

50376  
1975  
73

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376  
1975  
73

THESE

présentée

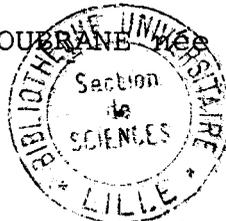
pour l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences Naturelles

mention Biologie

par

Claude SOUBRANE ~~et~~ CHAMANT



ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ALLERGIE MEDICAMENTEUSE

ET MISE EN EVIDENCE D'IGE SERIQUES SPECIFIQUES ANTI-MEDICAMENT

Membres du Jury :	Monsieur le Professeur J. MONTREUIL	Président
	Monsieur le Professeur A. CAPRON	Rapporteur
	Mademoiselle G. SPIK Maître de Conférences	Rapporteur
	Madame C. BURTON Maître de Recherche	Rapporteur
	Monsieur le Professeur C. LESPAGNOL	Examineur
	Monsieur le Professeur J. PAUPE	

Soutenue le 11 Février 1975

A Bernard,

A Bénilde et Alexandre, Flore et Damien,

A mes parents,

A mes beaux parents,

Meis et Amicis.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL  
Professeur de Chimie Biologique à l'Université  
des Sciences et Techniques de Lille.

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.  
Qu'il veuille trouver ici le témoignage de notre gratitude et de  
notre profond respect.

A Monsieur le Professeur A. CAPRON  
Professeur d'Immunologie et de Biologie  
Parasitaire à la Faculté de Médecine de Lille  
Chef de Service à l'Institut Pasteur de Lille

qui a bien voulu nous faire l'honneur d'accepter la direction  
scientifique de cette thèse.  
Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre très vive reconnais-  
sance pour son accueil bienveillant ainsi que pour les précieux  
conseils qu'il nous a prodigués.

A Mademoiselle G. SPIK  
Maitre de Conférence Agrégé  
de Chimie Biologique

qui a bien voulu accepter de faire partie du jury.  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur C. LESPAGNOL  
Professeur de Chimie de Synthèse  
des Médicaments

qui a bien voulu accepter d'être membre rapporteur du jury.  
En témoignage de notre gratitude pour l'intérêt qu'il a toujours  
porté à nos travaux et pour son bienveillant accueil.

A Madame C. BURTIN

Maitre de Recherche à l'INSERM

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et qui, depuis six années, nous a guidée avec patience et acharnement essayant de développer en nous l'esprit critique nécessaire à la Recherche.

Qu'elle soit assurée, avec notre vive reconnaissance, de notre respectueuse affection.

A Monsieur le Professeur J. PAUPE  
Professeur de Pathologie Expérimentale  
à la Faculté Necker Enfants Malades

qui nous a accueillie dans son équipe avec bienveillance et dont les conseils éclairés ont été précieux pour le présent travail.

Qu'il veuille trouver ici, avec nos remerciements, l'expression de notre profond attachement.

A toute l'équipe du Laboratoire de Pathologie Expérimentale  
du C.H.U. Necker-Enfants Malades

au sein de laquelle il fait si bon travailler

ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE L'ALLERGIE MEDICAMENTEUSE ET MISE  
EN EVIDENCE D'IgE SERIQUES SPECIFIQUES ANTI-MEDICAMENT.

## INTRODUCTION

Actuellement les accidents survenant après l'administration d'une substance médicamenteuse deviennent de plus en plus fréquents. Le problème de l'allergie médicamenteuse se pose même à l'échelle mondiale puisque l'Organisation Mondiale de la Santé y a consacré une étude particulière dans une récente réunion à Genève.

En effet les médicaments ou leurs métabolites peuvent devenir antigéniques, en dépit de leur faible poids moléculaire, par fixation sur une protéine. Différents types d'anticorps (immunoglobulines G, E ou M) sont donc induits et peuvent être responsables d'accidents lors de la réintroduction de l'antigène dans l'organisme. Il s'agit de l'hypersensibilité de type immédiat. Au contraire la réaction immunitaire peut être retardée, c'est-à-dire que l'accident apparaît 24 à 72 heures après la réintroduction de l'antigène. C'est l'hypersensibilité cellulaire de type retardé. Il est impossible de préjuger de la survenue de l'accident, de sa forme ni de sa gravité. De plus la partie antigénique (et de ce fait le déclenchement) peut être commune à toute une "famille de corps".

Actuellement il n'existe qu'un seul moyen de prévention : éliminer totalement de la thérapeutique du malade le médicament suspect ainsi que tous les médicaments de la même famille chimique. Ceci pose quelquefois d'énormes problèmes.

C'est pourquoi il nous a paru important d'une part de tenter de mettre en évidence les IgE sériques spécifiques anti-médicaments qui sont les anticorps dont le rôle pathogène est indiscutable et d'autre part d'étudier les réactions immunitaires générales anti-médicaments.

Les tests cutanés pratiqués chez l'homme constituent une technique in vivo permettant de mettre en évidence les IgE spécifiques mais pour les médicaments présentent un réel danger et, de ce fait, ne sont pas utilisés couramment. Parmi les techniques in vitro, l'anaphylaxie passive sur tissus de primates est une technique sensible. Nous avons donc mis au point une technique d'anaphylaxie passive in vitro sur poumon de singe. Notre objectif se résumait en quatre points essentiels : augmenter la sensibilité du test, assurer une bonne reproductibilité, diminuer le nombre de résultats faussement négatifs, ne pas créer de résultats faussement positifs. Cette technique ne met en évidence que les IgE circulantes.

Après une revue des connaissances actuelles sur les IgE, nos travaux personnels comprendront dans la première partie :

- la mise au point d'une technique permettant de mettre en évidence les IgE sériques spécifiques.
- les résultats portant sur l'étude de 500 sérums de malades.
- une discussion de la technique et de ces résultats.

La deuxième partie de ce travail sera consacrée :

- à l'étude approfondie de 38 cas d'allergie médicamenteuse à manifestations cutanées par plusieurs techniques immunologiques.
- à une discussion de cette étude.

Enfin une discussion générale sur les réactions croisées terminera ce travail.

## HISTORIQUE

## H I S T O R I Q U E

### I - L'Allergie médicamenteuse :

Un groupe scientifique de l'Organisation Mondiale de la Santé spécialisé en immunologie clinique s'est réuni à Genève en octobre 1971 et a écrit le paragraphe suivant sur la seule allergie médicamenteuse : "Drug Allergy : Allergic reactions to drugs are an important hazard in modern clinical medicine. It has been estimated that 10 p.100 of hospitalized patients suffer from one or another form of iatrogenic, drug-induced, untoward reaction..... Penicillin, sulphonamides, and salicylate derivatives appear to be drugs most frequently causing allergic symptoms".

Il n'en faut pas davantage pour insister sur le problème de l'allergie médicamenteuse devenue de plus en plus fréquente. Ceci peut être dû à l'extension de la pharmacopée et à la consommation accrue de "cocktails" médicamenteux.

Si les symptômes de l'allergie médicamenteuse peuvent revêtir plusieurs formes, il n'y a encore aucun moyen de la prévenir et nous verrons le danger qu'elle représente pour le patient.

Les médicaments incriminés le plus fréquemment sont par ordre décroissant : la pénicilline, les dérivés salicylés, les dérivés de la malonylurée, les sulfamides, la glafénine, et certains antibiotiques. Il ne s'agit pas là, bien sûr, d'une liste exhaustive.

A titre documentaire, nous indiquerons que différentes enquêtes ont tenté d'évaluer la fréquence de l'allergie à la pénicilline par exemple : selon de WECK, la fréquence des réactions à la pénicilline dans une population normale est située entre 1 et 2 p.100 ; d'après une enquête de WELCH portant sur 3 ans et s'adressant à 1637 médecins américains, ne précisant d'ailleurs pas le nombre de traitements, sont rapportés 1616 accidents dont 1608 peuvent être rattachés à l'allergie.

La fréquence de l'allergie à l'acide acétylsalicylique a été diversement appréciée. WALTON a retrouvé une allergie à l'aspirine 22 fois chez 830 entrants hospitaliers pris au hasard (2,3 p.100), GARDNER étudiant un groupe de 457 allergiques connus (dont 50 p.100 d'asthmatiques) trouve cinq sujets seulement allergiques à cette substance médicamenteuse, SALEN évalue cette fréquence à 8 p.100 chez les asthmatiques.

L'introduction en 1935 des sulfamides en thérapeutique a bouleversé le pronostic de nombreuses infections microbiennes mais très vite sont survenus des accidents de sensibilisation, notés dès 1937 par HAGEMAN et BLAKE.

## II - Manifestations cliniques :

La symptomatologie de l'allergie médicamenteuse est polymorphe. On peut, pour plus de commodité, classer ces accidents selon les 4 types de GELL et COOMBS.

a) Type I : réactions immédiates de type anaphylactique (ou allergie humorale)

les accidents rencontrés sont :

- le choc anaphylactique
- l'urticaire généralisée
- l'œdème de Quincke
- des manifestations asthmatiformes.

b) Type II : réactions cytotoxiques.

Elles semblent liées à l'action conjuguée d'anticorps circulants et du complément et réalisent souvent des syndromes hématologiques.

c) Type III : réactions semi tardives liées à l'action nocive du complexe antigène-anticorps ou réactions du type de la "maladie sérique du 9<sup>e</sup> jour".

Ces accidents surviennent du 5<sup>e</sup> au 9<sup>e</sup> jour environ après le début du traitement. L'administration antérieure du médicament peut manquer et la sensibilisation est alors induite par le début du traitement. Les manifestations rencontrées sont très polymorphes allant de l'urticaire aux toxidermies bulleuses gravissimes.

d) Type IV : réactions d'hypersensibilité retardée : Il s'agit d'une allergie purement cellulaire qui réalise des dermites de type "eczéma de contact".

Quel que soit le type de manifestations allergiques rencontrées, nous insistons sur le fait que le médicament entier peut être responsable des accidents, mais également les métabolites de ce médicament. Nous consacrerons un chapitre à l'étude des médicaments, de leurs métabolites et des réactions croisées entre diverses "familles" médicamenteuses.

Si les types cliniques des accidents sont bien connus il faut néanmoins souligner l'importance de l'interrogatoire du malade cherchant à faire préciser d'une part l'allure clinique de l'incident et ses circonstances exactes d'apparition, d'autre part, la notion de prises antérieures sensibilisantes. Ces dernières ne sont d'ailleurs pas toujours retrouvées, ce qui ne doit pas étonner, étant donné le nombre de médications contenant de la pénicilline, par exemple, même à doses très faibles mais qui sont peut-être plus sensibilisantes : collyres, pommades, gouttes nasales, suppositoires, vaccins. De plus en ce qui concerne la pénicilline, le contact peut être "occulte" : produits laitiers, volailles, infections mycosiques.

Le déclenchement des accidents médicamenteux n'est pas le même pour tous les médicaments : ainsi pour la pénicilline, la voie injectable est, de loin, celle qui entraîne le plus grand nombre d'accidents mais il existe cependant des observations de choc anaphylactique après la mise en place d'un

seul suppositoire à la pénicilline. Par contre la voie orale semblerait moins déclencher de conflit antigène-anticorps puisqu'on connaît des cas de malades ayant eu des accidents graves après l'administration de pénicilline mais pour lesquels ce médicament demeure indispensable et est toléré par voie orale.

### III - Evolution des connaissances :

En 1921, PRAUSNITZ eut l'idée d'injecter par voie sous-cutanée chez un homme normal une petite quantité de sérum de son collaborateur KÜSTNER qui était très fortement sensibilisé au poisson. Le lendemain il injecte exactement au même endroit de l'extrait de poisson : une réaction locale faite d'un placard ortié entouré d'une zone érythémateuse avec douleur et chaleur se produisit. Ce fait démontrait que, sur la peau de l'homme normal, s'était fixée une "substance" transmissible et qui entraînait, lors de l'introduction de l'antigène, la libération de médiateurs chimiques. En effet la réaction locale observée avait toutes les caractéristiques de celle obtenue après une injection sous-cutanée d'histamine.

Il s'agissait donc d'une anaphylaxie cutanée passive homme-homme et cette réaction devenue moyen de détection de cette "substance" fut dénommée depuis test de PRAUSNITZ-KÜSTNER : P.K.

COCA et GROVE en 1925 appelèrent cette substance "réagine", terme qui subsistera pendant 40 ans.

Des essais de mise en évidence des "réagines" humaines furent faits en essayant de les transmettre à différentes espèces animales de laboratoire (KABAT, 1961) : mais ce furent des échecs.

En dehors de la technique de P.K., on pouvait déceler l'activité "réaginique" par une méthode d'anaphylaxie active c'est-à-dire en injectant directement l'antigène par scarification : c'est la méthode des tests cutanés pratiquée encore couramment.

Vers les années 1963-1966 LAYTON et coll. essayèrent de transmettre passivement les "réagines" de malades sensibilisés à l'ambroisie à des singes. Ce fut un succès : c'était donc une sorte de P.K. homme-singe. La technique sera décrite plus loin.

Mais les années passant, on ignorait toujours ce que recouvrait le mot "réagines" et à quelle catégorie de corps elles pouvaient appartenir.

Cependant les progrès dans la connaissance des immunoglobulines et le développement des techniques immunologiques ont permis de penser que les "réagines" s'apparentaient aux immunoglobulines. En 1962, HEREMANS et VAERMAN ont rapporté qu'une fraction globulinique  $\gamma$  A de sérum de malades atopiques contenait des anticorps réaginique et ont suggéré la possibilité que les réagines appartiennent aux immunoglobulines A. Mais cette hypothèse fut infirmée par différents travaux (ISHIZAKA, 1966) : ainsi des immunoglobulines A dirigées contre une substance du groupe sanguin ne sensibilisaient pas la peau humaine, réaction mise en évidence par un test de P.K.

Ceci prouvait donc que l'activité "réaginique" devait être reliée à une autre classe d'immunoglobulines plasmatiques. Et c'est en 1966 que ISHIZAKA et coll. identifient les immunoglobulines E.

#### Les immunoglobulines E ou IgE :

Elles constitueront l'essentiel de notre étude car, si leur rôle physiologique est encore inconnu, leur rôle pathologique est indiscutable. Leur identification est donc récente et s'est faite grâce aux travaux d'ISHIZAKA et coll. En effet ces auteurs (1966) immunisèrent des lapins avec un sérum de malade

très sensibilisé à l'ambroisie. L'immun-sérum étant absorbé avec les IgG, les IgA, les IgD et les IgM, ils constatèrent, par immunoélectrophorèse, que le surnageant donnait une bande de précipitation  $\gamma_1$  avec une fraction du sérum sensibilisé à l'ambroisie. Par radioimmunoélectrophorèse, avec de l'ambroisie marquée ils montrèrent que la  $\gamma_1$  globuline avait une activité d'anticorps.

En même temps, ces mêmes auteurs ont fait agir, sur un sérum de malade sensibilisé à l'ambroisie, des anti-IgG, anti-IgA, anti-IgD et anti-IgM. La fraction sérique restante donnait toujours une réaction de PRAUSNITZ-KÜSTNER sur la peau d'un homme normal.

Donc les déterminants antigéniques spécifiques n'étant pas décelables dans les autres classes ou sous-classes d'immunoglobulines, cette protéine fut dénommée alors immunoglobulines E ou IgE.

Parallèlement JOHANSSON et BENNICH (1967) découvraient une protéine atypique chez un malade porteur d'un myélome. En échangeant leurs immun-sérums, ISHIZAKA et JOHANSSON (1968) purent conclure qu'il s'agissait de la même protéine.

De plus ISHIZAKA (1967) a montré qu'une fraction très purifiée d'IgE, issue de sérums de malades sensibilisés à l'ambroisie, entraînait une importante sensibilisation de la peau mise en évidence par la réaction de PRAUSNITZ-KÜSTNER. L'activité de cette fraction disparaissait par précipitation des IgE avec un sérum anti IgE. Ces expériences montraient que "l'activité réaginique" était due aux IgE et aux IgE seules.

L'activité "réaginique" associée à la présence d'immunoglobuline E a été démontrée non seulement chez des sujets sensibilisés à des pneumallergènes mais aussi à des médicaments et ceci par disparition de l'activité "réaginique" après action d'un sérum anti IgE (ISHIZAKA et coll. 1968). Parmi les médicaments incriminés, le plus fréquent, d'après LEVINE ( 1966 ) est la pénicilline.

## Structure et propriétés physico-chimiques des IgE.

Comme les autres immunoglobulines, les IgE sont composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Pour étudier la structure des IgE, BENNICH et JOHANSSON (1968) ont réduit la protéine avec du mercapto-éthanol. ; cette réduction clivant les ponts disulfures interchaînes est suivie d'une alkylation par de l'iodoacétamide et ainsi deux composants correspondants aux chaînes légères et aux chaînes lourdes ont été isolés. Figure 1.

### Structure des chaînes légères ou L

Elles sont communes à toutes les immunoglobulines et comportent deux variétés coexistant chez un même sujet : les chaînes kappa K et lambda  $\lambda$  . Le poids moléculaire des chaînes légères est d'environ 22 000.

Chaque chaînes légère est faite d'une séquence de 214 acides aminés. Elle se divise en deux parties presque égales :

- . un segment V variable de 108 acides aminés correspondant à la moitié amino-terminale.
- . un segment C constant de 106 ou 107 acides aminés.

La différence antigénique qui sépare les chaînes lambda et kappa porte en particulier sur la partie C terminale au voisinage du pont disulfure de jonction avec la chaîne lourde.

### Structure des chaînes lourdes ou H

Elles sont appelées  $\epsilon$  , sont polypeptidiques et plus longues que celles des immunoglobulines G. Leur poids moléculaire est d'environ 75 000 ce qui confère à la molécule d'IgE un poids moléculaire total d'environ 195 000. Le nombre des ponts disulfures intracaténaires est plus élevé pour les IgE que pour les autres immunoglobulines puisqu'il est de sept au lieu de quatre.

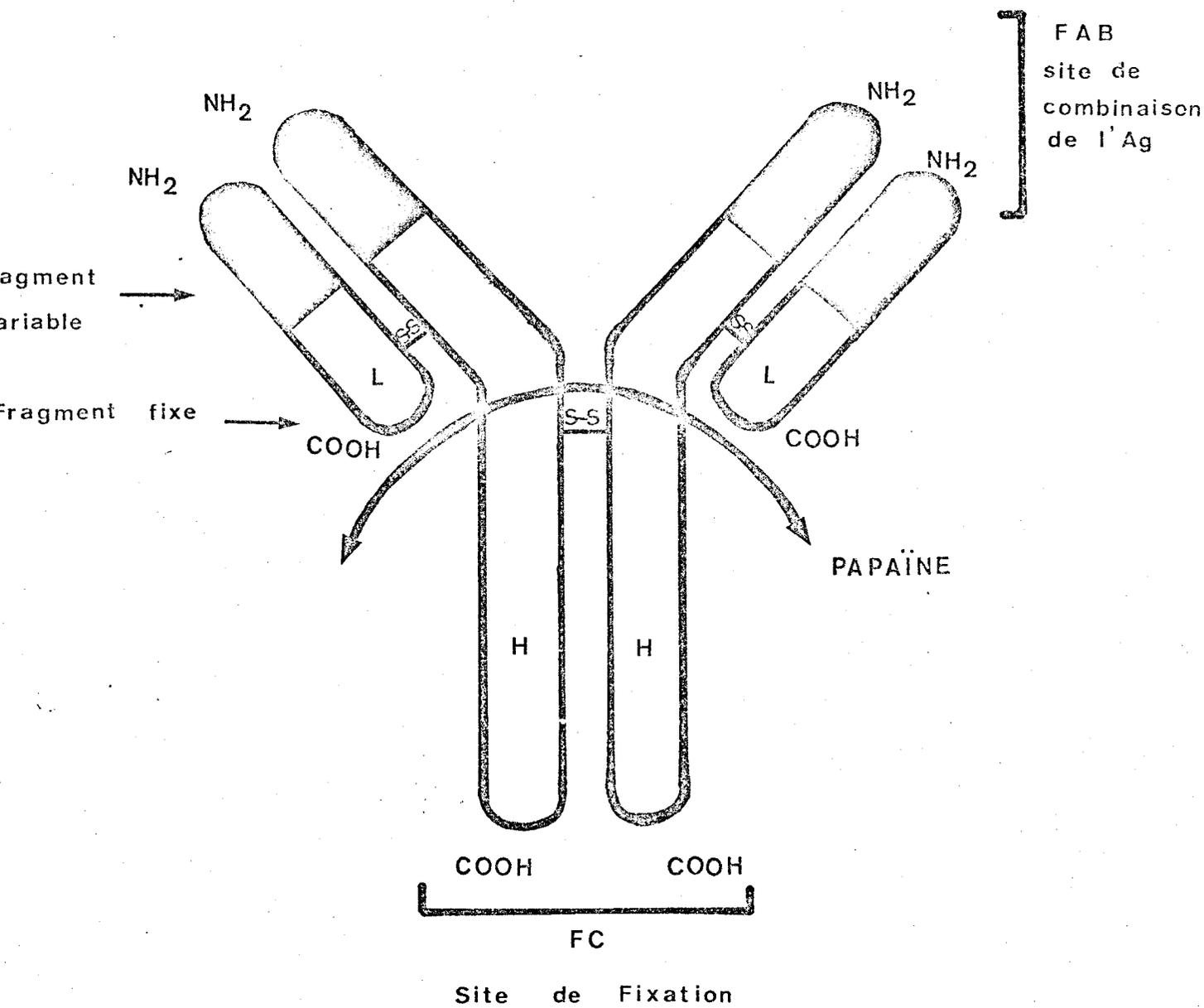


FIG. 1



Les chaînes L et H sont reliées entre elles par des ponts disulfures : ils sont soit intracaténares établis entre deux cystéines éloignées sur une même chaîne polypeptidique soit intercaténares unissant les chaînes légères aux chaînes lourdes et les chaînes lourdes entre elles.

Les IgE contiennent des résidus cystéine et méthionine.

La dégradation enzymatique par la papaïne coupe la molécule d'IgE au milieu de la chaîne lourde en avant de la région charnière et détache 3 fragments : 2 Fab et 1 Fc. Chaque fragment Fab est constitué par l'association d'une chaîne légère et de la moitié N-terminale de la chaîne lourde. C'est par le  $\gamma$  fragment Fab que se fait l'union avec l'antigène. Le fragment Fc est constitué des deux moitiés carboxy-terminales des chaînes lourdes réunies entre elles par des ponts intercaténares. Il détermine les principales fonctions biologiques de la molécule en dehors de son activité anticorps : il porte la plupart des glucides, 11 p.cent pour les IgE (figure 2 ).

