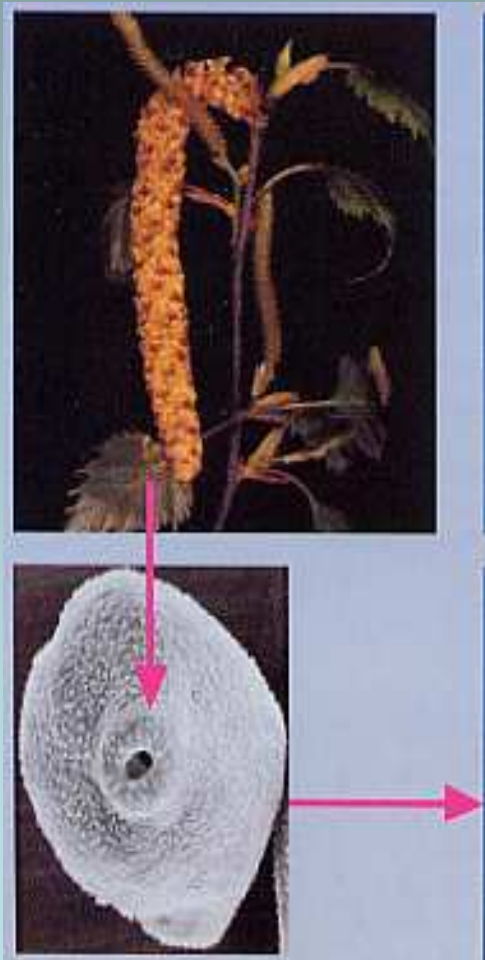


# Intérêt des allergènes recombinants dans le diagnostic de l'allergie alimentaire

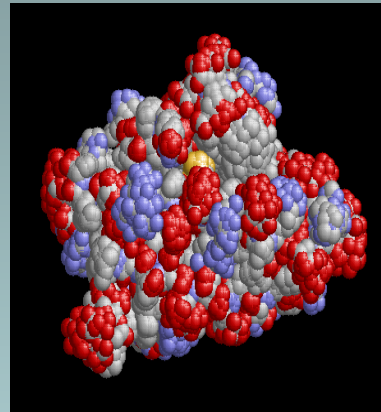
Laurence Guilloux

Laboratoire Marcel Mérieux - Biomnis

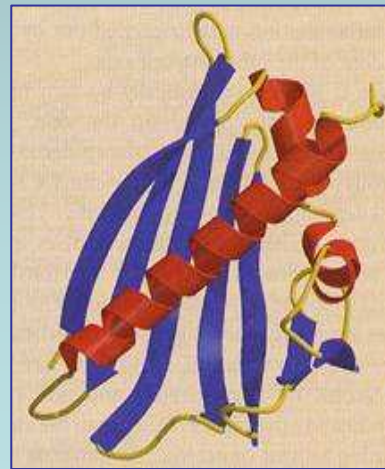
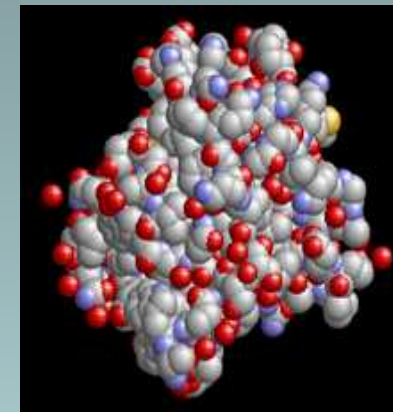
# D 'une vision macromoléculaire vers une vision moléculaire des allergènes



**Bet v 1**



**Bet v 2**



**Bet v 1, Gajhede 1995**

G Pauli 2005

# Extraits allergénique et allergènes recombinants

- **Les extraits allergéniques**

- Obtenus à partir de sources naturelles (grains de pollens, cultures d'acariens, aliments...),
- Sources hétérogènes; mélanges complexes de molécules allergéniques et non allergéniques,
- Teneur en allergènes dépend des procédés d'extraction, de purification, de stockage...

- **Les allergènes naturels purifiés**

- Important polymorphisme sur le plan moléculaire et de leurs glycosilation,
- Procédés d'extraction et de purification avec rendement peu élevé (certains allergènes ne sont pas hydrosolubles, d'autres sont labiles).

- **Allergènes recombinants**

- Correspondent à un variant moléculaire précis,
- Les systèmes d'expression bactériens ne permettent pas la glycosilation posttraductionnelle des polypeptides, ce qui peut jouer un rôle majeur dans l'acquisition de la structure tridimensionnelle définitive de la molécule,
- **Indispensable de valider l'activité immunologique des allergènes recombinants/allergènes naturels correspondants.**

# **Allergène recombinant**

**Protéine produite par génie génétique**  
**à partir de l'allergène naturel**

- Isolement d'ARNm de la source d'allergènes (animaux, plantes...)
- Synthèse d'ADNc
- Bibliothèque de phages
- Infection d'une bactérie, levure...
- Incubation avec sérum (IgE)
- Isolement de l'ADN phagique
- Clonage dans un vecteur
- Analyse de la séquence ADN
- Expression de l'allergène recombinant
- Purification des protéines
- Vérification de l'activité immunologique in vitro et in vivo

