

Dosage des IgG4 spécifiques par immuno-enzymo-fluorimétrie en vue de l'exploration de l'immunothérapie aux venins d'hyménoptères chez l'enfant

J. SAINTE-LAUDY *, J. PAUPE **

De nombreux travaux ont prouvé l'intervention des IgG puis plus tard le rôle prépondérant des sous-classes IgG1 et IgG4 en immuno-allergologie [3, 4, 5, 9, 10, 15, 16, 19, 20, 21, 22].

L'importance relative des IgG par rapport aux IgE et particulièrement celles des deux sous-classes IgG1 et IgG4 est appréciée de façon très contradictoire par les différents auteurs. Toutefois, il est clairement démontré que les IgG1 et les IgG4 spécifiques d'un allergène donné sont bien retrouvées dans le sérum des sujets allergiques tandis que les IgG2 et les IgG3 spécifiques apparaissent lors de la stimulation par d'autres types d'antigènes et particulièrement par des antigènes bactériens.

Au cours de certaines réactions atopiques (eczéma ou asthme) les IgG4 totales ou spécifiques de l'allergène sensibilisant (acariens le plus souvent) sont souvent élevées. De nombreuses techniques ont été décrites pour les dosages de sous-classes d'IgG totales ou spécifiques [2, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 17, 18]. Elles ont largement bénéficié de la disponibilité d'anticorps monoclonaux. Nous avons mis au point une technique d'évaluation semi-quantitative des IgG4 spécifiques qui peut s'appliquer à l'allergie aux venins d'hyménoptères, afin de suivre leurs variations au cours de l'immunothérapie spécifique par ces venins.

MATERIEL ET METHODES

Sélection des patients

30 enfants allergiques aux venins d'hyménoptères (21 sensibilisés à la guêpe et 9 à l'abeille) ont été sélectionnés sur les indications qu'ils posaient pour un traitement de désensibilisation. Ce traitement a été réalisé selon un mode accéléré en 7 à 8 jours suivi d'injections mensuelles de 10 µg de venin.

Les prélèvements ont été effectués avant le « rush », à la fin de celui-ci (J9) tous dans un délai variable de 1,5 à 3 ans.

Les sérums ont été immédiatement congelés et conservés à -20°C pour être dosés en aveugle par séries de 20 à 30 sérums.

Technique de recherche des IgG4 spécifiques

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique sensibilisée par une lecture fluorimétrique.

L'antigène utilisé est un venin Albay Dôme Hollister Stier « Yellow Jacket » ou « Honey bee ».

Ces venins sont tout d'abord dilués en tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,6 à la concentration de 10 µg/ml. 150 µl de ces dilutions sont répartis dans les cupules d'une plaque de micro-

* Laboratoire d'Immuno-allergologie, 5, bd du Montparnasse, 75006 PARIS.

** Service d'Allergologie et de Pneumologie infantiles du Département de Pédiatrie de l'Hôpital des Enfants-Malades, Paris.

Tirés à part : Dr J. Sainte-Laudy, adresse-ci-dessus.

SAINTE-LAUDY J., PAUPE J. — Dosage des IgG4 spécifiques par immuno-enzymo-fluorimétrie en vue de l'exploration de l'immunothérapie aux venins d'hyménoptères chez l'enfant. *Rev. fr. Allergol.*, 1988, 28 (3), 237-240.

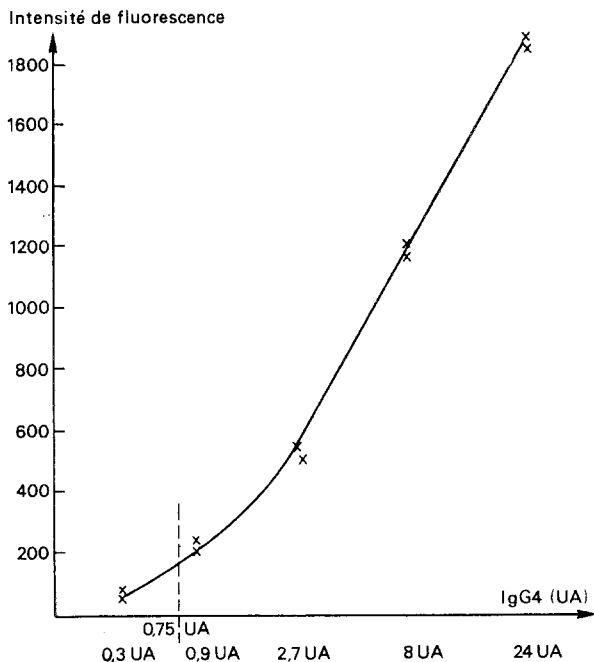


Fig. 1. — Courbe de référence exprimée en unités arbitraires (UA) obtenue à partir d'un pool de sérums riches en IgG4 du venin de guêpe.

titration (Imulon II Dynatech) et le « coating » est effectué pendant une nuit à + 4 °C.

