

Etude de la réponse immunitaire IgM, IgG et IgE spécifiques à la bêta-lactoglobuline saccharosée chez le lapin

par

Anne MONERET-VAUTRIN*, A. K. EL HAMOUI**, G. HUMBERT***,
C. JANOT**** et H. GERARD*****

Résumé

La possibilité d'une réponse en anticorps hémagglutinants et réaginisques (IgE spécifiques) à l'immunisation par voie digestive, intra-péritonéale et sous-cutanée à la β -lactoglobuline saccharosée, est étudiée chez le lapin en comparaison avec la β -lactoglobuline native. Une administration unique n'est pas suivie de réponse hémagglutinante et la réponse à IgE spécifiques est inconstante et de faible intensité pour les voies digestive et sous-cutanée. Elle est plus nette par voie intrapéritonéale et l'on peut considérer que ceci est un modèle expérimental d'une situation pathologique où la muqueuse digestive serait gravement altérée.

Les anticorps sont également mis en évidence vis-à-vis de la β -lactoglobuline native. Il semble que le chauffage en présence de sucre ne modifie pas l'antigénicité. Le taux de réactions immunitaires est identique par l'utilisation de la β -lactoglobuline native et saccharosée. La répétition des prises pendant huit jours, de 10 mg/jour

* Service de médecine « D » (Pr J. P. Grilliat, Pr Ag. D. A. Moneret-Vautrin), Médecine Interne et Immuno-Allergologie, C.H.U. de Nancy-Brabois, route de Neufchâteau - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy.

** Laboratoire d'Immunologie (Pr J. Duheille), Faculté A de Médecine, B.P. 184 - 54505 Vandœuvre-lès-Nancy.

*** Laboratoire de Biochimie Appliquée (Pr C. Alais), Université de Nancy I, B.P. 239 - 54506 Vandœuvre-lès-Nancy.

**** Centre de Transfusion Sanguine, Nancy-Brabois, route de Neufchâteau - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy.

***** Laboratoire d'Embryologie (Pr G. Grignon), Faculté de Médecine - 54505 Vandœuvre-lès-Nancy.

de la protéine, montre l'absence d'IgE spécifiques. Ce modèle expérimental se rapproche de l'alimentation usuelle humaine (prises répétées). Il semble qu'on puisse conclure à un état de non réactivité. Le pouvoir immunogène et allergénique de la β -lactoglobuline par voie digestive est confirmé, mais paraît faible, en comparaison avec la peroxydase du raifort et l'ovalbumine.

Mots clés

Bétalactoglobuline - Immunisation expérimentale - Lapin - Administration orale, péritonéale, sous-cutanée - Anticorps hémagglutinants - IgE spécifiques - Dégranulation des basophiles.

Titre abrégé

Immunisation expérimentale à la bétalactoglobuline.

Summary

STUDY OF THE IMMUNE RESPONSE (SPECIFIC IgM, IgG AND IgE)
VERSUS NATIVE BETALACTOGLOBULIN
AND BETALACTOGLOBULIN COUPLED TO SUCROSE,
IN THE RABBIT

The production of hemagglutinating antibodies and specific IgE against native β -lactoglobulin, or coupled with sucrose, is studied in the rabbit. Immunization is performed by oral, peritoneal and subcutaneous administration. A single administration does not give rise to an hemagglutinating response, and the level of specific IgE is low and not constant-except for peritoneal immunization. This last one is an experimental model of pathological states including a severe alteration of digestive mucosa. The antibodies directed against β -lactoglobulin coupled to sucrose interact with native β -lactoglobulin. Meating does not modify the allergenicity. Reactions evoked by both proteins are identical. Repeated administration (10 mg/day during eight days) is followed by the apparition of hemagglutinating antibodies but specific IgE are absent. This model is close to human diet. We may consider that absence of immunological reactivity is obtained. Immunogenic and allergenic potencies of β -lactoglobulin by oral administration are confirmed, but seem to be weak, compared to horse-radish peroxydase and ovalbumin.

Key words

Betalactoglobulin - Experimental immunisation - Rabbit - Oral, peritoneal, subcutaneous administration - Hemagglutinating antibodies - Specific IgE - Basophil degranulation.

Run-title

Experimental immunisation to betalactoglobulin.

