



Article original

Allergie respiratoire aux protéines de feuilles, implication d'un nouvel allergène

Respiratory allergy to leaf proteins, involvement of a new allergen

V. Leduc^{a,*}, A. de Lacoste de Laval^b, C. Ledent^c, M. Mairesse^c

^a Service recherche, Allerbio, ALK-Abello, 7, place de la Défense, 92400 Courbevoie, France

^b Versailles, France

^c Département de pneumo-allergologie, CHR, 185, avenue Albert I, 5000 Namur, Belgique

Reçu le 21 juillet 2008 ; accepté le 24 juillet 2008

Résumé

Les symptômes des sujets présentant une rhinite, une conjonctivite ou une urticaire de contact lors d'une exposition ou d'un contact avec des herbes, sont généralement attribués à une allergie aux pollens de graminées ou à certaines moisissures atmosphériques. Les quatre cas décrits ici présentent des symptômes allergiques lors de la tonte de pelouse. La suspicion d'allergie aux feuilles de pelouse (graminées) a été vérifiée par des tests cutanés natifs. Un extrait de feuille d'ivraie a été produit et les allergènes analysés par SDS-PAGE et immunoempreinte. Trois des quatre patients ont montré la présence d'IgE spécifiques vis-à-vis d'une seule molécule de 56 kDa. Cette protéine est majoritaire dans la feuille, et a été identifiée comme la sous-unité de la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxydase, enzyme majeure du règne végétal, impliquée dans la photosynthèse. Cette protéine est universellement présente dans les feuilles et est, de plus, utilisée comme modèle de non-allergénicité, dans les modèles expérimentaux étudiant l'allergénicité des protéines alimentaires. En effet, elle est instantanément dégradée par les enzymes digestives, contrairement aux principaux allergènes alimentaires connus. L'allergie respiratoire aux protéines de feuilles est donc montrée dans l'étude de ces quatre cas, qu'il y ait ou non existence d'allergie ou de sensibilisation associée aux pollens de graminées.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Symptoms of subjects presenting with rhinitis, conjunctivitis or contact urticaria when exposed or in contact with grass are usually attributed to allergy to grass pollen or to certain airborne molds. The four cases described in the present report presented with allergic symptoms when mowing their lawn. The suspicion of allergy to grass leaves was confirmed by skin prick tests with native leaves. An extract of rye grass leaves was made and its allergens were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Three of the four patients were found to have IgE specific for a single 56 kDa molecule. It was shown to be a major leaf protein and identified as a subunit of ribulose 1,5 diphosphate carboxylase/oxydase, a major plant kingdom enzyme involved in photosynthesis. This protein is widely present in leaves and is, in addition, used as a non-allergenic model in investigation of the allergenicity of food proteins. In fact, it is degraded instantaneously by digestive enzymes, in contrast to the known principal food allergens. In conclusion, respiratory allergy to grass leaf proteins was demonstrated in this study of four patients, who were or were not allergic or sensitized to grass pollen.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie respiratoire ; Protéines alimentaires ; Enzymes ; Graminées

Keywords : Allergy; Grass; Leaves; Allergen; Ribulose 1.5 diphosphate carboxylase/oxydase

1. Introduction

Certains sujets présentent de la rhinite, de la conjonctivite ou une urticaire de contact lors d'une exposition ou d'un contact avec des herbes, symptomatologie habituellement attribuée à

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : v.leduc@allerbio.fr, socpneumoledent@belgacom.net
(V. Leduc).

une allergie aux pollens ou à certaines moisissures atmosphériques, plus rarement à une sensibilisation aux herbes dans le cadre d'une action croisée avec leurs pollens. Nous décrivons quatre cas d'allergie respiratoire observée lors de la tonte de pelouse. Certains des patients testés ne présentent pas d'allergie ni de sensibilisation aux pollens de graminées.

L'objet de cette étude est d'étudier chez ces quatre patients, l'existence d'une allergie IgE-médiée aux protéines de feuilles, allergie déjà identifiée par certains auteurs [1–3] lors de la tonte de pelouse. Malgré la description de ces cas cliniques isolés décrivant des cas d'allergie pouvant aller jusqu'à l'asthme, la fonction des allergènes en cause n'a pu être identifiée jusqu'à présent. Le but est également d'étudier la sensibilisation des patients vis-à-vis des pneumallergènes polliniques et allergènes individuels, et d'identifier les allergènes présents dans l'extrait de pelouse, constituée de feuilles de graminées : ivraie (ray-gras), fétuque...

