

Université de Liège, Clinique et Policlinique des Maladies de l'Enfance
(Prof. A. Lambrechts), Belgique.

ETUDE CLINIQUE DU POUVOIR
ALLERGENIQUE DE FRACTIONS *PURIFIEES*
OBTENUES A PARTIR DE LA POUSSIERE
DE MAISON

Par

Y. MONARD & F. GEUBELLE*

Au cours d'une étude précédente, nous avons signalé les doutes que le clinicien éprouve au sujet de la spécificité des extraits allergéniques préparés à partir d'un stock de poussière de maison (*Monard & Geubelle*, 1964).

Après avoir montré que des extraits allergéniques préparés de manière différente à partir d'un stock de poussière de maison locale possèdent un pouvoir allergénique comparable et que certains rebuts d'extraction, habituellement rejetés lors de la préparation des extraits, possèdent une activité allergénique satisfaisante et analogue à celle des extraits correspondants, il est apparu nécessaire de poursuivre des recherches en vue d'isoler, à partir de ces *EXTRAITS* totaux, des *FRAC-TIONS* purifiées qui seraient plus allergéniques. En effet, *Berrens* (1963) a isolé d'un extrait total de poussière de maison deux fractions principales: l'une appelée fraction D, proviendrait des squames humaines et l'autre, appelée fraction E, pourrait être l'allergène réellement spécifique de la poussière de maison.

Pour étudier l'activité allergénique des fractions expérimentales énumérées ci-dessous et préparées par *Versie* (1964), les réactions cutanées obtenues avec ces fractions ont été com-

* Associé au Fonds National de la Recherche Scientifique.

parées à celles observées avec un allergène « de référence ». Cette substance de référence a été obtenue à partir de la poussière de maison et commercialisée par l'Institut Pasteur; elle est considérée comme allergénique parce que, chez un grand nombre d'enfants asthmatiques, les conditions énumérées par *Urbach et coll.* (1949) sont remplies.

En effet, 1°) l'extrait « poussière de maison » est obtenu à partir d'un mélange de substances qui sont effectivement rencontrées dans l'entourage des patients; 2°) les symptômes de leur maladie disparaissent si on écarte ces substances de leur présence; 3°) le contact intradermique avec l'extrait provoque des réactions cutanées nettes; 4°) l'inhalation de l'extrait est suivie d'un bronchospasme analogue aux crises d'asthme spontanément présentées par le patient.

En outre, le nombre de réactions cutanées est faible lorsque cet extrait est injecté, à même concentration que chez l'enfant allergique, dans le derme d'un groupe d'enfants sains sans signes de maladies allergiques.

Enfin, des essais sont actuellement en cours pour mettre directement en évidence des anticorps vis-à-vis de cet extrait dans notre groupe de patients, dernière condition qui permet de démontrer que cet extrait est réellement allergénique (*Urbach et coll.*)

Pour affirmer que les substances extraites à partir d'un lot de poussières de maison « locales » fabriquées par *R. Versie* (voir ci-dessous) sont allergéniques — au même titre que l'extrait commercial fabriqué par l'Institut Pasteur — il nous a paru indispensable: 1°) de vérifier tout d'abord le nombre de réactions cutanées obtenues chez un groupe d'enfants *non allergiques* comparé à celui obtenu par l'allergène de référence injecté à la même concentration et chez les mêmes sujets; 2°) de comparer ensuite la fréquence des réactions cutanées chez des patients qui répondent aux quatre conditions énumérées ci-dessus et qui sont déclarés allergiques à la poussière de maison.

En utilisant des dilutions successives de l'extrait de référence, la concentration « liminaire » a été antérieurement déterminée: moins de 5 pour cent des sujets sains présentent une

réaction cutanée lorsque la concentration de l'extrait Pasteur est de 1/50.000 (*Monard & Geubelle, 1964*). Lorsqu'à cette même concentration, un extrait ou une fraction « expérimentale » provoquent un nombre plus grand de réactions cutanées chez les mêmes sujets sains, le fait peut être interprété de deux manières différentes: a) ou bien, on peut supposer que l'extrait expérimental contient une grande quantité de substances banales irritantes, à côté d'une fraction éventuellement allergénique, ou bien, b) on peut supposer qu'une large proportion d'enfants sains sont, en réalité, naturellement sensibilisés vis-à-vis de l'extrait expérimental qui, grâce à un pouvoir allergénique très puissant, a été capable de déceler ces allergiques latents mieux que ne l'a fait l'allergène de référence.

