

ROLE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES DE LA MOLECULE D'IMMUNOGLOBULINE γ G DANS L'EXPRESSION DE LA SPÉCIFICITÉ ANTICORPS : UNE NOUVELLE TECHNIQUE D'ANALYSE DU COMPLEXE HAPTÈNE-ANTICORPS

M. FOUGEREAU

*Station de Virologie et d'Immunologie,
École nationale supérieure agronomique, 78 - Thiverval-Grignon*

SOMMAIRE

La contribution des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines γ G à la spécificité anticorps est analysée par l'étude de la fixation du haptène 2-4-dinitrophénol par divers mélanges de chaînes polypeptidiques spécifiques et aspécifiques. L'analyse des complexes haptène-mélanges de chaînes est réalisée par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Cette technique démontre directement que la réapparition d'activité anticorps est liée à la reformation de molécules γ S. La mesure quantitative des constantes d'association et l'évaluation des valences moyennes indiquent que l'activité anticorps est maximale pour les mélanges contenant les chaînes complémentaires spécifiques homologues, en accord avec des travaux antérieurs.

INTRODUCTION

Les anticorps spécifiques synthétisés par un organisme animal en réponse à une stimulation antigénique appartiennent à une famille de molécules regroupées récemment sous le terme d'immunoglobulines (Bulletin de l'O. M.S.) parmi lesquelles on distingue quatre classes : γ G, γ A, γ M et γ D, et dont la synonymie se trouve illustrée sur le tableau 1. Un des buts fondamentaux que se propose l'immunochimiste consiste à établir les bases structurales de la spécificité des anticorps. On sait que deux types d'hypothèses ont été proposés : pour PAULING, la spécificité est inscrite exclusivement au niveau de la structure tertiaire, alors que pour LEDERBERG, chaque anticorps est constitué par une séquence univoque d'acides aminés. La faible étendue

du site actif (KABAT, 1960 ; KARUSH, 1962) rend difficile la perception de différences de structures primaires au niveau des molécules γ G intactes, et impose d'isoler des fragments de la molécule plus directement accessibles à l'analyse. C'est à cette nécessité qu'ont tenté de répondre deux techniques de fragmentation des immunoglobulines γ G, les mieux étudiées du point de vue structural : le clivage enzymatique, proposé par PORTER, (1959), permettant d'obtenir deux fragments univalents *Fab*, et un fragment *Fc* inactif, présentant chacun une masse moléculaire d'environ 50 000, et la rupture chimique des ponts disulfures, qui conduisit EDELMAN (1959) à mettre en évidence la nature multichaine de la molécule γ G. Celle-ci apparaît constituée de

TABLEAU I

Les trois principales classes d'immunoglobulines (1)

Nouvelle nomenclature	Anciennes dénominations	Constantes de sédimentation	Concentrations moyennes dans le sérum humain normal (%)	Répliques pathologiques
γ G ou IgG γ A ou IgA γ M ou IgM	γ_2 , γ 7S γ_{SS} γ 1A ou β 2A γ 1M, β 2M, 19S	7S Principalement 7S 19S	1,2 0,4 0,1	Myélome G Myélome A Macroglobuline M

(1) Une quatrième classe a été récemment décrite par ROWE et FAHEY (1965 *a* et *b*) sous le terme « IgD ».

deux types de chaînes polypeptidiques : les chaînes lourdes (masse moléculaire : 55 000), et les chaînes légères (masse moléculaire : 23 000). De la considération de ces masses moléculaires (PORTER, 1962 ; EDELMAN, 1963), et de la connaissance des rapports antigéniques existant entre les fragments et les chaînes polypeptidiques (OLINS et EDELMAN, 1962), devait émerger un modèle de la molécule γ G dans laquelle on distingue quatre chaînes : deux lourdes et deux légères, dont les rapports topologiques ont été schématisés par PORTER (1962), par EDELMAN et BENACERRAF, (1962) et par EDELMAN et GALLY, (1964) (fig. 1). Ces rapports topologiques ont été confirmés par l'analyse des cartes peptidiques des chaînes et des fragments *Fab* et *Fc* (FOUGEREAU et EDELMAN, 1965).

L'existence de chaînes polypeptidiques au sein de la molécule d'immunoglobuline γ G permet d'envisager une nouvelle voie d'approche pour tenter d'établir les bases structurales de la spécificité, en s'efforçant de déterminer la contribution relative de chaque type de chaînes à l'expression de la spécificité d'un anticorps. On sait en effet que les chaînes lourdes et légères isolées sont capables de se réassocier facilement en molécules 7S (OLINS et EDELMAN, 1964) dont les caractéristiques structurales sont très voisines des molécules γ G natives (FOUGEREAU et EDELMAN, 1964). En réalisant des mélanges hybrides de chaînes polypeptidiques, il doit donc être possible de déterminer si le site actif est contenu tout entier sur un seul des deux types de chaînes, ou bien si, au contraire, les deux types de chaînes, lourdes et légères sont indispensables à l'expression de la fonction anticorps. Cette méthode d'étude,

définie d'abord par FRANEK et NEZLIN (1963), puis par EDELMAN et *al.* (1963) nous a donné des résultats intéressants dans le cas des anticorps anti-phages (FOUGEREAU et *al.*, 1964). Nous présentons dans ce mémoire une analyse de l'activité des anticorps anti-2-4-dinitrophénol (DNP). L'aspect qualitatif de la fixation du haptène par divers mélanges de chaînes polypeptidiques est étudié par ultracentrifugation en gradient de saccharose. L'aspect quantitatif est abordé par la technique de dialyse à l'équilibre.

