

Méthodes immuno-chimiques pour le contrôle de la puissance et de la qualité des extraits allergéniques de pollen

H. LOWENSTEIN *

Les méthodes immuno-chimiques, telles que l'immuno-diffusion et l'immuno-électrophorèse, dans lesquelles on utilise comme réactif chimique des anticorps provenant d'animaux immunisés, ont été employées pour le contrôle qualitatif des extraits allergéniques ; elles révèlent la composition antigénique des extraits et, dans les cas où l'on dispose d'anticorps monospécifiques contre les allergènes, elles peuvent permettre le contrôle de la puissance de ces extraits. L'immuno-électrophorèse quantitative révèle à la fois la qualité (composition antigénique) et la puissance (concentration) de chacun des principaux allergènes pourvu qu'ils aient été préalablement identifiés au moyen de la radio-immuno-électrophorèse croisée.

Les avantages et limites de ces techniques ont été discutés y compris sous l'angle de leur sensibilité, variabilité et corrélation avec les autres méthodes valables de contrôle des extraits allergéniques. Une expérience pratique du contrôle de la puissance et de la qualité des extraits allergéniques par rapport à des standards bien définis et en utilisant l'immuno-électrophorèse quantitative combinée avec d'autres méthodes *in vivo* et *in vitro* a été présentée. Ce modèle de standardisation des allergènes (DAS 76) a permis de standardiser des extraits allergéniques en termes de composition, concentration en allergènes majeurs, activité allergénique totale *in vivo*, *in vitro* et stabilité.

L'analyse de la puissance et de la qualité des extraits allergéniques peut comporter à la fois l'utilisation de méthodes physico-chimique, chimique et biologique.

Aucune méthode ne permet aujourd'hui de donner seule une réponse satisfaisante à ces diverses questions et il est donc préférable d'en utiliser plusieurs en les combinant pour qu'elles se complètent mutuellement.

Ci-après, je vais donc insister sur les méthodes immuno-chimiques qui sont toutes des outils communément utilisés dans la chimie des protéines.

Mon objectif est de présenter les avantages potentiels et les limites de quelques-unes des méthodes immuno-chimiques utilisées pour le contrôle de la qualité et la détermination de la puissance des allergènes, d'établir leur relation avec les autres méthodes utilisées, de rapporter les expériences sur la définition d'un extrait allergénique standard et leur application au contrôle de la qualité et de la puissance des extraits allergéniques.

Rappelons, à titre d'introduction, quelques données relatives aux antigènes et aux allergènes : les épitopes moléculaires (les déterminants) peuvent créer une augmentation du taux des anticorps de n'importe quelle classe d'immuno-globulines produits par n'importe quel animal, y compris l'homme. Actuellement, peu d'exemples ont été établis d'une production limitée à une classe d'immunoglobulines dirigée contre un épitope unique. Cette situation est due à la capacité génétique variable des systèmes de production d'immunoglobulines de reconnaître les antigènes à faibles doses et dans leur condition actuelle d'exposition (naturelle ou artificielle, dans le cadre d'un programme d'immunisation). Il n'y a cependant aucune preuve scientifique qui permette de distinguer entre les déterminants allergéniques (reconnus par les IgE) ou antigéniques (reconnus par les IgG). Cela implique également que tous les allergènes peuvent être des antigènes et vice-versa mais également, en théorie, qu'il est possible de produire des anticorps contre tous les allergènes potentiels.

Des techniques immuno-chimiques variées, utilisant des immunoglobulines animales comme réactif,

* University of Copenhagen, The Protein Laboratory, 34, Sigurdsgade, DK 2200 COPENHAGEN (Danemark).

ont été employées depuis de nombreuses années pour la caractérisation et la quantification des extraits allergéniques. Les anticorps sont produits par l'immunisation des animaux avec l'extrait allergénique sélectionné. Les essais peuvent être fondés sur l'emploi d'anticorps mono-spécifiques, comme dans le cas de l'immuno-diffusion radiale simple (technique de Mancini) dans laquelle la surface de l'anneau de diffusion, formé par l'antigène précipité dans le gel contenant l'anticorps, est corrélée avec la quantité d'antigène utilisée. Dans l'immuno-électrophorèse en rocket (électro-immuno essai) la hauteur du précipité, formé par l'antigène et ayant subi l'immuno-électrophorèse dans un gel contenant des anticorps, est proportionnelle à la concentration d'antigène. Les deux méthodes permettent de quantifier des composants simples ; leur sensibilité peut atteindre 1-100 ng de chaque composant par millilitre avec un écart maximum à la moyenne de ± 10 p. cent.

