

LE TEST DE DÉGRANULATION DES BASOPHILES HUMAINS DANS QUELQUES ALLERGIES NON POLLINIQUES

J. DRY, F. LEYNADIER, H. LUCE et N. ABUAF (*)

RÉSUMÉ

Un test de dégranulation des basophiles humains, pratiqué sur une suspension cellulaire enrichie, a été appliqué à 28 patients, dont 14 allergiques à *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.pt) et 14 témoins. Chez les 14 témoins, aucune dégranulation significative n'a été observée avec les diverses dilutions de D.pt utilisées (index toujours inférieur à 20 p. cent). Chez 13 allergiques sur 14, l'index a été supérieur à 40 p. cent ($p < 0,001$) pour au moins une de ces dilutions ; chez un allergique à test cutané faiblement positif à D.pt, l'index n'atteint que 35 p. cent ($p < 0,001$) pour une dilution. Le test de dégranulation des basophiles humains a permis de montrer, chez 7 autres allergiques, la perte du pouvoir allergique du D.pt lyophilisé après dilution et conservation à 4°. A l'occasion de deux allergies à la farine et d'une allergie à l'amande, les auteurs montrent la souplesse de la technique qui paraît aussi fiable que le RAST ou le dosage de l'histamine.

SUMMARY

The human basophil degranulation test in some non-pollenic allergies. — A human basophil degranulation test performed on an enriched cell suspension, was applied in 28 patients, 14 of whom were allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* (D. pt.), and 14 of whom were control subjects. In the 14 control subjects, no significant degranulation was observed with the various dilutions of D. pt. used (index always lower than 20 per cent). In 13 allergy patients out of 14, the index was higher than 40 per cent ($p < 0.001$) for at least one of these dilutions. In one allergy patient with a skin test not strongly positive to D. pt., the index reached only 35 per cent ($p < 0.001$) for one dilution. The human basophil degranulation test made it possible to demonstrate, in 7 other allergy patients, the loss in allergy-inducing power of lyophilised D. pt. after dilution and conservation at 4°. In the case of two allergies to flour and one allergy to almonds, the authors show the flexibility of the technique, that seems as reliable as the RAST or the histamine dose test.

L'étude des polynucléaires basophiles (PB) humains à des fins diagnostiques représente une voie d'abord particulièrement intéressante pour l'allergologue. Entreprise dès 1962 par SHELLEY [11, 12, 13, 14], elle fut abandonnée au profit de celle des PB de lapin. Dès cette époque, cependant, il avait été établi que le conflit allergénique provoquait, tant in vivo qu'in vitro, l'apparente disparition des PB qui ne sont, en pratique, reconnaissables des autres cellules blanches que par leurs granulations métachromatiques [8].

Plus récemment, PRUZANSKY et PATTERSON [10], mais surtout HIRSCH et ZASTROW [5], puis SOIFER et HIRSCH [17] ont rapporté des résultats très probants en utilisant un test de dégranulation des basophiles humains (TDBH), après enrichissement, chez des allergiques. Leur travail s'appuyait sur la comparaison avec le résultat des tests cutanés, qui demeurent, sans conteste, le critère le plus objectif auquel

doit être confrontée toute nouvelle technique biologique [20].

Nous mêmes avons rapporté une technique basée sur le principe de ces auteurs [6]. Elle comporte l'enrichissement des PB, dont la concentration atteint 10 à 20 fois celle du sang circulant, la réalisation du conflit allergénique sur lame puis la fixation et la coloration. Il a ainsi été possible d'étudier les allergies médicamenteuses [1], la maladie sérique après sérothérapie antitétanique [2] et la pollinose [3, 4, 7]. Nous avons montré l'excellente concordance entre résultats du TDBH et tests cutanés par l'étude de 33 polliniques et de 39 témoins. En outre, nous avons mis en évidence une corrélation significative entre le diamètre de l'érythème du test cutané (mesuré en mm) et le résultat du TDBH [4].

L'objet du présent travail est de rapporter les résultats obtenus avec d'autres allergènes.

Travail présenté à la Réunion de la Société Française d'Allergologie, La Bourboule, 22-24 septembre 1978.