Les plaques sont alors lavées à l'aide d'un tampon de lavage : PBS 0,1 M tween 0,5 p. cent pH 7,4. 150 µl d'une dilution au 1/10 du sérum dans un tampon PBS 0,1 M BSA 1 mg/ml pH 7,4 sont répartis en duplicate. Une gamme de référence est également répartie en duplicate. Elle comprend 4 dilutions d'un pool de sérum de patients désensibilisés au venin de guêpe.

Après une incubation de 1 h 30 à température du laboratoire et trois lavages, 140 mcl de l'anticorps monoclonal (Seward clone BAM16) dilué au 1/2 500 dans le tampon de dilution sont ajoutés dans tous les puits. A 1 heure d'incubation à température du laboratoire et trois lavages 150 µl d'anticorps F(ab)'₂ anti-IgG de souris (Sigma) marqué à la phosphatase alcaline sont ajoutés dans tous les puits. Après trois lavages, 200 µl d'une dilution de 10⁻⁴ M de méthyl umbelliferyl phosphate dans un tampon Tris 0,1 M pH 8,5 sont répartis dans tous les puits.

Après une incubation de 30 minutes à température du laboratoire les plaques sont lues à l'aide d'un fluorimètre automatique (Dynatech microfluor).

Expression des résultats

Les valeurs moyennes des intensités de fluorescence des différents duplicats sont comparées

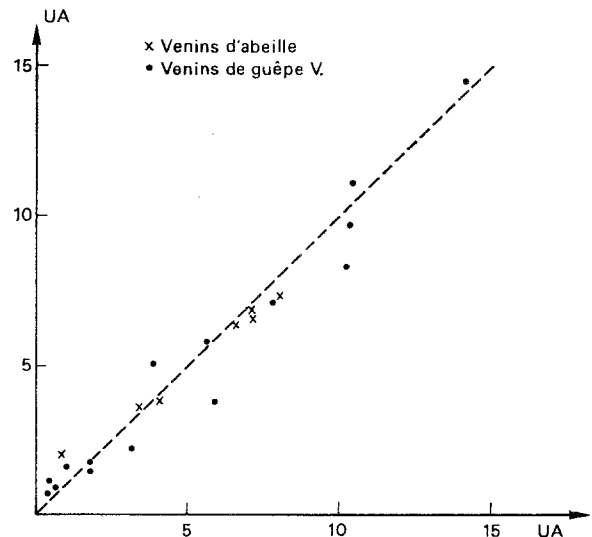


Fig. 2. — Reproductibilité des dosages d'IgG4 spécifiques effectués en duplicate sur 22 sérums (6 pour le venin d'abeille et 14 pour le venin de guêpe).

à celles d'un gamme de référence. Celle-ci est obtenue à partir d'un sérum riche en IgG4 spécifiques du venin de guêpe et son expression semi-quantitative en unités arbitraires (UA) définit en fixant à 0,75 UA la valeur moyenne plus 2 écarts-types des résultats en intensité de fluorescence de 50 sérums de sujets non allergiques,

Une courbe d'étalonnage type est représentée sur la figure 1.

RESULTATS

Reproductibilité des résultats

22 sérums possédant des taux différents d'IgG4 spécifiques ont été dosés à l'aveugle en double dans la même série de dosage. Les résultats sont représentés sur la figure 2.

Nous avons également dosé 25 fois le même sérum dans la même série de dosages. Pour une moyenne des résultats correspondant à 3,7 UA, le coefficient de variation est de 6 p. cent.

Spécificité des résultats

La fiche de contrôle de l'anti-sérum monoclonal utilisé montre qu'en présence de protéines purifiées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 humaines la réaction croisée pour les isotypes 1, 2 et 3 est négligeable.

