

MISE EN EVIDENCE IN VITRO D'ANTICORPS
CHEZ DES SUJETS SENSIBILISES A
L'OVALBUMINE¹

Par

M. M. P. GRABAR, A. BOURDUAS et A. HOLTZER
(Institut Pasteur et Hôpital Broussais. Paris)

A de rares exceptions près les sérums des allergiques ne donnent pas de réactions immunologiques positives in vitro par les méthodes classiques, comme la précipitation spécifique. On sait, cependant, que ces sérums contiennent des anticorps, car on peut les mettre en évidence d'une manière assez générale par la méthode de sensibilisation passive de Prausnitz-Küstner. Deux causes peuvent être invoquées pour expliquer l'absence des réactions in vitro: 1) les anticorps donnant la réaction cutanée peuvent avoir des propriétés différentes des anticorps précipitants; on connaît, en effet, en immunologie des anticorps dits « incomplets » ou « bloquants » dont la présence ne peut être décelée que par des méthodes indirectes, ou bien 2) la différence peut n'être que quantitative, la sensibilité de l'épreuve cutanée étant supérieure à la limite de sensibilité des réactions classiques in-vitro. On n'arrive, en effet à déceler la présence de précipitines à l'aide de l'épreuve du disque (ring test) que lorsque leur concentration est supérieure à quelques μg par ml. Ce fait nous a incité à rechercher si l'emploi d'une méthode plus sensible ne permet pas de mettre en évidence des anticorps dans le sérum des allergiques.

Depuis plusieurs années divers auteurs ont tenté de met-

¹ Communication présentée à la Société Française d'Allergie, Séance du 19 juin 1951.

tre au point des méthodes d'agglutination de particules inertes (collodium, carmin, etc) ayant adsorbé l'antigène, mais les résultats obtenus ne sont pas toujours satisfaisants. Par contre, l'emploi d'érythrocytes comme particules porteurs d'antigène s'est montré excellent et divers auteurs ont utilisé cette méthode d'hémagglutination (4) ou d'hémolyse « conditionnée » (5) pour la mise en évidence d'anticorps. Les globules rouges (G.R.) sont capables de fixer à leur surface divers composés et ceci d'une façon suffisamment solide pour résister à des lavages ultérieurs. Nous avons eu l'occasion de confirmer ces faits en utilisant des immunsérums de Lapin, des G.R. de Mouton et divers antigènes ou haptènes. Cependant, lorsque l'antigène est un protéide il faut modifier les G.R. pour qu'ils puissent fixer cet antigène. L'emploi d'un léger tannage des G.R. décrit par Boyden (2) permet d'effectuer une telle fixation. Nous avons appliqué la technique qui nous a donné de bons résultats avec les immunsérums (1) à l'étude de quelques sérums d'allergiques. Nous nous sommes adressés, pour commencer, à des cas d'allergie à l'ovalbumine, cet antigène pouvant être obtenu très pur et la réaction des sérums de Lapin anti-ovalbumine pouvant nous servir de modèle.

I. MATERIEL

a) *Sérums*. Parmi les malades fréquentant le service du professeur Pasteur-Vallery-Radot trois cas d'allergie au blanc d'œuf ont été constatés.

Il s'agit de deux adultes et d'un garçon de 12 ans (cas n° 2). Ces malades souffraient d'asthme ou (et) de colite (cas n° 1) après absorption d'œuf et présentaient des réactions cutanées et des réactions de Prausnitz-Küstner fortement positives au blanc et aussi au jaune d'œuf; le cas n° 2 réagissait également à la viande de poulet et aux plumes. Aucun de ces malades n'a reçu d'injections de blanc d'œuf en vue d'une désensibilisation.

Les sérums de ces trois malades ont été examinés, ainsi que, à titre de contrôle, des sérums de quelques personnes bien portantes et de quelques allergiques sensibilisés à des antigènes autres que l'ovalbumine.

Un mélange de sérums de Lapin anti-ovalbumine, obtenus par des méthodes ordinaires d'immunisation, servait à titre de comparaison.

b) *Ovalbumine* (OV). L'antigène employé était de l'ovalbumine de Poule,

purifiée par plusieurs cristallisations successives et dissoute dans une solution tampon de phosphates de $\text{PH} = 6,4$ rendue isotonique par une addition de NaCl . La solution était ajustée de manière à contenir 1mg_2 d'OV/ml.

c) *Erythrocytes* (G.R.). Le sang défibriné de Mouton, dilué dans 1,2 volumes de solution d'Alsever et conservé à froid servait de stock de G.R. Avant leur emploi ces G.R. ont été lavés 3 fois avec de la solution physiologique.