Simplicité et rapidité d'exécution sont les principaux avantages de ces méthodes ; le fait d'obtenir un contrôle acceptable par la détermination de la concentration de l'un des allergènes majeurs représentant 90 p. cent de l'activité allergénique peut être critiqué. Pour le contrôle des extraits allergéniques, il est donc préférable de procéder à une élévation quantitative de tous les antigènes majeurs mais également à une estimation qualitative grossière de tous les composants mineurs. L'immuno-électrophorèse croisée, réalisée suivant la technique de Clark et Freeman, qui combinent l'immuno-électrophorèse de Grabar et Williams avec l'électro-immuno essai de Laurell, résout ces problèmes : une électrophorèse ordinaire en gel d'agarose est suivie d'une électrophorèse réalisée dans un gel contenant des anticorps, perpendiculairement à la première. L'électrophorèse en gel d'agarose étant réalisée à pH 8,6 avec une faible électro-endosmose, les anticorps de lapins ne migrent pas et il se forme des précipités qui délimitent une zone dont les caractéristiques peuvent être rapportées à la concentration des différents antigènes. La sensibilité peut atteindre, pour chaque antigène, 10-100 ng/ml avec un écart maximum à la moyenne de ± 10 p. cent. Un grand pouvoir de résolution, la possibilité d'une quantification relative de chaque fraction allergénique sans séparation préalable et la grande stabilité de réactifs (les anticorps) constituent les principaux avantages de cette technique. Sa principale limite se situe au niveau de la possibilité de produire des anticorps contre tous les allergènes potentiels, de fait :

1) La matière première utilisée pour obtenir l'immunisation correspond-elle à celle qui a sensibilisé le malade ?

2) Les capacités génétiques de l'animal utilisé sont-elles révélatrices de la réponse humaine à cette source d'allergènes ?

Comparativement à l'iso-électrofocalisation, le pro-

blème de la surcharge protéique ne pose pas de problèmes réels puisqu'elle est normalement compensée par des titres élevés d'anticorps contre les antigènes majeurs.

La radio-immuno-électrophorèse croisée (CRIE), proposée par LOWENSTEIN et WEEKE, relie le profil de précipitation d'un extrait allergénique avec les IgE spécifiques du sérum de malades, en identifiant ainsi les allergènes. L'autoradiographie, obtenue en laissant le précipité croisé initial réagir avec les IgE sériques puis en ajoutant des anti-IgE marquées à l'iode 125, permet d'identifier les allergènes. Les applications du CRIE sont, d'une part, la détermination du profil de réponses IgE des malades à chaque déterminant d'extraits complexes et, d'autre part, en s'appuyant sur un ensemble de telles déterminations réalisées sur un groupe de malades, l'identification des allergènes majeurs et mineurs. Ces connaissances peuvent maintenant être utilisées pour la standardisation et le contrôle des extraits allergéniques. C'est ainsi, par exemple, qu'a été mise en évidence la réponse IgE du sérum de sujets allergiques aux ambrosia, en fonction des différents composants allergéniques contenus dans un extrait de pollen, et qu'a été établi l'allergogramme. D'après le nombre de malades réagissant à chaque déterminant il est possible de définir les allergènes majeurs.

Le terme immuno-électrophorèse quantitative (QIE) a été choisi comme dénomination commune pour un certain nombre de modifications techniques de l'immuno-électrophorèse croisée (tableau I). La famille QIE de méthodes immuno-électrophorétiques rapides et à fort pouvoir résolutif réunit des techniques qui sont toutes quantitatives ou semi-quantitatives. Les méthodes QIE ont été largement utilisées pour le contrôle des extraits allergéniques. Citons, à titre d'exemples, les études de :

- reproductibilité,
- stabilité,
- extraction,
- conservation au cours des diverses étapes de purification,
- dégradation enzymatique,
- détermination de paramètres physico-chimiques,
- identification,
- standardisation.

