

LA MOLÉCULE D'IMMUNOGLOBULINE γ G : FORMATION D'HYBRIDES MOLÉCULAIRES

M. FOUGEREAU

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

SOMMAIRE

On étudie la formation de molécules γ S à partir de chaînes polypeptidiques complémentaires non homologues isolées et marquées de façon distinctive par deux isotopes d'iode radioactif (^{131}I et ^{125}I). On montre que les chaînes κ ou λ (protéines de Bence-Jones de type K ou L) peuvent être indifféremment utilisées pour former des molécules γ S, lorsqu'on les mélange à une même population de chaînes lourdes γ . On obtient également des molécules hybrides par réassociation des chaînes polypeptidiques complémentaires des classes γ G et γ M, et entre les chaînes dérivées des immunoglobulines γ G du mouton et du cobaye. La notion de complémentarité des chaînes lourdes et des chaînes légères est discutée en détail du double point de vue de la structure et de la biosynthèse des immunoglobulines.

INTRODUCTION

Les études structurales des immunoglobulines, rendues difficiles en raison de l'hétérogénéité de ce groupe de molécules, se sont trouvées grandement facilitées par l'existence de répliques pathologiques que constituent les protéines myélomateuses. La présence de ces protéines en quantités importantes dans le sérum de malades atteints de myélome, et leur relative homogénéité en font un matériel de choix pour les études de structure. On sait aussi que l'on retrouve dans l'urine des myélomateux une protéine particulière, décrite il y a plus d'un siècle par Henry Bence-Jones, protéine qui a joué un rôle déterminant dans le développement de l'analyse structurale des immunoglobulines. KORNGOLD et LIPARI (1956 *a* et *b*), BURTIN et *al.* (1957) démontrèrent l'existence de déterminants antigéniques communs entre les protéines de Bence-Jones, les protéines du myélome et les immunoglobulines normales. Ces déterminants permettaient de distinguer deux groupes anti-

géniques : I et II. La parenté fut ensuite étendue aux macroglobulines γ_M (KORN-GOLD et VAN LEEUWEN, 1957), et aux immunoglobulines γ_A (HEREMANS, 1960 ; FRANKLIN et STANWORTH, 1961).

Après la mise en évidence des chaînes polypeptidiques de la molécule d'immunoglobuline γ_G (EDELMAN, 1959), EDELMAN et POULIK (1961) proposèrent que les protéines de Bence-Jones n'étaient autre chose que des chaînes polypeptidiques communes aux trois classes d'immunoglobulines. La nature des protéines de Bence-Jones fut bientôt élucidée par l'analyse structurale (EDELMAN et GALLY, 1962 PUTNAM, 1958 ; PUTNAM *et al.*, 1963 ; SCHWARTZ et EDELMAN). Ces molécules sont des chaînes légères, qui, de ce fait constituent l'élément structural commun aux différentes classes d'immunoglobulines. Les caractéristiques spécifiques de chaque classe sont apportées par les chaînes lourdes, dont les propriétés chimiques, électrophorétiques et immunologiques diffèrent entre immunoglobulines γ_G , γ_A et γ_M (COHEN, EDELMAN, 1963 ; CARBONARA et HEREMANS). On trouvera sur le tableau I la nomenclature détaillée des chaînes et des fragments enzymatiques des immunoglobulines (*Bulletin de l'O. M. S.*).

TABLEAU I

Nomenclature des immunoglobulines. (1)

Classes	Fragments enzymatiques	Chaînes polypeptidiques		
		Chaînes lourdes (spécifiques des classes)	Chaînes légères (ubiquitaires)	Type antigénique
γ_G ou IgG (γ^2 , γ_{SS} ou 7S)	Fab (S, I, I', II, A, C) Fc (F, III, B) Fd («A pieces»)	γ (H, A)	κ ou λ	K (I)
γ_A ou IgA (β_2A ou γ_1A)		α (II, A)		L (II)
γ_M ou IgM (β_2M , γ_1M , 19S)		μ (H, A)		

(1) *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1964, **30**, 447.

Les symboles anciens figurent entre parenthèses

Le présent mémoire se propose de montrer que l'aspect ubiquitaire des chaînes légères au sein des immunoglobulines peut être mis en évidence de manière synthétique, en utilisant la formation d'hybrides moléculaires à partir de chaînes polypeptidiques isolées, dérivées de molécules de types antigéniques distincts, de classes et d'espèces animales différentes.

MATÉRIEL, ET TECHNIQUES

Immunoglobulines et protéines myélomateuses

L'immunoglobuline γ G humaine est une préparation commerciale de *Lederle Laboratories, Pearl River, N. Y.*, lot C 780 (fraction II de Cohn).

Les immunoglobulines γ G de mouton et de cobaye sont préparées à partir de sérums individuels, soit par précipitation au sulfate de sodium (KEKWICK) suivie d'une chromatographie sur di-éthyl-amino-éthyl (DEAE)-cellulose équilibrée en tampon phosphate 0,02 M, pH 6,5 (PETERSON et SOBER), soit par électrophorèse de zone sur amidon.

Les immunoglobulines γ M humaines proviennent d'un complexe cryoglobulinique dissocié à 22°C et soumis à chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G 200, afin d'en séparer les constituants 7S et 19S.