2. Observations cliniques

2.1. Cas n° 1

Un homme âgé de 40 ans, sans atonie familiale ni personnelle, présente depuis 20 ans, d'avril à septembre, de la rhinite aqueuse, une oppression respiratoire avec toux et sifflements respiratoires ainsi qu'une urticaire lors de la tonte de pelouse ou à proximité du tondeur.

Les prick-tests sont négatifs pour les pneumallergènes usuels et les IgE spécifiques inférieures à 0,35 kU/L pour les acariens, les pollens de graminées, d'armoise et de bouleau, l'*Alternaria* et le *Cladosporium*. Un prick-test réalisé avec le jus de pelouse (JP) frais donne une réaction immédiate avec une papule de 10 mm (codéine : 3 mm) et est négatif chez dix témoins ; le CAP-RAST – « JP » effectué par Phadia (Suède) est de 0,33 kU/L, les IgE spécifiques broméline et rBetv2 inférieures à 0,35 kU/L.

2.1.1. Cas n° 2

Un homme, âgé de 20 ans, porteur depuis l'âge de dix ans d'un coryza périodique par allergie aux pollens de graminées, signale l'apparition quelques années plus tard d'éternuements et d'un prurit oculaire lors du ramassage d'herbes fraîchement tondues.

Les prick-tests réalisés avec les pneumallergènes usuels sont négatifs, exceptés pour le pollen de dactyle, avec une papule de 22 mm (histamine : 3 mm) et les IgE spécifiques dactyle sont à 18,7 kU/L. Le prick-test avec le JP frais donne une réaction immédiate avec une papule de 4 mm, les CAP-RAST – « JP » (Phadia, Suède) sont de 9,5 kU/L et inférieurs à 0,35 kU/L pour la broméline et la profiline de bouleau (rBet v 2).

2.1.2. Cas n° 3

Une femme, âgée de 23 ans, signale une dermatite atopique dans le jeune âge ainsi qu'un asthme apparu vers l'âge de six ans (absence de bilan allergologique). Une exploration est réalisée en 2003 dans une autre institution vu l'aggravation de cet asthme en période verno-estivale, au contact avec des

cobayes ainsi que lors de la cuisson des épinards : les prick-tests sont positifs pour les pollens de bouleau et les graminées ainsi que pour les poils de cobaye, les IgE spécifiques sont positives pour les pollens de graminées et de bouleau ainsi que pour les poils de chat, chien, cheval et cobaye.

Adressée en 2006 pour mise au point, elle nous rapporte l'apparition d'une dyspnée et sibilances lors de la tonte des pelouses depuis plusieurs années et, plus récemment, d'un prurit buccopharyngé suivi d'oppression respiratoire lorsqu'elle consomme épinards, cerfeuil, persil et salade.

Les prick-tests sont positifs pour les pollens de graminées et de bouleau, le JP, le persil et la ciboulette, les IgE spécifiques rBet v 2 et broméline sont inférieures à 0,35 kU/L.

2.1.3. Cas n° 4

Un homme, âgé de 54 ans, signale une dermatite atopique du nourrisson, puis un asthme ainsi qu'une urticaire apparue au cours de l'adolescence, lors de l'ingestion de persil et de cerfeuil. L'exploration réalisée en 1985 met en évidence un syndrome obstructif réversible par salbutamol et une polysensibilisation ([*dermatophagoides pteronyssinus* Dpt], graminées).

Adressé en 2006 pour mise au point, il nous rapporte l'existence, depuis de nombreuses années, d'un prurit plantaire lors de la marche sur herbe, d'une oppression respiratoire lors de la tonte des pelouses et d'un œdème labial lors de l'ingestion de cerfeuil et de persil.

Les prick-tests sont positifs pour le JP et le persil, les IgE spécifiques « Persil » sont à 0,4 kU/L et inférieures à 0,35 pour la broméline et la profiline de bouleau (rBetv2).

Vu la symptomatologie polymorphe des deux dernières observations, nous avons complété la mise au point des premiers patients : dans le cas n° 1, on notait un prick-test positif à la ciboulette et, dans le cas n° 2, un prick-test positif au persil et à la ciboulette ainsi que des IgE spécifiques persil à 5,46 kU/L.

