

LA MOLÉCULE D'IMMUNOGLOBULINE γ G OVINE : MISE EN ÉVIDENCE DE DEUX SOUS-CLASSES.

M. FOUGEREAU

*Station de Virologie et d'Immunologie,
route de Thiverval, 78 - Thiverval-Grignon*

SOMMAIRE

Les molécules d'immunoglobuline γ G du mouton peuvent être distinguées en deux sous-classes de mobilités électrophorétiques différentes. Ces différences semblent siéger au niveau des fragments Fc. Les anticorps anti-phage f_1 appartiennent tous à la sous-classe de mobilité γ -rapide.

INTRODUCTION

La nature multichaine des immunoglobulines semble être une caractéristique structurale générale de cette famille de protéines. Décrite d'abord pour la molécule d'immunoglobuline γ G humaine (EDELMAN, 1959 ; EDELMAN et POULIK), la structure polypeptidique a été mise en évidence dans les autres classes γ A et γ M (CARBONARA et HEREMANS ; EDELMAN, 1963 ; COHEN, 1963 ; CHAPLIN, COHEN et PRESS, 1965), et retrouvée chez toutes les espèces animales examinées de ce point de vue (FAHEY et *al.*, FRANEK). Récemment, MARCHALONIS et EDELMAN (1965) ont pu démontrer l'existence de chaînes polypeptidiques dans une immunoglobuline, qui semble appartenir à la classe γ M des mammifères, chez la rousette (*Mustellus canis*), membre du groupe des Élasmodontes.

Les observations rapportées dans la présente note indiquent que les immunoglobulines γ G du mouton suivent la règle générale, mais qu'en outre, on peut y distinguer deux sous-classes de mobilités électrophorétiques différentes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Isolement des immunoglobulines γG .

Les immunoglobulines sont isolées à partir de sérums individuels de moutons de race indéterminée, par précipitation au sulfate de sodium, selon le procédé de KEKWICK. La préparation ainsi obtenue est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne de di-éthyl-amino-éthyl (DEAE)-cellulose, équilibrée en tampon phosphate 0,02 M, à pH 6,5 (PETERSON et SOBER, 1956).

Immunisation des animaux.

Chaque mouton reçoit 10 mg de phage f_1 (ZINDER et al., 1963) en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund, par voie intra musculaire. Une seconde injection est réalisée dans les mêmes conditions un mois plus tard.

Isolement de l'anticorps spécifique anti- f_1

L'anticorps anti-phage f_1 est isolé par redissociation en milieu acide (tampon glycine-acide sulfurique pH 2,4, force ionique 0,35) du précipité spécifique. Le phage f_1 est éliminé de la solution par ultracentrifugation à 100 000 g pendant deux heures.

Préparation des chaînes polypeptidiques.

Les immunoglobulines sont réduites par le 2-mercapto-éthanol et alkylées par de l'iodoacétamide, suivant la technique définie par EDELMAN et POULIK (1961). Les chaînes lourdes et légères sont alors séparées par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G 100 en présence d'acide propionique 0,5 N ou 1,0 N (FLEISCHMAN et al., 1962).

Hydrolyse enzymatique par la papaïne et isolement des fragments Fab et Fc.

Les conditions d'hydrolyse par la papaïne cristallisée sont celles définies par PORTER (1959), sauf que la durée d'incubation est ramenée à une heure. Les fragments libérés par clivage enzymatique sont séparés par électrophorèse de zone sur amidon (EDELMAN et al., 1960).

Ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Les modalités d'application de cette technique décrite par MARTIN et AMES (1961), ont été exposées en détail (FOUGEREAU).

Immuno-électrophorèse.

Nous utilisons la variante de la micro-méthode de SCHEIDEGGER décrite par HEREMANS (1961), et qui fait emploi d'une solution de gélose à 1 p. 100 en tampon véronal (force ionique 0,05 ; pH 8,6), que l'on coule sur une lame porte-objet de microscopie. Une différence de potentiel de 20 volts/cm est appliquée pendant 90 à 120 minutes. Les réactions de précipitation sont développées contre un sérum de lapin anti-immunoglobulines de mouton et les lames sont photographiées sous éclairage latéral.