Les protéines myélomateuses sont préparées par électrophorèse de zone sur amidon à partir de sérums de malades atteints de myélome. Les protéines de Bence-Jones sont purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium à partir des urines des mêmes malades.

Marquage des immunoglobulines à l'iode radioactif

L'iodination des protéines est pratiquée suivant les techniques décrites par HELMKAMP *et al.* (1960) et de MCFARLANE (1963). Les protéines sont dissoutes en tampon borate (0,2 M, pH 8,0) auquel est ajouté du chlorure de sodium, à la concentration finale de 0,15 M. L'iode radioactif est apporté sous la forme d'iodate de sodium exempt d'entraîneur (^{125}I de *Volk Radiochemical Co. Chicago* et ^{131}I d'*Oak Ridge National Laboratory*). L'excès d'iode non fixé est retenu sur une courte colonne d'Amberlite IRA 401 (*Mallinckrodt Chemical Works*). Les immunoglobulines sont réduites après marquage avec l'un des isotopes. Les chaînes polypeptidiques sont séparées, et leur activité spécifique par unité de densité optique est déterminée. Les chaînes complémentaires, marquées par des isotopes distincts, sont réassociées dans les conditions précisées ci-dessous. A chaque étape ultérieure de l'expérimentation, il est donc possible d'établir la contribution de chaque isotope à la radioactivité totale, et partant, d'y préciser la participation relative de chaque type de chaînes polypeptidiques. L'analyse simultanée des deux isotopes se fait dans un compteur à scintillation à cristal creux doté de deux canaux (*Nuclear Chicago, Des Plaine, Ill.*). Les corrections dues au bruit de fond, à la décroissance naturelle de radioactivité, à l'interférence des émissions de l'isotope ^{125}I dans la zone de détection de l'isotope ^{131}I sont effectuées toutes les fois qu'il y a lieu.

*Réduction et alkylation des immunoglobulines
et des protéines de Bence-Jones*

Les immunoglobulines sont réduites en tampon *Tris-HCl*, 0,05 M, pH 8,0 par le 2-mercapto-éthanol utilisé à une concentration finale de 0,1 M, et alkylées avec un léger excès d'iodoacétamide, suivant le protocole défini par EDELMAN et POULIK (1961). Les chaînes sont séparées par chromatographie d'exclusion sur gel de

Sephadex, selon la technique de FLEISCHMAN *et al.* Les protéines de Bence-Jones sont soumises au même traitement afin d'être isolées sous leur forme monomérique, seule utilisable pour des expériences de reconstitution moléculaire (GALLY et EDELMAN, 1964).

Reconstitution de molécules 7S à partir de chaînes polypeptidiques isolées et marquées

Cette technique a été décrite en détail par OLINS et EDELMAN. Les chaînes légères marquées par l'iode ^{125}I (ou ^{131}I) sont mélangées aux chaînes lourdes marquées par l'isotope ^{131}I (ou ^{125}I), immédiatement après leur sortie de la colonne de chromatographie, alors qu'elles sont encore en solution dans l'acide propionique 0,5 N. Le rapport de la masse de chaînes légères à celle des chaînes lourdes, exprimé comme le rapport de leurs densités optiques à 280 m μ , est de 3 dans les mélanges à l'origine. Nous le désignerons dans le texte sous le terme de « rapport γ » afin d'alléger l'exposé.

Après trois jours de dialyse contre un tampon neutre, les mélanges sont analysés par ultra-centrifugation en gradient de saccharose, en utilisant la phosphatase alcaline de *E. coli* comme marqueur (OLINS et EDELMAN, 1964 ; FOUGEREAU et EDELMAN, 1964).

RÉSULTATS

Formation de molécules 7S à partir de chaînes γ normales et de chaînes légères isolées à partir d'une immunoglobuline γM pathologique

Cet exemple illustre le caractère interchangeable des chaînes légères entre les classes d'immunoglobulines γG et γM . Sur la figure 1, est représentée la courbe de séparation de molécules γG normales et de molécules γM pathologiques après

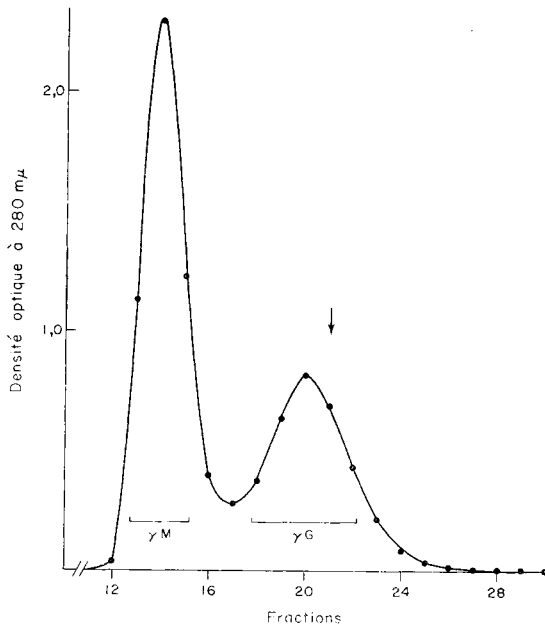


FIG. 1. — Séparation des immunoglobulines γM et γG à partir d'un complexe cryoglobulinique, par chromatographie d'exclusion sur colonne de Séphadex G 200 en présence de tris-NaCl (↓ position du pic de phosphatase alcaline employée comme marqueur)

dissociation à 22°C d'un complexe cryoglobulinique. Le premier pic contient les molécules γ M, ainsi qu'en atteste le cliché d'électrophorèse sur gel d'amidon de la figure 2. Cette immunoglobuline γ M est du type L, et l'on remarquera l'étroitesse de la zone de migration de ses chaînes sur gel d'amidon (fig. 2) comparée à la bande diffuse des chaînes légères d'une immunoglobuline γ G normale. On observera en outre, sur la même figure, la différence de mobilité au niveau des chaînes γ et μ .

