

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'HYPERSENSIBILITÉ IMMÉDIATE. COMPARAISON ENTRE LES IMMUNISATIONS PAR AÉROSOL ET PAR VOIE SOUS-CUTANÉE I. Expérimentation sur le singe babouin

J.-M. FOURNIER (\*), J.-C. ACCOMINOTTI, J.-L. LECLERC et R. FONTANGES (\*\*)  
avec la collaboration technique de C. ENTZMANN et F. DESOR

## RÉSUMÉ

Deux lots de trois singes babouins, de 10 à 18 kg, ont reçu, à dix reprises, 25 mg d'ovalbumine, respectivement par voie sous-cutanée et aérosol. Le titrage des anticorps hémagglutinants a montré que la voie aérosol était aussi immunisante que la voie sous-cutanée. La surveillance de l'état d'hypersensibilité immédiate, par dosage des IgE, recherche de l'anaphylaxie cutanée passive et à l'aide de tests d'allergie cutanée n'a pas montré de différence nette entre les animaux du premier et du deuxième lot. Un essai de déclenchement du choc anaphylactique en exposant à un aérosol les animaux préalablement sensibilisés a été négatif. Un animal de chaque lot est mort de choc anaphylactique retardé.

## SUMMARY

*Experimental study of immediate hypersensitivity. Comparison between immunization by aerosol and by subcutaneous route. I. Experiment on baboon monkey. — Two groups of baboon monkeys, weighing between 10 and 18 kg, received on ten occasions, 25 mg of ovalbumin, respectively by subcutaneous route and by aerosol. Titration of hemagglutinating antibodies showed that the aerosol route was just as immunizing as the subcutaneous route. Supervision of the state of immediate hypersensitivity, by estimation of IgE, a search for passive skin anaphylaxis, using allergic skin tests did not show any definite difference between the animals of the first and second group. An attempt to trigger off an anaphylactic shock by exposing to an aerosol the previously desensitised animals, was negative. One animal of each group died from delayed anaphylactic shock.*

MOTS CLES MEDLINE : Hypersensibilité immédiate - Ovalbumine  
\* immunologie - Aérosols - Injections sous-cutanées - Babouins.

INDEX TERMS : Hypersensitivity, immediate - Ovalbumin \* administration - Aerosols - Injections, subcutaneous - Baboons.

Après avoir démontré chez le singe babouin, l'efficacité immunisante de la voie aérosol, à l'aide des anatoxines tétanique et diphtérique [10, 11], de la souche EV 40 de *Yersinia pestis* [15] et du virus grippal inactivé [16], il nous a semblé important de rechercher si cette nouvelle voie d'immunisation pouvait entraîner des réactions d'hypersensibilité immédiate. Ni WALDMAN [21 à 25], ni ALEXANDROV [1 à 4], qui utilisent depuis plusieurs années cette méthode de vaccination chez l'homme, n'ont observé de telles réactions. Du point de vue expérimental,

KREININ [19] n'observe aucune modification du coefficient de Tiffeneau chez des volontaires vaccinés et revaccinés par aérosol contre la typhoïde et le tétanos. EGOROVA [6, 7] immunise des cobayes au moyen d'anatoxine tétanique administrée en aérosol ou par voie sous-cutanée. Nous avons voulu poursuivre ces études en utilisant cette fois des techniques particulières de dispersion et de contrôle des aérosols de vaccin lyophilisé, mises au point dans nos laboratoires [12, 13]. Les résultats que nous avons obtenus seront présentés en deux chapitres : le premier, exposé ci-dessous, a trait à une expérimentation sur le singe babouin, le second, à une expérimentation sur la souris ; il fera l'objet de la communication suivante [17].

(\*) Adresse actuelle : Service d'Immunologie microbienne, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 PARIS (France).

(\*\*) Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Division de Microbiologie, 108, boulevard Pinel, 69272 LYON CEDEX 1 (France).

Ce travail a bénéficié d'une aide de la Direction des Recherches et Moyens d'Essais.

Tirés à part : Pr R. FONTANGES.

Reçu le 31 mai 1976.

