

rentes, a révélé par extrapolation à une concentration zéro un coefficient de sédimentation de 10,8 S. L'IgG₁ et l'IgM isolées du colostrum bovin donnent des valeurs de 7,1 S et 19,2 S respectivement. Ces chiffres sont obtenus après correction des valeurs déterminées sur la figure, par un facteur de 1,033 dû à la viscosité du solvant, le KCl 0,15 molaire.

La détermination du taux d'hexoses a révélé par la méthode de l'orcinol une valeur de 6% pour la fraction 11 S alors que pour l'IgG, elle n'était que de 1,5%.

L'immunisation de lapins par cette fraction 11 S a permis de produire des immunoséras spécifiques contre cette protéine et d'identifier sa présence en quantité relativement élevée dans la salive de vache. Il existe donc bien dans le colostrum bovin une IgA de sécrétion distincte de l'IgG₁ et de l'IgM et analogue à celle des sécrétions externes humaines. Cette protéine n'a pu être démontrée dans le sérum.

Les immunoséras anti IgA ont révélé en outre la présence de pièce de sécrétion libre, c'est-à-dire détachée de l'IgA, dans le colostrum et surtout dans le lait mûr qui ne contient que très peu d'IgA.

Une préparation purifiée de cette pièce de sécrétion libre a permis de déterminer pour cette protéine séparée de l'IgA, un coefficient de sédimentation de 4,95 S (Figure). Cette valeur est légèrement plus élevée que celle trouvée pour la pièce de sécrétion humaine obtenue par réduction et alkylation de l'IgA 11 S (TOMASI⁹).

Summary. The sedimentation coefficient of a secretory IgA found in bovine colostrum and saliva is compared with that of IgG and IgM from the same colostrum. The IgA fraction gives a value of 10.8 S, whereas the major part of the IgG has a value of 7.1 S and the IgM 19.2 S. The sedimentation coefficient of the free secretory piece has also been determined: its value is 4.95 S.

J.-P. MACH et J.-J. PAHUD

*Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne,
1005 Lausanne (Suisse), 4 juin 1969.*

⁹ T. B. TOMASI et J. BIENENSTOCK, *Adv. Immunol.* 9, 1 (1968).

Libération d'un composant du complément par des leucocytes humains in vitro¹

La chaîne de réactions qui conduit une cellule recouverte d'anticorps spécifiques à sa lyse par le complément est aujourd'hui assez bien connue: L'action de 11 facteurs du complément humain ou de cobaye a pu être mise en évidence dans l'hémolyse immune. Cette suite de réactions est amorcée par la rencontre du premier composant du complément, C1, avec un complexe antigène-anticorps.

Le C1 existe dans le plasma sous forme d'un complexe macromoléculaire de 3 unités, C1q, C1r, C1s, liées par du calcium; ce complexe est facilement dissocié par des chélateurs tels que l'EDTA. Le souscomposant C1q ou composant 11S est la protéine qui s'attache directement sur la molécule d'anticorps. C'est à la suite de cette fixation qu'il y a activation du C1 qui, agissant sur les composants suivants C4 et C2, déclenchera la réaction.

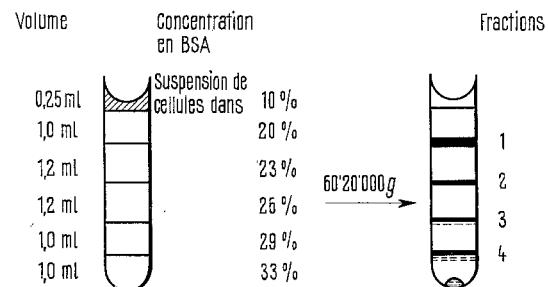
Le C1q peut être purifié à partir de sang frais par précipitation des euglobulines du sérum humain à force ionique faible suivie de chromatographie sur CM-cellulose, filtration sur Sephadex G 200 et électrophorèse préparative².

