

Revue générale

Sensibilisation au frêne : allergènes spécifiques et/ou allergènes croissants ? ☆

Sensitization to ash: specific and/or cross-reacting allergens?

G. Pauli ^{a,*}, I. Papanikolaou ^a, V. Niederberger ^b

^a Service de pneumologie, Inserm U425, hôpital Lyautey, hôpitaux universitaires de Strasbourg,
1, place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg cedex, France

^b Département de pathophysiologie, hôpital général Vienne, université de Vienne, Autriche

Reçu le 13 décembre 2002 ; accepté le 20 décembre 2002

Résumé

Le frêne commun (*Fraxinus excelsior*) appartenant à la famille des oléacées est largement répandu dans l'ensemble du territoire européen. La fréquence des sensibilisations cutanées au pollen de frêne, constatée depuis quelques années, fait discuter la pertinence clinique de ces sensibilisations souvent observées chez des patients polliniques polysensibilisés. Une meilleure connaissance des allergènes des pollens, ainsi que la possibilité d'effectuer des expérimentations avec des allergènes purifiés ou recombinants a permis de différencier les allergènes spécifiques du pollen de frêne de ceux contenus dans d'autres pollens parfois taxonomiquement éloignés. Les auteurs présentent une revue de la littérature concernant les sensibilisations au frêne observées chez les patients polliniques et relèvent la rareté de la monosensibilisation aux allergènes de frêne. Ils décrivent également la pluralité des profils de sensibilisation observés chez les patients sensibilisés à un extrait de frêne, les sérums de ces patients pouvant réagir avec des familles moléculaires différentes : allergène majeur des oléacées, profiline, protéines liant le calcium, allergènes de haut poids moléculaire... Les sensibilisations vis-à-vis des allergènes « croissants » permettent de mieux interpréter des sensibilisations concomitantes à plusieurs extraits de pollens.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Common ash (*Fraxinus excelsior*), which belongs to the oleaceae family, is widely spread over the European continent. The frequency of skin sensitization to ash pollen, now reported for several years, leads to a discussion of the clinical significance of this sensitization, one that is often observed in polysensitized pollinosis patients. A better understanding of pollen allergens, together with the possibility of undertaking studies with purified and recombinant allergens, has allowed differentiation of ash-specific allergens from allergens present in plants that are taxonomically different from *F. excelsior*. The authors present a review of the literature concerning sensitization observed in pollinosis patients and point out the rarity of sensitization to ash pollen alone. They also describe the different sensitization profiles in ash-pollen sensitized patients whose sera reacts with different molecular families of allergens, including the major allergen of the oleaceae family, profilin, calcium-binding proteins, high molecular weight allergens et al. Awareness of sensitization to cross-reacting allergens leads to a better interpretation of concomitant sensitization to several pollen extracts.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Mots clés : Pollen de frêne ; Oléacées ; Allergènes croissants

Keywords: Ash pollen; Oleaceae; Cross-reacting allergens

☆ Présentation aux Journées parisiennes d'allergologie des 8/10 janvier 2003.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Gabrielle.Pauli@chru-strasbourg.fr (G. Pauli).

Les sensibilisations aux pollens de frêne sont souvent mises en évidence dans un contexte de polysensibilisations vis-à-vis de plusieurs pollens. L'apport du diagnostic moléculaire, grâce à l'utilisation d'allergènes recombinants, devrait permettre d'effectuer des diagnostics plus précis et de différencier les sensibilisations et allergies liées aux allergènes majeurs du frêne des sensibilisations liées à des allergènes présents dans d'autres extraits de pollens.

1. Données botaniques et cliniques

Le frêne, arbre forestier d'Europe, appartient à la famille des Oléacées. Les deux espèces principales rencontrées en France sont *Fraxinus excelsior* et *Fraxinus ornus*. Il existe une parenté botanique étroite avec le jasmin (*Jasminum*), le lilas (*Syringa*), le troène (*Ligustrum*), le forsythia (*Forsythia*) et l'olivier (*Olea*). Les pollens de frêne ont un diamètre voisin de 25 µm et un poids moyen de 13 ng. Des quantités importantes de pollens de frêne sont mises en évidence en France dans le Nord-Est, au voisinage du bassin méditerranéen et dans la région Rhône-Alpes, mais leur présence est également signalée dans les régions du Sud-Ouest. La durée de dissémination des pollens s'étale de 5 à 6 semaines, à partir de la 1^{re} quinzaine du mois de mars, avec cependant des pics de pollinisation se situant par exemple à Strasbourg fréquemment fin mars et début avril (données RNSA des 12 dernières années). Cette période de pollinisation correspond également en France à celle des bétulacées et en particulier à celle du bouleau.