# Allergène recombinant

Protéine produite par génie génétique  
dans différents systèmes

- Procaryote bactérien : Escherichia Coli (rdt : 10 mg/l)
- Levures
  - Pichia pastoris (rdt : 50 à 250 mg/l)
  - Saccharomyces cerevisiae
- Cellules d'insectes : drosophile
- Cellules végétales : plants de tabac (rdt : 0.5 à 2 mg/g de feuille)

# Allergène recombinant

## Contrôles

- **Vérification de la pureté**
- **Validation de l'activité immunologique / l'allergène naturel +++++**
  - **in vitro :**
    - Comparaison des structures avec spectroscopie de masse
    - Techniques d'immunodétection avec AC monoclonaux ou sérums de patients sensibilisés ou animaux immunisés,
    - Techniques d'inhibition
    - Tests cellulaires (HL, cytométrie de flux).
  - **in vivo :**
    - Tests cutanés
    - Tests de provocation (oculaire, nasal, bronchique)

# Préparation allergène recombinant

## Intérêts

- **Connaissance et amélioration des extraits utilisés**
  - Production d' Ac monoclonaux spécifiques
    - Analyse de la composition des extraits allergéniques
    - Quantification du contenu allergénique, notamment les allergènes majeurs
    - Voire sélection d'une variété
  - Possibilité d'enrichir une préparation d'une protéine déficitaire (Hev b 5 pour k82 ; Cor a 1.04 pour f17)
- **Epidémiologie moléculaire dans différentes populations** (ex rPhl p 1 prévalence de sensibilisation de 95% en Europe mais seulement 65% Japon, Laffer S JACI 2006)
- **Définition du spectrotype des patients avec détermination quantitative des IgEs vis-à-vis de molécules d'allergènes** (41% des IgE anti lolium correspondait à la somme de Lol p 1 et p 5, Van Ree R JACI 1998)

# Préparation allergène recombinant

## Intérêts

- **Bases moléculaires des réactivités croisées** (identification de molécules allergéniques ayant de fortes homologues séquentielles et/ou structurales)
- **Interprétation des polysensibilisations**: allergie croisée ou cosensibilisation ? Important de différencier les allergènes moléculaires spécifiques d'une espèce donnée et les allergènes moléculaires présents dans des extraits provenant de sources différentes (panallergènes; profiline, protéines liant le calcium, Bet v 1 like ....)
- **Corrélation avec des tableaux cliniques particuliers** (relations entre mode de présentation clinique et profil de sensibilisation aux allergènes recombinants par ex pour le latex, les LTP, pour l'oméga-5 gliadine...)



# Classification des allergènes protéiques: Familles moléculaires

• Famille moléculaire	Nombre d'allergènes dans la famille (au 12/12/07)
• Profilines	94
• Tropomyosines	77
• LTP (Lipid Transfer Proteins)	45
• Bet v 1-like, protéines PR-10	40
• Polcalcines	35
• Parvalbumines bêta	29
• 2S Albumines	28
• beta expansines	27
• Polygalacturonases	22
• Ag5, Antigènes 5	22
• Albumines	19
• Caséines	19
• Lipocalines	18
• Groupe 5 des graminées	18
• 11S Globulines	17
• 7S Vicilin-like Globulines	16
• Groupe 4 des graminées	16
• cystéine protéases papain-like	16
• Phospholipases A1	15
• serine protease inhibitors	14
• Hyaluronidases	14
• Chitinases de classe 1	13
• Thaumatin-like protéines	13

Obtenue par comparaison de séquences d'aa; on définit ainsi un « motif » qui est reproduit dans toutes les protéines de la même « famille ».

La probabilité d'observer des réactions croisées est plus forte si homologie de séquence est importante mais non nulle quand elle diminue (ex des vicilines; structure tridimensionnelle identique: épitopes conformationnels communs)

**TABLE I. Plant food allergens homologous to PR-type proteins**

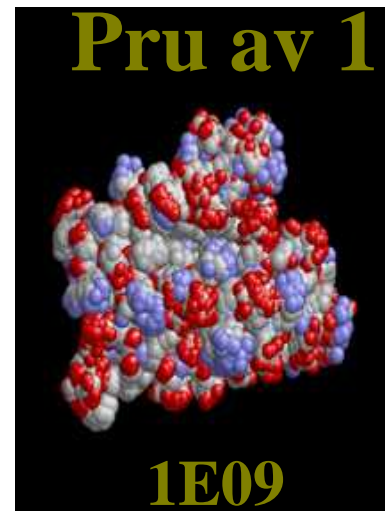
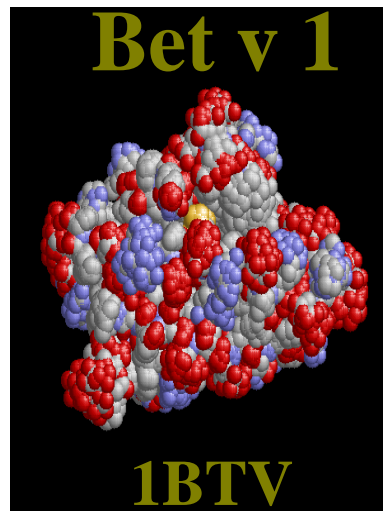
<b>Allergen homologous to</b>	<b>Protein classification</b>	<b>Allergen source/allergen</b>
<b>PR-2 type proteins</b>	<b><math>\beta</math>-1,3-Glucanases</b>	<b>Fruits, vegetables</b>
<b>PR-3 type proteins banana</b>	<b>Basic class I chitinases</b>	<b>Avocado (Pers a 1), chestnut,</b>
<b>PR-4 type proteins</b>	<b>Chitinases similar to potato Win proteins</b>	<b>Turnip, elderberry</b>
<b>PR-5 type proteins</b>	<b>Thaumatococcus-like proteins</b>	<b>Cherry (Pru av 2), apple (Mal d 2), bell pepper (P23)</b>
<b>PR-10 type proteins</b>	<b>Bet v 1-homologous proteins</b>	<b>Apple (Mal d 1), cherry (Pru av 1), apricot (Pru ar 1), pear (Pyr c 1), celery (Api g 1), carrot (Dau c 1), parsley (pcPR), potato (pSTH)</b>
<b>PR-14 type proteins</b>	<b>Lipid transfer proteins</b>	<b>Peach (Pru p 3), apple (Mal d 3), soybean (Gly m 1),* barley</b>