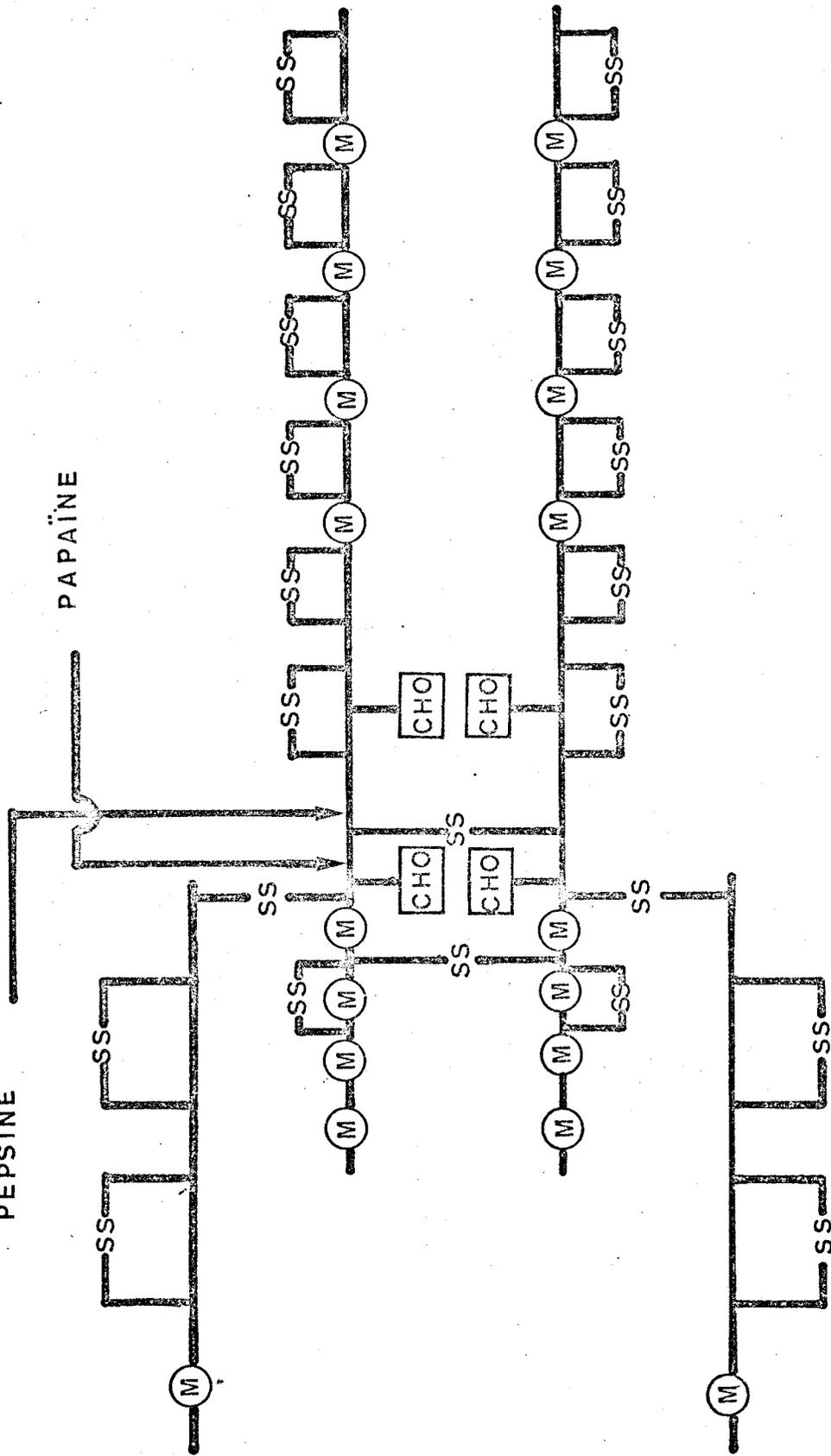
L'action de la pepsine dégrade au contraire en petits peptides l'extrémité C-terminale de la molécule en arrière de la région charnière, libérant un gros fragment F(ab'2) portant les deux sites anticorps et un fragment pFC dont le poids moléculaire est d'environ 30 000 et qui représente une fraction de la partie carboxy-terminale des chaînes  $\epsilon$ , portant les déterminants antigéniques caractéristiques du fragment Fc.

Les IgE sont une  $\gamma_1$  glycoprotéine dont la constante de sédimentation est de 8 S.

Elles sont thermolabiles : à 56°C pendant 4 heures, les IgE sont inactivées. ISHIZAKA (1967) a montré que cette température élevée pendant 4 heures entraînait des modifications de structure du fragment Fc de la molécule l'empêchant de se fixer sur les tissus. Par contre l'intégralité du fragment F ab est conservée.

PEPSINE

PAPAÏNE



M: méthionine ; CHO : hydrate de carbone ;

SS: pont disulfure



FIG. 2

Les IgE ne fixent pas le complément, ne traversent pas la barrière placentaire. Ce sont des anticorps homocytotropes qui se fixent sur les récepteurs cellulaires par le fragment Fc. Cette fixation sur les mastocytes tissulaires ou sur les basophiles qui, il est admis maintenant, sont des mastocytes circulants (ISHIZAKA, 1970) persiste au moins trois semaines après l'introduction de l'anticorps dans l'organisme. Il s'agit là d'un caractère propre aux immunoglobulines E puisque les IgG ne persistent que deux ou trois jours dans l'organisme. La fixation des IgE sur les récepteurs cellulaires leur confère leur caractère pathologique parcequ'elles ne sont pathologiques que si elles sont fixées.

C'est cette fixation qui est à la base des phénomènes anaphylactiques. Pour que le phénomène anaphylactique se produise il faut que deux molécules au moins d'IgE soient réunies spécifiquement par l'antigène. La combinaison de l'antigène aux sites anticorps provoque probablement une modification allostérique du Fc de l'IgE responsable d'altérations de la membrane entraînant une libération de substances vasoactives : histamine, SRSA : slow reacting substance of anaphylaxis, bradykinine, héparine, ECFA : facteur chemotactique pour les éosinophiles et plus récemment on a décrit la libération de prostaglandines  $\text{PGF}_2$  -  $\text{PGE}_1$  -  $\text{PGE}_2$  ainsi qu'un facteur faisant contracter l'aorte de lapin : RACS : rabbit aorta contraction substance.

D'après ROHLICH, ANDERSON et UVNAS (1971) plutôt qu'un éclatement de la cellule, il semblerait s'agir d'une extrusion des granules par des pertuis creusés à travers la membrane cellulaire. Les substances vasoactives sont alors libérées des granules par échange ionique avec le milieu extracellulaire.

La dégranulation est déclenchée par une activation membranaire mettant en jeu le système de la 3'5' adénosine monophosphate cyclique. En effet les substances qui élèvent le taux intracellulaire d'AMP cyclique inhibent la dégranulation (ORANGE et coll. 1971). Parmi ces substances les agents  $\beta$  adrénergiques comme l'isoprénaline inhibent la libération de l'histamine et de la SRS-A en agissant sur l'adénylcyclase. Il en est de même de la diéthylcarbamazine et des méthylxanthines en agissant sur la phosphodiesterase. Par contre les substances  $\beta$  bloquantes, le propranolol par exemple, empêchent l'action de l'isoprénaline sur l'inhibition de la libération des médiateurs.

Il n'en demeure pas moins qu'une partie du mécanisme de libération des médiateurs chimiques reste encore inconnue. Ainsi la libération de l'héparine est surtout observée chez le chien au cours du choc anaphylactique. L'ECFA est libéré en même temps que l'histamine chez le cobaye après action de l'antigène sur du poumon sensibilisé.

#### Formation et métabolisme des IgE :

A l'aide d'une technique d'immunofluorescence, TADA et ISHIZAKA (1970) ont étudié chez l'homme les lieux de formation des IgE : les amygdales et les ganglions lymphatiques possèdent un nombre très élevé de cellules plasmocytaires colorées par des anti-IgE. Il en est de même des ganglions bronchiques, péritonéaux ainsi que des muqueuses bronchiques, gastrointestinales et des plaques de PEYER. Par contre il y aurait peu de cellules productrices d'IgE dans la rate et les ganglions lymphatiques sous-cutanés.

La demi-vie des IgE est de deux jours alors que celle des IgG est de 25 jours (WALDMAN, 1969). Cette courte demi-vie des IgE fait penser que ces immunoglobulines sont formées de manière continue et que la production est supérieure à la concentration dans le sérum. Cependant, des IgE injectées dans la peau de l'homme ou du singe persistent plus longtemps. Ainsi si on injecte dans la peau humaine des IgE marquées à l'<sup>131</sup> iode et si on mesure la radioactivité cutanée, on constate que la protéine décroît rapidement de 1 à 5 p.100 de la dose initiale en 3 à 4 jours. Puis elle persiste ensuite de 8 à 14 jours, ISHIZAKA (1971).

Des études sur la formation d'IgE chez différentes espèces animales ont été faites : ainsi chez le singe infesté d'ascaris on a constaté des réactions positives de la peau vis-à-vis de ce parasite. De plus, des injections d'ascaris à ces singes entraînent la formation d'anticorps mis en évidence par des réactions d'anaphylaxie passive cutanée : WIRSER et coll. 1968, ISHIZAKA et coll. 1969. Le singe a une protéine qui donne une réaction croisée avec du sérum anti-IgE humaines. Pour confirmer cette hypothèse, on a étudié les anticorps "réaginique" dans le sérum de chimpanzés infestés par shistosoma mansoni ou haematobium. L'activité réaginique était absorbée par du sérum anti-IgE.

BLOCH et OHMAN (1971) ont étudié les anticorps homocytotropes chez le rat. Chez les rats infectés par Nippostrongylus brasiliensis, la production d'immunoglobulines E est très augmentée.

PROUVOST-DANON et BINAGHI (1970) ont montré qu'il y avait production d'anticorps anaphylactiques chez des souris sélectionnées génétiquement. Ces anticorps ne sont pas transmissibles de la mère au foetus.

Dosage des IgE sériques totales :

En raison du taux extrêmement faible des IgE sériques, toutes les techniques in vitro utilisées sont basées sur l'emploi de traceurs radioactifs. D'autre part, elles nécessitent toutes l'emploi d'anti-sérum anti-IgE obtenu par immunisation au moyen des protéines provenant d'un des deux cas connus de myélome à IgE ; l'anti-sérum doit contenir essentiellement des anti-epsilon à l'exclusion des anticorps anti-chaîne légère.

La technique d'immunodiffusion en gélose de ROWE (1969) est une sensibilisation de la méthode de MANCINI (1965) : le sérum à étudier est mis à diffuser à partir de réservoirs creusés dans une agarose contenant du sérum de lapin anti-IgE humaines. Après deux jours d'incubation, les plaques sont lavées avec un tampon phosphate pour éliminer les protéines non précipitées. Cependant les IgE bien que précipitées en un anneau dont le diamètre est fonction de leur teneur sérique, ne sont pas visibles : pour les révéler il faut utiliser un sérum animal anti-protéine de lapin marqué à l'iode radioactif qui, après lavage, révèle l'anneau précipité sur une auto-radiographie.

Cette technique nécessite un appareillage réduit et est donc relativement peu coûteuse mais elle est peu sensible car des doses inférieures à 100 ng/ml ne sont pas décelables. De plus elle est longue et la reproductibilité est difficile.

Beaucoup plus utilisé actuellement est le dosage radio-immunologique par la technique du "radio-immunosorbant test" RIST. Décrit initialement par WIDE et PORATH (1966) pour le dosage d'hormones polypeptidiques, l'application au dosage des IgE a été faite par JOHANSSON, WIDE et BENNICH (1968).

Des particules de Séphadex recouvertes d'anticorps anti-IgE humaines sont mises au contact avec le sérum à étudier mélangé à une quantité standard d'IgE purifiées et marquées à l'iode radioactif  $I^{125}$ . Ainsi un constituant immunoabsorbant en phase insoluble est produit. Il s'établit un équilibre entre

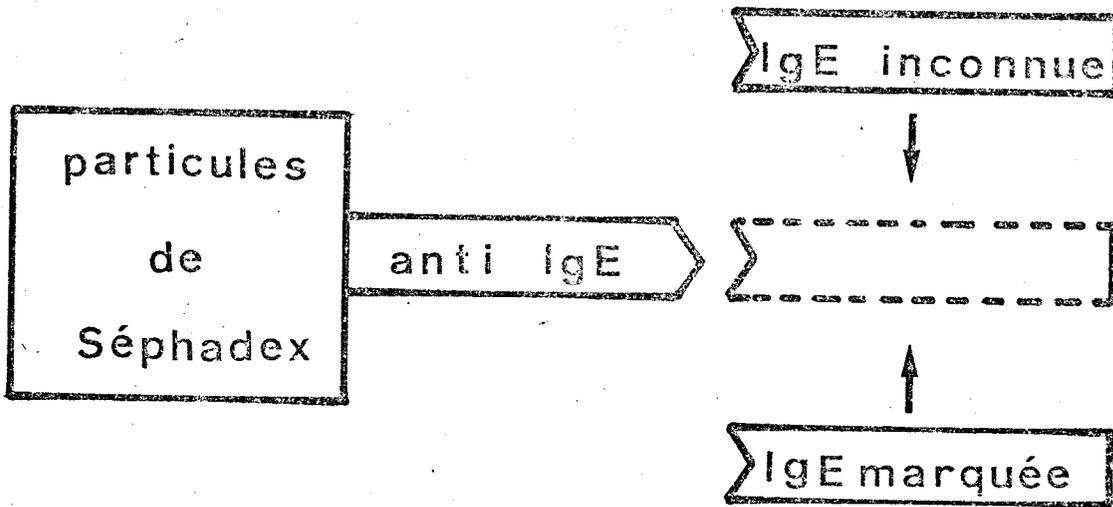
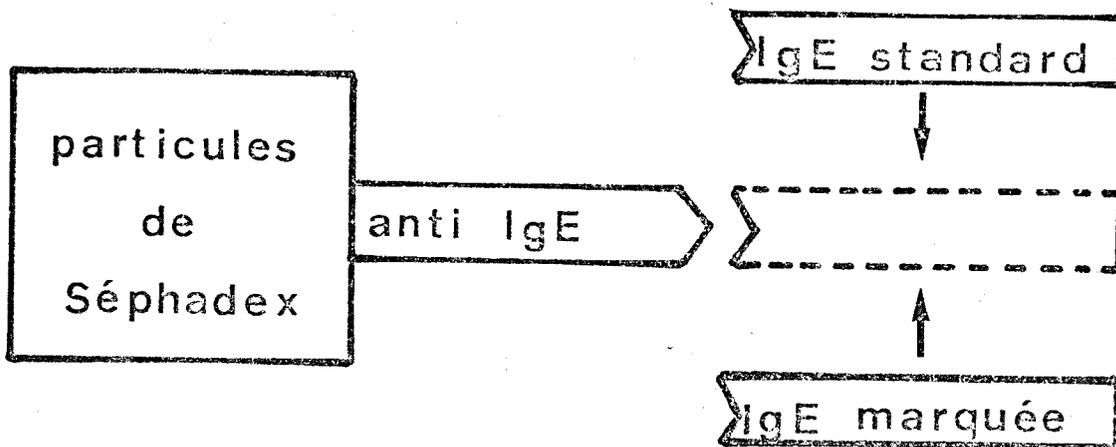
molécules d'IgE marquées et non marquées. A la fin de l'incubation, les particules de Séphadex sont centrifugées, lavées et la radioactivité qu'elles supportent est appréciée au moyen d'un compteur à radiations (fig. 3 ). Cette radioactivité est inversement proportionnelle à la quantité d'IgE sériques de l'échantillon.

Au préalable, une courbe d'étalonnage est établie en présence d'une dose fixe d'IgE marquées et d'une gamme d'IgE standard non marquées. Une courbe de référence est donc obtenue et pour déduire le taux d'IgE sériques totales de l'échantillon il suffit de reporter la valeur obtenue sur la courbe de référence.

#### Taux d'IgE sériques chez l'homme :

D'après JOHANSSON (1968) le taux sérique normal moyen d'IgE chez l'adulte sain est de 242 nanogrammes/ml avec un intervalle de confiance de 61 à 1 000 ng/ml. Les résultats peuvent être aussi exprimés en unité internationale par millilitre (U/ml) : une unité est égale à 2,42 nanogrammes.

Des IgE sont présentes dans le sérum du cordon ombilical mais d'après JOHANSSON (1968) le fœtus synthétiserait de novo ses propres IgE. Chez le nourrisson de un mois à quatre mois le taux moyen d'IgE est de 60 nanogrammes/ml et il augmente progressivement au cours de la croissance pour atteindre le taux moyen de l'adulte vers l'âge de 15 ans.



RADIO IMMUNOSORBANT TEST (R.I.S.T.)



Fig. 3

Les chiffres d'IgE les plus élevés se rencontrent dans les parasitoses (JOHANSSON et coll., 1968).

JOHANSSON et coll. (1968) ont rapporté que les enfants de certaines populations africaines avaient un taux d'IgE 28 fois plus élevé que celui d'enfants suédois. Les auteurs ont pensé que l'élévation du taux d'IgE était due à une parasitose, en l'occurrence infestation par l'ascaris fréquente en Afrique alors que les enfants suédois étaient indemnes de toute affection parasitaire.

De son côté ISHIZAKA (1970) a observé les mêmes faits : un taux élevé d'IgE chez des enfants d'Amérique du Sud ayant des parasitoses à *Schistosoma mansoni*.

Une récente étude sur les IgE sériques totales faite par DRY et coll. (1974) montre que le taux des IgE n'a de signification que dans la mesure où il est anormalement élevé pour étayer le diagnostic d'une atopie. Il est nécessaire d'éliminer auparavant toute autre cause : parasitose, cirrhose. Le risque d'erreur par excès de 4 à 5 p. cent, observé dans la population, doit être pris en considération. Une valeur normale ne permet aucune déduction sur la nature réaginique ou non d'une affection allergique. Aucune méthode ne permet malheureusement de calculer le taux des IgE fixées sur les mastocytes et impliquées directement dans la libération des substances responsables de manifestations pathologiques.

D'après BRUTTMANN et coll. (1974) le taux d'IgE est en moyenne de 518 nanogrammes /ml chez des malades allergiques à la poussière mais comme l'écart-type est de 486 on voit donc que la dispersion des IgE est très grande.

Si la méthode du RIST pour le dosage sérique des immunoglobulines E est une technique rapide, reproductible, elle ne peut refléter la spécificité des différentes IgE.

### Mise en évidence des IgE spécifiques :

Si importante que soit la détermination du taux global des IgE, la possibilité d'apprécier la présence de réagines spécifiques d'un antigène soupçonné semble d'un intérêt capital.

La mise en évidence des IgE spécifiques se fait par des techniques *in vivo* et des techniques *in vitro* comprenant des méthodes immunochimiques et immunopharmacologiques.

#### - Techniques *in vivo* :

. Comme les IgE se fixent sur la peau, elles peuvent être mises en évidence par des tests cutanés à réponse immédiate (10 à 15 minutes) après introduction de l'antigène.

Actuellement on insiste beaucoup sur le danger que constitue la pratique de ces épreuves dans le cas de l'allergie médicamenteuse : en effet on connaît un cas mortel après une injection intra-dermique de deux unités de pénicilline. Par ailleurs, la négativité des tests n'a pas de valeur absolue et n'infirme pas la présence d'anticorps. D'autre part REDMOND et LEVINE (1968) chez des sujets recevant de la pénicilline et ne présentant pas d'accident a obtenu des tests cutanés positifs. Cette technique ne paraît donc pas avoir un intérêt primordial pour l'allergie médicamenteuse.

. Des transferts *in vivo* peuvent être faits :

- soit chez l'homme : technique de PRAUSNITZ-KUSTNER qui a été décrite dans un précédent chapitre.

- soit chez le singe : LAYTON (1966). Cet auteur a sensibilisé par voie intra-dermique des singes avec des sérums de malades allergiques à la pénicilline ou à des pneumallergènes. Puis on injecte au singe du bleu Evans par voie intra veineuse. L'antigène est introduit ensuite soit par scarification au lieu d'injection du sérum, soit par voie orale, sublinguale ou sous-cutanée. La réaction est positive si le bleu Evans

a diffusé au point d'injection du sérum humain. En effet il s'agit d'une réaction d'anaphylaxie passive cutanée avec libération de médiateurs chimiques en particulier l'histamine. Cette dernière entraîne alors au point d'injection une augmentation de la perméabilité capillaire qui se traduit par une extravasation du bleu Evans.

- Techniques in vitro :

1°) Techniques immunochimiques

. Une technique dérivée de la technique d'agglutination mixte de COOMBS (1953) ; il s'agit du test RCLAAR (red cell linked antigen antiglobuline reaction). Dans un premier temps l'antigène est fixé par photo-oxydation sur des anticorps de lapin anti-hématie humaine. Puis le sérum à étudier est mis en contact et s'il contient des IgE spécifiques de l'antigène il y a fixation de ces IgE sur l'allergène. L'agglutination visible est enfin obtenue au moyen des immun-sérum anti-IgE (fig.4). Cette réaction a été utilisée pour rechercher des réagines spécifiques chez des malades souffrant d'asthme au ricin, COOMBS (1968). Si cette technique paraît de pratique facile pour certaines antigènes, elle n'a pas encore été mise au point pour les médicaments.

. Technique radioimmunologique ou radioallergosorbant test (RAST) :

Cette technique décrite par WIDE, BENNICH et JOHANSSON (1967) consiste à coupler l'allergène à des particules de Séphadex activées par CN Br ; les anticorps sériques sont ensuite fixés sur le support, puis la fixation des seules IgE est révélée au moyen d'anticorps anti IgE purifiés et marqués à l'iode radioactif (fig.5). La radioactivité mesurée est proportionnelle à la quantité d'IgE spécifiques.

Le couplage de l'allergène sur les particules de Séphadex est possible surtout avec des antigènes de haut poids moléculaire : ceci est déjà fait pour la poussière, les pollens, les poils de chien ou de chat ainsi que pour les antigènes parasitaires tels que *Ascaris Lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Necator americanus*, *Echinococcus* (JOHANSSON, 1971).