Les méthodes QIE peuvent être utilisées à la fois pour un contrôle qualitatif (c'est-à-dire composition allergénique) et pour la détermination de la puissance des extraits allergéniques (c'est-à-dire concentration des allergènes). Ces méthodes montrent une bonne corrélation avec la détermination de la puissance au moyen de l'inhibition du RAST. Cependant, à la différence des méthodes basées sur le RAST, elles permettent d'obtenir des données indépendantes de la composition des extraits allergéni-

TABLEAU I
MÉTHODES QIE AVEC RÉFÉRENCES SPÉCIALES A LA RECHERCHE ALLERGÉNIQUE

MÉTHODES	APPLICATIONS	EXTRAITS D'ALLERGÈNES UTILISÉS
CIE (LAURELL, antigène /anticorps CIE d'après CLARKE et FREEMAN)	Caractérisation et quantification des antigènes à l'aide d'anticorps polyspécifiques ; étude de l'hétérogénéité moléculaire des antigènes.	Ame, Bp, Bw, C, Ch, H, Hd, Hu, K, Lp, Ms, Pp.
Rocket immuno-électrophorèse (électro-immuno-essai)	Quantification des antigènes en utilisant des anticorps mono-spécifiques.	C, H.
Tandem-CIE	Comparaison des antigènes. Détermination de réactions d'identité partielles.	C, H, Pp.
CLIE	Comparaison des antigènes. Détermination de réactions d'identité partielles ; absorption des anticorps in situ.	Ame, Bw, C, Ch, H, Hd, Hu, K, Lp, Ms, Pp.
CIE avec un gel intermédiaire	Comparaison des anticorps. Étude des anticorps à réaction croisée. Détermination des titres.	Ame, Bw, C, H, Hu, Lp, Pp.
« Fused » rocket immuno-électrophorèse	Contrôle des procédures de fractionnement sur colonne.	Ame, Ch, H, Hu, Lp, Pp.
Immuno-électrophorèse d'affinité croisée	Études d'affinité. Prédiction au cours du fractionnement de la versatilité des protéines immobilisées - des produits de réactions.	K, Pp.
CRIE	Identification des allergènes. Détermination de la réponse de malades aux différents déterminants.	Ame, C, H, Hu, K, Lp, Ms, Pp.

Abréviations utilisées pour les extraits : pollen d'ambrosia (Ame) ; pollen de bouleau (Bp) ; petit lait de vache (Bw) ; morue (C) ; C. herbarum (Ch) ; poil et squame de cheval (H) ; poussière de maison (Hd) ; poil et squame de chien (Hu) ; poil et squame de vache (K) ; pollen de rye grass (Lp) ; farine de blé (MS) ; pollen de phléole (Pp).

Abréviations utilisées pour la technique : immuno-électrophorèse quantitative (QIE) ; immuno-électrophorèse croisée (CIE) ; ligne croisée d'immuno-électrophorèse (CLIE) ; immuno-radio-électrophorèse croisée (CRIE).

ques. Il reste alors à se demander quelle est la variation acceptable dans la proportion de chaque déterminant. Nous devons nous poser la question des composants isolés. La signification de trop grandes variations dans le contenu des déterminants majeurs peut avoir des conséquences aussi importantes que les variations dans la puissance totale de l'activité allergénique. Idéalement, les préparations allergéniques gagnent à être définies suivant leur contenu de composants actifs comme tout autre médicament qui contient un mélange de substances actives. D'un point de vue pratique je dirai que, d'un lot à l'autre, la concentration relative des déterminants majeurs ne devrait pas varier de plus de 33 à 300 p. cent par rapport au produit standard. Dans ces conditions, la puissance calculée par les méthodes QIE (par exemple, comme une moyenne pondérée du total de chaque déterminant majeur), devrait se situer dans une limite comprise entre 33 et 300 p. cent telle qu'elle est couramment proposée pour l'inhibition du RAST.

