Durée de vie d'un extrait de dactyle (Dactylis glomerata) lyophilisé et reconstitué*

P. ABOU [1], J. BOUSQUET [2], J. CHARPIN [3], J. DRY [4], B. GUÉRIN [5], F. LEYNADIER [4], F. B. MICHEL [2], J. MIGUERES [1], D. VERVLOET [3]

RÉSUMÉ

Depuis quelques mois des extraits allergéniques standardisés et lyophilisés ont été mis sur le marché en France. Leur durée de vie, une fois reconstitués, a été recherchée dans une étude entreprise par le Groupement d'Études Français pour la Standardisation des Allergènes. Deux diluants ont été comparés (solution phénolée à pH7 et solution phénolée contenant 0,02 % d'albumine humaine) pour la conservation d'extraits de pollen de dactyle. Les extraits fraîchement reconstitués ont été comparés à des extraits reconstitués d'une semaine à six mois auparavant. Les extraits ont été testés au moyen d'une échelle cutanée réalisée en intradermoréaction. Quatre centres français ont participé à l'étude et l'analyse statistique par test de Wilcoxon a montré la grande stabilité des extraits de dactyle lyophilisés une fois reconstitués. Le diluant contenant 0,02 % d'albumine humaine est cependant conseillé en raison de la plus grande stabilité des extraits.

SUMMARY

Life of a reconstituted freeze-dried extract of Dactylis glomerata. – Over recent months, standardised, freeze-dried extracts of allergens have been released onto the market in France. Their life after being reconstituted was studied by the French Study Group for the Standardization of Allergens. Two diluents were compared (pH7 phenol solution and a phenol solution containing 0.02 % human albumin) for the storage of extracts of dactylis pollen. The freshly reconstituted extracts were compared to extracts which had been reconstituted between one week and six months before. The extracts were tested by means of a cutaneous scale based on intradermal reaction. Four French centres participated in the study and statistical analysis using Wilcoxon's test showed that the reconstituted extracts of freeze-dried dactylis had good stability. The diluent containing 0.02 % human albumin is nevertheless recommended, because of the greater stability of the extracts.

Depuis deux ans, deux producteurs français d'extraits allergéniques, le Laboratoire des Stallergènes et l'Institut Pasteur, proposent des produits lyophilisés qui présentent l'avantage d'une bonne conservation à l'état sec. Certains sont, en outre, standardisés par la technique de l'inhibition du RAST comparativement à un extrait de référence, et il devient facile de contrôler leur stabilité après remise en solution à la concentration la plus élevée ; par contre, aucune technique in vitro ne permet de s'assurer que cette stabilité se retrouve avec les solutions très diluées, utilisables en pratique clinique, notamment pour le diagnostic par intradermoréaction ou l'immunothérapie.

En pratique, divers solvants ont été utilisés pour les tests intradermiques, mais leurs qualités sont très variables. Il apparaît ainsi que le sérum phénolé pH7 n'est pas un conservateur très puissant [1, 2]. La dénaturation des solutions allergéniques très diluées (entre $1/10.^6$ et $1/10.^8$) proviendrait d'une adsorption des molécules protéiques à la surface du verre ou de leur attraction vers l'interface air-liquide ; pour y remédier, Norman et Marsh [4] ont proposé un solvant contenant de l'albumine humaine à 0,02 %, dont il importait de vérifier les propriétés.

C'est dans ce contexte que le Groupement d'Études Français pour la Standardisation des Allergènes a entrepris une étude multicentrique afin de déterminer la durée de vie d'allergènes lyophilisés reconstitués. Dans un premier temps, des extraits de dactyle (Alyostal, Laboratoire des Stallergènes, Fresnes) ont été reconstitués avec deux types de diluants (sérum phénolé pH7 et sérum phénolé contenant 0,02 % d'albumine humaine), puis conservés à + 4 °C pendant 24 semaines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Patients

Quatre centres ont testé chacun cinq à huit patients par semaine de tests. Tous étaient fortement allergiques aux pollens de graminées. Ils étaient âgés de 16 à 49 ans.

* Étude Multicentrique réalisée à l'instigation et avec la coordination du Groupement d'Études Français de Standardisation des Allergènes (GEFSA).