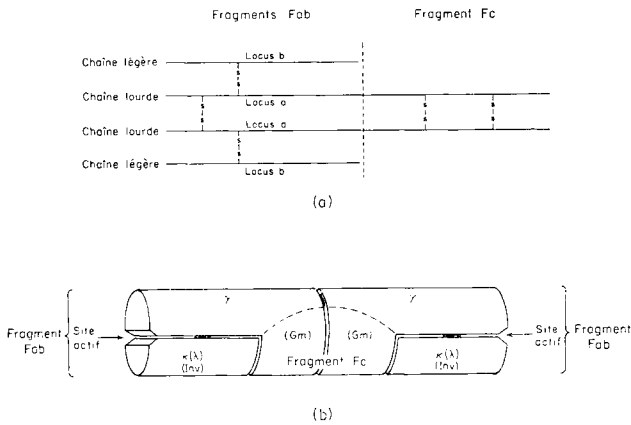


FIG. 1. — Deux modèles proposés pour la molécule d'immunoglobuline γG

a) Molécule d'immunoglobuline γG dans la représentation de PORTER.

b) Modèle décrit par EDELMAN et GALLY. Les ponts disulfures sont schématisés par les courts segments entre les chaînes polypeptidiques.

L'emplacement des marqueurs génétiques de la molécule γG de lapin est arbitrairement indiqué sur le modèle de PORTER. Les facteurs G_m et $I\eta_v$, attachés à la molécule γG humaine sont figurés sur le modèle d'EDELMAN. Les lignes en pointillé indiquent les zones de clivage par la papaine.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Antigène

Nous utilisons le 2-4 dinitrophénol (DNP) (Eastman Kodak, Rochester, N. Y.) couplé à de la sérum albumine bovine (SAB) (Armour, Kankakee, Ill., lot W 19512) selon la technique de FARAH et *al.* (1960).

Immunisations

Des lapines adultes, de race *Nouvelle-Zélande*, reçoivent par voie intra-musculaire 5 mg d'une solution à 1 p. 100 de DNP-SAB émulsionnée dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund (Difco). Un mois plus tard, les animaux reçoivent une série de 3 à 5 injections intra-musculaires bi-hebdomadaires de 10 mg d'antigène sans adjuvant. Les animaux sont sacrifiés par ponction intra-cardiaque.

Préparation des anticorps anti-DNP et des immunoglobulines résiduelles

Les anticorps sont isolés par redissolution du précipité spécifique en excès d'haptène, selon la technique définie par FARAH et *al.* Les immunoglobulines γG résiduelles sont préparées par précipitation au sulfate de sodium (KEKWICK) à partir du sérum immun, après épuisement des anticorps spécifiques par un excès d'antigène.

Réduction et alkylation des immunoglobulines : isolement des chaînes polypeptidiques

La réduction ménagée des immunoglobulines et des anticorps est réalisée suivant la méthode décrite par EDELMAN et POULIK (1961). Les immunoglobulines, en solution à 1 p. 100 dans un tampon *Tris-HCl* (0,05 M ; pH 8,0) sont réduites par l'addition de 2-mercapto-éthanol, à une concentration finale de 0,1 M. Après deux heures d'incubation à la température du laboratoire, la réaction est arrêtée par addition d'iodoacétamide cristallisée (concentration finale 0,2 M). Les chaînes polypeptidiques sont alors séparées suivant la technique de FLEISCHMAN et al. par chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100, en présence d'acide propionique 1,0 M.

Reconstitution de molécules 7S à partir de chaînes polypeptidiques isolées

Cette technique a été décrite en détail par OLINS et EDELMAN (1964) et par FOUGEREAU et EDELMAN (1964). Les chaînes légères sont mélangées aux chaînes lourdes immédiatement après leur sortie de la colonne de chromatographie. Les mélanges sont réalisés dans un rapport molaire des chaînes légères aux chaînes lourdes d'une valeur de 1. Après dialyse contre un tampon neutre pendant trois jours à + 4°C, les mélanges sont analysés par ultracentrifugation en gradient de saccharose, ou bien les molécules 7S sont isolées par chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex G200 en tampon *Tris-HCl* (0,05 M ; pH 8,0).