En vue de définir des extraits standards de référence, les méthodes QIE ont été largement utilisées parallèlement avec d'autres méthodes dans le cadre

d'une étude multicentrique, DAS 76, qui a impliqué 15 hôpitaux et laboratoires différents au Danemark (fig. 1). Des extraits allergéniques standards furent préparés dans notre laboratoire et utilisés pour la production d'anticorps. Les mêmes extraits furent utilisés dans différents hôpitaux et laboratoires suivant différentes procédures de diagnostic pour la sélection de malades présentant une allergie bien définie. Ces malades ont permis :

1. La détermination d'une HEP (Histamine Equivalent Prick),
2. L'identification des allergènes par le CRIE,
3. L'évaluation de la puissance au moyen du RAST.

Des réactifs spécifiques pour le contrôle des futurs extraits allergéniques sont maintenant disponibles, à savoir :

1. Pool d'anticorps de lapins pour le contrôle de la composition antigénique et de la concentration des déterminants majeurs au moyen du QIE,
2. Pool de sérums humains pour le contrôle de l'activité allergénique totale au moyen de l'inhibition du RAST,

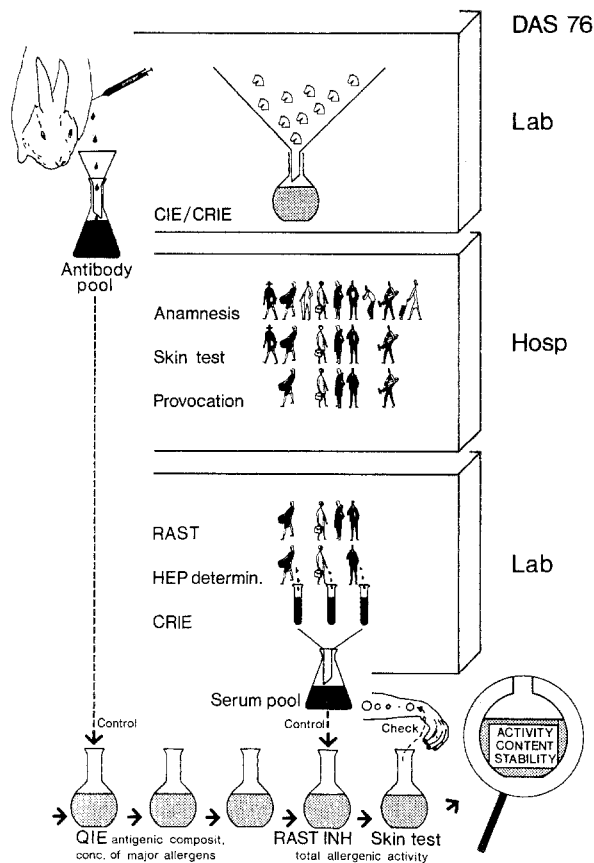


FIG. 1. — Le DAS 76 (programme danois de standardisation des allergènes 1976) est une procédure ayant pour objet la définition d'un extrait standard, la préparation de réactifs spécifiques et leur emploi pour la détermination de la puissance, le contrôle de la qualité et de la stabilité des futurs extraits allergéniques. Les extraits allergéniques standards sont préparés dans notre laboratoire et utilisés pour la production d'anticorps contre ces extraits standards. Les mêmes extraits sont utilisés dans différents laboratoires et hôpitaux au cours de différentes procédures de diagnostic pour la sélection de malades souffrant d'une allergie bien définie : la détermination d'une HEP (Histamine Equivalent Prick), l'identification des allergènes par la CIE (immuno-électrophorèse croisée) et CRIE (radio-immuno-électrophorèse croisée) et la puissance des extraits par le RAST furent déterminées en référence à ces malades. Des réactifs spécifiques pour le contrôle des futurs extraits allergéniques sont maintenant disponibles, à savoir :

1. pool d'anticorps de lapins pour le contrôle de la composition antigénique et de la concentration des allergènes majeurs du QIE (immuno-électrophorèse quantitative),
2. pool de sérums humains pour la détermination de l'activité allergénique totale au moyen de l'inhibition du RAST,
3. sélection de quelques malades pour vérifier la réactivité cutanée des extraits.

