

## Évaluation du taux des anticorps IgG antipollen de graminées

### Application aux dosages dans le sérum et dans des préparations d'immunoglobulines à usage thérapeutique

P. LAMBIN, M. DEBBIA, C. DOINEL, M. STEINBUCH, J. P. SOULIER\*

#### RÉSUMÉ

Un dosage radio-immunologique des anticorps de classe IgG a été mis au point et utilisé pour mesurer les anticorps antipollen de graminées dans le sérum humain et dans des préparations d'immunoglobulines à usage thérapeutique. Dans cette méthode, l'allergène est couplé covalentement à un support solide et les anticorps IgG sont révélés par la protéine A, marquée à l'iode 125. Le taux des anticorps mesuré dans le sérum de sujets ayant subi une immunothérapie, est significativement plus élevé que dans une population témoin. Le taux des anticorps antipollen de graminées a été mesuré dans des solutions d'immunoglobulines à usage thérapeutique. Ces taux sont, en moyenne, de 5 à 15 fois ceux observés dans un pool de sérum pris comme référence. Lorsque ces méthodes de dosage sont appliquées à des préparations d'immunoglobulines fractionnées selon un procédé utilisant l'acide caprylique, des taux d'anticorps de 15 à 30 fois supérieurs à ceux du sérum de référence, sont obtenus.

#### SUMMARY

*Evaluation of anti-grass pollen IgG antibody levels. Use in dosing serum and immunoglobulin preparations for therapeutic usage.* — A radioimmunologic dosing method for IgG antibodies has been developed to measure anti-grass pollen antibodies in human serum in immunoglobulin preparations for therapeutic use. In this method, the allergen is covalently bound to a cellulose matrix and IgG antibodies are demonstrated using protein A tagged with iodine 125. The antibody serum level in patients who had undergone immunotherapy was significantly increased as compared to the control population. The anti-grass pollen antibody level was measured in immunoglobulin solutions for therapeutic use. These levels were, on the average, 5 to 15 times greater than that in the serum pool used as control. When these dosing methods were performed on fractionated immunoglobulin preparations with a procedure employing caprylic acid, the antibody levels obtained were 15 to 30 times greater than the control serum.

La mesure du taux des IgE spécifiques d'un allergène s'est révélée être particulièrement utile chez les patients souffrant d'allergie. Cependant, les IgE ne sont pas les seuls anticorps impliqués dans la reconnaissance des motifs antigéniques des allergènes, d'autres classes d'immunoglobulines sont concernées, en particulier les IgG [10]. Des études récentes ont montré que le taux sérique des IgG spécifiques des allergènes s'élevait lors de l'immunothérapie [2, 4, 14, 15]. D'autre part, ces anticorps sont capables de bloquer la réaction allergique en entrant en compétition avec les IgE pour l'allergène [10]. L'élévation du taux des anticorps IgG est donc d'un grand intérêt comme critère biologique de l'efficacité de l'immunothérapie [2, 4, 11]. De plus, le transfert passif d'IgG purifiées s'est révélé être une méthode thérapeutique efficace pour protéger les malades des effets pathologiques dus à l'injection de certains allergènes, en particulier les venins d'abeille [9]. Dans cet article, nous décrivons une nouvelle méthode de mesure des anticorps IgG spécifiques d'allergènes du sérum humain. Cette méthode est

appliquée au dosage des anticorps antipollen de graminées, présents dans le sérum humain et dans des préparations d'immunoglobulines à usage thérapeutique.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le pool de sérum utilisé comme référence, a été obtenu en mélangeant 1 ml de sérum de 100 donneurs volontaires du Centre National de Transfusion Sanguine (Paris). Les sérums de 25 patients, ayant subi pendant 12 mois minimum une cure d'immunothérapie nous ont été adressés par divers hôpitaux de la région parisienne. Les immunoglobulines examinées avaient été purifiées, soit par le fractionnement éthanolique habituel, soit selon un procédé décrit par Steinbuch et coll. [13] comportant un stade de précipitation par l'acide caprylique. Les disques de papier sur lesquels ont été couplés les allergènes ont été obtenus soit commercialement (Pharmacia), soit préparés par activation au bromure de cyanogène. Dans ce cas, les aller-

\* Centre national de transfusion sanguine, Paris.