Sur le plan clinique, la pollinose au frêne associe rhino-conjonctivite et asthme [1–4]. Sa réalité a été objectivée par certains auteurs par des tests de provocation nasale [2,3]. Le bilan allergologique comportant des tests cutanés et des recherches d'IgE spécifiques vis-à-vis d'extraits commerciaux de frêne, montre dans un certain nombre de cas des discordances. De nombreux auteurs ont souligné la fréquente association à d'autres pollinoses aux arbres, en particulier aux bétulacées [1–5] mais aussi aux graminées. La co-sensibilisation fréquente chez un même individu aux pollens de bouleau et de frêne, rend difficile l'évaluation de l'impact clinique causé par l'allergie au frêne, en raison de la superposition des calendriers polliniques de ces deux pollens dans de nombreuses régions.

2. Monosensibilisations et polysensibilisations aux pollens de frêne

Seule l'enquête Isaac (phase II) a étudié la prévalence de la sensibilisation au frêne dans une population générale. La batterie d'allergènes utilisée dans cette enquête a inclus le pollen de frêne à Strasbourg et à Reims. Il s'avère que dans une population d'enfants strasbourgeois âgés de 9 à 10 ans, 4,4 % d'entre eux sont sensibilisés à cet allergène (résultats non publiés). D'autres enquêtes ont été effectuées dans des populations d'allergiques ayant des tests cutanés positifs aux pollens. Hemmer et al. [5] en Autriche, relèvent 17,6 % de patients présentant une sensibilisation aux pollens de frêne parmi 5416 sujets. Seuls 9 % d'entre eux ont une monosensibilisation aux pollens de frêne. Dans un travail personnel [6] concernant 275 consultants consécutifs de notre service, testés à 10 extraits polliniques différents, 82 (32 %) ont une sensibilisation aux pollens de frêne, mais on ne retrouve parmi eux que 8 monosensibilisés. Il faut rapprocher ce chiffre de celui obtenu par Mari [7] dans une population italienne de 1294 sujets, testés à 23 espèces polliniques différentes, où une monosensibilisation aux pollens d'olivier n'est retrouvée que dans 7 % des cas parmi l'ensemble de la population de polliniques monosensibilisés (Tableau 1).

Les sensibilisations associées aux pollens de frêne ont été précisées dans 2 études : Hemmer et al. [5], en ne prenant en compte que les patients sensibilisés à 2 ou 3 familles polliniques, mettent en évidence que l'allergie aux pollens de fagales est celle qui est la plus souvent associée (26,7 %), devançant l'allergie aux pollens de graminées (13,9 %). Dans l'étude strasbourgeoise [6], parmi 74 patients présentant des polysensibilisations, la famille allergénique la plus souvent associée est la famille des poacées (84 %), devançant celle des bétulacées (68 %) ; d'autres cosensibilisations sont retrouvées moins fréquemment : armoise, ambroisie et plantain (avec des prévalences respectives de 22, 23 et 27 %) et plus rarement ortie et platane (10 et 15 %).

3. Les allergènes du frêne, relation avec d'autres pollens

3.1. L'allergène majeur du frêne

Il a été purifié par Obispo et al. [8] en même temps que les allergènes majeurs d'autres oléacées (troène et lilas). Les

Tableau 1
Prévalence de la sensibilisation à un extrait de frêne ou d'olivier dans des populations de patients sensibilisés à divers pollens

	Nombre de patients sensibilisés aux pollens	% des patients sensibilisés au frêne ou à l'olivier*	% des monosensibilisations au frêne ou à l'olivier par rapport aux sujets sensibilisés au frêne ou à l'olivier*	% de monosensibilisés au frêne ou à l'olivier* par rapport à l'ensemble des patients sensibilisés aux pollens
Hemmer [5]	5416	17,6	9	1,6
Schetchikova [6]	275	32	9	2,9
Mari [7]	1294	34	6,4	2,2

