

RAST TESTS AVEC DES ANTIGÈNES PROTÉINIQUES ET POLYSACCHARIDIQUES ET DES CELLULES LAVÉES (*)

G. EDGE et J. PEPYS (**)

MOTS CLES MEDLINE : *Candida albicans* * immunologie - Antigène fongique - IgE - Mannane - Protéine - Test cutané - Test de précipitation - Aspergillose * immunologie.

INDEX TERMS : *Candida albicans* * immunology - Antigens, fungal - IgE - Mannans - Proteins - Skin tests - Precipitin tests - Aspergillosis * immunology.

Il y a de nombreux problèmes concernant un rôle possible de *Candida albicans* à l'origine d'une maladie allergique. Sa présence presque universelle, la mise en évidence d'une sensibilisation sous la forme d'anticorps, de tests cutanés positifs, rendent difficile l'évaluation de leur importance clinique. Les mêmes problèmes concernent un certain nombre d'autres pathogènes commensaux communs, comme *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pneumococcus*. Tous ces germes contiennent une variété de différents antigènes capables de provoquer différents types de réactions allergiques. Il est donc essentiel, pour l'analyse des caractères allergéniques de *Candida albicans*, de préparer les différents constituants antigéniques, individuellement ou en groupes chimiques séparés. Ces derniers pourront être utilisés pour la caractérisation des antigènes et l'étude de leurs effets allergéniques. Enfin il est nécessaire d'établir une corrélation entre ces résultats et des situations cliniques bien définies.

La préparation, par SUMMERS et coll. en 1964, d'un polysaccharide purifié de paroi de *C. albicans*, un polymère de mannose, c'est-à-dire un mannane, nous a procuré un point de départ pour nos études. Nous avons comparé le mannane avec un filtrat de cultures des souches A et B de *Candida albicans*. Les filtrats de culture contiennent le mannane mais aussi les antigènes protéiniques. Ces antigènes réagissent différemment dans les tests sur gélose comme cela est démontré ici : les antigènes protéini-

ques donnant des arcs de précipitation d'un dessin précis alors que le mannane donne des arcs flous qui sont très sensibles à la concentration de l'antigène de mannane, puisqu'ils ne sont mis en évidence que par les faibles concentrations, et non par les fortes concentrations (PEPYS et coll., 1968). Par conséquent, lorsque l'on effectue les préparations habituelles la réaction de précipitation avec le mannane peut être négative si la concentration est trop élevée : par exemple avec 1 mg/ml ou plus.

Nous avons fait les constatations suivantes :

1) Les précipitines avec le mannane ont été trouvées, chez 19 à 23 p. cent des sujets bien portants ou des sujets ayant des affections pulmonaires autres que l'asthme. Chez les patients ayant un asthme non compliqué, 55 p. cent ont eu des réactions positives alors que ceux atteints d'asthme avec éosinophilie pulmonaire en avaient 72 p. cent. Le dernier groupe, souffrant d'aspergillose broncho-pulmonaire est d'un intérêt particulier, il sera discuté plus tard.

2) Une plus grande incidence de réactions à précipitines était obtenue avec le mannane de la souche A, qui est cultivée plus fréquemment chez l'homme, qu'avec la souche B.

3) Les tests cutanés avec le mannane ont provoqué des réactions de type I et de type III. La majorité des sujets bien portants qui ont eu des réactions cutanées négatives lorsqu'ils ont été testés la première fois, ainsi que des réactions à précipitines né-

(*) Exposé présenté à la Deuxième Journée d'Immuno-allergologie microbienne de l'Hôpital de l'Institut Pasteur, Paris, mars 1976.

(**) Department of clinical Immunology, Cardiothoracic Institute, Brompton Hospital, LONDON SW3 (Grande-Bretagne).

gatives, ont eu des réactions de type I et III positives ainsi que des tests à précipitines positifs lorsque les tests ont été répétés 1 à 4 semaines plus tard. Ceci illustre l'allergénicité puissante de l'antigène de mannane. Le filtrat de culture, mais non le mannane, a aussi provoqué des réactions de type IV retardées en tests cutanés.