On aboutit à une protéine hautement purifiée qui migre à l'électrophorèse comme une gamma lente. Injectée à un lapin dans de l'adjuvant de Freund, elle suscite des anticorps qui sont capables de précipiter spécifiquement le C1q, et en outre d'inhiber son activité biologique.

L'activité hémolytique du C1q peut être mesurée en ajoutant du R C1q, c'est-à-dire du sérum frais dépourvu de C1q. L'hémolyse d'érythrocytes de mouton sensibilisés par un anticorps de lapin est mesurée selon la manière classique. Le réactif R C1q est préparé en ajoutant à du sérum humain frais de l'anti-C1q en présence d'EDTA; il y a précipitation du C1q seulement et le surnageant contient tous les autres composants du complément. L'hémolyse peut également être mise en évidence en milieu gélifié: dans un gel d'agarose à 1% contenant des globules rouges sensibilisés et du R C1q on perfore des cavités, on y place les solutions à examiner et incube à 37°C. Une zone d'hémolyse apparaîtra autour des trous contenant le C1q. La réaction est inhibée par l'anticorps spécifique.

Cette technique d'hémolyse en gel a permis d'aborder le problème de la localisation du C1q dans des cellules sanguines. Une suspension de leucocytes humains lavés mélangée à de l'agarose contenant des globules sensibilisés et du R C1q, est coulée en couche mince dans des boîtes de Pétri. Après une heure à 37°C des zones de lyse ou «plaques» apparaissent comme dans la technique de Jerne; ces zones sont centrées sur des cellules mononucléées. Une méthode de séparation de leucocytes a été appliquée pour tâcher de localiser l'activité du C1q dans un groupe de cellules distinct. La technique utilisée, inspirée de celle de DUTTON³, consiste en une centrifugation sur un gradient d'albumine des leucocytes provenant de 12 ml de sang hépariné traité au dextran pour éliminer les érythrocytes (figure).

Parmi les quatre couches cellulaires ainsi isolées la fraction 2 est celle qui possède le plus grand nombre de cellules actives. Un exemple de répartition est donné dans le tableau.



Séparation de leucocytes sur gradient d'albumine.

¹ Ce texte est le résumé d'une communication faite à la Société Suisse de Biochimie le 17 mai 1969.

² H. MÜLLER-EBERHARD, *Adv. Immunol.* 8, 1 (1968).

³ D. J. RAIDT, R. I. MISHELL and R. W. DUTTON, *J. exp. Med.* 128, 681 (1968).

Répartition de l'activité du C1q dans différentes populations de leucocytes

Fractions	% Polymorpho-nucléaires	Plaques d'hémolyse par 10 ⁶ cellules
1	0-2	15
2	0-2	260
3	18	80
4	> 95	8

Il apparaît donc que la libération dans le gel de C1q actif est la propriété d'une population de cellules correspondant à la couche 2 de la centrifugation sur albumine. Le fait qu'en absence de R C1q dans le milieu il n'y ait pas d'hémolyse suggère que seuls certains composants du complément, dont le C1q, sont contenus dans

ces cellules. Celles-ci sont selon toute vraisemblance des mononucléaires mais seules des méthodes de cultures cellulaires, d'incorporation d'amino-acides radioactifs dans la protéine et de morphologie permettront de les placer dans une classe définie de leucocytes.

Summary. Human blood leucocytes were shown to liberate active C1q in vitro. An agarose gel containing sensitized sheep red cells and a serum depleted of C1q has been used to detect C1q activity. A population of mononucleated cells which display such activity could be isolated by centrifugation on an albumin gradient.

H. JACOT-GUILLARMOD

*Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne,
7005 Lausanne (Suisse), 4 juin 1969.*

Shwartzman Phenomenon Without Endotoxin Preparation

A number of observations indicate that granulocytes play an important role in the pathogenesis of inflammation, hemorrhage and necrosis developing in the local Shwartzman reaction¹⁻³. THOMAS⁴ was able to induce the Shwartzman phenomenon with a preparatory dose of leukocyte granules rich in lysosomes and with an eliciting injection of endotoxin.