Tirés à part : P<sup>r</sup> J. P. Soulier, Centre National de Transfusion Sanguine, 6, rue Alexandre-Cabanel, 75739 Paris Cedex 15.

Reçu le 25 juillet 1984. Accepté le 5 septembre 1984.

LAMBIN P., DEBBIA M., DOINEL C., STEINBUCH M., SOULIER J. P. — Évaluation des taux des anticorps IgG antipollen de graminées. Application aux dosages dans le sérum et dans des préparations d'immunoglobulines à usage thérapeutique. *Rev. fr. Allergol.*, 1984, 24 (n° 3), 117-120.

gènes fixés étaient soit des extraits de pollen de *Dactylis glomerata* ou de *Phleum pratense* (Dr B. David, Institut Pasteur). La protéine A du staphylocoque doré (Pharmacia) a été marquée à l'iode 125 par la chloramine T. La protéine radiomarquée a été séparée de l'iode 125 par gel filtration sur Amberlite. L'activité était en moyenne, de 6 000 cpm/ng de protéine.

### Évaluation du taux des IgG antipollen de phléole et de dactyle

Les sérums ou les immunoglobulines sont diluées en tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 contenant 0,15 M de NaCl, 0,5 % de Tween 20 et 1 % d'albumine bovine purifiée (Armour). 100 µl de dilution de sérum ou d'immunoglobulines sont incubés avec les disques pendant 3 heures à 20 °C dans des tubes plastiques. Les disques sont lavés trois fois en tampon phosphate contenant 0,15 M de NaCl et 0,5 % de Tween 20, 50 ng de protéine A radiomarquée (5 µCi/µg) sous un volume de 100 µl sont ajoutés aux disques. Après une incubation de 18 heures à 20 °C, les disques sont à nouveau lavés trois fois en tampon phosphate (NaCl 0,15 M et 0,5 % de Tween 20) et la radioactivité incorporée à la phase solide est mesurée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité fixée sur le support par rapport à la radioactivité introduite dans la réaction.

## RÉSULTATS

### Obtention de la courbe de référence

Une courbe d'allure sigmoïdale est obtenue en exprimant l'inverse de la dilution du pool de sérum en fonction du pourcentage de protéine A fixée par les IgG ayant réagi avec les allergènes des extraits de pollen de phléole ou de dactyle (fig. 1).

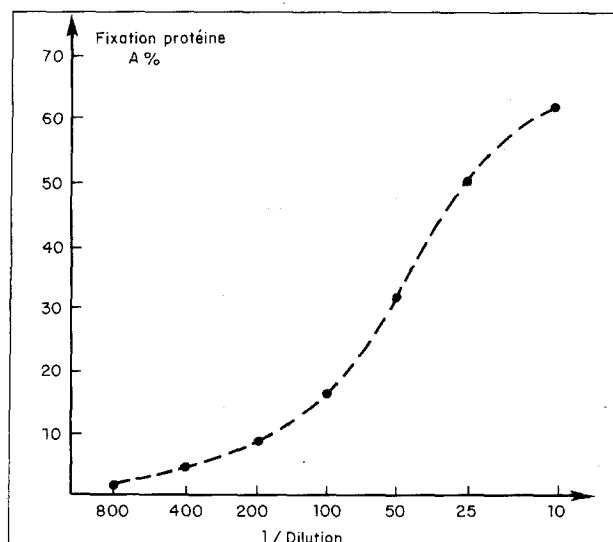


Fig. 1. — Pourcentage de fixation de la protéine A par les anticorps IgG antipollen de dactyle, en fonction de l'inverse de la dilution du sérum de référence.