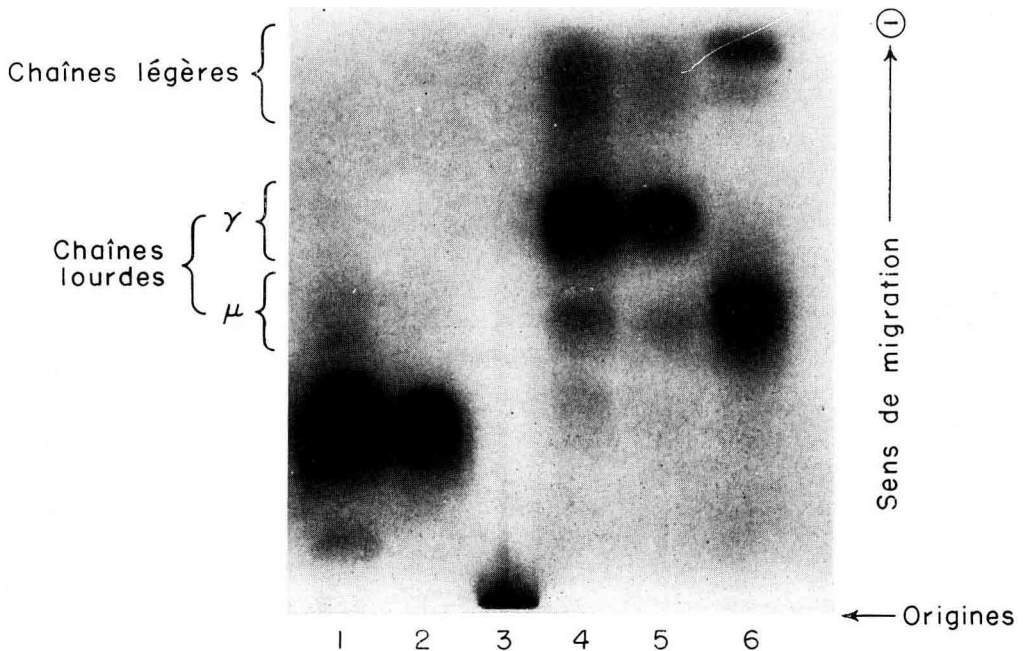


FIG. 2. — *Electrophorèse sur gel d'amidon en tampon urée-formiate (pH 3) d'immunoglobulines γ G et γ M humaines et de leurs produits de réduction.*

1. Immunoglobuline γ G normale.
 2. Immunoglobuline γ G isolée du complexe cryoglobulinique.
 3. Immunoglobuline γ M isolée du même complexe.
 4. Immunoglobuline γ G normale réduite et alkylée.
 5. Immunoglobuline γ G du complexe, réduite et alkylée.
 6. Immunoglobuline γ M du complexe, réduite et alkylée.
- Toutes les réductions ont été effectuées en l'absence d'urée.

Après réduction et alkylation de l'immunoglobuline pathologique γ M, les chaînes légères (λ) sont isolées et immédiatement mélangées à des chaînes lourdes (γ) d'immunoglobuline γ G normale. Après trois jours de dialyse en tampon neutre, le mélange est analysé par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Les chaînes isolées sont soumises à l'ultracentrifugation dans les mêmes conditions. Les trois courbes d'éluion sont représentées sur la figure 3. Les chaînes λ isolées sédimentent en un pic unique dont la constante de sédimentation calculée à partir de la position du pic de phosphatase alcaline est d'environ 3,4S. Les chaînes lourdes γ présentent un pic principal, dont la constante de sédimentation est de 5,4S. On note l'existence d'un ensemble hétérogène d'agréats entre le pic principal et le fond du tube. L'analyse du mélange révèle l'existence de molécules 6,7S. Les chaînes γ y sont presque entièrement contenues. Une partie seulement des chaînes λ est incorporée dans les

molécules de reconstitution, en accord avec des observations antérieures (FOUGEREAU et EDELMAN, 1964). Le rapport γ , calculé au niveau du pic 6,7S est de 4, et est compatible avec une réassociation des chaînes polypeptidiques conforme à l'arrangement défini pour la molécule d'immunoglobuline γ G (FOUGEREAU et EDELMAN, 1965).