[1] Centre Hospitalier Universitaire Rangueil, Toulouse.
[2] Clinique des Maladies respiratoires, Hôpital l'Aiguelongue, Montpellier.
[3] Hôpital Sainte-Marguerite, Marseille.
[4] Service de Médecine interne, Hôpital Rothschild, Paris.
[5] Laboratoire des Stallergènes, 160, quai de Polangis, 94340 Joinville-le-Pont.

Tirés à part : Dr Abou, Service de Pneumologie, CHU de Rangueil, chemin du Vallon, 31054 TOULOUSE CEDEX.

Reçu le 18 février 1984. Accepté le 28 avril 1984.

ABOU P., BOUSQUET J., CHARPIN J., DRY J., GUÉRIN B., LEYNADIER F., MICHEL F. B., MIGUERES J., VERVLOET D. – Durée de vie d'un extrait de dactyle (Dactylis glomerata) lyophilisé et reconstitué. **Rev. fr. Allergol.**, 1984, **24** (n° 2), 81-83

Matériel

Un même lot d'extraits Alyostal de dactyle *(Dactylis glomerata),* lyophilisés et standardisés par la méthode du RAST, a été fourni par les Laboratoires Stallergènes à tous les centres. Il a servi à préparer toutes les dilutions nécessaires à l'expérimentation.

L'extrait lyophilisé a été reconstitué soit avec du diluant pH7, soit avec un sérum phénolé contenant 0,02 % d'albumine humaine, fournis par les Laboratoires Stallergènes.

Méthodes

Les tests cutanés ont été réalisés chez des patients désensibilisés ou non, n'ayant pas reçu d'antihistaminiques, de corticoïdes par voie générale depuis une semaine, de kétotifène depuis trois semaines, et n'ayant pas été traités par corticothérapie générale prolongée. Ils ont été réalisés entre 9 h et 11 h par le même expérimentateur en injectant avec le même type de seringue 0,05 ml de liquide.

Les tests cutanés ont été lus après 15 minutes et la papule et l'érythème décalqués selon la méthode du scotch test. Puis après photocopie sur papier calibré, chaque papule et érythème ont été pesés. Les poids ont été exprimés en mg.

Ces tests ont été faits aux semaines 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 et 24.

Au temps 0, la première semaine, l'extrait allergénique lyophilisé de dactyle, repris par l'une ou l'autre des solutions, a été dilué au 100 000e, au 1 000 000e et au 10 000 000e. Ces préparations constituent les éprouvettes dosées pour l'étude de la durée de vie des extraits.

Au début de chaque semaine de tests, il a été préparé une série complète de dilutions de l'un ou l'autre des diluants en utilisant chaque fois, comme solution mère, un flacon lyophilisé, conservé à + 4 °C, remis en solution extemporanément et qui constitue donc l'extrait de référence puisque la stabilité des produits conservés dans ces conditions a été confirmée par ailleurs.

Les deux séries de dilutions de l'extrait de dactyle ont été utilisées parallèlement lors de chaque essai sur chacun des sujets inclus et choisis sur les critères déjà définis, chez les malades présents à la consultation du jour. 14 intradermoréactions ont donc été réalisées en principe une seule fois sur chaque sujet, à savoir :

- 2 témoins diluants (pH7 et HSA) ;
- 3 dilutions extemporanées en pH7 (100 000e, 1 000 000e, 10 000 000e) ;
- 3 dilutions extemporanées en HSA (mêmes concentrations) ;
- 3 dilutions de référence en pH7 ;
- 3 dilutions de référence en HSA.

Il était recommandé aux différents centres de tester au moins six individus chaque semaine.

L'analyse statistique a été effectuée par B. de Sesmaisons, Groupe Sicko-Pharm. La stabilité a été étudiée en comparant les résultats à la semaine X du test réalisé avec la solution étalon et ceux du test produit par la solution semaine SX. Les tests de Wilcoxon sur séries appariées entre S1 et SX ont été calculés lorsque les données recueillies furent suffisantes.

L'analyse statistique a été réalisée sur l'ensemble des centres pour obtenir un nombre suffisant de patients.

RÉSULTATS

Trois des quatre centres ont utilisé le protocole prescrit tandis qu'un centre a utilisé les mêmes patients, volontaires pour tous les tests.