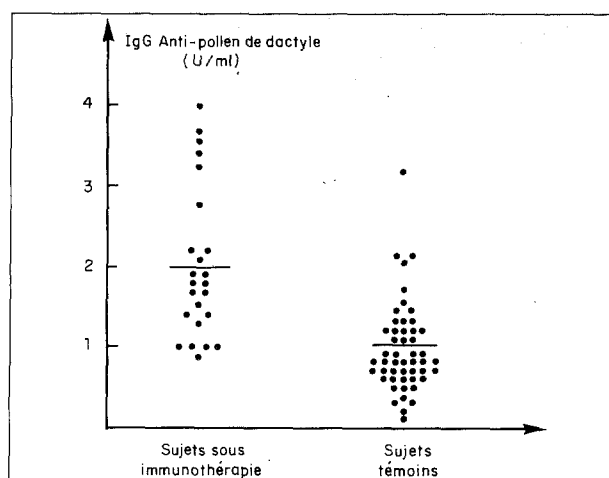


Fig. 2. — Taux d'IgG antipollen de dactyle chez 25 sujets ayant subi une cure de désensibilisation depuis plus d'un an. Taux observés chez 50 sujets donneurs de sang.

Des courbes d'aspect similaire à la courbe de référence sont obtenues dans une large gamme de dilutions avec des sérums normaux ou pathologiques. Par convention, le pool de sérum de référence contient 1 unité d'anticorps IgG antipollen de graminées/ml.

### Mesures effectuées dans des sérums individuels

Les taux d'anticorps IgG antipollen de phléole ont été mesurés par cette méthode chez 25 sujets allergiques soumis depuis plus d'un an à une cure de désensibilisation. Les taux obtenus sont compris entre 0,8 U/ml et 4 U/ml avec une valeur moyenne de 2 U/ml (fig. 2). Chez 50 sujets donneurs de sang pris comme population témoin, le taux a été en moyenne de 1 U/ml, valeur significativement différente de celle des sujets désensibilisés (fig. 2).

### Comparaisons du taux des IgG antipollen de phléole et de dactyle dans un même sérum

Les résultats obtenus avec 51 sérums sont donnés dans la figure 3. Il existe une corrélation positive entre les taux observés pour les deux pollens de graminées ( $r = 0,72$ ).

### Mesure du taux des IgG antipollen dans les solutions d'immunoglobulines thérapeutiques

Si l'on dilue des solutions d'immunoglobulines thérapeutiques, on obtient des courbes d'aspect similaire à celles précédemment observées avec les sérums normaux ou pathologiques (fig. 4). Connaissant les concentrations protéiques dans les dilutions d'immunoglobulines, on peut calculer le titre de ces solutions d'immunoglobulines.

Les résultats effectués dans les solutions d'immunoglobulines polyvalentes (préparations intramusculaires ou intraveineuses) montrent des taux compris entre 5 et 10 U/ml (solution à 10 %). Les solutions d'immunoglobulines préparées au Centre National de Transfusion Sanguine par des méthodes de fractionnement,

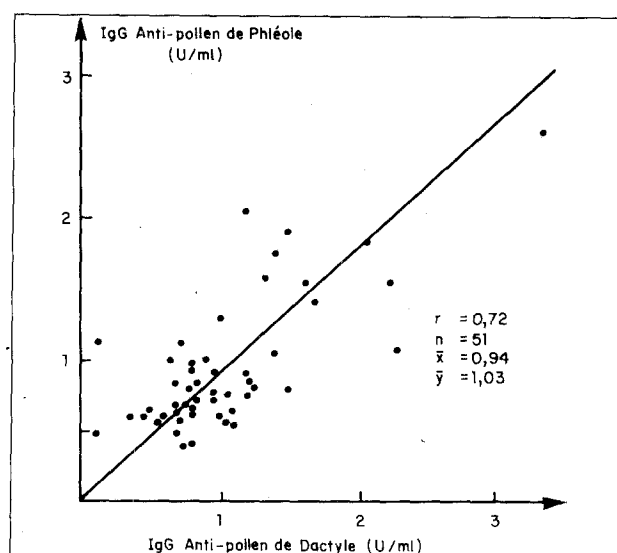


Fig. 3. — Taux des anticorps antipollen de phléole en fonction du taux des anticorps antipollens de dactyle chez 50 sérums de sujets donneurs de sang.