INTRODUCTION

L'allergénicité du lait de vache a trait à plusieurs protéines possibles. Toutefois, l'antigène majeur est la bêta-lactoglobuline (β LG) quantitativement la plus importante après les caséines. Bleumink et Berrens (1966) ont montré que le pouvoir réactogène cutané de la β LG chauffée en présence d'un sucre réducteur, est supérieur à celui de la β LG native (Bleumink et Young, 1968). Plus récemment, Mc Laughlan *et al.*, (1981) ont établi que le pouvoir immunogène est, au contraire, très diminué par la technologie moderne, et ses procédés de chauffage et dessiccation.

La mise au point de gels lactosériques (Legrand et Paul, 1977), dont l'obtention comporte un traitement thermique, pose donc le problème d'un risque allergisant ou réactogène particulier, dans la mesure où des interactions entre protéine et saccharose pourraient donner des dérivés à risque d'allergie. C'est pourquoi, nous rapportons ici les résultats de l'immunisation expérimentale à la β LG saccharosée chez le lapin.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Lapins Albinos, adultes, de poids moyen de 2 kg. Cette espèce possède des IgE, et un haut taux de basophiles sanguins (Ishizaka et Kishimoto, 1972; Revoltella et Ovary, 1969; Strannegard *et al.*, 1969; Zvaifler et Becker, 1966).

Antigène

La β LG saccharosée (β LGS) est obtenue par couplage, en chauffant sous pression le mélange protéine + saccharose à 112° C pendant 5 min (le rapport β LG/saccharose est 1/6). Deux doses sont étudiées : 1 et 10 mg.

Adjuvant

Gel d'hydroxyde d'alumine selon la technique de Levine et Vaz (1970) en raison de son rôle inducteur d'IgE spécifiques (Pauwells *et al.*, 1979). La dose unitaire est de 90 mg dans toutes les expériences.

Immunisation et chronologie des tests

Six groupes sont immunisés :

1. Dix animaux. Voie digestive : β LGS : 1 mg.

2. Sept animaux. Voie digestive : β LGS : 10 mg.
3. Sept animaux. Voie intrapéritonéale : β LGS : 10 mg.
4. Huit animaux. Voie sous-cutanée : β LGS : 10 mg.
5. Huit animaux. Voie digestive : β LG native : 10 mg/jour, pendant 8 jours.
6. Huit animaux. Voie digestive : β LGS : 10 mg/jour, pendant 8 jours.

Les tests sont pratiqués avant et 10 j après immunisation.

Techniques

Les tests utilisés sont l'hémagglutination passive et le test de dégranulation des basophiles de lapin, ainsi que le compte des basophiles avant et après provocation intraveineuse.

1. *L'hémagglutination passive* selon la technique de Boyden, (1951), modifiée par Stavitzki (1954) comporte l'incubation d'hématies de Mouton avec la β LG native ou saccharosée en présence de glutaraldéhyde. Les antisérums de Lapin (dilutions de 2 en 2), préalablement décomplémentés par chauffage à 56° C pendant 30 min sont testés, après incubation préalable de 20 min avec des hématies contrôle (élimination des anticorps anti-GRM).

2. *Le test de dégranulation des basophiles de Lapin (TDBL)* : il est pratiqué selon la technique de Benveniste *et al.*, (1977). On prélève 3 ml de sang veineux sur un mélange d'Héparine et d'EDTA di- et tétrasodique et on introduit 20 μ l de sang dans les sept puits d'une micro-plaque (cinq puits contiennent la substance étudiée additionnée de calcium, à quatre concentrations : 100, 10, 1 et 0,1 μ g/ml. Deux puits servent de témoins pour le compte de basophiles/ μ). La plaque est placée pendant 10 min à 37° C, puis on ajoute 180 μ l de réactif (bleu de toluidine à 0,025 % dans l'éthanol à 30 % amené à pH 3,2 par 4 μ l d'acide acétique glacial/ml). Le mélange prélevé est mis dans une cellule de Nageotte. Après une attente de 10 min la cellule est observée et les basophiles sont comptés. Le réactif hémolyse les globules rouges et colore spécifiquement les basophiles en rouge. En cas de libération d'histamine, les basophiles dégranulés ne se colorent pas : on observe donc une diminution nette du nombre des basophiles pour une ou plusieurs concentrations. Le taux de dégranulation correspond à :

$$\frac{\text{nombre de basophiles contrôle} - \text{nombre de basophiles test}}{\text{nombre de basophiles contrôle}} \times 100$$