3. Méthodes

3.1. Production de l'extrait pour analyse in vitro

Un extrait « pelouse » (P) est produit au laboratoire par extraction de feuilles d'ivraie, au rapport d'extraction 1/5 p/v, pendant 16 heures à 2–8 °C. L'extrait est ensuite centrifugé à 5000 g, pendant 15 minutes, puis subit une filtration sur 0,2 µm. L'extrait est ensuite conservé à –20 °C.

3.2. Détection des IgE spécifiques par méthode Elisa

La détection des IgE spécifiques est réalisée par méthode Elisa. Les extraits allergéniques et allergènes individuels sont adsorbés, dans un tampon carbonate de sodium, sur une plaque de microtitration à 5 et 1 µg/ml, respectivement. Après une étape de saturation (PBS – Tween 20 0,05 % – gélatine 0,5 %), les sérums, dilués au 1/10 dans le tampon de saturation, sont incubés pendant deux heures. Les IgE spécifiques sont ensuite détectées par des anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgE humaines marqués à la phosphatase alcaline. L'activité

enzymatique est révélée par le substrat pNPP (1 mg/ml) dans un tampon diéthanolamine 10 %, pH 9,5. L'absorbance est lue sur un spectrophotomètre, à 410 nm.

3.3. Détection des allergènes par SDS-PAGE et immunoempreinte

L'extrait « pelouse » est séparé par SDS-PAGE selon la technique de Shägger et Von Yagow, sur un gel d'acrylamide à 12 % [4]. Les extraits sont dilués dans un tampon SDS 5 %, Tris-acétate 50 mM, pH 7,5 avec présence ou non d'un agent réducteur (DTT 1 %). Après la migration, une fraction du gel est colorée au nitrate d'argent [5], et l'autre fraction est soumise à un électrotransfert [6], sur membrane de nitrate de cellulose. L'immunoempreinte est saturée en tampon TBS-Tween 20 0,1 %, 2 % polyvinylpyrrolidone. Les sérums dilués au 1/10 sont incubés pendant la nuit et les IgE sont révélées par des anti-IgE marqués à la phosphatase alcaline et le substrat NBT/BCIP. La sous-unité large (L) de la rubisco est identifiée avec un anticorps spécifique (anti-RbcL) dilué au 1/2000 et des anticorps traceurs marqués à la phosphatase alcaline.

4. Résultats

4.1. Détection des IgE sériques spécifiques

La détection des IgE spécifiques des quatre patients étudiés vis-à-vis des extraits allergéniques de pollens graminées (représenté par le pollen de dactyle), des allergènes individuels de pollen de bouleau (Bet v 1, Bet v 2) et de ceux du pollen de phléole (Phl p 1, 2, 5, 6 et 7) est présenté Fig. 1.

Le patient 1 ne montre pas d'IgE spécifiques détectables vis-à-vis des extraits allergéniques et des allergènes individuels testés. Le patient 2 présente une forte reconnaissance des extraits de pollen de dactyle et de certains allergènes individuels des pollens de graminées (rPhl p 1, rPhl p 5, rPhl p 2). Aucune sensibilisation à Bet v 1 et à la profiline n'est détectée. Les patients 3 et 4 ne sont pas sensibilisés au pollen de graminées, mais au pollen de bouleau via la reconnaissance de Bet v 1.

4.2. SDS-PAGE/immunoempreinte

L'analyse de la spécificité des IgE des quatre patients est analysée par SDS-Page suivie d'immunoempreinte (Fig. 2). Les résultats confirment la présence d'allergènes dans l'extrait de feuilles. Trois des quatre patients montrent une fixation d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'extrait au niveau d'un seul allergène localisé à une masse moléculaire de 56 kDa, en conditions non réductrices et réductrices [1]. Cet allergène est fortement représenté dans l'extrait. Les protéines de feuilles majoritaires étant bien identifiées, notre hypothèse de travail était de confirmer que la molécule de 56 kDa reconnue par les IgE des patients correspond à la sous-unité L (RbcL) de la rubisco. Pour vérifier cette hypothèse, un anticorps de poule, spécifique de la RbcL, a été testé. Cet anticorps est spécifique de toutes les RbcL existantes dans les plantes supérieures, cyanobactéries, phyto-plancton, algues vertes, lichen. . . Les résultats des immunoempreintes démontrent que l'unique allergène reconnu par les trois patients correspond à la sous-unité L de la rubisco. L'anticorps spécifique de la sous-unité L de la rubisco reconnaît également la bande de 56 kDa. Les molécules de plus hautes masses moléculaires (> 100 kDa), reconnues par l'anti-rubisco et les