* Concerne l'étude de Mari [7].

homologies avec l'allergène majeur de l'olivier Ole e 1 ont été confirmées par des techniques immunochimiques et de séquençage d'acides aminés. Les protéines correspondant aux allergènes majeurs des oléacées ont un poids moléculaire d'environ 20 kDa [9–12]. Ole e 1 a pu être produit sous forme recombinante dans un système d'expression utilisant la levure *Pichia pastoris* et son activité biologique a été démontrée in vitro et in vivo [13,14]. Ole e 1 appartient à une famille de protéines hautement conservées, présentant des similarités de structure avec les protéines inhibitrices de la trypsine du soja présente dans de nombreux végétaux (arbres, graminées, herbacées) [15]. Dans l'étude autrichienne de Hemmer et al. [5] les sérums provenant de patients monosensibilisés au frêne reconnaissent électivement un allergène de 17–23 kDa, que les auteurs attribuent à Fra e 1, cet allergène n'étant reconnu qu'inconstamment par les sérums de sujets polysensibilisés (dans seulement 75 % des cas). Dans une étude personnelle, parmi 40 sérums de patients allergiques aux pollens de frêne, 23 reconnaissent une protéine de poids moléculaire de 21–25 kDa présumée être Fra e 1. Des expérimentations supplémentaires ont été effectuées pour appuyer cette hypothèse ; elles donnent les résultats suivants : absence d'inhibition de cette protéine après préincubation avec des allergènes recombinants correspondant à d'autres allergènes possibles du frêne, inhibition complète de la bande 21–25 kDa après incubation avec un extrait de pollens d'olivier [16].

3.2. Les autres allergènes présents dans un extrait de frêne

3.2.1. Fra e 2

Wahl et al. [17] signalent déjà la présence de bandes de précipitation à partir de 14 kDa sur des immunoblots de frêne révélés par des sérums de patients allergiques au frêne. Hemmer et al. [5] identifient une profiline grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la profiline du céleri. Ceci est confirmé dans notre étude [16] où le sérum de lapin obtenu par immunisation avec la profiline recombinante, reconnaît la même bande sur un blot de frêne. D'autre part, les immunoblots réalisés avec les sérums de nos patients ont montré dans 20 cas sur 40 des zones de précipitation se situant entre 18 et 14 kDa, pouvant correspondre à la liaison des IgE avec la profiline présente dans l'extrait de pollens de frêne. Des expériences d'inhibition avec rBet v 2 sur un sérum reconnaissant uniquement une bande entre 10 et 14 kDa montre la disparition complète du signal sur le blot frêne, alors que la préincubation de ce même sérum avec l'allergène recombinant rBet v 1 ne modifie pas le signal à 14 kDa. La préincubation avec les allergènes de pollens d'autres familles fait également disparaître ce signal. On sait que les profilines constituent une famille de protéines ayant d'importantes homologies entre elles. Pour la famille des oléacées, Ledesma et al. [18] ont isolé Ole e 2 dans un extrait de pollens d'olivier, à l'aide d'anticorps de lapin immunisé par l'allergène recombinant de la profiline de bouleau. De

plus, ces auteurs ont démontré qu'un extrait de pollens de frêne pouvait inhiber ces anticorps.

3.2.2. Fra e 3

Hemmer et al. [5] signalent l'existence de sérums de patients allergiques au frêne reconnaissant sur le blot frêne une bande à 10 kDa qu'il rapproche de Ole e 3 isolé dès 1996 par Batanero et al. [19]. Ole e 3 appartient à la famille des protéines liant le calcium, retrouvées dans de nombreux végétaux et plus préférentiellement dans le pollen plutôt que dans les autres parties de la plante. Il existe une importante communauté des épitopes B reconnus par les IgE pour les protéines liant le calcium, issus de pollens variés, en particulier pour les protéines liant le calcium du pollen d'aulne, Aln g 4, du pollen de bouleau Bet v 4, du pollen d'olivier Ole e 3, du pollen de frêne Fra e 3, du pollen de cynodon Cyn d 7, du pollen de phléole Phl p 7, du pollen de Colza Bra n 1 et Bra r 1 [20–24]. Dans notre étude, un sérum de lapin sensibilisé avec Aln g 4 reconnaît une bande à 8–9 kDa sur le blot frêne. D'autre part, nous avons pu inhiber un sérum reconnaissant électivement une protéine de poids moléculaire de 6–8 kDa par rPhl p 7, homologue de Aln g 4 et de Ole e 3, ainsi que par des extraits de pollens contenant cet allergène (bouleau, olivier, frêne, phléole).