4) Les tests d'inhalation avec le mannane et les filtrats de culture ont provoqué des réactions immédiates et non immédiates, ces dernières étant accompagnées de fièvre et de leucocytose. Ces résultats montrent qu'en plus de la réaction classique de type IV à *Candida albicans*, l'allergie de type I et de type III pouvait aussi être mise en évidence à la fois dans la peau et dans les bronches. Il y a là deux problèmes :

— le filtrat de culture est un mélange de polysaccharides et d'antigènes protéiniques ;

— les réponses bronchiques montrent que les antigènes sont capables de provoquer des réactions, mais cela ne prouve pas qu'il y a une relation causale entre ces antigènes et les manifestations cliniques.

L'étape suivante de nos recherches fut d'essayer de préparer des antigènes protéiniques sans polysaccharides pour les comparer avec le mannane. Tous les extraits commerciaux de *Candida albicans* contiennent à ma connaissance à la fois des antigènes polysaccharidiques et protéiniques. Nous avons pu préparer des antigènes à partir des protéines cytoplasmiques sans mannane en faisant passer la préparation de cellules éclatées à travers une colonne de sépharose-concanavaleine A. La concanavaleine A a une telle affinité pour le mannane, qu'après passage sur colonne, l'éluat n'en contient plus (LONGBOTTOM et coll., 1976).

La comparaison des antigènes de mannane et de protéines cytoplasmiques a montré que dans les transferts cutanés passifs chez le singe, des réactions de type immédiat à la protéine étaient médiées par des sérums humains contenant des anticorps thermolabiles, sensibilisants pour la peau, du type *long term*, vraisemblablement des IgE ; alors que les réactions immédiates obtenues avec le mannane étaient médiées par des anticorps thermostables du type *short term*, sensibilisants pour la peau, probablement des IgG.

RAST POUR IgE SPÉCIFIQUES AUX ANTIGÈNES ET CELLULES DE *C. ALBICANS*

Nos plus récentes recherches ont été principalement basées sur le RAST pour rechercher les IgE spécifiques contre les préparations suivantes :

- Les protéines cytoplasmiques purifiées, sans mannane. Cet antigène était couplé avec des disques de papier suivant la méthode de bromure de cyano-gène.

- Des suspensions cellulaires lavées de *Candida*

TABLEAU I
RAST : TESTS POSITIFS AUX ANTIGÈNES
DE *C. ALBICANS*

	PROTÉINES CYTOPLASMIQUES SANS MANNANES	SUSPENSION DE CELLULES LAVÉES	SUSPENSION DE MANNANE INSOLUBILISÉE	FILTRAT DE CULTURE	ASPERGILLUS FUMIGATUS
Contrôles (14) : Sang du cordon (9) Banque de sang (5) Maladie de Kimura (11)	1 371	5 496	1 696	6 739	1 883
Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (10)	8	10	9	9	2
Aspergillome (9)	9	10	2	7	10
Atopiques (7) : prick-tests + aux protéines cytoplasmique	4	5	4	0	6
	4	5	2	2	2

Les chiffres donnés sont ceux de la moyenne + 2 déviations standard.

albicans, souche A, provenant d'une culture agitée pendant 48 heures dans le milieu de Sabouraud à 37°. Les cellules étaient récoltées, centrifugées, après avoir été tuées par la chaleur. Elles étaient lavées plusieurs fois dans du soluté chloruré phosphaté et étaient incorporées, pour les tests, en suspension dans la sérum albumine bovine.

- Une préparation polymérisée, insoluble, de mannane, préparée par un traitement à l'épichlorohydrine, et aimablement fournie par SANDULA et KUNIAK (1974), a été homogénéisée. Les particules ont été desséchées et mises de côté pour un usage ultérieur. Les préparations pour tests ont été faites sous forme de suspension dans du soluté de ClNa phosphate, + 20 p. cent de sérum de cheval ; de l'azoture de sodium a été ajoutée comme conservatif. Lors de la reconstitution de la suspension, les particules gonflent.

- Le filtrat de culture a été couplé aux disques de papier pour les tests *in vitro*.

- Un extrait d'*Aspergillus fumigatus* a aussi été couplé aux disques de papier.