# Apport des allergènes recombinants aux bases moléculaires des allergies croisées

**PR10** Bet v 1- like  
protéines

transport des  
stéroïdes  
dans les  
plantes

- **Bouleau, Bet v 1**  
Breiteneder, Emb J 1989
- **Cerise, Pru av 1**  
Scheurer, Mol Immunol 1999  
Neudecker, J Biol Chem 2001
- **Pomme, Mal d 1**  
Vaneck-Krebitz, Biophysic 1995
- **Céleri, Api g 1**  
Breiteneder, Eur J Bioch. 1995
- **Carotte, Dau c 1,**  
Hofman-Sommergruber  
Clin Exp Allergy 1999
- **Poire, Pyr c 1**  
Karamloo, J Chrom Bio 2001
- **Soja, Gly m 4,** Kleine-Tebbe,  
JACI 2002
- **Noisette, Cor a 1,**  
Luttkopf, Mol Immunol 2002
- **Arachide, Ara h 8**  
Mittag, JACI 2004



Identité de séquence varie de 38 à 67%

d'après G. Pauli 2005

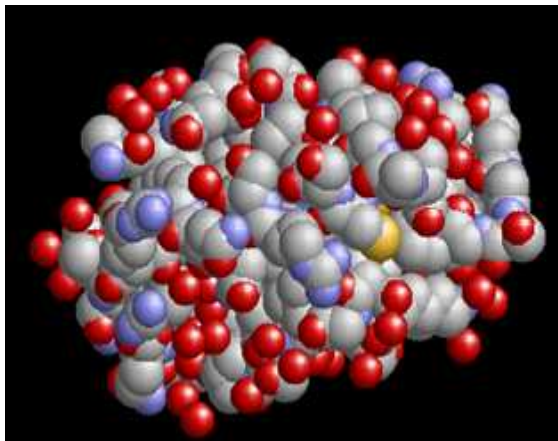
# Apport des allergènes recombinants aux bases moléculaires des allergies croisées

## entre trophallergènes :

Protéines de  
transfert des  
lipides LTPs  
PR-14

Transfère les lipides  
entre les liposomes  
et les membranes.  
cellulaires

## LTP Maïs



- **Pêche, Pru p 3**  
Sanchez-Monge, JACI 1999
- **Pomme, Mal d 3**  
Pastorello, JACI 1999
- **Abricot, Pru ar 3**  
Pastorello, JACI 2000
- **Châtaigne, LTP**  
Diaz-Perales, Clin Exp 2000
- **Maïs,**  
Pastorello, JACI 2000
- **Cerise, Pru av 3**  
Scheurer, JACI 2001
- **Prune, Pru d 3**  
Pastorello, J Chromato 2001
- **Noisette, Cor a 8**  
Pastorello, JACI 2002

# LE BOULEAU ET LA POMME

## ➤ Mald 1 : Bet v 1 homologue (all.majeur), famille des PR-10

- Bet v 1 et Mald 1 ont 56% de séquence identique
- 75% de la surface de Mald 1 peut se lier aux Ac anti-Bet v 1 (Jenkins et al. JACI, 2005)
- responsable de syndrome oral
- la source initiale est une sensibilisation au pollen de bouleau
- le risque est de 75% qu'un sujet allergique au pollen de bouleau réagisse à au moins un des fruits : pomme, cerise, châtaigne, noisette

« profil Nord »  
« modéré »  
Pollinose Bouleau  
Allergie aux rosacées  
Syndrome oral

## ➤ Mald 3 : protéine de transfert des lipides non spécifiques (PR-14, LTP)

- haut risque de réaction clinique à la **pomme** (Mald 3), la **cerise** (Pru av 3) et la **prune** (Pru d 3) des patients allergiques à la **pêche** (Pru p 3) ou l'**abricot** (Pru ar 3)

