

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU RÔLE ALLERGISANT DES ACARIENS DE LA POUSSIÈRE. ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DES SÉRUMS DES MALADES ET DES SÉRUMS DES LAPINS HYPERIMMUNISÉS (*)

A. ARAUJO-FONTAINE, F. MILTGEN, H. ROMBOURG,
B. MOLET, G. PAULI, A. BASSET (**)

RÉSUMÉ

Les auteurs rapportent leur expérience concernant l'élevage des acariens de la poussière domestique : *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Glyciphagus destructor* et *Tyrophagus putrescentiae*. Deux sortes d'extraits antigéniques ont été préparés à partir de ces trois espèces d'acariens. Une identité antigénique entre la poussière domestique et *Dermatophagoides pteronyssinus* est mise en évidence par immunodiffusion. Par cette même méthode, les auteurs constatent de nombreux arcs de précipitation dans les sérums de lapins hyperimmunisés (7 à 13), ainsi que dans le sérum de malades allergiques à la poussière. Sur 87 malades, 65 avaient des précipitines vis-à-vis de *D. pteronyssinus*. Des arcs de précipitation sont révélés aussi par immuno-électrophorèse. Le dosage des IgE et la recherche des précipitines ont été effectués parallèlement chez 32 malades. La coexistence d'un taux élevé des réagines et de précipitines est observée dans 77,2 p. cent de cas.

Une bonne corrélation entre les résultats obtenus par immunofluorescence et immunodiffusion a été observée dans une série de 44 malades.

MOTS CLES MEDLARS : Poussières - Acariens - Allergie respiratoire - Immunofluorescence - Immunodiffusion - IgE * analyse.

A Strasbourg, les recherches concernant les allergies à la poussière de maison, entreprises depuis 1965, aboutissent, par une voie différente de celle des auteurs hollandais, à la mise en évidence des acariens. C'est la présence d'un taux élevé de protéines dans les extraits de poussière, qui nous fit rechercher un facteur biologique dans celle-ci [2, 3].

Nous avons dans un premier temps hyperimmunisé des lapins avec l'extrait de poussière domestique préparé par nous-même et mis en évidence la présence d'anticorps précipitants anti-poussière dans l'immu-sérum ; puis nous avons constaté la pré-

SUMMARY

Results of research into the allergizing function of the Acaridae in dust. An immunological study of patients' sera and the sera of hyperimmunized rabbits. — The authors describe their experiments with breeding house dust Acaridae : *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Glyciphagus destructor* and *Tyrophagus putrescentiae*. Two kinds of antigenic extracts were prepared from these three types of Acaridae. Immunodiffusion showed house dust and *Dermatophagoides pteronyssinus* to be antigenically identical. By this same method, the authors have found many precipitation arcs in the sera of hyperimmunized rabbits (7 to 13), as well as in the sera of patients allergic to dust. Out of 87 patients, 65 produced precipitins in response to *D. pteronyssinus*. Precipitation arcs were also found by immunoelectrophoresis. Assessment of IgE and investigation for precipitins were carried out concurrently on 32 patients. The coexistence of a high level of reagins and precipitins was found in 77.2 per cent of the cases.

A satisfactory correlation between the results obtained by immunofluorescence and immunodiffusion was found in a group of 44 patients.

INDEX TERMS : Dust - Mites - Respiratory hypersensitivity - Fluorescent antibody technic - Gel diffusion tests - IgE * analysis.

sence d'anticorps précipitants anti-poussière dans les sérums des malades allergiques à celle-ci par la méthode d'immunodiffusion en gélose. Lorsque nous disposâmes des extraits d'acariens, préparés à partir des différentes espèces élevées dans nos laboratoires, nous pûmes mettre en évidence, toujours par la même méthode, l'existence d'une fraction antigénique commune à la poussière domestique et l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus*. Nous avons fait part de ces résultats dans des communications antérieures [4, 5, 6]. Plus récemment nous avons hyperimmunisé des lapins avec des extraits préparés

(*) Travail présenté aux X^{es} Journées Nationales d'Allergologie, Strasbourg, mai 1972.

(**) Clinique dermatologique (Pr A. Basset) et Institut de Parasitologie (Pr J. Callot), CHU, BP 426/R 5, 67005 STRASBOURG.

ARAUJO-FONTAINE A., MILTGEN F., ROMBOURG H., MOLET B., PAULI G., BASSET A. — Contribution à l'étude du rôle allergisant des acariens de la poussière. Etude immunologique des sérums des malades et des sérums des lapins hyperimmunisés. *Rev. franç. Allergol.*, 1974, 14 (n° 2), 91-96.

