

Conduite d'un essai thérapeutique dans le cadre de la désensibilisation de l'asthme aux acariens

G. PAULI, M.C. KOPFERSCHMITT-KUBLER, A. TENABENE, J.C. BESSOT *

RÉSUMÉ

La conduite d'un essai thérapeutique effectué dans le cadre d'une désensibilisation de l'asthme aux acariens est soumise à de nombreuses et nécessaires contraintes. Les extraits utilisés doivent être purifiés, standardisés, et leur composition allergénique connue. La sélection des patients doit permettre l'obtention de groupes homogènes et comparables composés de malades monosensibilisés, chez lesquels la responsabilité des Dermatophagoides a été clairement établie. Parallèlement à la caractérisation précise des patients, une quantification des allergènes des acariens présents dans leur environnement doit être effectuée. La technique et les modalités de la désensibilisation utilisée, la durée de l'essai, de même que les doses cumulatives injectées, doivent être précisées. L'évaluation clinique des résultats repose sur l'association de scores symptômes, médicamenteux et fonctionnels. Des paramètres plus objectifs peuvent être évalués : modification des tests cutanés, comparaison des tests d'inhalation avant et après désensibilisation, étude des modifications biologiques induites par la désensibilisation. Les effets immunologiques de la désensibilisation sont décevants, une augmentation des IgG spécifiques est le plus souvent notée sans qu'il y ait cependant de corrélation avec l'amélioration clinique. La quantification des allergènes des acariens dans l'environnement domestique peut permettre de mieux comprendre certains échecs de la désensibilisation.

SUMMARY

Management of a therapeutic trial in the desensitization of asthma due to acarians. — The management of a therapeutic trial in desensitization of asthma due to acarians is bound by numerous and necessary restrictions. The extracts being used must be purified, standardized, and their allergen content must be known. Selection of the patients should aim to obtain homogeneous and comparable groups, including monosensitized patients, for whom the responsibility of Dermatophagoides has been clearly established. Concomitantly to the precise selection of the patients, a quantification of acarian allergens present in their environment must be done. The technique and modalities of the desensitization, the length of the trial as well as the cumulative doses that are injected, must be specified. The clinical evaluation of the results is based on the association of symptoms, medications and functional scores. More objective parameters may be evaluated : modification of the skin tests, comparison of inhalation tests before and after desensitization, study of the biological alterations induced by desensitization. The immunological effects of desensitization are disappointing ; most of the time, an elevation of specific IgG is noted without, however, any correlation with the clinical improvement. The quantification of acarian allergens in the home environment allows a better understanding of certain desensitization failures.

Les premières désensibilisations avec des extraits d'acariens ont été effectuées dès 1969. Depuis, plus d'une douzaine de travaux ont été publiés dans la littérature. Les résultats obtenus par des études réalisées en double insu avec un groupe témoin de patients traités par placebo ne

sont pas toujours concordants [1, 4, 7, 9, 10, 16, 17, 22, 26]. Les différents essais ne sont souvent pas comparables du fait de la variété des schémas thérapeutiques. Cette variabilité concerne à la fois les extraits allergéniques utilisés, les doses et les durées des traitements, ainsi que les paramètres

* Service de Pneumologie II, Pavillon Laënnec, CHRU, BP 426, F 67091 STRASBOURG CEDEX.

Tirés à part : Dr G. Pauli, adresse ci-dessus.

Reçu le 30 août 1988. Accepté le 9 décembre 1988.

PAULI G., KOPFERSCHMITT-KUBLER M.C., TENABENE A., BESSOT J.C. — Conduite d'un essai thérapeutique dans le cadre de la désensibilisation de l'asthme aux acariens. *Rev. fr. Allergol.*, 1989, 29, (1), 1-6.

utilisés pour apprécier l'efficacité de la désensibilisation. Bien que la majorité des différentes études ait montré de manière statistiquement significative un bénéfice du traitement par immunothérapie comparé au placebo, l'amélioration clinique n'est cependant souvent pas complète. Les principaux progrès qui sont ou seront réalisés au cours des futurs essais thérapeutiques dans le cadre de l'immunothérapie aux acariens, portent sur une connaissance plus précise des doses cumulatives d'allergènes majeurs injectés, et sur une réelle quantification des allergènes de l'environnement domestique des patients sélectionnés pour ce type d'étude.

