

Laboratoire de Chimie Médicale, Toxicologie et Hygiène (Prof. C. Heusghem),
Université de Liège, Belgique.

ETUDES ELECTROPHORETIQUE ET
IMMUNOCHIMIQUE DE DEUX FRACTIONS
ALLERGENIQUES ISOLEES DE LA
POUSSIÈRE DE MAISON

Par

R. VERSIE

Aspirante au F. N. R. S.

Au cours de ces dernières années, l'étude physico-chimique et biologique des extraits allergéniques de poussière de maison a fait l'objet de plusieurs travaux (1, 3, 7, 8, 15, 16, 17). Toutefois, il n'est pas encore possible de tirer des conclusions définitives quant à la nature, la composition ou le nombre des allergènes spécifiques à la poussière de maison. Les divergences d'opinion à ce sujet s'expliquent en partie par la diversité des procédés d'extraction et de purification employés pour la préparation des extraits allergéniques.

Jusqu'à présent, l'étude immuno-chimique des extraits de poussières de maison n'a pas été approfondie. Cependant, lors d'examens immuno-chimiques pratiqués au moyen d'antisérums préparés chez l'animal, *Lietze & Reed* (8) ont remarqué des réactions croisées entre les antisérums préparés par injection de deux extraits de poussières d'origine différente; *Philips & Northey* (11), par immunodiffusion, ont mis en évidence la présence d'au moins 3 composés antigéniques dans chacun des cinq extraits choisis, provenant d'origine différente.

Nous-mêmes avons entrepris une étude immuno-chimique des extraits de poussières de maison (18) dans le but d'établir les ressemblances antigéniques existant entre les différentes fractions allergéniques. En effet, lors de travaux antérieurs (9-17-

19), nous avons différencié sur les plans chimique et biologique, plusieurs fractions isolées à partir d'extraits bruts. Deux de ces fractions paraissent spécialement intéressantes à cause de leur activité allergénique important, mise en évidence par tests cutanés.

Le présent travail relate l'étude du comportement électrophorétique et immunoélectrophorétique de ces deux fractions et l'intérêt des renseignements apportés par ces deux techniques dans l'étude analytique des allergènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des Extraits. (Tableau 1).

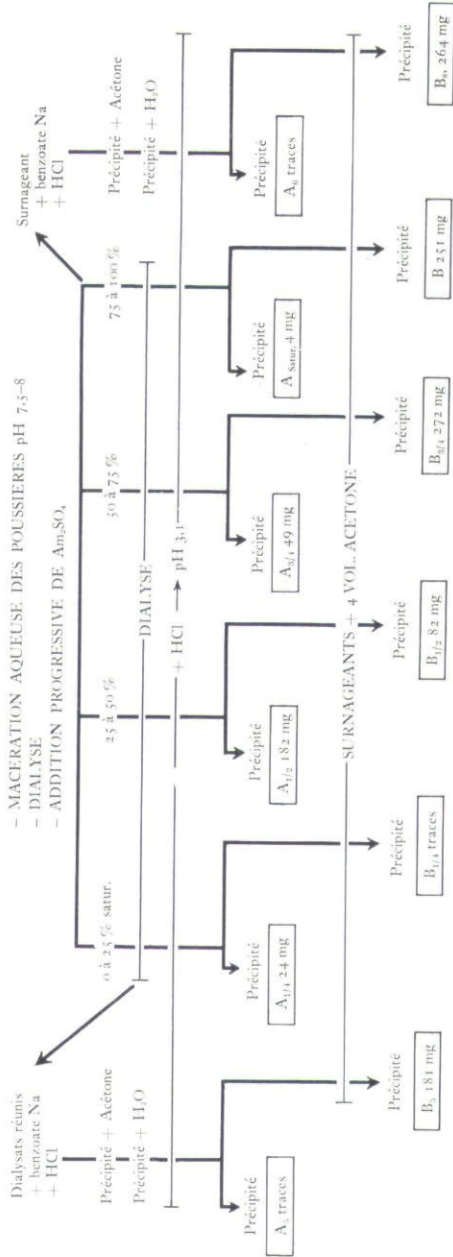
Trois kilos de poussières de maison ont été traités par macération aqueuse à un pH légèrement alcalin ($\pm 7,5-8$), en présence de phénol. Le mélange a été filtré et la solution, concentrée et dialysée. Celle-ci a été soumise à un fractionnement systématique par relargage à différentes concentrations en sulfate ammonique. Nous avons obtenu ainsi quatre précipités correspondant aux concentrations suivantes en Am_2SO_4 ; de 0 à 25 pour cent, de 25 à 50 pour cent, de 50 à 75 pour cent, de 75 à 100 pour cent de saturation. Les précipités séparés après un repos de 18 h. à 4°C ont été mis en suspension et dialysés, puis les liquides non dialysables ont été additionnés d'HCl dilué jusqu'à l'obtention d'un pH 3,1. Les précipités séparés après un repos de 18 heures à 4°C , ont été séchés sous vide; ils constituent les *fractions A*. Les liquides surnageants ont été additionnés de 4 fois leur volume d'acétone. Les précipités formés après repos de 18 heures à 4°C , constituent les *fractions B*.

En marge de ce fractionnement systématique, nous avons procédé à deux vérifications importantes:

1) *Absence de dérivés allergéniquement actifs dans les dialysats*: Pour ce faire, toutes les solutions dialysées lors du fractionnement décrit plus haut, ont été réunies et traitées par un précipité d'acide benzoïque (1, 12, 14, 17). Le précipité a été mis en suspension dans l'acétone; après centrifugation, la phase acétonique a été rejetée et le précipité, insoluble dans l'acétone, a été solubilisé par de l'eau et cette solution portée à pH 3,1. Après séparation du précipité formé (*fraction A5*), la solution surnageante a été traitée par 4 volumes d'acétone, et ce deuxième précipité séparé (*fraction B5*).