On the other hand, it was published by KELLER and SORKIN⁵ that casein, peptone and bactocasitone could elicit the chemotaxis of leukocytes without any apparent immune reaction in an in vitro system.

In view of the above facts, we attempted the preparation of local Shwartzman phenomenon with casein (Hammersten, Reanal, Hungary), Witte's peptone and bactocasitone (Difco Laboratories). These cytotoxins were used in 1% solutions of saline at pH 7. We performed our experiments in autumn on male conventional rabbits coming from a breeding stock, weighing 2500 ± 200 g. Before the experiments the rabbits had been kept on standard diet under normal conditions.

The local Shwartzman phenomenon was induced on the dorsal skin of rabbits. The preparatory injections were 1% solutions of casein, Witte's peptone and bacto-

casitone in 0.4 ml volumes. In some cases 0.01 N HCl, 0.01 N NaOH and saline were given for control. As a challenging dose 150 µg of Boivin endotoxin (from *E. coli* 0111) was administered i.v. 24 h later. The result was seen after a further 24 h on the inside of the skin. In some cases 6 h after the eliciting injection, specimens of the skin were excised for histological examination. After fixation in Susa's solution and embedding in paraffin, the sections were stained with hematoxyline and eosine.

From these preparations we were able to produce a moderate but typical local Shwartzman reaction both with casein and peptone – as can be seen in Figure 1a. This phenomenon was histologically the same type in every respect as the one prepared with endotoxin (Figure 2a and b). The results are summarized in the Table.

Our findings indicate that the rabbit's own leukocytes, when attracted to the site of casein, peptone or bacto-

¹ R. M. BECKER, Proc. Soc. exp. Biol. 69, 247 (1948).

² C. A. STETSON JR. and R. A. GOOD, J. exp. Med. 93, 49 (1951).

³ C. A. STETSON JR., J. exp. Med. 94, 347 (1951).

⁴ L. THOMAS, Proc. Soc. exp. Biol. 115, 235 (1964).

⁵ H. U. KELLER and E. SORKIN, Experientia 24, 641 (1968).

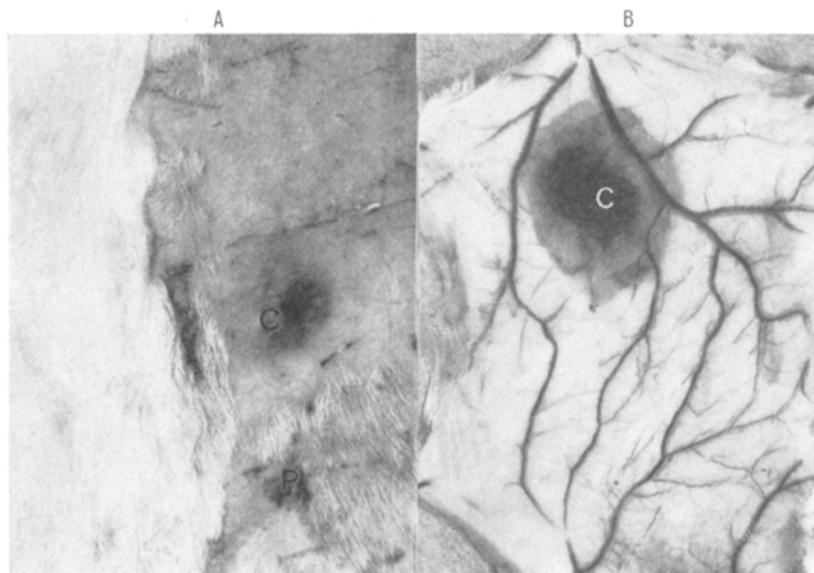


Fig. 1. (A) Local Shwartzman reaction. C, prepared with casein (1%) and P, peptone (1%). (B) Reaction to the casein from the inside of the skin.