

Le test de libération d'histamine dans la standardisation des allergènes

A. WEYER¹, J. LE MAO¹, B. LEBEL² et B. DAVID¹

Il existe un préalable à la standardisation des allergènes : mesurer d'une façon précise et reproductible l'activité de chaque allergène, quant à son pouvoir de déclencher des symptômes d'allergie chez les sujets sensibles. Une fois cette mesure bien définie et largement pratiquée, il conviendra alors d'établir des références pour chaque préparation allergénique.

La mesure, au laboratoire, de l'activité d'un extrait allergénique, doit refléter une réalité physiologique, transposable sur le plan médical *in vivo*. Il est donc nécessaire d'élaborer des méthodes fondées sur l'interaction entre l'allergène et le matériel biologique responsable du phénomène d'hypersensibilité immédiate, c'est-à-dire faisant intervenir IgE et mastocytes ou basophiles. Les techniques développées en ce sens sont l'inhibition du RAST et la libération d'histamine. L'inhibition du RAST fait appel à un pool d'IgE sériques, la libération d'histamine à des cellules-cibles recouvertes d'IgE, provenant d'un malade ou d'un animal sensibilisé. Des travaux effectués avec des extraits de pollens et d'acariens ont montré qu'il existe une corrélation positive entre les résultats obtenus avec ces deux tests *in vitro* et ceux obtenus avec les tests cutanés quantitatifs [1, 3]. Les méthodes *in vitro* d'inhibition du RAST et de libération d'histamine permettent donc d'évaluer l'activité de l'extrait destiné au diagnostic.

Le présent article traite de la mesure de l'activité des allergènes par le test de libération d'histamine. A titre d'exemple, les activités de plusieurs extraits d'un même pollen sont comparées.

Le test de libération d'histamine est réalisé suivant la méthode de MAY et coll. [5]. Les mesures des quantités d'histamine libérées se font par une méthode fluorométrique automatisée [2]. Le seuil de détection de cette méthode est de 100 pg histamine/ml et 15 ml de sang suffisent pour effectuer une comparaison de 4 extraits sur les cellules lavées, en réalisant chaque incubation en deux exemplaires. Le choix des malades se fonde sur la valeur élevée du taux d'IgE spécifiques sériques pour l'allergène étudié, et une courbe préalable de libération d'histamine est faite avec un extrait de référence afin de connaître la zone de sensibilité cellulaire vis-à-vis de cet allergène (fig. 1).

L'allure sigmoïdale des courbes de libération d'histamine en fonction de la concentration d'allergène (fig. 1) permet de déterminer, sur la partie croissante la plus sensible de la courbe, un paramètre reflétant la « force allergénique » de l'extrait. Ce paramètre, noté D_{50} , représente la quantité d'allergène induisant une libération d'histamine égale à la moitié de la libération maximum d'histamine. Lorsque l'on compare dans une même expérience plusieurs extraits de même concentration (poids/volume), les valeurs des D_{50} obtenus reflètent l'activité allergénique spécifique de chaque extrait par rapport à celle d'un extrait de référence.

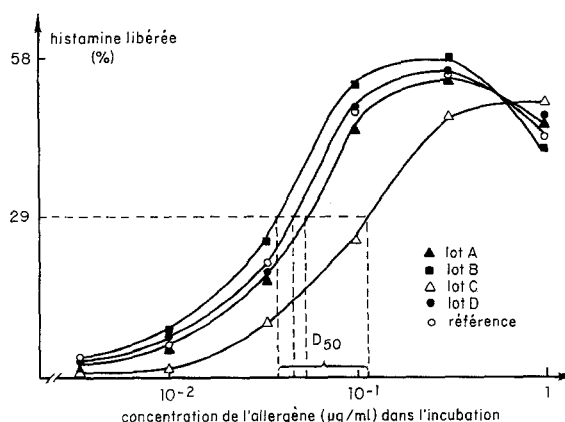


FIG. 1. — Pourcentage d'histamine libérée par les basophiles d'un malade sensible en fonction de la concentration de l'allergène dans l'incubation. Comparaison de la force allergénique de différents lots (A, B, C, D) d'un même extrait allergénique avec celle de l'extrait pris comme référence.

Actuellement, les extraits allergéniques utilisables en clinique sont obtenus à partir de procédés d'extraction très différents. Ainsi, des facteurs tels que le pH, la force ionique, la température et la durée de l'extraction, le soluté extracteur, varient selon les protocoles de production et peuvent influencer la qualité et l'activité des extraits allergéniques. Nous avons étudié ici l'influence du paramètre « temps d'extraction » sur les caractéristiques des extraits obtenus à partir de *Dactylis glomerata*. Nous

¹ Institut Pasteur, Service d'Immuno-Allergie, Paris.

² INSERM, FRA 3, Faculté de Médecine Necker, Paris.