II. METHODE

La technique employée, dérivée de celle de Boyden (2), sera décrite en détail dans une autre publication (1). En voici les points essentiels.

a) Le sérum est chauffé pendant 30 min. à 56° afin d'inactiver le complément et éviter ainsi l'hémolyse. Il est ensuite traité par des G.R. de mouton pour absorber les agglutinines anti-mouton, jusqu'à absence d'agglutination.

b) Les G.R. de mouton lavés sont traités par une solution au 20.000^e d'acide tannique pendant 10 min. à 37° , puis de nouveau lavés par centrifugation. On les suspend ensuite dans la solution d'ovalbumine de manière à avoir les proportions suivantes : 10 mg d'ovalbumine pour 2 cm^3 de G.R. à 2,5 % (en volume). Après un contact d'au moins 15 min., on centrifuge et on lave au moins deux fois ces G.R. ainsi sensibilisés, par du sérum de lapin normal dilué au 1/250 ou du « Subtosan » au 1/10 (dérivé polyvinilique, succédané du sérum). L'expérience a montré que ces lavages sont suffisants à condition de décanter le liquide surnageant aussi complètement que possible. Toutes les centrifugations doivent se faire à une vitesse et pendant un temps tels que les érythrocytes ne soient pas écrasés.

b) Pour la réaction proprement dite on mélange dans des petits tubes à fond rond une goutte de la suspension de G.R. sensibilisés à 2,5 % (en volume) et 0,5 ml des dilutions successives du sérum. La suspension et les dilutions doivent être faites soit dans du sérum de Lapin normal (inactivé et absorbé par des G.R. de Mouton) dilué au centième, soit dans du « Subtosan », dilué au dixième. Des tubes témoins contenant, d'une part, un mélange de G.R. non traités et le sérum à examiner, d'autre part, des G.R. sensibilisés et un sérum normal et, enfin, des G.R. non traités en suspension dans la solution physiologique, servent de contrôles.

Afin d'éviter des erreurs dues à des contaminations bactériennes, nous ajoutons à toutes les solutions un antiseptique, l'éthyl-mercure-thiosalicylate de sodium à 1/10.000.

Un séjour à la température du laboratoire suffisant pour permettre aux G.R. de sédimenter est nécessaire avant d'effectuer la lecture des résultats qui se fait à l'aide d'un agglutinoscope. Dans les essais où l'agglutination est positive les G.R.

sont disposés sur tout le fond du tube ou forment des agglomérats plus ou moins irréguliers, tandis que dans les essais négatifs, ils sont disposés au milieu du fond du tube et forment une sorte d'anneau régulier. Une agitation redisperse les G.R., mais un nouveau repos (par exemple, d'une nuit à la glacière) redonne la même image.

III. RESULTATS

Le tableau ci-dessous résume les principaux résultats obtenus.

Sérums	Agglutination ¹⁾	Précip.	µg d'N des anticorps/ mL sérum
S.H. (OV) n° 1	1 : 10,000	1 : 10	180
S.H. (OV) n° 2	1 : 10,000	trace	env. 20
S.H. (OV) n° 3	1 : 100	nég.	rien
S.L. Anti-OV	1 : 30,000	1 : 100	sup. à 250 ²
S.H. (poussières)	nég.		
S.H. (plumes)	nég.		
S.H. (pollen)	nég.		
S.H. normal	nég.		

On voit que le sérum anti-OV de lapin (S.L.), qui donne une réaction de précipitation très nette (ring-test) même à la dilution 1 : 100 et dont la zone d'équivalence correspond à environ 250 µg d'OV, provoque une hémagglutination même au 30.000^e. Les sérums humains (S.H.) se comportent différemment : les n° 1 et 2 agglutinent au 10.000^e, tandis que le n° 3 seulement au 100^e. Or, le sérum n° 1 présente une précipitation assez forte et le dosage par la méthode de Heidelberger et Kendall a montré qu'il contient 180 µg d'N des anticorps précipitants, tandis que le n° 2 n'en contient que peu, de l'ordre de 20 µg et le n° 3 n'en contient pas ou des quantités

¹ Le S.H. n° 1 n'agglutinait plus qu'au 1 : 1000 et le n° 2 qu'au 1 : 100 un mois plus tard.

² N'a pas été dosé d'une manière précise.

inférieures à la sensibilité de la méthode. Enfin, les sérums de sujets normaux ou sensibilisés à d'autres substances ont donné des résultats négatifs, c'est-à-dire que leur sérum n'agglutine pas les G.R. sensibilisés par l'OV, même lorsqu'on utilise du sérum dilué seulement au $\frac{1}{4}$.

Un fait qui nous semble utile d'être souligné c'est la diminution rapide du titre des sérums n° 1 et 2 pendant leur conservation à la glacière.

