

Structure et fonction de quelques protéines allergéniques d'origine animale et végétale

J.-P. DANDEU, J. RABILLON, B. DAVID

RÉSUMÉ

Nous avons essayé d'apporter un certain nombre d'arguments théoriques, et expérimentaux à l'appui de l'hypothèse selon laquelle il pourrait exister une relation entre la structure, la fonction et l'allergénicité de certaines protéines d'origine animale ou végétale. En fait on peut supposer que la fonction de transporteur ou l'activité enzymatique de certaines protéines peut avoir un effet au niveau de la membrane des cellules immunologiquement compétentes ce qui pourrait leur conférer une plus grande capacité à sélectionner préférentiellement les profils des lymphocytes Th2, inducteurs de la réponse IgE. La distinction entre immunogénicité et allergénicité ne repose actuellement que sur la capacité génétique du receveur à produire de l'IgE et sur les conditions environnementales qui permettent cette réponse à IgE. Au niveau moléculaire, on remarque que les homologies de structure entre différentes molécules allergéniques n'entraînent pas obligatoirement une antigénicité croisée.

SUMMARY

Structure and function of several allergenic animal and plant proteins. – The authors try to provide a number of theoretical and experimental arguments in favour of the hypothesis of a possible relationship between the structure, function and allergenicity of certain animal or plant proteins. The transport function or enzymatic activity of certain proteins can be assumed to have an effect on the membrane of immunologically competent cells which could endow them with a greater capacity to preferentially select the profiles of Th2 lymphocytes, inducers of the IgE response. The distinction between immunogenicity and allergenicity is currently exclusively based on the genetic capacity of the recipient to produce IgE and the environmental conditions which allow this IgE response. At the level molecular, structural homologies between various allergenic molecules do not inevitably induce crossed antigenicity.

Il y a dans ce titre trois grandes notions entre lesquelles on aimerait voir exister une relation intime et trouver ainsi une réponse à une très vieille question : qu'est-ce qui fait qu'un allergène est un allergène ? Il serait en effet tentant de croire que des allergènes ayant une structure commune et une fonction semblable, puissent avoir en plus des communautés antigéniques. Il resterait que

ceci ne serait peut-être pas un avantage pour le patient qui sensible à l'un de ces allergènes, le serait donc à tous les autres.

Avant toute chose nous voudrions souligner que la réponse IgE qui est génétiquement contrôlée constitue probablement la part la plus importante de la définition de l'allergénicité d'une molécule. En effet un allergène n'est un allergène que chez

Unité d'Immuno-Allergie, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 PARIS CEDEX 15.

Tirés à part : Pr B. David (adresse ci-dessus).

DANDEU J.P., RABILLON J., DAVID B. – Structure et fonction de quelques protéines allergéniques d'origine animale et végétale. *Rev. fr. Allergol.*, 1995, **35** (6), 519-523.

le sujet humain ou animal chez qui il induit non seulement une réponse IgE mais aussi chez qui il est capable dans un second temps d'induire une réaction anaphylactique et inflammatoire. De ce fait, quelles que soient les qualités intrinsèques de la molécule protéique considérée, celle-ci ne sera allergénique qu'en fonction des caractères génétiques du receveur et de l'environnement dans lequel la molécule est inductrice et réaginique. Nous devons ouvrir dès maintenant une parenthèse, afin de lever l'ambiguïté apportée par le terme majeur dans l'expression « allergène majeur ». Le niveau d'importance d'un allergène trouve sa véritable définition dans la sensibilité du patient concerné et non dans les données statistiques que nous réunissons en laboratoire. Mais alors que reste-t-il comme rôle à la protéine elle-même ? Ce pourrait-être en fait la modulation de cette réponse IgE d'une part et la capacité de se lier à celles-ci pour déclencher la libération des médiateurs de l'inflammation contenus dans les cellules tels que les basophiles et les mastocytes.

Au cours de ces dernières années nos recherches se sont essentiellement orientées vers l'étude des allergènes d'origine animale et c'est plus récemment que nous nous sommes intéressés aux protéines d'origine végétale.

Il faut tout d'abord remarquer que les allergènes ayant comme origine les mammifères sont le plus souvent présents sur le pelage de l'animal et qu'ils s'y trouvent déposés par un moyen quelconque ou bien sécrétés par des glandes sous-jacentes. On a pu en effet les mettre en évidence dans l'urine, chez la souris et le rat, dans la salive, chez ces mêmes animaux, mais aussi chez le chien et chez le cheval, dans les glandes sébacées et périanales chez le chat, et dans le lait de la vache.

