

Traitements immunomodulateurs actuels et futurs

Principales implications des allergènes recombinants

J.M. Saint-Rémy

Center for molecular and vascular biology, university of Leuven, campus Gasthuisberg, O&N, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgique

allergènes recombinants / immunisation génique

recombinant allergens / gene immunization

L'avènement des allergènes recombinants nous offre la possibilité de révolutionner le domaine de l'allergie humaine, tant en ce qui concerne les mécanismes physiologiques à la base des réactions allergiques que la thérapeutique. Le propos de ce texte est d'examiner brièvement les principales implications pratiques liées à l'utilisation de molécules recombinantes.

La production des allergènes recombinants est pratiquement devenue une routine de laboratoire. À partir d'ADN génomique ou d'ARN suivi d'une transcription inverse, le segment génique contenant l'information pour la synthèse de l'allergène est inséré dans un vecteur d'expression. Ce vecteur est ensuite introduit dans une culture cellulaire pour production de la protéine correspondante. Deux systèmes d'expression sont actuellement couramment utilisés, soit en cellules de procaryotes telles que *Escherichia coli*, soit en cellules d'eucaryotes. Ces dernières sont des cellules de mammifères, de levure ou d'insectes. Ces systèmes d'expression ne sont pas interchangeables. Les protéines et les allergènes en particulier sont soumis à des modifications post-translacionnelles qui conditionnent la fonction de la protéines. Glycosylation, sulfatation, addition/déletion d'acides aminés, formation de ponts disulfures en sont des exemples marquants. *Escherichia coli* par exemple ne permet pas la glycosylation protéique ; à l'inverse, les cellules de levure ajoutent fréquem-

ment des sucres normalement absents. Le choix du système d'expression n'est donc pas innocent.

PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES EXTRAITS ALLERGÉNIQUES

On peut d'emblée distinguer les avantages que peuvent procurer les allergènes recombinants dans la préparation d'extraits à visée diagnostique et/ou thérapeutique : identification et quantification des composants principaux et réduction des variations de préparation à préparation. De plus, il devient possible d'obtenir une concentration en allergènes dans les extraits basée sur une mesure précise de la quantité de protéine, et non plus sur une évaluation de la réactivité cutanée moyenne de sujets allergiques ou de l'inhibition de fixation d'anticorps IgE spécifiques. Enfin, les protéines recombinantes permettent de produire des anticorps monoclonaux spécifiques servant différents buts, tel que le suivi de la stabilité des extraits et de la conformation tridimensionnelle des allergènes.

RELATIONS STRUCTURE-FONCTION

La conformation d'un allergène est en effet essentielle non seulement pour ses propriétés de liaison aux anticorps IgE, mais également pour ce qui

concerne la fonction physiologique de l'allergène, souvent exprimée par une activité enzymatique. Il faut bien admettre que nous ne connaissons toujours pas les propriétés qui déterminent qu'une protéine se comporte en allergène. Quelques règles générales ont pu être déduites : taille comprise entre 15 et 40 kD, glycosylation, activité enzymatique, etc., mais elles souffrent nombre d'exceptions. Disposer d'une protéine en solution homogène et de sa séquence permet une étude précise de la relation existant entre la structure et la fonction. Ainsi, par mutation dirigée, il est possible de générer des variants ne différant de la protéine native que par un seul ou un petit nombre d'acides aminés. Ceci permet notamment de déterminer les sites de fixation des anticorps spécifiques mais également d'étudier des propriétés a priori indépendante de la production d'anticorps IgE.

Une des questions les plus intéressantes concernant les allergènes, et qui était restée totalement dans l'ombre jusqu'à l'arrivée des molécules recombinantes, concerne le polymorphisme protéique. Le phénomène n'est en soi pas inattendu car largement identifié dans le règne animal comme végétal. L'intérêt vient de la démonstration de propriétés immunogéniques fort variables d'une isoforme à l'autre. Un nombre limité de substitutions d'acides aminés peut en effet entraîner une altération majeure de la capacité de fixation des anticorps IgE. Ce polymorphisme est plus ou moins lié aux zones géographiques évaluées, mais des variations existent au sein d'un même écosystème, ou même d'un seul sujet. Cela ne simplifie pas la tâche de préparation des allergènes pour le diagnostic et le traitement : faut-il utiliser telle ou telle isoforme, ou convient-il de réaliser des mélanges d'isoformes ?