2) *Précipitation complète des allergènes par le relargage au Am_2SO_4 à saturation de solution*. Pour ce faire, la solution saturée en sulfate ammonique obtenue après séparation des précipités, a été dialysée puis traitée par addition d'acide benzoïque et fractionnée comme il est indiqué ci-dessus pour les dialysats (*fractions A6 et B6*).

TABLEAU I



La précipitation au pH de 3,1 et l'addition de 4 volumes d'acétone à la solution acide sont les conditions décrites précédemment pour l'obtention de fractions très actives d'allergènes de poussière de maison (1, 17, 19).

Examen des Extraits.

Lors de travaux précédents (17, 19), nous avons montré que ce système de fractionnement appliqué à des extraits bruts – même isolés différemment – sépare deux types de fractions allergéniquement très actives et présentant des caractéristiques chimiques nettement différenciées.

Les fractions A, séparées au pH 3,1, sont constituées d'un mélange riche en substances protéiniques. Les fractions B, séparées par addition d'acétone à une solution acide, sont vraisemblablement de nature glucoprotéinique. Le Tableau 2 reprend les valeurs moyennes des *constituants chimiques* établies pour ces groupes de fractions (17, 19).

TABLEAU 2
Résultats des Analyses Chimiques.

	Fractions B	Fractions A
<i>Azote organique</i>	8,5	5,7
<i>Azote précipitable</i> par Ac. TCA*	5,4	0,5
par Ac. PT**	7,6	5,2
Différence	2,1	4,7
<i>Reducteurs</i> (en glucose)		
Directs	1,9	4,5
Après hydrolyse acide	9,1	29,7
Différence	7,2	25,2
<i>R. Totaux</i>		
<i>N. Organique</i>	1	5,2

Les résultats sont donnés en pour cent du poids d'extrait sec. Les chiffres indiqués représentent la valeur moyenne des dosages effectués sur différentes fractions. – * Acide trichloracétique. – ** Acide phosphotungstique.

L'étude clinique des deux groupes de fractions a été effectuée par intradermo-réactions chez des individus sains et allergiques. Elle révèle que les fractions A ont une activité allergénique au moins égale à celle d'un extrait commercial de référence¹ et que les fractions B sont beaucoup plus actives (9, 19).

Les tests cutanés pratiqués chez des individus allergiques indiquent que la fraction B₅ (isolée à partir des dialysats) ne renferme pas de composés allergéniques décelables à la concentration habituellement utilisée avec des extraits aller-

¹ « Extrait de la poussière de maison » de l'Institut Pasteur, Paris.

géniques de poussières, pour faire apparaître une réaction positive chez les mêmes personnes.

Par contre, la fraction B6 (non précipitée par Am_2SO_4 à saturation de la solution) renferme un certain pouvoir allergénique; le nombre d'individus testés n'est cependant pas suffisant pour établir une correspondance entre l'activité de cette fraction et celle des autres fractions B.

Technique électrophorétique. Les examens électrophorétiques ont été pratiqués sur gel d'agar tamponné à pH 8,4 par une solution de veronal (20). Une intensité de courant de 15 mA par plaque a été maintenue pendant 25 minutes. Les composés polypeptidiques séparés ont été déterminés par le réactif à l'amidoschwarz.

Préparation des immun sérums. Deux lots de cinq lapins ont été traités, l'un par injections d'extrait A, l'autre par injections d'extrait B. Quatre injections sous-cutanées ont été pratiquées de sept en sept jours alternativement dans les quatre pattes. Chaque injection contenait 2 mg d'extrait en suspension dans un mélange à parties égales de tampon phosphate pH 7,2 et d'adjuvant de Freund.¹ Sept jours après la dernière injection sous-cutanée, les lapins ont reçu une injection intrapéritonéale de 2 mg d'extrait en solution dans le tampon phosphate pH 7,2 sans adjuvant de Freund. Le 11^{ème} jour après cette injection, 1 ml de sang a été prélevé à la veine marginale de l'oreille et testé par la technique de double diffusion (Ouchterlony) (10) afin de mettre en évidence la présence d'anticorps dans les sérums. Cette recherche étant positive, les lapins ont été saignés et les sérums conservés séparément à -20°C .

Technique immunoélectrophorétique. Les examens ont été pratiqués selon la technique classique d'immunoélectrophorèse en gel d'agar (13).

Le gel a été coulé sur les plaques au moment de l'emploi (2 ml par plaque); le tampon choisi était une solution de Veronal à pH 8,2. La différence de potentiel appliquée aux deux extrémités des plaques (75 mm) était de 40 V; la durée de migration, de 25 minutes.

Après développement électrophorétique, l'antisérum a été déposé dans les tranchées pratiquées dans l'agar et les plaques placées 15 à 18 heures dans une chambre humide à la température de 20°C . Après lavage des plaques dans le sérum physiologique, les arcs de précipitation antigène-anticorps ont été révélés par le réactif à l'amidoschwarz.

Les solutions d'allergènes et les immun sérums ont été déposés dans le gel selon le schéma indiqué ci-dessous (Fig. 1).

EXAMENS ET RESULTATS

A) Examens Electrophorétiques.

a) *Les examens directs* pratiqués sur les différents extraits A et B préparés suivant le procédé décrit au Tableau 1, révè-

¹ Bacto adjuvant complete 163860 - Difco.

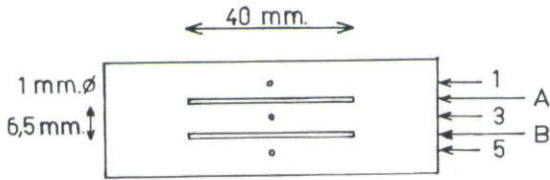


Fig. 1.