Ultracentrifugation en gradient de saccharose

Le principe de la méthode, défini par MARTIN et AMES (1961) permet d'évaluer la constante de sédimentation d'une protéine qui, dans les conditions utilisées, est directement proportionnelle à la distance de migration définie à partir du ménisque. Nous utilisons un gradient linéaire de saccharose (5 à 20 p. 100) en solution dans un tampon *Tris-HCl* (0,05 M ; pH 7,6). A la solution d'anticorps ou de molécules de reconstitution, nous ajoutons 10 μ l d'une solution de 2-4-dinitrophénol marqué par ¹⁴C dans son noyau benzène (ICN City of Industry, Calif., activité spécifique : 2 m Ci/mM) à une concentration telle que l'anticorps soit en excès molaire d'environ deux fois. Le complexe anticorps-haptène est alors déposé à la surface du gradient et la centrifugation est effectuée à 100 000 g pendant 15 heures, dans une centrifugeuse Spinco, modèle L (Beckman Inc), au moyen d'un rotor SW 39 à godets basculants. 20 à 25 fractions sont recueillies après percement des tubes de centrifugation à l'aide d'une courte aiguille à injection intra-dermique. Les fractions sont analysées par la réaction de Folin (modification de LOWRY et al.) et par détermination de la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide (Packard). L'emploi d'un marqueur permet d'évaluer les constantes de sédimentation des échantillons analysés. Nous utilisons la phosphatase alcaline de *E. coli* (Worthington Biochemical Co, Freehold, N. J.) dont le coefficient de sédimentation est d'environ 6S. Un μ g d'enzyme est ajouté à la solution analysée avant l'application sur le gradient. La position du pic de phosphatase alcaline après centrifugation est appréciée par la détermination de l'activité enzymatique de portions aliquotes de 10 μ l prélevées dans chaque fraction. L'hydrolyse du *para*-nitro-phényl phosphate (10⁻³ M) est suivie par le développement d'une couleur jaune résultant de la libération de *para*-nitro-phénol.

Dialyse à l'équilibre

Cette méthode d'analyse, introduite en immunologie par MARRACK et SMITH a été considérablement améliorée par EISEN et KARUSH (1949), puis par KARUSH (1956), dont nous suivons le protocole expérimental. Les faibles quantités d'anticorps disponibles (en particulier en ce qui concerne les molécules 7S obtenues par réassociation de chaînes polypeptidiques) ont imposé l'emploi d'un haptène radioactif (DUBERT) : le 2-4 dinitrophénol, marqué par C-14 dans son noyau benzène. Les membranes (Visking, 23-32) sont abondamment lavées dans plusieurs bains successifs d'eau distillée à 75°C, et conservées dans le tampon *Tris-HCl* (0,05 M ; pH 7,6) utilisé pour la dialyse. Au moment de l'emploi, les membranes sont montées entre deux compartiments de verre de 2 ml, et l'ensemble est scellé à la paraffine. Les concentrations des solutions d'immunoglobulines varient entre 10⁻⁶ et 10⁻⁷ M, l'haptène étant utilisé à des concentrations comprises entre 10⁻⁴ et 10⁻⁸ M. Les dialyses sont réalisées à + 4°C, sous constante agitation. Des volumes de 0,1 ml sont prélevés dans chaque compartiment deux jours plus tard, puis à nouveau le troisième jour, afin de s'assurer que l'équilibre a bien été atteint. Chaque échantillon est repris par 1 ml d'éthanol absolu, auquel sont ajoutés 20 ml du mélange suivant : dioxane (500 ml), toluène (400 ml), naphthalène (50 g) et liquifluor (50 ml). Les flacons sont analysés dans un compteur à scintillation liquide. Les résultats expriment la quantité d'haptène fixée par molécule d'anticorps, pour l'extrapolation à une concentration infinie en haptène.

RÉSULTATS

Étude qualitative de la fixation du 2-4-DNP par ultracentrifugation des complexes anticorps-haptène en gradient de saccharose

L'emploi d'un anticorps anti-haptène est particulièrement indiqué lors des études immuno-chimiques, car le déterminant antigénique que l'on utilise est bien défini chimiquement, le mécanisme de la réaction est bien connu, et il est en outre possible de calculer les constantes d'association, que nous exprimerons ici par la valeur des pentes initiales.

