

# Méthodes de caractérisation des extraits allergéniques

## *Methods for the characterization of allergenic extracts*

T. Batard<sup>\*</sup>, E. Nony, H. Chabre, J. Bouley, P. Lemoine, K. Jain, M.-N. Couret, C. Berrouet, J. Barberon, A. Huet, S. Horiot, L. Mascarell, V. Bodo, P. Moingeon

*Direction scientifique, Stallergenes, 6, rue Alexis-de-Tocqueville, 92183 Antony cedex, France*

Disponible sur Internet le 16 février 2011

### Résumé

Les extraits allergéniques destinés au traitement des allergies de type I par immunothérapie spécifique sont des mélanges complexes de molécules, obtenus à partir de matières premières biologiques qui présentent une certaine variabilité. De nombreuses méthodes sont aujourd'hui disponibles pour offrir une caractérisation poussée de ces extraits allergéniques et documenter leur reproductibilité.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés* : Extrait allergénique ; Allergène ; Ballast ; Immunochimie ; Protéomique ; Caractérisation fonctionnelle

### Abstract

Allergenic extracts intended for the treatment of type I allergies by specific immunotherapy are complex mixtures of molecules, obtained from biological materials known to exhibit some variability. Today, multiple methods are available for extensive characterization of allergenic extracts and documentation of their consistency.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

*Keywords*: Allergenic extract; Allergen; Ballast; Immunochemistry; Proteomics; Functional characterisation

## 1. Introduction

La libération des extraits allergéniques destinés à l'immunothérapie spécifique est fondée sur des méthodes de routine comme la mesure de l'activité allergénique totale et la quantification des allergènes pertinents. La caractérisation des extraits allergéniques peut être complétée par des méthodes qui, si elles ne sont pas applicables en routine, contribuent toutefois à une meilleure documentation de leur qualité et de leur reproductibilité. Nous présentons ci-dessous un ensemble de méthodes utilisées pour cette caractérisation.

## 2. Caractérisation des allergènes

Les allergènes sont les composants actifs des extraits allergéniques destinés à l'immunothérapie spécifique [1,2].

Au sein d'un extrait, il est donc essentiel d'identifier les allergènes et de caractériser en détail les allergènes pertinents [3].

### 2.1. Des méthodes immunochimiques pour identifier et quantifier les allergènes

L'identification des allergènes d'un extrait se fait par immuno-empreinte après électrophorèse mono- ou bi-dimensionnelle. Après séparation des protéines d'un extrait suivant leurs tailles et/ou leurs charges, celles-ci sont transférées sur une membrane qui est ensuite incubée avec le sérum d'un ou plusieurs patients allergiques à la source d'allergènes considérée. La détection des IgE qui se sont fixées sur les protéines allergéniques permet l'identification de ces dernières, comme le montre l'exemple de la Fig. 1. En appliquant ce type d'expérience sur un grand nombre de sérums de patients allergiques (étude séro-épidémiologique), on peut déterminer les allergènes fréquemment reconnus, ou allergènes majeurs.

<sup>\*</sup> Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [tbatard@stallergenes.fr](mailto:tbatard@stallergenes.fr) (T. Batard).

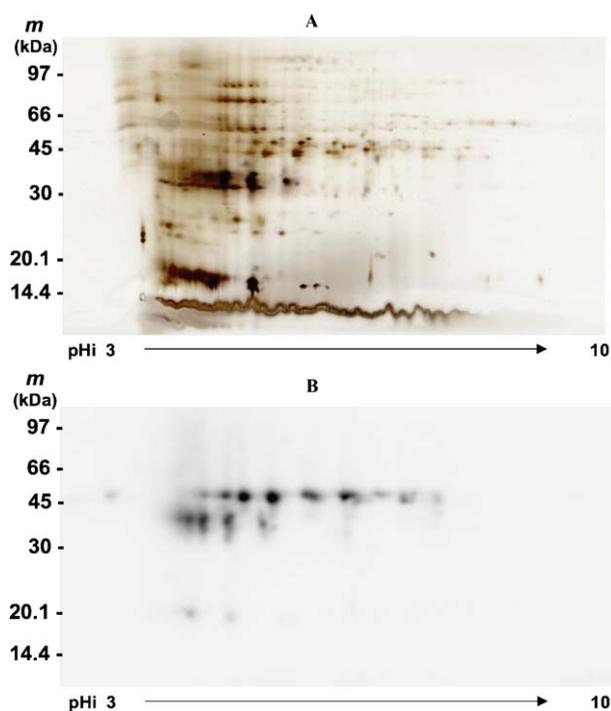


Fig. 1. A. Séparation en électrophorèse bidimensionnelle des protéines d'un comprimé d'extrait de cinq pollens de graminées (Oralair®). B. Identification des allergènes après transfert des protéines sur membrane, incubation avec un mélange de sérums de patients allergiques aux pollens de graminées et détection des IgE.