D'après le travail de Gérard *et al.*, (1977), le taux de dégranulation est significatif au risque d'une erreur statistique inférieure à 5 %, selon le nombre de cellules comptées (fig. 1 et 2). Le nombre de basophiles/ μ l variant de 90 à plus de 250, chaque test a reposé

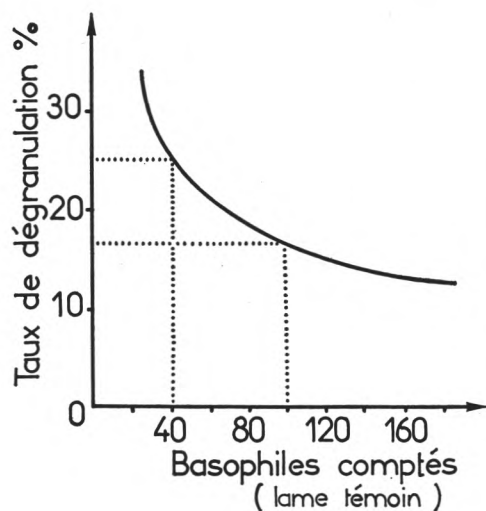


fig. 1

Variation du pourcentage de dégranulation significatif ($p < 0,05$) en fonction du nombre de basophiles comptés sur la lame-témoin.

Significative level of degranulation owing to the number of counted basophils in the control ($p < 0,05$).

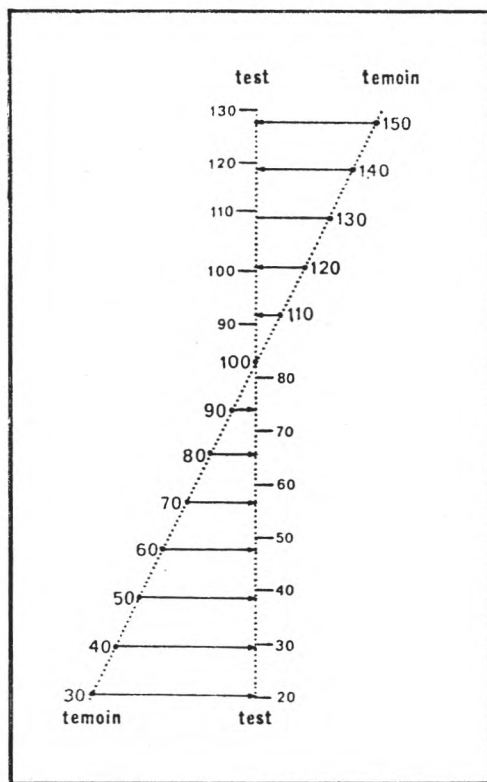


fig. 2

Echelle de correspondances entre le nombre de basophiles comptés sur la lame-témoin et le nombre de basophiles en dessous duquel une lame-test présente un taux de dégranulation significatif ($p < 0,05$).

Scale of correspondances between the number of basophils in the control and in the test ($p < 0,05$).

sur l'observation de 60 à 100 cellules par concentration étudiée. La dégranulation est significative si elle dépasse 22 % pour 60 cellules, 18 % pour 100 cellules. Deux variantes sont réalisées : TDBL direct sur basophiles lavés en tampon PBS, en présence d'EDTA (mise en évidence d'IgE fixées sur les cellules); et TDBL indirect par sensibilisation passive avec l'antisérum étudié de basophiles d'un Lapin témoin. Après trois lavages en tampon PBS, les basophiles sont incubés 60 min avec l'antisérum : mise en évidence d'IgE plasmatiques.

3. *Compte de basophiles* 30 min après provocation intraveineuse par 1 mg de β LG. La chute du nombre des basophiles correspond à une dégranulation in vivo. La spécificité de cette dégranulation est évaluée par la comparaison avec les résultats obtenus chez le même animal après injection intraveineuse du même volume de sérum physiologique (compte toujours stable), et les résultats obtenus par injection intraveineuse (IV) de 1 mg de β LG chez des animaux non immunisés.