En premier lieu, nous avons examiné l'aspect qualitatif de la fixation du haptène par les mélanges de chaînes polypeptidiques, en étudiant le comportement des complexes à l'ultracentrifugation en gradient de saccharose. Cette méthode permet d'identifier directement la fraction d'un mélange qui est responsable de l'activité anticorps. L'exemple présenté sur la figure 2 illustre la comparaison entre la fixation du haptène par l'anticorps purifié, et la même préparation préalablement soumise à diverses conditions de réduction et de dissociation. A cet effet, la solution d'anticorps a été divisée en trois lots. Le premier est utilisé tel quel. Le second est soumis à réduction et alkylation en l'absence d'urée, dans les conditions exposées au chapitre « matériel et techniques ». Le mercaptan est éliminé par dialyses successives contre un tampon neutre pendant trois jours. Le troisième lot est réduit et alkylé puis les chaînes sont dissociées par dialyse en acide propionique 0,5 M pendant 16 heures, puis réassociées par dialyse de trois jours en tampon neutre. A chacune de ces préparations, qui contiennent la même quantité de protéines, est ajoutée une quantité de DNP radioactif, calculée de manière à placer l'anticorps en excès molaire de deux fois. On observe (fig. 2 a) que le pic de sédimentation de l'anticorps purifié coïncide exactement avec la courbe de radioactivité, ce qui indique une fixation complète du haptène. La réduction et l'alkylation de l'anticorps suivies d'une dialyse en tampon neutre n'affecte pas le profil de sédimentation, et ne semble donc pas modifier la fixation du haptène (fig. 2 b). Si l'anticorps est réduit, alkylé, puis exposé à l'acide propionique avant la dialyse en tampon neutre, on observe l'apparition d'agrégats (fig. 2 c), mais le haptène reste essentiellement fixé au pic d'anticorps 7S.

Des mélanges, préparés cette fois à partir de chaînes polypeptidiques isolées par gel-filtration après réduction et alkylation d'anticorps anti-DNP et d'immunoglobulines non spécifiques provenant du même lapin sont analysés dans les mêmes conditions (fig. 3). La présence d'un pic de radioactivité associé à la région 7S illustre de façon directe que l'activité des mélanges est due à la reformation effective de molécules complètes. La fixation du DNP radioactif est maximale lorsque les mélanges renferment les chaînes homologues spécifiques (fig. 3 a), en accord avec les expériences relatives à la neutralisation du phage. Les molécules de haptène non fixées par les molécules 7S sont distribuées sous la forme d'un gradient de diffusion ainsi qu'en témoignent les expériences de contrôle (fig. 3 e et 3 f). On note également que les chaînes lourdes spécifiques isolées sont capables de fixer le haptène (fig. 3 d). Cette observation est à rapprocher des résultats de FLEISCHMAN *et al.* (1963) et

d'UTSUMI et KARUSH, et se trouve en accord avec la persistance d'une activité résiduelle des chaînes lourdes constatée dans les expériences de neutralisation du phage (FOUGEREAU *et al.*). Le problème de la pureté des chaînes lourdes isolées est évidemment crucial, et on notera à ce propos que le pic de sédimentation des chaînes lourdes spécifiques coïncide exactement avec celui de la phosphatase alcaline, dont la constante de sédimentation est de 6S.

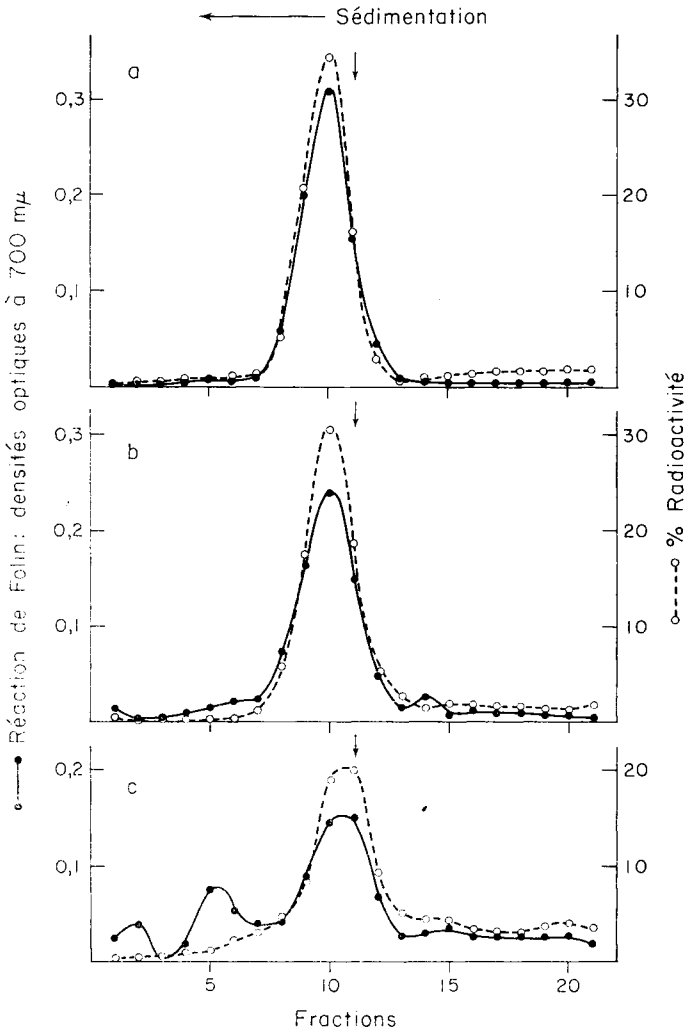


FIG. 2. — Analyse par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100) de complexes anticorps anti-DNP et du haptène 2-4-DNP marqué par ^{14}C

a) Anticorps purifié.

b) Anticorps réduit, alkylé, et immédiatement dialysé en tampon neutre.

c) Anticorps réduit, alkylé, dialysé en acide propionique 0,5 M, puis dialysé en tampon neutre.