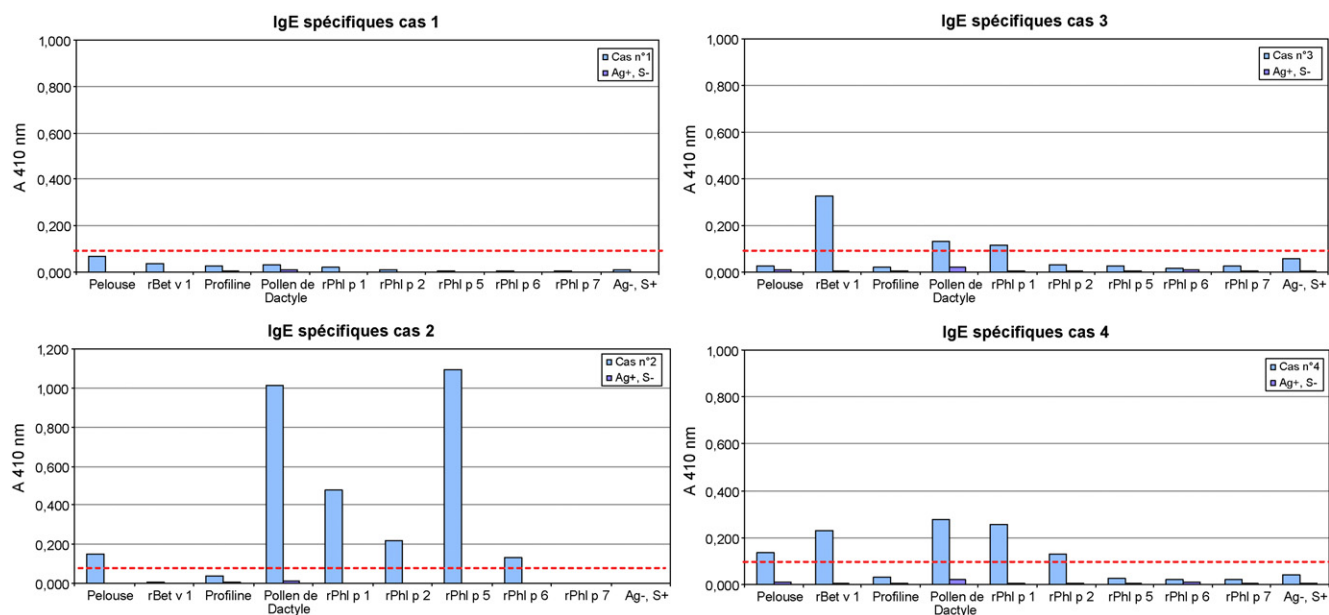


Fig. 1. Détection des IgE spécifiques par Elisa direct vis-à-vis des extraits allergéniques « pelouse » et des allergènes de pollen de bouleau et dactyle et des allergènes individuels Bet v 1, Bet v 2 (profiline), Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 et Phl p 7. Les sérums des patients (cas 1–4) ont été dilués au 1/10. L'adsorption non spécifique de chaque sérum est représentée (Ag–, S+) et l'adsorption non spécifique due à l'antigène est représentée à droite de chaque antigène (Ag+, S–). La ligne rouge représente l'absorbance obtenue pour le standard IgE à 0,35 kUI/L.