FOURNIER J.-M., ACCOMINOTTI J.-C., LECLERC J.-L., FONTANGES R., avec la collaboration technique de ENTZMANN C., DESOR F. — Etude expérimentale de l'hypersensibilité immédiate. Comparaison entre les immunisations par aérosol et par voie sous-cutanée. I. - Expérimentation sur le singe babouin. *Rev. franç. Allergol.* 1976, 16 (n° 3), 129-133.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Animaux :** singes babouins mâles et femelles, pesant de 10 à 18 kg.

**Antigène :** ovalbumine en poudre fine (Merck, réf. 967).

**Exposition des animaux aux aérosols :** les singes sont placés dans un caisson de 6,4 m<sup>3</sup> [8, 9] dans lequel la concentration d'un aérosol d'ovalbumine en poudre est maintenue constante grâce à un ensemble original (générateur d'aérosol-densitomètre d'aérosol) décrit par ailleurs [12, 13]. Le temps d'exposition des animaux correspond à l'inhalation d'une dose théorique de 25 mg de produit. Cette dose théorique inhalée est obtenue en multipliant le débit ventilatoire des animaux par la concentration de l'aérosol et le temps d'exposition à l'aérosol. Le débit ventilatoire des singes est déterminé par la formule de GUYTON [18] que nous avons vérifiée expérimentalement sur le singe babouin [14].

**Dosage des anticorps hémagglutinants :** nous avons utilisé la réaction d'hémagglutination passive, avec les hématies de mouton, tannées selon BOYDEN [5] et sensibilisées selon STAVITSKY [20] avec de l'ovalbumine cinq fois recristallisée (Flucka, réf. 05440).

**Dosage des IgE :** nous avons appliqué une méthode radio-immunologique (Phadebas IgE-test), avec des réactifs destinés au dosage des immunoglobulines humaines.

**Dosage des anticorps par anaphylaxie cutanée passive (ACP) :** les sérums à étudier ont été injectés purs et dilués au 1/10 et au 1/100 par voie intradermique sur un singe neuf rasé. Dix-huit heures plus tard l'animal reçoit une injection intraveineuse de 8 ml d'une solution d'ovalbumine à 10 g/l contenant 0,5 p. cent de bleu Evans.

La lecture a lieu 30 mn plus tard. On dénombre et on mesure le diamètre des taches bleues qui apparaissent autour des points d'injection.

**Tests cutanés d'allergie :** nous avons utilisé deux solutions antigéniques : l'une, préparée à partir d'ovalbumine cinq fois recristallisée, l'autre, préparée à partir de l'ovalbumine en poudre sèche qui avait servi à immuniser les animaux. On injecte, par voie intradermique, 0,1 ml de solutions de concentrations décroissantes ( $1,10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  g/l) dans la région dorsale de l'animal. Les réactions éventuelles sont observées trente minutes, six heures et vingt-quatre heures après l'injection.

**Protocole expérimental :** nous avons utilisé deux lots de trois singes :

— le lot n° 1 (mâles n° 86 et 92, femelle n° 89) a été sensibilisé par voie sous-cutanée ;

— le lot n° 2 (mâles n° 68 et 83, femelle n° 88) a été sensibilisé par aérosol.

Les doses théoriques inhalées ou injectées étaient toujours de 25 mg. Des prélèvements sanguins ont été effectués à intervalles réguliers, les sérums étant immédiatement séparés et placés dans une chambre froide à — 30 °C.

Quatre vingts jours après la dixième sensibilisation, les animaux des deux lots ont été soumis à un aérosol d'ovalbumine afin d'essayer de déclencher un choc anaphylactique. La dose théorique d'ovalbumine inhalée a été de 14 mg.

## RÉSULTATS

### *Mortalité en cours d'expérimentation.*

La femelle n° 89 qui est morte 12 heures après la quatrième sensibilisation par voie sous-cutanée présentait à l'autopsie :

- une incoagulabilité sanguine,
- une forte congestion hépatique,
- des signes de décompensations cardiaques avec un ventricule gauche volumineux et présentant un aspect en besace.

Le mâle n° 83, mort 3 heures après le cinquième aérosol d'ovalbumine présentait :

- une incoagulabilité sanguine,
- un abondant mucus spumeux de couleur rosée au niveau de la trachée,
- un œdème aigu du poumon.