Plusieurs mammifères vivent avec l'homme qu'il s'agisse d'animaux de compagnie, ou de ceux élevés à des fins alimentaires ou scientifiques. Nous pouvons citer appartenant respectivement à ces différents groupes, les canidés, les félidés, les équidés, les bovidés et les muridés. Chiens, chats, chevaux, bœufs, souris et rat, tous secrètent des protéines qui sont potentiellement allergéniques. Pour la plupart, au moins un allergène a été isolé, purifié et caractérisé. Ce n'est pas notre but de vous rapporter en détails la totalité des propriétés qui caractérisent ces différents allergènes, mais plutôt de trouver entre eux un caractère commun qui pourrait expliquer leur allergénicité.

L'hypothèse d'une possible relation entre la structure d'une protéine et son allergénicité est née de la constatation que l'allergène majeur du cheval Equ c1, que nous avons préparé, isolé, purifié et caractérisé [8], s'était révélé avoir un haut degré d'homologie au niveau de sa séquence en acides aminés avec une alpha-2 μ -globuline, la

protéine urinaire majeur de la souris ou mMUP, allergène déjà bien connu [18, 9].

Equ c1 est une protéine de Mr 22 kDa, avec un pI#3.9 et dont nous avons étudié la séquence en acides aminés d'une part au niveau d'un peptide N-terminal de 27 résidus et d'autre part de plusieurs peptides internes obtenus par hydrolyse de la molécule par la trypsine. Les homologues constatés avec plusieurs alpha-2 μ -globulines et plus particulièrement avec la mMUP, varient de 50 à 80 p. cent selon les peptides considérés, ce qui permet de considérer Equ c1 comme une alpha-2 μ -globuline. Il pourrait s'agir de la Retinol-binding Protein. Le gène de cette protéine a pu être cloné à partir de la glande salivaire sublinguale du cheval en utilisant, pour créer les sondes adéquates, les séquences des peptides préparés à partir de l'allergène purifiés et décrits précédemment. Nous devons souligner aussi qu'à un moindre degré cet allergène présente des homologues avec la protéine urinaire du rat. Une précision de très grande importance doit être apportée dès maintenant : si la rMUP et la mMUP sont essentiellement trouvées dans l'urine de ces animaux, des protéines similaires ayant une allergénicité équivalente ont été mises en évidence dans diverses sécrétions telles les larmes et la salive. Or la fonction essentielle de ces protéines est le transport de molécules hydrophobes telles que les stéroïdes et la Vitamine A [30], et nous verrons par la suite l'importance de ce détail.

Nous avons donc recherché si d'autres protéines allergéniques connues avaient des caractères semblables ; la liste n'en est pas très longue mais elle n'en est pas moins significative.

Parmi ces allergènes d'origine animale, l'un des premiers à avoir été décrits est le Fel d1 [22, 3, 7], un allergène du chat (*Felis domesticus*), essentiellement trouvé sur le pelage de l'animal. Cette protéine a été montrée être synthétisée par les glandes sébacées et les glandes périanales [10], comme cela a été démontré pour d'autres alpha-2 μ -globulines transporteuses de phéromones [19]. Il s'agit d'une protéine probablement tétramérique, mais dont la forme dimérique (Mr 35kDa) est la plus fréquemment rencontrée. L'une des deux chaînes peptidiques, la séquence d'acide aminés de la chaîne A présente 28 p. cent d'homologie avec l'utéroglobine de lapin, protéine possédant la capacité de lier les rétinoïdes [17].

L'allergène de chien (*Canis familiaris*), Can f1, a été isolé et purifié mais sa séquence n'a pu encore être analysée [27]. Il s'agit d'une protéine de Mr 25kDa présente dans la salive et sur le poil de l'animal [4, 14].

Rats (*Rattus norvegicus*) [32, 33] et souris (*Mus musculus*) [18, 29] peuvent être regroupés car ils sécrètent des protéines de structure et de fonction similaires, synthétisées dans les glandes salivaires

et lacrymales et dans le foie ; la protéine d'origine hépatique est éliminée par voie urinaire et représente la protéine majeure de l'urine, la MUP (fig. 1), protéine de Mr 21 kDa, une α -2 μ -globuline dont le rôle est très probablement celui de transporteur de la Vit A et de ses dérivés. Ce sont des allergènes puissants et responsables de maladies professionnelles.

En ce qui concerne les allergènes provenant des bovidés (*Bos domesticus*), présents sur le pelage [24, 25] et probablement dans la salive, ils ont été bien peu étudiés en comparaison des protéines du lait de vache impliquées dans les allergies alimentaires. La β -lactoglobuline, la plus connue, est une protéine de Mr 19 kDa dont on a montré récemment une similarité de structure avec la RBP plasmatique (fig. 2) [23], et sa capacité à lier le rétinol.