## ➤ Mald 2 : famille thaumatin-like protein (PR-5, TLP)

Les TLP sont très stables

haut risque de réaction croisée avec

**réaction croisée directe**

2 de

« profil Sud » « sévère »  
Pas de Pollinose  
Bouleau  
LTP, TLP  
Allergie entre rosacées  
Syndrome systémique

- ✓ L'analyse moléculaire du bouleau et de la pomme
- ✓ a mis en évidence des profils protéiques différents en Europe
- ✓ qui signent une sensibilisation locale
- ✓ et déterminent une expression clinique spécifique

## TABLE II. Other plant food allergens with known biologic functions

Protein classification	Allergen source/allergen
Inhibitors of proteases and $\alpha$ -amylases	Soybean: Kunitz trypsin inhibitor family; cereals: trypsin / $\alpha$ -amylase inhibitors; barley: Hor v 1/BMAI-1, CMb, BDP; wheat: CM16; rye: Sec c 1,* RDAI-1, RDAI-3; rice: RAP
Peroxidases	Wheat, barley
Profilins	Peanut: Ara h 5; soybean: Gly m 3; celery: Api g 4; pear: Pyr c 4; hazelnut, apple, carrot, lychee, tomato, pumpkin seeds
Seed storage proteins	
2S albumins	Yellow mustard: Sin a 1; oriental mustard: Bra j 1; oilseed rape: BnIII; Brazil nut: Ber e 1; English walnut: Jug r 1
Vicilins	Peanut: Ara h 1; English walnut: Jug r 2
Conglutins	Peanut: Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7
Glycinins	Peanut: Ara h 3, Ara h 4; soybean
Beta-conglycinins	Soybean
Thiol-proteases	Papaya: papain; fig: ficin; pineapple: bromelain; kiwi: actinidin/Act c 1; soybean: Gly m 1*
Lectins	Peanut: agglutinin

Breiteneder JACI 2000

\*Signifies that another allergen from the same plant can be found with an identical designation in the literature

# Allergènes de l'arachide et des fruits à coque

	Prolamines		Cupines ou globulines		Homologues de pollens	
	Albumines 2S	LTP	Vicilines 7S (glycosylées)	Légumineuses 11S	Bet v 1 PR10	Profilines
Arachide	Ara h 2/ h 6		Ara h 1	Ara h 3 / h 4	Ara h 8	Ara h 5
Noisette		Cor a 8	Cor a 11	Cor a 9	Cor a 1	Cor a 2
Noix	Jug r 1	Jug r 3	Jug r 2	Jug r 4		
N de pécan	Car i 1					
N de cajou	Ana o 3		Ana o 1	Ana o 2		
N du Brésil	Ber e 1			Ber e 2		
Amande				Pru du		Pru du 4
Pistache	Pis v 1			Pis v 2		
Châtaigne		Cas s 8			Cas s 1	

N de coco

Coc n

Fagales

Juglandales

sapindales

Fabales

Rosales

d'après DAMV

fréquent

Syndrome oral  
allergie croisée avec les rosacées

Cor a 1 (PR-10)  
(thermosensible)

CCD  
Réaction in vivo  
non confirmée



Profiline  
→ Fruits  
→ Légumes

Cor a 9  
(légumineuse 11s)

Pertinence  
clinique non  
confirmée ?