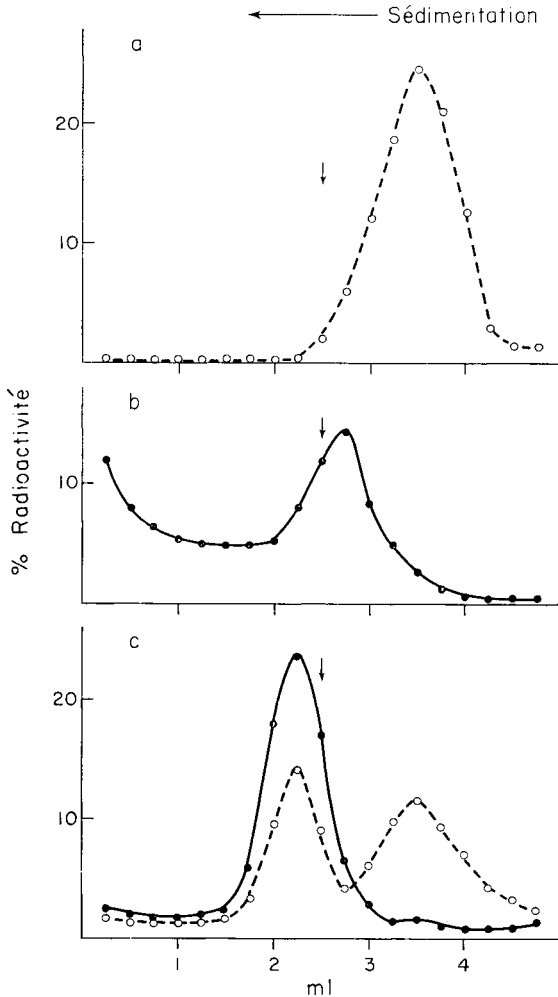


FIG. 3. — Analyse par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100) de mélanges réalisés à partir des chaînes λ isolées d'une immunoglobuline pathologique γ M marquée par ^{125}I (---○---○---), et des chaînes γ normales marquées par ^{131}I (—●—) (c).

a) chaînes λ isolées et b) chaînes γ isolées.

↓ pic d'activité de la phosphatase alcaline utilisée comme marqueur.

Interchangeabilité des chaînes κ et des chaînes λ

Ainsi que nous l'avons indiqué dans l'introduction, les protéines de Bence-Jones isolées des urines d'un malade atteint de myélome, ne sont autre chose que les chaînes légères qui n'ont pas été incorporées dans la protéine myélomateuse

que l'on peut isoler du sérum de ce même malade. Une protéine de Bence-Jones doit donc permettre la reconstitution *in vitro* d'une protéine de myélome G si elle est mise en présence de la chaîne γ correspondante. La réalité de cette hypothèse a été démontrée par GALLY et EDELMAN (1964), qui précisèrent en outre que les protéines de Bence-Jones devraient être apportées sous leur forme monomérique dans le mélange. On sait d'autre part que les molécules d'immunoglobulines humaines normales se répartissent en deux groupes antigéniques K et L, selon qu'elles contiennent des chaînes κ ou λ , mais qu'une molécule individuelle ne paraît pas contenir à la fois les deux types de chaînes légères. Nous avons cherché à établir si une restriction existait *in vitro*, en étudiant la formation de molécules 7S à partir d'une même population de chaînes lourdes, mais en utilisant, dans des séries expérimentales distinctes, des chaînes légères fournies par des protéines de Bence-Jones appartenant aux deux types antigéniques différents K et L.

Les chaînes γ proviennent d'une protéine myéломateuse de groupe L. Les

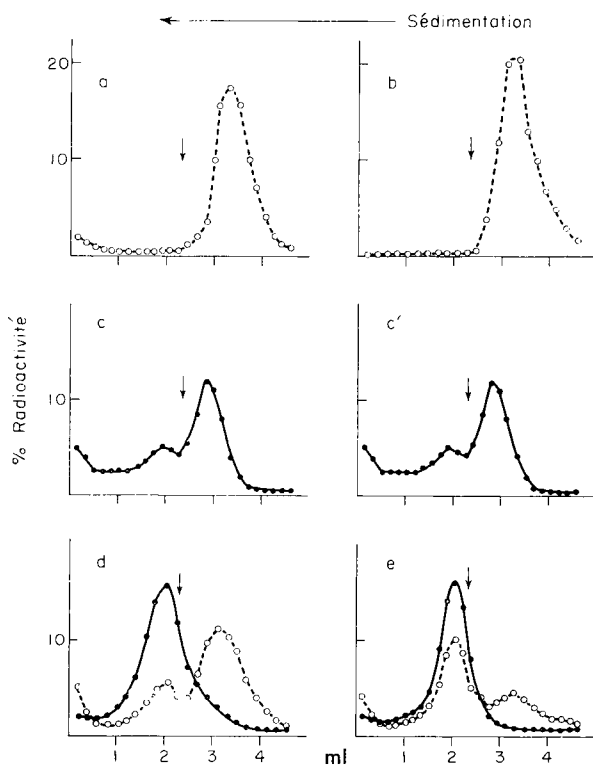


FIG. 4. — Analyse par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100), de mélanges réalisés par l'addition, à une même population de chaînes γ d'une protéine de myélome G de type L, de protéines de Bence-Jones appartenant soit au type K, soit au type L.