(*) Centre d'Allergie, Service de Médecine interne (Pr J. DRY), Hôpital Rothschild, 33, boulevard de Picpus, 75571 PARIS CEDEX 12 (France).

DRY J., LEYNADIER F., LUCE H., ABUAF N. — Le test de dégranulation des basophiles humains dans quelques allergies non polliniques. *Rev. franç. Allergol.*, 1978, 18 (n° 4-5), 185-190.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

RÉALISATION DU TDBH

L'isolement des PB, le conflit avec l'allergène, la fixation, la coloration et le principe de la lecture ont déjà été rapportés [6]. L'amélioration du séchage des lames, qui doit s'effectuer en moins de cinq minutes, et une fixation supplémentaire par le méthanol durant douze heures représentent deux modifications techniques mineures ajoutées depuis.

ALLERGÈNES UTILISÉS

Dermatophagoides pteronyssinus (D. pt)

Deux extraits allergéniques de l'Institut Pasteur ont été utilisés :

— l'extrait commercial, employé pour les tests cutanés, en solution au 1/1 000, et dilué extemporanément au 1/10 000 (10^{-4}), 1/100 000 (10^{-5}) et 1/1 000 000 (10^{-6}) dans du tampon Hépes-ACM [6] ;

— l'extrait lyophilisé, d'abord dilué à 1 mg/ml et conservé à 4°. Il est dilué ensuite le jour du TDBH à 100, 10, 1 et 0,1 µg/ml dans du tampon Hépes-ACM (ou conservé à ces concentrations à - 80°).

En outre, pour vérifier la stabilité de l'allergène en solution, des dilutions à 100, 10, 1 et 0,1 µg/ml ont été conservées à 4° durant quelques jours avant l'emploi.

Allergènes alimentaires ou professionnels

Leur préparation s'effectue extemporanément à partir de l'aliment (farine, amande) ou de la substance suspecte amenée par le malade ; la « solution mère » (10^{-1}) comporte un volume de l'aliment ou de la substance pour neuf volumes de sérum physiologique. Des dilutions successives (10^{-2} , 10^{-4} , etc.) sont pratiquées ensuite dans l'Hépes-ACM.

Autres allergènes

Les extraits allergéniques commerciaux (Institut Pasteur) de poussière de maison, poils de chat ou de chien, de pollen d'arbres au 1/1 000 sont dilués extemporanément dans l'Hépes-ACM.

INTERPRÉTATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS

Pour chaque dilution d'allergène, l'index de dégranulation exprime le rapport suivant :

$$\frac{BT - B. ag}{BT} \times 100$$

où BT représente le nombre de basophiles comptés en l'absence d'allergène et B. ag en sa présence.

TABLEAU I
INDEX DE DÉGRANULATION OBTENUS
AVEC UNE SOLUTION FRAICHE DE D. pt LYOPHILISÉ
CHEZ 9 ALLERGIQUES (1 A 9)
ET 9 TÉMOINS NON ALLERGIQUES A D. pt (10 A 18)

	DILUTION DE <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>				*
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	
ALLER- GIQUES					
1	43	20	43	NF	
2	NF	89	74	39	
3	0	0	35	NF	
4	57	63	79	78	
5	36	68	86	NF	
6	78	73	85	NF	
7	59	43	49	NF	
8	11	65	23	NF	
9	67	75	52	NF	
TÉMOINS					
10	NF	0	0	0	
11	NF	0	0	14	
12	0	0	19	NF	
13	13	0	15	0	
14	0	0	0	12	
15	0	0	0	NF	
16	0	0	0	NF	
17	0	0	0	NF	
18	NF	0	NF	NF	

* non fait.

L'analyse statistique du résultat tient compte à la fois du caractère de la distribution (loi de Poisson) et du nombre de basophiles réellement comptés.

TESTS CUTANÉS

Ils sont pratiqués par voie intradermique à l'aide des extraits de l'Institut Pasteur au 1/10 000.