Proportions respectives des extraits allergéniques et des antisérums lors de examens immuno-électrophorétiques. Les deux distributions suivantes ont été employées.

- a) quantités d'allergène déposées: les alvéoles 1-3-5 sont remplies respectivement 1 fois, 3 fois, 5 fois par le même allergène (sol. 50 mg/ml).
 - quantités d'antisérum déposées: 0,03 ml et 0,05 ml du même antisérum sont déposés respectivement dans les tranchées A et B.
- b) quantités d'allergène déposées: les alvéoles 1-3-5 sont remplies respectivement 3 fois, 5 fois et 3 fois par le même allergène.
 - quantités d'antisérum déposées: 0,03 ml de deux antisérums différents sont déposées dans les tranchées A et B.

Lors de la migration électrophorétique, le pôle positif est à gauche du cliché.

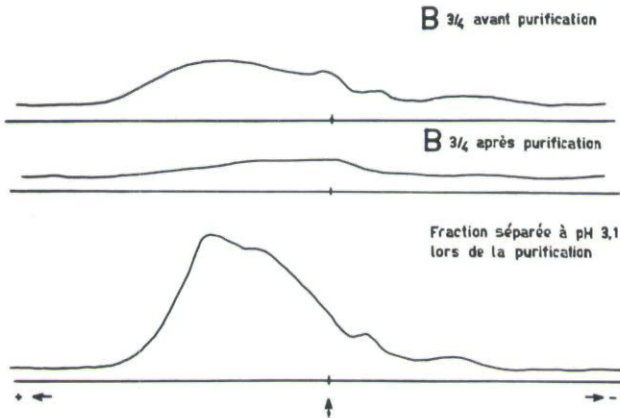


Fig. 2.

Enregistrement de la coloration obtenue par l'amido-schwarz après migration électrophorétique de la fraction B $\frac{3}{4}$ avant et après purification et de la fraction séparée à pH 3,1, lors de la purification.

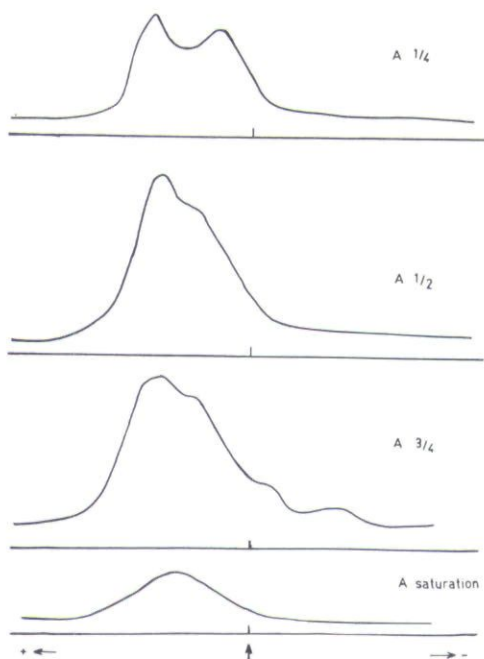


Fig. 3.

Enregistrement de la coloration obtenue par l'amido-schwarz après migration électrophorétique des différentes fractions A.

lent l'existence de deux groupes de fractions: le groupe des fractions A contenant plusieurs composés fortement colorés par l'amidoschwarz et le groupe des fractions B faiblement colorées. Une précipitation unique ne sépare pas complètement les fractions A des fractions B: les fractions B contiennent des traces des constituants caractéristiques des fractions A (Fig. 2).

b) Les fractions A et B ont été à nouveau traitées par précipitation au pH 3,1 puis par addition d'acétone.

A l'examen des fractions purifiées, on constate une meilleure différenciation des caractéristiques électrophorétiques des fractions A et B, principalement en ce qui concerne les fractions B (Fig. 2).

Caractéristiques électrophorétiques des différentes fractions.

Fractions A: le réactif à l'aminoschwarz fait apparaître plusieurs bandes électrophorétiques.

Quoique les 4 fractions A donnent des images très semblables, les différences suivantes apparaissent (Fig. 3) :

- la fraction A $\frac{1}{4}$ contient deux composés protéiniques migrant vers l'anode et révélables avec la même intensité.

- la fraction A $\frac{1}{2}$ renferme principalement le composé protéinique migrant rapidement vers l'anode.

- dans la fraction A $\frac{3}{4}$, le réactif à l'amidoschwarz révèle en plus des composés anodiques rencontrés dans les autres fractions, deux composés de moindre importance, migrant vers la cathode.

- dans la fraction A satur., le réactif à l'amidoschwarz, ne révèle qu'une faible bande anodique.

Fractions B: le réactif à l'amidoschwarz fait apparaître une bande légèrement colorée, diffusant de part et d'autre de la ligne de départ, principalement vers l'anode (Fig. 2).

B) Examens Immunoélectrophorétiques.

Un lot de 5 immunsérums anti-fractions A (ASA) et un lot de 5 immunsérums anti-fractions B (ASB) ont été obtenus.

a) *Comparaison des immunsérums.* Les ASA ont été testés en présence d'une fraction A et d'une fraction B. Les mêmes essais ont été pratiqués pour les ASB.

De l'examen des immunoélectrophorèses, on peut tirer les observations suivantes :

- 1) Les 5 lapins immunisés par la fraction A ont donné des réponses immunologiques peu différentes entre elles, si l'on n'envisage que le nombre d'anticorps formés. Il en est de même pour les 5 lapins immunisés par la fraction B.

- 2) Les zones de précipitation immunoélectrophorétiques obtenues avec les sérums anti A au contact des fractions A sont très différentes de celles obtenues avec les sérums anti B au contact des fractions B (Fig. 4 a-d).