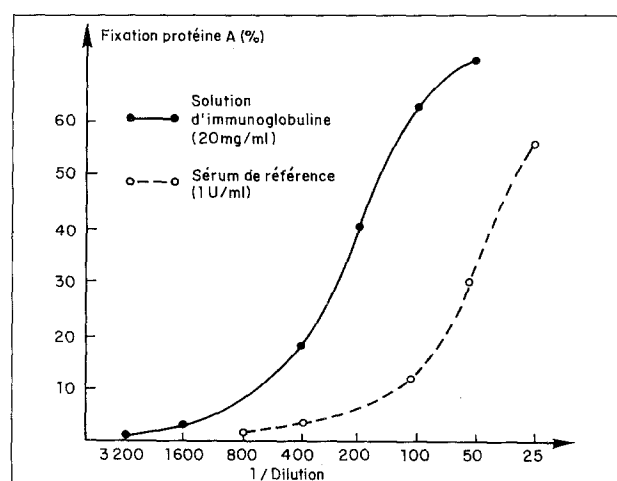


Fig. 4. — Pourcentage de fixation de protéine A en fonction de l'inverse de la dilution.

—•—•— Solution d'immunoglobuline (20 mg/ml)  
- - - - - Sérum de référence (1 U/ml)

TABLEAU I. — Taux des anticorps antipollen de phléole présents dans différentes solutions d'immunoglobulines thérapeutiques (Concentration 10 %)

| Immunoglobulines fractionnées par l'éthanol          | Activité en Unités/ml |
|------------------------------------------------------|-----------------------|
| Lot 1                                                | 10                    |
| Lot 2                                                | 7                     |
| Lot 3                                                | 5                     |
| Lot 4                                                | 7                     |
| Lot 5                                                | 8                     |
| Immunoglobulines fractionnées par l'acide caprylique | Activité en Unités/ml |
| Lot 1                                                | 15                    |
| Lot 2                                                | 24                    |
| Lot 3                                                | 20                    |
| Lot 4                                                | 28                    |
| Lot 5                                                | 24                    |

comportant un stade de précipitation supplémentaire, contiennent des taux d'IgG antiallergène compris entre 15 et 28 U/ml (tableau I).

## DISCUSSION

Les anticorps de classe IgG, ayant réagi avec des allergènes fixés à une phase solide, sont habituellement révélés soit par un anticorps anti-IgG d'une autre espèce [5, 12] (poly- ou monoclonal), soit par la protéine A [7]. Cette dernière se lie avec une grande affinité au niveau de la jonction  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$  de la partie Fc de toutes les sous-classes IgG humaines, à l'exception de l'IgG<sub>3</sub> qui représente seulement 7 p. cent des IgG totales [1, 8]. Lors d'expériences préliminaires, nous avons pu constater que l'utilisation de la protéine A permettait d'obtenir un bruit de fond beaucoup plus faible que celle de l'anti IgG.

La fixation simultanée d'IgE n'influe pas d'une manière mesurable, sur la réaction. Nous avons vérifié que des sujets, bien qu'ayant des quantités considérables d'IgE spécifiques d'un allergène, pouvaient avoir des taux très faibles d'IgG de la même spécificité. Nous pensons donc que la fixation de la protéine A par les IgE, peut être considéré comme négligeable dans les conditions de réaction que nous utilisons.

En ce qui concerne les taux d'IgG antipollens de graminées présents dans une population non sélectionnée de donneurs de sang, on constate que la plupart des sujets ont un taux compris entre 0,5 et 1 U/ml de sérum. Cependant, sur 50 sujets, 3 avaient un taux supérieur à 2 U/ml. Par contre, chez les sujets soumis à une immunothérapie depuis plus de 12 mois, environ 50 p. cent avaient des taux supérieurs à 2 unités avec des maximums allant jusqu'à 4 U/ml.

Les mesures effectuées dans les solutions d'immunoglobulines thérapeutiques montrent que les solutions préparées par les méthodes classiques de fractionnement éthanolique, contenaient de 5 à 10 unités antipollen de graminées par ml (solutions de protéine ramenées à 10 %).