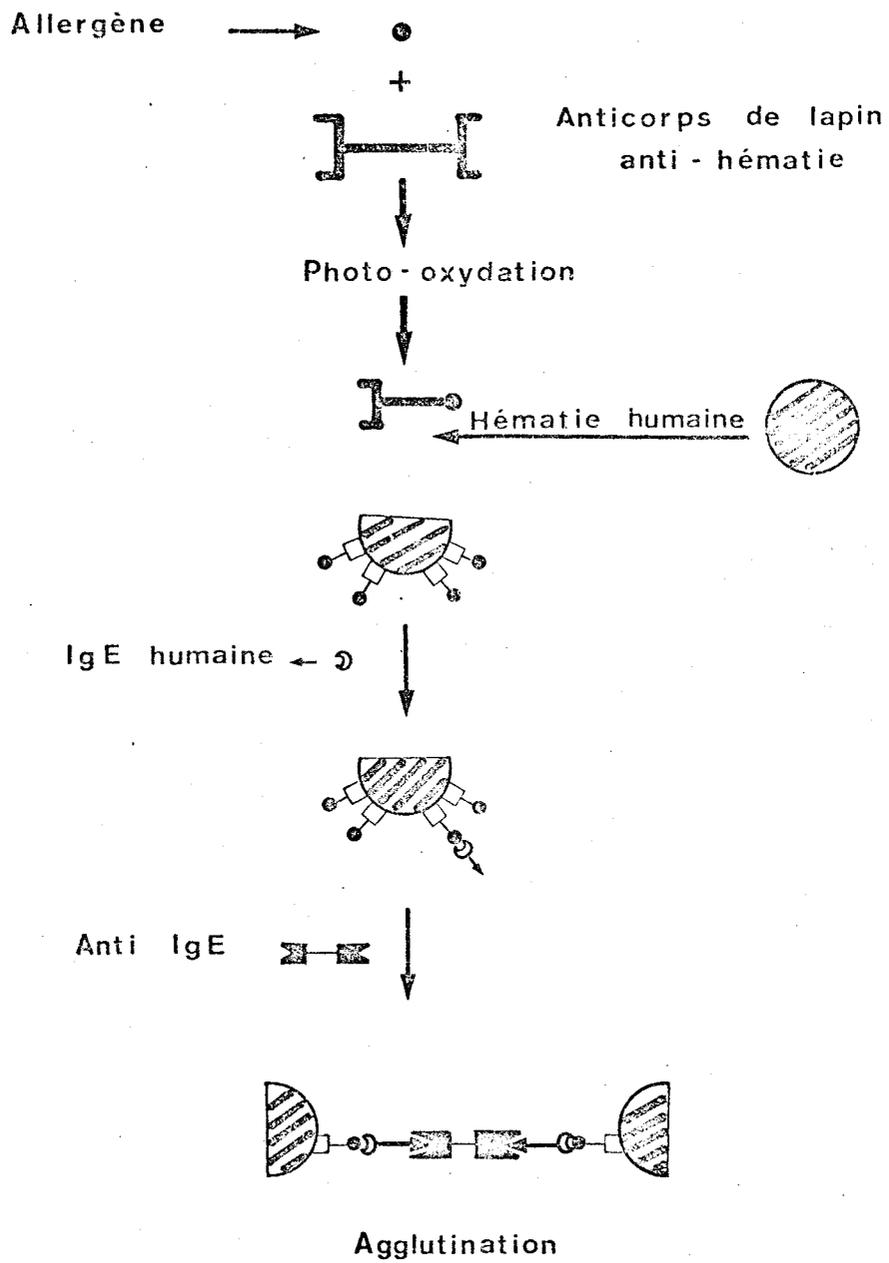
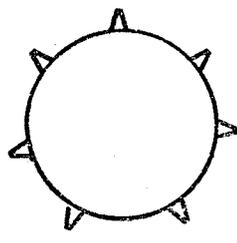
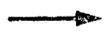
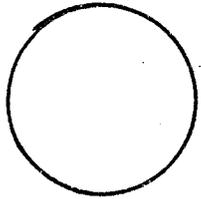


FIG. 4

Allergène >

+

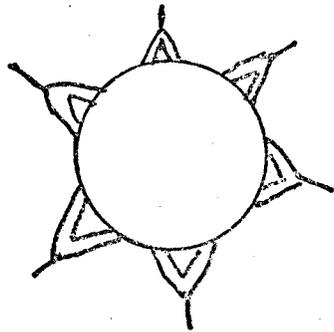
particules  
de Séphadex



+

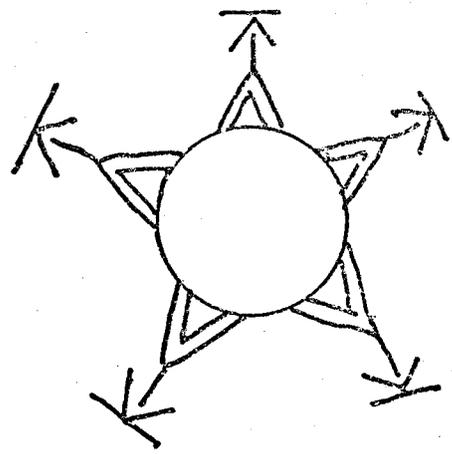
Ig E >

(anticorps  
anti allergène)



+

anti Ig E  
marqué K



complexe radio actif insoluble



RADIO ALLERGOSORBANT TEST (R.A.S.T.)

FIG. 5

Dans le cas de l'allergie médicamenteuse, la plupart du temps les antigènes sont des molécules simples, de faible poids moléculaire et on risque de les dénaturer lors du couplage. Or si la molécule médicamenteuse est altérée on peut craindre alors qu'elle perde ses déterminants antigéniques.

Cette technique semble maintenant utilisée pour la pénicilline, WIDE (1971), de WECK (1974), mais elle n'est pas encore mise au point pour d'autres antigènes médicamenteux. Par ailleurs, il ne s'agit pas d'un dosage vrai des IgE sériques spécifiques mais d'une présence estimée de 0 à 4 par rapport à des sérums de référence.

. Très récemment DESSAINT (1974) a mis au point une technique permettant le dosage d'IgE spécifiques anti-parasites. Les préparations antigéniques parasitaires sont insolubilisées par liaison covalente à une phase solide selon différentes techniques. Le sérum est incubé avec cet immuno-adsorbant. Les anticorps spécifiques sont ensuite élués et les IgE anti-parasites sont dosées par la méthode radioimmunologique (RIST).

Cependant, dans le cas de l'allergie médicamenteuse les techniques immunopharmacologiques sont nécessaires parce qu'en dehors de la pénicilline, il n'existe pas actuellement d'autres techniques permettant de mettre en évidence des IgE sériques anti-médicament.

## 2. Techniques immunopharmacologiques

Les IgE spécifiques peuvent être mises en évidence soit à partir des basophiles sensibilisés du malade soit à partir du sérum du malade en utilisant des techniques d'anaphylaxie passive.

### a) IgE fixées sur les basophiles du malade :

Dès 1940, KATZ a montré une libération d'histamine à partir de leucocytes sensibilisés mis au contact de l'antigène. Puis ISHIZAKA (1969) et MAY (1970) ont montré qu'à partir de basophiles sensibilisés du malade, on déclenchait une libération d'histamine après action de l'antigène.

b) IgE circulantes :

Les immunoglobulines E ne se fixant que sur les tissus de primates, plusieurs auteurs ont tenté de les mettre en évidence en utilisant des techniques d'anaphylaxie passive in vitro sur différents tissus de primates :

iléon de singe : ROSE et coll.1964  
KOBAYASHI 1967  
WICKER et coll.1968  
SOUBRANE et coll. 1970

appendice humain : SOUBRANE et coll.1970

poumon de singe : GOODFRIEND 1968  
ASSEM 1968  
MALLEY 1968

poumon humain : SHEARD 1967  
ASSEM 1968  
PAUL 1969

peau de singe : ROSE 1964  
GOODFRIEND 1968  
PEDERSEN 1969

peau humaine : PEDERSEN 1969  
GREAVES et coll.1972

Un autre test est basé sur la dégranulation des mastocytes péritonéaux de rats (PERELMUTTER, 1969 ; KOROTZER, 1971 ; GILLMAN, 1972) en présence d'antigène et de sérum humain.

Nous en discuterons plus loin.

Notre principal travail a été la mise au point d'une technique permettant la mise en évidence d'IgE circulantes spécifiques par anaphylaxie passive in vitro sur poumon de singe.

TRAVAUX PERSONNELS

I<sup>ère</sup> PARTIE

MISE EN EVIDENCE DES IgE SERIQUES  
SPECIFIQUES ANTI-MEDICAMENT.

A. ANAPHYLAXIE PASSIVE IN VITRO SUR POUMON DE SINGE.

## CHAPITRE I

### MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE.

L'anaphylaxie passive in vitro, technique mise au point par DALE (1913) est basée sur le principe suivant : un tissu est sensibilisé passivement par fixation d'anticorps, l'addition de l'antigène déclenche une libération d'histamine et l'histamine est dosée par méthode biologique.

Nous avons appliqué ce principe à la mise en évidence des IgE sériques humaines en utilisant le tissu pulmonaire de singe comme récepteur.

Ce chapitre comprend 4 paragraphes.

- A. Le dosage de l'histamine.
- B. L'étude du matériel : choix des malades, prélèvement du sang, antigènes.
- C. Les conditions d'utilisation du tissu pulmonaire de singe avec les résultats permettant ou non cette utilisation.
- D. La description détaillée de la technique d'anaphylaxie passive in vitro sur poumon de singe.

## A - DOSAGE DE L'HISTAMINE

Dans tous les cas, l'histamine est dosée par la méthode biologique classique sur iléon isolé de cobaye et exprimée en dichlorhydrate d'histamine.

### a) l'iléon isolé de cobaye.

Les animaux utilisés sont des mâles d'un poids compris entre 250 et 400 g. Leur nourriture consiste en granulés synthétiques et est complétée par du chou, des carottes et de l'eau.

L'animal est sacrifié, après coup sur la tête, par section des carotides. Après laparotomie médiane, on prélève deux morceaux d'iléon subterminal, juste en amont d'un léger renflement qu'on observe constamment sur la partie terminale ; on enlève le mésentère avec précaution sans jamais tirer sur l'iléon. Les fragments retirés ont environ 3 cm de long.

A l'aide d'une pipette, on lave soigneusement la lumière de l'iléon avec du liquide de Tyrode<sup>\*</sup> à 36° environ et on monte l'iléon le plus rapidement possible en évitant de le distendre. Il faut également éviter au cours de ces opérations de montage de laisser l'iléon trop longtemps hors du liquide de Tyrode.

### b) l'appareil à organe isolé.

Le bac à organe isolé est une cuve munie d'une résistance chauffante, d'un thermostat qui règle la température à  $\pm 0,5^\circ$  et d'un dispositif d'agitation qui est destiné à rendre égale la température en tous les points de la cuve. Le bain à organe isolé est un tube de verre de 10 cm de haut et de 1 cm de large. Un barbotage d'air assure à la fois une oxygénation suffisante et une agitation qui rend la composition du bain homogène après l'introduction des substances à essayer.

\* Composition du liquide de Tyrode : NaCl : 8g ; KCl : 200mg ; CaCl<sub>2</sub> : 200mg ; MgCl<sub>2</sub> : 100mg ; NaHCO<sub>3</sub> : 1g ; glucose : 1g ; sulfate d'atropine : 50mcg ; eau distillée q.s.p. : 1 000ml.

Il est préférable de travailler à la température de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  ; à des températures plus basses, les contractions sont plus amples mais plus lentes ; à des températures plus élevées, les contractions sont plus rapides mais plus petites et l'iléon survit moins longtemps.

La réserve du liquide de Tyrode est conservée dans un serpentin de verre situé dans le bac à organe isolé donc maintenue à la température du bac soit  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ .

On travaille en isotonie et la tension exercée sur l'organe est de un gramme.

L'enregistrement des contractions se fait sur un appareil PHILIPS par un système électronique d'extensométrie. L'iléon dont le raccourcissement représente la grandeur à mesurer, est relié par l'intermédiaire d'une poulie à un capteur de déplacement alimenté sous une tension continue : le courant induit est mesuré par un convertisseur de mesure de déplacement et transmis à un enregistreur potentiométrique.

L'avantage de ce système réside en l'absence de frottement et une grande facilité d'amplification permettant de travailler avec de faibles doses d'histamine, même si les iléons en expérience sont relativement peu sensibles à cette substance. Il nous est ainsi possible de visualiser des contractions produites par l'addition de  $0,02$  mcg d'histamine soit 2 nanogrammes au contact de l'organe.

### c) La gamme d'histamine.

Le dosage de l'histamine se fait avec une gamme étalon d'histamine préparée extemporanément. Le dichlorhydrate d'histamine utilisé doit être aussi pur que possible. Une solution-mère titrée à  $100$  mcg/ml est préparée dans de l'eau distillée et peut être conservée plusieurs semaines à  $+4^{\circ}\text{C}$ . A partir de cette solution-mère, on prépare une solution à  $5$  mcg/ml dans du liquide de Tyrode et c'est cette dernière solution qui permet d'obtenir une gamme avec des tubes contenant  $1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05$  mcg de dichlorhydrate d'histamine par millilitre.

d) Technique des essais.

Avant chaque essai, il est indispensable de s'assurer que le niveau du liquide de Tyrode qui baigne l'iléon est toujours à la même hauteur, ceci afin d'obtenir une dilution identique des lots d'expérience au niveau de l'iléon, le volume du bain étant de 10 ml.

Il est indispensable de travailler très régulièrement en provoquant une contraction toutes les minutes 30 secondes par exemple. Dans le cas où le travail a été interrompu, il est préférable d'effectuer un certain nombre de lavages avant de stimuler à nouveau l'organe. Un iléon peut être utilisé pendant plusieurs heures. Le temps d'une contraction est de 15 secondes environ, puis la durée du lavage de 30 secondes (quatre à cinq lavages) puis on laisse l'iléon se reposer 45 secondes : l'iléon est donc excité toutes les 1'30. Le nombre de lavages doit être le même après chaque contraction et l'enregistrement doit indiquer le retour spontané à la ligne de base.

Des prises d'essai sont d'un demi-millilitre. Après avoir cherché la sensibilité absolue de l'iléon (elle augmente au début), on cherche la meilleure sensibilité différentielle : il faut que deux doses d'histamine différentes de 10 p. 100 donnent deux contractions de hauteur nettement différente.

Il est préférable de travailler avec de petites contractions et une bonne sensibilité différentielle qu'avec de grandes contractions au voisinage de la réponse maximale. C'est ce que montre le diagramme action-dose (fig. 6).

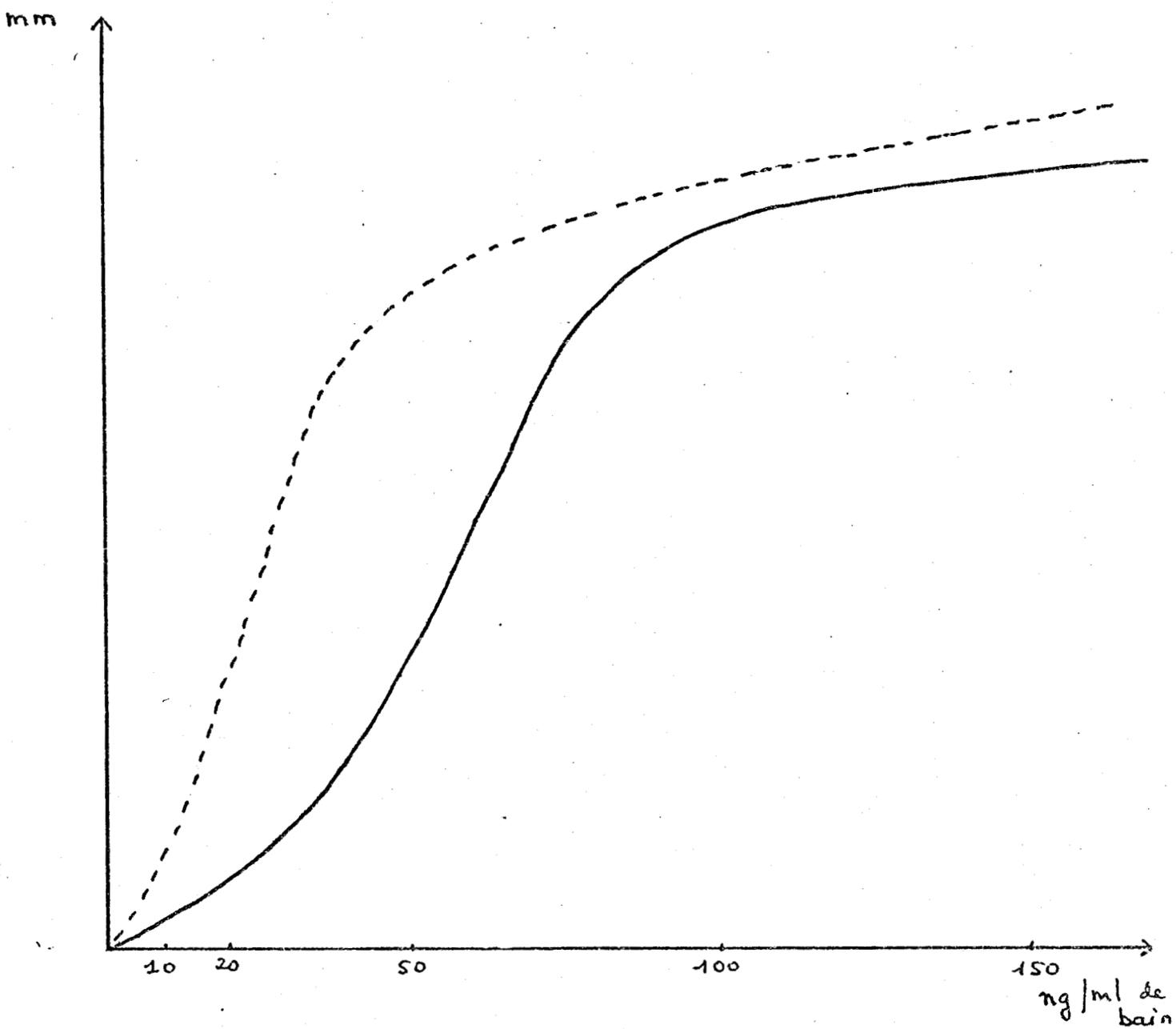


Fig. 6 Diagramme action-dose de l'histamine sur iléon isolé de Cobaye

- en abscisses la dose de dichlorhydrate d'histamine en ng/ml de bain
- en ordonnées la hauteur des contractions en mm
- en trait plein - diagramme action-dose en début d'une expérience
- en pointillé.... pour le même iléon, diagramme action-dose deux heures plus tard.

Lorsqu'une sensibilité différentielle est déterminée c'est-à-dire par exemple, lorsque la hauteur des contractions obtenues diffère de 2 cms pour 0,2 et 0,3 mcg de dichlorhydrate d'histamine ajouté, il est important de travailler dans cette zone. Si les échantillons contiennent une quantité d'histamine par millilitre supérieure à 0,2 , 0,25 ou 0,3 mcg d'histamine par ml, mieux vaut diluer l'échantillon plutôt que de quitter cette zone de sensibilité différentielle. Au cours d'une même expérience, cette zone varie mais ce qui importe toujours c'est d'amener la quantité d'histamine à déterminer dans cette zone de sensibilité différentielle.

Si l'histamine libérée n'est pas dosée à la fin de l'expérience, il suffit d'acidifier avec de l'acide chlorhydrique N le contenu des tubes afin d'obtenir un pH voisin de 2. Dans ces conditions et à  $-20^{\circ}\text{C}$ , il n'y a ni destruction ni formation d'histamine. La vérification a été faite expérimentalement.

La contraction histaminique est inhibée par la mépyramine, antihistaminique spécifique. Lorsque le liquide de Tyrode baignant l'iléon de cobaye contient de la mépyramine à une concentration de  $10^{-9}$ , la contraction obtenue avec la gamme étalon est totalement inhibée au bout de 20 minutes de contact. Dans ces conditions expérimentales, les lots d'expérience ne doivent donner aucune contraction.

Cependant avec une dose d'histamine 20 fois supérieure à celle ayant été inhibée, la contraction de l'iléon de cobaye est enregistrée. Après les essais avec la mépyramine il faut laver abondamment l'iléon avec du liquide de Tyrode et retrouver la hauteur des contractions histaminiques antérieures.

## B - MATERIEL

### a) Sujets étudiés :

Deux groupes de sujets ont été étudiés :

. d'une part des malades suspects d'allergie médicamenteuse parce qu'ayant présenté des manifestations de type allergique après l'administration d'un médicament précis. Dans certains cas, ces accidents pouvaient revêtir des formes gravissimes telles que choc anaphylactique ou syndrome de Lyell. Dans d'autres cas, les manifestations rencontrées étaient respiratoires avec des crises d'asthme, dyspnée laryngée, rhinite intense ou toux spasmodique ou des manifestations variées : urticaire, eczéma, oedème de Quincke, éruptions cutanées diverses. Dans la majorité des cas il s'agissait d'accidents de type immédiat.

. d'autre part des sujets témoins étudiés proviennent soit de sujets sains soit de malades recevant les médicaments incriminés mais ne présentant aucune manifestation pathologique extériorisée due à l'administration de ces médicaments.

### b) Prélèvement du sang :

Le sérum recueilli après rétraction du caillot peut être conservé pendant plusieurs semaines à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le prélèvement doit être effectué en dehors de tout traitement par les corticoïdes et après un délai de trois semaines environ après un choc anaphylactique.

Pour chaque expérience et pour chaque antigène, 3,5 ml de sérum sont préalablement dialysés contre 100 ml environ d'une solution isotonique de glucose\* à  $\text{pH} = 7,4$ .

Cette dialyse se fait dans des sacs de collodion et dure six heures avec changement de la solution de glucose toutes les deux heures.

\* Composition de la solution de glucose : glucose 50 gr ;  $\text{CO}_3\text{HNa}$  40 mg ; eau distillée q.s.p. 1 000 ml.

c) Les antigènes :

Les antigènes utilisés doivent être :

- solubles et stables en milieu aqueux à pH 7,6
- non toxiques pour l'iléon de cobaye
- non libérateurs d'histamine
- sans action propre (contractante ou décontractante) sur la fibre lisse.

Tous les antigènes sont dilués dans du liquide de Tyrode. La concentration est donnée par millilitre au contact du poumon de singe.

Liste des principaux antigènes utilisés : cf Tableau I

Les concentrations d'antigène ont été choisies, de façon empirique, en fonction de la dose moyenne quotidienne du médicament administré et de la concentration sanguine supposée.

ANTIBIOTIQUES	Pénicilline G	200 U.I./ml
	Tétracycline	5 mcg/ml
	Chloramphénicol	40 mcg/ml
	Sulfate de colistine	200 U.I./ml
	Gentamicine	2 mg/ml
	Céfalotine	10 mg/ml
	Spiramycine	600 mcg/ml
	Streptomycine	100 mcg/ml
	Rifampicine	12 mcg/ml
	Isoniazide	10 mcg/ml
SULFAMIDES	Sulfamérazine	10 mcg/ml
	Sulfaguanidine	200 mcg/ml
	Tolbutamide	20 mcg/ml
	Glybutamide	10 mcg/ml
ANTIPYRETIQUES ANALGESIQUES ANTI INFLAMMATOIRES	Acide acétyl salicylique	200 mcg/ml
	Antipyrine	12 mcg/ml
	Phénacétine	20 mcg/ml
	Phénylbutazone	20 mcg/ml
	Hydroxychloroquine	6 mcg/ml
	Glafénine	20 mcg/ml
ANTIPALUDEENS	Sulfate de quinine	10 mcg/ml
	Chloroquine	6 mcg/ml
MÉDICAMENTS DU S.N.C.	Phénobarbital	10 mcg/ml
	Levomépromazine	20 ng/ml
	Diazépam	200 ng/ml
ANESTHÉSIFIQUES LOCAUX	Procaïne	100 mcg/ml
	Lignocaïne	100 mcg/ml
DIVERS	Méthyl dopa	10 mcg/ml
	Spiro nolactone	2 mcg/ml
	Aminophylline	10 mcg/ml
	Phénindione	200 mcg/ml
	Allopurinol	10 mcg/ml
	Acétazolamide	20 mcg/ml
Aurothiopropamol	0,5 mcg/ml	

Tableau I

C - CONDITIONS OPTIMALES D'UTILISATION DU TISSU PULMONAIRE DE SINGE.