3.2.3. Allergènes de haut poids moléculaire (35 kDa)

Les immunoblots réalisés avec les 40 sérums de notre étude montrent dans 6 cas une bande à 36 kDa qui est reconnue de manière exclusive dans 3 cas. Il a été possible d'inhiber ce signal par la préincubation des sérums avec du pollen de bouleau, d'olivier et d'ambroisie. Par contre, aucune inhibition n'est obtenue par la préincubation des sérums avec les allergènes recombinants rBet v 1, rBet v 2 et rPhl p 7. Sur des blots d'olivier et de bouleau on note la présence d'une bande qui se situe dans une zone de même poids moléculaire. Pour le bouleau, cette bande correspond à Bet v 5, une isoflavone réductase [25] et on peut suggérer qu'il existe dans le pollen de frêne une protéine analogue.

3.2.4. Groupe d'allergènes de haut poids moléculaire, supérieur à 30 kDa

Hemmer et al. [5] rapportent 2 sérums qui fixent sur l'immunoblot de frêne une large zone de protéines situées entre 40 et 80 kDa, les mêmes fixations étant obtenues sur un immunoblot de pollen d'olivier. Pouvant inhiber ces signaux par une préincubation avec la bromélaïne, il en déduit qu'il s'agit de résidus polysaccharidiques et de glycoprotéines [26]. Dans notre étude, 12 sérums reconnaissent plusieurs bandes de poids moléculaire supérieur à 30 kDa. Dans un cas, des expériences d'inhibition ont été réalisées et ont montré que la préincubation du sérum avec des extraits de pollens de graminées et de pollens d'olivier entraîne la disparition de ces bandes. Phl p 4 est un allergène de haut poids moléculaire du pollen de phléole. Un immun sérum de lapin, anti-Phl p 4, fixe de nombreuses bandes de haut poids moléculaire sur le blot frêne. Enfin, un immun sérum de lapin

Tableau 2 (d'après [16])

Poids moléculaire des bandes détectées en immunoblot par 40 sérums de patients sensibilisés au pollen de frêne et fréquence de leur reconnaissance

Poids moléculaire	Nombre de sérums positifs	Nombre de monosensibilisés
6–8 kDa (protéine de liaison au calcium)	2	1
12–18 kDa (profiline)	20	8
21–25 kDa (allergène majeur des oléacées)	23	6
35 kDa (isoflavone réductase « like »)	6	3
Allergènes de haut poids moléculaire (> 30 kDa)	12	1

obtenu par immunisation par un polypeptide de haut poids moléculaire du bouleau, Bet v 8, une protéine analogue à la pectine estérase, fixe également des bandes de haut poids moléculaire. Ainsi, on peut suggérer que des molécules homologues aux allergènes Phl p 4 et Bet v 8 pourraient être contenues dans le pollen de frêne.

L'ensemble des résultats obtenus par l'analyse du profil allergénique des sérums des 40 patients de notre étude est résumé dans le Tableau 2.

4. Conclusion

D'après les données de la littérature actuelle, il s'avère que la détection des IgE spécifiques vis-à-vis des différents allergènes pouvant être présents dans le frêne, permet de dissocier 2 groupes de patients, ceux sensibilisés à l'allergène majeur des oléacées et ceux qui présentent en plus, des sensibilisations à des allergènes différents, certains patients pouvant être monosensibilisés à ces allergènes qui ont de fortes homologues avec des allergènes présents dans d'autres espèces polliniques. De ce fait, on ne peut exclure que l'origine des IgE spécifiques reconnaissant ces allergènes « croissants » n'est pas simplement la conséquence de l'exposition à d'autres espèces polliniques, tels que les pollens de bouleau et de graminées largement représentés dans les comptes polliniques de nos régions.