RÉSULTATS

SOLUTION FRAICHE DE D. pt LYOPHILISÉ

Le TDBH a été appliqué à 18 sujets souffrant, pour la plupart, d'asthme et/ou de rhinite : 9 sujets ont un test cutané positif à D. pt au 1/10 000 (diamètre moyen de l'érythème : $35,5 \pm 30$ mm) et 9 sujets ont un test cutané négatif. Les résultats figurent tableau I et figure 1.

SOLUTION CONSERVÉE A 4° DE D. pt LYOPHILISÉ

Le TDBH a été pratiqué avec la solution diluée de D. pt lyophilisé conservée de quelques jours à quatre semaines, chez sept allergiques (diamètre moyen de l'érythème au D. pt 1/10 000 : $27 \pm 7,6$ mm), choisis au hasard et différents des précédents. Les

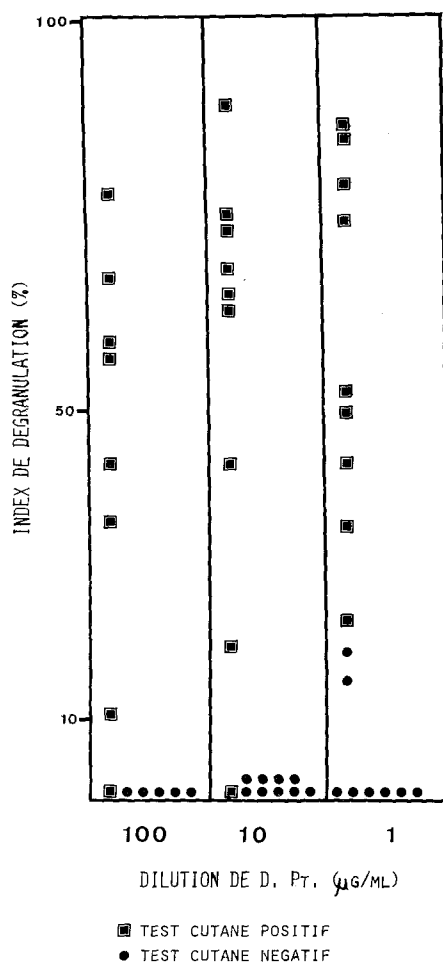


FIG. 1. — Index de dégranulation obtenus pour trois dilutions fraîches de D. pt. lyophilisé chez 18 sujets (9 allergiques et 9 témoins).

index de dégranulation obtenus ne sont pas significatifs dans la plupart des cas (tableau II). Les moyennes obtenues pour chacune des dilutions (100, 10 et 1 $\mu\text{g/ml}$) sont totalement différentes de celles obtenues avec des dilutions fraîches de D. pt lyophilisé (tableau III).

EXTRAIT COMMERCIAL DE D. pt

Cet extrait, employé pour la pratique habituelle des tests cutanés, a été testé chez dix autres sujets dont cinq ont un test cutané positif et cinq un test cutané négatif. Les résultats obtenus figurent dans le tableau IV.

ASTHME DU BOULANGER

Deux sujets (un boulanger et un pâtissier), ayant des crises d'asthme au cours de leur activité profes-

TABLEAU II
INDEX DE DÉGRANULATION
AVEC UNE SOLUTION CONSERVÉE À 4°
DE D. pt LYOPHILISÉ
CHEZ 7 ALLERGIQUES À D. pt

OBS.	DILUTION DE <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>			
	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$
1	10	0	0	NF
2	35*	33*	21	NF
3	NF	16	0	0
4	NF	8	0	NF
5	0	0	0	25
6	18	23	11	NF
7	13	14	0	0

* $p < 0,01$.