- a) chaînes λ isolées. (Protéines de Bence-Jones de type L, réduites et alkylées).
 b) chaînes κ isolées. (Protéines de Bence-Jones de type K, réduites et alkylées).
 c et c') chaînes γ isolées.
 d) Mélange de chaînes γ (—●—), et de chaînes λ (---○---).
 e) Mélange de chaînes γ (—●—), et de chaînes κ (---○---).
 Les chaînes γ sont marquées par ^{125}I , et les chaînes légères par ^{131}I .
 ↓ pic d'activité de la phosphatase alcaline.

chaînes λ sont apportées par la protéine de Bence-Jones correspondante, et les chaînes κ par une autre protéine de Bence-Jones, celle-là de type K. L'analyse des mélanges, par ultracentrifugation en gradient de saccharose (fig. 4), indique clairement que les deux types de chaînes légères sont capables de se réassocier à une même population de chaînes lourdes, primitivement combinées à des chaînes λ dans la protéine de myélome G dont elles dérivent. La qualité de la reconstitution est même meilleure pour le mélange utilisant les chaînes κ . La valeur du rapport des masses γ/λ est de 2,6, alors qu'elle est de 4,2 pour le rapport γ/λ . Des fluctuations

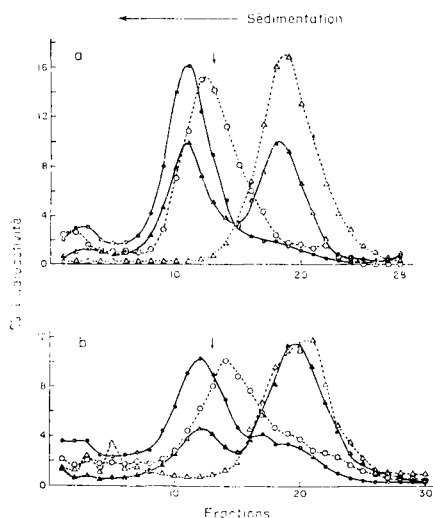


FIG. 5. — Analyse par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100) de mélanges hybrides de chaînes polypeptidiques d'immunoglobulines γ G de mouton et de cobaye

- a) chaînes lourdes de mouton marquées par ^{125}I —●— associées à des chaînes légères de cobaye inmarquées par ^{131}I —▲—, —○— chaînes lourdes isolées et —△— chaînes légères isolées.
 b) chaînes lourdes de cobaye marquées par ^{131}I —●— associées à des chaînes légères de mouton marquée par ^{125}I —▲—, —○— chaînes lourdes isolées et —△— chaînes légères isolées.
 ↓ pic d'activité de la phosphatase alcaline.

des valeurs du rapport γ de cet ordre sont couramment observées, et en cette occurrence, pourraient être dues à une dédimérisation incomplète des chaînes λ avant leur mise en mélange.

Formation d'hybrides interspécifiques

Les résultats précédents suggèrent qu'une certaine complémentarité entre les chaînes lourdes et les chaînes légères déborde le cadre des classes et des groupes antigéniques. Les expériences suivantes se proposent d'établir si cette complémentarité déborde également le cadre des espèces animales.

Des molécules hybrides sont effectivement formées par mélange des chaînes γ d'immunoglobulines γ G de mouton et des chaînes légères d'immunoglobulines γ G de cobaye (fig. 5 a). Les croisements réciproques conduisent aux mêmes conclusions (fig. 5 b). Dans le premier cas, le rapport γ dans les molécules de reconstitution est de 4,2 ; il est de 2,75 dans le second. Cette observation est à rapprocher des résultats

obtenus par OLINS et EDELMAN (1964), indiquant la formation de molécules hybrides entre les chaînes polypeptidiques d'immunoglobulines γ G de lapin et les chaînes complémentaires d'immunoglobulines γ G humaines.

DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette communication indiquent que les limites naturelles des associations de chaînes polypeptidiques complémentaires dans le « système γ » (HEREMANS, 1960) peuvent être aisément débordées par l'expérimentation. On note que l'intégrité des ponts disulfures n'est nullement nécessaire pour la réassociation de chaînes lourdes et légères en molécules γ S, ce qui a été discuté en détail par ailleurs (OLINS et EDELMAN, 1964 ; FOUGEREAU, 1966). Cette situation n'est pas sans évoquer le cas des protéines dans lesquelles les interactions entre les chaînes sont de nature exclusivement non covalentes, comme par exemple l'hémoglobine (INGRAM), et la phosphatase alcaline (SCHLESINGER et LEVINTHAL, 1963). L'association des chaînes polypeptidiques soulève deux sortes de problèmes, l'un portant sur la structure, l'autre sur la synthèse des immunoglobulines (et d'une manière plus générale, des protéines multi-chaînes).

Le premier problème peut se poser de la façon suivante : l'interaction non covalente est-elle le reflet d'une complémentarité des chaînes polypeptidiques entraînant une homologie de leurs structures tertiaires et, éventuellement, primaires ? LEVINTHAL et *al.* (1962) ont pu obtenir des hybrides moléculaires de phosphatases alcalines par réassociation des chaînes dérivées d'enzymes isolées à partir de deux micro-organismes appartenant à des genres différents : *Serratia marcescens* et *Escherichia coli*. Les compositions en acides aminés et les cartes peptidiques des deux enzymes étant différentes, les auteurs concluent que les structures primaires sont distinctes, et que la formation d'hybrides est due à une homologie des structures « secondaires ». Ils proposent que la sélection a favorisé les mutations qui assuraient le maintien de l'intégrité des segments polypeptidiques responsables de la complémentarité de structure et de la complémentation de fonction. L'existence de courts segments peptidiques a été établie pour les chaînes α et β de l'hémoglobine, molécule dans laquelle les chaînes polypeptidiques sont également réunies par des liaisons non covalentes. En ce qui concerne les chaînes de la molécule d'immunoglobuline γ G, on connaît trois modalités d'association : entre les deux chaînes légères, entre les deux chaînes lourdes, et enfin entre une chaîne lourde et une chaîne légère. La dimérisation des chaînes légères a été particulièrement bien étudiée (GALLY et EDELMAN, 1964), et se trouve bien illustrée par l'existence des protéines de Bence-Jones. L'existence de ces dimères indique qu'une chaîne légère peut adopter une configuration complémentaire à elle-même, et permet de suggérer que l'interaction entre une chaîne légère et une chaîne lourde dans la molécule d'immunoglobuline γ G pourrait refléter une réelle homologie de leurs structures tertiaires, au niveau des régions d'interaction. Si, conformément à l'hypothèse d'ANFINSEN et *al.* (1961), la structure primaire conditionne le repliement d'une chaîne polypeptidique, on pourrait dès lors s'attendre à trouver quelques homologies de séquence entre les chaînes légères et les chaînes lourdes, représentant les « segments-clés » de la structure tertiaire. Cette hypothèse