Si l'on accepte la première hypothèse, l'extrait expérimental doit être dilué jusqu'à obtenir une concentration liminaire pour laquelle le nombre de réactions cutanées soit très petit (5 pour cent, voir ci-dessus) chez les enfants sains (1/500.000 ou 1/5 millions). Mais si, à cette concentration liminaire, la fréquence des réactions cutanées dans un groupe de patients allergiques est plus élevée avec l'extrait expérimental qu'avec l'extrait de référence, on peut alors supposer que le pouvoir allergénique de cet extrait expérimental pourrait être plus élevé. On possède tout au moins une première indication pour une étude plus extensive comprenant les tests de provocation avec l'extrait expérimental, la recherche d'anticorps dans le sang circulant et celle du pouvoir hyposensibilisant de l'extrait.

Le but du présent travail est limité à l'étude des réactions cutanées provoquées par l'injection du fractions obtenues à partir d'extraits de poussière de maison recueillie dans la région liégeoise.

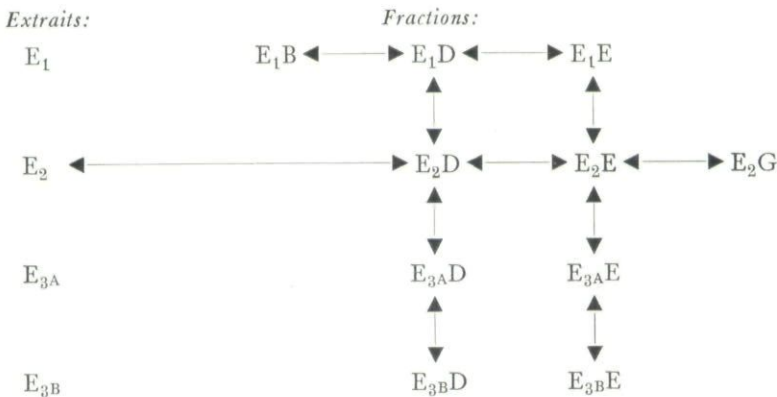
NOMENCLATURE DES EXTRAITS ET DES FRACTIONS ETUDIÉES

A la suite de différentes manipulations, (*Versie, 1964*), 4 extraits allergéniques totaux ont été obtenus: E_1 , E_2 , E_{3A} , E_{3B} , à partir d'un lot de poussières de maison.

Ces extraits ont été traités ensuite selon les méthodes décrites par *Berrens et coll.* (1963) afin d'en isoler les différentes fractions qui sont décrites dans le Tableau 1. Dans celui-ci : 1°) les EXTRAITS gardent la dénomination arbitraire antérieure (*Monard & Geubelle*, 1964); 2°) les FRACTIONS D correspondraient aux squames humaines, selon la suggestion de *Berrens* (1962) *et coll.* (1961); 3°) les FRACTIONS E pourraient constituer l'élément spécifique de la poussière de maison, selon ces mêmes auteurs; 4°) la fraction E₂G est un rebut de fractionnement.

TABLEAU 1

Nomenclature des différents extraits et fractions obtenus à partir d'un lot de poussière de maison. Le signe $\longleftrightarrow$ indique les comparaisons d'activité clinique qui ont été étudiées au cours de ce travail.



En un premier temps de l'expérience, nous avons comparé (voir signe $\longleftrightarrow$, Tableau 1) l'activité biologique de l'extrait E₂ et de ses fractions (E₂D, E₂E et E₂G) à celle de l'extrait allergénique de référence. L'extrait E₂ a été choisi parmi les autres extraits parce que sa technique de préparation est analogue à celle décrite par *Berrens et coll.* (1963) (*Versie*, 1964). En outre, la quantité d'extrait sec finalement obtenue est suffisamment grande pour permettre une étude chimique et clinique assez large.

En un second temps, nous avons comparé entre elles les ac-

tivités: a) des quatre fractions D obtenues à partir des 4 extraits précédemment étudiés (E_1D , E_2D , $E_{3A}D$ et $E_{3B}D$), b) les 4 fractions E obtenues à partir des mêmes extraits (E_1E , E_2E , $E_{3A}E$ et $E_{3B}E$).