- 3) Les immunsérums anti B réagissent avec les extraits A

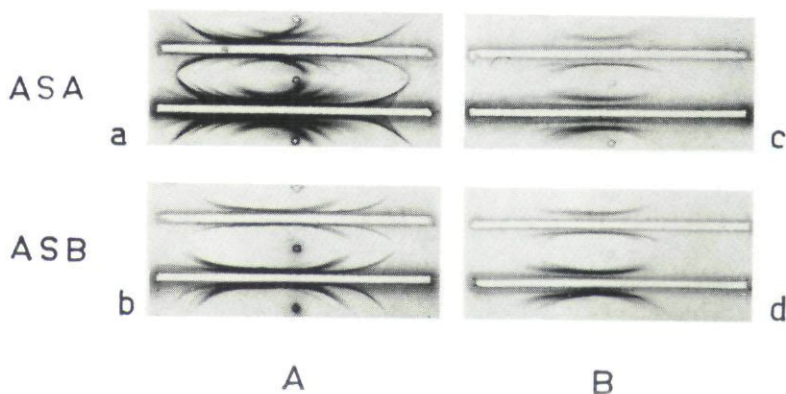


Fig. 4.

Zones de précipitation immunoélectrophorétiques des fractions A et B au contact des sérums ASA et ASB. Pour la disposition des allergènes et des sérums, cfr. Fig. 1a.

et les immunosérums anti A avec les extraits B en donnant des diagrammes immunoélectrophorétiques différents (Fig. 4 b-c) de ceux observés pour ces sérums avec les extraits antigéniques homologues (Fig. 4 a-d).

b) *Examen des différentes fractions A.* Les fractions A ont été testées en présence d'anti-sérums ASA et ASB (Fig. 5). Les résultats de ces essais sont les suivants :

1) Les zones de précipitation formées au contact de ces deux sérums présentent des différences importantes.

2) Les différentes fractions A sont antigéniquement peu différentes entre elles, à l'exception de la fraction A $\frac{1}{4}$ pour laquelle la ligne de précipitation la plus cathodique n'est pas visible.

3) L'arc de précipitation dans la région de l'albumine est très important; cet arc anodique n'est mis en évidence que par les ASA dans les conditions de concentration étudiées.

c) *Examen des différentes fractions B.* Les fractions B ont été testées en présence d'antisérums ASA et ASB (Fig. 6). Les résultats de ces essais sont les suivants :

1) Les zones de précipitation observées au contact de ces deux sérums présentent des différences importantes.

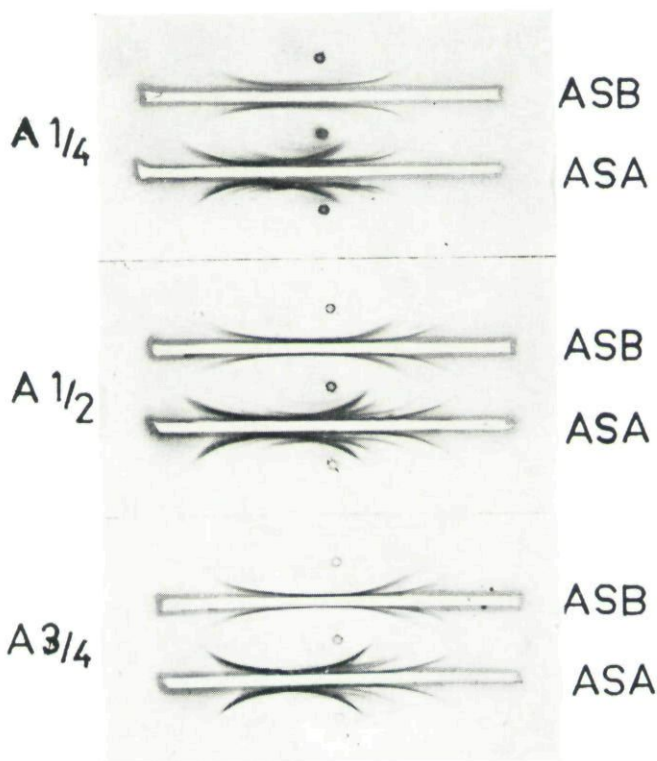


Fig. 5.

Zones de précipitation immunoélectrophorétiques des différentes fractions A au contact des sérums ASA et ASB. Pour la disposition des allergènes et des sérums, cfr. Fig. 1b.

2) Les différentes fractions B sont constituées de mélanges d'antigènes.

3) Les ASB révèlent dans les fractions B une zone de précipitation très importante au niveau du point de dépôt électrophorétique. Deux arcs plus fins se remarquent également : l'un, très léger, dans la zone anodique, l'autre à très grand rayon de courbure, dans la zone cathodique. Ces 3 arcs, nettement visibles, sur les immunoélectrophorèses, se retrouvent dans toutes les fractions B testées, mais en proportions différentes.