Ces trois méthodes permettent de rapprocher ces résultats de ceux obtenus avec le produit de référence. Voir le texte pour plus de détails.

3. Groupes de quelques malades pour le contrôle de la réactivité cutanée de ces extraits.

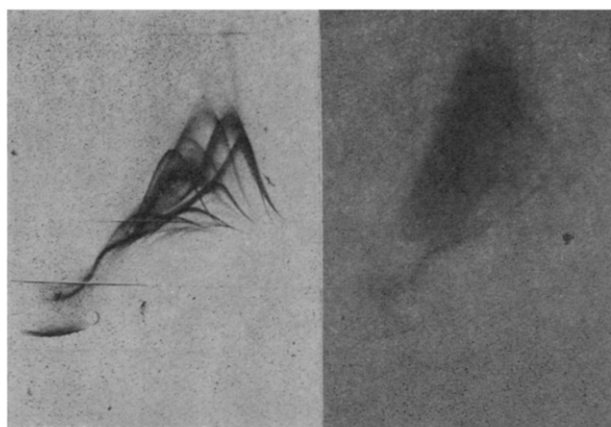
Les résultats fournis par ces trois méthodes pour le produit à contrôler furent rapprochés de ceux obtenus avec le produit standard.

Il a été produit dans des conditions reproductibles, par extraction, filtration, centrifugation, dialyse et lyophilisation, des extraits allergéniques devant comporter toutes les fractions allergéniques sans altération de structure et après élimination des composés de faible poids moléculaire. L'extraction des matières premières allergéniques fut réalisée dans les mêmes conditions physico-chimiques que pour l'extraction des pollens ou des squames humaines, c'est-à-dire approximativement avec une puissance ionique comprise entre 0,1 et 0,25 et à un pH d'environ 7,3. Cependant, pour se mettre à l'abri des dégradations protéolytiques, l'extraction fut conduite à basse température (c'est-à-dire 4 °C). Sa durée fut choisie pour réaliser un compromis permettant une dégradation protéolytique minimale et un rendement maximal. La QIE fut utilisée pour étudier les changements qualitatifs et quantitatifs, intervenant au cours de l'extraction en la complétant par d'autres méthodes telle que le RAST pour s'assurer que l'essentiel des produits allergéniques était extrait. Les immunoglobulines de lapins contre les extraits allergéniques furent obtenues par immunisation, saignée et purification. La caractérisation des extraits fut conduite au moyen de méthodes physico-chimiques et d'immuno-électrophorèse quantitative. Les malades furent sélectionnés en fonction de l'anamnèse, des tests cutanés, des épreuves de provocation et du RAST, en utilisant les extraits allergéniques mentionnés ci-dessus.

Pour permettre :

1. La détermination d'une HEP,
2. L'identification des allergènes par la CRIE,

3. La détermination de la puissance par le RAST, les patients furent sélectionnés d'après quelques critères particuliers ; pour être inclus dans le groupe les malades devaient avoir présenté une hypersensibilité de type I depuis au moins 5 ans, un score de 2 points pour au moins 1 ou une somme d'au moins 4 points dans les quatre essais suivants : tests cutanés, provocation, anamnèse et RAST (négatif = 0 ; douteux = 1 ; positif = 2 points). Les critères d'exclusion furent : traitement par les antihistaminiques, les pommades stéroïdes, le cromoglycate et une immunothérapie spécifique. Les allergènes majeurs furent identifiés en réalisant une radio-immuno-électrophorèse croisée, CRIE. La stabilité des extraits allergéniques fut étudiée à différentes températures, concentrations et pour différents solvants au moyen d'immuno-électrophorèse quantitative QIE.