LTP (thermostable)  
Cor a 8

rare

Réaction systémique  
Allergie  
croisée  
avec  
l'arachide

Réaction systémique sévère  
Allergie croisée avec les rosacées

Illustration de la complexité d'un allergène alimentaire

d'après G. Pauli

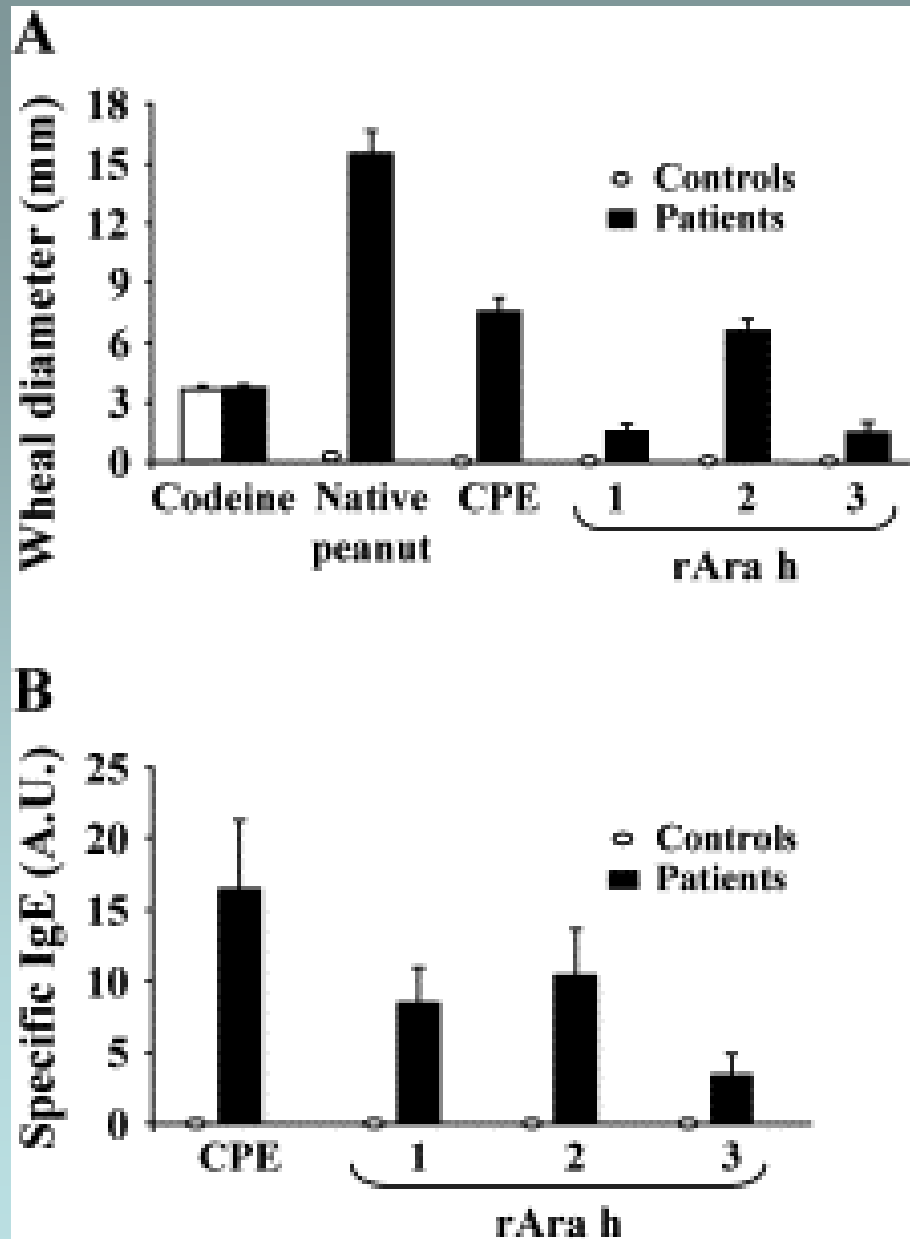


# Intérêt diagnostique des IgEs aux allergènes recombinants d'arachide

G. Kanny et col, CHU Nancy

- **But** : montrer intérêt de 3 allergènes majeurs recombinants de l'arachide : rAra h 1, h 2, h 3
- **Première étude** : chez 30 patients avec TPO + à l'arachide
  - SPT
    - rAra h 2 + 100%, rAra h 1 + 40%, rAra h 3 + 27%
    - 53% était monosensibilisés à Ara h 2
    - (Pas de corrélation entre taille des SPT et sévérité de l'allergie)
  - IgEs: Ara h 2 +100%, Ara h 1 + 50%, Ara h 3 + 20%
  - (Pas de corrélation entre taux IgEs et sévérité de l'allergie)

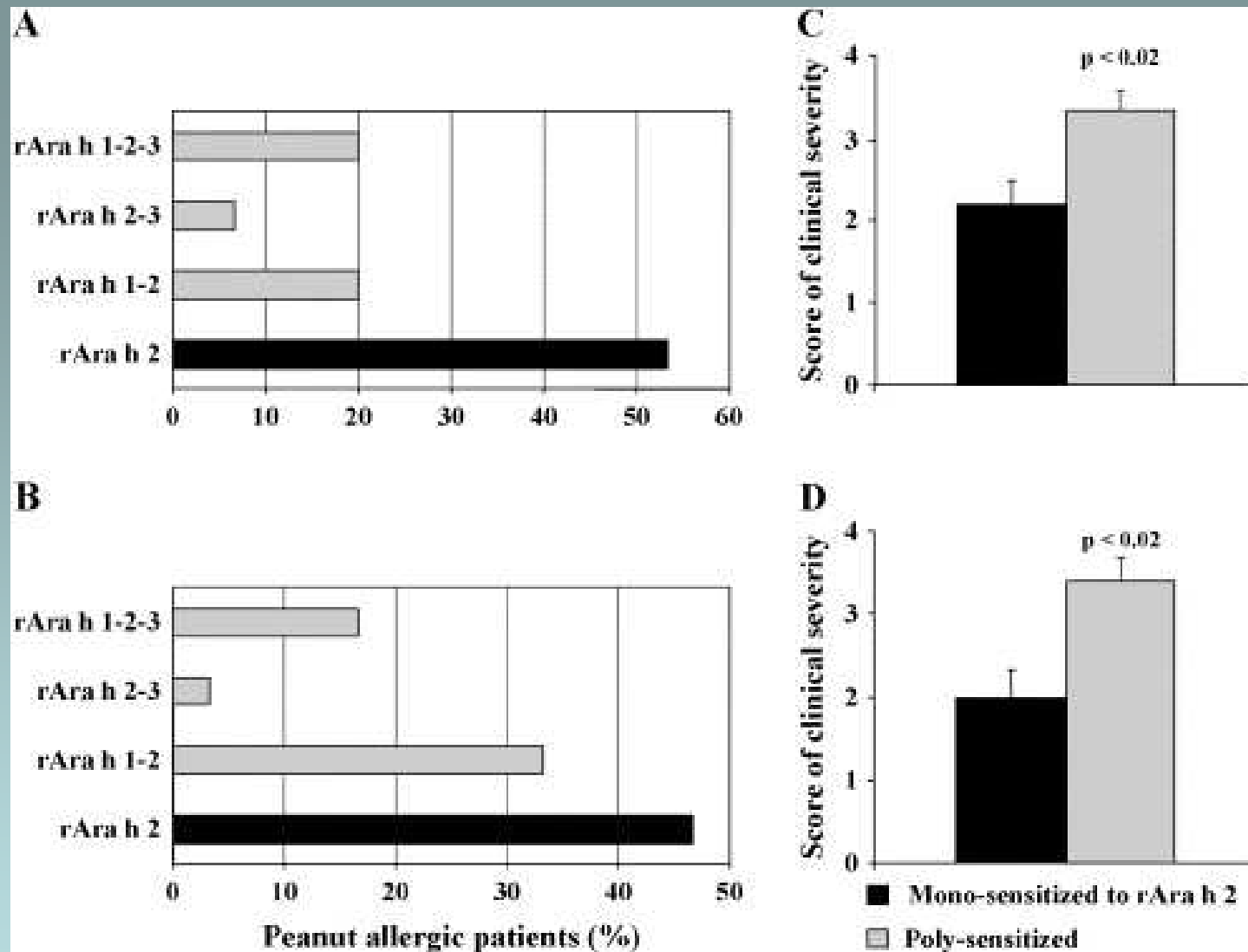
Les patients polysensibilisés présentaient des réactions plus graves