Dans quelques rares fractions B, l'arc cathodique est très

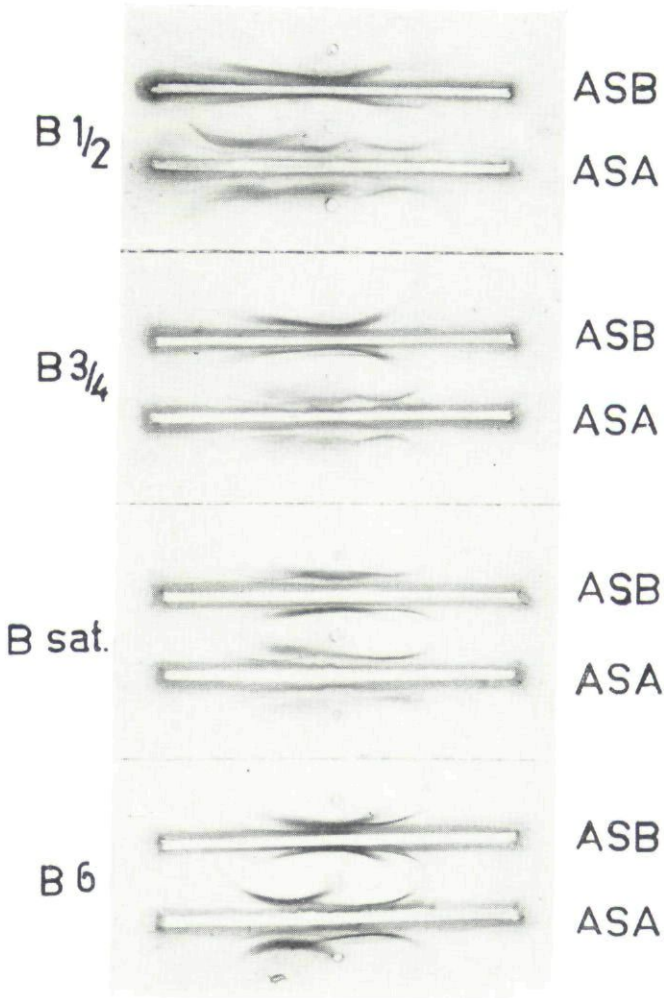


Fig. 6.

Zones de précipitation immunoélectrophorétiques des différentes fractions B au contact des sérums ASA et ASB. Pour la disposition des allergènes et des sérums, cfr. Fig. 1b.

difficilement détectable (Fig. 7 c), par contre, il est toujours assez important dans les fractions B séparées pour des concentrations en Am_2SO_4 supérieures à 75 pour cent de saturation (Fig. 6, fractions B satur. et B6).

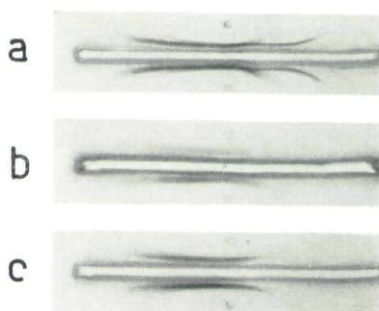


Fig. 7.

Zones de précipitation immunoélectrophorétiques observées au contact d'un ASB.

- a) pour une fraction B à fréquence élevée de tests cutanés positifs chez des individus non allergiques.
- b) pour la même fraction B après reprécipitation.
- c) pour une fraction B isolée d'un lot de poussières différent.

Les 3 examens immunoélectrophorétiques ont été pratiqués avec les mêmes quantités d'extraits et de sérum.

4) Les ASA forment plusieurs zones de précipitation au contact des fractions B. L'intensité relative de ces zones varie d'une fraction à l'autre. Pour certaines fractions B, les images immunoélectrophorétiques des zones de précipitation sont identiques au contact des ASA et des ASB (Fig. 4 c-d).

INTERET DE L'ETUDE IMMUNOCHIMIQUE

Outre l'étude comparative des fractions A et B, les immun-sérums permettent de résoudre certains problèmes d'identité d'allergènes et de confirmer des conclusions tirées des examens chimiques ou physico-chimiques; les observations suivantes découlent d'essais de précipitation antigène-anticorps.

a) Les fractions B isolées de certains lots de poussières montrent lors d'essais immunochimiques un arc de précipitation dans la région nettement cathodique (Fig. 7 a). Cet arc disparaît lorsque ces extraits sont soumis à des précipitations successives (Fig. 7 b); or, ces fractions B, présentant un arc cathodique important, donnent des réactions cutanées positives chez des individus non allergiques avec une plus grande fré-

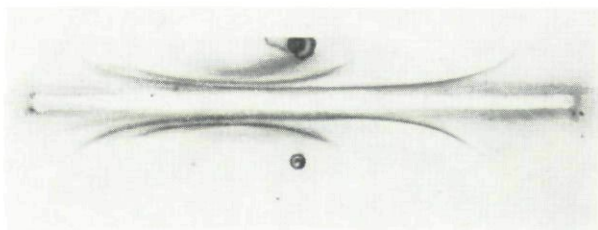


Fig. 8.

Zones de précipitation immunoélectrophorétiques de deux fractions A d'origine différente au contact d'un ASA épuisé « in vitro » par de l'albumine humaine.

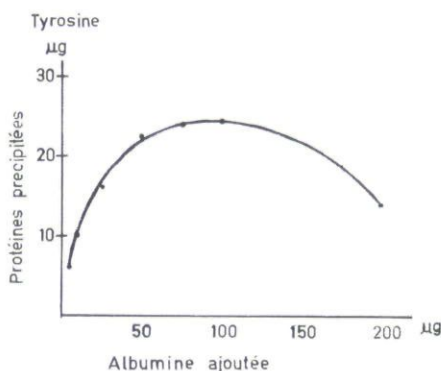


Fig. 9.

Dosage des protéines dans les complexes antigènes-anticorps précipités par addition de quantités croissantes d'albumine humaine (Behringwerke) à un ASA.

quence (19) que les extraits ne contenant pas cet antigène cathodique (Fig. 7 c).

b) 2 fractions A isolées à partir de poussières d'origines très différentes ont été testées au contact du même anti-serum; les zones de précipitations immunoélectrophorétiques sont superposables (Fig. 8).

c) L'observation d'un arc de précipitation important au niveau de l'albumine lors de l'examen des fractions A, a orienté les recherches vers l'étude de la similitude du composé antigénique ainsi révélé et de l'albumine humaine. Les anti-sérums ASA précipitent l'albumine humaine aussi bien dans les

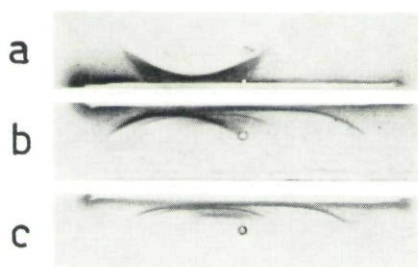


Fig. 10.