METHODE ET MATERIEL CLINIQUE

La méthode utilisée pour apprécier l'activité clinique et la spécificité d'une solution allergénique a été décrite antérieurement (*Monard & Geubelle, 1964*).

Nous avons étudié les réactions obtenues chez 17 enfants asthmatiques et 100 enfants ne présentant pas de signes apparents de maladie allergique. Ces enfants allergiques et non allergiques ont été choisis selon les critères décrits antérieurement (*Monard & Geubelle, 1964*).

Les substances étudiées ont été injectées aux concentrations suivantes:

a) chez les enfants NON allergiques:

1/5.000 et 1/50.000 pour l'extrait E_2 et la fraction E_2G ;

1/5.000 à 1/5 millions pour les fractions E_2D et E_2E ;

b) chez les enfants allergiques:

1/500.000 et 1/5 millions pour l'extrait E_2 et la fraction E_2G ;

1/500.000 à 1/500 millions pour les fractions E_2D et E_2E .

L'allergène de référence (poussière de maison) a toujours été injecté simultanément et à la même concentration que la fraction étudiée. En vue d'éviter une sensibilisation éventuelle que des injections répétées d'une même fraction allergénique auraient pu provoquer chez les enfants non allergiques, ces derniers ont été répartis en 4 groupes: 30 sujets ont reçu une injection à la concentration de 1/5.000; 30 à la concentration de 1/50.000, et 30 à la concentration de 1/500.000. Enfin un groupe de 10 enfants a été testé à l'aide de fractions allergéniques diluées à 1/5.000.000.

RESULTATS

Première partie. Etude de l'extrait E_2 et de ses fractions

A. Enfants non allergiques (Tableau 2, 3 et 4).

L'allergène de référence provoque très rarement une réaction cutanée nette lorsque le produit a été dilué à 1/50.000; par contre, à la concentration de 1/5.000, plus de 10 pour cent des enfants non allergiques montrent une réaction nettement positive. Ces chiffres sont analogues à ceux obtenus antérieurement (*Monard & Geubelle, 1964*).

Le nombre des réactions cutanées positives est *légèrement*

plus élevé lorsque l'extrait E_2 est testé à la concentration de $1/5.000$; par contre, la fréquence des réactions positives augmente nettement lorsque les fractions E_2D et E_2E sont injectées à cette concentration de $1/5.000$. Ainsi, à cette dilution, 73 pour cent des enfants non allergiques ont une réaction clairement positive si la fraction E_2E est utilisée.

Les différences entre la fréquence de réactions positives vis-à-vis de l'allergène commercial d'une part, et de l'extrait E_2 et de la fraction E_2D d'autre part, disparaissent si l'on dilue les solutions allergéniques de $1/5.000$ à $1/50.000$ pour l'extrait E_2 , de $1/5.000$ à $1/50.000$ et au delà pour la fraction E_2D (Tableaux 2 et 3).

TABLEAU 2

Etude des réactions cutanées obtenues chez 90 enfants non allergiques lors de l'injection de l'extrait de poussière de maison fabriqué par l'Institut Pasteur (P), de l'extrait total E_2 et de ses fractions ($E_2D - E_2E - E_2G$) à différentes concentrations, obtenues à partir de poussière domestique locale. Les réactions provoquées par E_2E sont plus fréquentes, même aux dilutions élevées.

		Intensité de la réaction	Fréquence des réactions				
			P	E_2	E_2D	E_2E	E_2G
A	0	20	12	8	3	27	
$1/5000$	$\pm$	7	11	10	5	1	
30 cas	+	2	6	9	14	1	
	$+\pm$	1	1	3	8	1	
B	0	25	23	21	12	...	
$1/50.000$	+	5	6	7	5	...	
30 cas	$\pm$	...	1	2	11	...	
	$+\pm$	...	...	...	2	...	
C	0	26	...	25	13	...	
$1/500.000$	$\pm$	4	...	5	11	...	
30 cas	+	...	...	...	6	...	
	$+\pm$	...	...	...	...	...	

Les réactions positives vis-à-vis de la fraction E_2E restent très fréquentes à la concentration de $1/50.000$. Si cette fraction est injectée à des concentrations plus faibles encore ($1/500.000$ et $1/5.000.000$), le nombre de réactions posi-

tives décroît régulièrement mais il persiste un pourcentage assez élevé de réactions érythémateuses, parfois très discrètes (Tableaux 2 et 3).