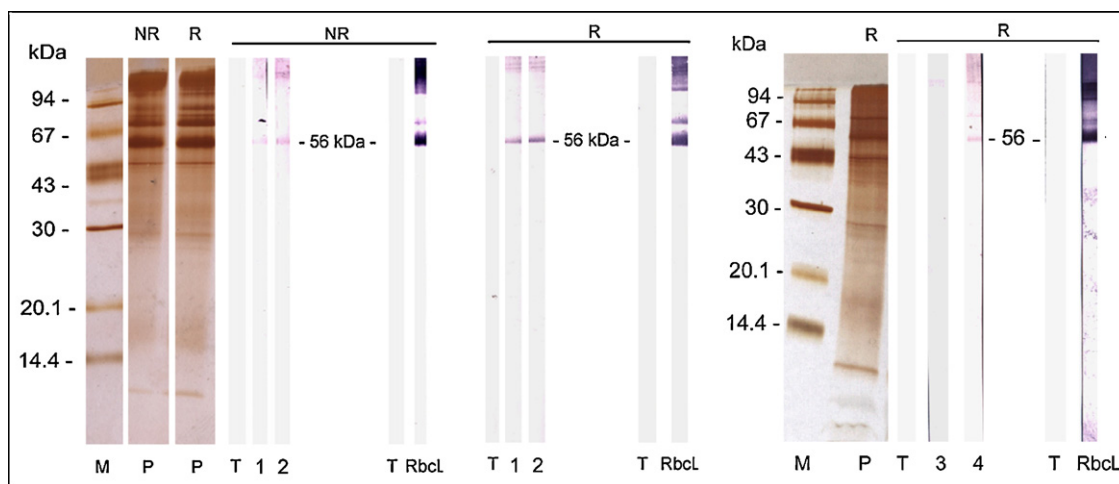


Fig. 2. Analyse des allergènes de l'extrait « pelouse » par SDS-PAGE et immunoempreinte. Les marqueurs de masse moléculaire (M) et l'extrait allergénique de pelouse (P) après coloration au nitrate d'argent. L'extrait « pelouse » a été traité par des conditions non réductrices (NR) et réductrices (R). Détection des IgE spécifiques de quatre patients sensibilisés (cas 1–4). T, bandelette incubée avec le tampon de saturation. Rbcl, bandelette incubée avec l'anticorps anti-rubisco (sous-unité L).

IgE spécifiques des patients, correspond à la rubisco en son état natif et non dissocié.

5. Discussion

Grimm en 1976 [7] rapporte l'observation d'un patient souffrant d'asthme en présence d'herbe fraîchement tondue, symptomatologie qu'il attribuait à une allergie au « JP » basée sur la positivité de tests cutanés à lecture immédiate et d'une réaction de Prausnitz-Küstner ; par la suite, ni Niinimäki [1] et Rowe et al. [2] étudiant des sujets porteurs de rhinoconjonctivite lors de la tonte des pelouses n'ont pu confirmer l'hypothèse de Grimm.

Si Koh et al. [8] démontrent en 1997 l'existence d'une dermatite de contact aux herbes au moyen de patch-tests, Subiza et al. [3] rapportent un cas d'asthme professionnel chez un jardinier lors de la tonte de pelouses : les PT et IgE spécifiques sont positifs pour les pollens ainsi qu'avec un extrait de feuilles de graminées (prick-tests négatifs chez les témoins). Le rôle causal des feuilles de graminées était objectivé par une provocation bronchique avec l'extrait « de pelouse » (réduction du VEMS de 49 % à la vingtième minute). Pour autant, les molécules responsables n'avaient pas été identifiées.

L'analyse de la spécificité des IgE des quatre patients étudiés confirment les données de l'enquête allergologique. Le patient 1 n'est pas sensibilisé aux pneumallergènes testés (pollens de graminées et allergènes majeurs des pollens de graminées, Bet v 1 et profiline), le patient 2 est sensibilisé aux pollens de graminées (dactyle) et aux allergènes spécifiques des pollens de graminées (les groupes 1 et 5), les patients 3 et 4 sont sensibilisés au pollen de bouleau, via la reconnaissance de Bet v 1.

La mise en évidence d'IgE spécifiques par la technique Elisa n'a pas été possible pour les quatre sérums. L'absence ou la faible détection par Elisa des IgE spécifiques dirigées contre l'extrait « pelouse » pourrait être expliqué par le masquage des

épitopes IgE de la sous-unité L, de part sa structure quaternaire (association des différentes unités). Les épitopes ne seraient alors accessibles qu'après dénaturation de la molécule réalisée pour sa séparation par SDS-PAGE. Cependant, cette explication n'est pas en accord avec la bonne réactivité cutanée de l'extrait natif.

L'analyse par SDS-PAGE et immunoempreinte, montre qu'un allergène unique présent dans l'extrait « Pelouse » est détecté par trois des quatre patients. En conditions réductrices et non réductrices, une bande de 56 kDa est visible dans l'extrait ainsi qu'une bande supplémentaire de haute masse moléculaire (> 94 kDa), correspondant à la molécule non dissociée. La fonction identifiée par un anticorps spécifique correspond à la sous-unité L de la rubisco (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase), protéine majoritaire des feuilles et enzyme de l'appareil photosynthétique [9]. Cette protéine chloroplastique peut représenter jusqu'à 50 % des protéines totales de la feuille. C'est la protéine la plus abondante au monde, puisqu'elle représenterait 0,2 % des protéines du globe. La rubisco (EC 4.1.1.39) initie le cycle des pentoses phosphates (cycle de Calvin) en catalysant l'assimilation du dioxyde de carbone atmosphérique (CO₂) au ribulose 1,5 diphosphate pour produire le 3-phosphoglycérate (3-PG).