CARACTERISATION DES EXTRAITS UTILISES POUR UNE DESENSIBILISATION AUX ACARIENS

Les extraits utilisés dans les travaux publiés sont de deux types : extraits aqueux et extraits retards (adsorbés sur différents substrats tels que l'hydroxyde d'alumine, la L-tyrosine, le phosphate de calcium...). Il est indispensable pour des études futures d'utiliser des extraits purifiés et standardisés, et d'en connaître la composition allergénique. Grâce aux techniques d'immuno-électrophorèse bidimensionnelle (CIE) et de radio-immunoélectrophorèse bidimensionnelle (CRIE) qui utilisent des anticorps précipitants de lapin, grâce aux techniques d'électrotransfert et d'immuno-empreinte utilisant des sérums de patients allergiques, les allergènes majeurs des espèces *Dermatophagoides pteronyssinus* et *Dermatophagoides farinae* présents dans un extrait donné, peuvent être comparés à des préparations standards dont le contenu en allergènes majeurs est connu. L'utilisation d'anticorps monoclonaux obtenus grâce à des marqueurs purifiés comme l'allergène Der P₁ permet également de quantifier l'allergène majeur dans un extrait donné. L'activité biologique totale d'un extrait allergénique peut être appréciée par des techniques mettant en jeu la combinaison de l'allergène avec les IgE spécifiques, sériques ou cellulaires de sujets allergiques (RAST, inhibition du RAST, histaminolibération des basophiles, mesure des réactions cutanées) [14]. Cette activité biologique sera estimée par rapport à une préparation de référence [8] (soit un standard interne du laboratoire, soit les extraits standardisés du comité de standardisation de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie).

SELECTION DES PATIENTS

La sélection des patients est un élément déterminant : elle a pour but l'obtention de groupes aussi homogènes que possible, comparables sur le plan de l'état civil (âge, sexe), de la gravité et de la durée

d'évolution de l'asthme, de l'hyperréactivité bronchique non spécifique, du degré de la sensibilité allergénique à *Dermatophagoides pteronyssinus* appréciée par les tests cutanés, les IgE spécifiques sériques et éventuellement les tests de provocation nasale ou bronchique. Il est souhaitable de ne choisir que des sujets monosensibilisés chez lesquels le facteur allergique déclenchant paraît prédominant et qui n'ont pas été désensibilisés antérieurement. Les caractéristiques cliniques de l'allergie respiratoire aux acariens doivent être recherchées : asthme du domicile, crises d'asthme ou de rhinite parfois provoquées par des activités ménagères, disparition des crises à l'hôpital, rechute lors du retour à domicile après un éloignement temporaire (vacances, cure climatique...), recrudescence des crises dans une habitation particulière, mais recrudescence saisonnière inconstante et variation selon les régions et les conditions climatiques annuelles. Les patients, avant d'être admis dans l'étude, doivent avoir un score clinique pré-essai minimal, évalué par la fréquence des crises et les traitements médicamenteux utilisés. Des patients allergiques aux acariens ne présentant qu'une ou deux crises par an (soit un score trop faible) doivent être exclus d'un essai thérapeutique de ce type. Enfin, la comparaison des scores pré-essai dans les deux groupes (groupe placebo et groupe immunothérapie, ou groupe immunothérapie A et groupe immunothérapie B) ne doit pas montrer de différence significative. L'observation des patients avant l'inclusion dans un protocole de désensibilisation permet de tester leur compliance. Si pendant cette période probatoire qui devrait avoir une durée minimale de 30 jours d'après notre expérience [18], les journaux sont incomplètement remplis et si la discordance entre scores symptômes et scores fonctionnels est trop importante, il est préférable de ne pas les inclure dans l'étude projetée. Quoi qu'il en soit, il est nécessaire de définir rigoureusement le profil clinique et biologique des patients entrant dans l'essai.