L'anticorps est en excès molaire d'environ deux fois. Les protéines sont analysées par la méthode de FOLIN (—●—), et le 2-4-DNP radioactif est analysé par scintillation liquide, les résultats exprimant le pourcentage de la radioactivité totale présente dans chaque fraction (---○---).

↓ : pic d'activité de la phosphatase alcaline.

Expériences de dialyse à l'équilibre

La fixation du haptène a été finalement étudiée quantitativement par la technique de dialyse à l'équilibre. Les analyses de l'activité des mélanges ont été effectuées sur les fractions 7S isolées par chromatographie d'exclusion à partir des mélanges de reconstitution. La représentation graphique des résultats est exprimée en portant les valeurs de r/c en fonction de r , où r représente le nombre moyen de sites actifs

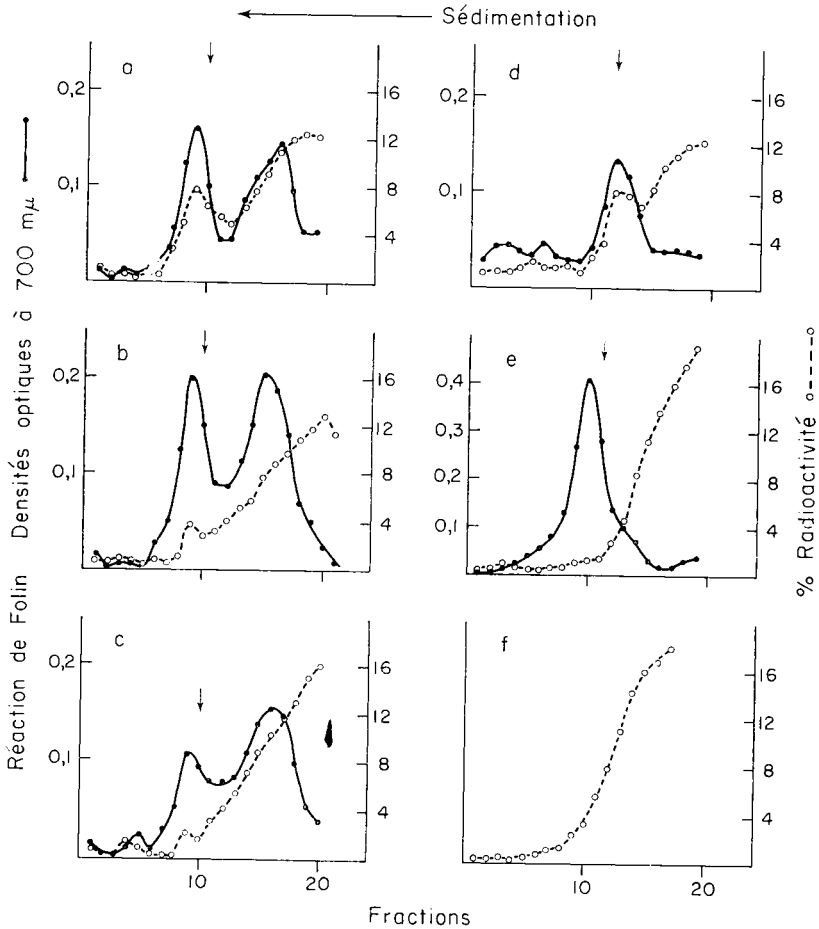


FIG. 3. — Analyse par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100) de l'activité de fixation du 2-4-DNP radioactif par divers mélanges de chaînes polypeptidiques d'anticorps et d'immunoglobulines γ G de lapin

- a) Mélange II (DNP) + L (DNP).
- b) Mélange H (DNP) + L (γ G).
- c) Mélange H (γ G) + L (DNP).
- d) Chaînes II (DNP).
- e) Immunoglobulines γ G.
- f) Dinitrophénol seul.

Les mélanges sont analysés suivant les indications de la figure 2.

fixés à l'haptène par la molécule d'anticorps, et c la concentration en haptène libre (EISEN et KARUSH). La constante d'association K_A est donnée par la relation :

$$K_A = \frac{r}{(n-r)c}$$

dans laquelle n représente la valence de l'anticorps. Dans la représentation graphique adoptée, la courbe coupe l'axe des abscisses pour une valeur de r égale à n . Les constantes d'association K_A sont exprimées par la valeur des pentes initiales.

