glycannes, aucun fait expérimental nouveau n'a été observé . Nous avons isolé et identifié des structures déjà décrites; s'agissant de la biosynthèse son universalité semble réelle, que ce soit par la taille maximale des structures oligomannosidiques impliquées, ou par la précision et la complexité de son système de régulation (voir les restrictions apportées par la présence de la structure biantennée porteuse d'une GlcNAc intercalaire, p.258 .

Par contre des résultats complémentaires de ceux déjà acquis dans la connaissance structurale des IgM sont apportées . Il s'agit :

1 - De l'observation des deux types de N-glycannes, oligomannosidiques et N-acétyllactosaminiques, dans les trois IgM, ce qui n'avait pas encore été recherché ni précisé dans les IgM normales ;

2 - De l'étude structurale des chaînes oligosaccharidiques dans les IgM normales, jamais entreprise jusqu'alors du fait de leur hétérogénéité originelle et de leur faible concentration sérique . Ces travaux semblaient nécessaires afin de posséder une base de comparaison avec les IgM pathologiques ;

3 - De la description, pour la première fois dans les IgM, de structures biantennées munies d'une GlcNAc intercalaire, ces structures existant dans d'autres immunoglobulines (IgA, IgE ,IgD) et sont de plus en plus fréquemment identifiées dans les glycoprotéines .

CONCLUSIONS GENERALES

En 1908, le Comité de la Nomenclature des Protéines de la Société Physiologique Américaine et de la Société Américaine de Biochimie définissaient ainsi les glycoprotéines : composés comportant, outre la molécule protéique, un groupement glucidique autre qu'un acide nucléique. A partir de cette date les glycoprotéines ont été considérées comme des molécules faisant partie d'une branche vraiment "négligée" de la Science (Levene 1925).

Avec les années 1967-1969 naissait la "Biologie Moléculaire des glycoconjugués après un siècle de gestation" (Montreuil, 1982). Avant 1968, en effet il était admis que l'information spécifique était portée par les acides nucléiques et les protéines ; ce n'est qu'après 1968 que ce concept a été élargi, incluant les glycannes selon Sharon : "la spécificité de nombreux composés naturels n'est pas écrite seulement en termes d'acides aminés et de nucléotides, mais aussi en termes de glucides".

En 1977, Uy et Wold, analysant l'importance de la glycosylation dans les modifications post-traductionnelles des protéines, proposaient l'existence d'une "communication intercellulaire et intermoléculaire" par l'intermédiaire de composés clés tels que la copule glucidique des glycoprotéines et les lectines spécifiques des glucides. En 1981, Wold constate que les glycoconjugués sont de plus en plus impliqués dans les "communications biologiques", par le déchiffrement de structures oligosaccharidiques qui constituent un langage varié et complexe dérivé d'un alphabet simple : celui des monosaccharides communs, constitutifs des glycoprotéines et des glycolipides. En 1982, Olden *et al.* confirment que les glycannes sont de plus en plus impliqués dans des phénomènes de reconnaissance.

Depuis longtemps les glycannes étaient considérés comme des éléments stabilisateurs de la conformation des glycoconjugués ; ce n'est que depuis quelques années qu'ils sont définis comme des marqueurs biologiques spécifiques, et sont responsables du développement de la "Pathologie des glycoconjugués".

Pour cette raison, nous projetions de définir au cours de notre travail une structure ou un caractère glycanique associé à la macroglobulinémie de Waldenström.

Le matériau utilisé pour réaliser ce travail est constitué d'IgM normales isolées de 8 plasmas individuels normaux et de 18 IgM pathologiques provenant de plasmaphères de sujets atteints de maladie de Waldenström (teneur moyenne : 30 g d'IgM pathologique/l. de plasma).

Après une préparation des IgM pathologiques, fondée sur leurs propriétés physico-chimiques, et des IgM normales par chromatographie d'affinité sur une colonne de protamine Sépharose 4 B, les fractions enrichies en IgM ont été purifiées par gel filtration suivie d'une vérification immunologique de leur homogénéité.

Un premier fractionnement des chaînes glycaniques libérées par hydrazinolyse (suivie d'une N-réacétylation et d'une réduction au borohydrure tritié) est obtenu par chromatographie d'affinité sur colonne de ConA en 3 fractions : A (non retenue), B (faiblement retenue) et C (fortement retenue). Après caractérisation des différentes fractions par GLC et TLC, un sous-fractionnement ultérieur par HPLC pour la fraction C (oligomannosidique) et par électrophorèse à haut voltage pour les fractions A (la plus complexe) et B (biantennée) est réalisé.

La structure primaire des glycanes les plus caractéristiques est déterminée en combinant les résultats obtenus après GLC, microméthylation (suivie d'une méthanolyse et d'une peracétylation), incluant une analyse en spectrométrie de masse, et d'une dégradation récurrente par les exo-glycosidases spécifiques. Dans certains cas une analyse en RMN du proton à 500 MHz a été possible en collaboration avec le groupe du Professeur J.F.G. Vliegthart à Utrecht.

Une stratégie identique a été appliquée à chaque IgM, permettant une étude comparative entre IgM normales et IgM pathologiques, et entre IgM pathologiques.

De ces études menées en parallèle sur les deux types d'IgM les points suivants ont pu être dégagés :

1. - Deux populations sont distinguées parmi les IgM pathologiques sur la base de leur teneur en monosaccharides : une population majeure (12 IgM) à 7,3% et l'autre mineure (6 IgM) à 10% de glucides. Les IgM normales possèdent un taux moyen de 7,2% de monosaccharides.

Les IgM normales sont rassemblées du fait de leur composition homogène en glucides ($7,2 \pm 0,4\%$) et constituent la population statistique de référence. Une IgM pathologique correspond à chaque population est choisie pour les investigations ultérieures : l'IgM-7(ZAJ) et l'IgM-10(GRA).

2. - Les profils d'éluion obtenus après fractionnement sur ConA diffèrent selon l'IgM étudiée. Les IgM normales représentent un état d'équilibre ; l'IgM pathologique la moins glycosylée(IgM-7) est enrichie en structures oligomannosidiques tandis que l'IgM-10 présente une teneur élevée en structures les plus complexes. Une très grande hétérogénéité structurale est révélée par TLC (un minimum de 13 bandes) en accord avec les observations faites dans de nombreux autres systèmes (Pollack et Atkinson, 1983).

3. - L'application des microméthodes d'analyse structurale a permis de décrire des structures glycaniques identiques dans les IgM normales et pathologiques, à savoir :

a - des structures oligomannosidiques, dont la présence de tous les stades de "maturation", de 9 à 5 résidus mannose, en accord avec les résultats précédents obtenus dans des IgM de Waldenström Chapman et Kornfeld, 1979 a,b ; Cohen et Ballou, 1980 ; Jouanneau *etal.*, 1981 ; Van Halbeek *et al.*, 1981b)

b - des structures biantennées, révélant une microhétérogénéité due au fucose et surtout à l'acide sialique. Ces structures ont déjà été décrites dans une IgM humaine fucolysée (Hickman *et al.*, 1972) ou non fucolysée dans la pièce J constitutive de la même IgM (Baenziger, 1979) ;

c. - des structures très complexes dont certaines sont triantennées (mineures) et peut-être tétraantennées, ou plus complexes encore mais à l'état de traces ;

d. - dans cette fraction complexe, l'identification, pour la première fois dans une IgM, de structures biantennées munies d'une N-acétyl glucosamine intercalaire, avec toutes les restrictions qu'elle impose au plan de la biosynthèse (Schachter *et al.*, 1983). La structure monosialysée et monofucosylée est majoritaire dans les trois IgM étudiées, mais elle est prédominante dans l'IgM-10 (3,8%). Cette structure, détectée dans d'autres immunoglobulines humaines sériques (IgG, IgA, IgD), du lait de femme (sIgA) et de nombreuses autres glycoprotéines (v. références p. 228) n'a pas encore été décrite dans une IgM humaine. Les 2 structures majeures rencontrées dans les IgM étudiées ont été confirmées par RMN (Fig. 3 ; article N° 5 ; p. 227) :

- pour la structure biantennée monosialylée en α -2,6 sur le Gal 6, et monofucosylée en α -1,6 sur la GlcNAc 1 (IgM-7) ;

- pour la structure biantennée munie d'une GlcNAc intercalaire liée en β -1,4 sur le β -Man : monosialylée en α -2,6 sur le Gal 6, et monofucosylée en α -1,6 sur la GlcNAc 1 (IgM-10).