IDENTIFICATION DES ÉPITOPES B ET T

De nombreuses méthodes existent qui permettent de déterminer la localisation des épitopes sur une protéine donnée : utilisation de peptides synthétiques représentatifs de l'ensemble de la séquence de la protéine, mutagenèse dirigée, substitution conservatrice ou non, présentation sur phages, etc. Si les techniques sont bien implantées dans les laboratoires, il reste d'importants problèmes d'interprétation. Quelques exemples devraient inciter à la réflexion :

- le plus souvent, l'identification des épitopes T est réalisée à l'aide de clones de lymphocytes T générés in vitro ; on sait cependant qu'il existe un important biais de sélection dans la production de ces clones, dû autant aux cytokines utilisées qu'aux cellules présentatrices elles-mêmes ;
- les protéines sont porteuses d'épitopes majeurs, mineurs et cryptiques, c'est-à-dire suivant une certaine hiérarchie qu'ignore complètement l'analyse faite à l'aide de peptides ;
- les épitopes reconnus par les anticorps, et en particulier les anticorps IgE, sont essentiellement de nature conformationnelle ; cet aspect des choses est éludé dès que l'on pratique une évaluation à l'aide de peptides.

Malgré ces réserves, il est peu douteux que nous ne soyons au seuil d'une révision complète de notre conception actuelle de l'immunogénicité des allergènes. Voici en bref quelques-uns des progrès que l'on peut attendre de ce type d'analyse :

- identification des sites de fixation des anticorps IgE ;
- élucidation des mécanismes par lesquels les anticorps IgG spécifiques influencent la fixation des IgE et la dégranulation mastocytaire qui en résulte ;
- identification des complexes majeurs d'histocompatibilité impliqués dans la reconnaissance d'un allergène ou d'un épitope allergénique particulier ;
- identification des récepteurs antigéniques des lymphocytes T ;
- étude de la relation entre reconnaissance épitopique et production de cytokines ;
- comparaison à l'échelle moléculaire de la présentation antigénique par différentes cellules compétentes, etc., pour n'en citer que quelques-uns.

RÉACTIVITÉ CROISÉE ET FAMILLES D'ALLERGÈNES

Les comparaisons de séquences de différents allergènes sont instructives à plus d'un titre. Elles permettent de déterminer le degré d'homologie entre des protéines semblables au sein d'une même espèce. Ainsi les allergènes sont-ils repris sous forme de groupes : le groupe 2 des allergènes d'acariens, le groupe 5 des allergènes de graminées, etc. Plus intéressant encore est la découverte d'allergènes iden-

tiques dans des espèces différentes. L'exemple classique est l'allergène Bet v1 du pollen de bouleau, présent au niveau de la pomme (Mal d1). Plus inattendue est la découverte de la parenté allergénique entre la tropomyosine d'acariens et celle d'autres invertébrés.

On en arrive ainsi progressivement à définir des familles d'allergènes partageant les mêmes fonctions physiologiques (profilines, cyclofilines, etc.) et à amorcer une compréhension nouvelle de la pathogénicité des allergènes. Il est fascinant de constater que ces familles d'allergènes sont souvent constituées de protéines participant à la défense anti-infectieuse (par exemple Bet v1) ou de protéines de stress.

Une autre conséquence non négligeable de l'identification d'homologie de séquence est l'émergence d'une nouvelle classification d'allergène. Cela s'inscrit dans un vaste programme de remodelage en profondeur de la botanique actuellement en cours et qui, grâce à l'étude de séquences de protéines à fonction identique, permet le rapprochement de végétaux jusque-là considérés comme distants (rose et ortie, par exemple).

IMPLICATIONS POUR L'IMMUNOTHÉRAPIE

On distingue d'emblée deux niveaux : utilisation d'allergènes recombinants sous forme native, de dérivés ou de (poly)peptides d'une part, et, d'autre part, la vaccination génique et ses variantes. Le premier aspect étant évoqué ailleurs dans ce numéro de la *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, nous n'évoquerons ici que la thérapie génique.

Il s'agit de l'administration directe d'un segment d'ADN sous forme de plasmide par voie intramusculaire, sous-cutanée ou épicutanée. Ce plasmide (unité d'ADN circulaire autonome) est administré seul, adsorbé sur particules ou encapsulé dans un vecteur. Le principe est de faire synthétiser l'allergène correspondant par l'organisme hôte. Cet allergène est pris en charge par une cellule présentatrice locale qui le présente aux lymphocytes T spécifiques dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. L'intérêt majeur de cette méthodologie est de dévier la réponse immunitaire d'une activation préférentielle de Th2 vers une activation Th1, et ceci apparemment aussi bien dans la prévention d'une réponse que durant une réponse déjà établie. Cet effet de déviation est en fait imputable à la présence de « séquences d'immunostimulation », en réalité de motifs CpG qui sont de puissants stimulants des cellules présentatrices amenant une production d'IL-12 et d'IFN- γ .

Une autre forme d'immunothérapie consiste en la production de conjugués faits d'allergène et d'oligonucléotides contenant des séquences CpG. Ici également, la présence de ces séquences favorise la production d'IL-12 et d'IFN- γ et donc une déviation de réponse immunitaire vers un profil Th1 dominant.

CONCLUSION

Les implications des allergènes recombinants sont multiples et il n'est guère douteux qu'il faille les considérer comme une avancée majeure dans le domaine de l'allergie, à la fois sur le plan recherche et sur le plan clinique.