Les préparations d'antigènes ont été testées par immersion dans 50 microlitres de sérum pendant 24 heures, puis lavées plusieurs fois, ensuite mises en contact avec un sérum anti-IgE marqué à l'I¹²⁵. Après plusieurs lavages, la consommation de la radioactivité a été mesurée. Les groupes de sérums testés étaient les suivants (tableau I) :

— Contrôles : ils consistaient en sérums de nouveau-nés (cordon) et en sérums de donneurs de sang en bonne santé. Ils ont donné des résultats sembla-

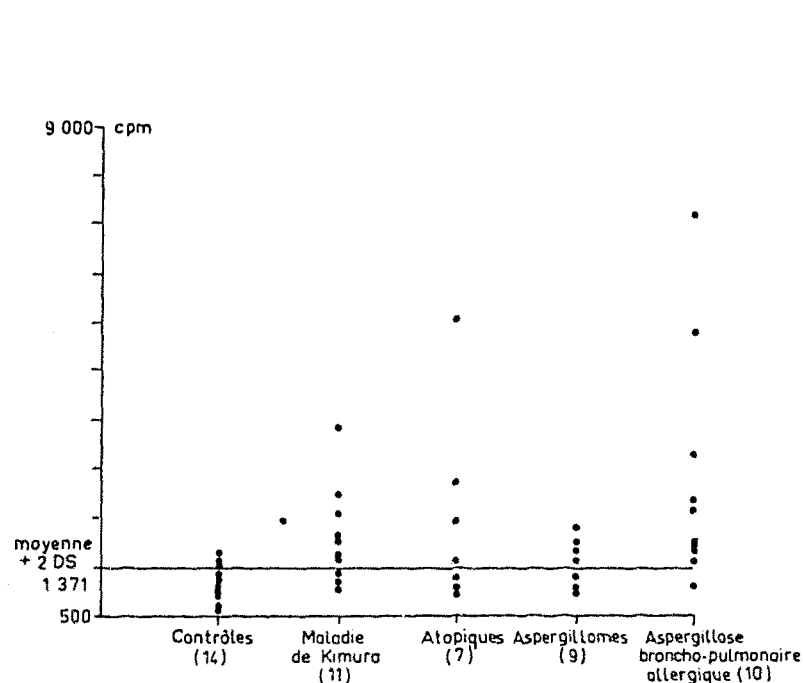


FIG. 1. — Protéine cytoplasmique purifiée.
DS : déviations standard.

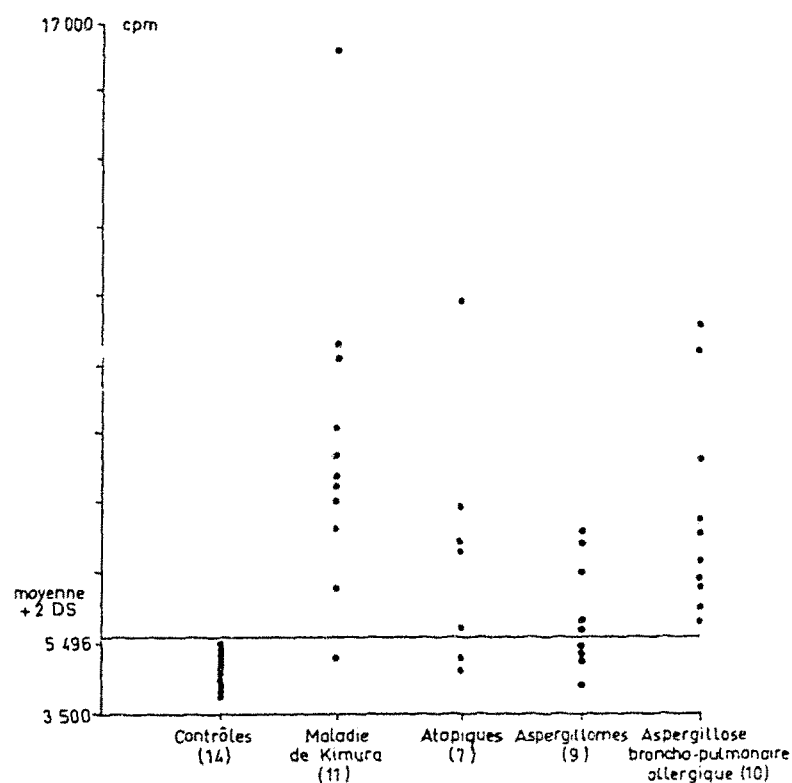


FIG. 2. — Cellules lavées de *C. albicans*.