Références

- [1] Lelong M, Castelain MC, Sulmon G. Existe-t-il en France, une pollinose au frêne ? Rev Fr Allergol 1992;32:41–2.
- [2] Schmid P, Peeters AG, Wüthrich M. L'allergie au pollen de frêne existe en Suisse, nous l'avons rencontrée. Rev Fr Allergol 1992;32: 139–40.
- [3] Laurent J, Guinnepain MT, Sauvaget J, Lafay M. La pollinose du frêne (*Fraxinus excelsior* L.) à Paris. Rev Fr Allergol 1998;38:89–93.
- [4] Sawaf K, Oster JP, Kopferschmitt MC, de Blay F, Pauli G. La pollinose au frêne en Alsace : à propos de 12 observations. Rev Fr Allergol 1997;37:1154 Abst.
- [5] Hemmer W, Focke M, Wantke F, Jarisch R, Jager S, Gotz M. Ash (*Fraxinus excelsior*) pollen allergy in central Europe: role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. Allergy 2000;55:923–30.
- [6] Schetchikova O, Hutt N, Papanikolaou I, Pauli G. Sensibilisation aux pollens en Alsace. Étude prospective sur 3 ans. Alsamed soumis pour publication.
- [7] Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. Int Arch Allergy Immunol 2001;125:57–65.
- [8] Obispo TM, Melero JA, Carpizo JA, Carreira J, Lombardero M. The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of the oleaceae family. Clin Exp Allergy 1993;23:311–6.
- [9] Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, et al. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from Olive tree pollen, Polymorphism analysis and tissue specificity. J Biol Chem 1994;269:15217–22.
- [10] Lombardero M, Barbas JA, Moscoso del Prado J, Carreira J. cDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e I. Clin Exp Allergy 1994;24:765–70.
- [11] Batanero E, Villalba M, Lopez Otin C, Rodriguez R. Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen, Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. Eur J Biochem 1994;221:187–93.
- [12] Batanero E, Gonzalez de la Pena MA, Villalba M, Monsalve RI, Martin-Esteban M, Rodriguez R. Isolation. cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. Clin Exp Allergy 1996;26:1401–10.
- [13] Huecas S, Villalba M, Gonzalez E, et al. Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. Eur J Biochem 1999;261: 539–46.
- [14] Quiralte J, Gonzalez E, Arias de Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Saenz De San Pedro B, et al. Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with Olea europea pollinosis. Int Arch Allergy Immunol 2000;122:101–7.
- [15] Van Ree R, Hoffman DR, van-Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koeleman CA, Grande M, et al. Lol p 11, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. J Allergy Clin Immunol 1995;95:970–8.
- [16] Niedeberger V, Purohit A, Oster JP, Spitzauer S, Valenta R, Pauli G. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species. Clin Exp Allergy 2002;32:933–41.
- [17] Wahl R, Schmid-Grendelmeier P, Cromwell O, Wüthrich B. In vitro investigation of cross-reactivity between birch and ash pollen allergen extracts. J Allergy Clin Immunol 1996;98:99–106.
- [18] Ledesma A, Rodriguez R, Villalba M. Olive-pollen profiling, Molecular and immunologic properties. Allergy 1998;53:520–6.
- [19] Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente XS, Rodriguez R. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. Eur J Biochem 1996;241:771–8.
- [20] Twardosz A, Hayek B, Seiberler S, et al. Molecular characterization, expression in *Escherichia coli* and epitope analysis of a two EF-hand calcium-binding birch pollen allergen, Bet v 4. Biochem Biophys Res Commun 1997;239:197–204.
- [21] Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of calcium-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. Eur J Biochem 1998;258:454–9.
- [22] Suphioglu C, Ferreira F, Knox RB. Molecular cloning and immunological characterization of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. FEBS Lett 1997;402:167–72.

- [23] Niederberger V, Hayek B, Vrtala S, et al. Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two-EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. *Faseb J* 1999;13:843–56.
- [24] Toriyama K, Okada T, Watanabe M, et al. A cDNA clone encoding and IgE binding protein from *Brassica anther* has significant sequence similarity to Ca²⁺ binding proteins. *Plant Mol Biol* 1995;29: 1157–65.
- [25] Karamloo F, Schmitz N, Scheurer S, Foetisch K, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. Molecular cloning and characterization of birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:991–9.
- [26] Pike RN, Bagorozzi Jr D, Travis J. Immunological cross-reactivity of the major perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Lol p I and the cysteine proteinase, bromelain. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112: 412–4.