TABLEAU 3

Etude des réactions cutanées obtenues chez des enfants non allergiques et chez des enfants allergiques, lors de l'injection de l'extrait de « référence » de l'Institut Pasteur, de l'extrait total E_2 et de ses fractions (E_2D , E_2E et E_2G) à la même concentration. Les réactions provoquées par E_2E restent plus fréquentes, même à cette dilution élevée, surtout chez les enfants allergiques.

	Intensité de la réaction	Fréquence des réactions				
		P	E_2	E_2D	E_2E	E_2G
A	0	9	...	8	4	...
1/5.000.000	$\pm$	1	...	2	5	...
10 cas	$\pm$	1	...	2	5	...
(témoins)	+	...	...	...	1	...
	+ $\pm$	...	...	...	...	...
B	0	...	...	...	...	3
1/5.000.000	$\pm$	2	2	1	...	4
10 cas	+	8	6	4	...	3
(allergiques)	+ $\pm$	...	2	5	10	...

Avec la fraction E_2G , moins de 10 pour cent des enfants testés ont une réaction cutanée positive pour la concentration de 1/5.000.

Le Tableau 4 fait apparaître deux faits :

1) le nombre de réactions qualifiées $\pm$ (érythème sans modification de la papule d'injection) reste analogue pour l'extrait Pasteur et la fraction allergénique E_2D . Par contre, ces réactions sont beaucoup plus nombreuses lorsque la fraction E_2E est utilisée.

2) Le nombre de réactions nettement positives décroît de manière progressive lorsque la fraction E_2E est diluée de 1/5.000 à 1/5.000.000. Par contre :

a) le nombre de réactions positives à l'allergène Pasteur diminue brusquement lorsque l'on passe de la concentration 1/500 (44 pour cent) à la concentration 1/5.000 (10 pour cent). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par *Wolfromm et coll.* (1962) ;

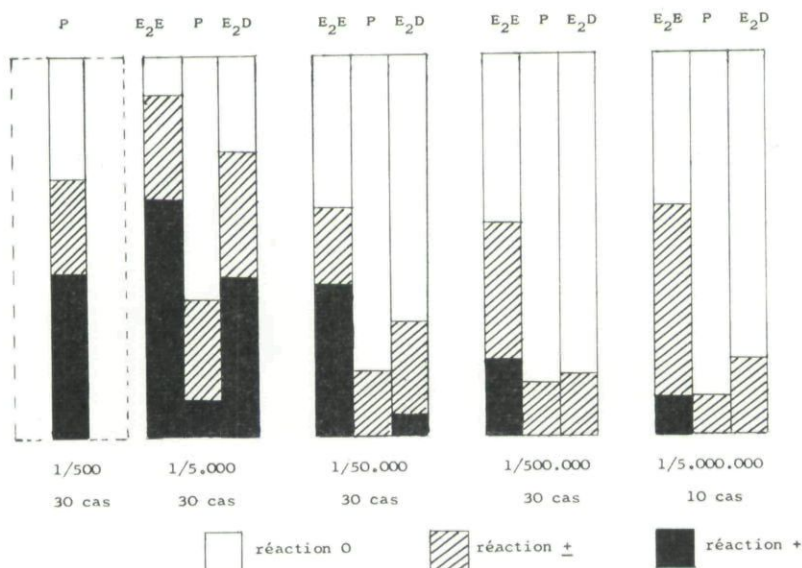


TABLEAU 4

Fréquence et types des réactions cutanées obtenues avec les fractions allergéniques E₂D et E₂E en fonction de leur concentration. Comparaison avec l'allergène commercial Poussière de Maison « Pasteur » (P), chez 100 enfants non allergiques.

b) le nombre de réactions positives à la fraction E₂D diminue aussi brusquement lorsqu'on passe de la concentration 1/5.000 à 1/50.000.

Cette différence entre la réactivité des sujets non allergiques vis-à-vis de la fraction E₂E d'une part, de l'allergène Pasteur et de la fraction E₂D d'autre part, permet de suspecter, tout au moins, un mode d'action différent. Tout se passe comme si la fraction E₂E contenait une proportion non négligeable d'irritants non spécifiques, à côté d'une fraction éventuellement allergénique.