RESULTATS

On n'obtient pas de réponse hémagglutinante à une immunisation unique par voie digestive ou intrapéritonéale (tab. 1), et une

TABLEAU 1 - TABLE 1

Réponse IgM et IgG appréciée par hémagglutination passive à la β -lactoglobuline native (N) et saccharosée (S)

Passive hemagglutination to native β -lactoglobulin (N) and β -lactoglobulin coupled to sucrose (S)

Groupe	Voie d'administration	β -lactoglobuline (dose d'antigène)	Anticorps hémagglutinant (nombre de réponse, titre)
2	Digestive	S (10 mg)	0/7
3	Intrapéritonéale	S (10 mg)	0/7
4	Sous-cutanée	S (10 mg)	2/7 (1/2 - 1/32)
5	Digestive	N (10 mg/j)	5/7 (1/32)
6	Digestive	S (10 mg/j)	8/8 (1/32 - 1/128)

réponse faible chez deux animaux sur sept, immunisés par voie sous-cutanée. La prise régulière de β LG dans l'alimentation pendant 8 jours, entraîne une réponse faible chez cinq animaux sur sept

TABLEAU 2 - TABLE 2

Réponse IgE spécifique à la β -lactoglobuline native (N) et saccharosée (S)
Specific IgE to native β -lactoglobulin (N) and β -lactoglobulin coupled to sucrose (S)

Groupes	Voie d'administration	β -lactoglobuline (antigène)	Dose d'antigène (mg)	Nombre de lapins	IgE spécifique cellulaire		IgE spécifique plasmatique		Chute du compte de basophiles (CB %)
					S	N	S	N	
1	Digestive	S	1	10	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	Digestive	S	10	7	3	4	2	3	3 (61-67-74)
3	Intrapéritonéale	S	10	7	4	3	4	1	6 (76-78-91-91-95-97)
4	Sous-cutanée	S	10	8	2	2	3	4	3 (61-65-95)
5	Digestive	N	10 (8 j)	8	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
6	Digestive	S	10 (8 j)	8	1	0	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = non déterminé.

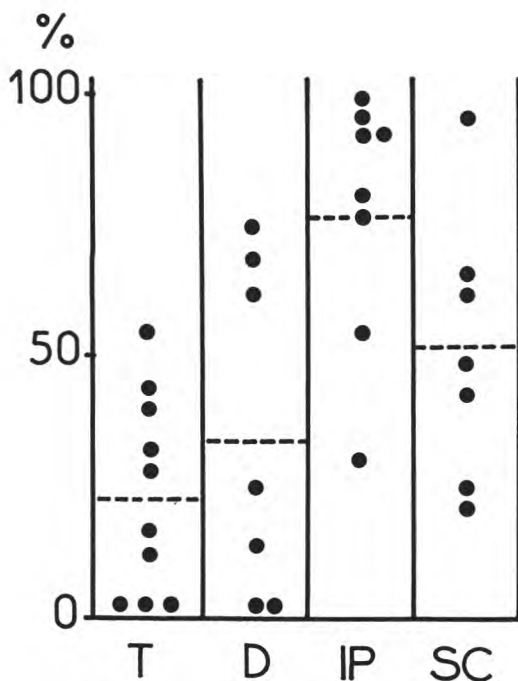


fig. 3

Taux de chute du nombre des basophiles après provocation intraveineuse par 1 mg de β -lactoglobuline (T = témoin, D = voie digestive, IP = voie intrapéritonéale, SC = voie sous-cutanée).

Lowering of the level of basophils after intravenous challenge with 1 mg of β -lactoglobulin (T = control, D = oral, IP = peritoneal, SC = subcutaneous administrations).

(pour la β LG native) et chez tous les animaux ingérant la β LGS. Inversement, une réponse IgE (IgE fixées sur les basophiles et IgE plasmatiques) est observée chez onze animaux sur trente-deux subissant une immunisation unique, la voie intrapéritonéale obtenant les meilleurs résultats, appréciée par TDBL direct et indirect que par chute du compte des basophiles après injection IV (tab. 2). Le test de provocation, réalisé dans les groupes 2, 3, 4, est toujours négatif sur le plan clinique : les animaux ne présentant pas de symptômes patents. Il existe une chute du compte des basophiles chez trois animaux témoins sur six (allant de 20 à 46 %), et chez douze animaux sensibilisés sur vingt-deux. La différence n'est pas significative. Cependant, en cas d'immunisation intrapéritonéale, les chiffres de dégranulation sont très supérieurs à ceux obtenus chez les témoins (de 76 à 97 %) ; quatre animaux présentent une disparition de plus de 90 % de leurs basophiles (fig. 3). L'ingestion régulière de β LG aboutit au résultat inverse : un seul animal sur seize présente un TDBL positif à la β LGS. Lorsque les animaux immunisés à la β LGS présentent des IgE spécifiques, le TDBL est fréquemment positif aussi à la β LG native (fig. 4 et 5).