L'étude de 500 sérums sur 184 poumons de singe pendant plus de deux ans nous a permis de constater que certaines difficultés rencontrées pour la mise au point d'une telle technique, provenaient de la variabilité des poumons de singe et de celle du rapport "idéal" antigène-anticorps. En effet, une étude de reproductibilité des résultats a montré que des sérums préalablement trouvés positifs lors de plusieurs expériences étaient tous négatifs avec certains poumons. En cherchant les circonstances donnant ces résultats faussement négatifs, circonstances ne pouvant provenir que du poumon lui-même, les questions suivantes ont été posées :

- état du singe donneur, présence ou non de parasites, avec ou sans traitement anti-parasitaire.
- influence de l'anesthésie plus ou moins complète avant le sacrifice.
- importance du pouvoir histaminasique du poumon.
- évaluation de sa capacité de libération d'histamine.

Ce travail préliminaire (BURTIN et SOUBRANE (1973)) a pour but de préciser les conditions dans lesquelles un poumon de singe est utilisable pour la mise en évidence des anticorps homocytotropes humains.

a) Prélèvement du poumon :

Les singes utilisés sont des papio-papio. Certains d'entre eux ont des parasites ou sanguins ou localisés dans le tube digestif ; d'autres ont subi un long traitement anti-parasitaire ; d'autres enfin semblent indemnes de toute affection.

Les poumons de singes très parasités lors du sacrifice sont inutilisables pour la mise en évidence des IgE humaines. Les poumons utilisés proviennent de singes parasités mais ayant subi un long traitement spécifique. Ces singes ne sont utilisés au plus tôt qu'un mois après l'arrêt du traitement.

Ils sont sacrifiés par section des carotides soit sans anesthésie, soit après une anesthésie au chloroforme, soit après injection de chlorhydrate de phencyclidine\* ou de gardénal sodique. Quand le singe a été anesthésié au chloroforme, la libération d'histamine par réaction anaphylactique est inhibée ; il en est de même pour le sédatif (Sernyvet) alors que la libération d'histamine par la n-octylamine n'est pas modifiée. Par contre les dérivés de la malonylurée sont utilisables. Cependant la presque totalité des expériences a été effectuée sur des poumons provenant de singes sacrifiés sans anesthésie.

Les poumons prélevés sont mis immédiatement dans du liquide de Tyrode. S'ils ne sont pas utilisés immédiatement, ils sont conservés à + 4°C mais le délai maximal d'utilisation est de 48 heures après le sacrifice.

\* Sernyvet, DE PARKE-DAVIS

b) Préparation du poumon :

Avant toute expérience, le poumon est découpé en morceaux de 50mg environ ; ces fragments sont lavés trois à quatre fois pendant deux heures avec du liquide de Tyrode jusqu'à obtention d'une solution parfaitement limpide. Les morceaux de poumon prélevés indifféremment sur la partie extérieure du poumon aussi bien que dans les régions péribronchiques sont mélangés : en effet l'étude topographique du poumon n'a pas permis de distinguer une différence dans les résultats d'expérience.

c) Mesure de l'activité histaminasique :

Pour mesurer l'activité histaminasique du poumon, sont constitués :

- des lots d'histamine (lots H) à 0,4 mcg/ml et à 0,04 mcg/ml
- un lot témoin poumon (lot TP) avec 500 mg de poumon
- des lots d'histamine et de poumon (lots HP) avec soit 0,4 mcg/ml, soit 0,04 mcg/ml d'histamine et 500 mg de poumon

Ces différents lots sont placés au bain-marie à 37° C pendant 45 minutes puis les morceaux de poumon retirés et l'histamine résiduelle est dosée. L'histamine est exprimée en dichlorhydrate.

La destruction de l'histamine par l'histaminase du poumon est calculée de la façon suivante à partir de l'histamine h par millilitre dans les différents lots :

$$100 - \frac{h \text{ du lot HP} - h \text{ du lot TP}}{h \text{ du lot H}} \times 100 = \text{pourcentage de perte.}$$

Sur 184 poumons de singe étudiés, la plupart des pourcentages de perte en histamine, pour la dose de 0,4 mcg d'histamine par ml, se situe entre 10 p.cent et 30 p.cent. Mais les pourcentages extrêmes vont de 0 p.cent à 52 p.cent.

Pour la dose de 0,04 mcg d'histamine par ml, la plupart des pourcentages de perte en histamine se situe entre 20 p.cent et 40 p.cent avec des variations extrêmes allant de 0 p.cent à 80 p.cent.

Afin d'éviter des résultats faussement négatifs, il apparaît que le poumon n'est pas utilisable si l'activité histaminasique dépasse 45 p.cent.

d) Etude de l'histamine libérable par la n-octylamine :

A l'aide d'une gamme de n-octylamine allant de 40 mcg/ml à 800 mcg/ml, on étudie l'histamine libérable.

Les lots d'expérience sont composés de la façon suivante (par exemple pour la concentration de 800 mcg/ml) :

- 1 ml de n-octylamine à 4 mg/ml
- 4 ml de liquide de Tyrode
- 10 morceaux de poumon

avec un tube témoin sans octylamine.

Ces différents lots d'expérience sont placés au bain-marie à 37°C pendant 45 minutes. Puis après avoir retiré les morceaux de poumon, l'histamine libérée est dosée.

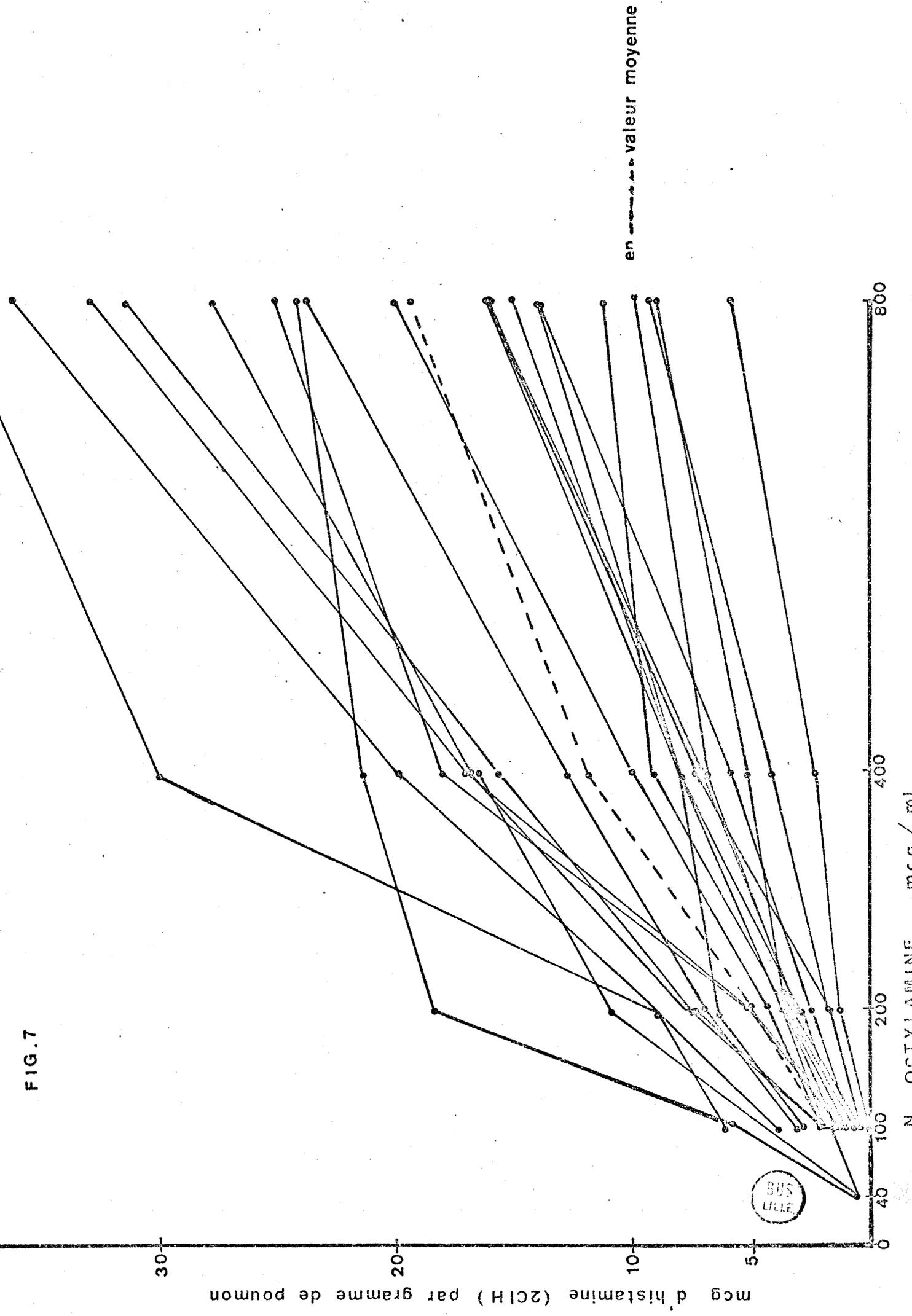
Tous témoins faits et déduits, les résultats sont exprimés en microgrammes de dichlorhydrate d'histamine par gramme de poumon frais.

Sur 20 poumons de singe étudiés, avec des doses différentes de n-octylamine, la dispersion dans la libération d'histamine est très importante (fig. 7 ).

La libération d'histamine a été étudiée sur 184 poumons de singe avec 800 mcg de n-octylamine/ml. Le diagramme montre que le plus grand nombre de poumons libère entre 15 et 20 mcg d'histamine par gramme de poumon (fig. 8 ).

Les expériences de reproductibilité ont montré qu'un poumon donne des résultats faussement négatifs si la quantité de dichlorhydrate d'histamine libérée par 800 mcg/ml de n-octylamine est inférieure à 15 mcg par gramme de tissu frais. De ce fait, un poumon sur trois n'est pas utilisable.

FIG. 7



en ----- valeur moyenne

BUS LILLE

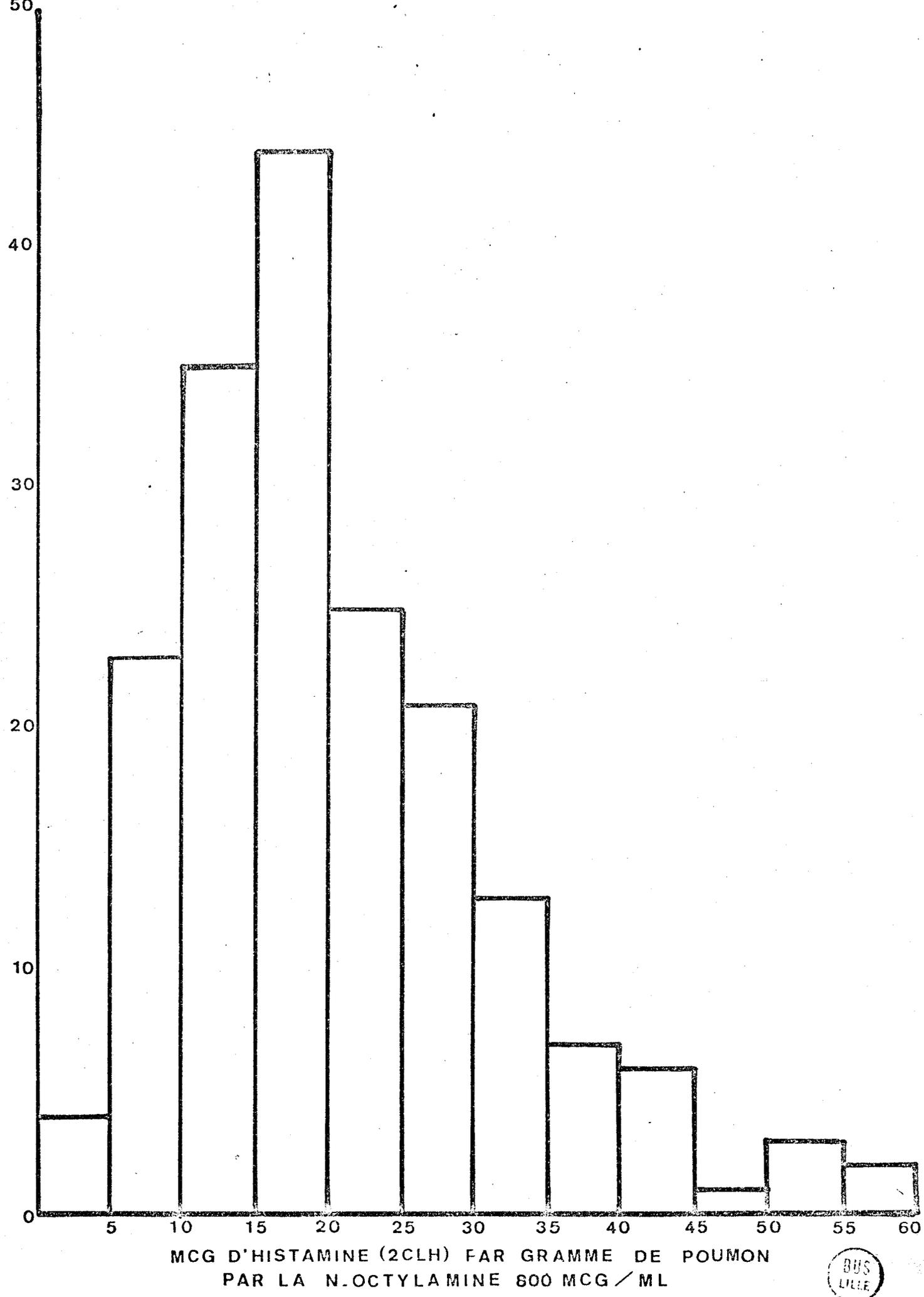


FIG. 8



D - TECHNIQUE PROPREMENT DITE

Avant tout début d'expérience les morceaux de poumon découpés au préalable et lavés pendant deux heures dans du liquide de Tyrode sont placés dans une solution isotonique de glucose pendant 30 minutes.

La technique elle-même se déroule en deux temps : tout d'abord il y a fixation des anticorps du sérum sur le poumon de singe, puis l'addition de l'antigène sur le tissu récepteur sensibilisé déclenche une libération d'histamine.

1er temps : fixation des IgE sur le poumon de singe.

- Constitution des différents lots d'expérience :  
tableau II .

Ces lots ainsi constitués sont placés au bain-marie à 37°C pendant deux heures, après avoir vérifié que le pH est voisin de 7,5.

Puis après agitation de chaque tube, les morceaux de poumon sont recueillis et lavés trois fois dans du liquide de Tyrode avant d'être placés dans les tubes correspondants du 2è temps.

Si le 2è temps de la technique n'a pas lieu immédiatement, on peut conserver les tubes après les deux heures passées au bain-marie à +4°C pendant 12 à 16 heures. On lave ensuite les morceaux de poumon avant le 2è temps.

S A P

	S	A	P
Solution de glucose	0	+	+
Sérum	+	0	0
Poumon	+	+	+
EDTA	+	+	+

Tableau II : Constitution des différents lots d'expérience et des lots témoins pour le 1er temps de la technique ;

S : lot d'expérience avec le sérum à étudier

A : 5 lots témoin antigène

P : 5 lots témoin poumon.

Solution de glucose : 4 ml d'une solution isotonique de glucose

Sérum : le sérum recueilli après dialyse correspondant à 2 ml, 1 ml et 0,5 ml de sérum initial.

On complète, si nécessaire, à 4 ml avec la solution de glucose

Poumon : 10 morceaux de poumon de 50 mg environ chacun

EDTA : 0,1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra acétate disodique à 100mg/ml.



2<sup>e</sup> temps : déclenchement de la réaction antigène-anticorps.

- Constitution des différents lots d'expérience :

Les poumons des lots d'expérience et des lots témoins antigènes sont placés dans 5 ml de liquide de Tyrode contenant la solution antigénique dont la concentration a été donnée par millilitre au contact du poumon de singe. Les morceaux de poumon du lot témoin-poumon sont placés dans 5 ml de liquide de Tyrode.

Les lots ainsi préparés sont placés au bain-marie à 37°C pendant 45 minutes.

Après agitation de chaque tube, les morceaux de poumon sont retirés et l'histamine libérée est dosée.

## CHAPITRE II

Ce chapitre comprend 2 paragraphes :

A. L'expression des résultats

B. Les résultats.

A - EXPRESSION DES RESULTATS

Pour les lots témoins, nous faisons la moyenne des 5 lots témoin-antigène et calculons la déviation standard. Les résultats sont donnés, pour ces témoins, en moyenne  $\pm 2$  d.s. (ou  $2\sigma$ ).

Tous témoins faits et déduits, les résultats sont exprimés en microgramme de dichlorhydrate d'histamine libérée par gramme de poumon frais.

Ils sont calculés de la manière suivante :

histamine h libérée par millilitre du lot d'expérience E

histamine h libérée par millilitre des lots témoin-antigène A :

$m + 2\sigma$ .

( $h$  du lot E -  $h$  du lot A en  $m + 2\sigma$ )  $\times 10$  = histamine libérée par  
gramme de poumon frais

Pour plus de commodité de langage, nous désignerons par sérum positif tout sérum dans lequel des immunoglobulines E spécifiques auront été mises en évidence. Il s'agit donc de sérum pour lequel la libération d'histamine aura été supérieure à celle de la moyenne des tubes témoins  $+ 2\sigma$ .

Nous appellerons sérum négatif tout sérum qui aura donné une libération d'histamine égale ou inférieure à celle donnée par la moyenne des tubes témoins  $+ 2\sigma$ .

B - RESULTATS

Plus de 500 sérums ont été étudiés.

Au moment où nous avons mis la technique au point, nous utilisons une seule quantité de sérum dialysé : 2 ml. Dans ce cas, les deux antigènes le plus souvent incriminés étaient la pénicilline et l'acide acétyl-salicylique : tableau III.

Médicaments étudiés	Nombre de cas	Présence d'IgE sériques spécifiques	
		Nombre	Pourcentage
Pénicilline	193	61	32
Acide acétyl Salicylique	46	16	37
TOTAL	239	77	35

Depuis que nous avons modifié la technique en utilisant 3 volumes différents de sérums, nous avons étudié 210 sérums de malades suspects d'allergie médicamenteuse et 80 sensibilisés aux pneumallergènes.

Les sérums de malades suspects d'allergie médicamenteuse se répartissent ainsi : tableau IV.

Médicaments étudiés	Nombre de cas	Présence d'IgE sériques spécifiques	
		Nombre	Pourcentage
Pénicilline	130	68	52
Autres antibiotiques	18	8	44
Acide acétyl salicylique	26	13	50
Phénobarbital	13	6	46
Sulfamides	5	2	40
Anesthésiques locaux	2	2	100
Divers	16	12	75
<b>TOTAL</b>	<b>210</b>	<b>111</b>	<b>53</b>



Les résultats globaux, portant sur tous les sérums étudiés avec la variante de notre technique, montrent que, pour chaque sérum étudié, il y a trois valeurs de libération d'histamine correspondant à 2 ml (lot A), 1 ml (lot B) et 0,5 ml (lot C) pour la même concentration d'antigène.

Dans 173 cas, une des trois valeurs au moins a été positive. La moyenne des valeurs ( $\pm$  l'écart-type) exprimée en microgrammes de dichlorhydrate d'histamine par gramme de poumon est de :

pour 2 ml de sérum (lot A)	: 0,50 $\pm$ 0,10
pour 1 ml de sérum (lot B)	: 0,45 $\pm$ 0,06
pour 0,5 ml de sérum (lot C)	: 0,35 $\pm$ 0,04

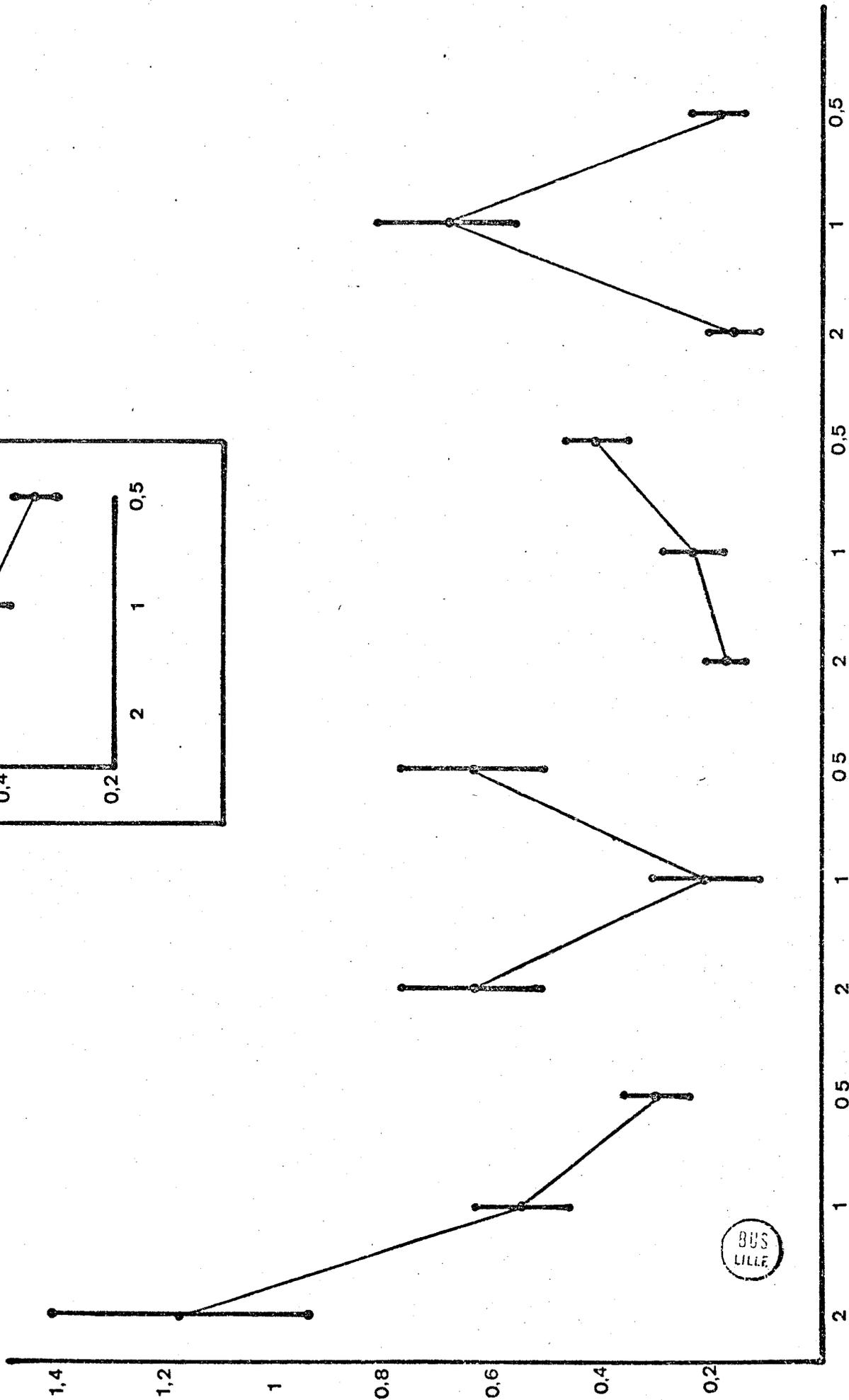
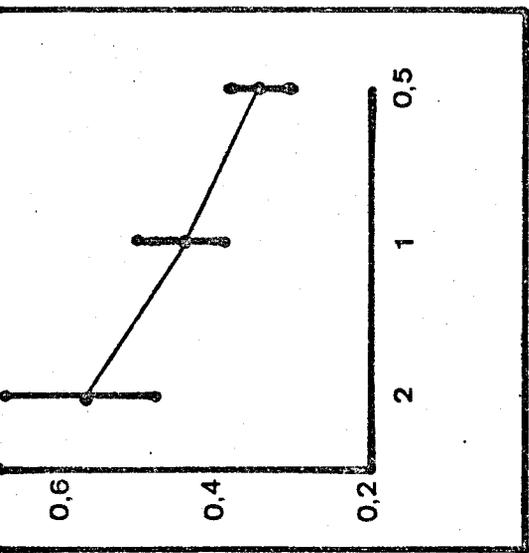
Cependant l'analyse des résultats permet de séparer ces sérums en quatre groupes (figure 9) :

Le groupe I comprend 60 sérums où les valeurs des lots A, B et C décroissent. Dans 30 cas, le lot C seul est nul et dans 19 cas, les lots B et C sont nuls.