RÉSULTATS

Le caractère général de la structure multichaîne des immunoglobulines se trouve illustré par la figure 1. Un profil d'élution typique des chaînes polypeptidiques de la molécule d'immunoglobuline γG humaine est présenté sur la figure 1 a. Le premier pic contient les chaînes lourdes, et se trouve précédé par un épaulement contenant des molécules incomplètement réduites et des chaînes lourdes dimérisées. Le second

pic contient les chaînes légères qui représentent entre 25 et 30 p. 100 de la masse totale. On note que la séparation des chaînes d'immunoglobuline γ M humaine (fig. 1 b) est du même type, et que les pourcentages respectifs des deux sortes de chaînes sont du même ordre. Ce dernier point a été confirmé récemment par CHAPLIN, COHEN et PRESS (1965). La réduction et l'alkylation de la molécule d'immunoglobuline γ G ovine conduit à la séparation de chaînes polypeptidiques dont la courbe d'éluion est en tous points comparable à la précédente (fig. 1 c). La séparation des chaînes de la molécule d'immunoglobuline γ G du lapin est, en général plus difficile. Elle est améliorée par l'emploi d'acide propionique 1,0 N (fig. 1 d).

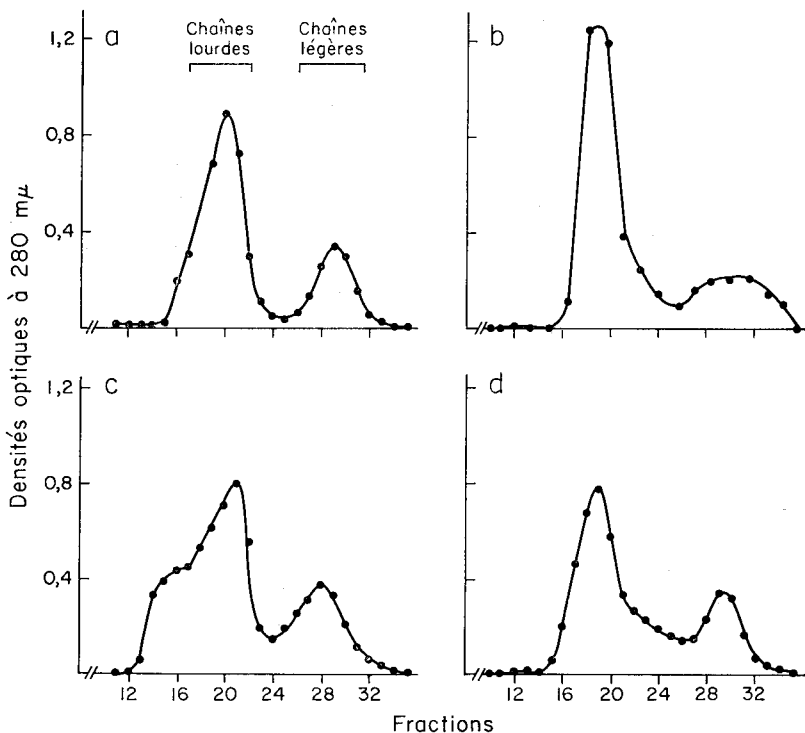


FIG. 1. — Séparation des chaînes polypeptidiques d'immunoglobulines partiellement réduites et alkylées, par chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex G 100, en présence d'acide propionique 0,5 M (a, b, c) et 1,0 M (d).

- a) Immunoglobuline γ G humaine.
- b) Immunoglobuline γ M humaine.
- c) Immunoglobuline γ G ovine.
- d) Immunoglobuline γ G cuniculine.

L'examen des propriétés immuno-électrophorétiques de la molécule d'immunoglobuline γ G de mouton révèle une intéressante particularité (fig. 2). Cette immunoglobuline comprend deux populations de molécules qui se distinguent par leurs mobilités électrophorétiques (fig. 2 a). L'hydrolyse par la papaine libre deux fragments porteurs de déterminants antigéniques distincts : l'un migre vers la cathode, l'autre présente deux arcs de précipitation à l'immuno-électrophorèse (fig. 2 b). Le premier arc est parallèle au constituant cathodique principal, mais plus éloigné du

réservoir des anticorps ; le second migre vers l'anode. L'analyse en gradient de saccharose montre que l'hydrolyse est complète (fig. 3), et qu'aucun arc de précipitation de la figure 2 *b* ne saurait donc représenter une fraction de molécules γ S intactes. Cette situation apparemment complexe a été également rapportée par RICHARDS et MARRACK. Nous avons pu l'expliquer en nous adressant, non plus aux immunoglobulines γ G totales, mais à un anticorps purifié de mouton. L'anticorps anti-phage f_1 isolé à partir du sérum du même animal que les immunoglobulines