permet d'accentuer davantage l'unité structurale du « système γ ». Le caractère ubiquitaire des chaînes légères a été directement illustré au cours de ce travail par la formation des molécules hybrides : des chaînes légères, originellement présentes dans une molécule d'immunoglobuline γ M peuvent être associées à des chaînes λ pour former des molécules γ S ; des chaînes γ , naturellement unies à des chaînes λ peuvent être associées à des chaînes κ . Récemment, PRENDERGAST et *al.* (1965) ont obtenu la formation d'hybrides entre les classes γ G et γ A, et l'on pourrait vraisemblablement réaliser toutes les combinaisons possibles, sans restriction apparente. Replacée dans notre hypothèse, l'association des mêmes chaînes légères avec les chaînes lourdes des trois classes d'immunoglobulines signifierait une homologie structurale de certains segments des chaînes α , γ et μ , en l'occurrence au niveau de la partie correspondant au fragment F_a de la chaîne γ .

La formation d'hybrides interspécifiques permet d'élargir considérablement cette notion de complémentarité, en lui donnant une dimension verticale, témoin de l'évolution. La formation de telles molécules hybrides n'a été jusqu'à présent rapportée que pour des immunoglobulines de mammifères : lapin-homme (OLINS et EDELMAN, 1964), bovin-porc (FRANEK et *al.*, 1964), et cobaye-mouton (ce travail). Il serait évidemment d'un grand intérêt évolutif d'en préciser les limites. L'hypothèse de l'existence de segments peptidiques communs aux chaînes légères et aux chaînes lourdes des différentes classes conduit en effet à postuler qu'elles dériveraient d'une chaîne polypeptidique ancestrale commune, sous le contrôle génétique d'un gène unique. La mise en évidence récente (MARCHALONIS et EDELMAN 1965), d'une classe unique d'immunoglobuline possédant des chaînes polypeptidiques lourdes et légères associées indifféremment soit en molécule γ S, soit en molécules γ S, chez la roussette (*Mustellus canis*, Élasmobranches), pourrait constituer une étape dans cette direction.

La facilité avec laquelle les chaînes polypeptidiques se réassocient *in vitro* autorise-t-elle à suggérer qu'un mécanisme spécial d'assemblage n'est pas indispensable dans la cellule ? Cela impliquerait que les chaînes seraient d'abord synthétisées lors de traductions séparées, au niveau de polysomes différents. L'assemblage pourrait alors se faire, soit au niveau des polysomes associés à la synthèse de l'une des chaînes, soit dans le cytoplasme à l'intérieur duquel les chaînes seraient entièrement libres. BAGLIONI et INGRAM (1961), ont suggéré qu'un tel processus pourrait expliquer l'association des chaînes de l'hémoglobine, et LEVINTHAL et *al.* (1962), ont proposé la même possibilité en ce qui concerne l'assemblage des chaînes de la phosphatase alcaline.

Il est vraisemblable que les chaînes lourdes et les chaînes légères sont synthétisées au niveau de polysomes différents. Ces deux chaînes sont en effet porteuses de marqueurs génétiques qui se trouvent sous le contrôle de gènes indépendants. De plus, par l'emploi d'anticorps fluorescents spécifiques des chaînes, BUFFE et *al.* (1964), ont montré que les deux sortes de chaînes polypeptidiques avaient, au moins dans certains cas, des répartitions distinctes à l'intérieur du plasmocyte.

Les expériences de reconstitution présentées dans ce travail suggèrent qu'il n'existe pas de restriction à l'appariement des chaînes *in vitro*. À côté des cas de réassociation que nous avons décrits et qui mettaient en cause les types antigéniques des chaînes légères ou l'interchangeabilité de ces mêmes chaînes entre les trois classes d'immunoglobulines, la formation d'hybrides à partir de chaînes associées à des

allotypes distincts a été récemment rapportée (MANNIK et METZGER, 1965). Contrairement à ces observations, de sérieuses restrictions ont été signalées *in vivo*. Il semble, par exemple, que des molécules mixtes $\gamma\kappa\gamma\lambda$ n'existent pas, (MANNIK et KUNKEL, 1963). ANGER et VAN DYKE ont suggéré que les deux types de chaînes légères seraient synthétisées par des immunocytes différents, en accord avec les résultats de PERNIS et CHIAPPINO (1964). Ces derniers auteurs indiquent toutefois l'existence d'un faible pourcentage d'immunocytes contenant à la fois des chaînes α et des chaînes λ .