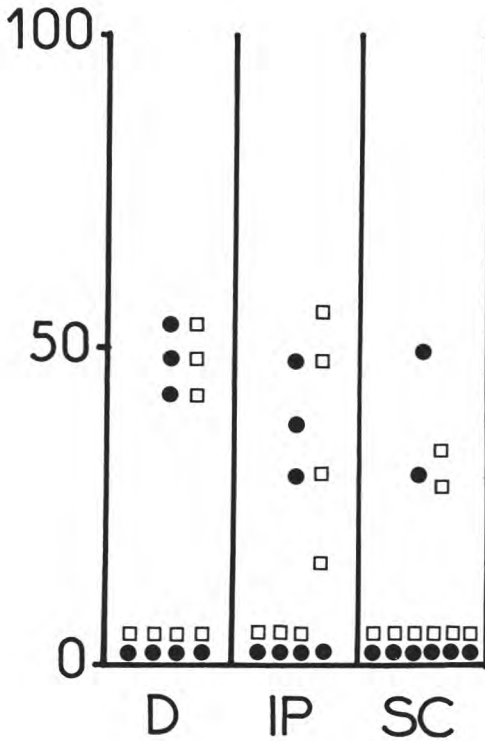


fig. 4

IgE spécifiques à la β -lactoglobuline (TDBL direct) chez les lapins immunisés par 10 mg de β -lactoglobuline saccharosée ($\square$) avec 90 mg d'hydroxyde d'alumine ($\text{Al}(\text{OH})_3$). (● β -lactoglobuline native ; administration digestive D, intrapéritonéale IP et sous-cutanée SC).

Cellular specific IgE to β -lactoglobulin in rabbits immunized with 10 mg of β -lactoglobulin coupled to sucrose ($\square$) with 90 mg of alumine hydroxyd ($\text{Al}(\text{OH})_3$). (● native β -lactoglobulin ; Digestive, D, peritoneal, IP and subcutaneous, SC, administrations).

DISCUSSION

Plusieurs travaux, dans certaines souches de Rat ou de Souris, indiquent la possibilité d'une réponse réaginique à une immunisation par voie digestive (Bazin *et al.*, 1973, 1976, 1977 ; Jarrett *et al.*, 1976 ; Moneret-Vautrin *et al.*, 1979). Ces travaux apportent une base immunologique à la compréhension de l'allergie alimentaire de type I, où les anticorps mis en évidence sont des IgE. Cependant, l'étude de Coombs et Oldham (1981), chez le Lapin, montre, de surcroît, que l'immunisation aux protéines du lait peut entraîner des lésions arthritiques avec infiltration lymphoplasmocytaire des synoviales, et leucocytose du liquide articulaire, et ceci peut évoquer un mécanisme de type III, à immun-complexes, dont les anticorps en cause serait des IgG.

La β LGS et la β LG native se comportent comme des immunogènes peu puissants, puisque la réponse hémagglutinante est nulle pour les voies digestive et intrapéritonéale, en cas d'immunisation unique ; le taux est un peu plus élevé (1/32 à 1/138) en cas d'immu-