L'idéal serait un grand nombre de patients permettant d'atténuer les incidences des caractéristiques individuelles connues ou inconnues sur les calculs statistiques, mais les nombreuses exigences pour les critères de sélection des patients entraînent fréquemment des études où le nombre de patients inclus dans chaque groupe est faible, ce qui rend difficile ultérieurement l'analyse statistique des résultats observés. Cette notion plaide en faveur d'études multicentriques.

Par ailleurs, la rigueur scientifique avec des groupes comparables ne pourra être acquise que si l'on effectue un essai en double aveugle, avec tirage au sort (selon des tables de nombres au hasard). Ce tirage au sort devra être effectué une fois le malade jugé bon pour entrer dans l'essai,

c'est-à-dire immédiatement avant le moment où le traitement diffère. Les études en double aveugle sont techniquement réalisables si l'on compare l'immunothérapie à un traitement placebo, mais il est souvent difficile de réaliser une étude en double aveugle s'il s'agit de la comparaison de deux immunothérapies différentes.

QUANTIFICATION DES ALLERGENES DES ACARIENS DANS L'ENVIRONNEMENT DOMESTIQUE

La mise en évidence des allergènes des acariens dans l'environnement des patients atteints de rhinite ou d'asthme est actuellement réalisable par plusieurs méthodes :

- identification des allergènes dans l'atmosphère domestique par l'appareil d'Andersen (élution des filtres piège et dosage des allergènes par inhibition du RAST) [23] ;

- détection des allergènes majeurs des acariens dans un gramme de poussière domestique prélevée au domicile par aspiration du matelas et des moquettes, en utilisant un dosage immuno-enzymatique ou radio-immunologique, ce dernier permettant par l'usage d'anticorps monoclonaux de doser l'allergène Der P₁ [15, 21] ;

- enfin, il a pu être démontré qu'il existait une corrélation satisfaisante entre la concentration en allergènes des acariens et la concentration en guanine d'un échantillon de poussière de maison [3, 19, 20, 25]. La guanine, catabolite final du métabolisme azoté chez les arthropodes, est un excellent marqueur des fèces des acariens. Le test de la guanine est simple, disponible dans le commerce, d'exécution rapide, mais donne des résultats semi-quantitatifs. Les techniques immuno-chimiques quant à elles sont de véritables méthodes quantitatives de dosage des allergènes des acariens mais nécessitent un laboratoire spécialisé.

Le test de la guanine devrait permettre dans les études futures une évaluation simple et objective du degré d'infestation par les acariens de l'environnement domestique des patients inclus dans les essais de désensibilisation ; il permettra également de contrôler dans le temps une modification du degré d'infestation susceptible d'expliquer certaines aggravations des symptômes ou au contraire leur disparition.

DEFINITION DU PROTOCOLE DE DESENSIBILISATION

Les techniques de désensibilisation dans le cadre d'une essai thérapeutique doivent être parfaitement précisées. Aux techniques traditionnelles

de désensibilisation où l'administration d'allergène par voie sous-cutanée est effectuée une fois par semaine au début du traitement, est venue s'ajouter la désensibilisation accélérée (rush-immunothérapie) au cours de laquelle la dose maximale est atteinte en trois à cinq jours. La progression des doses est souvent variable d'un individu à l'autre, cette progression étant modulée selon les réactions secondaires observées (locales, syndromiques ou générales). La dose d'entretien est habituellement administrée tous les mois dans les études publiées où un long suivi a été effectué. La notion d'une relation dose-efficacité est de plus en plus admise, et au cours de l'immunothérapie aux acariens cette relation devrait pouvoir être étudiée dans les essais futurs. Dans ce but, la dose cumulative d'allergènes injectés doit être évaluée pour chaque patient. Une connaissance précise du contenu en allergènes majeurs des extraits utilisés devrait permettre des comparaisons de l'efficacité de traitements de désensibilisation utilisant des protocoles variés (selon le rythme des injections, selon la rapidité de la progression des doses...). Enfin, la durée du traitement devrait être précisée au départ. En effet, un certain nombre d'études ne portent que sur des désensibilisations aux acariens menées pendant trois mois. Les résultats des modifications biologiques observées pendant cette période par rapport à un groupe non traité sont une source d'information intéressante ; par contre, seule une surveillance prolongée (pendant six mois à un an au minimum afin de détecter les éventuelles exacerbations saisonnières) permet d'évaluer le bénéfice clinique de l'immunothérapie.