La courbe ainsi obtenue pour l'anticorps purifié est fortement infléchi, ce qui traduit une hétérogénéité marquée de cette population d'anticorps (fig. 4), et indique qu'un pourcentage relativement important des molécules de cette population possède une affinité très faible pour l'haptène. Les courbes exprimant l'activité des chaînes lourdes isolées et des divers mélanges ont des pentes initiales voisines de celle de

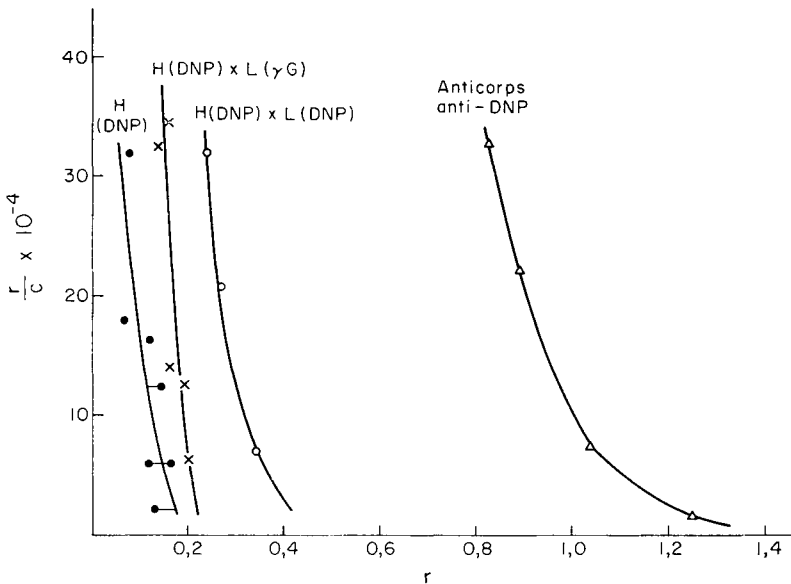


FIG. 4. — Mesure de l'activité de différents mélanges de chaînes polypeptidiques d'anticorps anti-DNP de lapin et d'immunoglobulines γG isolées chez le même sujet, par la technique de dialyse à l'équilibre

l'anticorps, mais elles coupent l'axe des abscisses pour des valeurs de r beaucoup plus faibles. Il s'ensuit que les constantes d'association des diverses préparations (K_A calculées pour les pentes initiales), sont proches, et les fluctuations sont essentiellement imputables aux erreurs expérimentales, considérablement amplifiées sur la représentation graphique, en raison de la forte valeur des pentes. L'extrapolation à l'axe des abscisses permet de déterminer les valences moyennes de chaque population, et de comparer ainsi l'activité des différentes préparations à celle de l'anticorps, prise comme référence (tabl. 2). Les chaînes lourdes isolées ont une valence moyenne de 0,2 (pour une masse moléculaire de 110 000, correspondant au dimère), soit 14 p. 100 de celle de l'anticorps. Les chaînes légères ne fixent pas le haptène, et ne sont pas représentées sur ce graphique. La valence moyenne du

mélange hétérologue représente environ 18 p. 100 de celle de l'anticorps, celle du mélange homologue atteignant 32 p. 100. ROHOLT *et al.* et FRANEK *et al.* obtiennent des valeurs plus élevées pour les mélanges homologues (50 à 60 p. 100). Le pourcentage plus modeste que nous obtenons paraît lié à la forte hétérogénéité de l'anticorps utilisé.

TABLEAU 2

Caractérisation par la méthode de dialyse à l'équilibre de l'activité des molécules 7S isolées à partir des mélanges de chaînes polypeptidiques d'un anticorps anti-DNP de lapin et des immunoglobulines γG résiduelles provenant du même animal

Echantillons	$n^{(1)}$	$\frac{n}{n(\text{Ac})} \times 100$	$K_A^{(2)}$ (litre/mole)	$-\Delta F_0$
Ac anti-DNP	1,4	100	$1,8 \cdot 10^6$	7,95
H (DNP)	0,20	14	$3 \cdot 10^6$	8,15
H (DNP) \times L (γG)	0,25	18	$4,8 \cdot 10^6$	8,4
H (DNP) \times L (DNP)	0,45	32	$3,4 \cdot 10^6$	8,2

⁽¹⁾ Valences moyennes obtenues par extrapolation des courbes à l'axe des abscisses.

⁽²⁾ Constantes d'association définies par la valeur des pentes initiales.

Les immunoglobulines résiduelles ont été isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose à partir de l'immun-sérum épuisé en anti-corps.

DISCUSSION

L'activité anticorps des chaînes lourdes et légères isolées d'une immunoglobuline spécifique est très faible, comparée à celle des molécules γG intactes. Le regain d'activité des mélanges renfermant les chaînes polypeptidiques complémentaires spécifiques, rapporté en premier lieu par FRANEK et NEZLIN, puis par EDELMAN *et al.* (1963) a été confirmé par des observations plus récentes (ROHOLT *et al.*, 1964; FRANEK *et coll.*, 1964; FOUGEREAU *et al.*, 1964), et se trouve en plein accord avec les expériences présentées dans cette communication. La mise au point d'une nouvelle technique d'analyse du complexe haptène-anticorps nous a permis d'illustrer directement le fait que la réapparition d'activité observée pour les mélanges de chaînes polypeptidiques spécifiques était liée à la reformation effective de molécules 7S.