Aucun autre incident n'a été remarqué chez les autres singes.

**Essai de déclenchement du choc anaphylactique par aérosol :** l'aérosol d'ovalbumine effectué 80 jours après la dixième sensibilisation sur les deux animaux restant dans chaque lot, n'a été suivi d'aucune manifestation clinique de type anaphylactique.

**Titres hémagglutinants d'anticorps anti-ovalbumine :** nous constatons que les titres hémagglutinants (fig. 1) sont sensiblement supérieurs chez les animaux sensibilisés par aérosol par rapport à ceux obtenus chez les animaux sensibilisés par voie sous-cutanée.

**Dosage des IgE :** les taux d'IgE sont très faibles (de 10 à 160 unités internationales par ml) et ne présentent aucune relation avec le type de traitement subi par l'animal.

**Tests d'anaphylaxie cutanée passive :** nous avons testé les sérums prélevés aux jours 0, 28 et 35 pour les singes 88 et 89, et aux jours 0, 28, 49, 91 et 133 pour les quatre autres singes. Le sérum prélevé le 133<sup>e</sup> jour, soit 7 jours après la dixième sensibilisation sous-cutanée, chez le singe n° 86, donne une tache bleue de 20 mm de diamètre, lorsqu'il est utilisé pur.

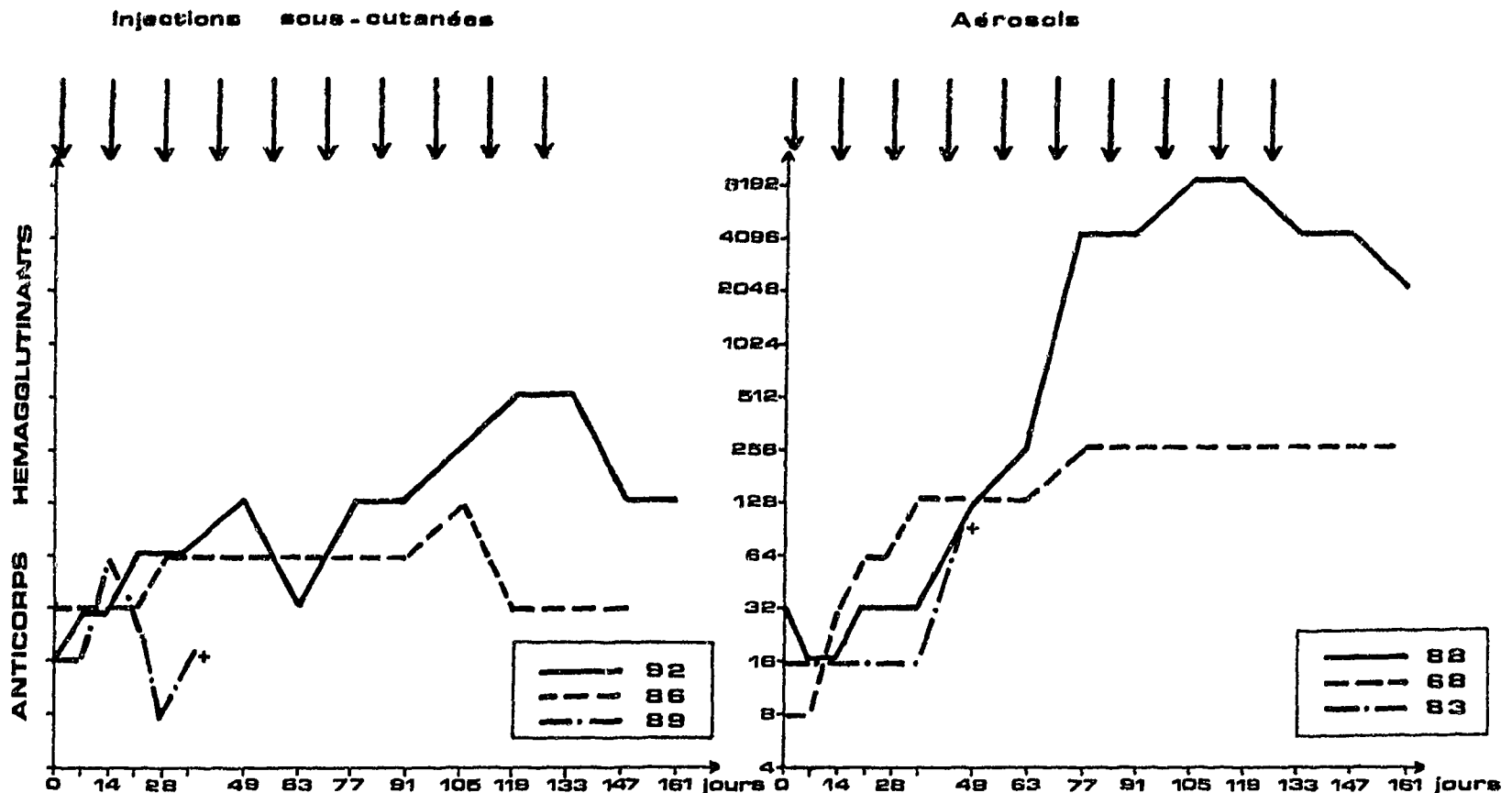


FIG. 1. — Evolution, en fonction du temps, des titres d'anticorps hémagglutinants chez des singes babouins polysensibilisés avec de l'ovalbumine administrée par voie sous-cutanée ou par aérosol.

**Tests d'allergie cutanée :** ils ont été effectués sur les quatre singes restant après la dixième immunisation. Le singe mâle n° 86 sensibilisé par voie sous-cutanée présente des manifestations fugaces d'hypersensibilité immédiate avec les deux solutions d'ovalbumine.

Six heures après les injections d'ovalbumine, les singes n° 86 et n° 92 du lot « sous-cutanée » présentent un œdème important, au point d'inoculation. Le singe n° 88, immunisé par aérosol, présente une réaction plus importante avec œdème et nécrose hémorragique.

Aucun des animaux, observés 24 et 48 heures après les injections, n'a manifesté de réaction d'hypersensibilité retardée.