à partir des élevages de *Dermatophagoides pteronyssinus* et de *Glyciphagus destructor*. Nous voulons rendre compte ici de l'orientation légèrement différente de nos recherches, qui utilisent d'autres méthodes que celles précédemment décrites, ainsi que les résultats obtenus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos recherches sont orientées dans cinq directions : l'élevage des acariens, la préparation des antigènes à partir des acariens, la recherche des précipitines chez l'animal hyperimmunisé et chez les malades allergiques, la recherche d'anticorps par immunofluorescence indirecte chez ces mêmes malades et le dosage du taux des IgE dans les sérums des malades.

ELEVAGE DES ACARIENS

Il comporte l'analyse biologique des poussières et l'élevage proprement dit.

Cent échantillons de poussière provenant de maisons de sujets allergiques ont été analysés par la méthode de Voorhorst-Spieksma [12].

Pour l'élevage proprement dit, nous avons suivi la technique de ces mêmes auteurs. Néanmoins, nous avons introduit une variante. Les *Glyciphagus destructor*, élevés habituellement sur de la farine de seigle, et les *Tyrophagus putrescentiae*, élevés sur du lait en poudre, ont été ici élevés sur poudre de squames humaines additionnée de levure (*Sacharomyces cerevisiae*), c'est-à-dire le même milieu que pour *Dermatophagoides pteronyssinus*.

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES

Nous avons préparé à partir des élevages des trois espèces d'acariens (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Glyciphagus destructor* et *Tyrophagus putrescentiae*) deux sortes d'extraits.

Le premier, destiné aux épreuves cutanées et ventilatoires (effectués par le Dr PAULI), est préparé selon la méthode de Voorhorst-Spieksma [11].

Le second est utilisé pour les tests d'immunodiffusion et d'immunoélectrophorèse, ainsi que pour l'immunisation des lapins. Pour celui-ci, nous avons adopté les méthodes préconisées par BIGUET et ses coll. [7] pour la préparation des antigènes. Les acariens des élevages de 15 jours à 1 mois et demi, selon les espèces et le milieu nutritif, sont mis au congélateur pendant quelques jours pour les tuer. Le tout est ensuite broyé au mortier avec la poudre de carborandum (grain 800) à sec pendant une heure, et mis en suspension avec agitation magnétique dans une solution de NaCl à 1 p. mille pendant 24 heures à 4 °C, puis centrifugé à 4 500 tours, une fois 10 minutes pour supprimer le carborandum et les gros débris, une deuxième fois à 4 500 tours pendant une demi-heure, le tout à 4 °C. Les pro-

téines du surnageant sont ensuite précipitées par l'acétone à +4 °C (deux fois) puis lavées à l'éther deux fois. Le produit sec obtenu nous sert d'antigène. Ceci est valable, pour les extraits que nous utilisons depuis le 1^{er} janvier 1972.

Immunisation des lapins

Cinq lapins ont été immunisés ; deux avec l'antigène *Dermatophagoides pteronyssinus*, deux avec l'antigène *Glyciphagus destructor* et un témoin avec l'adjuvant de Freund, complet et incomplet.

Dix mg d'antigène sec sont dissous dans un demi ml d'eau physiologique et mélangés à un volume égal d'adjuvant de Freund complet, pour les quatre premières injections, puis incomplet pour les suivantes.

Les lapins sont inoculés dans les aires ganglionnaires axillaires à raison de deux injections par semaine, pendant dix semaines. Du sang est prélevé avant immunisation, puis en cours d'immunisation, puis à nouveau au bout de 10 semaines, par aspiration au niveau de la veine marginale de l'oreille.

Sérums humains

Notre étude comporte 97 sérums. De ces sérums, 87 ont été prélevés chez des malades allergiques, dont 67 présentaient les traits de l'atopie (antécédents héréditaires, polysensibilisation, troubles vasomoteurs) ; 16 étaient d'asthmatiques non atopiques ; 4 des pneumopathies diverses. Les 10 autres étaient des sérums témoins, prélevés chez des sujets n'ayant pas d'allergie connue. Ces sérums ont été gardés sans conservateur au congélateur à -18 °C, et depuis le premier janvier 1972 à -70 °C.

TECHNIQUE UTILISÉE POUR LES PRÉCIPITATIONS EN GÉLOSE

L'immunodiffusion est réalisée en gel d'agarose, en tampon véronal sodé, HCl à pH 8,2, force ionique 0,05.