On note toutefois que l'activité des molécules 7S de reconstitution ne représente qu'une fraction de celle de l'anticorps. Cette observation peut être interprétée de deux manières :

a) Toutes les molécules de reconstitution sont relativement homogènes, et une molécule individuelle possède une activité altérée.

b) La population de molécules de reconstitution est hétérogène, et comprend seulement une fraction de molécules qui possèdent une activité voisine de celle de l'anticorps.

Les expériences de dialyse à l'équilibre permettent d'orienter la réponse. Si l'hypothèse *a* est correcte, les valences doivent être du même ordre que celle de l'anti-

corps, les valeurs des constantes d'association K_A étant faibles. La représentation graphique adoptée devrait traduire cette situation par un aplatissement des pentes et une extrapolation à l'axe des abscisses identique à la courbe exprimant l'activité de l'anticorps. On observe l'inverse : les valences sont faibles, mais les pentes initiales sont voisines. C'est donc la seconde hypothèse qui semble prévaloir. Quelle est alors la signification de l'activité résiduelle des chaînes lourdes ? Elle peut être due soit à une contamination par des chaînes légères, soit à une activité intrinsèque réelle. L'examen de la courbe traduisant l'activité des chaînes lourdes spécifiques isolées plaide en faveur d'une contamination, illustrant simplement un cas particulier de l'hypothèse *b*. De plus, la constante de sédimentation de cette préparation de chaînes lourdes est de 6S (voir fig. 3 *d*), comme celles de toutes les préparations de chaînes lourdes d'immunoglobulines γ G de lapin que nous avons examinées. Ce chiffre suggère l'existence de complexes polypeptidiques renfermant des chaînes légères. Le problème de la pureté des chaînes lourdes spécialement dans l'espèce cuniculine, est un obstacle auquel se sont heurtés tous les groupes de chercheurs qui ont tenté de les isoler (à partir de molécules réduites en l'absence d'urée). On notera, en particulier, l'impossibilité, soulignée par FEINSTEIN *et al.*, d'obtenir une préparation de chaînes γ débarrassée des spécificités allotypiques associées aux chaînes légères (en l'occurrence A_4 et A_5). UTSUMI et KARUSH ont étudié le comportement à la dialyse à l'équilibre de chaînes lourdes isolées à partir d'un anticorps anti-lactoside. Ils ont obtenu une courbe qui est compatible avec notre hypothèse *a*, suggérant que les chaînes lourdes auraient une activité propre. Néanmoins, la valeur de K_A obtenue par ces auteurs n'atteint que 10 p. 100 de celle de l'anticorps et ne permet pas de rendre compte que le site actif est tout entier contenu dans les chaînes lourdes. De plus, il n'est pas exclu que deux chaînes lourdes puissent se compléter dans un dimère pour former un « site » dont la conformation serait assez proche de celui qui résulterait de l'association d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. On notera enfin la facilité avec laquelle les chaînes γ non spécifiques peuvent fixer des groupements hapténiques (STEVENSON).

Les résultats présentés dans ce mémoire, en accord avec les observations de ROHOLT *et al.* (1964), EDELMAN *et al.*, (1963), METZGER *et al.* (1964), FRANEK et NEZLIN, (1963) conduisent à proposer que les deux types de chaînes polypeptidiques, lourdes et légères, contribuent à la spécificité de la réaction anticorps. Le problème qui se pose dès lors est d'établir si les deux chaînes participent directement à la formation du site actif, constituant, selon l'hypothèse d'EDELMAN *et al.* (1963), un site partagé, ou bien si l'une des chaînes aurait un rôle plus indirect, en favorisant l'expression de la configuration adéquate de la chaîne complémentaire, portant seule le site actif (« site modulé » d'EDELMAN *et al.*).

Reçu pour publication en décembre 1965.

REMERCIEMENTS

Nous sommes particulièrement heureux d'exprimer notre profonde gratitude au Dr G. M. EDELMAN dans le laboratoire duquel le présent travail a été réalisé, alors que nous étions boursier du Comité de Biologie moléculaire.

SUMMARY

ROLE OF POLYPEPTIDE CHAINS OF γ G IMMUNOGLOBULIN MOLECULES
 IN ANTIBODY SPECIFICITY : A NEW METHOD
 OF ANALYSIS OF HAPTEN-ANTIBODY COMPLEX

Reconstitution of γ S molecules from isolated polypeptide chains of γ G immunoglobulin molecules has already provided an interesting tool in order to establish the relationship between multi-chain structure of γ G immunoglobulin and antibody specificity. Mixtures prepared from heavy and light chains of γ G immunoglobulin and/or specific antibody directed against 2-4 dinitrophenol group were allowed to bind this hapten, and the resulting complexes were submitted to ultracentrifugation in a sucrose density gradient. The elution pattern of the gradient clearly indicated that the binding activity was associated with γ S molecules.