**Fig 3**

Reactivity to peanut extracts and peanut recombinant allergens. **A**, Wheal diameters (mm) obtained by SPT. rAra h 1, 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; rAra h 2 and 3, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **B**, Levels of sIgE determined by ELISA (n = 30 subjects/group).

CPE commercial protein extract



**Fig 4**

Spectrotypes of recombinant allergen reactivity and clinical score of patients monosensitized to rAra h 2 and polysensitized. Spectrotypes as defined by SPT (A) and by sIgE (B). Peanut allergy severity in rAra h 2 monosensitized and polysensitized patients as defined by SPT (n = 16 rAra h 2 monosensitized and n = 14 polysensitized patients; C) and sIgE (n = 14 rAra h 2 monosensitized and n = 16 polysensitized patients; D).

- **Nouvelle étude**

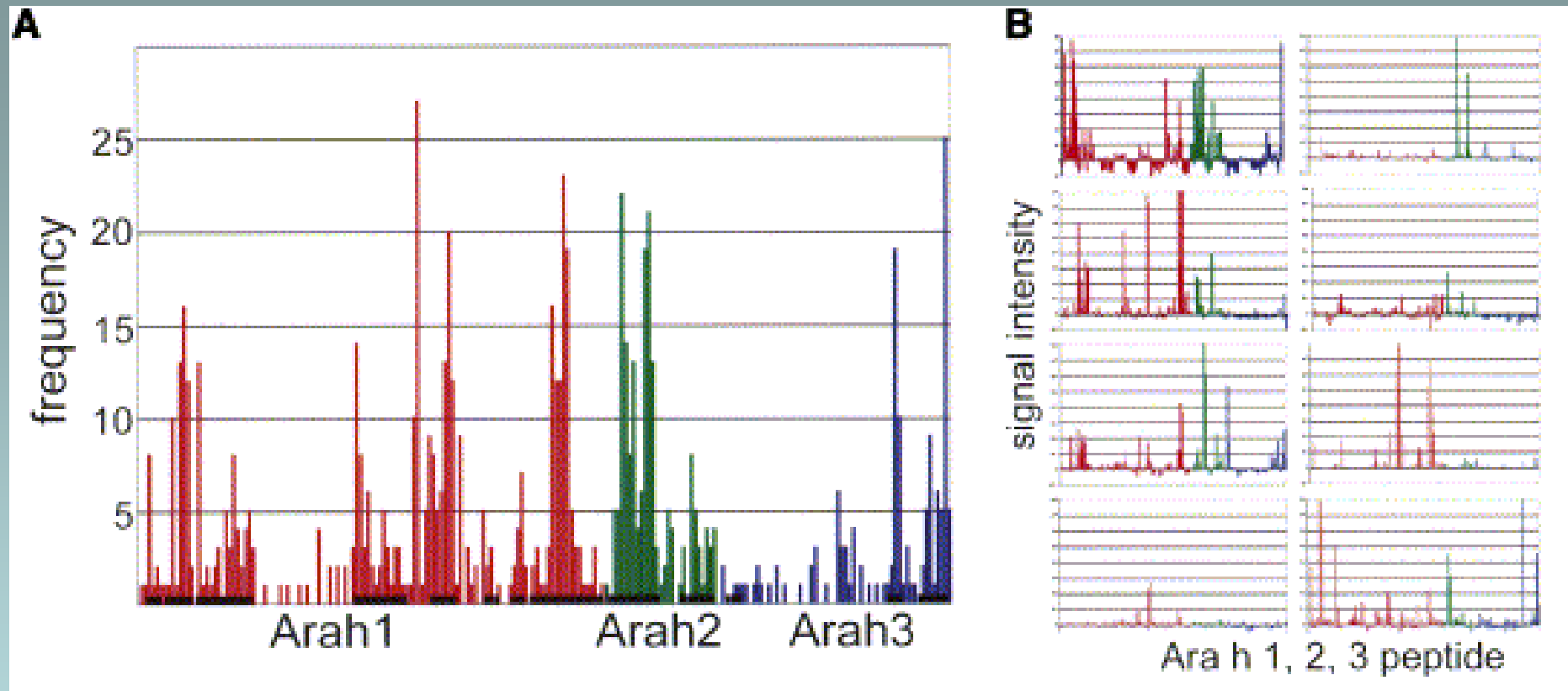
- avec 94 patients allergiques à l'arachide (TPO +)
- 50 contrôles non atopiques
- 39 contrôles atopiques (TC + bouleau et graminées)