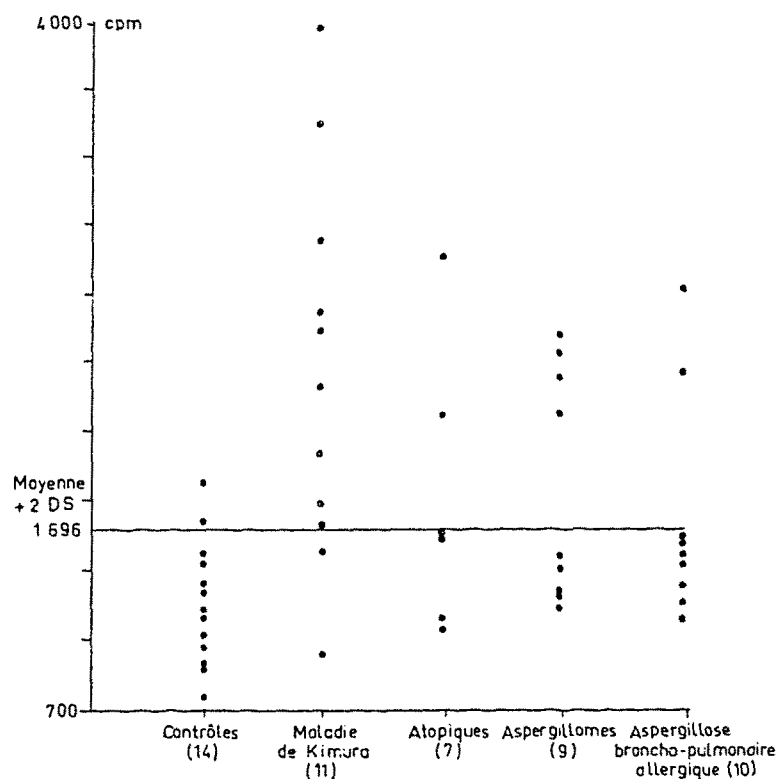


FIG. 3. — Mannane insolubilisé.