## DISCUSSION

Malgré les travaux d'ALEXANDROV [1 à 4], de WALDMAN [21 à 25] et de KREININ [19] chez l'homme, d'EGOROVA [6, 7] chez le cobaye, qui concluent à l'innocuité de l'aérosol, nous avons voulu comparer l'aérosol et la voie sous-cutanée dans leur capacité soit d'induire un état d'hypersensibilité immédiate soit de déclencher un choc anaphylactique.

La mort d'un animal de chaque lot, vraisemblablement par choc anaphylactique retardé d'après les lésions observées à l'autopsie, ne permet pas de conclure que l'une des deux voies d'immunisation est plus sensibilisante que l'autre. Par ailleurs, l'aérosol, dans nos conditions expérimentales ne semble pas particulièrement propice au déclenchement d'un choc anaphylactique, puisque les quatre animaux qui avaient été immunisés à dix reprises par aérosol ou par voie sous-cutanée n'ont présenté aucun signe clinique d'anaphylaxie après une exposition à un nouvel aérosol.

Le dosage des IgE par dosage radio-immunologique n'a pas permis de mettre en évidence une relation entre leur taux et l'état de sensibilisation des deux animaux qui sont morts en cours d'expérience. On pourrait penser à une mauvaise qualité de la réaction entre les IgE de singe et l'immunosérum anti-IgE humaines utilisé. Cependant, quand on recherche les anticorps par anaphylaxie cutanée passive ou qu'on effectue des réactions d'allergie cutanée immédiate, le singe n° 86, sensibilisé par voie sous-cutanée, présente une réaction positive au niveau des deux tests.

La réaction d'allergie cutanée semi-tardive, avec œdème et nécrose hémorragique, présentée par le singe n° 88 est sans doute à mettre en relation avec les titres élevés d'anticorps hémagglutinants trouvés

chez cet animal immunisé par aérosol. Ainsi, les résultats des tests d'anaphylaxie cutanée passive, d'allergie semi-tardive et des dosages d'anticorps hémagglutinants, bien qu'obtenus sur un très petit nombre d'animaux, semblent assez cohérents pour confirmer que l'aérosol n'est pas plus sensibilisant que la voie sous-cutanée.