CLASSES DE RAST	0 - 1	2	3 - 4
NOMBRE DE PTT	1	1	50

Concentration de protéines : 46 % (p/v) ; 1 HEP = 170 mg.l⁻¹ ; corrélation entre SI_{1HEP} et RAST : $r = 0,64$, $p < 0,001$.

AG #	% pos. CRIE	PM (daltons)	pI
3	19	< 10 000	3,9
4	33	54 000	4,6
15	33	37 000	4,6
19	30	15 000	4,9
25	53	15 000	4,5
20A/27	53	82 000	5,2
30/37	40	33 000	9,4/8,9

	°C	COCA	50 % GLYCÉROL	ADSORPTION SUR Al (OH) ₃
Pourcentage d'activité maintenue	20	11	28	~ 100
après 2 années de conservation	5	79	40	~ 100
	— 20	62	75	

FIG. 2. — Elle montre les principales données permettant de caractériser l'extrait standard. L'image située tout en haut à gauche présente le profil en immuno-électrophorèse croisée du produit standard et, à côté, un exemple du profil CRIE obtenu avec le sérum d'un seul malade. Pour plus amples informations sur ces données se rapporter au texte.

Les futurs extraits allergéniques peuvent dorénavant être contrôlés par comparaison avec nos extraits standards définis comme suit :

1. Concentration de chaque antigène y compris des allergènes à l'aide d'une immuno-électrophorèse croisée et du pool d'immunoglobulines de lapins,
2. Détermination de l'activité allergénique globale en utilisant l'inhibition du RAST et le pool de sérums de malades,
3. Recherche de l'activité à l'aide de l'« Histamine Equivalent Prick »,
4. Etude de la stabilité dans le cadre du délai de conservation indiqué.

Pour illustrer la définition d'un extrait standard de référence et son utilisation pour le contrôle de la qualité et de la puissance des extraits allergéniques, nous avons choisi l'extrait de phléole dont la composition est assez simple.

L'extrait standard de référence de phléole (fig. 2) contient 37 antigènes différents décelables par la QIE. Au moyen du pool de sérums, obtenu à partir de malades, il a été montré que 15 d'entre eux s'identifiaient comme des allergènes. Le poids moléculaire et

le point iso-électrique de ces allergènes ont été également déterminés pour permettre de comparer ces données avec celles d'autres extraits standards. La méthode de Lowry a permis de trouver un pourcentage de 46 p. cent de protéines par rapport au poids sec de l'extrait standard. La valeur d'une HEP, pour cet extrait, fut fixée à 170 µl/ml d'après la réponse obtenue sur des patients sélectionnés. Sur 52 sujets, il ne fut trouvé qu'un RAST de classe 0/1 et un de classe 2. On trouva dans ce cas une corrélation statistiquement significative entre l'index cutané : $d \times D/HIST$ (1 mg/ml) et les résultats du RAST exprimés en SU. L'activité allergénique trouvée après deux ans de conservation dans trois solvants différents et à trois températures différentes fut assez forte. Les extraits glycinés ou adsorbés sur l'hydroxyde d'aluminium ne montrèrent aucune baisse sérieuse d'activité, même à des concentrations inférieures à 10⁻² HEP ; l'extrait dissout dans la solution de coca avait conservé 11, 79 et 62 p. cent de son activité après conservation respectivement à 20 °C, 5 °C et — 20 °C.

Le contrôle de la qualité et de la puissance des extraits par rapport à l'extrait standard a été réalisé par immuno-électrophorèse quantitative. L'extrait de phléole de référence a été utilisé à quatre concentra-

TABLEAU II
 CONTRÔLE DE LA PUISSANCE
 D'UN EXTRAIT DE POLLEN DE PHLÉOLE

	RAPPORT CONCENTRATION-ACTIVITÉ PAR RÉACTIF AU STANDARD DAS		VALEUR EN HEP APRÈS DILUTION ²
	QIE ¹	RAST INHIBITION	
Extrait 1	2,6	3,7	$\geq 3 ; \leq 1$
Extrait 2	1,5	1,8	$\geq 3 ; \leq 1$
Extrait 3	1,4	1,7	1
Extrait 4	2,9	2,3	$\geq 1 ; \leq 3$
DAS-stand.	1	1	1

¹ Moyenne calculée sur trois allergènes.