4. - Une étude comparative est rendue possible entre les différentes IgM puisque la méthodologie d'étude est la même et que les structures glycaniques décrites sont semblables. Les résultats sont réunis dans le tableau XIV ; p. 244 , et la Fig. 34 ; p. 245 .

La conclusion principale qui s'en dégage est la suivante : les différences observées ne sont pas qualitatives mais quantitatives, en accord avec les nombreux résultats obtenus après comparaison entre glycoprotéines (secrétées ou membranaires) provenant de cellules normales et pathologiques. De nombreuses interprétations sont données, impliquant une dysrégulation des phénomènes complexes qui accompagnent la biosynthèse des chaînes glycaniques.

En résumé, les principales conclusions obtenues sont les suivantes :

- la distinction de deux populations d'IgM pathologiques fondée sur leur composition en monosaccharides ;

- l'identification, pour la première fois dans les IgM, de structures biantennées munies d'une N-acétylglucosamine intercalaire dans ces deux populations ainsi que dans les IgM normales ;

- l'observation d'une importante hétérogénéité des structures oligosaccharidiques, comme dans la plupart des glycoprotéines ;

- la mise en évidence de différences essentiellement quantitatives après une étude comparative entre glycannes constitutifs des IgM normales et pathologiques.

Ces résultats sont interprétés en tenant compte de l'existence d'un système de régulation très sophistiqué dans la biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques.

Les travaux que nous avons menés ne nous permettent pas , à l'heure actuelle, de dégager un marqueur glycanique de valeur diagnostique irréfutable dans la macroglobulinémie de Waldenström. Nous pouvons cependant considérer cette série de résultats comme préliminaire, nous ayant permis d'acquérir un outil technologique très précieux et nous révélant les nombreuses possibilités d'orientation des recherches concernant ce matériau, pour essayer de mieux comprendre le rôle biologique des glycannes dans la réponse de l'hôte à une maladie.

BIBLIOGRAPHIE

Les nombres entre parenthèses renvoient à la page du mémoire. Les références incluses dans les articles ne sont pas classées ci-dessous.

ACTON, R.T., WEINHEIMER, P.F., HALL, S.J., NIEDERMEIER, W., SHELTON, E., BENNET, J.C. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 107 (26)

AHMED, A.I., OSUGA, D.T., FEENEY, R.E., (1973) J. Biol. Chem., 248, 8524 (84)

AMINOFF, D., GATHMANN, W.D., BAIG, M. (1979) J. Biol. Chem., 254, 8909 (84, 115)

AMINOFF, D., VORDER BRUEGGE, W.F., BELL, W.C., SARPOLIS, K., WILLIAMS, R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 1521 (253)

AMZEL, L.M., POLJAK, R.J., SAUL, F., VARGA, J.M., RICHARDS, F.P., (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 1427 (90)

ANDERSON, D.R., ATKINSON, P.H., GRIMES, W.J. (1984) (manuscript in preparation) (250)

ANDERSON, D.R., GRIMES, W.J., (1982) J. Biol. Chem., 257, 14858 (250, 253, 261, 273)

AREND, W.P., WEBSTER, D.E. (1977) J. Immunol., 118, 395 (93)

ASHWELL, G., MORELL, A.G. (1971) in "Glycoproteins of Blood Cells and Plasma" p.173 (Jamieson, G.A., and Greenwalt, T.J, Eds) Lippincott, Philadelphia (85)

ASHWELL, G., MORELL, A.G., (1974) Adv. Enzymol., 41, 99 (85)

ASHWELL, G., MORELL, A.G (1977) Trends Biochem. Sci., 2, 76 (85)

ASHWELL, G., MORELL, A.G. (1978) in "The Glycoconjugates", vol. 2; p.241 (Horowitz, M. and Pigman, W. Eds) Academic Press, New York, (85)

ASKENASE, P.W., HAYDEN, B.J. (1974) Immunology, 27, 563 (92)

ATKINSON, P.H., GREY, A., CARVER, J.P., HAKIMI, J., CECCARINI, C. (1981) Biochemistry, 20, 3979 (66, 249, 253)

ATKINSON, P.H., HAKIMI, J. (1980) in "Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans", p.191 (Lennarz, W.J. Ed) Plenum Press, New York (271, 272, 274)

AUGENER, W., GREY, H.M., COOPER, N.R., MÜLLER-EBERHARD, H.J (1971) Immunochemistry, 8, 1011 (94)

AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S. (1967) Nature, 214, 1302 (116)

BAENZIGER, J.U. (1979) J. Biol. Chem., 254, 4063 (39, 40, 211, 283)

- BAENZIGER, J.U., FIETE, D. (1980) *Cell*, 22, 611 (250)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S. (1974 a) *J. Biol. Chem.*, 249, 7260 (30, 33, 154)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S. (1974 b) *J. Biol. Chem.*, 249, 7270 (30, 33, 154, 254)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S., KOCHWA, S. (1974 c) *J. Biol. Chem.*, 249, 1889 (251)
- BAENZIGER, J., KORNFELD, S., KOCHWA, S. (1974 d) *J. Biol. Chem.*, 249, 1897 (251)
- BARKER, W.C., KETCHAM, L.K., DAYHOFF, M.O. (1980) *J. Mol. Evol.*, 15, 113 (51)
- BAR-SHAVIT, Z., OFEK, I., GOLDMAN, R., MIRELMAN, D., SHARON, N. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, 455 (87)
- BAUVOIS, B., CACAN, R., FOURNET, B., MONTREUIL, J., VERBERT, A. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 121, 567 (269)
- BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 774 (249)
- BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., (1981) *Eur. J. Biochem.*, 113, 405 (254)
- BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., ROUX, D., STRECKER, G. (1979) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 27, 153 (119)
- BAYARD, B., MONTREUIL, J. (1974) in "Méthodologie de la structure et du Métabolisme des Glycoconjugués", p.209 (Montreuil, J., Ed.) Editions du CNRS, Paris (117)
- BAYNES, J.W. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 8519 (102)
- BEELEY, J.G. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 1051 (35, 263)
- BELCHER, R., NUTTEN, A.J., SAMBROOK, C.M. (1954) *Analyst.*, 79, 201 (114)
- BENACERRAF, B., SEBESTYEN, M., COOPER, N.S. (1959) *J. Immunol.*, 82, 131 (92)
- BENNICH, H., BAHR-LINDSTROM, H. (1974) in "Progress in Immunology II", 1, p.49 (Edit. by Brent, L. and Holborow, J.) North Holland, Amsterdam, Oxford (43)
- BERGER, E.G., BUDDECKE, E., KAMERLING, J.P., KOBATA, A., VLI EGENTHART, J.F.G. (1982) *Experientia*, 38, 1129 (80)
- BEYER, T.A., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., SADLER, J.E., HILL, R.L. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 12531 (69)

- BIRSHTEIN, B.K., CAMPBELL, R., DIAMOND, B. (1982) *J. Immunol.*, 129, 610 (94)
- BLITHE, D.L., BUCK, C.A., WARREN, L. (1980) *Biochemistry*, 19, 3386 (271)
- BLOBEL, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 1496 (280)
- BOCK, K., ARNAP, J., LONNGREN, J. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 129, 171 (46, 48)
- BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J., SPIK, G. (1980) *Biochimie*, 62, 43 (241)
- BOURGEOIS, A., FOUGEREAU, M. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 12, 558 (43)
- BRACK, C., HIRAMA, M., LENHARD-SCHULLER, R., TONEGAWA, S. (1978) *Cell*, 15, 1 (55, 56)
- BRAMWELL, M.E., HARRIS, H. (1978) *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 201, 87 (272)
- BREBOROWICZ, J., MACKIEWICZ, A., BREBOROWICZ, D. (1981) *Scand. J. Immunol.* 14, 15 (275)
- BRENCKLE, R., KORNFELD, R. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 201, 160 (39, 115)
- BRETSCHER, M.S. (1973) *Science*, 181, 622 (83)
- BRISSE, J.R., CARVER, J.P. (1983 a) *Biochemistry*, 22, 1362 (46, 258)
- BRISSE, J.R., CARVER, J.P. (1983 b) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 61, 1067 (246, 258)
- BROWN, J.C., KOSHLAND, M.E. (1975) *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 5111 (99)
- BUBB, M.O., CONRADIE, J.D. (1976) *Immunology*, 31, 893 (94)
- BUBB, M.O., CONRADIE, J.D. (1978) *Immunology*, 34, 449 (95)
- BUCK, C.A., FUHRER, J.P., SOSLAU, G., WARREN, L. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 1541 (271)
- BUTLER, W.T. (1978) in "The Glycoconjugates", Vol. II, p. 79, (Horowitz, M. Pigman, W. Eds.) Academic Press, New York (30)
- CANN, G.N., ZARITSKY, A., KOSHLAND, M.E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6656 (24)
- CARVER, J. GREY, H. (1981) *Biochemistry*, 20, 6607 (258)
- CARVER, J. GREY, H., WINNIK, F., HAKIMI, J., CECCARINI, C., ATKINSON, P. (1981) *Biochemistry*, 20, 6600 (249)
- CECCARINI, C., ATKINSON, P.H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 500, 197 (274)