Zones de précipitation immunoélectrophorétiques:

- a) de l'albumine humaine (Behringwerke) au contact d'un ASA,
- b) d'une fraction A au contact d'un ASA,
- c) d'une fraction A au contact du même ASA épuisé « in vitro » par de l'albumine humaine.

essais « in vitro » (Fig. 9) que lors d'examens immunoélectrophorétiques (Fig. 10). Des essais de similitude par double diffusion en agar selon la méthode *d'Ouchterlony* (10) ont montré un arc continu de précipitation. Ces essais immuno-chimiques confirment la présence d'éléments humains dans les extraits de poussières de maison (4).

d) Les immunosérums ont permis également d'envisager la similitude antigénique entre les différents allergènes, tels, par exemple, les extraits allergéniques de squames humaines, et de poussières de maison (4).

DISCUSSION

Les études électrophorétique et immunoélectrophorétique des fractions séparées d'extraits de poussières de maison par précipitation au pH de 3,1 (fractions A) d'une part et par addition d'acétone au milieu acide (fractions B) d'autre part, ont permis d'établir que ces fractions, présentant des caractéristiques chimiques et biologiques différentes, se différencient également sur le plan antigénique.

Les caractéristiques chimiques de ces deux groupes de fractions ont été détaillées et discutées dans un précédent travail (17-19). Elles nous permettent de penser que les

fractions A sont principalement de nature protéinique et les fractions B de nature glucoprotéinique. Les activités biologiques ont été déterminées chez des individus allergiques et non allergiques à différentes concentrations; elles sont supérieures à celle d'un extrait de référence (*Pasteur*) (9, 19).

Nous discuterons:

- 1) la répartition des fractions A et B en fonction de la concentration en Am_2SO_4 nécessaire à leur relargage,
- 2) les différences électrophorétiques et immunoélectrophorétiques observées entre les fractions A,
- 3) les différences électrophorétiques et immunoélectrophorétiques observées entre les fractions B,
- 4) la comparaison des anticorps présents dans les ASA et les ASB,
- 5) l'intérêt de l'immunochimie appliquée à l'étude analytique des allergènes.

1) La plus grande partie des composés précipitables au pH de 3,1 (fractions A) est relarguée pour des concentrations en Am_2SO_4 inférieures à 50 pour cent, tandis que les composés plus solubles, précipitables par l'acétone en milieu acide (fractions B) sont relargués pour des concentrations en Am_2SO_4 comprises entre 25 et 100 pour cent de saturation de la solution.

Les rendements en ces différentes fractions varient légèrement d'un lot de poussières à l'autre. Deux faits se remarquent cependant avec une certaine constance: l'absence de fraction B dans l'extrait précipité pour une concentration en Am_2SO_4 inférieure ou égale à 25 pour cent de saturation de la solution et un rendement important de fraction B pour des concentrations en Am_2SO_4 comprises entre 30 et 80 pour cent de saturation. Ceci est en accord avec des observations précédentes (4).

Notons que la fraction isolée par *Berrens & Young* à pH 3,1 (1) présente une activité biologique identique à celle de nos fractions A; par contre, celle isolée par *Elias et coll.* (7) à pH 3, en présence de chlorure de cétyle-pyridine, ne présente pas d'activité allergénique.

Certains auteurs (7) considèrent que le rendement obtenu par la précipitation au Am_2SO_4 est supérieur à celui obtenu par l'acide benzoïque. Notre expérience confirme que cette précipitation n'est cependant pas complète (2) et qu'un traitement ultérieur par l'acide benzoïque de la solution dialysée, entraîne encore des composés allergéniques (fraction B6). Une étude chimique, biologique et immunoélectrophorétique de la fraction B6 nous paraît nécessaire pour établir avec certitude la similitude entre cette fraction B et les autres fractions B et déterminer s'il est important ou non d'en tenir compte lors de la préparation d'un extrait allergénique de poussières de maison.

L'absence de pouvoir allergénique dans le dialysat est en accord avec les résultats de plusieurs auteurs (5, 6, 7). Cette fraction B5, isolée à partir des dialysats, est incolore, allergéniquement inactive et privée de propriété antigénique chez le lapin. L'isolement d'une fraction allergéniquement inactive, constituée par une poudre blanche, ne nous paraît pas une observation suffisante pour entreprendre une discussion sur le point de savoir si un extrait allergénique est nécessairement un produit dérivant d'une réaction de Maillard et dès lors coloré (2, 7).

2) L'examen *électrophorétique* met en évidence l'hétérogénéité de toutes les *fractions A*. Celles-ci sont constituées de mélanges de composés polypeptidiques facilement révélables par le réactif à l'amidoschwarz (4, 17, 19).

Malgré la similitude de composition chimique de ces fractions A (17), la proportion des constituants séparés par électrophorèse varie en fonction des concentrations en Am_2SO_4 utilisées pour les relarguer; les fractions A séparées par des concentrations inférieures à 25 pour cent ne renferment pas de composé très cathodique.

L'examen *immunoélectrophorétique* confirme l'hétérogénéité de ces fractions, et l'absence de dérivés antigéniques migrant rapidement vers le cathode dans la fraction séparée par une concentration en Am_2SO_4 inférieure à 25 pour cent de saturation.