L'immunoélectrophorèse est réalisée en gel d'agar au même pH et à la même force ionique.

Pour l'immunodiffusion, les sérums sont utilisés non concentrés.

Pour l'immunoélectrophorèse, les sérums sont concentrés trois fois par lyophilisation. La diffusion est effectuée pendant 36 heures. Puis les lames sont lavées, ensuite plongées dans un bain de citrate de sodium à 5 p. cent, afin d'éliminer les éventuels précipités non spécifiques : protéine C, anti-protéine C ; finalement elles sont déminéralisées et colorées à l'amido-Schawarz.

IMMUNOFLUORESCENCE

Les acariens sont tués par congélation à -18 °C. On les met alors en suspension dans très peu d'eau physiologique à pH 7,2. Cette suspension est mise

dans un boudin de muscles congelé, puis on fait des coupes de 4 μ d'épaisseur au microtome à congélation. Ces coupes déposées sur lame servent d'antigène.

La réaction est faite par immunofluorescence indirecte, selon la méthode classique [1]. Les coupes sont ensuite contrecolorées au bleu d'Evans au 1/5 000 afin d'éliminer les fluorescences non spécifiques.

DOSAGES DES IgE

Ils ont été effectués sur 32 sérums de malades par le Dr R. THIERRY de l'Institut de bactériologie (Service du Pr MINCK), par la technique de radio-immuno-absorption (RIST, Pharmacia Upsala). Les résultats sont exprimés en unités ; une unité correspond à 2,42 nanogrammes.

RÉSULTATS

ANALYSE DES POUSSIÈRES

Sur cent échantillons, nous avons trouvé une population d'acariens faite essentiellement de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, et accessoirement de *Dermatophagoides farinæ*, *Chortoglyphus arcatus*, *Klemania plumigera*, *Goheria*, *Sturnophagoides bresiliensis* Fain.

Nous avons pu isoler en élevage trois espèces : *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Glyciphagus destructor* et *Tyrophagus putrescentiae*.

Nous avons trouvé un pourcentage particulièrement élevé, 97 p. cent, de *Dermatophagoides pteronyssinus*, dans les poussières provenant des matelas de nos malades.

IMMUNODIFFUSION

Nous utilisons auparavant la technique de HARTMANN et TOILLIEZ [9], variante du procédé d'Ouchterlony. Par cette méthode nous avons montré la présence d'une fraction antigénique commune à la poussière domestique et à l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus*, dans l'immun-sérum anti poussière et dans les sérums des malades allergiques.

Etant donné les limites de cette microméthode, nous avons adopté les techniques préconisées par BIGUET et coll. ; plus analytiques ces techniques nous ont permis de constater, avec les sérums hyperimmuns de lapins, que les acariens se comportent comme des antigènes puissants, provoquant l'apparition d'un nombre considérable d'arcs de précipitation (7 à 13 arcs) ; et qu'en plus de la présence d'une fraction antigénique commune à la poussière domestique et à l'acarien *D. pteronyssinus*, il existe des communautés antigéniques entre les différentes espèces d'acariens.

En ce qui concerne la série de 97 sérums de malades allergiques, étudiés, nous avons pu, par cette méthode confirmer la présence de précipitines dans les sérums de malades, constater que, mises à part les fractions antigéniques communes à la poussière domestique et à l'espèce *Dermatophagoides pteronyssinus*, il existe aussi des communautés antigéniques entre les trois espèces étudiées, enfin que le nombre d'arcs de précipitation varie ainsi que l'intensité et la qualité, selon les cas.

IMMUNOÉLECTROPHORÈSE

Pour les lapins hyperimmunisés, un nombre considérable d'arcs apparaît ; il existe des arcs communs aux deux antigènes utilisés : *D. pteronyssinus*, *G. destructor*.

Pour les sérums de malades, nous avons obtenu en immunoélectrophorèse un maximum de cinq arcs.

L'ENSEMBLE DE NOS RÉSULTATS est exposé dans les tableaux I, II et III.

Le tableau I montre :

- 1) que la poussière standard, telle que nous pouvons nous la procurer dans le commerce, n'est pas utilisable en immunodiffusion du fait, peut-être, de sa faible concentration en antigène ;
- 2) qu'il existe un parallélisme étroit entre la poussière domestique et l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus* ;
- 3) que les différences des trois malades peuvent être expliquées par une allergie à un autre composant de la poussière ;
- 4) que le nombre des réactions positives aux autres espèces d'acariens étudiés, ainsi qu'à d'autres allergènes, est inférieur à celles de *Dermatophagoides pteronyssinus* ;
- 5) que le milieu de culture se comporte comme un élément neutre.