Par ailleurs, la présence dans une même molécule de quatre chaînes, toutes associées à des spécificités allotypiques distinctes, (par exemple A_1 , A_2 , A_4 et A_5) n'a jamais été observée (OUDIN, 1961; DRAY et *al.*, 1963). Des rapports contradictoires ont été présentés, en ce qui concerne la localisation intracellulaire des allotypes chez un hétérozygote. COLBERG et DRAY, (1964) ont pu, par la technique d'immunofluorescence, identifier les allotypes A_4 et A_5 dans un même immunocyte. Par contre, la même méthode d'analyse a conduit PERNIS et *al.* (1965), à conclure de façon opposée : 99 p. 100 des cellules ne synthétisent que l'un des allotypes, 1 p. 100 des cellules présentant une synthèse « mixte ». Encore, l'auteur ne peut-il conclure que ces cellules à synthèse mixte ne représentent pas, en fait, un artefact. Si l'analyse de PERNIS rend plus simplement compte de la non-existence de molécules hétérozygotes, elle est toutefois insuffisante pour nous autoriser à transposer directement les résultats obtenus lors de nos expériences de reconstitution aux mécanismes d'assemblage opérant effectivement *in vivo*.

A ce propos, on se rappellera les observations de ZIPSER et PERRIN qui montrèrent que la réassociation des sous-unités de β -galactosidase était 200 fois plus rapide au contact des ribosomes qu'en solution, et les travaux du groupe d'ANFINSEN qui indiquent que la vitesse de reformation des liaisons disulfures de la ribonucléase réduite était considérablement augmentée en présence d'une enzyme isolée des microsomes hépatiques, (GOLDBERGER et *al.*, 1964). On se trouve, dès lors, incité à une certaine prudence quant à l'extrapolation des expériences de reconstitution *in vitro* aux mécanismes de synthèse intervenant chez l'animal.

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

THE γ G IMMUNOGLOBULIN MOLECULE : MOLECULAR HYBRIDS FORMATION

It has been shown that 7S molecules can be easily obtained by reassociation of isolated complementary polypeptide chains of γ G immunoglobulins. Heavy and light chains were isolated from various immunoglobulins labeled either with ^{131}I or ^{125}I . Hybrid mixtures were prepared, dialyzed for several days at 4°C, and analyzed by means of ultracentrifugation in a sucrose density gradient.

Type K or type L Bence-Jones proteins could be associated with the same population of γ chains, isolated from a type J myeloma protein. Hybrid 7S molecules were formed from complementary chains isolated from γ G and γ M immunoglobulins, and interspecies molecular hybrids were obtained between heavy and light chains derived from sheep and guinea pig γ G immunoglobulins.

Bearing of complementarity upon structure and biosynthesis of immunoglobulins is discussed in detail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANFENSEN C. B., HABER E., SELA M., WHITE F. M., 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidations of the reduced polypeptide chain. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **47**, 1309-1314.
- ANGER H. O., VAN DYKE D. C., 1964. Polypeptide chains of human gamma globulin : cellular localization by fluorescent antibody. *Science*, **144**, 1590-1591.
- BAGLIONI C., INGRAM V. M., 1961. Four adult haemoglobin types in one person. *Nature*, **189**, 465-467.
- BUFFE D., BURTIN P., GRABAR P., 1964. Localisation intracellulaire des chaînes légères et des chaînes lourdes des γ -globulines. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 4629-4631.
- Bulletin de l'O. M. S., 1964, **30**, 447-451.
- BURTIN P., HARTMANN L., HEREMANS J., SCHEIDEGGER J. J., WESTENDORP-BOERMA F., WIEME R., WUNDERLY C., FAUVERT R., GRABAR P., 1957. Études immunochimiques et immunoelectrophorétiques des macroglobulinémies. *Rev. franç. Ét. clin. biol.*, **2**, 5-177.
- CARBONARA A. O., HEREMANS J. F., 1963. Subunits of normal and pathological γ_1 A globulins (b_2 A globulins). *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 137-143.
- COHEN S., 1963. Properties of the separated chains of human γ -globulin. *Nature*, **197**, 253-255.
- COLBERG J. E., DRAY S., 1964. Localization by immunofluorescence of γ -globulin allotypes in lymph node cells of homozygous and heterozygous rabbits. *Immunology*, **7**, 273-290.
- DRAY S., YOUNG G. O., GERALD L., 1963. Immunochemical identification and genetics of rabbit γ -globulin allotypes. *J. Immunol.*, **91**, 403-415.
- EDELMAN G. M., 1959. Dissociation of γ -globulin. *J. amer. Chem. Soc.*, **81**, 3155-3156.
- EDELMAN G. M., 1963. In: International Symposium on immunopathology, La Jolla, Calif. *Immunopathology 3rd*, Basel, Schwabe, 57-67.
- EDELMAN G. M., GALLY J. A., 1962. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to chains of myeloma globulins and normal γ globulins *J. exper. Med.*, **116**, 207-227.
- EDELMAN G. M., POULIK M. D., 1961. Studies on structural units of the γ -globulins. *J. exper. Med.*, **113**, 861-884.
- FLEISCHMAN J. B., PAIN R. M., PORTER R. R., 1962. Reduction of γ -globulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, Supplément 1, 174-180.
- FOUGEREAU M. La molécule d'immunoglobuline γ G : structure polypeptidique et activité anticorps. Thèse, Paris, 1966.
- 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.
- FRANEK F., KOTYNEK O., SIMEK L., ZIKAN J., 1964. S-sulphonated anti-dinitrophenyl antibodies. Some specific features of the interaction between isolated heavy and light subunits. In: Molecular and cellular basis of antibody formation, Prague, Published by the Czechoslovak Acad. Sci., 125-134.
- FRANKLIN E. C., STANWORTH D. R., 1961. Antigenic relationships between immune globulins and certain related para proteins in man. *J. exper. Med.*, **114**, 521-533.
- GALLY J. A., EDELMAN G. M., 1964. Protein-protein interaction among L-polypeptide chains of Bence-Jones proteins and human γ -globulins. *J. exper. Med.*, **119**, 817-836.
- GOLDBERGER R. F., EPSTEIN C. J., ANFENSEN C. B., 1964. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. biol. Chem.*, **239**, 1406-1410.
- HELMKAMP R. W., GOODLAND R. L., BALE W. F., SPAR I. L., MUTSCHLER L. E., 1960. High specific activity iodination of γ -globulin with iodine 131 monochloride. *Cancer Res.*, **20**, 1495-1500.
- HEREMANS J. F., 1960. Les globulines sériques du système gamma, leur nature et leur pathologie. Arscia, Bruxelles, 1960. Masson et Cie, Paris, 1961.
- INGRAM V. M., 1961. Hemoglobin and its abnormalities. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, 1961.
- KEKWICK R. A., 1940. The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem. J.*, **34**, 1248-1256.
- KORNGOLD L., LIPARI R., 1956 a. Multiple myeloma proteins. I. Immunological studies. *Cancer*, **9**, 183-189.
- KORNGOLD L., LIPARI R., 1956 b. Multiple myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence-Jones protein to normal gamma-globulin and multiple myeloma serum proteins. *Cancer*, **9**, 262-265.