B. Enfants allergiques. (Tableaux 3 et 5).

Tous les enfants allergiques qui réagissent à l'extrait commercial (Pasteur) montrent également une réaction positive à l'extrait E₂ et à ses fractions E₂D et E₂E à la concentration de 1/5.000.000 (Tableau 3).

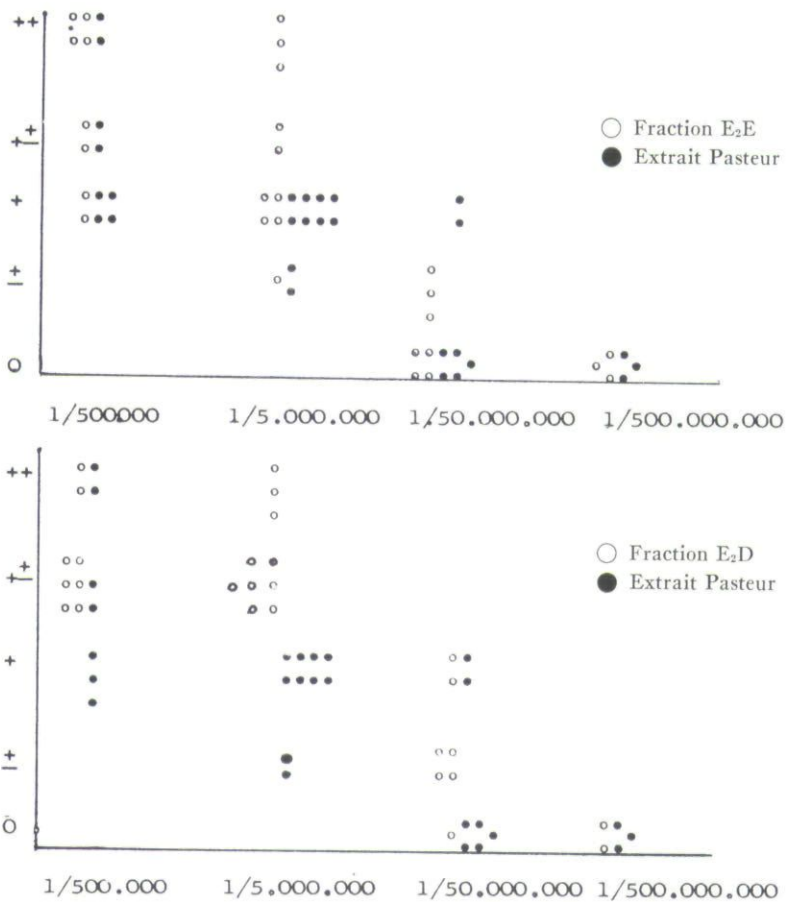


TABLEAU 5

Etude comparative, chez des enfants asthmatiques de l'intensité et de la fréquence des réactions cutanées en fonction de différentes concentrations pour l'extrait « de référence » Pasteur et les 2 principales fractions isolées d'un extrait de poussière domestique locale: E₂D (tableau A) et E₂E (tableau B).

Aucun patient allergique n'a été trouvé sensible pour la seule fraction E₂D qui, selon Berrens & Young (1961), correspondrait aux squames humaines: si la réaction est positive lors de l'injection de la fraction E₂D, elle l'est également lors de l'injection de la fraction E₂E qui pourrait être, selon ces auteurs, la fraction spécifique de la poussière de maison.

Lorsque la fraction E_2E est utilisée chez des enfants allergiques reconnus sensibles à l'extrait de poussière de maison Pasteur, le nombre de réactions très positives ($+\pm$ et $++$) est plus élevé que lors de l'injection de l'extrait Pasteur ou de la fraction E_2D (Tableau 5). La fraction E_2E semble donc plus active que les deux autres allergènes (extrait Pasteur et fraction E_2D).

Les résultats obtenus avec de l'extrait commercial et les fractions progressivement diluées (Tableau 4) permettent de suggérer également que la fraction E_2E est plus active que l'extrait Pasteur et la fraction E_2D . Cependant, il se pourrait que cet accroissement d'activité ne soit qu'apparent et dû, par exemple, à la présence de substances irritantes non spécifiques. La différence de réactivité chez le sujet sain entre la fraction E_2E et les autres fractions ou extraits nous avait aussi suggéré la possibilité d'un autre mode d'action (voir ci-dessus). Une étude avec une fraction E_2E hautement purifiée permettrait probablement de résoudre cette question.