La structure de la rubisco est complexe, il s'agit d'une molécule composée de huit grandes sous-unités L de 56 kDa et de huit petites sous-unités S (*small*) de 14 kDa. Les grandes sous-unités sont codées par l'ADN des chloroplastes alors que les petites sous-unités sont codées par l'ADN nucléaire. Chaque chaîne L contient un site catalytique et un site régulateur. Le rôle de la chaîne S est pour l'instant inconnu. Les sous-unités de 56 kDa (Rbcl) sont associées deux par deux par un pont disulfure, tandis que les sous-unités de 14 kDa sont associées à la structure de façon non covalente. En conditions natives, la rubisco est donc une protéine de 500–600 kDa environ. La rubisco n'est pas une protéine glycosylée, ce qui exclut la notion de reconnaissance de la molécule via des IgE spécifiques

des déterminants carbohydrates cross-réactifs (CCD) présents sur certains allergènes du règne végétal.

L'étude précise de ces quatre cas cliniques démontre l'implication des feuilles de graminées dans l'allergie respiratoire à la pelouse. L'allergène principal identifié est la sous-unité L de la rubisco. Cette protéine n'ayant, pour le moment, jamais été décrite comme un allergène malgré sa présence majeure dans le règne végétal, est utilisée comme une protéine modèle dans les études concernant la relation entre allergénicité alimentaire et stabilité à la digestion et dénaturation thermique. En effet, la stabilité de la rubisco à la digestion enzymatique a été testée par de nombreux auteurs. Astwood et al. ont démontré que cette molécule est dégradée par la pepsine en moins de 15 secondes, tandis qu'Ara h 2 est stable pendant au moins 60 minutes dans les mêmes conditions [10]. La rubisco est donc reconnue pour son risque allergène « nul » [10–14]. D'autres molécules dont l'allergénicité n'a pas été démontrée sont également utilisées comme « modèle » de non-allergénicité : le cytochrome c, la sucrose synthase...

6. Conclusions

En conclusion, l'aérosolisation de JP lors de la tonte et de la manipulation d'herbe fraîchement tondue peut engendrer une symptomatologie allergique indépendamment d'une sensibilisation aux pollens de graminées ou à certaines moisissures atmosphériques. Cette étude décrit les premiers cas d'allergie respiratoire, induite par les protéines de feuilles, impliquant un allergène majeur identifié comme la sous-unité L de la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxydase, protéine la plus prépondérante au monde, et utilisée comme un modèle de non-allergénicité alimentaire.

Références

- [1] Niinimäki A. Allergy to grass juice. *Acta Allergol* 1977;32:192–4.
- [2] Rowe MS, Bailey J, Ownby DR. Evaluation of the cause of nasal and ocular symptoms associated with lawn mowing. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:714–9.
- [3] Subiza J, Subiza JL, Hinojosa M, Varela S, Cabrera M, Marco F. Occupational asthma caused by grass juice. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:693–5.
- [4] Schägger H, Von Yagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 100 kDa. *Anal Biochem* 1987;166:368–79.
- [5] Rabilloud T, Brodard V, Peltre G, Righetti PG, Ettori C. Modified silver staining for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1992;13:264–6.
- [6] Kyhse-Anderson J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without tank buffer for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203–9.
- [7] Grimm I. Grass juice asthma. A contribution to the theme “fragrance allergy”. *Z Hautkr* 1976;51:7–8.
- [8] Koh D, Goh CL, Tan HT, Ng SK, Wong WK. Allergic contact dermatitis from grasses. *Contact Dermatitis* 1997;37:32–4.
- [9] Mizziorko HM, Lorimer GH. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu Rev Biochem* 1983;52:507–35.
- [10] Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996;14:1269–73.
- [11] Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull* 2003;26:969–73.
- [12] FAO/WHO consultation. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity derived from biotechnology. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy, 2001.
- [13] Pasteau S, Bannon G, Astwood J, Goodman R, Cockburn A. Évaluation du potentiel allergène des aliments dérivés de plantes génétiquement modifiées. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003;43:24–30.
- [14] Fu T, Abbott U, Hatzos C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – A comparative study. *J Agric Food Chem* 2002;50:7154–60.