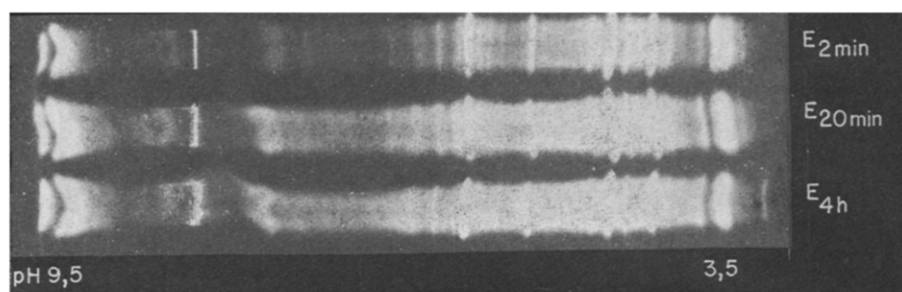


FIG. 2. — Iso-électrofocalisation d'extraits de *Dactylis glomerata* préparés par macération du pollen pendant des durées différentes.

avons choisi des extractions de courte durée, sachant avec quelle rapidité les processus pathologiques se déclarent chez le pollinique après un contact avec le pollen.

Du pollen de *Dactylis glomerata* est mis à macérer dans des conditions de pH, de température et de force ionique bien définies. Des aliquots sont prélevés aux temps 2 minutes, 20 minutes, 4 heures et après filtration et centrifugation, les surnageants constituent les extraits testés ($E_{2\text{ min}}$, $E_{20\text{ min}}$, $E_{4\text{ h}}$). Ces extraits sont analysés qualitativement par iso-électrofocalisation et leur activité allergénique est mesurée par le test de libération d'histamine.

L'iso-électrofocalisation des 3 extraits étudiés montre une grande similitude qualitative pour les préparations obtenues pour des temps d'extraction allant de 2 minutes à 4 heures (fig. 2).

Des courbes de libération d'histamine ont été obtenues en utilisant les basophiles de 5 malades polliniques dans 5 expériences indépendantes. Un exemple est montré dans la figure 3. Bien que le spectre des activités anticorps des IgE spécifiques fixées sur les basophiles ne soit pas identiques chez ces différents malades, les résultats obtenus avec plusieurs malades permettent d'évaluer la force allergénique relative des extraits testés. Le classement des forces allergéniques des divers extraits est le même chez 4 des 5 malades. L'activité allergénique de l'extrait $E_{2\text{ min}}$ est inférieure à celle des extraits $E_{20\text{ min}}$ et $E_{4\text{ h}}$, ces deux derniers extraits montrant des activités semblables.

Parallèlement, des expériences d'inhibition du RAST ont été réalisées avec ces mêmes extraits et l'activité allergénique de $E_{2\text{ min}}$ a été trouvée infé-

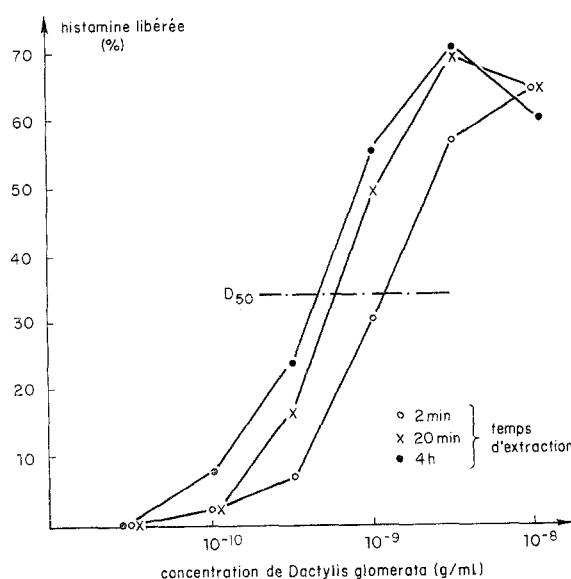


FIG. 3. — Détermination des forces allergéniques relatives des extraits de *Dactylis glomerata* obtenus après macération pendant 2 min, 20 min, 4 h.

rieure à celle des deux autres extraits ; l'activité allergénique de $E_{20\text{ min}}$ est identique à celle de $E_{4\text{ h}}$.

Les résultats obtenus avec les extraits $E_{20\text{ min}}$ et $E_{4\text{ h}}$ par ces deux méthodes ont donc montré des activités allergéniques comparables. Ainsi dans le procédé d'extraction que nous avons utilisé, 20 minutes suffisent pour obtenir une activité maximale et il semble donc inutile d'augmenter le temps d'extraction au-delà de cette durée. Ces observations concordent parfaitement avec les travaux de LØWENSTEIN et MYGIND sur le pollen de phléole [4].

RÉFÉRENCES

1. BAER H., GODFREY H., MALONEY C. J., NORMAN P. S., LICHTENSTEIN I. M. — The potency and antigen E content of commercially prepared ragweed extracts. *J. Allergy*, 1970, 45, 347.
2. LEBEL B. — A high sampling rate automated continuous flow fluorometric technique for analysis of histamine in biological samples at the nanogram level. *J. Immunol. Methods* (à paraître).
3. LE MAO J., WEYER A., PAULI G., LEBEL B., DAVID B. — Studies on *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens : measurement of the relative potencies of *D. pteronyssinus* purified extracts by in vitro and in vivo methods. *J. Allergy clin. Immunol.*, 1980, 65, 381.
4. LOWENSTEIN H., MYGIND N. — Extraction and degradation of timothy pollen allergen during simulated in vivo conditions. *J. Allergy*, 1978, 33, 238.
5. MAY C. D., LYMAN M., ALBERTO R., CHENG J. — Procedures for immunochemical study of histamine release from leukocytes with small volumes of blood. *J. Allergy*, 1970, 46, 12.