CRITERES D'EVALUATION DE L'EFFICACITE CLINIQUE

L'évaluation des résultats de la désensibilisation ne peut pas reposer uniquement sur les constatations effectuées par le malade et son médecin lors de consultations périodiques. En effet, si celles-ci restent indispensables à la prise en charge de l'asthmatique, elles sont souvent entachées de subjectivité. L'examen clinique ne permet pas toujours d'apprécier correctement le degré d'obstruction bronchique, il ne représente qu'une exploration momentanée de l'état respiratoire du malade. Pour tenter d'atténuer l'influence des facteurs subjectifs, différents paramètres peuvent être utilisés : paramètres cliniques, paramètres médicamenteux, paramètres fonctionnels... L'attribution d'une valeur semi-quantitative à chacun des paramètres étudiés permet ensuite d'établir des scores apportant ainsi des données chiffrées comparables et statistiquement exploitables. Cette étape, ainsi que le choix des tests statistiques, est à effectuer impérativement avant de commencer l'étude.

Score symptôme

La détermination des scores cliniques peut s'effectuer en demandant aux patients de noter sur une carte ou un carnet de surveillance journalière les principaux symptômes ressentis : survenue diurne et/ou nocturne de gêne respiratoire sibilante, toux et expectoration, importance de la gêne à l'activité. Une note peut être attribuée à chaque symptôme allant par exemple de 0 à 3 en fonction de leur intensité (0 = absence de symptômes ; 1 = symptômes faibles ; 2 = symptômes modérés, 3 = symptômes sévères).

Un score symptôme journalier ou par quinzaine peut ainsi être établi. La masse des chiffres résultant des journaux remplis par les malades peut être traitée par informatique, des graphiques peuvent être tracés. Une saisie globale de la quasi-totalité des données peut être effectuée, ce qui permet d'avoir une image relativement objective des changements de symptomatologie. Cependant, les scores symptômes ne reflètent pas forcément la réalité ; la perception que chaque sujet a de ses symptômes, la tolérance à ces symptômes en particulier à la dyspnée, surtout lorsqu'elle est modérée [5, 24], la précision de leur transcription sont très variables d'un sujet à l'autre.

Score médicamenteux

Le score médicamenteux peut être établi par l'inscription quotidienne des médicaments anti-asthmatiques utilisés. Il convient d'expliquer clairement aux malades à quelles classes de médicaments (bêta-agonistes, théophyllines, parasympatholytiques, corticoïdes...) ils peuvent avoir recours et quelle posologie ils doivent utiliser. Il est souhaitable d'exclure les médications à effet prolongé telles que les corticoïdes retard. La comptabilisation des quantités journalières de bronchodilatateurs utilisés doit encore être pondérée en fonction du nombre des prises médicamenteuses et du type de médicaments utilisés.

Score fonctionnel

L'élaboration d'un score fonctionnel permet une étude longitudinale relativement objective de l'obstruction bronchique de l'asthmatique. De nombreuses méthodes d'évaluation du trouble ventilatoire obstructif de l'asthmatique ont été proposées : mesure du VEMS, du DME 25/75, des résistances des voies aériennes, études de la courbe débit-volume, mesures du débit de pointe. Grâce à l'emploi d'appareils portables, peu coûteux, d'utilisation pratique, l'enregistrement du débit de pointe, en dépit de ses imperfections (fiabilité et sensibilité médiocres, effort-dépendance) est particulièrement bien adapté à la surveillance quotidienne fonctionnelle de l'asthmatique [11, 13]. En

raison des fluctuations de l'obstruction bronchique chez nombre d'asthmatiques, il a été montré qu'il était préférable de faire des mesures répétées, par exemple trois fois dans le nyctémère avec un appareillage simple, plutôt que des mesures espacées avec un appareillage plus sophistiqué. Les chiffres du débit de pointe comparés aux valeurs de référence ou mieux aux valeurs du sujet lui-même, permettent de dresser un score fonctionnel donnant une appréciation chiffrée du caractère évolutif de l'asthme.