Il est intéressant de noter que les protéines capables de lier une molécule hydrophobe présentent très souvent un haut pouvoir allergisant. Ce sont soit des lipocalines qui transportent les rétinoïdes, les stéroïdes ou les acides gras, soit des calycines qui fixent des phéromones ou des pigments comme la biline. Dans le cas des calycines on les trouvent plus particulièrement chez les invertébrés, insectes et helminthes. Un des allergènes principaux de la blatte (*Blattella germanica*), Bla g4, a été récemment montré avoir un haut degré d'homologie de structure primaire avec les calycines [5]. Le premier allergène de nématode parasite isolé et caractérisé en détails, ABA-1, à partir d'*Ascaris suum* semble être à la fois une Retinol-binding protein et une Fatty-acid binding protein [16].

Les *lipocalines* sont une grande famille de protéines extracellulaires très diverses [26] qui sont caractérisées par trois séquences d'acides aminés très bien définies et très bien conservées en particulier dans la partie N-terminal ou le tryptophane en position 19 est toujours conservé bien qu'il ne semble pas être impliqué directement dans le site de liaison du ligand transporté ; leur structure tertiaire est très similaire et elles montrent une haute affinité de liaison et de spécificité pour des molécules hydrophobes. La cristallographie a permis de révéler l'existence chez chacune d'un repliement de type baril- β (fig. 3) [21]. La possibilité que les unités de translocation des transporteurs puissent être des feuillet- β plutôt que des hélices α est particulièrement discutée par Fischbarg et coll. [12]. Ce type de structure se trouve dans les protéines transporteuses de pigments biliaires (tetrapyrroles à chaîne ouverte), telle la biline largement distribuée chez les insectes et particulièrement étudiée chez *Pteris brassicae* [15]. Bien qu'il n'y ait pas d'homologie très supérieure à 20 p. cent pour l'ensemble de la molécule, ce qui est inférieur au seuil de 25 p. cent

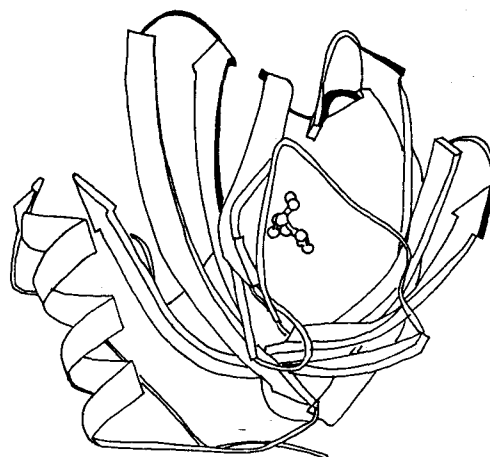


Fig. 1. – Schéma de la structure d'une lipocaline, la mMUP. Le ligand hydrophobe, ici la 2-(sec-butyl) thiazoline est fixé à l'intérieur du baril.

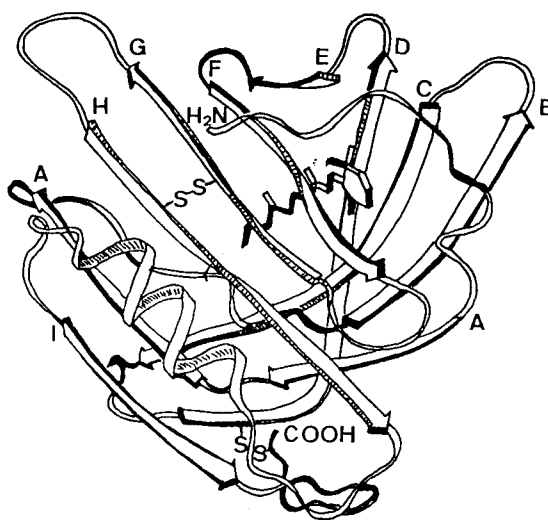


Fig. 2. – Schéma présentant le repliement de la β -lactoglobuline et montrant le site de fixation du rétinol.

au-dessous duquel des homologies de structure peuvent passer inaperçues [26], certaines similarités de structure des transporteurs de pigments avec les "fatty-acid binding proteins" ou lipocalines ont conduit à regrouper ces molécules dans la super-famille : des *calycines*. Bien que leur fonction de transporteur ait été bien établie, leur rôle exacte reste encore à définir. Il est assez probable qu'elles interviennent comme médiateur entre les ligands insolubles qu'elles transportent et leurs récepteurs membranaires. En effet ces protéines possèdent des récepteurs à la surface de la cellule,