3) L'examen *électrophorétique* ne permet pas de déceler plusieurs composés différenciés dans les *fractions B*. Pour une quantité importante d'extraits, le réactif à l'amidoschwarz ne fait apparaître qu'une bande faiblement colorée et diffuse. Cependant, la faible coloration de cette fraction sous l'action de l'amidoschwarz d'une part, et, d'autre part, la dispersion électrophorétique du composé révélabile ont fait présumer à Berrens que l'allergène était vraisemblablement un mélange de mucoprotéines de compositions chimiques très voisines (2).

L'examen *immunoélectrophorétique* des fractions B révèle que ces fractions sont des mélanges de composés présentant des caractéristiques antigéniques différentes. Le nombre des composés antigéniques et la proportion respective des zones de précipitation varient d'une fraction à l'autre, en fonction de la concentration en Am_2SO_4 utilisée pour les séparer. D'une façon générale, les fractions les plus solubles (nécessitant pour leur séparation une concentration élevée en Am_2SO_4) renferment une plus grande proportion de l'antigène de migration cathodique.

La zone de précipitation la plus importante dans toutes les fractions B se situe au niveau du point de dépôt électrophorétique. Cet arc correspond vraisemblablement au composé révélé par l'amidoschwarz lors des examens électrophorétiques.

Des essais sont en cours pour déterminer si « l'allergène » peut s'identifier à ce composé antigénique chez le lapin, faiblement révélabile par le réactif à l'amidoschwarz et de migration électrophorétique lente et diffuse. Ces essais doivent également établir si les composés antigéniques révélés plus faiblement, ont un pouvoir allergénique chez l'homme.

Il reste à déterminer si les antigènes secondaires mis en évidence dans les fractions B proviennent de la présence de traces de fractions A. Notons à ce propos que l'arc secondaire anodique se remarque toujours dans les fractions B même après plusieurs purifications par précipitation au pH 3,1 puis par l'acétone.

4) Les examens directs pratiqués par la méthode d'Ouchterlony sur les ASA et les ASB en vue de déterminer une simi-

litude entre certains anticorps présents dans ces deux antisérums ne nous ont pas permis de tirer des conclusions, les images étant trop complexes par suite de la présence de nombreux anticorps. En effet, nos essais nous ont permis de dénombrer au moins 6 arcs de précipitation en mettant en présence antiserum A et fraction A.

Lors d'essais semblables, *Philips & Northey* (11) n'obtiennent pour chacun des cinq extraits bruts choisis, que 3 arcs de précipitation. La différence dans le nombre d'anticorps trouvés par ces auteurs et par nous-mêmes, peut s'expliquer par plusieurs remarques: nous avons observé que des composés de migration électrophorétique différente donnent par la technique d'Ouchterlony un seul arc de précipitation; d'autre part, certaines séparations sont plus complètes par la méthode d'Ouchterlony lorsque l'antisérum est déposé plusieurs heures avant l'extrait antigénique. Les différences individuelles dans la réponse immunologique des animaux traités peut expliquer également cette différence dans le nombre d'anticorps formés par injection d'extraits de poussières. Jusqu'à présent, tous les extraits testés provenant de poussières d'origine différente, mais préparés selon le même procédé, donnent les mêmes images immunophorétiques (Fig. 8) avec parfois de très légères différences dans les proportions relatives des arcs de précipitation antigène-anticorps. Par contre, les extraits de *Philips* et *Northey*, au contact d'un immunosérum autre que leur homologue, ne présentent qu'une seule zone de précipitation.

Le fait que les ASB réagissent avec les fractions A peut s'expliquer soit par la présence des composés antigéniques de la fraction A dans la fraction B injectée aux lapins, soit par la présence dans ces fractions de composés légèrement différents mais de caractéristique antigénique identique. La présence de composés caractéristiques de B dans A s'expliquent par une coprécipitation de la fraction B entraînée dans la fraction A (4).

Les arcs de précipitation observés lors des immunoélectrophorèses présentent pour la plupart des rayons de courbure

très grands, ce qui laisse supposer que les substances antigéniques correspondant à chaque arc sont des mélanges de composés de propriétés antigéniques semblables et de propriétés électrophorétiques différentes.

5) La préparation d'immunsérums et l'examen immunoélectrophorétique ouvrent la voie à l'étude de la similitude antigénique de différents extraits allergéniques. Les essais pratiqués sur les extraits de poussières, l'albumine et les squames humaines montrent la présence de composés antigéniques semblables dans la poussière et les squames. Ces essais sont les premiers d'une investigation approfondie sur les correspondances chimiques et antigéniques existant entre les différents allergènes.

CONCLUSIONS

Un fractionnement des poussières de maison, faisant appel à la précipitation au point isoélectrique et à la précipitation par addition d'acétone à la solution acide, fournit 2 genres de fractions allergéniquement actives: les fractions A, de nature principalement protéinique et les fractions B, de nature mucoprotéinique (17-19).

Les fractions A sont précipitées pour des concentrations en Am_2SO_4 inférieures à 50 pour cent de saturation, tandis que les fractions B précipitent entre 30 et 85 pour cent.

Les examens électrophorétiques et une étude immunochimique expérimentale pratiqués sur les fractions nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

1) Les 2 groupes de fractions correspondent à 2 groupes distincts sur le plan de l'immunochimie.

a) Les immunsérums obtenus par injection d'extrait B contiennent des anticorps différents de ceux obtenus par injection d'extrait A;

b) à l'immunoélectrophorèse, les réactions des fractions A et B sont différentes, qu'elles soient au contact de sérum anti A ou de sérum anti B.

2) L'examen électrophorétique indique que les fractions A sont des mélanges de composés polypeptidiques. L'examen

immunoélectrophorétique nous montre que ces fractions renferment de nombreux composés antigéniques qui sont, pour la plupart, de migration lente ou anodique. Cependant, dans toutes les fractions A, sauf celles séparées pour des concentrations en Am_2SO_4 inférieures à 30 pour cent, on remarque également une zone de précipitation cathodique à grand rayon de courbure.