Les trois scores les plus fréquemment étudiés, score symptôme, score médicamenteux et score fonctionnel, doivent être associés. Ils ne traduisent pas exactement les mêmes faits. Alors que la consommation médicamenteuse reflète en principe l'ensemble de la gêne diurne et nocturne ressentie par les patients, les mesures du débit de pointe sont plutôt des mesures instantanées de l'obstruction bronchique. Une étude des corrélations existant entre ces différents scores [18] a montré une grande variabilité dans le comportement des patients.

A ces scores relativement objectifs, on peut associer des scores subjectifs sous la forme de questions posées aux malades, ou aux médecins assurant le suivi de ces patients. On peut y adjoindre également une échelle analogique permettant de quantifier les réponses subjectives.

ETUDE DES MODIFICATIONS DE PARAMETRES OBJECTIFS

La recherche de critères objectifs visant à mettre en évidence l'efficacité de la désensibilisation consiste essentiellement à détecter une éventuelle décroissance de la sensibilisation de l'individu traité (diminution des IgE spécifiques circulantes, diminution de la sensibilité des mastocytes cutanés, diminution de la sensibilité bronchique et diminution de la sensibilisation des basophiles circulants). Cette démarche implique que l'on évalue au départ la sensibilisation du patient à l'extrait qui sera utilisé pour le traitement de désensibilisation et que l'on contrôle les différents tests avec le même extrait tout au long de l'étude. Il importe également de prendre en compte l'effet de certaines thérapeutiques nécessaires pour traiter les patients au cours de l'essai et qui peuvent influencer les résultats des tests mis en œuvre (tests in vivo et tests in vitro).

Effet de la désensibilisation sur les tests cutanés

L'étude de la modification éventuelle des tests cutanés au cours de la désensibilisation aux acariens nécessite un protocole parfaitement standardisé : utilisation du même lot d'extrait purifié

standardisé et lyophilisé pour les tests cutanés lors de chaque contrôle, et reconstitution des solutions au moment où les tests sont effectués, réalisation d'une échelle de dilution (en prick test ou en intradermoréaction) de 3 en 3 et non de 10 en 10 comme on l'effectue habituellement. La mesure de l'intensité de la réaction cutanée peut être effectuée par différentes méthodes : mesure de la moyenne du grand diamètre et de son diamètre perpendiculaire, évaluation de la surface de la papule par planimétrie ou pesée des décalques des papules. Une modification du seuil de positivité de la sensibilité cutanée (end-point titration) est également utilisée par certains auteurs.

Effet de la désensibilisation sur les tests d'inhalation

Théoriquement séduisante la comparaison de tests d'inhalation doit, pour être satisfaisante, répondre à un certain nombre d'exigences : utilisation du même lot d'extrait purifié standardisé et lyophilisé lors de tests successifs, valeurs fonctionnelles basales identiques, élimination des variations circadiennes de la sensibilité aux allergènes, étude préalable de la reproductibilité de la technique utilisée au laboratoire, tests d'inhalation effectués autant que possible avec des doses progressivement croissantes d'allergènes pour construire de véritables courbes dose-réponse chez des patients non soumis à un traitement bronchodilatateur ou anti-allergique. La détection d'une réaction tardive (6 à 8 heures après la réaction immédiate) est intéressante et ceci d'autant plus que Warner et coll. [26] ont montré sa disparition dans un groupe d'enfants améliorés par le traitement de désensibilisation à *Dermatophagoides pteronyssinus*. Les études publiées concernant la reproductibilité des tests d'inhalation (spécifiques et non spécifiques) notent dans les meilleurs cas une reproductibilité de PD_{20} (dose entraînant une chute de 20 % du VEMS) satisfaisante dans la limite de plus ou moins un logarithme de la dose (doublement de la dose) [12], ce qui signifie que si l'on administre lors de tests successifs une seule dose d'allergène (celle qui au test d'inclusion a donné 20 % de chute du VEMS) seule une variation supérieure au doublement de la dose attestera d'une augmentation de la tolérance bronchique à l'allergène. Dans les travaux publiés, on note en général, en moyenne, une augmentation du seuil de tolérance bronchique à l'allergène, mais au vu des valeurs individuelles il s'avère que certains patients ne modifient pas leur seuil de sensibilité bronchique à l'allergène [2, 4].