- CHAPMAN, A., FUJIMOTO, K., KORNFELD, S. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4441 (63)
- CHAPMAN, A., KORNFELD, R. (1979 a) *J. Biol. Chem.*, 254, 816 (33, 38, 39, 284)
- CHAPMAN, A., KORNFELD, R. (1979 b) *J. Biol. Chem.*, 254, 824 (33, 38, 39, 211, 283)
- CHAPUIS, R.M., KOSHLAND, M.E. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 657 (26, 27)
- CHIANG, H.C., KOSHLAND, M.E. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2736 (99)
- CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. (1974) *Biochemistry*, 13, 211 (97)
- CHU, F.K., MALEY, F. (1982) *Archiv. Biochem. Biophys.*, 214, 134 (82)
- CLAMP, J.R., JOHNSON, I. (1972) in "Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function", 2nd. Edn., p.612 (Gottschalk, A; J., Ed.) Elsevier, Amsterdam (2, 33, 154, 279)
- COHEN, R.E., BALLOU, C.E. (1980) *Biochemistry*, 19, 4345 (31, 41, 284)
- COHEN, S., PORTER, R.R. (1964) *Advanc. Immunol.*, 4, 287 (3)
- COLMAN, P.M., DEISENHOFER, J., HUBER, R., PALM, W. (1976) *J. Mol. Biol.*, 100, 257 (45)
- COMAN, D.R. (1960) *Cancer Res.*, 20, 1202 (270)
- Committee on Nomenclature of Human Immunoglobulins, (7)
(1964) *Bull. W.H.O.*, 30, 447
(1966) *Bull. W.H.O.*, 35, 953
(1969) *Bull. W.H.O.*, 41, 975
- CONRADIE, J.D., BUBB, M.O. (1977) *Nature*, 265, 160 (95)
- COOPER, G.M. (1982) *Science (Wash.)* 218, 801 (272)
- CUSHLEY, W., COUPAR, B.E.H., MICKELSON, C.A., WILLIAMSON, A.R. (1982) *Nature* 298, 77 (61)
- DAVIE, J.M., OSTERLAND, C.K. (1968) *J. Exp. Med.*, 128, 699 (2, 37, 279)
- DAVIE, J.M., OSTERLAND, C.K. (1971) *Immunochemistry*, 8, 303 (37)
- DAVIES, D.R., PADLAN, E.A., SEGAL, D.M. (1975) *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 639 (90)
- DAVOUST, J., MICHEL, V., SPIK, G., MONTREUIL, J., DEVAUX, P. (1981) *FEBS Lett.*, 150, 503 (48)
- DAY, J.F., THORNBURG, R.W., THORPE, S.R., BAYNES, J.W. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2360 (102)
- DEBEIRE, P., HOFACK, B., CACAN, R., VERBERT, A., MONTREUIL, J. (1977) *Biochimie*, 59, 473 (70)
- DEBRAY, H. (1979) *Bull. Cancer (Paris)*, 66, 353 (271)

- DEBRAY, H., MONTREUIL, J., (1978) *Biochimie*, 60, 697 (118)
- DEBRAY, H., MONTREUIL, J. (1981) in "Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry" Vol. I, p. 221 (Bøg-Hansen, T.C. and Spengler, G.A., Eds.) de Gruyter, Berlin, New York (252)
- DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., DELANNOY, P.; MONTREUIL, J. (1984) *Eur. J. Biochem.* (*sous presse*) (118)
- DEBRAY, H., PIERCE-CRETEL, A., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1983) in "Lectins", Vol. III, p. 335 (Bøg-Hansen, T.C. and Spengler, G.A., Eds.) de Gruyter, W., Berlin (118, 246, 249, 258)
- DEBUIRE, B., PUTNAM, F.W. (1982) in "Protides of the Biological Fluids", 29 th. Colloq. 1982, p. 41 (Peeters, H. Ed.) Pergamon Press, Oxford, New York (43, 51, 52)
- DEISENHOFER, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2361 (98)
- DEISENHOFER, J., COLMAN, P.M., HUBER, R., HAUPT, H., SCHWICK, G. (1976) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 357, 435 (49, 99)
- DELLA CORTE, E., PARKHOUSE, R.M.E. (1973) *Biochem. J.*, 136, 597 (24)
- DISCHE, Z. (1930) *Microkemie*, 8, 4 (114)
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., SCHUT, B., VLIEGENTHART, J.F.G., SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., MONTREUIL, J. (1977) *FEBS Lett.*, 77, 15 (249)
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIEGENTHART, J.F.G., MONTREUIL, J., SPIK, G., FOURNET, B. (1979) *Eur. J. Biochem.*, 100, 569 (233, 254)
- DORRINGTON, K.J. (1976) *Immunol. Commun.*, 5, 263 (92)
- DORRINGTON, K.J. (1978) *Canad. J. Biochem.*, 56, 1087 (96)
- DORRINGTON, K.J., PAINTER, R.H. (1977) *Prog. Immunol.*, III, 298 (90)
- DORRINGTON, K.J., SMITH, B.R. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 263, 70 (90)
- DOUY, A., GERVAIS, M., GALLOT, B. (1980) *Macromol. Chem.*, 181, 1199 (48)
- DREYER, W., BENNETT, J.C. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 864 (55)
- DUBOIS, H., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956) *Anal. Biochem.*, 28, 350 (160)
- DULIS, B.H. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 2181 (76, 264, 266)
- DULIS, B.H., KLOPPEL, T.M., GREY, H.M., KUBO, R.T. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 4369 (76, 264)

- EARLY, H., HUANG, H., DAVIS, M., CALAME, K., HOOD, L. (1980) *Cell*, 19, 981 (57)
- EDELMAN, G.M. (1970) *Scientif. Amer.*, 233, 34 (89)
- EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, W.E., GOTTLIEB, P.D., RUSTISHAUSER, U., WAXDAL, M.J. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 78 (16, 42)
- EDMUNSON, A.B., ELY, K.R., ABOLA, R.R., SCHIFFER, M., PANAGIOPOULOS, N. (1975) *Biochemistry*, 14, 3953 (44, 90)
- EDMUNSON, A.B., SHEBER, F.A., ELY, D.R., SIMONDS, N.B., HUTSON, N.K., ROSSITER, J.L. (1968) *Archiv. Biochem. Biophys.*, 127, 725 (156)
- EGGE, H., MICHALSKI, J.C., STRECKER, G. (1982) *Archiv. Biochem. Biophys.*, 213, 318 (268)
- ELLERSON, J.R., YASMEEN, D., PAINTER, R.H., DORRINGTON, K.J. (1976) *J. Immunol.*, 116, 510 (96)
- ELSON, L.A., MORGAN, W.T.J. (1933) *Biochem. J.*, 27, 1824 (114)
- ELTING, J., CHEN, W.W., LENNARZ, W.J. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2325 (66)
- ESH DAT, Y., OFEK, I., YASHOUV-GAN, Y., SHARON, N., MIRELMAN, D. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 1551 (87)
- EYLAR, E.H. (1965) *J. Theoret. Biol.*, 10, 89 (81, 280)
- FAHEY, J.L. (1965) *J. Amer. Med. Assoc.*, 194, 71 (9)
- FEENEY, R.E., YEH, Y. (1978) *Adv. Prot. Chem.*, 32, 191 (83)
- FEINSTEIN, A., MUNN, E.A., RICHARDSON, N.E. (1971) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 190, 104 (49)
- FEINSTEIN, A., RICHARDSON, N.E., MUNN, E.A. (1976) in "Proc. Third John Innes Symp., Structure-Function Relationships of Proteins", p.111 (Markham, R. and Horne, R.W., Eds.) North Holland, Amsterdam (49, 50)
- FILITTI-WURMSER, S., GENTOU, C., HARTMANN, L. (1964) *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, IX, 398 (2, 10)
- FILITTI-WURMSER, S., GENTOU, C., HARTMANN, L. (1967) *Clin. Chim. Acta*, 15, 253 (2)
- FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H. (1980) *Carbohydr. Res.*, 80, 336 (121)
- FIRON, N., OFEK, I., SHARON, N. (1983) *Pure and Applied Chem.*, 55, 671 (87)