De plus, nous avons également testé la spécificité de cet anti-sérum en fixant sur des plaques de microtitration des anticorps polyclonaux anti-IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 (Nordic). L'anti-IgG4

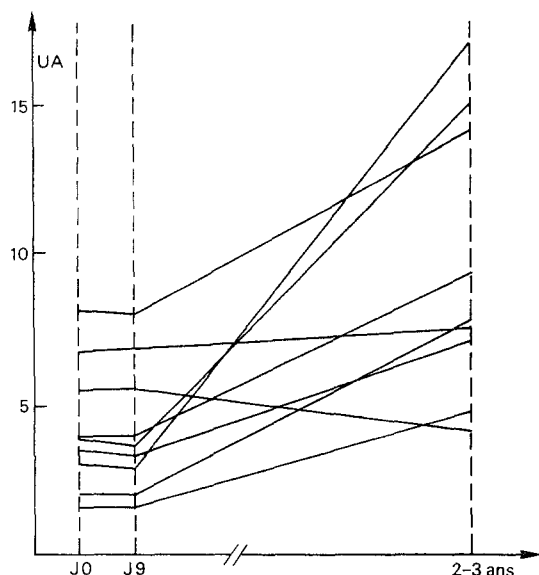


Fig. 3. — Evolution au cours du temps des IgG4 spécifiques post-rush pour le venin d'abeille (n = 9).

monoclonal ne reconnaît dans les conditions expérimentales utilisées que les IgG fixées par l'anti-IgG4 polyclonal alors qu'un anticorps monoclonal reconnaissant les quatre isotypes reconnaît les IgG fixées par les 4 anti-sérum.

De plus, dans les conditions techniques décrites précédemment, nous avons testé d'une part l'effet de la suppression du sérum et d'autre part l'effet de la suppression du monoclonal anti-IgG4 pour une dilution du sérum correspondant à 24 UA. L'intensité de fluorescence obtenue dans le premier cas est de 0,20 UA et dans le second de 0,35 UA (donc bien en-dessous de la limite de positivité de 0,75 UA).

Spécificité antigénique

Pour 25 sujets, nous avons dosé les IgG4 spécifiques pour les deux venins (Yellow Jacket et Honey bee). Pour une majorité des sérums (20/25), nous retrouvons une réponse significativement différente pour l'un ou l'autre des venins (7 pour le venin de guêpe avec en moyenne une réponse de 11,8 fois plus importante et 13 pour l'abeille avec une moyenne des réponses de 7,1 fois plus importante). Pour 5 sujets seulement la réponse était équivalente pour les deux venins.

Application aux malades en cours de désensibilisation

Les résultats des dosages pour les 21 sérums d'allergiques à la guêpe et les 9 sérums d'allergiques à l'abeille sont représentés respectivement sur les figures 3 et 4 et le tableau I.

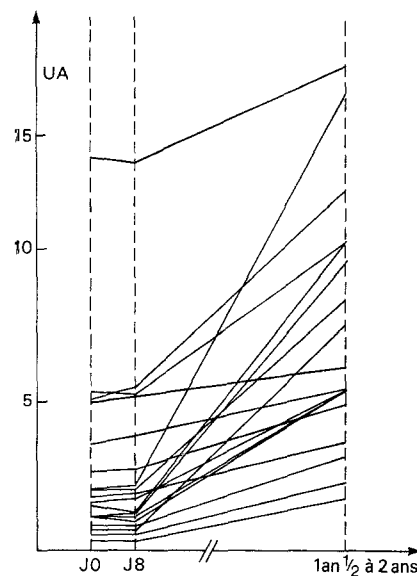


Fig. 4. — Evolution au cours du temps du taux des IgG4 spécifiques post-rush pour le venin de guêpe (n = 18).

TABEAU I. — Moyennes des valeurs obtenues avant le « Rush » (t0) à la fin de celui-ci (t1) et dans un délai de 18 à 36 mois (t2)

	t0	t1	t2
Venin de guêpe, n = 21	2,4 UA	2,6 UA	6,2 UA
Venin d'abeille, n = 9	4,2 UA	4,0 UA	10,4 UA

UA : unités arbitraires.

On constate au temps t2 une augmentation significative du taux des IgG4 spécifiques pour 7 sujets sur 9 pour l'abeille et pour 17 sur 21 sujets pour la guêpe dans un délai variant de 1 à 3 ans.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous disposons ainsi d'une technique fiable et rapide de recherche des IgG4 spécifiques. Parmi les différents allergènes, les venins représentent un cas tout à fait particulier du fait de la pureté de l'allergène utilisé. Il est important dans ce cas de disposer de paramètres d'efficacité thérapeutique. Wüthrich et coll. [23] ont montré que les IgG spécifiques éventuellement couplées aux IgE spécifiques représentaient de bons critères. Il paraît (résultats en cours de publication) que le dosage de la sous-classe 4 des IgG présente une meilleure sensibilité et une meilleure fiabilité que celle des IgG toutes sous-classes confondues. Il apparaît que l'immunothérapie en « rush » ne fait augmenter significativement le taux des IgG4

spécifiques qu'au bout de quelques mois. Les résultats correspondants seront l'objet d'un travail ultérieur en cours de préparation ; une étude plus prolongée semblait indispensable à la discussion de l'intérêt de ce dosage. Ce dosage des

IgG4 spécifiques peut très probablement être également appliqué au suivi de la désensibilisation aux pneumallergènes et au diagnostic des allergies alimentaires s'il est possible de disposer d'allergènes purs et bien standardisés.