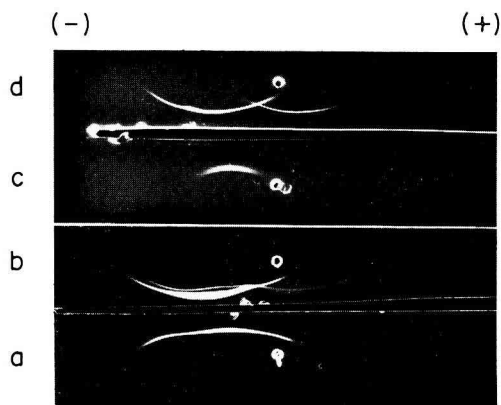


FIG. 2. — Identification immuno-électrophorétique de molécules γ G de mouton et de leurs produits de clivage par la papaine

Immunoglobuline γ G normale (a) et ses fragments libérés lors de l'hydrolyse par la papaine (b). Anticorps purifié anti-phage f_1 (c), et les fragments Fab et Fc correspondants (d). Les arcs de précipitation ont été développés contre un immun-sérum de lapin anti-immunoglobuline γ G ovine.

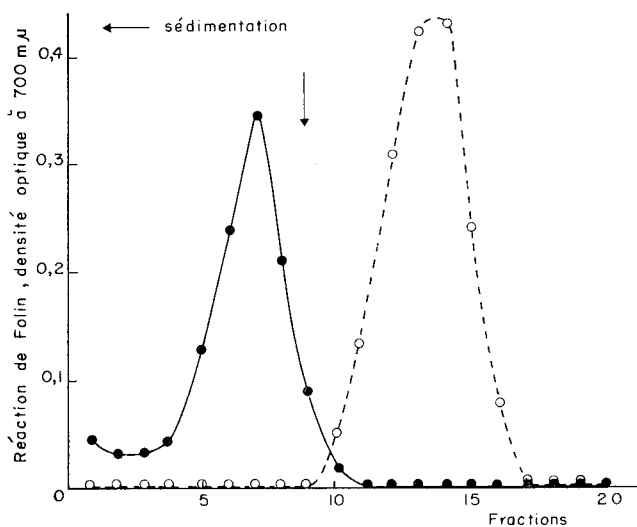


FIG. 3. — Ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100) de molécules d'immunoglobuline γ G ovine intacte (—●—) et des fragments libérés après une heure d'hydrolyse par la papaine (---○---)
 ↓ pic d'activité de la phosphatase alcaline ajoutée comme marqueur.

étudiées ci-dessus, ne renferme que des molécules de migration γ -rapides (fig. 2 c). L'hydrolyse par la papaïne conduit à l'apparition de deux types de fragments antigéniquement distincts : l'un anodique et l'autre cathodique (fig. 2 d). La séparation de ces deux fragments par électrophorèse de zone sur amidon est analogue à celle décrite par EDELMAN *et al.* (1960) pour la molécule d'immunoglobuline γ G humaine (fig. 4). La composante anodique représente $1/3$ de la masse totale, en accord avec la situation existant pour les immunoglobulines d'autres espèces animales.

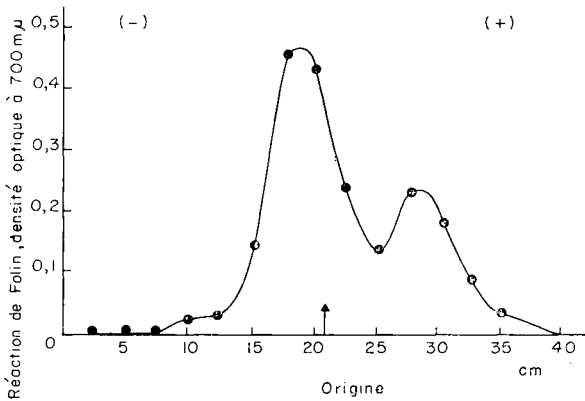


FIG. 4. — Séparation par électrophorèse de zone sur amidon des fragments F_{ab} et F_c libérés lors de l'hydrolyse par la papaïne d'un anticorps de mouton, anti-phage f_1
(+) Anode et (-) Cathode.