Chez nos malades allergiques, la fraction E_2G considérée comme rebut ne possède qu'une activité faible; nous avons précédemment noté ce fait chez les enfants non allergiques (Tableau 2).

*Deuxième partie. Activité respective des fractions D
et des fractions E isolées à partir des extraits totaux.
(Tableau 6).*

Les fractions D (E_1D , E_2D , $E_{3A}D$ et $E_{3B}D$) et les fractions E (E_1E , E_2E , $E_{3A}E$, $E_{3B}E$) recueillies à partir des extraits totaux ont été testées chez 7 patients allergiques et 35 enfants non allergiques; les activités respectives de ces fractions ont été comparées entre elles (signe $\updownarrow$; Tableau 1). La concentration de ces solutions était voisine de la concentration dite « liminaire » (Tableau 4). Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le Tableau 6.

A) *Activité des fractions D chez les enfants non allergiques et chez les patients asthmatiques.*

La fréquence des réactions cutanées nettement positives est analogue pour les fractions D étudiées aux concentrations 1/50.000 et 1/500.000.

TABLEAU 6

Etude comparative des réactions cutanées d'enfants non allergiques lors de l'injection des fractions D obtenues à partir des 4 extraits E₂, E₁, E_{3A} et E_{3B} et des fractions E obtenues à partir des mêmes extraits. La fréquence et l'intensité des réactions cutanées est analogue pour les différentes fractions D; par contre, en ce qui concerne la fraction E₂E, la distribution des réactions cutanées est différente de celle des autres fractions E (voir texte).

	Inten- sité de la réac- tion	Fréquence des réactions				Inten- sité de la réac- tion	Fréquence des réactions			
		E ₂ D	E ₁ D	E _{3A} D	E _{3B} D		E ₂ D	E ₁ D	E _{3A} D	E _{3B} D
A	0	10	9	9	9	0	16	16	14	15
	±4	3	4	3	3	±4	3	6	5	5
	+	1	3	1	3	+	...	1	...	...
	+ ±	...	...	1	...	+ ±	...	...	...	...
		1/50.000 20 cas					1/500.00 20 cas			
B		E ₂ E	E ₁ E	E _{3A} E	E _{3B} E		E ₂ E	E ₁ E	E _{3A} E	E _{3B} E
	0	6	12	9	10	0	8	13	13	16
	±6	2	4	3	3	±9	5	6	4	4
	+	3	1	2	2	+	2	2	...	...
	+ ±	...	...	...	...	+ ±	...	...	1	...
		1/500.000 15 cas					1/5.000.000 20 cas			

B) *Activité des fractions E chez les enfants non allergiques et chez les patients asthmatiques.*

Chez les sujets non allergiques, la fréquence des réactions nettement positives est pratiquement analogue pour

les différentes fractions E aux concentrations $1/500.000$ et $1/5.000.000$.

Cependant, les réactions érythémateuses (notées « $\pm$ » dans le Tableau 6) sont plus nombreuses lorsque la fraction E_2E est injectée. Chez les asthmatiques, les différentes fractions E provoquent aussi un nombre analogue de réactions cutanées nettes.

COMMENTAIRES

1) Les fractions D expérimentales montrent donc une activité allergénique nettement plus marquée que l'extrait de référence, fabriqué par l'Institut Pasteur. En effet, à la concentration liminaire ($1/50.000$), les réactions cutanées sont rares chez les enfants non allergiques et, par contre, plus fréquentes que celles observées avec l'allergène de référence chez les patients asthmatiques.

Si, comme le suggèrent Berrens et coll. (1963), ces fractions correspondent aux squames humaines, il faudrait conclure que la majorité des enfants présentant une sensibilité cutanée à l'allergène poussière de maison, sont aussi sensibilisés aux squames humaines. Avant de l'affirmer, il est indispensable de vérifier que la nature chimique de la fraction D obtenue ici et celle de l'allergène squames humaines isolé par Berrens est identique; ces analyses sont actuellement en cours (Versie, 1964). Par ailleurs, il faut noter que dans notre groupe des 17 enfants allergiques, tous les patients sensibilisés à la fraction D le sont aussi à la fraction E.

2) Le Tableau 4 indique qu'avec l'allergène de référence (Institut Pasteur) utilisé à la concentration « supraliminaire » de $1/500$, le nombre des réactions cutanées chez les enfants non allergiques augmente *brusquement* (jusqu'à plus de 40 pour cent).