- FLEISCHMAN, J.B., PORTER, R.R., PRESS, E.M. (1963) *Biochem. J.*, 88, 220 (15, 18)
- FLORENT, G., LEHMAN, D., LOCKHART, D., PUTNAM, F. (1974) *Biochemistry*, 13, 3372 (28, 37, 82)
- FOURNET, B., DHALLUIN, J.M., STRECKER, G., MONTREUIL, J., BOSSO, C., DEFAYE, J. (1980) *Analyt. Biochem.*, 108, 35 (122)
- FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIEGENTHART, J.F.G., BINETTE, J.P., SCHMID, K. (1978) *Biochemistry*, 17, 5206 (249)
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J. (1981) *Anal. Biochem.*, 116, 489 (121)
- FRAZIER, W., GLASER, L., (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 491 (87)
- GAHMBERG, C.G., ANDERSSON, L.C. (1982) *Biochim. Biophys. Acta, Reviews on Cancer*, 651, 65 (82, 278)
- GAHMBERG, C.G., JOHINEN, M., KARKI, K.K., ANDERSSON, L.C. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2169 (82)
- GEREN, L.M., EBNER, K.E. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 14 (70)
- GIBSON, R., KORNFELD, S., SCHLESINGER, S. (1980) *Trends Biochem. Sci.*, 5, 290 (81)
- GIBSON, R., KORNFELD, S., SCHLESINGER, S. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 456 (81)
- GLABE, C.G., HANOVER, J.A., LENNARZ, W.J. (1980) *J. Biol. Chem.*, 254, 9236 (34, 261)
- GLEESON, P.A., SCHACHTER, H. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 6162 (255, 259)
- GOGSTAD, G.O., HELGELAND, L. (1982) in "The Glycoconjugates", Vol. III, p.99 (Horowitz, M.I. and Pigman, W., Eds.) Academic Press, New York, London (74, 100)
- GOLDBERG, D.E., KORNFELD, S. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 3159 (66, 67, 70, 73)
- GOTTSCHALK, A. (1960) in "The Chemistry and Biology of Sialic acid and Related substances", Cambridge Univ. Press London (87)
- GOTTSCHALK, A. (1969) *Nature*, 222, 452 (79)
- GOTTSCHALK, A., BHARGAVA, A.S., MURTY, V.L.N. (1972) in "Glycoproteins, their composition, structure and function", Part B, p.810, (Gottschalk, A. Ed.) Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York (30)
- GRABAR, P., WILLIAMS C.A. (1953) *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 193 (12)
- GRABAR, P., WILLIAMS, C.A. (1955) *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 65 (112)

- GRIMMONPREZ, L., MONTREUIL, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 843 (120)
- GROSS, E. (1967) *Methods Enzymol.*, 11, 238 (29)
- GUEUZE, J. J., KRAMER, M. F., de MAN, J. H. C. (1977) in "Mammalian Cell Membranes," Vol. 2, p. 55 (Jamieson, G. A. and Robinson, D. M. Eds.) Butterworth, London (74)
- HAIMOVICH, J., GIVOL, D., EISEN, H. N. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 1656 (89)
- HAKOMORI, S. I. (1964) *J. Biochem.*, 55, 205 (121)
- HAKOMORI, S. I. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733 (87)
- HALPERN, M. S., KOSHLAND, M. E. (1970) *Nature*, 228, 1276 (24)
- HARPAZ, N., SCHACHTER, H. (1980 a) *J. Biol. Chem.*, 255, 4885 (66, 69, 255)
- HARPAZ, N., SCHACHTER, H. (1980 b) *J. Biol. Chem.*, 255, 4894 (66, 69, 255, 256)
- HARTMANN, L., TOILLIEZ, M. (1957) *Rev. Franç. Etud. Clin. Biol.*, 2, 197 (113)
- HATTON, M. W. C., MARZ, L., REGOECZI, E. (1983) *Trends Biochem. Sci.*, 8, 287 (177, 249, 275, 279; 283)
- HAUPT, H., HEIMBURGER, N., KRANZ, T., SCHWICK, H. G. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 17, 254 (108)
- HEIMBURGER, N., HEIDE, K., HAUPT, H., SCHULTZE, H. E. (1964) *Clin. Chim. Acta*, 10, 293 (144)
- HEMMING, F. W. (1982) *Bioscience Reports*, 2, 203 (81, 281)
- HICKMAN, S., KORNFELD, S. (1978) *J. Immunol.*, 121, 990 (99)
- HICKMAN, S., KORNFELD, R., OSTERLAND, C. K., KORNFELD, S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2156 (37, 38, 41, 211, 273, 284)
- HICKMAN, S., KULCZYCKI, A., LYNCH, R. G., KORNFELD, S. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 4402 (99)
- HOFACK, B., CACAN, R., VERBERT, A. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 88, 1 (269)
- HOFACK, B., CACAN, R., VERBERT, A. (1980) *Eur. J. Biochem.*, 112, 81 (269)
- HOMANS, S. W., DWEK, R. A., FERNANDES, D. L., RADEMACHER, T. W. (1982) *FEBS Lett.*, 150, 503 (48)
- HONG, R., NISONOFF, A. (1966) *J. Immunol.*, 96, 622 (96)

- HOROWITZ, H., PIGMAN, W. (Eds.) (1977) in "The Glycoconjugates", Vol. I, Acad. Press, New York (30)
- HOROWITZ, H., PIGMAN, W. (Eds.) (1978) in "The Glycoconjugates", Vol. II, Acad. Press, New York (30)
- HOUSLEY, T. J., ROWLAND, F. N., LEDGER, P. N., KAPLAN, J., TANZER, M. L. (1980) J. Biol. Chem., 255, 121 (82)
- HOZUMI, N., TONEGAWA, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3628 (55)
- HSIEH, P., ROSNER, M. R., ROBBINS, P. W. (1983 a) J. Biol. Chem., 258, 2548 (261)
- HSIEH, P., ROSNER, M. R., ROBBINS, P. W. (1983 b) J. Biol. Chem., 258, 2555 (264)
- HUBBARD, S. C., ROBBINS, P. W. (1979) J. Biol. Chem., 254, 4568 (63)
- HUBER, R., DEISENHOFER, J., COLMAN, P., MATSUSHIMA, M., PALM, W. (1976) Nature, (London), 264, 415 (46, 98)
- HUGHES, R. C. (1976) in "Membrane Glycoproteins, A review of Structure and Function", p. 269, (Hughes, R. C., Ed.) Butterworth, London (85, 87, 269)
- HUGHES, R. C., PENA, S. D. J. (1978) Nature, 276, 80 (87)
- HUGHES, R. C., PENA, S. D. J. (1980) in "Carbohydrate Metabolism and its Disorders", p. 363 (Randle P. J., Steiner, D. F., Whelan, W. F. Eds.) Acad. Press, New York (269)
- HUNT, L. T., DAYHOFF, M. O. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 757 (34)
- HURST, M., NIEDERMEIER, W., ZIRKAN, J., BENNETT, J. C. (1973) J. Immunol., 110, 840 (37, 273)
- HURST, M. M., VOLANAKIS, J. E., HESTER, R. B., STROUB, R. M., BENNETT, J. C. (1974) J. Exp. Med., 140, 1117 (94)
- HURST, M. M., VOLANAKIS, J. E., STROND, R. M., BENNETT, J. C. (1975) J. Exp. Med., 142, 1322 (94)
- INOUE, S., IWASAKI, M., MATSUMURA, G. (1979) in "Glycoconjugates, Proc. V th. Int. Symp. Glycoconjugates", Kiel, Sept. 1979, p. 40, (Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M. F., Vliegenthart, J. F. G., Wiegandt, H. Eds.) Thieme, Stuttgart (115)
- IRIMURA, T., TSUJI, T., TAGAMI, S., YAMAMOTO, K., OSAWA, T. (1981) Biochem., 20, 560 (237, 254)
- ISENMAN, D. E., DORRINGTON, K. J., PAINTER, R. H. (1975) J. Immunol., 114, 1726 (96)