IgEs	Contrôles NA	Contrôles A	Allergiques arachide	Sensibilité %	Spécificité %
f13	1	22	94	100	44
rAra h 1	0	0	74	79	100
rAra h 2	0	1	93	99	97
rAra h3	0	1	62	66	97
rAra h 8	0	33	45	48	15

- 18 patients sont monosensibilisés à Ara h 2 (19%)
- 12 sont cosensibilisés à Ara h 1 et Ara h 2 (13%)
- 62 sont polysensibilisés aux 3 (66%)

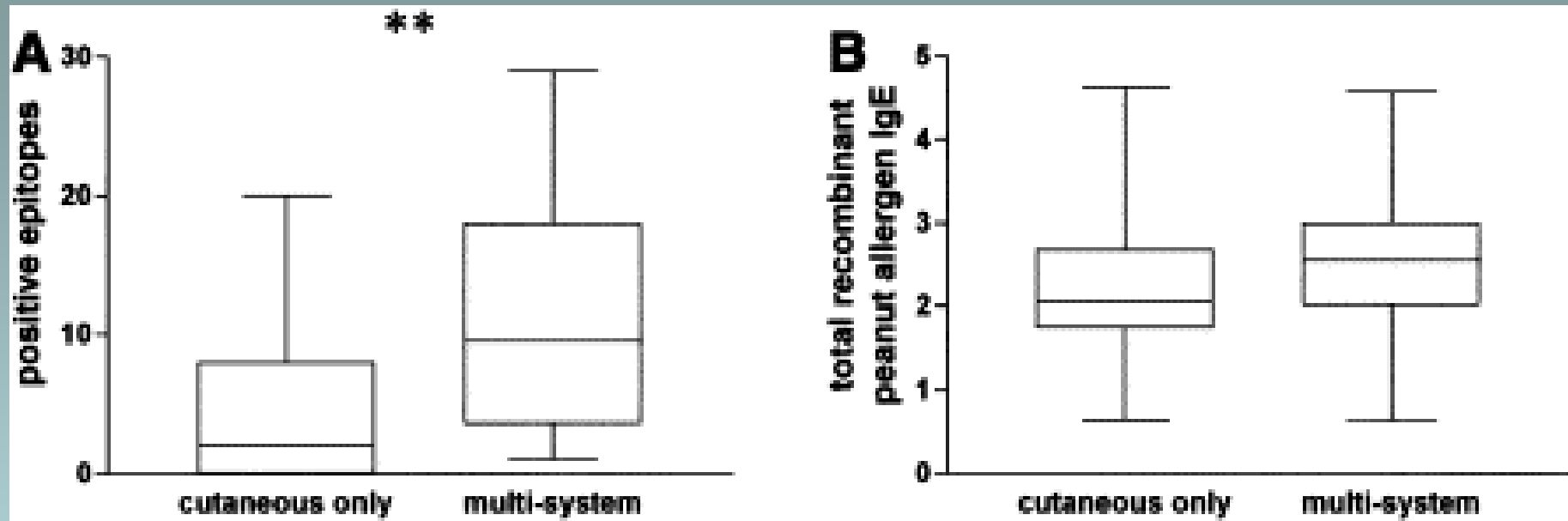
# Conclusion

- Haute sensibilité et spécificité d'Ara h 2 pour le diagnostic de l'AA à l'arachide
- Spécificité particulièrement importante chez des patients polliniques où le taux de faux + avec f13 atteint 56% (confirme étude LMM/ CHU Nancy)
- Absence de pertinence d'Ara h 8 chez les sujets polliniques (RX avec Bet v 1)
- Polysensibilisation qui apparaissait être un facteur de gravité, associé à un seuil de réactivité plus bas lors TPO standardisés n'est pas retrouvé dans cette deuxième étude.



**Fig 2**

IgE epitope profiles. **A**, The frequency of recognition plotted against each peptide on the microarray ordered from N to C terminus of Ara h 1 (*red*), Ara h 2 (*green*), and Ara h 3 (*blue*; n=77). **B**, Eight individual patient IgE profiles.



**Fig 3**

Individuals with a history of more severe peanut-induced reactions recognize more peanut allergen epitopes. A, Individuals with a history of cutaneous symptoms (n=14) recognize fewer epitopes (median, 2; range, 0-20) compared with those with a history of reactions involving multiple organ systems (n=24; median, 9.5; range, 1-29;  $P<.01$ ). B, The same patients have similar recognition of recombinant peanut allergens.