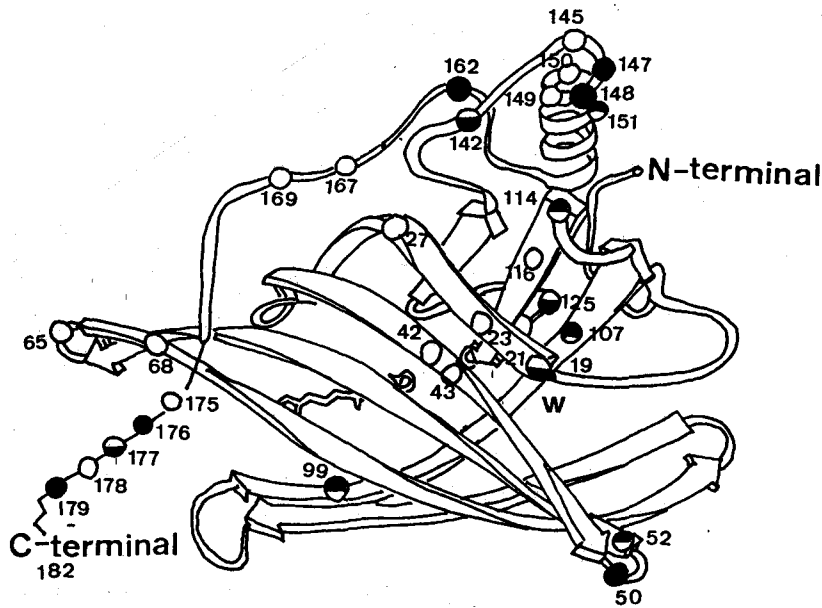


Fig. 3. – Schéma de la structure tertiaire de la "Rétinol-Binding Protein" (RBP) avec indication des mutations au niveau de la séquence : chez l'homme ●, chez le lapin ◐, chez le rat ○, et différent chez les trois ●.

et peuvent donc être internalisées par une endocytose médiée par le récepteur lui-même [13]. Comme nous venons de le voir, plusieurs de ces protéines lient le rétinol avec une haute affinité et dans le cas de l'alpha-1- μ -globuline possède un pouvoir immuno-dépresseur en même temps qu'un pouvoir mitogène en particulier au niveau des lymphocytes. D'autres comme la purpurine peuvent avoir une fonction de régulation au niveau de la différenciation, de l'adhésion et de la survie cellulaire. Toutes ces données sont étudiées en détails dans une excellente revue sur les différentes lipocalines et leurs fonctions [13].

Puisqu'un allergène tel qu'Equ c1 est défini comme une alpha-2 μ -globuline, protéine qui fixe généralement le rétinol, il était évidemment très tentant d'imaginer un possible rôle de médiation du rétinol dans la réponse immunitaire à celui-ci. Une augmentation de la synthèse des IgM in vitro dans une lignée de cellules B humaines transformée par le virus EBV (Epstein-Barr) sous l'action du rétinol, a en effet pu être démontrée qui serait liée, tout du moins en partie, à une augmentation de la production d'IL6 [2]. En ce qui concerne un réel effet immuno-adjuvant in vivo, les opinions sont contradictoires ; on sait seulement qu'un déficit en vitamine A entraîne une chute grave de la réponse immunitaire. De plus en ce qui concerne Equ c1, dont nous avons pu démontrer le très haut pouvoir immunogène en particulier chez le lapin pour la réponse IgG et chez la souris pour la réponse IgE, une quelconque action adjuvante du rétinol est à écarter puisque la purification de cet allergène fait appel à une délipida-

tion par l'acétone qui extrait aussi le rétinol. Il n'en reste pas moins que l'immunogénicité des alpha-2 μ -globulines et des protéines assimilées est très élevée.

L'existence de communautés antigéniques entre ces différents allergènes quelque soit les degrés d'homologie constatées entre-elles, n'a pu être mise en évidence.