- ISENMAN, D. E., ELLERSON, J. R., PAINTER, R. H., DORRINGTON, K. J. (1977) *Biochemistry*, 16, 233 (94)
- ISHIHARA, H., TEJIMA, S. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 110, 181 (33, 254)
- JANCIK, J., SCHAUER, R. (1974) *Hoppe-Seyler' Z. physiol. Chem.*, 355, 395 (88)
- JARNEFELT, J., FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H. (1978) *Trends Biochem. Sci.*, 3, 110 (87)
- JOHNSON, B. J., THAMES, K. E. (1976) *J. Immunol.*, 117, 1491 (94)
- JOUANNEAU, J. (1978) Thèse de Doctorat d'Etat, Paris. "Etude des chaînes oligosaccharidiques des IgM de Waldenström- Préparation et caractérisation des IgM -Analyse structurale des glycopeptides" (3, 28, 35, 144, 145, 150, 153, 162, 273)
- JOUANNEAU, J., FOURNET, B., BOURRILLON, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 667, 277 (39, 239, 284)
- KABAT, E. A., WU, T. T., BILOFSKY, H. (1976) in "Variable Regions of Immunoglobulins chains. Tabulations and Analysis of Amino acid sequences", Belt, Bearanek and Newman, Boston (16, 18)
- KAPLAN, A., SAVORY, J. (1965) *Clin. Chem.*, 11, 937 (112)
- KATAOKA, T., KAWAKAMI, T., TAKAHASHI, N., HONJO, T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 919 (57)
- KAVERZNEVA, E. D., TSHUCHROVA, A. I., VIKHA, G. W. (1978) *Bioorgan. Khim., U.S.S.R.*, 4, 369 (97)
- KAWASAKI, T., ASHWELL, G. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 5292 (85)
- KEHRY, M., EWALD, S., DOUGLAS, R., SIBLEY, C., RASCHKE, W., FAMBROUGH, D., HOOD, L. (1980) *Cell*, 21, 393 (59, 95)
- KEHRY, M., SIBLEY, C., FUHRMAN, J., SCHILLING, J., HOOD, L. E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 2932 (3, 18, 21, 23, 35, 37, 59, 89)
- KELLER, R. K., SWANK, G. D. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 702 (82)
- KIELY, M., McKNIGHT, G., SCHIMKE, R. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 5490 (73)
- KLEIN, M., HAEFFNER-CAVAILLON, N., ISENMAN, D. E., RIVAT, C., NAVIA, M. A., DAVIES, D. R., DORRINGTON, K. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 524 (97)
- KNUSTON, D. W., KIJLSTRA, A., van ES, L. A. (1977) *J. Exp. Med.*, 145, 1368 (93, 102)
- KOHLER, H., SHIMIZU, A., PAUL, C., PUTNAM, F. W. (1970) *Science*, 169, 56 (16, 20)

- KOIDE, N., MURAMATSU, T., KOBATA, A. (1979) *J. Biochem.*, 85, 149 (279)
- KOJ, A., DUBIN, A., KASPERCZYK, H., BERETA, J., GORDON, A.H. (1982) *Biochem. J.*, 206, 545 (275)
- KOL, O. (1983) Thèse de 3^e cycle, Lille: "Contribution à l'étude des endo- β -N-acétylglucosaminidases: purification et spécificités d'une enzyme isolée de *Sporotrichum dimorphosporum*." (241)
- KORNFELD, S., GREGORY, W., CHAPMAN, A. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 11649 (65)
- KORNFELD, R., KELLER, J., BAENZIGER, J., KORNFELD, S. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 3259 (254)
- KORNFELD, R., KORNFELD, S. (1976) *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 217 (30)
- KORNFELD, S., KORNFELD, R. (1978) in "The Glycoconjugates", Vol. II, p. 437 (Horowitz, M.I. et Pigman, W., Eds.) Academic Press, New York, London (80)
- KORNFELD, R., KORNFELD, S. (1980) in "Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans", p. 1 (Lennarz, W.J. Ed.) Academic Press, New York (30)
- KRUSIUS, T., RUOSLAHTI, E. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 3453 (275)
- KUNKEL, H.G., PRENDERGAST, R.A. (1966) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122, 910 (1)
- LAND, H., PARADA, L.F., WEINBERG, R.A. (1983) *Science (Wash.)* 217, 937 (272)
- LAURELL, C.B. (1972) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29, suppl. 124, 21 (137)
- LAWTON, A.R., KINCADE, P.W., COOPER, M.D. (1975) *Fed. Proc.*, 34, 33 (59)
- LAY, W.H., NUSSENZWEIG, V. (1969) *J. Immunol.*, 102, 1172 (92)
- LEAVITT, R., SCHLESINGER, S., KORNFELD, S. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 9018 (82, 97)
- LERNER, A.B., WATSON, C.J. (1947) *Amer. J. Med. Sci.*, 214, 410 (108)
- LESLIE, R.G.Q. (1980) *Immunol. Today*, 2, 78 (93, 100, 101)
- LEVENE, P.A. (Ed.) (1925) in "Hexosamines and Mucoproteins", Longmans, Green, New York (282)
- LI, E., KORNFELD, S. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 6426 (214, 240)
- LI, Z.Q., PERKINS, S.J., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 130, 275 (48)
- LIBERTI, P. (1975) *Immunochemistry*, 15, 107 (90)

LIS, H., SHARON, N. (1977) in "Lectins: their chemistry and application to immunology". The Antigens, Vol. 4, p. 429 (In Sela, M. Ed.) Academic Press, New York (85)

LLYOD, C. W. (1975) Biol. Rev., 50, 325 (270)

LODISH, H. F., BRAELL, W. A., SCHWARTZ, A. L., GER, J. A., STROUS, M., ZILBERSTEIN, A. (1981) Int. Rev. Cytol., 12, 248 (261)

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265 (112, 142)

LUNNEY, J., ASHWELL, G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 342 (86)

Mac-GILLIVRAY, R. T. A., MENDEZ, E., SHEWALE, J. G., SINHA, S. K., LINEBACK-ZINS, J., BREW, K. (1983) J. Biol. Chem., 258, 3543 (249, 279)

MADDISON, S. E. (1972) Health Lab. Sci., 9, 167 (15)

MALLARME, J., FAUVERT, R., HARTMANN, L., ORCEL, L., BOIVIN, P. (1957) Press. Med., 65, 839 (11)

MANCINI, G., CARBONARA, A. O., HEREMANS, J. F. (1965) Immunochemistry, 2, 235 (113, 142)

MANDEL, P., DREYFUS, H., LOUIS, J. C., HOF LACK, B., HARTH, S. (1981) Trans. Amer. Soc. Neur., 12, 156 (268)

MARCH, S. C., PARIKH, I., CUATRECASAS, P. (1974) Anal. Biochem., 60, 149 (110)

MARCHALONIS, J. J. (1972) Nature (London) 236, 84 (8, 21)

MARQUART, M., DEISENHOFER, J. (1982) Immunology Today, 3, 160 (47)

MARSHALL, R. D. (1972) Annu. Rev. Biochem., 41, 673 (34, 97)

MARSHALL, R. D., JOHNSON, L. N. (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 127 (84)

MARTIN, W. J., MATHIESON, D. R. (1953) Proc. Mayo. Clin., 28, 545 (108)

MARZ, L., HATTON, M. W. C., BERRY, L. R., REGOECZI, E. (1982) Can. J. Biochem., 60, 624 (249)

McCONNELL, I., HURD, C. M. (1976) Immunology, 30, 385 (95)

McNABB, T. C., KOH, T. H., DORRINGTON, K. J., PAINTER, R. H. (1976) J. Immunol., 117, 882 (93)

MEBAZZAA, A., OLLIER, M. P., DEGRELLE, H., LAZAR, P., FILITTI-WURMSER, S., HARTMANN, L. (1970) Ann. Biol. Clin., 28, 25 (11)