Des concentrations supraliminaires ont également été utilisées pour deux fractions expérimentales E_2D et E_2E chez les enfants non allergiques.

Lors de l'injection de E_2D à ces concentrations croissantes, on observe aussi une brusque augmentation du nombre de ré-

actions cutanées, plus ou moins parallèle à l'augmentation observée avec l'allergène de référence. (Tableau 4).

Par contre, la fraction E_2E présente deux particularités:

- 1) la concentration « liminaire » est beaucoup plus faible ($1/5.000.000$);
- 2) le nombre de réactions cutanées augmente *progressivement* lorsque la concentration est plus élevée (Tableau 4).

Ce dernier fait est-il caractéristique soit d'une substance non allergénique (et simplement irritante) soit d'un mélange de substances allergéniques et d'irritants banaux ? Pour répondre à cette question, nous n'avons trouvé dans la littérature aucune étude de la fréquence des réactions cutanées obtenues chez des enfants sains à l'aide d'un irritant banal non spécifique.

Par contre, dans notre population d'enfants non allergiques, Abrassart a montré récemment (1964) qu'aux doses supraliminaires des allergènes d'origine animale (squames bovins, poils de chien et de chat) fabriqués par l'Institut Pasteur, la fréquence des réactions cutanées augmente brusquement comme lors de l'injection de l'extrait poussière domestique et des fractions expérimentales D étudiées ici.

Il sera donc nécessaire, au cours d'un travail ultérieur:

1°) de tenter de « purifier » mieux encore cette fraction E_2E et, 2°) de soumettre ensuite les résultats à l'analyse statistique. Il est possible en effet, que la morphologie d'une courbe de fréquence de réactions cutanées (Tableau 4) chez une population d'enfants sans symptômes allergiques, permette à l'avenir de qualifier d'emblée d'allergène pur et non irritant, toute autre fraction expérimentale.

Les résultats des tests biologiques exposés ici seront comparés aux données de l'analyse chimique de ces fractions au cours d'un travail ultérieur.

CONCLUSIONS ET RESUME

La première étape de l'étude de l'activité allergénique clinique des fractions purifiées obtenues par *Versie* (1964) à partir d'un lot de poussière de maison a été réalisée. Nous avons observé le nombre de réactions cutanées provoquées par ces fractions et l'avons comparé à celui des réactions qui suivent l'injection d'un allergène de référence (Institut Pasteur) dans une population d'enfants sans symptômes allergiques et chez un groupe d'enfants asthmatiques.

Les fractions D qui ont été obtenues par *Versie* (1964) à l'aide de techniques identiques à celles décrites par *Berrens et coll.* (1963) et qui correspondraient, selon ces auteurs, aux squames humaines contenues dans la poussière de maison, ont une activité allergénique plus marquée que l'extrait de référence.

Les fractions E qui, selon ces mêmes auteurs, pourraient correspondre à la poussière de maison, semblent plus allergéniques mais peut-être moins spécifiques que l'extrait de référence. Il est indispensable de purifier encore ces fractions, notamment E₂E, avant de tirer des conclusions définitives à ce sujet.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Monard, Y. & Geubelle, F.*: Etude clinique du pouvoir allergénique de différentes fractions obtenues à partir de la poussière de maison. *Acta Allergol.* 19, 387, 1964.
2. *Berrens, L.*: Studies with verified house dust allergen and observations on the nature of its polypeptide component. *Clin. Chim. Acta* 8, 457, 1963.
3. *Versie, R.*: Etude comparative des procédés d'extraction et de purification des allergènes de poussière de maison. *Acta Allergol.* 20, 15, 1965.
4. *Urbach, E. & Gottlieb, P. M.*: in: «Allergy», 2nd edition, Grune-Stratton, New York, 1949.
5. *Berrens, L.*: Clinical characteristics of house dust allergen. *Dermatol. Acta* 124, 372, 1962.
6. *Berrens, L. & Young, E.*: Purification and properties of house dust allergen. *Int. Arch. Allergy* 19, 341, 1961.
7. *Wolfromm, E.*: in: Les maladies allergiques. Masson, Paris, 1962.
8. *Abrassart, C.*: La sensibilité de l'enfant aux allergènes d'origine animale. *Rev. Méd. Liège* 20, 163, 1965.

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.