3) L'examen électrophorétique des fractions B ne fait apparaître qu'une faible bande de migration lente.

L'examen immunoélectrophorétique nous montre plusieurs zones de précipitation, mettant ainsi en évidence l'hétérogénéité des fractions B. La zone de précipitation la plus importante se situe au point de dépôt.

4) Des essais de similitude pratiqués entre les extraits de poussières, les squames humaines et l'albumine ont révélé d'une part, la présence d'albumine humaine dans les fractions A et d'autre part, des réactions immunochimiques croisées entre les fractions B des poussières et des squames humaines (4).

5) Des essais sont en cours en vue de déterminer si les composés antigéniques chez le lapin correspondent aux composés responsables d'une activité allergénique chez l'homme. Quelle que soit la réponse à ce problème, l'immunochimie expérimentale reste une technique indispensable dans l'étude analytique approfondie du complexe « allergène » de poussières de maison.

RESUME

Un fractionnement basé sur la précipitation par addition de quantités croissantes de Am_2SO_4 , par précipitation au pH de 3,1 et par addition d'acétone a été appliqué à un soluté extractif de poussières de maison. Les fractions séparées par ce procédé se classent en deux catégories: les fractions protéiniques précipitées au point isoélectrique de 3,1 et les fractions mucoprotéiniques précipitées par l'acétone.

L'examen électrophorétique et l'étude immunochimique indiquent que ces fractions sont des mélanges contenant des composés antigéniques propres à chacun des 2 groupes.

La répartition de ces composés en fonction des conditions de séparation des fractions est envisagée de même qu'une étude immunochimique comparative de différents extraits allergéniques.

SUMMARY

A fractionation based upon precipitation by addition of increasing amounts of Am_2SO_4 , precipitation at pH 3.1, and by addition of acetone has been applied to a house dust extract. The fractions separated by this procedure are classified according to two categories: the proteinic fractions, precipitated at the isoelectric point 3.1, and the mucoproteinic fractions precipitated by acetone.

The electrophoretic examination and the immunochemical study show that these fractions are mixtures containing antigenic compounds pertaining to each of the two groups.

The rates of those antigenic compounds according to the separating conditions of the fractions are considered. The interest of immunoserums preparation is emphasized by a comparative immunochemical study of various allergenic extracts.

L'auteur remercie le Dr. Salmon et le service du Professeur van Cauwenberge pour les conseils reçus au cours de ce travail, le Dr. Monard et le service du Professeur Lambrechts pour le testage clinique des extraits.

BIBLIOGRAPHIE

1. Berrens, L. & Young, E.: Purification and properties of house dust allergen. *Int. Arch. Allergy*, 19, 341, 1961.
2. Berrens, L.: Preparation and properties of purified house dust allergen. *Nature*, 190, 536, 1961.
3. Berrens, L.: Studies with purified house dust allergen and observations on the nature of its polypeptide constituent. *Clin. Chim. Acta*, 8, 457, 1963.
4. Berrens, L., Morris, J. H. & Versie, R.: The complexity of house dust with special reference to the presence of human dandruff allergen. *Int. Arch. Allergy* 27, 129, 1965.
5. Boatner, C. H., Efron, B. G. & Dorfman, R. I.: Studies with antigens. III. The preparation of purified house dust extract. *J. Allergy*, 12, 176, 1941.

6. *Boatner, C. H. & Efron, B. G.*: Preparation and properties of house dust allergen. *J. Invest. Derm.*, 5, 7, 1942.
7. *Elias, R. W., Voorhorst, R. & van Krieken, H.*: On the purification of house dust allergen, *Acta Allergol. XIX*, 369, 1964.
8. *Lietze, A. & Reed, C. E.*: Studies on house dust allergens: the separation of closely related allergens of different specificity and their relationship to allergenically inactive antigens. *Int. Arch. Allergy*, 20, 344, 1962.
9. *Monard, Y. & Geubelle, F.*: Etude clinique du pouvoir allergénique de fractions purifiées à partir de la poussière de maison. *Acta Allergol. XX*, 1965 (en publication).
10. *Ouchterlony, O.*: Progress in Allergy, S. Karger, Basel, 5-1, 1958.
11. *Phillips, L. A. & Northey, W. T.*: Antigenic components of house dust allergens. *J. Allergy*, 36, 303, 1965.
12. *Rimington, C., Stillwell, D. E. & Maunsell, K.*: The Allergen(s) of house dust. Purification and chemical nature of active constituents. *Brit. J. Exp. Path.*, XXVIII, 309, 1947.
13. *Scheidegger, J. J.*: Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy*, 7, 103, 1955.
14. *Sutherland, C.*: The preparation of house dust extracts. *Brit. Med. J.*, 280, 1942.
15. *Vannier, W. E. & Campbell, D. H.*: The isolation and characterization of a purified house dust allergen fraction. *J. Allergy*, 30, 198, 1959.
16. *Vannier, W. E. & Campbell, D. H.*: A starch block electrophoresis study of aqueous house dust extracts. *J. Allergy*, 32, 36, 1961.
17. *Versie, R.*: Etude comparative des procédés d'extraction et de purification des allergènes de poussières de maison. *Acta Allergol. XX*, 15, 1965.
18. *Versie, R.*: Contribution à l'étude du fractionnement des allergènes de poussières de maison. Communication présentée au 5e Congrès international d'Allergologie, Madrid, Oct. 1964.
19. *Versie, R., Monard, Y. & Geubelle, F.*: Comparative study of various extraction and purification procedures used for the preparation of house dust allergen. (En publication).
20. *Wieme, R.*: An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slides. *Clin. Chim. Acta*, 4, 317, 1959.

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.