Il est possible, en modifiant les procédés de fabrication des immunoglobulines, et en particulier par addition d'un stade de fractionnement supplémentaire par l'acide caprylique, d'augmenter la teneur en IgG antipollen. Ainsi, nous avons pu mesurer des taux allant jusqu'à 25 ou 30 U/ml.

Ce sont ces solutions qui ont été utilisées lors de l'expérimentation rapportée par Grilliat et Herman [6].

L'activité antipollen de graminées mesurées dans ces solutions d'immunoglobulines paraît en relation à la fois avec un taux plus élevé d'IgG de sous-classe gamma 4 et avec un pourcentage de polymères supérieur à celui que l'on obtient par la méthode standard à l'éthanol.

En conclusion, la méthode d'évaluation du taux des anticorps antipollen de graminées de classe IgG que nous décrivons, peut être utilisée pour des estimations quantitatives dans les sérums et dans les préparations d'immunoglobulines thérapeutiques.

## RÉFÉRENCES

1. Deisenhofer J. - Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc-fragment and its complex with fragment B of protein A from staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. *Biochemistry*, 1981, 20, 2370-2378.
2. Donat N., Doinel C. - Efficacité clinique et modification des immunoglobulines spécifiques après désensibilisation aux pollens de graminées sur deux saisons polliniques. *Rev. fr. Allergol.*, 1982, 22, 7-13.
3. Evans R., Pence H., Kaplan H., Rocklin R. E. - The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hayfever. *J. Clin. Invest.*, 1976, 57, 1378-1385.
4. Gleich G. J., Zimmermann E. M., Henderson L. L., Yunginger J. W. - Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six year prospective study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1982, 70, 261-271.
5. Grant J. A., Goldblum R. M., Rahr R., Thueson D. O., Farnam J., Gillaspay J. - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for immunoglobulin G antibodies against insect venoms. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1981, 68, 112-118.
6. Grilliat J. P., Herman D. - Effets cliniques d'immunoglobulines antiallergènes ayant un titre élevé en anticorps spécifique (IgG) pour le traitement des allergies aux pollens de graminées. *Rev. fr. Allergol.*, 1984, 24, (n° 3), 121-125.
7. Hamilton R. G., Adkinson N. F. - Quantitation of antigen-specific IgG in human serum standardization by a staph. A solid phase. *J. Immunol.*, 1980, 124, 2966-2971.
8. Kronvall G., Williams R. C. - Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J. Immunol.*, 1969, 103, 828-833.
9. Lessof M. H., Sobotka A. K., Lichtenstein L. M. - Effects of passive antibody in bee venom anaphylaxis. *Johns Hopkins med. J.*, 1978, 142, 1-7.
10. Lichtenstein L. M., Holtzman N. A., Burnett L. S. - A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J. Immunol.*, 1968, 101, 317-324.
11. Lichtenstein L. M., Valentine M. D., Sobotka A. K. - Insect allergy: the state of the art. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1979, 64, 5-12.
12. Shimizu M., Wicher K., Reisman R. E., Arbesman C. E. - A solid-phase radioimmunoassay for detection of human antibodies. I. - Measurement of IgG antibody to bee venom antigens. *J. Immunol. Methods*, 1978, 19, 317-330.
13. Steinbuch M., Audran R. - Isolement de l'immunoglobuline IgG du plasma humain à l'aide de l'acide caprylique. *Rev. fr. Etudes clin. biol.*, 1969, 14, 1054-1058.
14. Weyer A., Doinel C., Debbia M., L'Héritier C., Rivat L., Le Mao J., Hirth C., David B. - Grass pollen hyposensitization versus placebo therapy. II. - Immunotherapy induced changes in serum IgE and IgG levels. *Allergy*, 1981, 36, 319-328.
15. Yu-Kun Chien, Anfosso F., Vervloet D., Charpin J. - In vitro evaluation of blocking antibodies by RAST interference during pollen desensitization: role of the IgG fraction. *Biomedicine*, 1982, 36, 145-149.