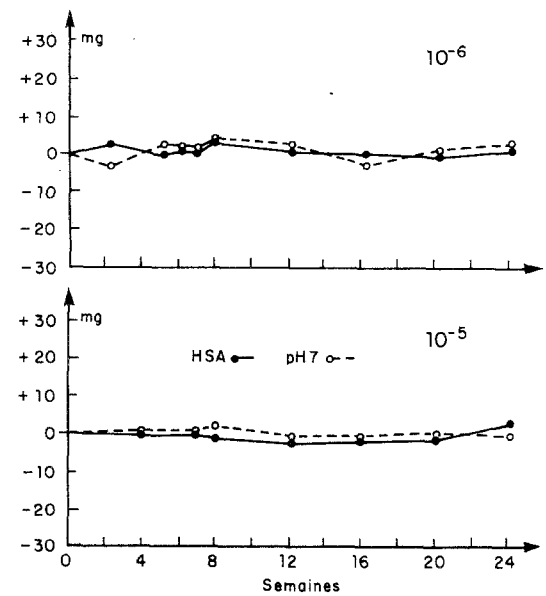


Fig. 1. – Variation moyenne du poids des papules chez les patients testés dans le centre n° 1.

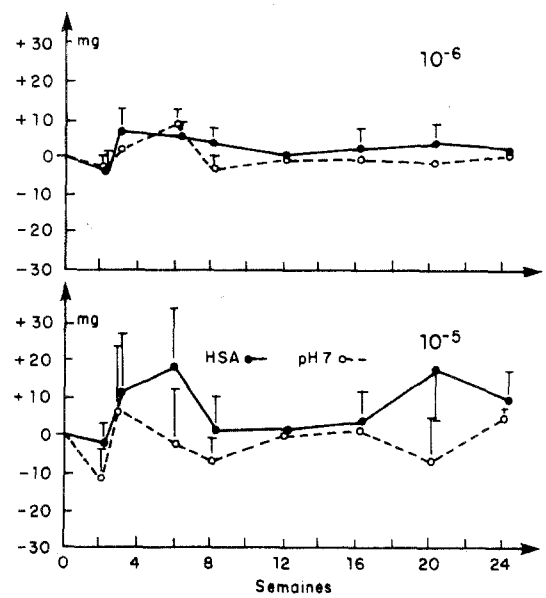


Fig. 2. – Variation moyenne du poids des papules chez les patients testés dans le centre n° 2.

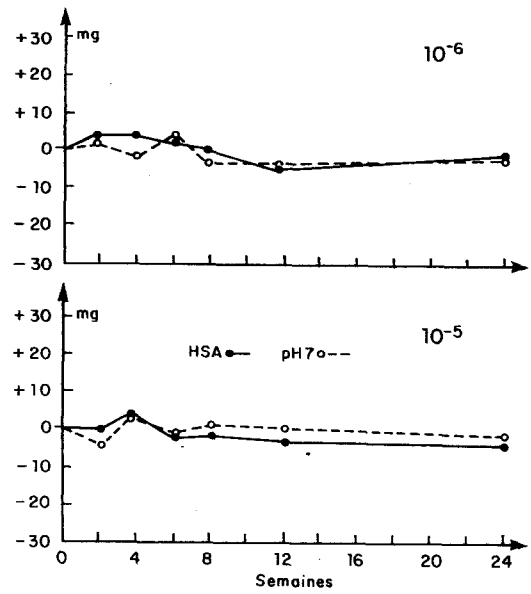


Fig. 3. – Variation moyenne du poids des papules chez les patients testés dans le centre n° 3.

TABLEAU I. – **Comparaison* des tests effectués avec des extraits reconstitués en pH7 aux semaines 1 et X**

Semaines	*Nombre de patients*	*Papules* 10^{-5}	*Papules* 10^{-6}	*Érythèmes* 10^{-5}	*Érythèmes* 10^{-6}
S 2	20	NS	NS	NS	NS
S 4	20	NS	NS	NS	NS
S 6	25	$p < 0,05$	NS	$p < 0,05$	$p < 0,05$
S 8	19	NS	NS	NS	$p < 0,05$
S 12	20	NS	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
S 16	18	NS	NS	–	–
S 20	20	NS	NS	–	–
S 24	24	$p < 0,05$	NS	$p < 0,05$	$p < 0,05$

* Les comparaisons ont été réalisées par le test de Wilcoxon.