Etude des modifications biologiques induites par la désensibilisation

— L'évolution des taux d'anticorps IgG (et éven-

tuellement de leurs sous-classes) peut être étudiée si l'on dispose de techniques fiables (tests radio-immunologiques avec des disques sur lesquels est fixé l'extrait utilisé dans l'essai thérapeutique ou un allergène majeur de Dpt) [6].

— L'évolution des taux d'IgE spécifiques peut être étudiée par la technique du RAST mais en utilisant les sérums dilués (dans la plupart des cas au moins au 1/5^e) pour éviter d'être dans la zone de plateau où les disques d'allergènes sont saturés [6, 17]. Pour les dosages d'IgG et d'IgE spécifiques, chaque expérience doit être faite en double et l'ensemble des prélèvements séquentiels doit être testé lors d'une même manipulation avec les mêmes réactifs pour éviter les variations inter-tests.

— L'histaminolibération des basophiles est une technique de recherche clinique relativement lourde et onéreuse. Une interprétation correcte de la courbe d'histaminolibération nécessite d'incuber les cellules avec des concentrations croissantes de l'allergène utilisé pour la désensibilisation, un minimum de 5 concentrations paraît nécessaire. Les modifications induites par la désensibilisation peuvent être appréciées par la comparaison de la courbe dans sa totalité, ou par les sensibilités cellulaires à 50 ou à 30 p. cent. Les libérations spontanées d'histamine (H_0) doivent être identiques dans les deux groupes de patients (placebo et traités).

L'étude des modifications immunologiques publiées dans divers travaux est assez décevante : le phénomène le plus constamment observé est l'augmentation des IgG spécifiques, mais cette augmentation n'a pas pu être reliée à l'amélioration clinique. L'évolution des taux d'IgE spécifiques et de l'histaminolibération des basophiles est variable et ne permet pas de différencier les groupes traités des groupes placebo.

Au total, pour tout nouvel essai de désensibilisation aux acariens, il est indispensable d'apporter des preuves tangibles et mesurables des effets de l'immunothérapie. Néanmoins, ces preuves reposent encore largement à l'heure actuelle sur l'analyse minutieuse des données cliniques et fonctionnelles relevées par le patient, contrôlées par le médecin et exploitées statistiquement. Il est important de poursuivre la réalisation de telles études avec des extraits de *Dermatophagoides pteronyssinus* purifiés et standardisés et en y ajoutant une étude de l'environnement. Comme les comptes polliniques, la quantification des allergènes des acariens dans l'environnement domestique peut permettre de comprendre certains échecs et certains échappements à l'immunothérapie lorsque la pollution allergénique de l'environnement est particulièrement intense.