- KORNGOLD L., VAN LEEUWEN G., 1957. Macroglobulinemia. I. The antigenic relationship of pathological macroglobulins to normal γ -globulin. *J. exper. Med.*, **106**, 467-483.
- KORNGOLD L., VAN LEEUWEN G., 1959. Macroglobulinemia. III. The effect of mercaptoethanol on the antigenic structure of macroglobulins. *J. exper. Med.*, **110**, 1-8.
- LEVINTHAL C., SINGER E. R., FETHEROLF K., 1962. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **48**, 1230-1237.
- McFARLANE A. S., 1963. *In vivo* behavior of 131 I-fibrinogen. *J. clin. Invest.*, **42**, 346-352.
- MANNIK M., KUNKEL H. G., 1963. Localization of antibodies in group I and group II γ -globulins. *J. exper. Med.*, **118**, 817-826.
- MANNIK M., METZGER H., 1965. Hybrid antibody molecules with allotypically different L-polypeptide chains. *Science*, **148**, 383-385.
- MARCHALONIS J. J., EDELMAN G. M., 1965. Phylogenetic origins of antibody structure. I. Multichain structure of immunoglobulins in the smooth dogfish (*Mustellus canis*). *J. exper. Med.*, **122**, 601-618.
- OLINS D. E., EDELMAN G. M., 1962. The antigenic structure of the polypeptide chains of human γ -globulin. *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.
- ODIN J., 1961. On the associated state of rabbit allotypes, the existence of rabbit antibody molecule against two allotypes, and the dissociation of human γ -globulin antigens into smaller molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5**, 358-361.
- PERNIS B., CHIAPPINO G., 1964. Identification in human lymphoid tissues of cells that produce group or group 2 gamma globulins. *Immunology*, **7**, 500-506.
- PERNIS B., CHIAPPINO G., KELUS A. S., GELL P. G. M., 1965. *J. exper. Med.*, **122**, 853-876
- PETERSON E. A., SOBER H. A., 1956. Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange absorbants. *J. amer. chem. Soc.*, **58**, 751-756.
- PRENDERGAST R. A., GREY H. M., KUNKEL H. G., 1965. *In vitro* hybridization of polypeptide chains derived from γ G and γ A myeloma proteins. *Fed. Proc.*, **24**, 2678.
- PUTNAM F. W., 1958. Abnormal human serum globulins. *J. biol. Chem.*, **233**, 1448-1454.
- PUTMAN F. W., EASLEY C. W., HELLING J. W., 1963. Structural study of human γ -globulin through the analysis of the tryptic peptides of Bence-Jones proteins. *Biochim. biophys. Acta*, **78**, 231-235.
- SCHLESINGER M. J., LEVINTHAL C., 1963. Hybrid protein formation of *E. coli* alkaline phosphatase leading to *in vitro* complementation. *J. mol. Biol.*, **7**, 1-12.
- SCHWARTZ J. H., EDELMAN G. M., 1963. Comparisons of Bence-Jones proteins and L-polypeptide chains of myeloma globulins after hydrolysis with trypsin. *J. exper. Med.*, **118**, 41-53.
- ZIPSER D., PERRIN D., 1963. Complementation on ribosomes. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **28**, 533-537.
-