² Dilué en fonction des résultats obtenus in vitro.

tions d'un lot d'extrait commercial (tableau II). Après avoir identifié quelques allergènes (antigènes n° 3, 19 et 25) les zones ainsi délimitées furent mesurées et la concentration correspondante d'extraits standards déterminée.

Sur la figure 2, la concentration QIE par rapport à l'extrait standard fut déterminée en fonction de ces trois allergènes et l'inhibition du RAST fut conduite par rapport à l'extrait standard. L'extrait fut alors dilué en fonction des résultats de la moyenne de ces deux rapports concentration-activité puis comme contrôle final, l'extrait fut essayé en tests cutanés parallèlement à une HEP référence sur un petit groupe de malades. Tous les extraits se situèrent entre 0,3 - 3 HEP ce qui est, à mon avis, acceptable si l'on considère la dispersion des résultats du prick. Ainsi donc, le contrôle qualitatif et la détermination de la puissance furent réalisés au moyen de deux méthodes différentes et indépendantes, contrôlés par une troisième méthode indépendante. Dans ce système nous n'avons pas pris en considération l'importance relative de chaque allergène dans l'allergénicité totale.

Les conditions nécessaires, les informations obtenues et les résultats de cette combinaison d'essais utilisée dans notre programme de standardisation, sont énumérés ci-après.

IMMUNO-ÉLECTROPHORÈSE QUANTITATIVE (QIE)

Nécessite :

1. antisérum polyspécifique avec spécificité contre tous les déterminants allergéniques contenus de l'extrait ;
2. identification des allergènes majeurs, par exemple au moyen de la CRIE ;
3. un extrait standard de stabilité connue.

Rend compte de :

1. la composition antigénique ;
2. les changements moléculaires ;
3. la concentration des allergènes majeurs par rapport à un produit standard.

Réalise :

la QIE des échantillons et du produit standard.

INHIBITION DU RAST

Nécessite :

1. un pool de sérums de malades présentant un large spectre ;
2. un allerge-sorbent sur lequel tous les déterminants allergéniques sont représentés ;
3. un extrait standard de stabilité connue.

Rend compte de :

l'activité allergénique totale comparativement à un produit standard.

Réalise :

une inhibition du RAST des échantillons à étudier et du produit standard.

PRICK-TEST (détermination de l'HEP)

Nécessite :

1. Un extrait standard, dont la concentration correspondant à une HEP, a été déterminé par la réalisation de tests cutanés sur un grand nombre de sujets allergiques.

2. Un petit nombre de malades pour la détermination de la valeur en HEP du nouveau lot.

Contrôle :

L'activité biologique de l'extrait allergénique standardisé au moyen du QIE et de l'inhibition du RAST.

Réalise :

Le prick test d'échantillons d'activité prédéterminée (par la QIE et l'inhibition du RAST) dilué pour contenir une HEP et celui du standard contenant une HEP.

Ces méthodes ont maintenant été utilisées avec succès pour le contrôle de la puissance et l'étude qualitative d'au moins 10 différents extraits allergéniques de la Compagnie ALK à Copenhague. Je désire cependant souligner que le parfait usage de ces 3 méthodes implique d'admettre certaines hypothèses, à savoir :

— que l'extrait standard contient tous les déterminants allergéniques potentiels,

— que les anticorps de lapins reconnaissent tous ces allergènes potentiels,

— que tous ces allergènes potentiels soient couplés aux disques du RAST et

— que tous les malades sélectionnés reconnaissent tous les allergènes potentiels.

Nous ne pouvons pas contrôler tous ces différents points mais la combinaison des techniques rappelées ci-dessus devrait nous mettre à l'abri d'erreurs graves.

RÉFÉRENCES

1. LOWENSTEIN H. — Quantitative immunoelectrophoretic methods as a tool for the analysis and Isolation of Allergens. *Prog. Allergy*, 1978, 25, 1-62.
2. LOWENSTEIN H., WEEKE B., — DAS, A Model for Allergen Standardization (en préparation).