- MELLIS, S. J., BAENZIGER, J. U. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 11546 (213, 250, 254)
- MESCHER, M. F. (1981) *Trends Biochem. Sci.*, 6, 97 (83)
- MESCHER, M. F., STROMINGER, J. L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 2005 (83)
- MESTECKY, J., SCHROENLOHER, R., KULHAVY, R., WRIGHT, G. P., TOMANA, M. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 544 (22, 24)
- MESTECKY, J., ZIKAN, J., BUTLER, W. T., KULHAVY, R. (1972) *Immunochemistry*, 9, 883 (143)
- METZ-BOUTIGUE, M. H., JOLLES, J., JOLLES, P., MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. (1980) *Biochem. Biophys. Acta*, 622, 308 (249)
- METZGER, H. (1967) *J. Amer. Med. Assoc.*, 202, 129 (7)
- MEYER, F. A., KRIEG, M., GELMAN, R. A. (1975) *Biochem. Biophys. Acta*, 392, 223 (83)
- MICHALSKI, J. C., STRECKER, G., van HALBEEK, H., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J. F. G. (1982) *Carbohydr. Res.*, 100, 351 (259, 268)
- MILLER, F. (1972) *Immunochemistry*, 9, 217 (239)
- MIZRAHI, A., O'MALLEY, J. A., CARTER, W., TAKATSUKI, A., TAMURA, G., SULKOWSKI, E. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 7612 (82)
- MOLE, J. E., BHOWN, A. S., BENNETT, J. C. (1977) *Biochemistry*, 16, 3507 (24, 36)
- MONSIGNY, M., KIEDA, C., ROCHE, A. C. (1979) *Biol. Cell*, 36, 239 (85)
- MONTREUIL, J. (1974) *Proc. VIIth. Int. Symp. Carbohydr. Chem.*, Bratislava, August 1974, *Pure Appl. Chem.*, 42, 431 (30, 31)
- MONTREUIL, J. (1975) *Pure Appl. Chem.*, 42, 431 (30, 43, 48, 268)
- MONTREUIL, J. (1980 a) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37, 157 (30, 46)
- MONTREUIL, J. (1980 b) *Proc. 9th. Aharon Katzir-Katchalsky Conference on Carbohydrate-Protein Interactions*, Kibbutz Kiryat Anavim p.3 (46, 48)
- MONTREUIL, J. (1981) *C.R. Soc. Biol.*, 175, 694 (267)
- MONTREUIL, J. (1982) in "Comprehensive Biochemistry", Vol. 19B, p.1 (Neuberger, A., van Deenen, L. L. M. Eds.) Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam, Oxford, New York (1, 30, 80, 115, 282)
- MONTREUIL, J. (1983 a) *Biochem. Soc. Trans.*, 11, 134 (46, 49)

- MONTREUIL, J. (1983 b) Proc. 7th. Symp. on Glycoconjugates, Lund-Ronneby, July 1983 (Chester, M.A., Heinegard, D., Lunblad, A., Svensson, S. Eds.) (46)
- MONTREUIL, J., DEBRAY, H., DEBEIRE, P., DELANNOY, P. (1983) in "Falk Symp. 34: Structural Carbohydrates in the liver", p.239 (Pooper, H., Rëntler, W., Ko" Hgen, E., Gudat, F. Eds.) MTP Press limited Falcon House, Lancaster, England (80, 118)
- MONTREUIL, J., FOURNET, B., SPIK, G., STRECKER, G. (1978) C.R.Acad.Sci.Paris, 287D, 837 (48)
- MONTREUIL, J., SPIK, G. (1963) "Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux", Lab.Chimie Biologique, Fac.Sc.Ed., Lille (36, 114)
- MONTREUIL, J., SPIK, G., KONARSKA, A. (1967) "Méthodes chromatographiques de dosage des oses neutres", Lab.Chimie Biologique, Fac.Sc., Ed., Lille (36)
- MONTREUIL, J., STRECKER, G. (1978) C.R.Acad.Sci., Paris, 287, 887 (268)
- MONTREUIL, J., Vliegenthart, J.F.G. (1979) in "Glycoconjugate Res., Proc. 4th. Intern. Symp. Glycoconjugates, Woods Hole, 1977", p.35, Academic Press, New York (268)
- MOORE, S. (1963) J.Biol.Chem., 238, 235 (113)
- MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, I., SCHEINBERG, I.H., ASHWELL, G. (1968) J.Biol.Chem., 243, 155 (85, 86)
- MORELL, A.G., RIESEN, W. (1981) in "Immunotherapy- A guide to Immunoglobulin Prophylaxis and Therapy", p.17 (Nydegger, U.E. Ed.) Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco (100)
- MORETTA, L., FERRARINI, M., DURANTE, M.L., MINGARI, M.C. (1975) Eur.J.Immunol., 5, 565 (95)
- MORRE, D.J., KARTENBECK, J., FRANKE, W.W. (1979) Biochim.Biophys.Acta, 559, 71 (74)
- MURAMATSU, T., KOIDE, N., CECCARINI, C., ATKINSON, P.H. (1976) J.Biol.Chem., 251, 4673 (274)
- NARASIMHAN, S. (1982) J.Biol.Chem., 257, 10235 (246, 255, 256, 257)
- NARASIMHAN, S., HARPAZ, N., LONGMORE, G., CARVER, J.P., GREY, A.A., SCHACHTER, H. (1980) J.Biol.Chem., 255, 4876 (254)
- NARASIMHAN, S., TSAI, D., SCHACHTER, H. (1981) Fed.Proc., 40, 1597 (69)
- NARASIMHAN, S., WILSON, J.R., MARTIN, E., SCHACHTER, H. (1979) Can.J.Biochem., 57, 83 (118)

- NEUBERGER, M.S., RAJEWSKY, K. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1138 (100)
- NEUFELD, E.F., LIM, T.W., SHAPIRO, L.J. (1975) Ann. Rev. Biochem., 44, 357 (86)
- NEUMANN, H., ZEHAU, U., TANKSLEY, T.D. (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 151 (82)
- NICHOLSON, G.L., WINKELHAKE, J.L. (1975) Nature (London), 255, 230 (269)
- NICOLLET, I., LEBRETON, J.P., FONTANNE, M., HIRON, M. (1981) Biochim. Biophys. Acta, 668, 235 (275)
- NIEDERMEIER, W., SCHROENLOHER, R.E., HURST, M. (1972) J. Immunol., 108, 346 (153)
- NIEDERMEIER, W., TOMANA, M., MESTECKY, J. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 257, 527 (36, 156)
- NISONOFF, A., WISSLER, F.C., LIPMAN, L.N., WOERNLEY, D.L. (1960) Arch. Biochem. Biophys., 89, 230 (28)
- NOSE, H., WIGZELL, M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 6632 (80, 99)
- OLDEN, K., PARENT, J.B., WHITE, S.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 650, 209 (82, 84, 85, 282)
- OLDEN, K., PRATT, R.M., YAMADA, K.M. (1978) Cell, 13, 461 (83)
- OUCHTERLONY, O. (1949) Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507 (113)
- PADLAN, E.A., DAVIES, D.R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 819 (45)
- PALADE, G.E. (1975) Science, 189, 347 (74, 84)
- PALO, J., SAVOLAINEN, H. (1972) J. Chromatogr., 65, 447 (119)
- PAPACONSTANTINO, J., HILL, R.E., GIBSON, W.H., RAO, E.Y. (1978) Differentiation, 10, 139 (279)
- PARKHOUSE, R.M.E., ASKONAS, B.A., DOORMASHKIN, R.R. (1970) Immunology, 18, 525 (26)
- PARODI, A.J., LELOIR, L.F. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 559, 1 (63)
- PAZ PARENTE, J., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. (1984 a) Anal. Biochem., (*sous presse*) (39, 121)
- PAZ PARENTE, J., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. (1984 b) J. Chromatogr., 288, 147 (277)
- PAZ PARENTE, J., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. (1982 a) J. Chromatogr., 249, 199 (120, 178)

- PAZ PARENTE, J., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B., van HALBEEK, H., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J.F.G. (1983) *FEBS Lett.*, 152, 145 (233, 254)
- PAZ PARENTE, J., WIERUSZESKI, J.M., STRECKER, G., MONTREUIL, J., FOURNET, B., van HALBEEK, H., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J.F.G. (1982 b) *J.Biol.Chem.*, 257, 13173 (233, 254)
- PIERCE-CRETEL, A., DEBRAY, H., MONTREUIL, J., SPIK, G., van HALBEEK, H., MUTSAERS, J.H.G.M., VLIEGENTHART, J.F.G. (1984) *Eur.J.Biochem.*, 139, 337 (254)
- PIERCE-CRETEL, A., PAMBLANCO, M., STRECKER, G., MONTREUIL, J., SPIK, G., (1981) *Eur.J.Biochem.*, 114, 169 (30, 154)
- PLESS, D.D., LENNARZ, W.J. (1977) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 74, 134 (65)
- POLJAK, R.J., AMZEL, L.M., AVEY, H.P., CHEN, B.L., PHIZACKERLEY, R.P., SAUL, F. (1973) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 70, 3305 (43, 89, 90)
- POLJAK, R.J., AMZEL, L.M., PHIZACKERLEY, R.P. (1976) *Prog.Biophys.Molec.Biol.*, 31, 67 (45)
- POLLACK, L., ATKINSON, P.H. (1983) *J.Cell Biol.*, 97, 293 (247, 250, 253, 261, 277, 284)
- PORTER, R.R. (1959) *Biochem.J.*, 73, 119 (28, 88, 160)
- PRIEELS, J.P., PIZZO, S.V., GLASGOW, L.R., PAULSON, J.C., HILL, R.L. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 75, 2215 (86)
- PRIVES, J.M., OLDEN, K. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 77, 5263 (83)
- PULCIANI, S., SANTOS, E., LAUVER, A.V., LONG, L.K., ROBBINS, K.C., BARBACID, M. (1982) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 79, 2845 (272)
- PUTNAM, F.W., FLORENT, G., PAUL, C., SHINODA, T., SHIMIZU, A. (1973) *Science*, 182, 287(17, 20, 28, 37, 43)
- RABBITS, T.H. (1983) *Biochem.Soc.Trans.*, 11, 119 (55)
- RADEMACHER, T.W., HOMANS, S.W., FERNANDES, D.L., DWEK, R.A., MIZUOCHI, T., TANIGUCHI, T., KOBATA, A. (1983) *Biochem.Soc.Trans.*, 11, 132 (48, 98, 254)
- RAO, A.K., MEDICINO, J. (1978) *Biochemistry*, 17, 5632 (69)
- RAUVALA, H. (1983) *Trends Biochem.Sci.*, 8, 323 (84)
- READING, C.L., PENHOET, E., BALLOU, C. (1978) *J.Biol.Chem.*, 253, 5600 (117)
- REARICK, J.I., KULCZYCKI, A.Jr., KORNFEL, S. (1983) *Arch.Biochem.Biophys.*, 220, 95 (33)