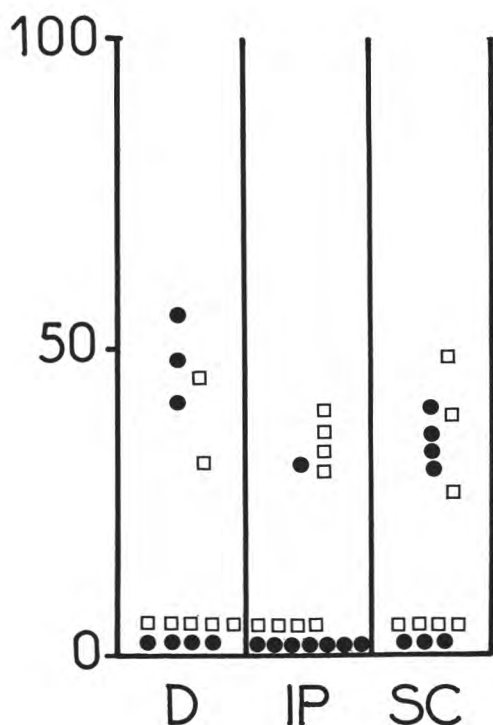


fig. 5

Lapins immunisés par 10 mg de β -lactoglobuline saccharosée : IgE spécifiques plasmatiques au 10^e j. (Pour les symboles, voir la légende de la figure 4).

Plasmatic specific IgE to β -lactoglobulin in rabbits immunized with 10 mg of β -lactoglobulin coupled to sucrose (for symbols see legend of figure 4).

nisation digestive répétée pendant 8 jours. Ces résultats sont assez comparables à ceux obtenus par Coombs et Oldham (1981), dont les taux d'anticorps se situent entre 1/4 et 1/18 (ce taux n'a pas utilisé d'adjuvant). La réponse en anticorps hémagglutinants est beaucoup plus faible que celle que l'on obtient avec l'ovalbumine ou la peroxydase du raifort.

Une réponse IgE est observée dans le tiers des cas, et reste de faible intensité. Elle paraît, cependant, favorisée par l'administration intrapéritonéale. Or, cette voie d'administration peut être considérée comme un modèle d'une situation pathologique, représentée chez le nourrisson par une atteinte importante de la muqueuse intestinale (d'origine virale, infectieuse, allergique, etc.). Dans ce cas, on peut supposer qu'une certaine quantité d'antigènes alimentaires franchisse cette muqueuse digestive altérée et vienne stimuler directement une réponse immunitaire au niveau des ganglions mésentériques. La constatation d'une plus grande fréquence des IgE spécifiques en réponse à l'administration intrapéritonéale pourrait indiquer un risque de sensibilisation plus important. De fait, différents pédiatres ont souligné que les gastro-entérites virales paraissent

favoriser la survenue d'une allergie alimentaire au lait chez le nourrisson.

Les anticorps IgE, créés par immunisation à la β LGS, sont capables d'induire une dégranulation des basophiles en présence de β LG native. Ceci amène à penser que les déterminants antigéniques de la β LG native subsistent dans la β LGS et n'ont pas été dénaturés par le chauffage. D'après nos résultats, il ne semble pas, du reste, que la β LG chauffée et couplée au saccharose présente un risque allergénique supérieur à la β LG native.

L'administration régulière de 10 mg/jour, pendant 8 jours, de β LG, montre l'existence d'une réponse en anticorps hémagglutinants, mais l'absence d'IgE spécifiques. Ce phénomène est important, car ce modèle d'immunisation se rapproche des ingestions répétées chez l'homme. Il semble donc s'installer un état de non-réactivité, et on pourrait conclure à une tolérance, sous réserve de confirmer ces résultats par l'étude de tests de provocation.

CONCLUSION

L'étude de la réponse immunitaire à la β LGS ne montre pas, chez le Lapin, de réponse anticorps importante, ni de type IgG et IgM, ni de type IgE. Les anticorps IgE présents réagissent avec la β LG native, et on peut conclure que les déterminants antigéniques de la protéine n'ont pas été modifiés par le traitement thermique la couplant au saccharose. La β LG se comporte comme un immunogène peu puissant. La répétition de son administration annihile toute réponse anticorps.

**

Nota-bene : Cette étude a fait, en partie, l'objet d'un contrat D.G.R.S.T. n° 78 7 1067 ; Comité « Qualité des Aliments, Toxicologie alimentaire, Physiopathologie des Aliments ».