TABLEAU III
INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT
DE LA SOLUTION ALLERGÉNIQUE (D. pt) :
MOYENNE DES INDEX DE DÉGRANULATION
SUR DEUX GROUPES DE MALADES COMPARABLES (ALLERGIQUES)

	DILUTION DE <i>D. pteronyssinus</i>		
	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Dilution fraîche (ou conservée à — 80°)	44 % (n = 8)	55 % (n = 9)	58 % (n = 9)
Dilution conservée à 4°	15 % (n = 5)	13,4 % (n = 7)	4,6 % (n = 7)

TABLEAU IV
INDEX DE DÉGRANULATION
OBTENUS AVEC L'EXTRAIT COMMERCIAL
DE D. pt (INSTITUT PASTEUR)
CHEZ 5 ALLERGIQUES (1 À 5) ET 5 TÉMOINS (6 À 10)

	DILUTION DE L'EXTRAIT		
	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}
ALLERGIQUES			
1	27	53	0
2	43	39	0
3	38	77	25
4	61	34	26
5	81	83	48
TÉMOINS			
6	10	0	18
7	20	0	5
8	7	0	26
9	0	0	0
10	30	NF	0

TABLEAU V
INDEX DE DÉGRANULATION OBTENUS CHEZ 2 SUJETS
ALLERGIQUES A LA FARINE ET 1 TÉMOIN

	NOMBRE DE BASOPHILES COMPTÉS ET INDEX DE DÉGRANULATION (%)			
	sans antigène	avec farine 10 ⁻²	avec farine 10 ⁻⁴	avec farine 10 ⁻⁶
Sujet 1 (allergique)	379	NF	48 (87 %)	21 (95 %)
Sujet 2 (allergique)	590	122 (79 %)	308 (48 %)	398 (33 %)
Sujet 3 (témoin)	323	NF	276 (15 %)	304 (6 %)

TABLEAU VI
INDEX DE DÉGRANULATION OBTENUS CHEZ 1 ALLERGIQUE A L'AMANDE ET 3 TÉMOINS

	NOMBRE DE BASOPHILES COMPTÉS ET INDEX DE DÉGRANULATION (%)			
	sans antigène	avec amande 10 ⁻⁴	avec amande 10 ⁻⁶	avec amande 10 ⁻⁸
Sujet 1 (allergique)	435	176 (59 %)	123 (72 %)	270 (38 %)
Sujet 2 (témoin)	268	NF	316 (0 %)	NF
Sujet 3 (témoin)	564	498 (12 %)	630 (0 %)	666 (0 %)
Sujet 4 (témoin)	403	378 (6 %)	339 (16 %)	345 (14 %)

sionnelle et un test cutané positif à la farine, et un témoin (asthmatique à test cutané négatif à la farine) ont subi un TDBH à la farine. Le détail des résultats, en particulier le nombre de basophiles réellement comptés, figure dans le tableau V.

L'index de dégranulation est significatif ($p < 0,001$) pour toutes les dilutions étudiées chez les deux malades et non significatif chez le témoin. Chez ces deux malades souffrant d'asthme à la farine, et chez un autre témoin, nous avons aussi pratiqué un TDBH à l'aide d'une « poudre améliorante » (Loc-kerine) accusée par l'un des malades de déclencher des crises. Le TDBH s'avéra positif de façon très significative chez les deux malades et négatif chez un témoin (dilutions de 10⁻⁴ et 10⁻⁶). Nous devons apprendre, ultérieurement, que cette poudre était composée de farine de blé maltée (mais aussi de léci-thine de soja et d'acide ascorbique).

ALLERGIE A L'AMANDE

Un TDBH à l'amande (dilutions de 10⁻⁴ à 10⁻⁸) a été pratiqué chez un sujet ayant une histoire clinique typique d'allergie réaginique à l'amande et un test cutané positif. Trois sujets servent de témoins (histoire clinique et tests cutanés négatifs). Le détail des résultats figure dans le tableau VI.

Aucune dégranulation significative n'est observée chez les témoins. Elle est, par contre, significative, même à la dilution de 10⁻⁸, chez l'allergique.

AUTRES ALLERGÈNES

D'autres allergènes tels la poussière de maison, les phanères d'animaux, les pollens d'arbre, etc., ont été étudiés chez un nombre restreint de malades. La concordance des résultats du TDBH avec ceux des tests

cutané est bonne pour les pollens d'arbre et la poussière de maison. Elle est, par contre, très imparfaite pour les phanères d'animaux.