REFERENCES

1. Avrameas S. — Coupling of enzyme to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, 1969, 6, 43.
2. Bousquet J., Menardo J.L., Michel F.B. — Clinical and immunologic survey in beekeepers in relation to their sensitization. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1984, 73, 332-340.
3. Diana L., Facan B.S., Clive A., Slaughter Ph. D.J., Donald Capra D., Thimothy J., Sullivan M.D. — Monoclonal antibodies to immunoglobulin G4 induce histamine release from human basophils in vitro. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1982, 70, 399-404.
4. Djurup R. — The subclass nature and clinical significance of the IgG antibody response in patients undergoing allergen specific treatment. *Allergy*, 1985, 43, 469-486.
5. Djurup R., Osterballe O. — IgG subclass antibody in grass pollen allergic patients undergoing specific immunotherapy. *Allergy*, 1984, 39, 433-441.
6. Ferrante A., Rowan-Kelly B., Beard I.J., Manwell G.M. — An enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative determination of human IgG subclasses using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1986, 93, 207-212.
7. Guesdon J.L., Avrameas S. — Magnetic solid phase enzyme immunoassay. *Immunochemistry*, 1977, 14, 443-447.
8. Herner D.C., de Weck A.L., Skvaril F., Muller U., Undertown B. — IgG4 antibody responses to five bee venom antigens. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1980, 65, 201.
9. Hindocha P., Wood C.B.S. — Histamine release from human leucocytes by IgG4 subclass in the sera of allergic children. *Allergy*, 1985, 40, 523-528.
10. Homburger A., Mauer, Sachs I., O'Connell J., Jacob L., Caron D. — Serum IgG4 concentrations and allergen specific IgG4 antibodies compared in adults and children with asthma and nonallergic subjects. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1986, 77, 427-34.
11. Hussain R., Poindentes R.W., Wistarand R., Reimer C.B. — Use of monoclonal antibodies to quantify subclasses of human IgG. I. Development of two site immunoenzymatic assays for total IgG subclasses determinations. *J. Immunol. Methods*, 1986, 93, 89-96.
12. Kemeny D.M., Urbanek R., Richards D., Greenall C. — Development of a semi quantitative enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of human IgG subclass antibodies.
13. Labrousse H., Guesdon J.L., Ragimbeau J., Avrameas S. — Miniaturization of beta-galactosidase immunoassays using chromogenic and fluorogenic substrates. *J. Immunol. Methods*, 1982, 48, 133-147.
14. Layton G.T., Stanworth D.R. — The quantitation of IgG4 antibodies to three common food allergen by Elisa with monoclonal IgG4. *J. Immunol.*, 1984, 73, 347-356.
15. Menett J., Barnetson R.S., Bun M.L., Menett T.G. — Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema. *Clin. exp. Immunol.*, 1984, 56, 645.
16. Nakagawa T., Stadler B.M., Heiner D.C., Skvaril F., de Weck A.L. — Flow-cytometric analysis of human basophil degranulation. *Clin. Allergy*, 1981, 11, 21-30.
17. Pateraki E., Guesdon J.L., Serie C., Avrameas S. — Terelisa : the Elisa test performed in terasaki plates. *J. Immunol. Meth.*, 1981, 46, 361-368.
18. Sainte-Laudy J. — Enzyme-linked immunosorbent assays (Elisa) for total serum IgG4 and specific IgG4 antibodies. In : *Clinical reviews in allergy*. New York, Elsevier, 1983.
19. Van Toorenbergen A.W., Aalberse R.C. — IgG4 and passive sensitization of basophil leucocytes. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1981, 65, 432-440.
20. Van Toorenbergen A.W., Aalberse R.C. — IgG4 and release of histamine from peripheral blood leucocytes. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1982, 67, 117-122.
21. Vijay H.M., Perelmutter L. — Inhibition of reagin-mediated PCA reactions in monkeys and histamine release from human leucocytes by human IgG4 subclass. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1977, 53, 78-87.
22. Vijay H.M., Perelmutter L., Bernstein I.L. — Possible role of IgG4 in discordant correlations between intracutaneous skin test and RAST. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1978, 56, 517-522.
23. Wüthrich B., Arrendal H., Lanner A. — Allergie aux piqûres d'hyménoptères. Différents types de réactions immunologiques pendant l'immunothérapie avec les venins. *Rev. fr. Allergol.*, 1982, 22, 199-205.