CONCLUSION

L'immunoglobuline γ G de mouton peut être dissociée en deux types de chaînes polypeptidiques que l'on peut isoler par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex en présence d'un solvant dissociant. La population de molécules γ G non spécifiques est hétérogène du point de vue électrophorétique, et peut être divisée en deux sous-classes, alors que les anticorps anti- f_1 appartiennent tous à la sous-classe de mobilité γ -rapide. En ce qui concerne l'hydrolyse par la papaïne, les résultats relatifs aux anticorps anti- f_1 sont clairs, comparables en tous points avec la situation décrite pour le clivage de l'immunoglobuline γ G humaine (EDELMAN *et al.*), qui aboutit à la séparation de deux fragments : F_{ab} , à migration cathodique, et F_c , à migration rapide, ce dernier représentant $1/3$ de la masse totale. Un fragment F_c identique est obtenu lors du clivage des immunoglobulines γ G ovines totales, mais ce fragment possède en outre les mêmes déterminants antigéniques qu'une composante cathodique, ce qui indique qu'il existe deux fragments F_c de mobilités électrophorétiques différentes. On n'observe pas d'hétérogénéité de migration pour les fragments F_{ab} , et il est donc logique de proposer que les deux sous-classes d'immunoglobulines γ G ovine diffèrent par la structure de leurs fragments F_c , donc de leurs chaînes lourdes.

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

SHEEP γ G IMMUNOGLOBULIN MOLECULE : EXISTENCE OF TWO SUB-CLASSES

Sheep γ G immunoglobulins are shown to consist of two types of polypeptide chains, and can be divided into two sub-classes, on the basis of their distinctive electrophoretic mobilities. By means of starch zone electrophoresis and immunoelectrophoresis, evidence is presented, suggesting that this distinction into two sub-classes reflects structural differences of Fc fragments.

Antibodies directed against f₁ phage were found to belong to a single sub-class according to electrophoretic criteria.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CARBONARA A. O., HEREMANS J. F., 1963. Subunits of normal and pathological γ_1 A globulins (β_1 A globulins). *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 137-143.
- CHAPLIN H., COHEN S., PRESS E. M., 1965. Preparation and properties of the peptide chains of normal human γ S γ -globulin (IgM). *Biochem. J.*, **95**, 256-261.
- COHEN S., 1963. Properties of the separated chains of human γ -globulin. *Nature*, **197**, 253-255.
- 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., HEREMANS J. F., HEREMANS M. T., KUNKEL H. G., 1960. Immunological studies of human γ -globulin. Relation of the precipitin lines of whole γ -globulin to those of the fragments produced by papain. *J. exper. Med.*, **112**, 203-223.
- EDELMAN G. M., POULIK M. D., 1961. Studies on structural units of the γ -globulins. *J. exper. Med.*, **113**, 861-884.
- FAHEY J. L., WUNDERLICH J., MISHILL R., 1964. The immunoglobulins of mice. I. Four major classes of immunoglobulins : 7S γ_2 , 7S γ_1 , γ_1 A (β_2 A) and 18S γ_1 M-globulins. *J. exper. Med.*, **120**, 223-242.
- FLEISCHMAN J. B., PAIN R. M., PORTER R. R., 1962. Reduction of γ -globulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, Supplément 1, 174-180.
- FOUGEREAU M., 1966. Rôle des chaînes polypeptidiques de la molécule d'immunoglobuline γ G dans l'expression de la spécificité anticorps : une nouvelle technique d'analyse du complexe haptène, anticorps. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **6** (2), 201.
- FRANEK F., 1961. Dissociation of animal 7S γ -globulins by cleavage of disulfide bonds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 28-31.
- HEREMANS J. F., 1960-1961. Les globulines sériques du système gamma, leur nature et leur pathologie. Arscia, Bruxelles 1960. Masson & Cie, Paris, 1961.
- 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.
- MARTIN R. G., AMES B. N., 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : application to protein mixtures. *J. biol. Chem.*, **236**, 1372-1379.
- NUSSENZWEIG V., BENACERRAF B., 1964. Studies on the properties of fragments of guinea-pig γ_1 and γ_2 antibodies obtained by papain digestion and mild reduction. *J. Immunol.*, **93**, 1008-1023.
- PETERSON E. A., SOBER H. A., 1956. Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange absorbents. *J. amer. chem. Soc.*, **58**, 751-756.
- PORTER R. R., 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, **73**, 119-126.
- RICHARDS C. B., MARRACK J. R., 1963. Sheep serum γ -globulin. Protides of the biological fluids, **10**, Elsevier Publishing Co, Amsterdam 1963.
- SCHNEIDEGGER J. J., 1955. Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy*, **7**, 103.
- ZINDER N. D., VALENTINE R. C., ROGER M., STOECKENIUS W., 1963. f₁, a rod-shaped male-specific bacteriophage that contains DNA. *Virology*, **20**, 638-640.