- REITMAN, M. L., TROWBRIDGE, I. S., KORNFELD, S. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 10357 (66)
- REYES, F. (1979) *Conc. Med.*, 45, 7305 (10)
- RHODES, J. (1973) *Nature (London)*, 243, 527 (92)
- RICHARDSON, N. E., BUTTRESS, N., FEINSTEIN, A., STRATIL, A., SPOONER, R. L. (1973) *Biochem. J.*, 135, 87 (279)
- RIMINGTON, C. (1931) *Biochem. J.*, 25, 1062 (114)
- ROBBINS, J. C., NICOLSON, G. L. (1975) in "Biology of tumors: Surfaces, immunology and comparative pathology", Vol. 4, p. 3, New York, Plenum Publishing Corporation (270)
- ROGERS, J., EARLY, P., CARTER, C., CALAME, K., BOND, M., HOOD, L., WALL, R. (1980) *Cell*, 20, 303 (59)
- ROHR, K. (1952) *Acta Haemat.*, 7, 321 (11)
- ROSEMAN, S. (1970) *Chem. Phys. Lipids*, 5, 270 (62, 68)
- SAKANO, H., HUPPI, K., HEINRICH, G., TONEGAWA, S. (1979) *Nature*, 280, 288 (57)
- SCHACHTER, H. (1981) in "Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases", p. 73 (Callahan, W., Lowden, J. A., Eds.) Raven Press, New York (267)
- SCHACHTER, H., NARASIMHAN, S., GLEESON, P., VELLA, G. (1983) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 61, 1049 (255, 265, 280, 285)
- SCHACHTER, H., ROSEMAN, S. (1980) in "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans", p. 85, (Lennarz, W. J., Ed.) Plenum press, New York (62)
- SCHAUER, R. (1978) *Methods Enzymol.*, 50, 64 (115)
- SCHAUER, R., BOER, P., BUDDECKE, E., KRAMER, M. F., VLI EGENTHART, J. F. G., WIEGANDT, H. (Eds.) (1979) in "Glycoconjugates", *Proc. Vth. Symp. Glucoconjugates*, KIEL, Sept. 1979, Thieme, Stuttgart (80)
- SCHNEIDEGGER, J. J. (1955) *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 7, 103 (112)
- SCHLESSINGER, J., STEINBERG, I. Z., GIVOL, D., HOCHMAN, J., PETCH, I. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2775 (99)
- SCHULTZE, H. E., HEREMANS, J. F. (1966) in "Molecular Biology of Human Proteins with special reference to Plasma Proteins", Vol. 1, p. 224, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (144)
- SCHUR, P. H., CHRISTIAN, G. D. (1964) *J. Exp. Med.*, 120, 531 (96)
- SEAGER, M. J., MIQUELIS, R. D., SIMON, C. (1980) *Eur. J. Biochem.*, 113, 91 (82)
- SELIGMAN, M., BROUET, J. C. (1973) *Semin. Hemat.*, 10, 163 (1)
- SELIGMAN, M., KLEIN, M. (1971) *Rev. Prat.*, 21, 883 (16)

- SHARON, N (1975) in "Complex Carbohydrates Their Chemistry, Biosynthesis and Functions" (Sharon, N. Ed.) Addison-Wesley, Reading (80)
- SHARON, N, LIS, H. (1980) in "The Proteins", Vol. V, 3rd. Ed. (Neurath, H., Hill, R.L., Eds.) Academic Press, New York (80)
- SHELTON, E., SMITH, M. (1970) *J. Mol. Biol.*, 54, 615 (49)
- SHILO, B.Z., WEINBERG, R.A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 6789 (272)
- SHIMIZU, A., PUTNAM, F.W., PAUL, C., CLAMP, J.R., JOHNSON, I. (1971) *Nature New Biol.*, 231, 73 (36, 37, 98; 117, 153, 273)
- SHINODA, T., TITANI, K., PUTNAM, F.W. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 4463 (34)
- SIA, R.H.P. (1924) *China M.J.*, 38, 35 (108)
- SIDMAN, C. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 9374 (100)
- SILVERTON, E.W., NAVIA, M.A., DAVIES, D.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5140 (46, 47)
- SINGER, P.A., SINGER, H.H., WILLIAMSON, A.R. (1980) *Nature*, 285, 294 (59)
- SNIDER, M.D., SULTZMAN, L.A., ROBBINS, P.W. (1980) *Cell*, 21, 385 (65)
- SOX, H.C.; Jr., HOOD, L. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 66, 975 (35)
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. (1958) *Anal. Chem.*, 30, 1190 (113)
- SPIEGELBERG, H.L. (1974) *Adv. Immunol.*, 19, 259 (88)
- SPIEGELBERG, H.L., ABEL, C.A., FISHKIN, B.G., GREY, H.M. (1970) *Biochemistry*, 9, 4217 (35)
- SPIK, G., SIX, P., MONTREUIL, J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 584, 203 (69)
- SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J. (1975) *FEBS Lett.*, 50, 296 (249)
- STAHL, P., RODMAN, J.S., MILLER, M.J., SCHLESINGER, P.H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 1399 (102, 86)
- STAHL, P., SCHLESINGER, P.H. (1980) *Trends Biochem. Sci.*, 5, 194 (86)
- STANLEY, P., SUDO, T. (1981) *Cell*, 23, 763 (252)
- STANELONI, R.J., LELOIR, L.F. (1982) *C.R.C. Critical Rev. Biochem.*, 12, 289 (63)
- STANELONI, R.J., UGALDE, R.A., LELOIR, L.F. (1980) *eur. J. Biochem.*, 105, 275 (63)
- STOTT, D.I., WILLIAMSON, A.R. (1982) in "Compreh. Biochem." (Neuberger, A. Ed.) Vol. 19 B, part II, p. 189, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam (16, 75, 88, 95)