Le tableau II nous permet de dire que lorsque l'on prend une série de malades positifs aux tests de provocation et aux intradermo-réactions, aux deux allergènes, on obtient une bonne corrélation avec la positivité des tests en immunodiffusion.

Le tableau III montre qu'il existe une corrélation étroite entre la positivité des tests cutanés et la positivité des tests en immunodiffusion, et que les réactions plus franchement positives en immunodiffusion correspondent en général à des atopies franches.

IMMUNOFLUORESCENCE

45 sérums de malades sensibilisés à la poussière ont été testés sur trois antigènes d'acariens différents : *D. pteronyssinus* ; *T. putrescentiae* et *G. destructor*. 43 d'entre eux sont positifs à un taux d'au moins 1/40, 15 de ces 43 sérums sont positifs sur un seul antigène, dont 8 sur *T. putrescentiae* ; 14 sérums

TABLEAU I
IMMUNODIFFUSION EN GÉLOSE

ANTIGÈNES TESTÉS	NOMBRE DE MALADES	RÉACTIONS POSITIVES	RÉACTIONS NÉGATIVES	TÉMOINS	
				POSITIFS	NÉGATIFS
Poussière standard (Pasteur)	87	33	54	0	10
Poussière domestique	87	66	21	0	10
D. pteronyssinus	87	63	24	2	8
T. putrescentiae	87	42	45	0	10
G. destructor	40	11	29	0	10
Poussières sans acariens	40	15	25	0	10
Moisissures du groupe II	22	1	21	0	10
Milieu de culture	40	0	40	0	10

TABLEAU II

	NOMBRE DE MALADES	IMMUNODIFFUSION					
		D. PTERONYSSINUS		POUSSIÈRE STANDARD (PASTEUR)		POUSSIÈRE DOMESTIQUE	
		—	1 à 6 + 2 à 6	—	1 à 2 + 2 à 6	—	1 à 2 + 2 à 6
IDR poussière standard + D. pteronyssinus +	34	7	21 6 27	20	14 0 14	4	18 12 30
Test de provocation poussière standard + D. pteronyssinus +							

TABLEAU III
TESTS CUTANÉS ET TESTS EN IMMUNODIFFUSION

N°	CLINIQUE	INTRADERMO-RÉACTIONS		IMMUNODIFFUSION			INTRADERMO-RÉACTIONS A D'AUTRES ALLERGÈNES				
		PS	D. pt.	D. pt.	P. domes- tique	P. sans acariens	Plumes	M1	M2	Farine	Pollens
9	bronchite	+	+	1 a	2 a	0 a	+	+			
11	asthme, eczéma	+	+	0 a	0 a	0 a	+				
41	rhinite	+	+	3 a	3 a	0 a			+		
45	eczéma atopique	+	+	5 a	5 a	0 a	+				
52	asthme atopique	+	+	2 a	4 a	0 a	+	+	+		
53	asthme atopique	+	+	5 a	2 a	0 a				+	
54	asthme, eczéma	+	+	2 a	0 a	0 a	+				
55	asthme, eczéma	+	+	1 a	1 a	0 a					
57	asthme, eczéma	+		2 a	1 a	0 a	+				
60	rhinite	+	—	0 a	0 a	0 a	+				
61	eczéma atopique	+	+	0 a	0 a	0 a	+				
63	rhinite	+	+	0 a	0 a	0 a					+
67	eczéma	+	—	2 a	0 a	0 a					
84	asthme	+	—	0 a	0 a	3 a	+				
87	eczéma atopique	+	+	2 a	2 a	0 a	+	+	+		+

PS : poussière standard. D. pt. : Dermatophagoides pteronyssinus.
M1 : moisissure du groupe I. M2 : moisissure du groupe II.

TABLEAU IV

RÉSULTATS DE 44 SÉRUMS DE MALADES ALLERGIQUES
A LA POUSSIÈRE TESTÉS EN IMMUNOFLUORESCENCE (IMF)
ET EN IMMUNODIFFUSION (ID) SUR ANTIGÈNE D'ACARIEN

IMF \ ID	0	1/40 ^e	1/80 ^e	1/160 ^e	Total
0 arc	1	1	1	0	3
1 à 2 arcs	1	10	16	0	27
+ de 2 arcs	0	4	6	4	14
Total	2	15	23	4	44

sont positifs sur 2 antigènes, dont 13 *T. putrescentiae*. Enfin 14 sérums sont positifs sur les trois antigènes.