DISCUSSION

La perte progressive des granulations métachromatiques du PB lors du conflit allergénique est aujourd'hui bien établie [2 à 14, 17]. Elle peut être suivie grâce au blocage de la réaction par le glutaraldéhyde à différents temps. L'étude cinétique de ce phénomène, avec l'allergène pollinique, nous a révélé que la dégranulation atteignait son maximum entre 10 et 15 minutes à 37° [1, 3, 4, 7]. Avec cet allergène, la dilution optimale se situe aux alentours de 1×10^{-6} (extrait de pollen de graminées de l'Institut Pasteur) [1, 3, 4, 7], la dégranulation étant moins importante aux dilutions plus fortes ou plus faibles. Ce fait avait déjà été établi, notamment, par SIRAGANIAN [15, 16] grâce au dosage automatique de l'histamine.

Les résultats obtenus avec *Dermatophagoides pteronyssinus* lyophilisé et dilué extemporanément chez neuf allergiques révèlent que la dégranulation est maximale pour des concentrations de 1 à 10 µg/ml de l'allergène. Avec l'extrait commercial de ce même allergène (Institut Pasteur), le maximum de dégranulation se situe à la dilution de 1×10^{-5} chez les cinq allergiques étudiés. Quoiqu'il en soit, la discrimination entre allergiques à D. pt et témoins est à peu près parfaite chez les 28 sujets étudiés. L'index de dégranulation est toujours inférieur à 20 p. cent (et non significatif) chez les 14 témoins et toujours supérieur à 40 p. cent pour au moins une dilution chez 17 allergiques. L'index n'est que de 35 p. cent à la dilution de 1 µg/ml pour un seul allergique, mais le test cutané était faiblement positif (érythème à 10 mm).

Cependant, nous ne trouvons pas de corrélation significative entre le diamètre de l'érythème du test cutané au 1/10 000 et l'index de dégranulation (ou la moyenne des index pour chaque sujet) contrairement à ce que nous avons mis en évidence avec le pollen de graminées chez 33 polliniques [4].

Ceci tient sans doute au fait que la série d'allergiques au D. pt est trop faible (14 sujets) ou que l'allergène n'est pas aussi puissant et défini que le pollen de graminées.

Il est remarquable que l'extrait de pollen de graminées de l'Institut Pasteur (solution au 1/10 dans le glycéril à 50 p. cent, obtenue grâce à l'amabilité du D^r DAVID) garde une activité intacte après 18 mois

de conservation à 4°. Même après dilution à 10^{-8} , et conservation à 4° durant plusieurs jours, la puissance allergénique de cet extrait ne paraît pas affectée.

Il n'en est pas de même avec l'extrait lyophilisé de D. pt dont l'activité allergénique s'amenuise lorsqu'il est conservé, dilué, à 4°, comme nous l'avons établi chez sept allergiques.

Il nous semble donc que le TDBH est une technique utilisable pour la standardisation des allergènes, surtout si l'existence d'une corrélation significative entre diamètre de l'érythème du test cutané et index de dégranulation se confirme avec d'autres allergènes.

L'expression des résultats par un index de dégranulation allant de 0 à 100 p. cent permet une appréciation quantitative du phénomène. Il est cependant nécessaire de définir, pour chaque sujet et pour chaque dilution de l'allergène étudié, la signification statistique de l'index. En effet, il est impossible de déterminer la limite au-dessus de laquelle il y a une « dégranulation » sans faire référence au nombre de basophiles réellement comptés. Par exemple, compter trente basophiles en l'absence de l'allergène (témoin) et vingt basophiles en sa présence conduit à admettre une « dégranulation » de 33 p. cent. Or les lois statistiques ont depuis longtemps établi que, pour des « phénomènes rares », 30 ne différerait pas de 20 [18]. L'index de 33 p. cent n'a, en l'occurrence, aucune signification et peut résulter du seul hasard. Il n'en n'est plus de même si 300 basophiles ont été dénombrés sans allergène contre 200 en sa présence. La dégranulation de 33 p. cent devient alors très hautement significative ($p < 0,001$).