A quantitative analysis was achieved by means of equilibrium dialysis. The best recovery of binding activity was observed in mixtures containing homologous complementary chains, in agreement with previous reports.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DUBERT J. M., 1959. Thèse, Paris.
- EDELMAN G. M., 1959. Dissociation of γ -globulin. *J. amer. chem. Soc.*, **81**, 3155-3156.
- EDELMAN G. M., BENACERRAF B., 1962. On structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma-system. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **48**, 1035-1042.
- EDELMAN G. M., GALLY J. A., 1964. A model for the γ S antibody molecule. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **51**, 846-853.
- EDELMAN G. M., OLINS D. E., GALLY G. A., ZINDER N., 1963. Reconstitution of immunologic activity by interaction of polypeptide chains of antibodies. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **50**, 753-761.
- EDELMAN G. M., POULIK M. D., 1961. Studies on structural units of the γ -globulins. *J. exper. Med.*, **113**, 861-884.
- EISEN H. N., KARUSH F., 1949. The interaction of purified antibody with homologous hapten, antibody valence and binding constant. *J. amer. chem. Soc.*, **71**, 363-365.
- FARAH F., KERN M., EISEN H. N., 1960. The preparation and some properties of purified antibody specific for the 2-4 DNP group. *J. exper. Med.*, **112**, 1195-1210.
- FEINSTEIN A., GELL P. G. H., KELUS A., 1963. Immunochemical analysis of rabbit γ -globulin allotypes. *Nature*, **200**, 653-654.
- FLEISCHMAN J. B., PAIN R. M., PORTER R. R., 1962. Reduction of γ -globulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, Supplément 1, 174-180.
- FLEISCHMAN J. B., PORTER R. R., PRESS E. M., 1963. The arrangement of the peptide chains of γ -globulin. *Biochem. J.*, **88**, 220-227.
- FOUGEREAU M., EDELMAN G. M., 1964. Resemblance of the gross arrangement of polypeptide chains in reconstituted and native γ -globulins. *Biochemistry*, **3**, 1120-1126.
- FOUGEREAU M., EDELMAN G. M., 1965. Corroboration of recent models of the γ G immunoglobulin molecule. *J. exper. Med.*, **121**, 373-394.
- FOUGEREAU M., OLINS D. E., EDELMAN G. M., 1964. Reconstitution of antiphage antibodies from L and H polypeptide chains and the formation of interspecies molecular hybrids. *J. exper. Med.*, **120**, 349-358.
- FRANEK F., KOTYNEK O., SIMEK J., ZIKAN J., 1964. *S-sulphonated anti dinitrophenyl antibodies. Some specific features of the interaction between isolated heavy and light subunits.* Molecular and cellular basis of antibody formation. Prague, Publié par la Czechoslovak Acad. Sci.
- FRANEK F., NEZLIN R. S., 1963. Recovery of antibody combining activity by interaction of different peptide chains isolated from purified horse antitoxins. *Folia Microbiol.*, **8**, 128-130.
- KABAT E. A., 1960. An upper limit for the size of the human anti-dextran combining site. *J. Immunol.*, **84**, 82-85.
- KARUSH F., 1956. The interaction of purified antibody with optically isomeric haptens. *J. amer. chem. Soc.*, **78**, 5519-5526.

- KARUSH F., 1962. Immunologic specificity and molecular structure. *Adv. in Immunol.*, **2**, 1-40. W. H. Ta-
haferro et J. H. Humphrey, éditeurs, Acad. Press, N. Y.
- LEDERBERG J., 1959. Genes and antibodies. *Science*, **129**, 1649-1653.
- MARRACK J. R., SMITH F. C., 1932. Quantitative aspects of immunity reactions : combination of anti-
bodies with simple haptens. *Brit. J. exper. Pathol.*, **13**, 394-402.
- MARTIN R. G., AMES B. N., 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes :
application to protein mixture. *J. biol. Chem.*, **236**, 1372-1379.
- METZGER H., WOFSEY L., SINGER S. J., 1964. The participation of A and B polypeptide chains in the
active sites of antibody molecules. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **51**, 616-618.
- OLINS D. E., EDELMAN G. M., 1962. The antigenic structure of the polypeptide chains of human γ -glo-
bulin. *J. exper. Med.*, **116**, 635-651.
- OLINS D. E., EDELMAN G. M., 1964. Reconstitution of 7S molecules from L and H polypeptide chains
of antibodies and γ -globulins. *J. exper. Med.*, **119**, 789-815.
- PORTER R. R., 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Bio-
chem. J.*, **73**, 119-126.
- PORTER R. R., 1962. *The structure of γ -globulins and antibodies. In Symposium on basic problems in neo-
plastic disease.* A Gellhorn et E. Hirschberg, éditeurs. N. Y. Columbia University Press, p. 177.
- ROHOLT O., ONOUE K., PRESSMAN D., 1964. Specific combination of H and L chains of rabbit γ -glo-
bulins. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **51**, 173-178.
- UTSUMI S., KARUSH F., 1964. The subunits of purified rabbit antibody. *Biochemistry*, **3**, 1329-1338.