Si l'on considère la papule induite par l'injection d'allergènes, il n'apparaît pas de différence significative au bout de 24 semaines, entre S1 et SX, quelle que soit la dilution ou le solvant (fig. 1 à 3).

L'analyse des résultats des tests sur la papule montre que certaines différences sont significatives entre S1 et SX mais on ne peut les attribuer au vieillissement des solutions. Par exemple, pour le diluant pH7, les tests sont significativement différents à la semaine 6 (dilution 10^{-5}), à la semaine 12 (dilution 10^{-6}) et à la semaine 24 (dilution 10^{-5}). Pour les extraits reconstitués en albumine sérique humaine, seuls les tests réalisés la seconde semaine pour la dilution 10^{-6} sont significativement différents.

TABLEAU II. – **Comparaison* des tests effectués avec des extraits reconstitués en HSA aux semaines 1 et X**

Semaines	*Nombre de patients*	*Papules* 10^{-5}	*Papules* 10^{-6}	*Érythèmes* 10^{-5}	*Érythèmes* 10^{-6}
S 2	20	NS	$p < 0,04$	NS	NS
S 4	20	NS	NS	NS	NS
S 6	25	NS	NS	NS	NS
S 8	19	NS	NS	NS	NS
S 12	20	NS	NS	NS	NS
S 16	18	NS	NS	–	–
S 20	20	NS	NS	–	–
S 24	24	NS	NS	NS	NS

* Les comparaisons ont été réalisées par le test de Wilcoxon.

L'analyse des résultats du test, pour ce qui concerne l'érythème, montre qu'il existe des différences significatives avec le solvant pH7 dès la sixième semaine. Ces résultats significatifs sont retrouvés régulièrement, sauf à la huitième semaine, pour la dilution à 1/100 000. Ces différences semblent pouvoir être expliquées par le vieillissement des solutions. Par contre, pour les extraits reconstitués en albumine sérique humaine, il n'existe pas de différence significative pour l'érythème et quelle que soit la concentration utilisée (tableaux I et II).

Les résultats par centre confirment ces données mais montrent pour la papule (cf. fig. 1 à 3) des variations parfois relativement importantes.

DISCUSSION

L'étude coopérative réalisée par le Groupement d'Études Français pour la Standardisation des Allergènes montre que les extraits de dactyle lyophilisés et reconstitués par le solvant incluant l'albumine sérique humaine sont plus stables que ceux reconstitués en solution phénolée à pH7. De grandes variations intercentres existent, ce qui était attendu, mais globalement les résultats sont relativement homogènes. L'érythème paraît constituer un critère de mesure plus précis et plus sensible de la durée de vie des allergènes que la papule, comme cela avait été observé par Turkeltaub et Baer [5] et Dry et coll. [3].

Les résultats observés semblent indiquer qu'il est préférable de diluer les extraits lyophilisés en albumine sérique humaine plutôt qu'en solution pH7.

RÉFÉRENCES

1. Baer H. – Stability of allergenic extracts. *In : Regulatory Control and Standardization of allergenic extracts.* Comptes rendus 1st International Paul-Ehrlich-Seminar, pp. 175-177. Stuttgart, Gustaw-fisher-Verlag, 1980.
2. Center J. G., Shuller N., Zelzanick L. D. – Stability of antigen E in commercially prepared ragweed pollen extract. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1974, *54*, 305-311.
3. Dry J., Leynadier F., Luce H. – Correlation entre test de dégranulation des basophiles humains et tests cutanés au cours de la pollinose (95 sujets). *Sem. Hôp. Paris*, 1980, *56*, 719-722.
4. Norman P. S., Marsh D. G. – Human serum albumin and tween 80 as stabilizers of allergen solutions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1978, *62*, 314-320.
5. Turkeltaub P., Rastogi S. C., Baer H., Anderson M. C., Norman P. S. – A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability : studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erytheme and patient selection on assay results. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1982, *70*, 343-352.