# Le Lupin

- **Le lupin n'a pas d'allergènes caractérisés**
- **Caractérisation de 2 séquences**
  - **une séquence proche d'Ara h 8 de la famille des PR-10**
  - **une séquence proche d'Ara h 1**

Identification of potentially cross-reactive peanut-lupine proteins by computer-assisted search for amino acid sequence homology (Guarneri F. Int Arch Allergy Immunol 2005)

- ✓ L'analyse moléculaire du lupin
- ✓ a permis d'identifier des séquences communes avec l'Ara h 1 et Ara h 8
- ✓ à défaut de caractériser les molécules allergéniques
- ✓ cela permet d'expliquer certaines réactions croisées entre l'arachide et le lupin



# Latex

**Table I**

**ELISA results for identification and quantitation of latex allergens from the internal and external surfaces of natural rubber latex surgical gloves**

Surfaces	Hev b 1 ( $\mu\text{g}/\text{extract}$ )	Hev b 3 ( $\mu\text{g}/\text{extract}$ )	Hev b 5 ( $\mu\text{g}/\text{extract}$ )	Hev b 6.02 ( $\mu\text{g}/\text{extract}$ )
<b>Internal</b>	Not detectable	Not detectable	75.93	56.42
<b>External</b>	0.04	0.14	Not detectable	23.93



# Familles moléculaires: latex et aliments

	B1,3 PR-2	CHI 1 PR-3	CHI 2	CHI 3	LYS	P	PAT
Avocat		Pers a 1	XXXX		XXXX	XXXX	
Banane	XXXX	Mus p 1			XXXX	XXXX	
Chataîgne		Cas s 5	XXXX			XXXX	
Figue		XXXX			XXXX		
Hévéa (latex)	Hev b2	Hev b 6.01 Hev b 6.02 Hev b 11w	Hev b 6.03	héva mine	XXXX	Hev b 8	Hev b 7
Kiwi		XXXX				XXXX	
Papaye		XXXX	XXXX		XXXX		
P de terre	XXXX	XXXX				XXXX	Sola t 1
Soja				XXXX		Gly m 3	
Tomate	XXXX	XXXX	XXXX			XXXX	XXXX

B1, 3 = béta 1, 3-glucanases

D'après H. Malandain

# Exemples pratiques

- **Intérêt de Gly m 4 (réseau Allergo Vigilance)**

Femme, 51 ans. Réaction systémique sérieuse (urticaire généralisée et œdème du visage) après pâtes, poulet et yaourt au soja.

**Prise en charge de l'urgence** : Cabinet de « SOS médecins » :  
Antihistaminiques et corticoïdes injectables.

**Antécédents notables** : Rhinite saisonnière de février à juin avec syndrome oral aux Prunoïdées.

**Bilan allergologique** :

Prick-tests : Histamine : 5mm ;

Soja : 4mm, lait de soja (Sojasun) : 5mm,

Bouleau : 4mm, armoise : 5mm.

IgE spécifiques :

Soja : négatif, rGly m 4 : 6.5kU/L,

rBet v 1:7.9kU/L, rBet v 2 et rBet v 4: négatif, armoise: 0.7kU/L.

**Point particulier** : Tous les aliments ont été consommés ultérieurement (sauf le soja) sans incident.

**Diagnostic** : Anaphylaxie au soja par sensibilisation croisée aux PR-10 (Bet v 1, Gly m 4).

## Intérêt de Gly m 4 (réseau Allergo Vigilance) suite

Femme 70 ans, 3 accidents quelques minutes après lait de soja trois jours de suite : J1 : syndrome oral léger, J2 : Syndrome oral franc, J3 : Syndrome oral, prurit des paumes puis urticaire, angioœdème et obstruction nasale

**Prise en charge de l'urgence** : aucune

**Antécédents notables** : Rhinite et asthme saisonniers

### **Bilan allergologique**

#### Tests cutanés :

Pneumallergènes courants : mono sensibilisation pollen de bouleau

Trophallergènes : extrait soja Allerbio : 2mm, yaourt au soja : 4mm, une boisson à base de soja : négatif, arachide : 3mm

#### IgE spécifiques:

Bouleau : 3.9 kU/L, arachide : 0.24 kU/L, soja : négatif, rGly m 4 : 1.18 kU/L

### **Diagnostic et commentaires :**

- 1. Allergie au Soja. L'allergène cliniquement relevant est Gly m 4 homologue de Bet V1. Cet allergène est en faible quantité dans le soja**
- 2. Une autre observation est que même les homologues de Bet V1 sont à risque d'induire une réaction systémique sérieuse**
- 3. Il est intéressant de noter que dans ce cas d'allergie croisée avec un pollen, des symptômes ORL sont survenus**

# Conclusion

- **Le recours aux AR obtenus par génie génétique permet l'identification précise de protéines allergéniques responsables des réactions croisées**
- **Les AR permettent de fournir un matériel standardisé pour le diagnostic in vivo et in vitro**
- **L'interprétation d'un résultat positif ne pourra se faire en dehors de l'anamnèse et de la présentation clinique.**



**Plant food allergen classes and cross-reactivity: it's all in the genes. The genetic code stands for homologous DNA sequences that encode such cross-reacting allergens.**

**Breiteneder JACI 2000**