Le groupe II comprend 26 sérums où la valeur du lot B est la plus faible ; elle est même nulle dans 14 cas.

Le groupe III comprend 44 sérums où les valeurs des lots A, B et C augmentent. Dans 26 cas, le lot A seul est nul, et dans 16 cas, les lots A et B sont nuls.

Le groupe IV comprend 43 sérums où le lot B a la valeur la plus forte. Le lot A est seul nul dans 27 cas ; le lot C seul nul dans 22 cas, les lots A et C sont nuls dans 20 cas.



BUS  
LILLE

FIG. 9

Légende figure 9 :

En abscisses : 3 quantités de sérum dialysé lot A = 2 ml  
 lot B = 1 ml  
 lot C = 0,5 ml

En ordonnées : quantité de dichlorhydrate d'histamine libérée  
 et exprimée en mcg/gramme de poumon.

Moyenne et écart-type

Groupe I	A $\gg$ B $\gg$ C	60 sérums
Groupe II	A $>$ B $<$ C	26 sérums
Groupe III	A $\leq$ B $\leq$ C	44 sérums
Groupe IV	A $<$ B $>$ C	<u>43 sérums</u>
		173 sérums

Dans le cadre

Moyenne des lots A, B et C sur 173 mesures.

Lorsqu'un patient est suspect d'allergie à la pénicilline, le sérum est étudié avec de la Spécilline G ; s'il s'agit d'ampicilline, l'antigène utilisé est l'ampicilline. Il en est de même pour d'autres pénicillines ou les céphalosporines. Mais l'expérience est faite une seconde fois avec de la Spécilline G ; dans tous les cas où des immunoglobulines E ont été mises en évidence, quelle que soit la catégorie de pénicilline utilisée, l'expérience s'est révélée aussi positive avec la Spécilline G. Nous utilisons donc maintenant systématiquement la Spécilline G pour toutes les recherches d'allergies aux pénicillines et aux céphalosporines

De même lorsque l'antigène suspecté est le phénobarbital (acide éthyl phénylbarbiturique), le butobarbital (acide éthylbutyl barbiturique), le sécobarbital, nous utilisons le phénobarbital. En effet les expériences faites en double avec le phénobarbital ont toujours donné des réactions positives lorsque les autres antigènes avaient permis de mettre en évidence des IgE spécifiques.

Enfin nous avons eu des malades suspects d'allergie à des sulfamides hypoglycémiantes type garglybutamide ou à d'autres sulfamides antibactériens type sulfaproxyline. Des expériences identiques à celles décrites précédemment nous ont permis de conclure que pour les allergies aux sulfamides nous pouvions utiliser la sulfamérazine.

### CHAPITRE III

Ce chapitre comprend 2 paragraphes :

A. Discussion de la technique

B. Discussion des résultats

## A - DISCUSSION DE LA TECHNIQUE

Notre objectif technique se résumait en quatre points essentiels : augmenter la sensibilité du test, assurer une bonne reproductibilité, diminuer le nombre de résultats faussement négatifs et ne pas créer de résultats faussement positifs. C'est pourquoi nous avons été amenés petit à petit à modifier la technique afin d'éliminer les différents facteurs de variabilité dûs au poumon d'une part, aux sérums ou aux antigènes de l'autre.

### 1. Le poumon de singe :

L'ensemble des résultats montre que de nombreuses précautions doivent être prises avant d'utiliser un poumon de singe pour la mise en évidence des anticorps homocytotropes par anaphylaxie passive.

Chez les singes très parasités, le taux d'IgE sériques est très élevé et les résultats d'anaphylaxie passive sont toujours faussement négatifs. Or il est impossible de faire une réaction de PRAUSTNITZ-KÜSTNER avec comme receveur un malade myélomateux à IgE. Il est vraisemblable qu'il en est de même dans le cas des poumons de singes parasités et que ceux-ci ne peuvent fixer un supplément d'IgE.

Le fait qu'une anesthésie générale par éther, uréthane, alcool éthylique empêche la libération d'histamine par anaphylaxie est connu depuis longtemps chez le cobaye. Il en est de même pour le singe, alors que la libération d'histamine par la n-octylamine n'est pas modifiée. Seuls les dérivés de la malonylurée permettent la libération anaphylactique.

Si l'histamine libérée par le poumon est détruite par l'histaminase, il est évident que les résultats seront faussement négatifs. Nous avons tenté d'inhiber cette destruction par l' $\alpha$ -aminoguanidine. Mais les témoins supplémentaires nécessitent du tissu pulmonaire, et limitent de ce fait le nombre d'expériences proprement dites. C'est pourquoi il semble préférable d'abandonner ces poumons à fort pouvoir histaminasique.

Il paraît peu conforme aux données classiques de relier la libération d'histamine anaphylactique à l'action de la n-octylamine. En fait, cette libération d'histamine n'est que le reflet du taux d'histamine totale du poumon mais sa mesure est plus simple et plus rapide. Si le poumon contient peu d'histamine, la libération anaphylactique qui ne représente qu'une faible partie de l'histamine totale n'est pas mesurable et crée ainsi des résultats faussement négatifs. Un même sérum positif étudié dans les mêmes conditions expérimentales sur différents poumons donne des taux de libération d'histamine proportionnels au taux d'histamine totale du poumon. Il n'est donc pas possible de tenir compte de ce taux d'histamine pour une évaluation du taux d'anticorps dans un sérum. Les recherches se poursuivent actuellement pour tenter d'éliminer ce facteur de variation imputable au poumon utilisé.

Cette étude porte uniquement sur du poumon de singe. Mais il est très vraisemblable que des impératifs identiques existent lors de l'utilisation du poumon humain, du moins en ce qui concerne l'anesthésie, le taux d'histaminase, et la quantité d'histamine libérable.

Les critères de sélection qui découlent de ce préambule peuvent paraître sévères. Mais la plupart de nos recherches ont été effectuées dans le cas d'allergie médicamenteuse. Le taux d'anticorps est en général beaucoup moins élevé que lors d'une hypersensibilité classique aux pneumallergènes par exemple ; c'est pourquoi il a été nécessaire d'augmenter le plus possible la sensibilité du test, sans pour cela risquer de provoquer des résultats faussement positifs.

## 2. Les sérums :

La plupart des sérums sont étudiés au moins deux fois. Un sérum peut être conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs semaines sans perte des immunoglobulines E.

Toutes conditions expérimentales respectées, un sérum positif est retrouvé positif et un sérum négatif retrouvé négatif quel que soit le délai entre les deux expériences. Mais un sérum positif ne donne pas d'une fois sur l'autre la même quantité d'histamine libérée : ceci est dû à la quantité d'histamine libérable à partir du poumon.

Le taux d'anticorps variant d'un sérum à l'autre, il nous a paru intéressant de mettre en présence, sur un même poumon et avec une dose d'antigène fixe, des quantités variables de sérum et de comparer les libérations d'histamine. C'est pourquoi, pour chaque sérum, nous faisons trois tubes d'expérience avec 2 ml, 1 ml et 0,5 ml de sérum.

Avant tout début d'expérience, le sérum à étudier est préalablement dialysé contre une solution isotonique de glucose parce que d'après LIACOPOULOS (1962) la fixation des anticorps en milieu non électrolytique est meilleure.

### 3. La technique :

#### a) Addition d'EDTA :

Il nous est arrivé d'étudier des sérums de malades atopiques présentant une allergie confirmée à la poussière ou à la candidine et suspects d'allergie médicamenteuse après l'absorption d'un médicament précis. Dans ce cas nous avons toujours eu une libération d'histamine au 1er temps de la technique et aucune libération au 2è temps. Nous avons alors supposé que lorsque l'allergène est circulant et s'il est constitué par une grosse molécule donc non dialysable (c'est le cas de la poussière), il subsiste alors dans le sérum. Au moment de la fixation des anticorps sur le poumon, il se produit une réaction antigène-anticorps avec épuisement de l'histamine libérable. Et on peut craindre que, au moment du 2è temps de la technique, la quantité d'histamine libérable ne soit insuffisante et avoir alors un résultat faussement négatif.

C'est pour éviter cet écueil que nous ajoutons aux tubes d'expérience du 1er temps de la technique de l'EDTA : c'est un chélateur des ions calcium et ainsi on évite une libération d'histamine qui se produisait parfois à ce stade. Et on sait depuis SCHILD (1968) que la libération d'histamine anaphylactique n'a pas lieu en l'absence de calcium.

b) Importance du pH :

Nous insistons sur l'importance de la neutralité des sérums au moment du 1er temps de l'expérience : en effet, nous avons travaillé plusieurs fois avec un pH voisin de 5,5 et le même sérum positif à pH neutre était négatif avec le pH 5,5.

Avec un pH alcalin supérieur à 8, la quantité d'histamine libérée était augmentée mais avait créé alors des résultats faussement positifs.

c) Lots témoins :

Il est indispensable de constituer des lots témoins antigène sans sérum : ceci pour éliminer une éventuelle sensibilisation du singe au médicament étudié. Nous avons eu trois singes sensibilisés à la pénicilline. Ainsi ceci permet d'éliminer des réactions faussement positives.

Nous faisons 5 lots témoin-antigène parce que nous nous sommes aperçus qu'il y avait parfois une dispersion dans la libération d'histamine entre 2 lots témoins pourtant identiques, cette dispersion pouvant être de 30 p.cent. Pour éviter des résultats faussement positifs ou faussement négatifs, nous avons pensé qu'en faisant 5 lots témoin-antigène, et à partir de là, un calcul statistique nous serions à l'abri de faux résultats.

Nous calculons donc la moyenne des 5 lots témoins  $\pm 2 \sigma$ . Ainsi toute libération d'histamine supérieure à la moyenne  $\pm 2 \sigma$  montre la présence d'IgE spécifiques dans l'échantillon.

d) Preuve expérimentale de la libération d'histamine :

Dans le conflit antigène-anticorps il y a libération de médiateurs chimiques. Parmi ceux-ci l'histamine joue un rôle important et est mise en évidence par sa propriété de faire contracter un muscle lisse. Ici nous l'avons dosée par la méthode biologique classique sur iléon de cobaye, d'autres la dosent par la méthode fluorimétrique.

La contraction donnée par les lots d'expérience est totalement inhibée lorsque le liquide de Tyrode baignant l'iléon de cobaye contient de la mépyramine à  $10^{-9}$ . Il en est de même de la contraction histaminique obtenue avec la gamme étalon. Ceci prouve donc bien que dans la libération des médiateurs chimiques se trouve l'histamine.

A côté de l'histamine, un autre médiateur chimique est libéré, la "slow reacting substance of anaphylaxis" SRS-A. La SRS-A libérée fait également contracter les muscles lisses mais contrairement à l'histamine la contraction ne survient qu'après un temps de latence de 30 secondes. Dans nos conditions expérimentales, nous ne l'avons pas étudiée.

e) Expériences prouvant qu'il s'agit d'une réaction d'anaphylaxie :

L'anaphylaxie passive in vitro constitue un moyen susceptible de permettre une étude approfondie des phénomènes d'hyper-sensibilité de type immédiat. Elle présente des avantages sur l'anaphylaxie passive in vivo car les conditions expérimentales peuvent varier à une échelle irréalisable in vivo.

Pour se produire, la réaction nécessite une température de  $37^{\circ}$  et la présence de calcium. Des sérums dont la mise en évidence d'IgE spécifiques étaient certaines dans les conditions requises par la réaction anaphylactique, ont été étudiés, à la température du laboratoire et/ou en présence d'EDTA : chélateur des ions calcium. Dans ces cas, nous n'avons pas eu de libération d'histamine.

f) Expériences prouvant qu'il s'agit des immunoglobulines E

Une des principales caractéristiques des IgE étant la thermolabilité du fragment Fc, nous avons donc fait chauffer à 56°C pendant quatre heures des sérums trouvés précédemment positifs. La technique de nouveau appliquée n'a pas permis de mettre en évidence une libération d'histamine. Les immunoglobulines par suite de la destruction de leur fragment Fc n'ont pas pu se fixer sur les tissus.

Nous avons fait chauffer des sérums à 56°C pendant 30 minutes : à cette température, le complément est détruit. Mais il a été tout de même possible de mettre encore en évidence des IgE spécifiques : donc le complément n'est pas indispensable. Et en effet les immunoglobulines E ne fixent pas le complément.

D'autre part, avec un sérum contenant des IgE anti-médicament mises en évidence préalablement par la technique spécifique, on sensibilise des morceaux de poumon. Sur ce tissu sensibilisé si on ajoute au 2<sup>e</sup> temps de la technique du sérum anti IgE de chèvre à la place de l'antigène, il se produit une libération d'histamine prouvant que ce sont bien des IgE qui se sont fixées sur le poumon de singe. Cependant cette preuve de mise en évidence des IgE tout en restant très valable est moins bonne que la précédente. En effet les immunoglobulines E du sérum se sont bien fixées sur le poumon mais il peut exister dans le sérum du sujet des IgE qui ne soient pas exclusivement dirigées contre le médicament.

Une des propriétés des immunoglobulines E est leur fixation sur les parois cellulaires, notamment sur les mastocytes de primates. Cette fixation persiste après trois lavages en liquide de Tyrode ce qui n'est pas le cas pour les IgG qui sont éliminées après le premier lavage : c'est pourquoi il ne peut y avoir d'interférence avec les autres immunoglobulines et que ce sont bien des immunoglobulines E qui sont mises en évidence.

En conclusion, cette technique mise au point petit à petit dans notre laboratoire, permet la détection d'immunoglobulines E sériques vis-à-vis d'un antigène précis.

Cette technique est sensible parce que, comme nous le verrons plus loin, il nous est possible de détecter de l'ordre de 60 nanogrammes d'immunoglobulines E. En effet cela a été possible avec un sérum contenant des IgE spécifiques mises en évidence par cette technique et pour lequel il a été effectué un dosage d'IgE totales.

Cette technique n'est pas quantitative; en effet le taux d'histamine libérée, pour un même sérum et un même antigène, n'est pas le même d'un poumon à l'autre et, comme nous l'avons déjà dit, ceci est dû à la quantité d'histamine libérable à partir du poumon. La libération d'histamine du lot d'expérience n'est donc pas proportionnelle au taux d'anticorps du sérum. C'est pourquoi nos résultats sont seulement exprimés par la notion de présence ou d'absence d'IgE spécifiques.

## B - DISCUSSION DES RESULTATS

La comparaison des tableaux III et IV met bien en évidence qu'à partir du moment où nous avons fait varier la quantité de sérum présente dans chaque lot, nous avons augmenté le pourcentage de résultats positifs alors que le recrutement des malades demeurait inchangé. En effet, pour la pénicilline les pourcentages passent de 32 p.cent à 52 p.cent et pour l'acide acétyl salicylique de 37 p.cent à 50 p.cent.

On peut penser que, la dose d'antigène étant fixe et le taux d'anticorps variant pour chaque lot d'expérience, les concentrations "optimales" antigène-anticorps sont plus facilement atteintes.

En utilisant 3 quantités différentes de sérums, nous avons donc diminué indiscutablement le nombre de résultats faussement négatifs. L'analyse de la figure 9 confirme ce fait. En effet pour le groupe III dans 26 cas sur 44, soit 59 p.cent, le lot A correspondant à 2 ml de sérum dialysé a une valeur nulle. En employant cette seule et unique quantité de sérum, comme nous le faisons au tout début de la mise au point de la technique, nous aurions eu 26 résultats faussement négatifs.

Il en est de même avec le groupe IV où dans 27 cas sur 43, soit 62 p.cent, le lot A est seul nul.

L'analyse du groupe II est assez complexe : pourquoi les lots A (2 ml de sérum) et C (0,5 ml de sérum) sont-ils positifs alors que B (1 ml de sérum) est inférieur ? S'agirait-il d'une libération d'histamine qui se traduirait par une courbe diphasique entraînant alors la positivité des lots A et C ? Mais c'est une simple hypothèse.

Par contre dans le groupe IV on peut penser que pour le lot B (1 ml) ayant la libération d'histamine la plus importante, le rapport "idéal" antigène-anticorps est atteint, alors que le lot A et/ou le lot C peut être nul. La limite de positivité se trouve alors très étroite.

Il peut être criticable d'affirmer la positivité d'un test à partir du moment où l'histamine libérée par un lot d'expérience est supérieure à celle libérée par le lot témoin.

Les taux d'histamine donnés par la moyenne  $\pm 2 \sigma$  des lots témoins antigène varient d'un poumon à l'autre et, pour un même poumon, d'un antigène à un autre. Toute libération d'histamine supérieure à celle de la moyenne  $\pm 2 \sigma$  des lots témoins donne un résultat réellement positif.

Quant aux sérums ayant donné une réaction négative, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : ils ne contiennent pas d'immunoglobulines E spécifiques : ce sont de vrais négatifs ou elles sont au-dessous du seuil de mesure ou la proportion antigène-anticorps n'est pas optimale : ce sont de faux négatifs.

## AUTRES TECHNIQUES

A. Anaphylaxie cutanée passive chez le singe

B. Dégranulation des mastocytes de Rat

A) Anaphylaxie cutanée passive chez le singe :

Comme les immunoglobulines E sont des anticorps homocytotropes, leur mise en évidence serait aisée par des tests cutanés après transfert du sérum du malade à un receveur sain : c'est la réaction de PRAUSNITZ-KÜSTNER. Mais en pratique cette méthode n'est pas utilisée en raison de la difficulté de trouver des receveurs et du risque de transmission d'hépatite virale.

C'est pourquoi nous avons appliqué pour certains sérums de malades la technique décrite par LAYTON (1963). Les auteurs ont sensibilisé la peau de Macaques avec des sérums de malades atopiques contenant des anticorps anti-pollens et anti-pénicilline. Puis après injection intraveineuse de Bleu Evans, l'antigène est administré par voie orale, intradermique ou sous-cutanée. La réaction apparaît dans les 5 minutes suivantes et se traduit par une extravasation du colorant.

Six babouins ont été mis à notre disposition\* et nous avons pu étudier quatre sérums par singe.

TECHNIQUE

Les singes pesant 5 kg environ sont rasés dans la région thoracique et abdominale.

Dans un 1er temps, le sérum du malade est injecté par voie intradermique à différentes dilutions : 1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>, 1/1000<sup>e</sup> sous un volume de 0,1 ml.

Puis 24 heures après, 4 ml d'une solution de bleu Evans à 1 p. cent sont injectés par voie intraveineuse.

\* Nous tenons spécialement à remercier Monsieur CHAUMONT, Chef de Laboratoire de l'Institut Pasteur et son équipe dont la collaboration nous a été précieuse pour toutes ces expériences.

L'antigène : 0,1 ml d'une solution de pénicilline G à 100 U/ml est introduit par voie intradermique aux différents points d'injection des sérums.

Les témoins : pour chaque singe, par voie intradermique sont injectés : 0,1 ml de la solution antigénique en dehors des points d'injection des sérums, 0,1 ml de la solution tampon et 0,1 ml d'une solution d'histamine à 100 mcg/ml.

Toutes les dilutions ont été faites dans une solution de ClNa 0,15 M + tampon phosphate à pH 7,4 et stérilisées par filtration sur filtre Millipore de 0,45 microns.

Dans nos expériences, nous avons utilisé pour chaque singe 3 sérums contenant des IgE spécifiques anti-pénicilline mises en évidence par la technique d'anaphylaxie passive in vitro sur poumon de singe et/ou 1 sérum ne contenant pas d'IgE anti-pénicilline servant de sérum témoin ou 1 des sérums contenant des IgE spécifiques anti-pénicilline mais qui avait été préalablement chauffé à 56°C pendant 4 heures.

### RESULTATS

La lecture se fait dans la plupart des cas dix minutes après l'administration de la solution antigénique.

Avec l'injection intradermique de 10 mcg d'histamine, nous avons obtenu une papule bleue de 1 cm de diamètre environ.

Avec les différents sérums dits positifs des papules de diamètre inférieur ont été observées, le diamètre étant sans corrélation avec les dilutions sériques. Dans 2 cas, les papules étaient à peine visibles.

Avec les sérums dits négatifs ou les sérums chauffés aucune papule n'a été obtenue.

Les témoins antigène et la solution tampon n'ont donné aucune réaction.

### DISCUSSION

Ces résultats confirment donc bien la présence d'immunoglobulines E spécifiques dans les sérums étudiés, IgE ayant été mises en évidence par la technique d'anaphylaxie in vitro sur poumon de singe.

Cette technique qui est une sorte de PRAUSNITZ-KÜSTNER homme-singe est donc assez satisfaisante mais, en aucun cas, elle peut devenir une technique de routine pour la mise en évidence des IgE sériques spécifiques.

En effet les singes sont coûteux et fragiles et après une de nos expériences un singe a dû être sacrifié. Les analyses histologiques ont montré des lésions rénales de type glomérulonéphrite. Le bleu Evans en était-il la cause ? C'est la raison pour laquelle nos essais ont dû être interrompus.

## B) Dégranulation des mastocytes de Rat :

Parmi les techniques in vitro permettant de mettre en évidence des immunoglobulines E spécifiques, nous avons déjà cité la dégranulation des mastocytes de rat.

### Principe :

Des mastocytes de rat sont mis en présence de sérum humain et de l'antigène responsable. Une dégranulation des mastocytes se produit s'il y a présence d'IgE spécifiques entraînant une libération d'histamine qui est dosée par la méthode biologique classique.

Nous avons essayé de pratiquer cette technique qui semblait simple et rapide d'après certains auteurs : PERELMUTTER et KHERA (1969), GILLMAN et HADDAD (1972). Sur 8 rats nous avons étudié 4 sérums contenant des IgE anti-pénicilline et 4 sérums pour lesquels la mise en évidence de ces IgE avait été négative.

### Description de la technique :

Des rats mâles Whistar sont anesthésiés par du chloroforme ou de l'éther et tués rapidement par saignée totale. Dix ml de Milieu 199 (Institut Pasteur, Paris) contenant de l'acide éthylènediamine tétraacétique (0,5 mg/ml) sont injectés dans la cavité péritonéale du rat. Le pH de cette solution est ajusté à 6,8 - 7. Après avoir massé doucement l'abdomen du rat pendant 90 secondes, le péritoine est incisé et la suspension mastocytaire recueillie dans des tubes en polystyrène est centrifugée à froid à 170 g. pendant 10 minutes.