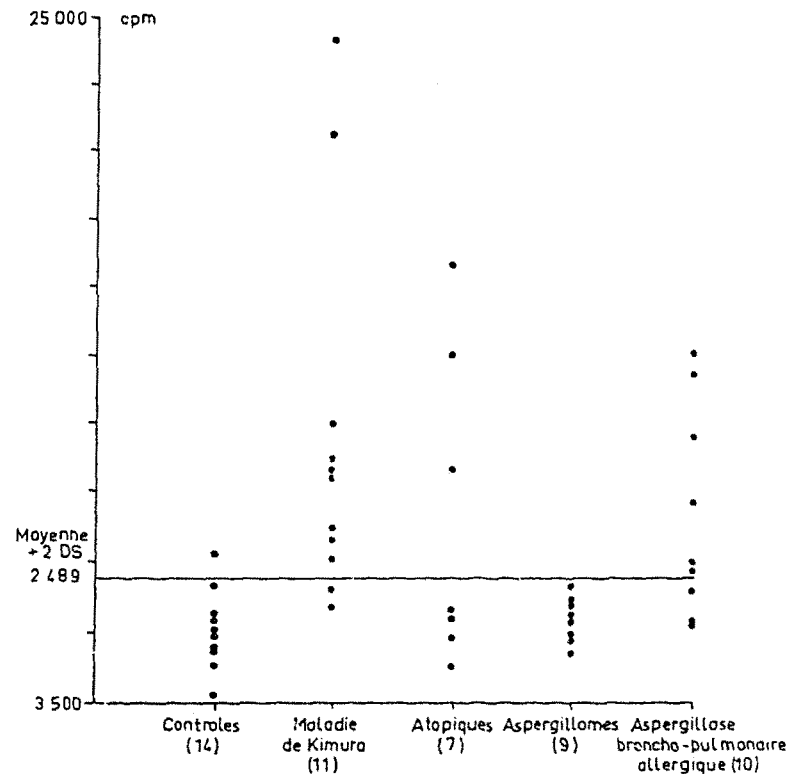


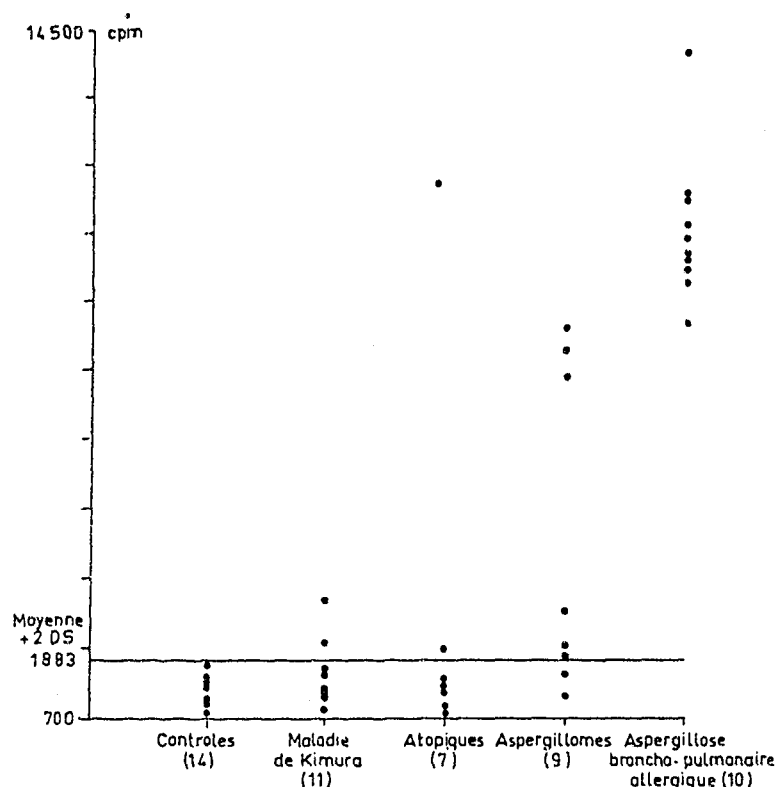
FIG. 4. — Filtrat de culture de *C. albicans*.

bles et ont été regroupés. Leurs valeurs en RAST avec chaque préparation étaient prises comme référence et les tests étaient considérés comme positifs lorsque les valeurs trouvées étaient plus grandes que la moyenne de contrôles + 2 déviations standard.

— Un groupe de sérums de patients ayant un granulome des parties molles attribué à *Candida albi-*

cans (appelé maladie de Kimura) : ils nous ont été fournis par TAKENAKA et coll. (1976). Ces auteurs avaient obtenu des RAST positifs avec les sérums contre des préparations commerciales de *Candida albicans*.

— Un groupe de patient souffrant d'aspergillose allergique broncho-pulmonaire.

FIG. 5. — *Aspergillus fumigatus*.

— Un groupe atteint de mycétomes aspergillaires des poumons.

— Un groupe de sujets atopiques qui avaient des réactions positives aux prick tests effectués avec les protéines cytoplasmiques.

RÉSULTATS

Les résultats du RAST étaient les suivants :

1) Les réactions positives aux protéines cytoplasmiques étaient obtenues chez la plupart des malades du groupe de Kimura et des sujets atteints d'aspergillome allergique (fig. 1).

2) La suspension de cellules lavées donnait de hautes valeurs de contrôle. Des réactions positives étaient obtenues chez presque tous les sujets du groupe Kimura et tout le groupe de l'aspergillome allergique, avec un nombre appréciable de réactions positives dans les cas d'aspergillome et dans le groupe atopique (fig. 2).

3) La suspension insolubilisée de mannane a donné des résultats positifs chez presque tous les malades de groupe Kimura, mais seulement chez deux malades du groupe de l'aspergillome allergique, montrant ainsi plus d'anticorps IgE anti-mannane dans le groupe Kimura (fig. 3).

4) Les filtrats de culture donnèrent des réactions positives en nombre comparable dans : le groupe

TABLEAU II

	RAST avec sérum de lapin (IgG) anti-IgE avec une suspension de mannane	PROTÉINE CYTOPLASMIQUE	SUSPENSION DE MANNANE INSOLUBILISÉE
Maladie de Kimura	86 p. cent	— 33 p. cent	— 87 p. cent
Aspergillome broncho-pulmonaire allergique		— 16 p. cent	— 14 p. cent
Aspergillome		— 80 p. cent	— 28 p. cent
Atopiques		— 64 p. cent	— 28 p. cent

Kimura, le groupe des aspergillomes allergiques avec peu de résultats positifs dans les autres groupes (fig. 4).

5) Dans les tests effectués avec *A. fumigatus*, toutes les aspergillomes allergiques et les deux tiers du groupe des aspergillomes furent positifs, avec les plus hautes valeurs dans le groupe de l'aspergillome allergique. Peu de réactions positives furent obtenues avec le groupe Kimura et les autres groupes (fig. 5).