IV. DISCUSSION

Nous n'avons pu réunir malheureusement que trois cas d'allergie à l'ovalbumine, mais les résultats sont tellement nets que nous sommes persuadés que des réactions analogues seront données par tous les sérums de personnes sensibilisées à l'ovalbumine. Nous espérons que tous les sérums pouvant donner une réaction de Prausnitz-Küstner positive présentaient une réaction d'agglutination positive avec des érythrocytes sensibilisés avec l'antigène homologue car il serait étonnant que seuls les sérums de personnes sensibilisées à l'ovalbumine donnent des réactions positives. Cependant, les résultats obtenus avec des sérums d'animaux hyperimmunisés montrent que suivant la nature chimique de l'antigène (protéide, polyoside) sa fixation sur les érythrocytes se fait dans des conditions différentes : ainsi l'ovalbumine ne se fixe que sur les érythrocytes traités au tannin, tandis que le polyoside de la tuberculine donne des titres plus élevés lorsqu'on le fixe sur des G.R. non modifiés; enfin, avec le polyoside typhique O on n'observe pas de réaction d'hémagglutination ni avec des G.R. non traités ni avec des G.R. tannés. Dans des recherches en cours nous essayons, d'une part, de nous rendre compte si la méthode d'hémagglutination « passive » peut être employée dans tous les cas d'allergie et, d'autre part, si suivant la nature de l'allergène on est obligé de modifier légèrement la technique de cette épreuve.

Il faut cependant noter que si l'hémagglutination « pas-

sive » est de 20 à 100 fois plus sensible que la réaction de précipitation (épreuve du disque), nous ne connaissons pas les limites de sensibilité comparées entre la réaction de Prausnitz-Küstner et l'hémagglutination, et, d'autre part, nous ne savons pas encore si tous les anticorps susceptibles de donner une réaction cutanée peuvent agglutiner des érythrocytes sensibilisés. Un fait semblerait démontrer une différence entre les deux réactions : l'hémagglutination peut se faire aussi bien avec les sérums frais que chauffés, tandis que l'on admet généralement que la réaction cutanée doit être pratiquée avec du sérum non chauffé. Cependant ce fait n'est pas nécessairement dû à une différence entre les anticorps donnant une réaction cutanée et ceux réagissant *in vitro*. On sait, en effet, que le chauffage du sérum à 56° a pour effet la formation de complexes entre des constituants du sérum et, en particulier, entre les fractions euglobuline et albumine. Il est donc fort possible que les anticorps inclus par le chauffage dans un complexe ne sont plus susceptibles de réagir *in vivo* tout en conservant leur propriété de participer à une réaction *in vitro*. Si cette hypothèse est exacte seules des différences d'ordre quantitatif pourraient intervenir entre les deux types de réactions.

Cependant, certaines observations plaideraient en faveur de l'existence de différences qualitatives. En voici un exemple, tiré d'un travail publié il y a plus de 20 ans (3). Les auteurs ont pu constater la présence d'anticorps dans le sérum d'enfants sensibilisés au blanc d'œuf à l'aide de la réaction de fixation du complément. Les concentrations en antigène nécessaires pour observer des réactions positives sont beaucoup plus faibles que celles qu'il a fallu utiliser pour titrer un sérum d'un enfant accidentellement immunisé par des injections de blanc d'œuf, ce qui semblerait parler en faveur d'une différence quantitative, l'immunsérum étant plus riche en anticorps. Mais, cet immunsérum n'ayant pas donné de réaction de Prausnitz-Küstner, les auteurs pensent qu'il doit exister aussi des différences qualitatives entre les anticorps de cet immunsérum et ceux des sérums d'enfants allergiques (3).

D'autres observations peuvent encore être invoquées, mais aucun argument ne nous semble décisif pour établir une différenciation, bien tranchée et nous espérons que de nouvelles expériences permettront de préciser la question.

CONCLUSIONS

L'expérience montre que des sérums de cas d'allergie à l'ovalbumine provoquent l'agglutination d'érythrocytes de mouton sensibilisés par une solution d'ovalbumine après un léger tannage. Une appréciation de la quantité d'anticorps dans le sérum est obtenue en opérant sur des dilutions de ce dernier. Deux des sérums examinés donnaient des réactions positives même à une dilution au 10,000^e; un de ces sérums présentait une réaction de précipitation très nette et contenait 180 μ g d'N d'anticorps/ml. Un troisième sérum n'agglutinait les G.R. sensibilisés qu'au centième.

La méthode est très sensible et spécifique; il est probable qu'elle puisse être appliquée à d'autres cas d'allergie en utilisant des antigènes convenablement choisis.

BIBLIOGRAPHIE

1. Borduas, A. et Grabar, P. (en impression).
2. Boyden, S. V.: *J. exper. Med.*, 1951, 93, 107—20.
3. Gyogry, P., Moro, E. et Witebsky, E.: *Klin. Wochenschr.*, 1930, 9, 1012—17.
4. Middlebrook, G. et Dubos, R. J.: *J. Exper. Med.*, 1948, 88, 521.
5. Muniz, J.: *O Hospital*, Rio de Janeiro 1950, 35, 199—205.

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.