La méthode d'immunotâches permet quant à elle de vérifier que des allergènes spécifiques sont bien présents dans un extrait [4].

Quant à la quantification des allergènes, réservée aux allergènes pertinents, elle peut être effectuée par méthode Elisa sandwich, où l'allergène est capturé par un premier anticorps monoclonal spécifique, et détecté par un second anticorps monoclonal spécifique [5,6]. Le Tableau 1 indique les taux d'allergènes pertinents mesurés dans un certain nombre d'extraits allergéniques par des méthodes de quantification immuno-chimiques, sachant que les taux ainsi mesurés sont très dépendants des anticorps, mais aussi des standards qui sont utilisés [7–9].

Enfin, le contenu global en allergènes d'un extrait est mesuré par Elisa-inhibition. Dans cette méthode, l'extrait à doser inhibe la fixation, sur des allergènes immobilisés, des IgE d'un sérum ou mélange de sérums de patients allergiques à la source d'allergènes correspondante. L'Elisa-inhibition reste aujourd'hui la méthode de choix pour la standardisation des extraits allergéniques, en raison de leur complexité de composition en allergènes.

## 2.2. Des méthodes chromatographiques pour purifier les allergènes

La caractérisation fine des allergènes n'est possible qu'après leur purification. Celle-ci fait classiquement appel à des méthodes chromatographiques, de type chromatographie d'échange d'ions ou tamisage moléculaire [10–12].

Tableau 1

Taux d'allergènes pertinents mesurés par des méthodes immuno-chimiques dans un certain nombre d'extraits allergéniques.

| Extrait                   | Allergène mesuré | Quantité mesurée pour 100 IR (µg) |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|
| <i>D. pteronyssinus</i>   | Der p 1          | 20                                |
|                           | Der p 2          | 4                                 |
| <i>D. farinae</i>         | Der f 1          | 50                                |
| Chat                      | Fel d 1          | 80                                |
| Chien                     | Can f 1          | 20                                |
| Pollens de cinq graminées | Groupe 5         | 7                                 |
| Pollen de bouleau         | Bet v 1          | 50                                |
| Pollen d'olivier          | Ole e 1          | 10                                |
| Pollen de cupressacée     | Jun a 1          | 100                               |
| Pollen d'ambrosie         | Amb a 1          | 100                               |
| Moississure Alternaria    | Alt a 1          | 6                                 |

## 2.3. La spectrométrie de masse pour la caractérisation fine et la quantification des allergènes

La spectrométrie de masse permet la caractérisation fine des allergènes purifiés. En effet, elle permet de déterminer sous quelles isoformes et glycoformes ils se présentent [11,12]. Cela est d'une grande importance lorsqu'il est question de mettre en place un dosage de l'allergène. Il peut s'avérer en effet qu'un dosage Elisa fondé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ne soit pas adapté en raison d'une trop grande spécificité de l'un au moins des anticorps, qui ne reconnaît pas toutes les isoformes de l'allergène présentes dans l'extrait allergénique à doser [13–17]. La connaissance de ces isoformes, telle que fournie par la spectrométrie de masse, est donc déterminante. Elle permet de surcroît la mise au point d'un test d'identité, fondée sur la détection par spectrométrie de masse d'un peptide spécifique d'espèce [11], ainsi que la mise au point d'un dosage d'allergène fondé sur la quantification, par spectrométrie de masse également, d'un peptide commun à toutes les isoformes.

## 2.4. La cytométrie en flux pour la caractérisation fonctionnelle des allergènes

Les allergènes sont également caractérisés fonctionnellement pour leur capacité à activer les basophiles, ou à faire proliférer et à polariser les lymphocytes T issus du sang périphérique de sujets allergiques [9,10,12]. Cette caractérisation fonctionnelle peut être réalisée grâce à la cytométrie en flux et utilisée pour documenter la robustesse d'un procédé de production d'un extrait allergénique (Fig. 2).

## 3. Caractérisation du ballast

Outre les allergènes, les extraits allergéniques contiennent de nombreuses protéines et autres molécules non allergéniques, dont l'ensemble constitue ce qu'on appelle communément « le ballast ». Il est important de caractériser ce ballast dans la mesure où il compte pour une grande part dans la composition des extraits allergéniques.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3386269>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3386269>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)