Ces résultats montrent que, tandis que le nombre de réactions positives dans le groupe Kimura et dans le groupe de l'aspergillome allergique était comparable, à la fois pour la protéine cytoplasmique et pour la suspension cellulaire, le groupe Kimura montrait beaucoup plus de réactions positives au mannane. La spécificité des réactions est bien démontrée par le faible nombre de réactions positives à *A. fumigatus* dans le groupe Kimura. Ces constatations suggèrent que les patients atteints d'aspergillome pulmonaire ont des anticorps IgE contre les antigènes de *C. albicans* autant que contre les antigènes d'*A. fumigatus*, et que cela va de pair avec une haute incidence de précipitines contre le mannane du *C. albicans* dans cette maladie.

L'absorption des sérums à tester est en voie de réalisation, elle permettra d'en contrôler les effets sur les résultats du RAST (tableau II). L'absorption avec un sérum anti-IgE a produit une diminution globale de 86 p. cent, montrant ainsi que les résultats du RAST étaient spécifiques des IgE.

L'absorption avec la protéine cytoplasmique couplée aux disques de papier et la répétition des tests sériques avec la protéine cytoplasmique a causé une réduction maximale du RAST dans le groupe des aspergillomes et le groupe atopique. Le groupe Kimura a montré une réduction plus grande que le groupe de l'aspergillome allergique.

L'absorption puis la répétition du test avec la suspension insolubilisée de mannane a donné comme résultat une bien plus grande diminution du RAST dans le groupe Kimura que dans aucun des autres groupes. Ces résultats montrent que dans le groupe

de Kimura les anticorps IgE sont plus spécifiquement dirigés contre les antigènes de *C. albicans* que dans les autres groupés. En termes généraux nos constatations se résument ainsi :

a) L'anticorps IgE spécifique peut être démontré contre les antigènes polysaccharidiques. C'est la première fois qu'une telle étude a été réalisée.

b) Des cellules entières de *C. albicans* peuvent être utilisées pour le RAST. Nous sommes en train d'essayer d'établir les contributions respectives des parois à ces résultats du mannane et des autres antigènes. La séparation des protéines des constituants du mannane du filtrat de culture est également nécessaire, de façon à ce qu'ils puissent être comparés avec les protéines cytoplasmiques. Cela aussi est en voie de réalisation. Les corrélations cliniques de ces différentes constatations avec la maladie devront au moins prendre en considération les facteurs suivants :

— des réactions allergiques de type I, médiées par les IgE ou IgG, s'observent avec l'antigène de mannane ;

— des réactions allergiques de type I peuvent être médiées par l'anticorps IgE dirigé contre l'antigène protéinique ;

— des réactions allergiques de type III peuvent être médiées par l'antigène de mannane et peut-être, quoique cela ne soit pas certain, par l'antigène protéinique ;

— des réactions de type IV sont médiées par l'antigène protéinique.

CONCLUSION

A la lumière de ces constatations il est évident que la préparation, l'utilisation, et la vérification des antigènes de *C. albicans*, doivent être effectuées avec soin et que les résultats trouvés dans le passé doivent être réexaminés et à nouveau vérifiés. Il est vraisemblable que notre compréhension de l'allergie à ce champignon deviendra meilleure et donnera comme résultat une appréciation plus précise des manifestations cliniques.

REFERENCES

- LONGBOTTOM J. L., BRIGHTON W. D., EDGE G., PEPYS J. — Antibodies mediating Type I skin test reactions to polysaccharide and protein antigens of *Candida albicans*. *Clin. Allergy*, 1976, 6, 41.
- PEPYS J., FAUX J. A., LONGBOTTOM J. L., MCCARTHY D. S., HARGREAVE F. E. — *Candida albicans* precipitins in respiratory disease in man. *J. Allergy*, 1968, 41, 305.
- SANDULA J., KUNIAK L. — Affinity chromatography of yeast antibodies on modified mannan. *J. Chromatogr.*, 1974, 91, 293.
- SUMMERS D. F., GROLLMAN A. P., HASENCLEVER H. F. — Polysaccharide antigens of *Candida* cell wall. *J. Immunol.*, 1964, 92, 491.
- TAKENAKA T., OKUDA J., USAMI A., KAWABORI S., OGAMI Y., KUBO K., UDA H. — Histological and immunological studies on eosinophilic granuloma of soft tissue, so-called Kimura's disease. *Clin. Allergy*, 1976, 6, 27.