Le culot est repris par 6 ml de Milieu 199 et à partir de cette suspension mastocytaire (SM) les différents lots sont constitués dans des tubes à hémolyse en polystyrène (tableau V ). Une numération est effectuée.

Ces lots ainsi constitués sont placés au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes, puis centrifugés à froid à 170 g. pendant 8 minutes.

	S.M	S	A	Tyrode
1	1	0	0	1
2	1	0	0,1	0,9
3	1	0,2	0	0,8
4	1	0,2	0,1	0,7

Tableau : V

Constitution des différents lots témoins et des lots d'expérience (en ml)

S M = 1 ml de suspension mastocytaire

S = 0,2 ml du sérum de malade

A = 0,1 ml de pénicilline à 800 U/ml

T = liquide de Tyrode en ml

tube n° 1 = tube témoin

tube n° 2 = tube témoin antigène

tube n° 3 = tube témoin sérum

tube n° 4 = tube d'expérience sérum + antigène



Dans le surnageant de chaque tube l'histamine est dosée par la méthode biologique sur iléon isolé de cobaye.

Le culot de chaque tube est étalé sur au moins deux lames et coloré suivant la méthode de MAY-GRÜNWARD-GIEMSA. On évalue le pourcentage des mastocytes intacts sur 2000 éléments cellulaires. La reconnaissance des mastocytes est très facile puisqu'il s'agit d'une cellule isolée, sphérique de 15 à 30 microns de diamètre. Elle est caractérisée principalement par la présence de volumineuses granulations bleues foncé, sans cytoplasme ni noyau visible.

### RESULTATS

Sur chaque tube d'expérience sont étudiés parallèlement la libération d'histamine dans le surnageant et le comptage des mastocytes intacts sur les lames.

Avec les tubes témoins-pénicilline seuls, nous avons obtenu une dégranulation de façon inconstante.

Avec les tubes témoins-sérums, qu'il s'agisse des sérums avec IgE spécifiques ou des sérums sans IgE anti-pénicilline, nous avons observé également une dégranulation des mastocytes de façon inconstante.

Avec les tubes contenant sérum et antigène, une dégranulation a toujours été observée quel que soit le sérum étudié.

### DISCUSSION

Cette technique n'est pas valable d'une part en raison de la dégranulation spontanée observée dans les tubes témoins et d'autre part parce qu'une différenciation entre sérums positifs et négatifs est impossible.

Nos résultats sont donc opposés à ceux de PERELMUTTER mais il faut signaler qu'HADDAD (1972), par la suite, a reconnu obtenir une dégranulation avec les sérums seuls. De plus PLAUT,

LICHTENSTEIN et BLOCH (1973) ont essayé sans succès d'appliquer cette technique. Ils ont utilisé des sérums de sujets sensibilisés à l'ambroisie. Ils ont également fait agir sur les mastocytes de rat la protéine du myélome à IgE et des anticorps de lapin anti-IgE pour essayer de déclencher une libération d'histamine : ils ne l'ont pas obtenue.

On peut se demander si vraiment les IgE humaines, malgré leur caractère homocytotrope, se fixent sur les mastocytes de rat ou bien si le complexe IgE-antigène provoquerait la dégranulation des mastocytes.

Après ces échecs, nous avons voulu voir si, à l'inverse, des IgE de rat se fixeraient sur du tissu de Primates.

En appliquant la technique d'anaphylaxie passive in vitro décrite précédemment, nous avons essayé avec un sérum de rat riche en IgE\* (10 mg/ml) de fixer ces immunoglobulines E sur des morceaux de poumon de singe. Le déclenchement a lieu avec du sérum de bouc anti-IgE de rat, puis l'histamine libérée est dosée.

Tous témoins faits et déduits, la libération d'histamine des lots d'expérience n'était pas supérieure à celle des lots témoin - poumon seul ou témoin anti-IgE seul.

Il ne semble donc pas y avoir d'identité entre les immunoglobulines E humaines et les immunoglobulines E de rat.

\* Nous remercions vivement le Docteur BAZIN du laboratoire de Monsieur HEREMANS qui a bien voulu nous procurer les IgE de rat et le sérum anti-IgE de rat.

II<sup>ème</sup> PARTIE

Nous venons donc de voir que dans l'allergie médicamenteuse de type immédiat un certain type d'anticorps était souvent mis en cause. Mais à côté des immunoglobulines E sériques d'une part et fixées de l'autre, il y a d'autres types d'anticorps intervenant dans les manifestations allergiques. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier l'allergie médicamenteuse à manifestations uniquement cutanées en cherchant à mettre en évidence d'autres réactions immunitaires. Cette étude porte sur 38 cas.

CHOIX DES MALADES :

Cette étude a porté sur 38 cas d'accidents cutanés récapitulés dans le tableau X . La responsabilité du médicament a été évaluée de + à +++ selon les critères suivants : plusieurs médicaments pris conjointement peuvent être responsables de l'accident (+) ; un seul médicament peut être suspecté (++) ; une réintroduction fortuite a déterminé une récurrence (+++).

Sujets témoins : chacun des médicaments a été étudié chez des sujets indemnes de toute sensibilisation. L'administration du médicament était interrompue 30 jours avant l'examen.

ANTIGENES UTILISES :

Les 38 cas de toxidermies se répartissent de la façon suivante : tableau VI

Médicaments étudiés	Nombre de cas
Pénicilline - Ampicilline	9
Acide acétylsalicylique	8
Phénobarbital	8
Sulfamides	5
Sulfate de quinine	3
Allopurinol	2
Sulfate de colistine	1
Cyclines	1
Aurothiopropanol	1

TECHNIQUES UTILISEES :

Pour chaque cas, à côté de l'étude clinique analytique des lésions cutanées des toxidermies et d'un examen histopathologique portant sur chaque type de lésion, une exploration in vitro a été faite en utilisant essentiellement 3 tests de signification distincte.

- Recherche d'IgE spécifiques sériques par anaphylaxie passive in vitro destinée à explorer l'hypersensibilité humorale de type anaphylactique.

- Test de migration leucocytaire qui a été adapté à cet effet aux antigènes médicamenteux et qui témoignerait d'une hypersensibilité de type cellulaire.

- Test de transformation lymphoblastique qui explore à la fois l'immunité cellulaire et humorale.

De plus dans certains cas un dosage d'IgE totales a été pratiqué ainsi qu'une hémagglutination passive pour la pénicilline.

Nous ne reviendrons pas sur la technique d'anaphylaxie passive in vitro sur poumon de singe qui a été étudiée en détail dans la 1ère partie de cette thèse. Nous signalons cependant qu'une recherche d'IgE spécifiques sériques a été faite, dans la plupart des cas, le 1er jour de l'accident cutané et le 30è jour après la survenue de l'accident. La technique pratiquée a été celle décrite plus haut et les concentrations antigéniques celles indiquées aussi précédemment.

A) Test de migration leucocytaire (T.M.L.) :

La migration spontanée et naturelle des leucocytes circulants humains hors d'un tube capillaire où ils ont été placés peut être spécifiquement inhibée par l'introduction dans le milieu de culture d'un antigène auquel le sujet est sensibilisé.

La technique utilisée est voisine de celle décrite par SØBORG et BENDIXEN (1967). Elle a été adaptée à l'allergie médicamenteuse par SAURAT (1973).

Quarante à soixante ml de sang sont recueillis sur héparine non phénolée et sédimentent 1<sup>re</sup> heure à 37°C. On prélève le surnageant contenant les cellules blanches qui est centrifugé 5 minutes à 800 tpm ; la plasma est aspiré et le culot cellulaire lavé 3 fois dans du milieu de Hanks à 37°C. Les éléments cellulaires sont alors remis en suspension dans 1 ml de Milieu 199 contenant 10 p.cent de sérum de poulain. La suspension, ramenée à 30 000 000 de cellules blanches par ml, est reprise dans des tubes à microhématocrite stériles, centrifugée à 2 000 tpm pendant 5 minutes. On sectionne 1 mm au-dessus du culot cellulaire chaque tube à microhématocrite et on le place dans une chambre de migration en verre siliconé stérile où il est maintenu par de la graisse siliconée. Les chambres sont remplies de Milieu 199 contenant 10 p.cent de sérum de poulain seul (témoin) ou additionné des antigènes à concentrations variables. L'obturation des chambres par des lamelles stériles est immédiate et totalement hermétique. La migration dure 18 heures à 37°C. L'ensemble de la manipulation a été réalisée le plus stérilement possible, sous hotte.

Pour la lecture, une loupe binoculaire avec chambre de lecture est utilisée ce qui permet à la fois d'étudier morphologiquement l'aspect de l'aire de migration, de s'assurer objectivement de l'absence de toute faute technique, de dessiner enfin avec précision la circonférence de l'aire de migration qui est alors mesurée au planimètre. On compare ainsi la moyenne des aires dans la série avec antigène pour chacune des concentrations.

Le pourcentage d'inhibition correspond au rapport :

$$100 - \frac{100 \text{ (surf.migr. avec Ag)}}{\text{surf.migr. sans Ag}}$$

Sont considérés comme positifs les tests donnant une inhibition supérieure à 25 p.cent par rapport à la moyenne des migrations témoins.

Les antigènes utilisés sont préparés extemporanément et les dilutions intermédiaires sont réalisées dans du Milieu 199 contenant 10 p.cent de sérum de poulain.

Les produits suivants ont été employés :

- Benzylpénicillinate de sodium (500, 1 000, 10 000, 20 000 et 100 000 U/ml).

- Phénobarbital (sel sodique à 20, 40, 80, 160, 320 et 640 mcg/ml).

- Sulfamérazine sodique : 20, 40, 80 mcg/ml.

- Colistine méthane sulfonate de sodium : 40, 80, 160 mcg/ml.

- Formiate basique de quinine : 20, 40, 80 et 160 mcg/ml.

- Rolitétracycline : 30, 60, 120, 180 mcg/ml
- Aurothiopropanol sulfonate de sodium : 100, 400, 800, 2 000, 4 000, 10 000 mcg/ml.

Le pH des différentes solutions est ajusté à 7,4.

Pour les 38 toxidermies étudiées, le T.M.L. a été pratiqué le 30<sup>e</sup> jour après l'accident.

B) Test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) :

Son principe repose sur la "reconnaissance" par les lymphocytes de l'antigène responsable de la sensibilisation. Cette "reconnaissance" détermine une "dépression" du petit lymphocyte traduite par des modifications morphologiques caractéristiques (transformation lymphoblastique) et comportant d'importantes activités de synthèse (que l'on peut objectiver en incorporant au milieu des précurseurs marqués).

A côté de cette mémoire du lymphocyte sensibilisé vis-à-vis de l'antigène, de nombreuses substances peuvent induire les mêmes phénomènes de transformation par des mécanismes non spécifiques, souvent purement pharmacologiques. Cette notion implique la nécessité de pratiquer pour chaque nouveau produit utilisé une série de témoins éliminant une telle possibilité.

On utilise la technique de PAPIERNIK (1970).

Cinq à dix ml de sang sont prélevés sur seringue héparinée avec les précautions d'asepsie d'une hémoculture. On laisse sédimenter pendant 1 à 2 heures à l'étuve à 37° puis on décante le plasma exsudé riche en lymphocytes. On le répartit dans environ 6 tubes de Barski-Leighton à raison généralement de 0,5 ml de plasma par tube. On ajoute ensuite 1,5 ml de Milieu 199 ainsi que l'antigène à différentes concentrations.

Chaque tube est obturé et mis à l'étuve à 37°C. La durée d'incubation est en général de 4 jours. A la fin de la période d'incubation, on transvase le contenu de chaque tube dans un tube conique de centrifugation et on centrifuge à 800 tpm pendant 10 minutes. On décante délicatement le surnageant, le culot cellulaire restant dans la partie distale effilée. On fait trois frottis pour chaque culot qui sont colorés selon la méthode de May-Grünwald-Giemsa.

La lecture est optique : mille cellules au moins sont comptées sur chaque lame. Seules les vraies cellules blastiques sont retenues (grande taille, gros nucléoles, cytoplasme bleuté).

Un T.T.L. est considéré comme positif quand à la fois d'une part le pourcentage de cellules blastiques dans un ou plusieurs tubes contenant les dilutions antigéniques est au moins deux fois plus élevé que celui du tube témoin et d'autre part que ce pourcentage est supérieur à 3 p.100.

Les antigènes ont été utilisés aux doses suivantes :

- Benzyl pénicillinate de sodium : 250, 500, 750, 1 000 U/ml.
- Phénobarbital (sel sodique) : 5, 10, 20, 40 mcg/ml
- Acide acétyl salicylique (sel de lysine) : 10, 15, 20, 40, 100 mcg/ml.

- Sulfamérazine sodique : 25, 50, 1 000 mcg/ml
- Colistine méthane sulfonate de sodium : 25, 100, 250 U/ml
- Formiate basique de quinine : 10, 20, 40, 100 mcg/ml
- Rolitétracycline : 60, 120 mcg/ml
- Allopurinol : 2, 4, 10, 20, 40, 100 mcg/ml
- Aurothiopropanol : 5, 10, 20, 50, 100 mcg/ml.

Pour les 38 toxidermies étudiées, le T.T.L. a été pratiqué le 30<sup>e</sup> jour après la survenue de l'accident.

#### C) Dosage des IgE totales\*:

Dans la plupart des cas, un dosage d'immunoglobulines E totales a été pratiqué dès le premier jour et le 30<sup>e</sup> jour après la survenue de l'accident. Ce dosage est fait suivant la technique du RIST qui a été décrite dans la 1<sup>ère</sup> partie de ce travail.

#### D) Hémagglutination passive (H.G.P.) :

Enfin dans certains cas, une hémagglutination passive (H.G.P.) a été pratiquée. Il s'agit d'une technique permettant de détecter des immunoglobulines G ou M.

La technique appliquée est celle de WECK (1964) : sur des hématies humaines du groupe O on fixe la pénicilline et on observe une agglutination de ces hématies lorsque le sérum du malade est ajouté si celui-ci contient des anticorps anti-médicament. Des dilutions croissantes du sérum décomplémenté du malade sont mises en contact avec les hématies et on note la dernière dilution pour laquelle une hémagglutination est observée.

\* Nous remercions vivement Monsieur le Professeur Agrégé François RUFF qui a bien voulu pratiquer les dosages des IgE sériques totales.

Cette technique n'est pratiquement utilisable que pour la pénicilline qui a la propriété de former des liaisons covalentes in vitro avec les hématies. La plupart des autres médicaments ne forment pas de telles liaisons et requièrent l'introduction de techniques indirectes de fixation ce qui rend les résultats moins reproductibles. La présence d'anticorps IgG ou IgM différenciés par l'action du mercaptoéthanol n'est pas nécessairement pathogène. En effet de nombreux sujets ayant reçu un traitement pénicilliné possèdent ces anticorps sans avoir fait d'accident cliniquement décelable.

L'hémagglutination passive a été pratiquée sur le sérum de sujets sensibilisés uniquement à la pénicilline le 30<sup>e</sup> jour après l'accident.

## R E S U L T A T S

Données fournies par les études immunologiques spécifiques du médicament :

### a) Anticorps homocytotropes :

Sur 38 cas, il a été retrouvé 34 fois des anticorps circulants homocytotropes anti-médicament dans le prélèvement du 1er ou du 30è jour.

Dans 23 cas la recherche est effectuée le 1er et le 30è jour chez le même malade.

Dans 11 cas le résultat est positif le 1er et le 30è jour.

Dans 7 cas le prélèvement initial est négatif et le second positif.

Dans 4 cas le prélèvement initial est positif et le second négatif.

Dans un cas enfin les deux prélèvements sont négatifs.

Ces différences ne semblent corrélées ni avec un type particulier d'accidents cliniques ni avec une augmentation ou une diminution du taux des IgE totales entre le 1er et le 2è prélèvement. Tableau VII.

### b) IgE Totales :

Actuellement le taux normal moyen des IgE totales est égal ou inférieur à 200 U/ml.

Les IgE sériques totales sont 5 fois augmentées, 11 fois normales le 1er jour ; 4 fois augmentées et 16 fois normales le 30è jour. Lorsque le dosage a été pratiqué chez le même malade le 1er et le 30è jour (9 cas) il n'a été observée que dans 3 cas une diminution entre le premier et le second prélèvement. Tableau VIII

TABLEAU VII

MEDICAMENTS ETUDIES	NOMBRE DE CAS	PRESENCE D'IGE SERIQUES SPECIFIQUES
PENICILLINE	9	8
ACIDE ACETYL SALICYLIQUE	8	7
PHENOBARBITAL	8	6
SULFAMIDES	5	5
QUININE	3	3
ALLOPURINOL	2	2
SULFATE DE COLISTINE	1	1
CYCLINES	1	1
AUROTHIO PROPANOL	1	1
TOTAL	38	34 87%

PRESENCE  
 ABSENCE

TABLEAU VIII

	1 <sup>er</sup> JOUR		30 <sup>ème</sup> JOUR	
	IgE SERIQUES	IgE TOTALES	IgE SERIQUES	IgE TOTALES
	SPECIFIQUES	U/ML	SPECIFIQUES	U/ML
ASCULITE 1	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	250
LICHENOÏDES 2	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	460
S. de LYELL 2	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	120
BULLOSES 9	<input type="checkbox"/>	1000	<input type="checkbox"/>	440*
	<input type="checkbox"/>	90	<input type="checkbox"/>	90
	<input type="checkbox"/>	90	<input type="checkbox"/>	90
	<input type="checkbox"/>	1800	<input type="checkbox"/>	1700
ERYTHEMES PIGMENTES FIXES 4	<input type="checkbox"/>	40	<input type="checkbox"/>	60
	<input type="checkbox"/>	50	<input type="checkbox"/>	140
ERUPTIONS PAPULO- VESICULEUSES 5	<input type="checkbox"/>	30	<input type="checkbox"/>	450*
	<input type="checkbox"/>	950	<input type="checkbox"/>	
ERUPTIONS MACULO- PAPULEUSES 9	<input type="checkbox"/>	550	<input type="checkbox"/>	290*
	<input type="checkbox"/>	120	<input type="checkbox"/>	50
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	30
	<input type="checkbox"/>	200	<input type="checkbox"/>	50
	<input type="checkbox"/>	75	<input type="checkbox"/>	
URTICAIRES 6	<input type="checkbox"/>	400	<input type="checkbox"/>	220
	<input type="checkbox"/>	255	<input type="checkbox"/>	205
	<input type="checkbox"/>	205	<input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	280
			<input type="checkbox"/>	25
PRESENCE IGE SPECIFIQUES	18/26 69%		28/35 80%	



c) Test de migration leucocytaire (T.M.L.) :

Les résultats obtenus pour chacun des médicaments sont donnés au tableau X (récapitulatif).

Sur 38 cas, 14 tests sont positifs : 4 pour la pénicilline, 3 pour l'acide acétyl salicylique, 4 pour le phénobarbital, un pour les sulfamides, un pour le sulfate de colistine, un pour l'aurothiopropanol.

d) Test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) : Tableau I

Sur les 38 tests effectués, 25 sont positifs : 5 pour la pénicilline, 6 pour l'acide acétyl salicylique, 7 pour le phénobarbital, 2 pour les sulfamides, 2 pour la quinine, un pour l'allopurinol, un pour le sulfate de colistine, un pour l'aurothiopropanol.

e) Hémagglutination passive :

Sur les 9 accidents dûs à la pénicilline ou à l'ampicilline, 6 H.G.P. ont été réalisées au 30<sup>e</sup> jour. Deux cas seulement sont positifs.

Les résultats des différentes techniques appliquées sur ces 38 cas de toxidermies sont comparés dans un tableau récapitulatif.

TABLEAU IX

MEDICAMENTS ETUDIES	NOMBRE DE CAS	T.T.L POSITIFS
PENICILLINE	9	5
ACIDE ACETYL SALICYLIQUE	8	6
PHENOBARBITAL	8	7
SULFAMIDES	5	2
QUININE	3	2
ALLOPURINOL	2	1
SULFATE DE COLISTINE	1	1
CYCLINES	1	
AUROTHIO PROPANOL	1	1
TOTAL	38	25



positif  
négatif  
interrogatoire: plusieurs drogues suspectes

TABLEAU X



VAL DES POSITIFS	25	14	34	2	6	10	0
ASCUTITE 1	<input type="checkbox"/>						
LICHENOIDES 2	<input type="checkbox"/>						
de LYELL 2	<input type="checkbox"/>						
ULLOSES 3	<input type="checkbox"/>						
ATHEMES MEMENTES NES 4	<input type="checkbox"/>						
RUPTIONS ACULO- ESICULEUSES 5	<input type="checkbox"/>						
RUPTIONS ACULO- ESICULEUSES 6	<input type="checkbox"/>						
RUPTIONS ACULO- ESICULEUSES 9	<input type="checkbox"/>						
ARTICAIRES 6	<input type="checkbox"/>						

\* 38 CAS DE TOXIDERMIE \*

T.T.L. T.M.L. A.P.S. H.G.P. EPICU. INTER. I.D. 2. ID.

## D I S C U S S I O N

Les résultats de l'étude in vitro de 38 cas de toxidermies peuvent être discutés selon deux modalités distinctes. On considérera d'une part l'apport de cette étude du diagnostic d'accidents médicamenteux et d'autre part les déductions pathogéniques qu'elle autorise.

### I. Valeur des tests utilisés :

Le tableau X montre que des trois tests utilisés le plus sensible est, de loin, la recherche d'IgE spécifiques sériques lorsque celle-ci est répétée à deux reprises le 1er et le 30è jour au décours de l'accident clinique : en effet sur 38 cas, 34 sont positifs soit 87 p.cent. La technique utilisée semble extrêmement sensible puisque, alors que les taux d'IgE totales circulantes n'étaient parfois que de 30 U/ml (c'est-à-dire environ 60 nanogrammes), la technique a néanmoins permis de déceler des IgE anti-médicament dont le taux était donc égal ou inférieur à 60 nanogrammes.

Dans 9 cas, le dosage des IgE totales a été pratiqué chez le même malade le 1er et le 30è jour après la survenue de l'accident. Dans 3 cas seulement une diminution du taux total entre le premier et le second prélèvement a été observée et cette diminution ne peut s'expliquer par le traitement puisqu'aucun des malades de notre série n'a reçu des corticoïdes ou des immunodépresseurs.

Les immunoglobulines E sériques totales sont inconstamment élevées et il n'est pas possible d'établir un parallélisme entre la présence d'IgE spécifiques et la variation des IgE totales. Donc un taux normal d'IgE ne permet pas d'exclure la présence d'une sensibilisation vis-à-vis d'un médicament précis.

L'inhibition du T.M.L. témoignerait d'une sensibilisation de type purement cellulaire. La corrélation du T.M.L. avec l'hypersensibilité à médiation cellulaire (H.M.C.) est admise par la plupart des auteurs. L'utilisation de cette technique en allergie médicamenteuse a été jusqu'ici très limitée. Le travail présenté ici montre l'intérêt du test dans cette indication.