Les résultats obtenus chez deux allergiques à la farine et un allergique à l'amande ont l'intérêt de montrer que le TDBH peut être appliqué à l'étude de n'importe quelle substance soluble, même non disponible en extrait commercial. La nécessité d'un, ou mieux, de plusieurs témoins non allergiques est évidente pour ne pas méconnaître une éventuelle propriété histamino-libératrice non spécifique de la substance utilisée.

CONCLUSIONS

La technique proposée nous paraît simple, fiable et peu onéreuse. Elle met à la portée d'un grand nombre de laboratoires l'étude du basophile humain. L'allergologue voit, dans cette cellule, son principal ennemi, mais il est vraisemblable qu'elle joue un rôle physiologique encore à définir.

RÉFÉRENCES

1. DRY J., LÉYNADIER F., LUCE H. — Le test de dégranulation des basophiles humains dans le diagnostic des allergies médicamenteuses. *Ann. Méd. interne*, 1978, 129, 265-268.
2. DRY J., LÉYNADIER F., LUCE H., ABUAF N. — Dégranulation des basophiles humains et immuns complexes circulants au cours d'une maladie sérique. *Nouv. Presse méd.*, 1978, 7, 1483.
3. DRY J., LÉYNADIER F., LUCE H. — Le test de dégranulation des basophiles humains appliqué au diagnostic des allergies réagéniques. *Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, Athènes, 4-6 mai 1978.
4. DRY J., LÉYNADIER F., LUCE H. — Le test de dégranulation des basophiles humains : comparaison avec les tests cutanés aux pollens de graminées chez 72 sujets. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur* (à paraître).
5. HIRSCH S. R., ZASTROW J. E. — Basophil degranulation : a new method of observation and its correlation with skin testing. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1972, 50, 338-347.
6. LÉYNADIER F., LUCE H., DRY J. — Une technique simple d'isolement et de fixation des polynucléaires basophiles humains. *Rev. franç. Allergol.*, 1977, 17, 215-218.
7. LUCE H. — *Le test de dégranulation des basophiles humains dans les allergies réagéniques*. Thèse de Médecine, Paris, 1978.
8. PARWARSCH M. R. — *The human blood basophil*. New York, Springer, 1975.
9. POMMIER DE SANTI P., VERVLOET D., VELLIEUX P., PAYAN H., CHARPIN J. — Corrélations morphologiques de la réaction d'allergie immédiate. Histamino-libération et ultrastructure de la dégranulation anaphylactique des basophiles humains. *Rev. franç. Mal. resp.*, 1978, 6, 440-442.
10. PRUZANSKY J. J., PATTERSON R. — Decrease in basophils after incubation with specific antigens of leukocytes from allergic donors. *Int. Arch. Allergy*, 1970, 38, 522-526.
11. SHELLEY W. B. — New serological test for allergy in man. *Nature (Lond.)*, 1962, 195, 1181-1183.
12. SHELLEY W. B. — Functional cytology of the human basophil in allergic and physiologic reactions : technic and atlas. *Blood*, 1962, 19, 208-216.
13. SHELLEY W. B., PERNES H. M. — The absolute basophil count. Technic and significance. *J. Amer. med. Ass.*, 1965, 192, 368-370.
14. SHELLEY W. B. — The basophil leukocyte as an index of immediate hypersensitivity. *Trans. Stud. Coll. Physns. Philad.*, 1964, 32, 15-19.
15. SIRAGANIAN R. P., BRODSKY M. J. — Automated analysis for in vitro allergy testing. 1. A method utilising allergen induced histamine-release from whole blood. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1976, 57, 525-540.
16. SIRAGANIAN R. P. — Automated histamine analysis for in vitro allergy testing. 2. Correlation of skin test results with in vitro whole blood histamine release in 82 patients. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1977, 59, 214-222.
17. SOIFER M. M., HIRSCH S. R. — The direct degranulation test and the intracutaneous test : a comparison using food extracts. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1975, 56, 127-132.
18. *Tables scientifiques* (7^e éd.). Bâle, Ciba-Geigy, 1972.
19. VIJAY H. M., PERELMUTTER L., BERNSTEIN I. L. — Possible role of IgG₄ in discordant correlations between intracutaneous skin tests and RAST. *Int. Arch. Allergy*, 1978, 56, 517-522.