On retiendra de ces résultats, la grande sensibilité de l'antigène *T. putrescentiae*.

Par ailleurs 44 de ces sérums ont été testés également en immunodiffusion avec les trois mêmes antigènes. Les résultats sont exprimés dans le tableau IV qui prouve l'existence d'une bonne corrélation entre le nombre d'arcs en immunodiffusion et le taux de positivité en immunofluorescence.

DOSAGE DES IgE

Le dosage des IgE a été effectué chez 32 malades atteints d'eczéma atopique, asthme atopique, asthme non atopique, rhinite atopique, pneumopathie (miliaire) et gale.

Les résultats sont exposés dans le tableau V. Ce tableau nous permet de constater que, chez les malades présentant les traits de l'atopie, il existe 72 p. cent de positifs supérieurs à 1 000 U (compris entre 1 000 et 4 000 U) et 28 p. cent seulement inférieurs

TABLEAU V

DIAGNOSTIC	NOMBRE DE MALADES	IMMUNODIFFUSION		DOSAGE DES IgE	
		+	—	> 1 000	< 1 000
Eczéma atopique	5	5	0	5	0
Asthme atopique	19	18	1	12	7
Asthme non atopique	5	5	0	0	5
Rhinite	1	0	1	1	0
Pneumopathie (miliaire)	1	1	0	1	0
Gale	1	1	0	0	1
Total	32	30	2	19	13

à 1 000 U (compris entre 380 et 900 U). Nous avons pu observer la coexistence d'un taux élevé de réagines et de précipitines dans 77,2 p. cent de cas.

DISCUSSION

Comme nous l'avions déjà signalé auparavant, il apparaît dans nos expériences une fraction antigénique commune à la poussière domestique et à l'espèce d'acarien *D. pteronyssinus*.

Avec les techniques utilisées actuellement nous avons pu constater :

— l'apparition d'un plus grand nombre d'arcs de précipitation tant dans l'immun-sérum de lapins que dans les sérums des malades allergiques à la poussière et aux acariens de la poussière ;

— l'existence d'importantes réactions croisées non seulement entre la poussière et *D. pteronyssinus*, mais aussi entre les trois espèces d'acariens étudiés ;

— l'existence des fractions propres à chacune des espèces d'acariens ;

— la plus grande fréquence de positivité vis-à-vis de l'espèce *D. pteronyssinus* par rapport aux autres espèces : *G. destructor*, *T. putrescentiae*. En effet, sur 87 malades l'immunodiffusion était positive pour *D. pteronyssinus* dans 65 cas ; parmi ces 65 cas, 39 avaient également des précipitines vis-à-vis de *T. putrescentiae*, 3 malades seulement avaient des précipitines avec *T. putrescentiae*, sans en avoir vis-à-vis de *D. pteronyssinus* ;

— la neutralité de notre milieu de culture (tableau I). Ceci peut s'expliquer par la grande concentration d'acariens dans nos élevages, qui fait qu'au moment de la préparation de l'antigène, il ne reste guère de squames humaines car elles ont été consommées par les acariens eux-mêmes ; d'autre part la petite quantité de levures (*Sacharomyces cerevisiae*) n'est pratiquement pas altérée par le broyage à sec et est éliminée lors de la préparation de l'antigène, c'est-à-dire que nos lapins sont hyper-immunisés avec un antigène constitué presque exclusivement d'acariens et de leurs déjections.

Tout cela nous suggère l'importance, dans ce genre d'expérience, des techniques utilisées pour la préparation des antigènes, l'immunisation des animaux et la très grande importance des données techniques dans la préparation des gels (pH, fi, etc.) dans l'immunodiffusion et l'immunoélectrophorèse, dont il faut tenir compte dans l'appréciation des résultats. Ainsi peut-on comprendre pourquoi certains auteurs comme MIYAMOTO, OSHIMA et ISHIZAKI [10], trouvent des bandes très faibles de précipitation vis-à-vis de l'extrait de poussière et pas de précipitation vis-à-vis des extraits d'acariens, tandis que DASGUPTA et CUNLIFFE [8] trouvent très peu d'arcs de précipitation vis-à-vis des acariens, bien que ces arcs de précipitation soient de forte intensité et nets, mais ces