Le T.M.L. a été retrouvé 14 fois positif sur 38 cas, soit à peine 37 p. cent. Il ne paraît pas représenter une méthode adaptée aux problèmes de dépistage des accidents médicamenteux.

Le faible pourcentage du T.M.L. positif pourrait s'expliquer par des problèmes d'ordre technique :

la plupart des médicaments sont utilisés sous forme soluble et l'on sait que le T.M.L. est moins maniable lorsqu'on emploie des antigènes non particuliers.

L'utilisation des médicaments sans couplage préalable à une protéine peut constituer un obstacle puisque l'haptène seul ne peut entraîner une hypersensibilité à médiation cellulaire. Cependant il est permis de penser qu'un couplage préalable n'est pas absolument souhaitable. Il est possible en effet que la combinaison nécessaire se produise dans le milieu pendant le temps d'incubation en présence des différents éléments cellulaires. Le couplage préalable du médicament à une protéine

pourrait peut-être contrarier cette combinaison. D'autre part sauf pour la pénicilline, les connaissances sur les métabolites responsables des sensibilisations médicamenteuses sont limitées, ce qui rend difficile le choix du produit à coupler. Des médicaments non couplés sont communément employés dans le système du test de transformation lymphoblastique et des transformations spécifiques sont obtenues. De leur côté ROCKLIN et DAVID (1971) ont montré que les lymphocytes de sujets sensibilisés pouvaient libérer du M.I.F. en présence de médicament non couplé.

Ces problèmes techniques ne semblent pas cependant seuls en cause et il est possible que la négativité du T.M.L. dans un grand nombre de cas ait une signification immunologique qui sera envisagée plus loin.

Le test de transformation lymphoblastique est positif dans 24 cas sur 38, soit 68 p. cent. Ce pourcentage est inférieur aux chiffres habituellement publiés et rend compte vraisemblablement de la méthode de lecture puisque ne sont retenus que les blastes vrais.

La signification immunologique de la transformation lymphoblastique est complexe. Il est généralement admis (dans les conditions techniques habituelles de réalisation en allergie médicamenteuse) que le T.T.L. puisse témoigner à la fois d'une sensibilisation de type humoral et de type cellulaire et ne permette pas de distinguer l'une de l'autre. L'induction d'une transformation blastique spécifique par le médicament suspect sur les lymphocytes d'un sujet permet donc d'affirmer qu'une réaction immunitaire dirigée contre ce médicament a eu lieu chez le sujet. Elle n'implique aucunement que cette réaction immunitaire soit pathogène.

Au total, l'enquête in vitro lorsqu'elle associe plusieurs tests, confirme toujours l'impression clinique de sensibilisation médicamenteuse, mais elle permet surtout, au sein d'une association de plusieurs produits, de déceler la drogue responsable. Cependant une enquête négative, surtout si elle ne comporte qu'un test, ne saurait en aucune façon permettre d'exclure la sensibilisation.

## II. Déductions pathogéniques :

Une remarque préliminaire s'impose : il convient de ne pas se méprendre sur la signification des tests in vitro. Comme on l'a souligné plus haut, la positivité de ces tests ne signifie pas que la sensibilisation qu'ils objectivent soit responsable des troubles cliniques observés. Dans un but diagnostique, la constatation parallèle d'un accident qui semble être déclenché par un médicament et d'une sensibilisation à ce médicament, objectivée par les tests in vitro, permet de penser que la sensibilisation est responsable de l'accident. D'un point de vue théorique une telle extrapolation est criticable puisque la preuve formelle du caractère pathogène de la sensibilisation manque souvent. Ce problème théorique étant, en l'état actuel des techniques, difficile à résoudre, la discussion pathogénique est basée sur des arguments de probabilité dont deux nous paraissent importants :

- d'une part l'existence d'un type particulier de sensibilisation chez des sujets faisant un accident médicamenteux alors que ce type de sensibilisation manque chez les sujets recevant le médicament sans incident.

- d'autre part la corrélation entre la survenue d'un type anatomoclinique d'accident et l'existence d'un type particulier de sensibilisation.

a) signification de la présence d'IgE sériques spécifiques

Le rôle pathogène des IgE antimédicament est probable dans la mesure où la "fonction" de ces anticorps est de sensibiliser les tissus. Les contrôles pratiqués jusqu'ici chez des sujets recevant le médicament sans incident ont été négatifs.

Il nous semble donc que la présence d'IgE sériques spécifiques du médicament puisse être considérée comme très probablement pathogène.

Les IgE spécifiques ont été retrouvées dans tous les groupes anatomocliniques. On peut penser qu'un mécanisme de type I (selon la classification de Gell et Coombs) est probablement impliqué isolément ou conjointement à d'autres mécanismes dans tous les accidents allergiques médicamenteux cutanés qu'ils rentrent ou non dans ce groupe d'hypersensibilité de type I.

b) signification d'un test de migration leucocytaire positif

On a déjà signalé que le T.M.L. explorait probablement l'hypersensibilité à médiation cellulaire (H.M.C.). Le rôle pathogène de l'H.M.C. anti médicament est pratiquement inconnu, exception faite des dermites de contact.

ROCKLIN et DAVID (1971) ont montré (en utilisant la technique d'inhibition de la migration des macrophages péritonéaux de cobaye par des surnageants de culture lymphocytaire en présence de médicament), que l'H.M.C. anti médicament pouvait accompagner des accidents médicamenteux succédant à une administration du produit par voie générale.

Les séries de T.M.L. que nous avons faites chez des sujets ayant reçu de l'acide acétyl salicylique et de la pénicilline sans manifester d'intolérance n'ont pas révélé de résultats positifs. Il semble cependant prématuré de conclure à partir de ces seuls arguments sur la valeur du T.M.L. dans l'affirmation du caractère pathogène de la sensibilisation.

c) signification du T.T.L. positif

HALPERN (1972) a montré que le test était presque toujours positif chez les sujets ayant présenté un accident clinique alors que le résultat était négatif en l'absence d'accident. Nos constatations personnelles confirment ces notions. Etant donné les incertitudes qui persistent quant à la signification immunologique du test, il semble aussi prématuré d'affirmer que la positivité d'un T.T.L. traduise à la fois la sensibilisation d'un sujet et le caractère pathogène de cette sensibilisation.

## DISCUSSION

La plupart des médicaments sont des haptènes : leur pouvoir immunogène, donc sensibilisant, provient de leur fixation à des protéines. On ignore le plus souvent le type de protéine auquel se lie le médicament ou un de ses métabolites pour devenir immunogène. On ignore aussi souvent le ou les métabolite(s) du médicament qui entre(nt) dans cette liaison et qui représente(nt) les déterminants antigéniques.

Il y a d'un côté le pouvoir antigénique qui peut être différent pour une même "famille" de corps.

De l'autre côté le déclenchement de la réaction antigène-anticorps chez le sujet sensibilisé peut se faire par toute une série de corps ayant une "parenté" chimique : c'est le problème des réactions croisées.

Chaque groupe de médicaments sera étudié sous le double angle de l'antigénicité d'une part et de la réaction croisée de déclenchement de l'autre.

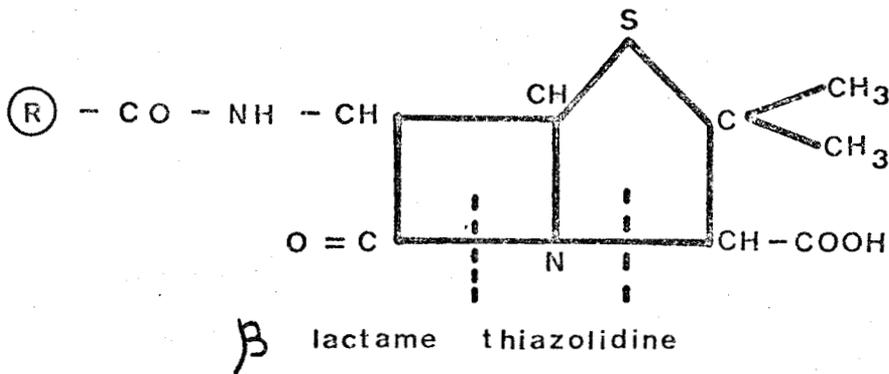


Problème des réactions croisées :

A - Les pénicillines et les céphalosporines :

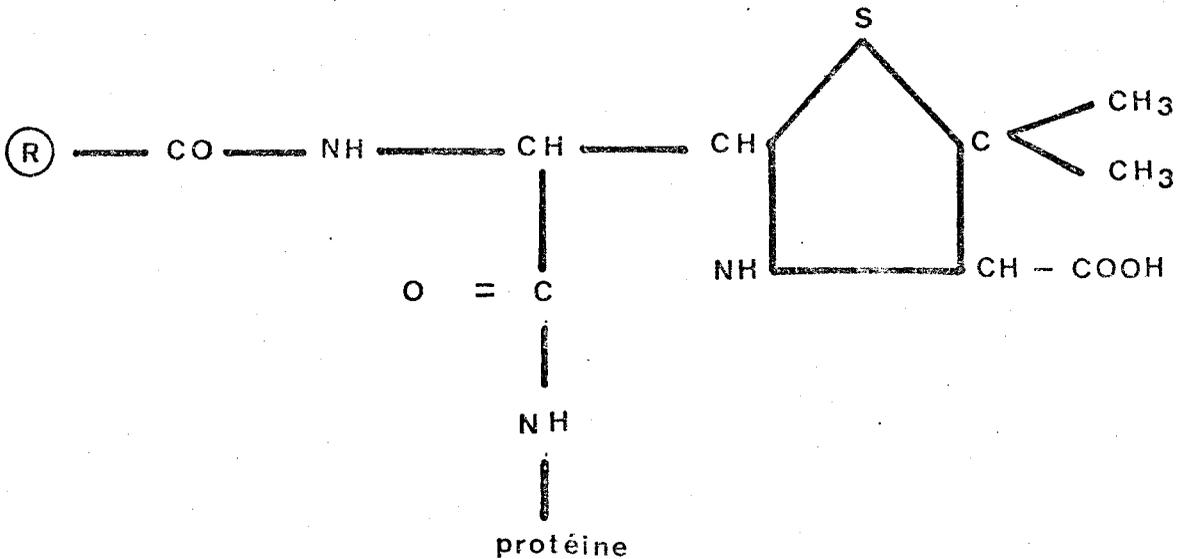
Comme nous l'avons dit au chapitre des résultats, les sérums de sujets suspects d'allergie à un type quelconque de pénicilline sont toujours étudiés avec de la Spécilline G.

En effet l'étude des pénicillines naturelles ou synthétiques montre que le noyau chimique de base commun est l'acide 6 amino - pénicillanique formé par l'union de 2 cycles : bêta-lactame et thiazolidine. Le radical R varie avec les différents types de pénicilline.



Acide 6 amino-pénicillanique

De ce noyau peu antigénique naissent spontanément, par ouverture du cycle bêta-lactame, des dérivés pénicilloyl qui se comportent comme des haptènes et ne sont antigéniques qu'après fixation sur une protéine. Ce groupement pénicilloyl-protéine qui représente le déterminant antigénique majeur de l'allergie aux bêta-lactamines, dérive du noyau de l'acide 6 amino-pénicillanique.



Groupement pénicilloyl - protéine.

La formation de ce groupement pénicilloyl - protéine à partir du noyau de l'acide 6 amino - pénicillanique peut se faire selon trois voies métaboliques :

- soit directement à partir de la pénicilline
- soit à partir de l'acide pénicillanique
- soit à partir du disulfide de cet acide.

BATCHELOR et coll. (1967) ont trouvé dans les préparations commerciales de pénicilline une impureté protéique pénicilloylée qui provenait probablement des procédés de préparation de la pénicilline (souche d'Escherichia Coli). Ils ont alors pensé diminuer de façon considérable les accidents allergiques en utilisant une benzyl-pénicilline purifiée. Ils semblent même l'avoir prouvé par des tests cutanés. Mais cette opinion n'est pas admise par tous.

Par ailleurs l'ampicilline est réputée très sensibilisante et donne de réelles réactions croisées avec la pénicilline.

Elle possède le noyau commun à toutes les pénicillines et le radical R est le suivant :

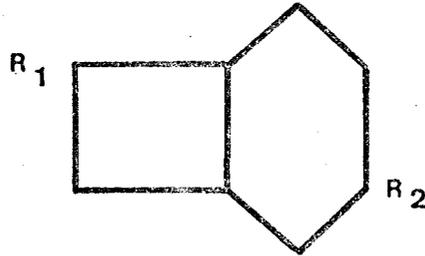


Le radical R de la pénicilline G est :



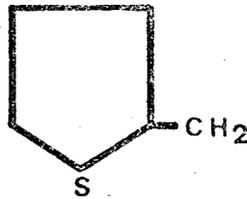
Pour certains, les accidents allergiques à l'ampicilline seraient dûs à la structure chimique propre de ce corps et à sa tendance particulière à subir une polymérisation interne. On peut aussi se demander si l'ampicilline ne serait pas plus antigénique que les autres pénicillines à cause du radical NH<sub>2</sub> libre qui favoriserait alors la fixation sur une protéine. Mais c'est une simple hypothèse de notre part.

Il est généralement admis qu'il y a des réactions allergiques croisées entre les pénicillines et les céphalosporines. La structure chimique de ces dernières est la suivante :



Céphalosporine : acide 7 amino-céphalosporénique.

Le radical  $R_1$



Le radical  $R_2$ , par exemple, pour la céphalotine, sera  $CH_3-COO$ .

Les céphalosporines paraissent certes moins allergisantes, mais leur utilisation est beaucoup moins répandue que celle des pénicillines et de l'ampicilline en particulier.

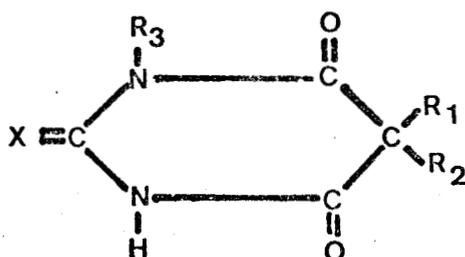
Lorsqu'un sujet possède des immunoglobulines E circulantes anti-pénicilline, le déclenchement de la réaction anaphylactique peut se faire par l'introduction dans l'organisme aussi bien d'une pénicilline, de l'ampicilline ou d'une céphalosporine et inversement.

Enfin il est un dernier point qu'il nous paraît important de signaler : certains accidents allergiques ont été signalés à la suite d'injection de pénicilline retard. Or le véhicule retard employé est souvent la procaïne, substance qui, comme nous l'avons vu, est elle-même allergisante. Il est donc important dans ce cas de déterminer la responsabilité de l'une ou de l'autre substance médicamenteuse, chacune pouvant impliquer une série de réactions croisées.

### B. les barbituriques

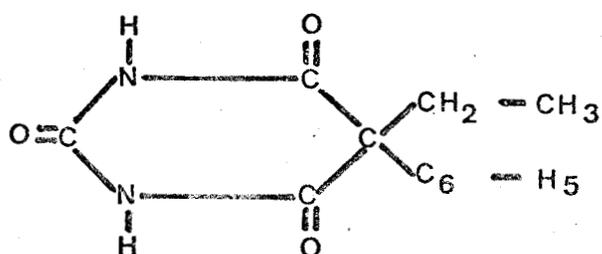
Nous ignorons totalement quel est le mode de liaison des malonylurées pour devenir antigéniques. Il est permis de penser, étant donné la grande consommation des barbituriques, que ces corps sont peu immunogènes. Ils provoquent cependant un certain nombre d'accidents.

Ce sont des corps dérivés de la malonylurée qui ont tous en commun la structure suivante :

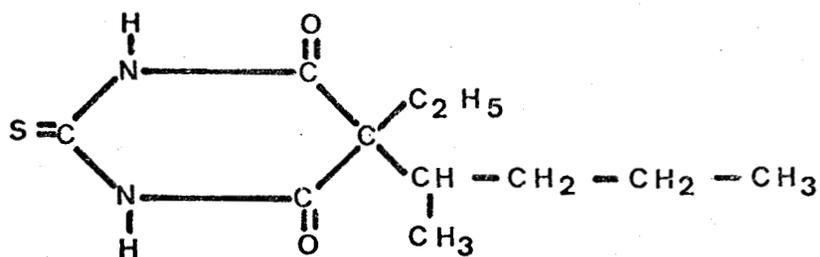


Les IgE formées seront donc dirigées contre ce noyau commun, les radicaux  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et X variant selon chaque corps.

Comme nous l'avons déjà dit, nous étudions les sérums suspects d'allergie aux dérivés de la malonylurée avec du phénobarbital qui est la phényléthylmalonylurée ou acide éthyl 5 - phényl 5 barbiturique.



Un sujet allergique au phénobarbital présentera vraisemblablement une allergie aux différents barbituriques puisqu'ils possèdent tous une structure commune. De même la plupart des anesthésiques généraux possèdent aussi cette structure : ainsi le thiopental :

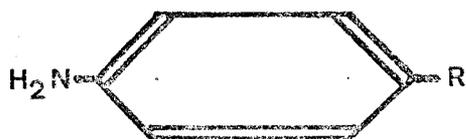


Nous n'avons pu le vérifier expérimentalement étant donné l'action toxique du penthotal sur l'iléon de cobaye.

C - Les sulfamides :

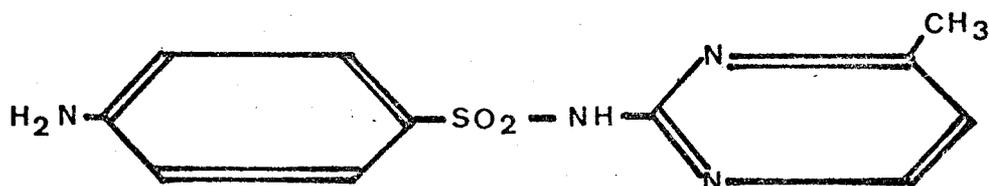
L'antigénicité relativement importante des sulfamides est reconnue par tous. La plupart de ces corps possédant un radical  $\text{NH}_2$  libre en position para, la liaison avec une protéine semble alors très facile. Ceci met aussi en évidence l'antigénicité de tous les corps ayant une fonction amine en position para : tous les sulfamides bactéricides, certains sulfamides hypoglycémiant, certains anesthésiques locaux et certaines matières colorantes.

Groupe para



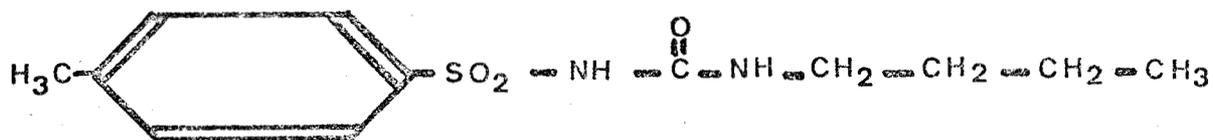
Rudolf MAYER (cité par Pasteur VALLERY-RADOT et coll.) a montré en 1928 que tous ces corps du groupe para libéraient dans l'organisme le même dérivé quinonique. Ceci explique qu'un sujet puisse fort bien présenter un accident lors d'une première absorption d'une de ces substances, le patient ayant été "préparé" par l'ingestion d'un autre produit chimiquement apparenté.

Nous avons dit précédemment que les sérums suspects d'allergie aux sulfamides étaient étudiés en présence de sulfamérazine dont la formule est la suivante :



En effet chez des malades ayant présenté des manifestations de type allergique après absorption des différents sulfamides, nous avons pu mettre en évidence des IgE spécifiques. Dans ce cas, le sérum était mis en présence ensuite systématiquement avec de la sulfamérazine et des IgE anti-sulfamérazine étaient détectées : ceci prouvait donc bien que les IgE étaient dirigées contre une partie de la molécule qui devait être commune à tous les sulfamides.

En effet un autre groupe de sulfamides a été aussi étudié : il s'agit des sulfamides hypoglycémiant type tolglybutamide dont la formule est la suivante :

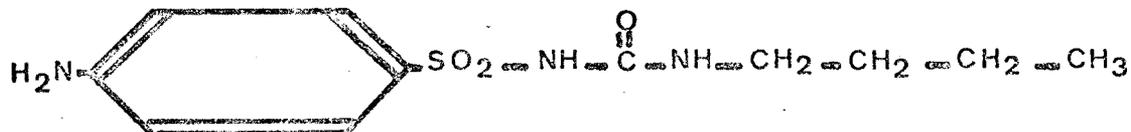


Nous pouvons alors constater que la partie commune de ces deux types de sulfamides est la suivante :



et que les immunoglobulines E détectées sont dirigées contre ce groupement de molécules. En effet ce cycle benzénique et les radicaux  $\text{SO}_2 - \text{NH}$  se retrouvent dans tous les sulfamides si bien qu'un sujet ayant présenté des manifestations allergiques après l'absorption d'un certain sulfamide aura vraisemblablement toutes les chances de développer des IgE anti-sulfamide quel qu'il soit.

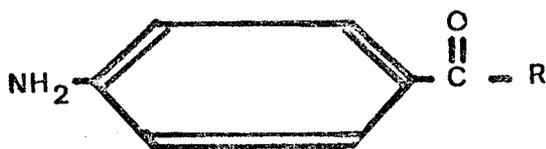
Par contre l'étude de la molécule d'un autre sulfamide hypoglycémiant : garglybutamide permet de constater qu'il présente un radical amine en position para sur le cycle benzène.



Donc cette catégorie de corps peut donner des réactions croisées avec presque tous les sulfamides et la partie commune devient alors :



Par ailleurs il est très important de connaître la possibilité de réactions croisées entre les sulfamides et les anesthésiques locaux. En effet certains de ces derniers, ont une sensibilité les uns par rapport aux autres et possèdent en commun le même squelette chimique :



Cette structure chimique rend compte de parentés antigéniques entre certains anesthésiques locaux et d'autres produits médicamenteux (sulfamides) ou non (paraphénylène diamine, colorants diazoïques).

La formule d'un colorant diazoïque usuel est la suivante :

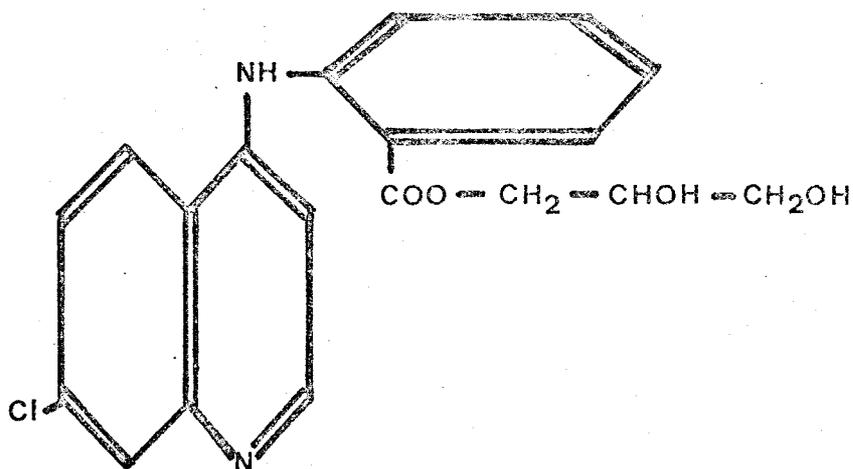


Il existe par contre tout un groupe d'anesthésiques locaux qui sont de structure chimique différente et qui ne sont en cosensibilité ni entre eux, ni avec les sulfamides, ni avec les colorants diazoïques.