On pourrait cependant interpréter ce résultat par une moins bonne efficacité immunisante de l'aérosol par rapport à la voie sous-cutanée. Les courbes d'évolution des anticorps hémagglutinants circulants permettent de réfuter cette hypothèse. Les taux d'anticorps sont même légèrement plus élevés pour le lot immunisé par aérosol, confirmant l'efficacité sur le système immunitaire général de cette voie d'introduction des antigènes.

## CONCLUSION

Malgré le faible nombre d'animaux mis en expérience, nous pouvons admettre que chez le singe, l'aérosol est aussi efficace du point de vue antigénique que la voie sous-cutanée et qu'il ne semble pas plus dangereux que cette dernière. Ces résultats confirment, avec nos aérosols de produit réduit en poudre, les résultats obtenus dans d'autres conditions expérimentales par ALEXANDROV [1 à 4], WALDMAN [21 à 25], KREININ [19] et EGOROVA [6]. Cette expérimentation sur singe se devait d'être complétée par une expérimentation sur souris, afin de pouvoir utiliser des lots expérimentaux plus importants. Ce sera le but de notre prochaine communication [17], qui utilise 2 800 animaux.

## REFERENCES

1. ALEXANDROV N. I., GEFEN N. E., GAPOTCHKO K. G., GARIN N. S., SERGEEV V. M., LAZAREVA E. S., MISTCHENKO V. V., CHLYAKHOV E. N. — Immunisation par aérosols de vaccins vivants et d'anatoxine sèche. VI. - Etude de la réaction post-vaccinale et de l'efficacité immunologique de l'immunisation par aérosols à l'aide de vaccin en poudre (brucellose, tularémie, charbon, peste) chez l'homme. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1961, 32, 56-62.
2. ALEXANDROV N. I., GEFEN N. E., GAPOTCHKO K. G., GARIN N. S., MASLOV A. I., MISTCHENKO V. V., SMIRNOV M. S. — Immunisation par aérosols de vaccins vivants et d'anatoxine sèche. IX. - Etude complémentaire des réactions post-vaccinales et de l'efficacité immunologique par suite de la vaccination par aérosols à l'aide du vaccin brucellique pulvérent. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1963, 33, 95-102.
3. ALEXANDROV N. I., GEFEN N. E., GAPOTCHKO K. G., GARIN N. S., MASLOV A. I., MISTCHENKO V. V. — Immunisation par aérosols de vaccins vivants et d'anatoxine sèche. X. - Etude clinique des réactions post-vaccinales en réponse à l'immunisation par aérosol au moyen du vaccin brucellique pulvérisé. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1962, 33, 31-37.
4. ALEXANDROV N. I., GEFEN N. E., EGOROVA N. B., VORONTSOV I. V., KREININ L. S., MIROCHNICHENKO I. V., SEVERTSOVA M. K., KRODAKOVSKIY N. A., GEFEN G. E., ABRAMOVITCH L. A., KATSNELSON I. A. — Etude comparative du pouvoir réactogène et de l'efficacité immunologique de la revaccination antityphoïdique et tétanique par aérosol et par voie sous-cutanée. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1967, 44, 15-20.
5. BOYDEN S. V. — The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.*, 1951, 93, 107-120.
6. EGOROVA N. B., EFREMOVA V. N., FEDYAEV S. F. — Immunobiological parallels in studying dry and fluid vaccine aerosol in experiments on animals. I. - Immunological and anaphylactogenic properties of dry and fluid vaccine aerosol of tetanus toxoid. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1969, 9, 60-66.
7. EGOROVA N. B. — Etude expérimentale de la dynamique de la sensibilisation immédiate au cours de l'administration par aérosol ou sous-cutanée de l'anatoxine tétanique. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1973, 9, 134.
8. FONTANGES R., BRUNAT W. R., BESSON H. — L'immunisation par aérosols. I. - Construction d'une nouvelle chambre d'expérience conditionnée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 608-623.
9. FONTANGES R., BRUNAT W. R., JACOB F., CORNET A. — L'immunisation par aérosols. II. - Etude expérimentale d'une nouvelle chambre d'expérience conditionnée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 624-631.
10. FONTANGES R., CORNET A., BRUNAT W. R., JACOB F., MONTEIL H., FERRY S. — L'immunisation par aérosols. VI. - Vaccination des singes babouins par l'anatoxine diphtérique lyophilisée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1970, 119, 172-192.
11. FONTANGES R., FOURNIER J. M., MONTEIL H., DARMONTON P., GAIRARD A. — L'immunisation par aérosols. VII. - Vaccination des singes babouins par l'anatoxine tétanique lyophilisée et par le mélange A tétanique-A diphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1971, 120, 831-848.
12. FONTANGES R., FOURNIER J. M. — L'immunisation par aérosols. I. - Technologie de la vaccination. *Lyon pharm.*, 1974, 25, 9-31.
13. FOURNIER J. M. — *L'immunisation collective par aérosol d'antigènes lyophilisés. Technologie, résultats, étude des mécanismes fondamentaux d'acquisition de l'immunité.* Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Lyon, 1975.
14. FOURNIER J. M., GAIRARD A., FONTANGES R. — Etude de plusieurs paramètres de physiologie respiratoire chez le cynocéphale *Papio papio*. *Bull. Soc. vét. comp. Lyon*, 1972, 74, 317-320.
15. FOURNIER J. M., PAUL G., CHOMEL J. J., DODIN A., FONTANGES R. — Etude expérimentale de la vaccination par voie sous-cutanée et par aérosol de la peste chez le singe cynocéphale. Absence de relation entre les anticorps hémagglutinants et précipitants et la protection. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1973, 124b, 315-328.