REFERENCES

1. A trial of house dust mite extract in bronchial asthma. Mite Allergy Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Association. — *Br. J. Dis. Chest*, 1979, 73, 260-270.
2. Bessot J.C., Moreau G., Lenz D., Parini J.P., Araujo-Fontaine A., Pauli G. — Etude comparative d'un essai de désensibilisation en double insu aux extraits de poussières et aux extraits d'acariens. *Rev. fr. Allergol.*, 1975, 15, 73-80.
3. Bischoff E., Schirmacher W. — Farbnachweis für allergenhaltigen Hausstaub. *Allergol.*, 1984, 11, 446-449.
4. Bousquet J., Calvayrac P., Guérin B., Hejjaoui A., Dhivert H., Hewitt B., Michel F.B. — Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1985, 76, 734-744.
5. Burdon G.W., Juniper E.F., Killian K.J., Hargreave F.E., Campbell E.J.M. — The perception of breathlessness in asthma. *Am. Rev. respir. Dis.*, 1982, 126, 825-828.
6. Chapman M.D., Platts-Mills T.A.E., Gabriel M., Allan W.G.L., Hill L.E., Nunn A.J. — Antibody response following prolonged hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1980, 61, 431-440.
7. D'Souza M.F., Pepys J., Wells I.D., Tai E., Palmer F., Overell B.G., Mc Grath I.T., Megson M. — Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* in house dust allergy : a controlled study of clinical and immunological effects. *Clin. Allergy*, 1973, 3, 177-193.
8. Ford A., Seagroatt V., Platts-Mills T.A.E., Lowenstein H. — A collaborative study of the first international standard of *Dermatophagoides pteronyssinus* (house dust mite) extract. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1985, 75, 676-685.
9. Gabriel M., Allan W.G.L., Hill L.E., Nunn A.J. — Study of prolonged hyposensitization with *D. pteronyssinus* extract in allergic rhinitis. *Clin. Allergy*, 1977, 7, 325-336.
10. Gaddie J., Skinner C., Palmer K.N.V. — Hyposensitization with house dust mite vaccine in bronchial asthma. *Br. med. J.*, 1976, 2, 561-562.
11. Haydu S.P., Chapman T.T., Hughes D.T.D. — Pulmonary monitor for assessment of airway obstruction. *Lancet*, 1976, 2, 1225-1226.
12. Kopferschmitt-Kubler M.C., Bigot H., Pauli G. — Allergen bronchial challenge tests : variability and reproducibility of the early response. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1987, 80, 730-740.
13. Leiner G.C., Abramovitz S., Small M.J., Stenby V.B., Lewis W.A. — Expiratory peak flow rate. Standard values for normal subjects. Use as a clinical test of ventilatory function. *Am. Rev. respir. Dis.*, 1963, 88, 644-665.
14. Le Mao J., Weyer A., Pauli G., Lebel B., David B. — Studies on *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens : measurement of the relative potencies of *Dermatophagoides pteronyssinus* purified extracts by in vitro and in vivo methods. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1980, 65, 381-388.
15. Lind P. — Enzyme linked immunosorbent assay for determination of major excrement allergens of house dust mite species, *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *D. microceras*. *Allergy*, 1986, 41, 442-451.
16. Newton D.A.G., Maberley D.J., Wilson R. — House dust mite hyposensitization. *Br. J. Dis. Chest*, 1978, 72, 21-28.
17. Pauli G., Bessot J.C., Bigot H., Delaume G., Hordle D.A., Hirth C., Thierry R. — Clinical and immunological evaluation of tyrosine adsorbed *Dermatophagoides pteronyssinus* extract : a double blind placebo controlled trial. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1984, 74, 524-535.
18. Pauli G., Bigot H., Pelletier A., Kopferschmitt-Kubler M.C., Roegel E. — A study of the criteria used for clinical evaluation of prophylactic treatment in bronchial asthma. *Eur. J. respir. Dis.*, 1985, 67, 369-377.
19. Pauli G., Tenabene A., Bessot J.C., Hoyet C. — Intérêt du dosage de la guanine dans la poussière de maison pour la quantification des allergènes des acariens. *Rev. fr. Allergol.*, 1986, 26, 163-169.
20. Pauli G., Hoyet C., Tenabene A., Le Mao J., Thierry R., Bessot J.C. — Guanine and mite allergenicity in house dust. *Clin. Allergy*, 1988, 18, 383-392.
21. Platts-Mills T.A.E., Heymann P.W., Chapman M.D., Hayden M.L., Wilkins S.R. — Cross reacting and species specific determinants on a major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* : development of a radioimmunoassay for antigen P1 equivalent in house dust and dust mite extracts. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1986, 78, 398-407.
22. Smith A.P. — Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen : trial in asthma induced house dust. *Br. med. J.*, 1971, 4, 204-206.
23. Swanson M.C., Agarwal M.K., Reed C.H.E. — An immunochemical approach to indoor aeroallergen quantitation with a new volumetric air sampler : studies with mite, roach, cat, mouse and guinea pig antigens. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1985, 76, 724-729.
24. Rubinfeld A.R., Pain M.C.F. — How mild is mild asthma ? *Thorax*, 1977, 33, 177-181.
25. Van Bronswijk J.E.M.H. — Guanine as a hygienic index for allergologically relevant mite infestations in mattress dust. *Exp. appl. Acarol.*, 1986, 2, 231-238.
26. Warner J.O., Price J.F., Soothill J.F., Hey E.N. — Controlled trial of hyposensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* in children with asthma. *Lancet*, 1978, 2, 912-915.

■ ■ ■