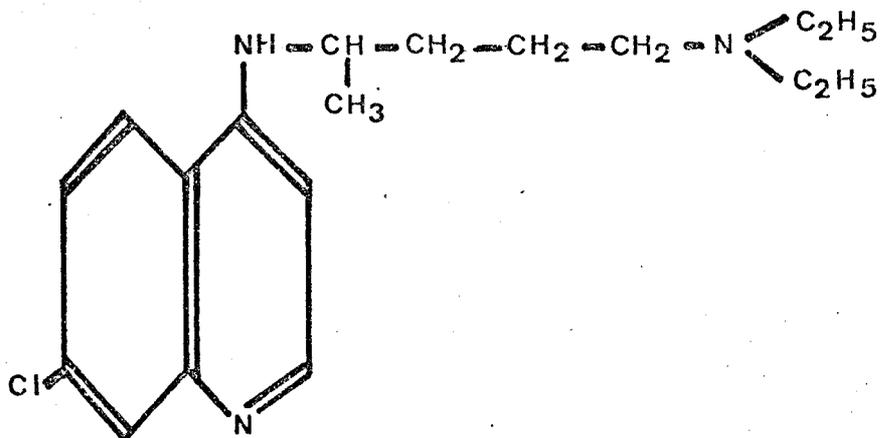
D - La glafénine :

En étudiant la molécule de glafénine, nous avons constaté qu'il y avait une "partie commune" avec les dérivés de la chloroquine : 4-amino 7-chloro quinoléine.

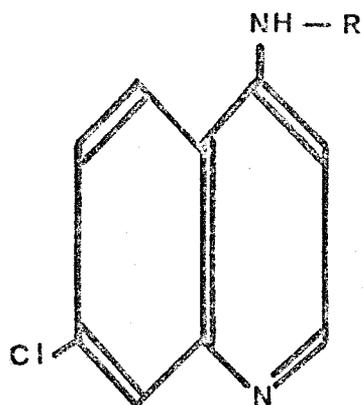
Glafénine



Chloroquine



Nous voyons donc que ces deux corps ont en commun le noyau 4-amino 7-chloro quinoléine. Les immunoglobulines E anti-glafénine d'une part et anti-chloroquine de l'autre ayant été mises en évidence pour le même sérum, on peut alors penser que ces anticorps sont dirigés contre le noyau commun :



Nous insistons donc sur le problème des réactions croisées parcequ'elles représentent un réel danger pour le sujet sensibilisé à une structure chimique donnée.

**RESUME**

Le premier but de ce travail est de mettre en évidence des immunoglobulines E sériques spécifiques en utilisant une technique d'anaphylaxie passive in vitro sur poumon de singe.

La mise au point de la technique a été faite grâce à l'étude de 80 sérums de malades sûrement sensibilisés aux pneumallergènes.

Avant tout début d'expérience, le poumon de singe est étudié seul et doit répondre à certaines conditions avant d'être utilisé pour la mise en évidence des IgE spécifiques. En effet, le poumon, issu d'un singe indemne de parasites digestifs ou sanguins et sacrifié sans anesthésie, ne doit pas avoir une activité histaminasique supérieure à 45 p. cent de perte en histamine. De plus la libération d'histamine par la n-octylamine (800 mcg/ml) doit être supérieure à 15 mcg par gramme de poumon. Ces conditions doivent être respectées totalement afin d'éviter un grand nombre de résultats faussement négatifs.

La technique se déroule en deux temps : d'abord la fixation des anticorps du sérum sur le tissu pulmonaire, puis le déclenchement de la réaction antigène-anticorps traduit par la libération d'histamine après introduction de l'antigène. La fixation des IgE sur le poumon se fait à 37°C pendant deux heures et en l'absence de calcium, le déclenchement de la réaction antigène-anticorps à 37°C pendant 45 minutes et en présence de calcium.

L'histamine libérée est dosée par la méthode biologique classique sur iléon isolé de cobaye.

Un sérum contient des IgE spécifiques lorsque le taux d'histamine donné par un lot d'expérience est supérieur à celui donné par la moyenne  $\pm 2 \sigma$  des lots témoins poumon-antigène.

Plus de 500 sérums ont été étudiés ; les antigènes mis en cause sont par ordre de décroissance : pénicilline et autres antibiotiques, acide acétyl salicylique, phénobarbital, sulfamides. Les résultats montrent que des immunoglobulines E ont été retrouvées dans 52 p.cent des cas pour la pénicilline, 50 p.cent pour l'acide salicylique, 46 p.cent pour le phénobarbital et 40 p.cent pour les sulfamides.

Toutes les recherches d'allergies aux pénicillines et aux céphalosporines sont faites avec de la Spécilline G : il a été démontré expérimentalement qu'il y avait réaction croisée entre ces deux types de corps. Chez un sujet sensibilisé aux pénicillines quelles qu'elles soient, le déclenchement de la réaction anaphylactique pourra avoir lieu avec une pénicilline ou une céphalosporine et inversement.

Il en est de même lorsque l'antigène suspecté est un dérivé de la malonylurée, nous utilisons le phénobarbital (acide éthylphényl barbiturique) car celui-ci possède la structure chimique commune à tout ce type de corps.

Nous avons également pu constater que, pour les allergies aux sulfamides, nous pouvons utiliser systématiquement la sulfamérazine qui possède la structure chimique commune à tous les sulfamides bactéricides, un certain nombre de sulfamides hypoglycémiants, d'anesthésiques locaux ou de matières colorantes.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié 38 cas d'allergie médicamenteuse à manifestations uniquement cutanées en cherchant à mettre en évidence, à côté de la présence d'IgE spécifiques, d'autres réactions immunitaires. Chez ces malades, un dosage d'IgE totales sériques, un test d'inhibition de la migration des leucocytes (T.M.L.), un test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) ont été pratiqués.

Sur 38 cas, des IgE spécifiques ont été retrouvées dans 34 cas soit 87 p.cent. Le T.M.L. a été positif dans 14 cas soit à peine 37 p.cent. Le T.T.L. positif dans 24 cas soit 68 p.cent.

Quant aux IgE totales, elles sont inconstamment élevées et il n'est pas possible d'établir un parallélisme entre la présence d'IgE spécifiques et la variation des IgE totales.

Ainsi donc, dans la batterie de tests nécessaires actuellement pour l'étude de l'allergie médicamenteuse, la mise au point d'une technique de semi-routine pour la mise en évidence des IgE sériques spécifiques est notre apport principal. Cette technique est reproductible, sensible, relativement aisée et peut s'appliquer à presque tous les médicaments.

## BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

- ASSEM E.S.K., SCHILD H.O.  
Detection of allergy to penicillin and other antigens by in vitro passive sensitization and histamine release from human and monkey lung.  
Brit.med.J., 1968, 3, n°5613, 272
- BATCHELOR F.R., DEWDNEY J.M., FEINBERG J.G., WESTON R.D.  
A penicilloylated protein impurity as a source of allergy to benzyl penicillin and 6 amino-penicillanic acid.  
Lancet, 1967, 7501, 1175
- BENNICH H.H., ISHIZAKA K., JOHANSSON S.G.O., ROWE D.S., STANWORTH D.R., TERRY W.D.  
Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin.  
J.Immunol., 1968, 100, 1143
- BENNICH H., JOHANSSON S.G.O.  
Studies on a new class of human immunoglobulins. II. Chemical and physical properties.  
in Killander J. (ed.) Gammaglobulins, Inter.Science Publishers, John Wiley and Sons, Inc. New York, 1968, voir p.199
- BENNICH H., JOHANSSON S.G.O.  
Structure and function of human immunoglobulin E.  
in Advances in Immunology, Ed.F.J.DIXON et H.G.KUNKEL, 1971, 13, 335 p.  
voir p.49
- BLOCH K.J., OHMAN J.L.  
Homocytotropic antibodies of guinea-pig, mouse and rat.  
in Biochemistry of the Acute Allergic Reactions, Ed.K.F.AUSTEN and E.L.BECKER, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburg, 1971, 1 vol. 356p. voir p.45
- BRUTTMANN G., AGNIUS-DELORD C., VILLEMAIN D., RINALDI R.  
Etude comparative des IgE dans l'allergie à la poussière et dans l'allergie à la poussière et aux acariens.  
Rev.franç.Allergol. 1974, 14, 139
- BURTIN C., SOUBRANE C.  
Detection of homocytotropic human antibodies by passive sensitization in vitro of monkey lung tissue.  
I. Optimum conditions for use of lung tissue.  
Biomedicine, 1973, 19, 217
- COCA A.F., GROVE E.F.  
Studies in hypersensitiveness. XIII. A study of the atopic reagins  
J.Immunol., 1925, 10, 445
- COMBS R.R.A., HUNTER A., JONAS W.E., BENNICH H., JOHANSSON S.G.O., PANZANI R.  
Detection of IgE (IgND) specific antibody (probably reagin) to castor bean allergen by the red-cell-linked antigen-antiglobulin reaction.  
Lancet, i, 1968, 1115

DALE H.H.

The anaphylactic reaction of plain muscles in the guinea-pig.  
J.Pharmacol. 1913, 4, 167

DESSAINT J.P.

Les anticorps IgE spécifiques dans les affections parasitaires.  
Thèse de Doctorat en Médecine, Lille, 1974, 143 pages.

DRY J., HERMAN D., CARTRON J.P., BLOCH-MICHEL E.

Immunoglobuline E sérique globale et maladies allergiques.  
Ann.Med.interne, 1974, 125, 145

GILLMAN S.A., HADDAD Z.H.

Histamine release from rat peritoneal mast cells after passive sensitization with human reaginic serum or E myeloma protein.  
J.Allergy Clin.Immunol. 1972, 50, 131

GOODFRIEND L.

In vitro detection of reagins.  
Excerpta med.international.Congr.Ser. Pays-Bas, 1968, n°162, 274

GOODFRIEND L., LUHOVYJ I.

In vitro detection of reagins in human atopic sera by monkey skin suspension technique.  
Int.Arch.Allergy, 1968, 33, 171

GREAVES M.W., YAMAMOTO S., FAIRLEY V.M.

New in vitro test for IgE mediated hypersensitivity in man.  
Brit.Med.J., 1972, 2, 623

HADDAD Z.H.

A critical appraisal of some recent in vitro diagnostic tests for immediate hypersensitivity - The rat mast cell test revisited.  
Ann.Allergy, 1972, 30, 599

HALPERN B.N.

Antibodies produced by drugs and methods for their detection.  
in Hypersensitivity to drugs. Vol.I, SAMTER M., PARKER C.W. ed.  
PERGAMON Press Oxford, 1972, 113

HEREMANS J.F., VAERMAN J.P.

IgA globulin as a possible carrier of allergic reaginic activity.  
Nature, 1962, 193, 1091

ISHIZAKA K.

Human reaginic antibodies.  
Ann.Review Med., 1970, 21, 187

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T.

Identification of E-antibodies as a carrier of reaginic activity.  
J.Immunol. 1967, 99, 1187

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T.

Reversed allergic skin reactions by anti- -E-globulin antibodies in humans and monkeys.  
J.Immunol. 1968, 100, 554

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T.

IgE immunoglobulins of human and monkey.

in Biochemistry of the Acute Allergic Reactions.

Ed.K.F.AUSTEN, E.L.BECKER, Blackwell Scientific Publications,  
Oxford and Edinburg, 1971, 1 vol., 365 pages, voir p.16

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., HORNBROOK M.M.

Physicochemical properties of reaginic antibody.

IV.Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity.

J.Immunol. 1966, 97, 75

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., HORNBROOK M.M.

Physicochemical properties of reaginic antibody.

V.Correlation of reaginic activity with E globulin antibody.

J.Immunol.1966, 97, 840

ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., JOHANSSON G.O., BENNICH H.

Histamine release from human leukocytes by anti- E antibodies.

J.Immunol. 1969, 102, 884

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., LEE E.H.

Physicochemical properties of reaginic antibody. II. Characteristic properties of reaginic antibody different from human gamma-A-iso-hemagglutinin and gamma D-globulin.

J.Allergy, 1966, 37, 336

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., MENZEL A.E.O.

Physicochemical properties of reaginic antibody. VI Effect of heat on E-, G-and A-antibodies in the sera of ragweed sensitive patients.

J.Immunol. 1967, 99, 610

ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., ORANGE R.P., AUSTEN K.F.

The capacity of human immunoglobulin E to mediate the release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey lung.

J.Immunol. 1970, 104, 335

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., TADA T.

Immunoglobulin E in the monkey.

J.Immunol. 1969, 103, 445

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., TERRY W.D.

Antigenic structure of E globulin and reaginic antibody.

J.Immunol. 1967, 99, 849

ISHIZAKA K., TOMIOKA H., ISHIZAKA T.

Mechanisms of passive sensitization.

I. Presence of IgE and IgG molecules on human leucocytes.

J.Immunol. 1970, 105, 1459

JOHANSSON S.G.O.

Serum IgND levels in healthy children and adults.

Int.Arch.Allergy, 1968, 34, 1

JOHANSSON S.G.O., BENNICH H.

Immunologic studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin.

Immunology, 1967, 13, 381

JOHANSSON S.G.O., BENNICH H., WIDE L.

A new class of immunoglobulin in human serum.  
Immunology, 1968, 14, 265

JOHANSSON S.G.O., MELLBIN T., VAHLQUIST B.

Immunoglobulin level in Ethiopian preschool children with special reference to high concentration of immunoglobulin E (IgND)  
Lancet, 1968, 1, 1118

KABAT E.A., MAYER M.M.

Experimental immunochemistry

THOMAS C.C., ed.

Second ed., 1961, 905 pages, voir chap.6 anaphylaxis and allergy, p.268

KATZ G.

Histamine release from blood cells in anaphylaxis in vitro.  
Science, 1940, 91, 221

KOBAYASHI S., GIRARD J.P., ARBESMAN C.E.

Demonstration of human reagin in monkey tissues.

III. In vitro passive sensitization of monkey ileum with sera of atopic patients. Physiologic and enhancing experiments.

J.Allergy, 1967, 40, 26

KOROTZER J.L., HADDAD Z.H., LOPAPA A.F.

Detection of human IgE antibody by a modified rat mast cell degranulation technique.

Immunology, 1971, 20, 545

LAYTON L.

Passive transfer of human atopic allergies into lemurs, lorises, pottos and galagos : possible primate - ordinal specificity of acceptance passive sensitization by human atopic reagin.

J.Allergy, 1965, 36, 523

LAYTON L.

Human allergic serum transfer tests in Marmosets : diminutive monkeys as substitutes for human patients and volunteers in allergen research and testing.

Int.Arch.Allergy, 1966, 30, 360

LAYTON L., YAMANAKA E., GREENE F.C., PERLMAN F.

Atopic reagins to penicillin, pollens and seeds : thermolability, titer and persistence in the skin of passively sensitized macaque monkeys.

Int.Arch.Allergy, 1963, 23, 87

LEVINE B.B.

Immunologic mechanisms of penicillin allergy : a haptenic model system for study of allergy diseases of man.

New Engl.J.Med. 1966, 275, 1115

LIACOPOULOS P.

L'anaphylaxie passive in vitro. III. Modalités de la sensibilisation in vitro.

J.Physiol. Paris, 1962, 54, 501

MALLEY A., HARRIS R.L.

Passive sensitization of monkey lung fragments with sera of timothy-sensitive patients.

I. Spectrofluorometric analysis of histamine release.

J.Immunol. 1968, 100, 915

MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F.

Immunochemical quantitation of antigens by a single radial immunodiffusion.

Immunochemistry, 1965, 2, 235

MAY C.D., LYMAN M., ALBERTO R., CHEN J.

Procedures for immunochemical study of histamine release from leukocytes with small volume of blood.

J.Allergy, 1970, 46, 12

ORANGE R.P., AUSTEN W.G., AUSTEN K.F.

Immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. I. Modulation by agents influencing cellular levels of cyclic 3'5' adenosine monophosphate.

J.exper.Med. 1971, 134, 136

PAPIERNIK M.

Le test de transformation lymphocytaire chez le foetus, le prématuré et l'enfant.

Micro et macrotechniques.

Sem.Hôp., Path.Biol. 1970, 18, 1119

PASTEUR VALLERY-RADOT L., WOLFROMM R., CHARPIN J., HALPERN B.N.

Maladies allergiques.

Flammarion et Cie edit., Paris, 1963, 1119 p, voir p.669

PAUL W., WEIR D.M.

Histamine release from human lung by specific antisera.

Clin.exper.Immunol. 1969, 5, 311

PEDERSEN-BJERGAARD J.

Skin-sensitizing antibodies in serum from patients with penicillin allergy studied by passive transfer to monkey skin and compared with results obtained on human skin (Prausnitz-Küstner technique).

Acta allergol.Danem. 1969, 24, 57

PERELMUTTER L., KHERA K.

Rat mast cells in human reagin detection.

Lancet, 1969, 1, 1269

PLAUT M., LICHTENSTEIN L., BLOCH K.

Failure to obtain histamine release from rat mast cells exposed to human allergic serum and specific antigen or IgE myeloma protein and anti-IgE.

J.Immunol. 1974, 111, 1022

PRAUSNITZ C., KÜSTNER H.

Studien über die Überempfindlichkeit.

Zbl.Bakt. I.Abt.Orig. 1921, 86, 160

PROUVOST-DANON A., BINAGHI R.  
Reaginic antibody in adult and young mice.  
Int.Arch.Allergy, 1970, 38, 648

REDMOND A.P., LEVINE B.B.  
Delayed skin reactions to benzylpenicillin in man.  
Int.Arch.Allergy, 1968, 33, 193

ROCKLIN R.E., DAVID J.R.  
Detection in vitro of cellular hypersensitivity to drugs.  
J.Allergy Clin.Immunol. 1971, 48, 276

RÖHLICH P., ÅNDERSSON P., UVNÄS B.  
Electron microscopic observations on compound 48/80 induced  
degranulation in rat mast cells. Evidence for sequential exo-  
cytosis of storage granules.  
J.Cell.Biol., 1971, 51, 465

ROSE N.R., KENT J.H., REISMAN R.E., ARBESMAN C.E., GIRARD P.  
Demonstration of human reagin in the monkey.  
I. Passive sensitization of monkey skin with sera of untreated atopic  
patients.  
J.Allergy, 1964, 35, 520

ROSE N.R., KENT J.H., REISMAN R.E., ARBESMAN C.E., GIRARD P.  
Demonstration of human reagin in the monkey.  
II. In vitro passive sensitization of monkey ileum with sera of  
untreated atopic patients.  
J.Allergy, 1964, 35, 535

ROWE D.S.  
Radioactive single radial diffusion : a method for increasing the  
sensitivity of immunochemical quantification of protein in agar gel.  
Bull.Wld.Hlth.Org. 1969, 40, 613

SAURAT J.H., BURTIN C., SOUBRANE C., PAUPE J.  
Cell-mediated hypersensitivity in skin reactions to drugs.  
(except contact dermatitis).  
Clin.Allergy, 1973, 3, 427

SCHILD H.O.  
Mechanism of anaphylactic histamine release.  
in Biochemistry of the Acute Allergic Reactions. Ed.K.F.AUSTEN and  
E.L.BECKER, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburg,  
1968, 1 vol. 340, voir p.99

SHEARD P., KILLINGBACK P.G., BLAIR A.M.J.N.  
Antigen induced release of histamine and SRS-A from human lung  
passively sensitized with reaginic serum.  
Nature, 1967, 216, n°5112, 283

SØBORG M., BENDIXEN G.

Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity.  
Acta Med.Scand. 1967, 181, 247

SOUBRANE C., DONAT N., BURTIN-LABORDE C.

Mise en évidence des anticorps circulants dans l'hypersensibilité  
immédiate par anaphylaxie passive in vitro sur iléon de singe.  
Rev.franç.Allergol. 1970, 10, 125

TADA T., ISHIZAKA K.

Distribution of E-forming cells in lymphoid tissue of the human  
and monkey.  
J.Immunol. 1970, 104, 377

WALDMANN T.A.

Disorders of immunoglobulin metabolism.  
New Engl. J.Med. 1969, 281, 1170

DE WECK A.L.

Penicillin allergy : its detection by one improved hemagglutination  
technique.  
Nature, 1964, 202, 975

DE WECK A.L.

Communication au IX Congrès Européen d'Allergie et d'Immunologie  
Clinique.  
Londres 1974

WHO Scientific Group on clinical immunology.

Genève 25-30 Octobre 1971

Technical report series n°496

in Int.Arch.Allergy, 1972, 42, annexe p.34-35

WICKER K., GIRARD J.P., REISMAN R.E., YAGI Y., ARBESMAN C.E.

Demonstration of human reagin in monkey tissues. In vitro sensiti-  
zation of monkey ileum with globulin fractions from sera of patients  
sensitive to ragweed.  
J.Allergy, 1968, 41, 63

WICKER K., KOBAYASHI S., ARBESMAN C.E., ISHIZAKA K.

Demonstration of human reagin in monkey tissues. In vitro passive  
sensitization of monkey ileum with absorbed globulin fractions from  
sera of patients sensitive to ragweed.  
J.Allergy, 1968, 41, 74

WIDE L., BENNICH H., JOHANSSON S.G.O.

Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies.  
Lancet ii, 1967, 1105

WIDE L., JUHLIN L.

Detection of penicillin allergy of the immediate type by radio-immunoassay of reagins (IgE) to penicilloyl conjugates.  
Clin.Allergy, 1971, 1, 171

WIDE L., PORATH J.

Radio immunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies.  
Biochim.Biophys. Acta, 1966, 130, 257

WIRSZER I., PATTERSON R., PRUZANSKY J.J.

Ascaris hypersensitivity in the rhesus monkey.  
J.Allergy, 1968, 41, 14

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1 - 3
HISTORIQUE	4 - 27
L'allergie médicamenteuse	
Manifestations cliniques	
Evolution des connaissances	
Les immunoglobulines E	
Structure et propriétés physicochimiques des IgE	
Dosage des IgE sériques totales	
Mise en évidence des IgE spécifiques	
TRAVAUX PERSONNELS I <sup>e</sup> PARTIE	28 - 75
Mise en évidence des IgE sériques spécifiques anti-médicament.	
Chapitre I	28 - 48
A - Dosage de l'histamine	
B - Matériel	
C - Conditions optimales d'utilisation du tissu pulmonaire de singe.	
D - Technique détaillée proprement dite	
Chapitre II	49 - 56
A - Expression des résultats	
B - Les résultats	
Chapitre III	57 - 67
A - Discussion de la technique	
B - Discussion des résultats	
Chapitre IV	68 - 75
Autres techniques	
A - Anaphylaxie cutanée passive chez le singe	
B - Dégranulation des mastocytes de Rat	

II<sup>e</sup> PARTIE

76 - 97

Etude approfondie de 38 cas d'allergie médicamenteuse  
par plusieurs Techniques immunologiques.

Techniques

Résultats

Discussion

DISCUSSION sur les réactions croisées

98 - 110

RESUME

111 - 114

BIBLIOGRAPHIE

115 - 123