16. FOURNIER J. M., TESSANDIER G., FONTANCES R. — Immunisation du singe cynocéphale par aérosol de virus gripal inactivé lyophilisé. Etude de la réponse sérique et sécrétoire bronchique. *First International Congress on Aerosol in Medicine*, Wien, 19-21 septembre 1973.
17. FOURNIER J. M., ACCOMINOTTI J. C., LECLERC J. L., FONTANCES R. — Etude expérimentale de l'hypersensibilité immédiate. Comparaison entre les immunisations par aérosol et par voie sous-cutanée. II. - Expérimentation sur la souris. *Rev. franç. Allergol.*, 1976, 16, 135-141.
18. GUYTON A. C. — Measurements of respiratory volume of laboratory animal. *Amer. J. Physiol.*, 1947, 150, 70-77.
19. KREININ L. S., SMERTINA A. F., SABUROV G. E. — Effet allergique sur les organes respiratoires de la vaccination et de la revaccination contre le tétanos et la typhoïde. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 1968, 8, 130-132.
20. STAVITSKY A. — Micromethod for the study of protein and antibodies. I. - Procedure and general application. II. - Specific application. *J. Immunol.*, 1954, 72, 360-375.
21. WALDMAN R. H., KASEL J. A., FULK R. V., TOGO Y., HORNICK R. B., HEINER G. G., DAWKINS A. T. — Influenza antibody in human respiratory secretions after subcutaneous or respiratory immunization with inactivated virus. *Nature (Lond.)*, 1968, 218, 594-595.
22. WALDMAN R. H., MANN J. J., SMALL P. A. — Immunization against influenza. Prevention of illness in man by aerosolized inactivated vaccine. *J. Amer. med. Ass.*, 1969, 207, 520-524.
23. WALDMAN R. H., BOND J. O., LEVITT L. P., HARTWIG E. C., PRATHER E. C., BARATTA R. L., NEILL J. S., SMALL P. A. — An evaluation of influenza immunization. Influence of route of administration and vaccine strain. *Bull. Org. mond. Santé*, 1969, 41, 543-548.
24. WALDMAN R. H., WOOD S. H., TORRES E. J., SMALL P. A. — Influenza antibody response following aerosol administration of inactivated virus. *Amer. J. Epidemiol.*, 1970, 91, 575-584.
25. WALDMAN R. H., GOGGINS W. J. — Influenza immunization : field trial on a University campus. *J. infect. Dis.*, 1972, 126, 242-248.