- STRECKER, G. (1977) in "Glycoprotéines et glycoprotéinoses : les Oligosaccharidoses", p.13 (Farriaux, J.P., Ed.) Crouan et Roques Lille (266)
- STRECKER, G., HERLANT-PEERS, M.C., FOURNET, B., MONTREUIL, J., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLI EGENTHART, J.F.G., FARRIAUX, J.P. (1977) Eur. J. Biochem., 81, 165 (268, 259)
- STRECKER, G., MICHALSKI, J.C., HERLANT-PEERS, M.C., FOURNET, B., MONTREUIL, J., (1979) Proc. 4th. Int. Symp. on Glycoconjugates, Woods Hole, 1977, p.945, Academic Press, New York (259)
- STRECKER, G., MONTREUIL, J. (1971) Clin. Chim. Acta, 33, 395 (268)
- STRECKER, G., MONTREUIL, J. (1979) Biochimie, 61, 1199 (30, 80, 267, 268)
- STROUS, G. J. A. M., LODISH, H. F. (1980) Cell, 22, 709 (74)
- STRUCK, D. K., SIUTA, P. B., LANE, M. D., LENNARZ, W. J. (1978) J. Biol. Chem., 256, 5332 (82)
- SUGGET, A. (1975) in "Water, a comprehensive Treatise" (FRANKS, F., Ed.) Vol. IV, p.519, Plenum Press, New York (84)
- SUTTON, B. J., PHILIPPS, D. C. (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 130 (279)
- SUZUKI, T., DEUTSCH, H. F. (1967) J. Biol. Chem., 242, 2725 (116)
- TABAS, I., KORNFELD, S. (1978) J. Biol. Chem., 253, 7779 (255)
- TABAS, I., KORNFELD, S. (1982) Methods Enzymol., 83, 416 (66)
- TABAS, I., SCHLESINGER, S., KORNFELD, S. (1978) J. Biol. Chem., 253, 716 (214)
- TABIN, C. J., BRADLEY, S. M., BARGMANN, C. J., WEINBERG, R. A., PAPAGEORGE, A. G., SCOLNICK, E. M., DHAR, R., LOWY, D. R., CHANG, E. H. (1982) Nature (London), 300, 143 (272)
- TAI, T., YAMASHITA, K., ITO, S., KOBATA, A. (1977) J. Biol. Chem., 252, 6687 (254)
- TAKATSUKI, A., ARIMA, A., TAMURA, G. (1971) J. Antibio., 24, 215 (70)
- TAKASAKI, S., KOBATA, A. (1978) Methods Enzymol., 50, 50 (118)
- TARTAKOFF, A., VASSALI, P., DETRAZ, M. (1979) J. Cell Biol., 83, 284 (72, 73, 100)
- THORNBURG, R. W., DAY, J. F., BAYNES, J. W., THORPE, S. R. (1980) J. Biol. Chem., 255, 6820 (102)
- THORPE, S. R., BAYNES, J. W. (1982) in "The Glycoconjugates", Vol. III, p.113 (Horowitz, M. I., Pigman, W., Eds.) Academic Press, New York, London (263)

- TILLMANS, J., PHILIPPI, K. (1929) *Biochem.Z.*, 215, 36 (114)
- TOMITA, M., MARCHESI, V.T. (1975) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 72, 2964 (61)
- TORANO, A., TSUZUKIDA, Y., LIU, Y-S.V., PUTNAM, F.W. (1977) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 74, 2301 (43, 51, 52, 89)
- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P., HARRISON, J.S. (1950) *Nature (London)*, 166, 444 (120)
- TROWBRIDGE, I.S., HYMAN, R., MAZAUSKAS, C. (1978) *Cell*, 14, 21 (80)
- TUSZYNSKI, G.P., BAKER, S.R., FUHRER, J.P., BUCK, C.A., WARREN, L. (1978) *J.Biol.Chem.*, 253, 6092 (271)
- UNKELESS, J.C., EISEN, H.N. (1975) *J.Exp.Med.*, 142, 1520 (92)
- UY, R., WOLD, F. (1977) *Science*, 198, 890 (262, 282)
- VAHERI, A., RUOSLAHTI, E., MOSHER, D.F. (1978) *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 312, 1 (87)
- VANDENHEEDE, J.R., AHMED, A.I., FEENEY, R.E. (1972) *J.Biol.Chem.*, 247, 7885 (83)
- VAN DEN EIJNDEN, D.H., JOZIASSE, D.H., DORLAND, L., van HALBEEK, H., VLIEGENTHART, J.F.G. (1980) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 92, 839 (69)
- VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VELDINK, G.A., VLIEGENTHART, J.F.G., FOURNET, B., RICART, G., MONTREUIL, J., GATHMANN, W.D., AMNOFF, L. (1981 a) *Eur.J.Biochem.*, 118, 487 (84)
- VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., VELDINK, G.A., VLIEGENTHART, J.F.G., STRECKER, G., MICHALSKI, J.C., MONTREUIL, J., HULL, W.E. (1980) *FEBS Lett.*, 121, 71 (268)
- VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J.F.G., JOUANNEAU, J., BOURRILLON, R. (1981 b) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 99, 886 (41, 284)
- VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J.F.G., MONTREUIL, J., FOURNET, B., SCHMID, K. (1981 c) *J.Biol.Chem.*, 256, 5588 (249)
- VARGUES, R. (1955) *Biol.Med.*, 44, 1 (108)
- VARKI, A., KORNFELD, S. (1980) *J.Biol.Chem.*, 255, 8398 (70)
- VASSALI, P., TARTAKOFF, A., PINK, J.R.L., JATON, Jr C. (1980) *J.Biol.Chem.*, 255, 11822 (76)
- VAUGHAN, L., LORIER, M.A., CARREL, R.W. (1982) *Biochim.Biophys.Acta*, 701, 339 (275)

- VERBERT, A., CACAN, R., HOF LACK, B., MONTREUIL, J. (1979) in "Glycoconjugates Res., Proc. 4th. Int. Symp. on Glycoconjugates" Wood Hole, 1977, p. 1091, Academic Press, New York (269)
- VIRELLA, E. S., LECHNER, M. C. (1976) Clin. Chim. Acta, 67, 137 (3)
- VITETTA, E. S., UHR, J. W. (1975) Science (Wash. D. C.) 189, 964 (77)
- VLIEGENTHART, J. F. G., DORLAND, L., van HALBEEK, H. (1983) Adv. Carb. Chem. Biochem., 41, 209 (121, 258)
- VLIEGENTHART, J. F. G., van HALBEEK, H., DORLAND, L. (1981) Pure Appl. Chem., 53, 45 (121)
- WAKSMAN, A., HUBERT, P., CREMEL, G., RENDON, A., BURGUN, C. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 604, 249 (74)
- WALBORG, E. F. (Ed.) (1978) in "Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes", ACS Symp. N° 80, AM. Chem. Soc. Publ., Washington (267)
- WALDENSTROM, J. (1944) Acta. Med. Scand., 117, 216 (10)
- WALDMANN, T. A., STROBER, W. (1969) Prog. Allergy, 13, 1 (92)
- WARIN, Y., BAERT, F., FOURET, R., STRECKER, G., SPIK, G., FOURNET, B., MONTREUIL, J. (1979) Carbohydr. Res., 76, 11 (46, 48)
- WARREN, L., BLITHE, D. L., COSSU, G. (1982) J. Cell Physiol., 113, 17 (275)
- WARREN, L., BUCK, C. A., TUSZYNSKI, G. P. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 516, 97 (271)
- WASSERMAN, R. L., CAPRA, J. D. (1977) Biochemistry, 16, 3160 (20)
- WASSERMAN, R. L., CAPRA, J. D. (1978) Science, 200, 1159 (21, 22)
- WATKINS, W. M. (1980) Adv. Hum. Genet., 10, 1 (268)
- WEINBERG, R. A. (1983) J. Cell Biol., 97, 1661 (278)
- WERNER, I., ODIN, L. (1952) Acta Soc. Med. Upsaliensis, 57, 230 (114)
- WICHMAN, A., BORG, H. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 490, 363 (110, 139)
- WIKLER, P., PUTNAM, F. W. (1970) J. Biol. Chem., 245, 4488 (34)
- WILHELM, P., PILZ, I., GORAL, K., PALM, W. (1980) Int. J. Biol. Macromol., 2, 13 (49, 50)
- WILLIAM, K. J., GOLDING, B., GIVOL, D., DWEK, R. A. (1977) FEBS Lett., 80, 133 (99)

- WINKELHAKE, J.L. (1978) *Immunochemistry*, 15, 695 (7, 25, 88)
- WINKELHAKE, J.L., NICOLSON, G.L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 1074 (93, 102)
- WINKELHAKE, J.L., VOSS, E.W. Jr. (1970) *Biochemistry*, 9, 1845 (90)
- WINTERBURN, P.J., PHELPS, C.F. (1972) *Nature*, 236, 147 (280)
- WINZLER, R.J. (1970) in "Blood in Tissue Antigens, p.117 (Aminoff, D. Ed.)
Acad. Press, New York, London (85)
- WOLD, F. (1981) *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 783 (262, 282)
- WOODRUFF, J.J., WOODRUFF, J.F. (1976) *J. Immunol.*, 117, 852 (88)
- YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., KOBATA, A. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 3862 (33, 66, 254)
- YASMEEN, D., ELLERSON, J.R., DORRINGTON, K.J., PAIN, R.H. (1976) *J. Immunol.*,
116, 518 (93)
- YOSHIMA, H., FURTHMAYR, H., KOBATA, A. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 9713 (254)
- YOSHIMA, H., MATSUMOTO, A., MIZUOCHI, J., KAWASAKI, T., KOBATA, A. (1981) *J.
Biol. Chem.*, 256, 8476 (249)
- ZAGYANSKI, Yu. A. (1975) *Archs. Biochem. Biophys.*, 166, 371 (51)
- ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C., VINCENDON, G. (1972) *J. Chromatog.*, 69, 291 (114)