Bibliographie

- BAZIN (H.), ANDRÉ (C.) et HEREMANS (J. F.) (1973). — Réponses immunologiques induites par voie orale. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 124 C, 253-271.
- BAZIN (H.) and PLATTEAU (B.) (1976). — Production of circulating reaginic (IgE) antibodies by oral administration of ovalbumin to rats. *Immunology*, 30, 679-684.
- BAZIN (H.) (1977). — Synthesis and distribution of IgE in some experimental models. In «Allergy and Clinical Immunology», Excerpta Medica, Ed. E. Mathou, T. Sindo and P. Naranto.
- BENVENISTE (J.), EGIDO (J.), GUTIERREZ-MILLET (V.) and CAMUSSI (G.) (1977). — Detection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 59, 271-279.

- BLEUMINK (E.) and BERRENS (L.) (1966). — Synthetic approaches to the biological activity of beta-lactoglobulin in human allergy to cow's milk. *Nature*, 212, 541-543.
- BLEUMINK (E.) and YOUNG (E.) (1968). — Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int. Arch. Allergy*, 34, 521-543.
- BOYDEN (S.V.) (1951). — The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination with antiprotein sera. *J. exp. med.*, 93, 107-111.
- COOMBS (R.R.A.) and OLDHAM (G.) (1981). — Early rheumatoid-like joint lesions in rabbits drinking cow's milk. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 64, 287-292.
- GÉRARD (H.), LEGRAS (B.) et MONERET-VAUTRIN (D.A.) (1981). — Le test de dégranulation des basophiles humains (TDBH). Intérêt d'une leucoconcentration et du calcul statistique appliqué au taux de dégranulation. *Pathol. Biol.*, 29, 137-142.
- HERBERT (W.J.) (1967). — Passive haemagglutination. In «Handbook of Experimental Immunology», Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 21, 720-744.
- ISHIZAKA (K.) and KISHIMOTO (T.) (1972). — Regulation of antibody response in vitro. II. Formation of rabbit reaginic antibody. *J. Immunol.*, 109, 65-73.
- JARRETT (E.E.E.), HAIG (D.M.), MAC DOUGALL (W.) and MAC NULTY (E.) (1976). — Rat IgE production. Primary and booster reaginic antibody responses following intradermal or oral immunization. *Immunology*, 30, 671-677.
- LEGRAND (C.) et PAUL (R.) (1977). — Produits lactés en forme de gel et leur procédé de fabrication. Brevets Français n° 2 345 936, n° 2 345 937 et 2 347 890.
- MAC LAUGHLAN (P.), ANDERSON (K.J.) and COOMBS (R.R.A.) (1981). — An oral screening procedure to determine the sensitizing capacity of infant feeding formulae. *Clin. Allergy*, 11, 311-318.
- MONERET-VAUTRIN (D.A.), DEMANGE (G.), SELVE (C.), GRILLIAT (J.P.) et SAVINET (H.) (1979). — Induction d'une hypersensibilité réaginique à la tartrazine chez le lapin : immunisation par voie digestive par le conjugué covalent tartrazine-sérumalbumine humaine. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 130 C, 419-430.
- PARIS (M.), HAMELIN (A.) et DEVILLE-HABROLLE (A.) (1977). — Hémagglutination passive. Technique à la glutaraldéhyde. Travaux Pratiques d'Immunologie Générale, Librairie « Le François », 44-46.
- PAUWELS (R.), BAZIN (H.), PLATTEAU (B.) and VAN DER STRAETEN (M.) (1979). — The influence of different adjuvants on the production of IgD and IgE antibodies. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 130 C, 49-58.
- QUICHAUD (C.) et al. (1974). — Intérêt de l'emploi de la glutaraldéhyde pour la sensibilisation des globules rouges dans la technique de Merskey. *Pathol. Biol.*, 22, 92-96.
- REVOLTELLA (R.) and OVARY (Z.) (1969). — Preferential production of rabbit reaginic antibodies. *Int. Arch. Allergy*, 36, 282-289.
- STAVITSKY (A.B.) (1954). — Micromethods for the study of proteins and antibodies. Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutinin inhibition reactions with tannic acid and protein treated with red blood cells. *J. Immunol.*, 72, 360-367.
- STRANNEGARD (O.), CHAN (P.C.Y.) and PALO ALTO (1969). — Association of rabbit reaginic antibody with an immunoglobulin distinct from IgG, IgA and IgM. *J. Allergy*, 43, 224-230.
- ZVAIFLER (N.J.) and BECKER (E.L.) (1966). — Rabbit anaphylactic antibody. *J. Exp. Med.*, 123, 935-950.