La deuxième partie du titre de cet article suggère qu'une étude similaire à celle présentée ci-dessus est en cours de réalisation au niveau des allergènes d'origine végétale. En effet nous étudions actuellement et de manière comparative les allergènes dont la fonction enzymatique a été définie ou qui présentent une homologie de structure avec ces mêmes enzymes. Les allergènes des fruits exotiques sont généralement des cystéines protéases, tout du moins pour les plus importants, comme nous avons pu le démontrer (résultats non publiés). Une relation entre l'activité de ces enzymes et leur immunogénicité semble exister, et une faible antigénicité croisée entre ces différents allergènes a pu être constatée, en particulier entre une cystéine protéase de l'ananas et celle de l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus* dont l'homologie de structure avec des cystéines protéases sont connues [6, 31, 1]. Enfin il nous faut signaler un résultat récent qui est en faveur de notre hypothèse ; il s'agit du travail effectué sur la phospholipase A2 et une protéine recombinante inactive [11] et pour laquelle les auteurs montrent qu'il existe une relation entre son activité catalytique et son antigénicité. Cette activité s'exerce

au niveau de la membrane des basophiles/mastocytes en entraînant une libération des médiateurs dont certaines cytokines parmi lesquelles l'IL-4 et l'IL-6 qui augmente la synthèse d'IgE induite par l'IL-4. On ne peut s'empêcher d'ima-

giner que les protéines transporteuses de rétinol, molécule hydrophobe probablement responsable d'une augmentation de la synthèse d'IL-6, pourrait de ce fait accroître la synthèse médiée par l'IL-4.

RÉFÉRENCES

1. Ando T., Ino Y., Haida M., Honma R., Maeda H., Yamakawa H., Iwaki M., Okudaira H. – Isolation of cysteine protease in the crude mite extract, *Dermatophagoides farinae*. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 1991, 96, 199-205.
2. Ballow M., Weiping W. – Retinoic-Acid Induced Enhancing Effects of Immunoglobulin Synthesis by Human B Cells. *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 107, 370-371.
3. Bartholome K., Kissler W., Baer H., Kopietz-Schulte E., Whan U.J. – Where does cat Allergen I come from ? *Allergy Clin. Immunol.*, 1985, 76, 503-506.
4. Blands J., Löwenstein H., Weeke B. – Characterization of extract of dog hair and dandruff from six different dog breeds by quantitative immunoelectrophoresis. Identification of allergens by crossed radioimmunoelectrophoresis (CRIE). *Acta Allergologica*, 1977, 32, 147-169.
5. Chapman M.D., Vailes L.D., Arruda L.K. – Molecular analysis of allergen expression among german and american cockroach species. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 95, 346, abstract n° 824.
6. Chua K.Y., Stewart G.A., Thomas W.R., Simpson R.J., Dilworth R.J., Plozza T.M., Turner K.J. – Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der pl. Homology with cysteine protease. *J. Exp. Med.*, 1988, 167, 175-182.
7. Dandeu J.-P., Rabillon J., Beltrand M.-J., David B. – Immobilized metal ion affinity chromatography a relevant tool for purification of Fel dl, a cat major allergen, from a house dust extract. *J. Chromatogr.*, 1990, 512, 177-188.
8. Dandeu J.-P., Rabillon J., Divanovic A., Carmi-Leroy A., David B. – Hydrophobic interaction chromatography for isolation and purification of Equ cl, the horse major allergen. *J. Chromatogr.*, 1993, 621, 23-31.
9. Dandeu J.-P., Rabillon J., Divanovic A., Carmi-Leroy A., David B. – Equ cl, the horse major allergen and its close relationship to the mouse and rat major urinary protein. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 95, 348, abstract n° 830.
10. Dornelas de Andrade A., Birnbaum J., Magalon C., Magnol J.P., Lanteaume A., Charpin D., Vervloet D. – Fel dl Levels in cat anal glands (to be published).
11. Dudler T., Cantarelli-Machado D., Kolbe L., Annan R.R., Rhodes N., Gelbe M.H., Koelsch E., Suter M., Helm B.A. – A link between activity, IgE independant mast cell activation, and allergenicity of bee venom phospholipase A2. *J. Immunol.*, 1995, 155, 2605-2613.
12. Fischbarg J., Cheung M., Li J., Isovich P., Czegledy F., Kuang K., Garner M. – *Mol. Cell. Biochem.*, 1994, 140, 147-162.
13. Flower D.R. – The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Letters*, 1994, 354, 7-11.
14. Ford A.W., Alterman L., Kemeny D.M. – The allergens of dog. I. Identification using crossed radio-immunoelectrophoresis. *Clin. Exp. Allergy*, 1989, 19, 183-190.
15. Huber R., Schneider M., Epp O., Mayr I., Messerschmidt A., Pflugrath J. – Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*. *J. Mol. Biol.*, 1987, 195, 423-434.
16. Kennedy M.W., Brass A., McCruden A.B., Price N.C., Kelly S.M., Cooper A. – The ABA-1 allergen of the parasitic nematode *ascaris suum*: fatty acid and retinoid binding function and structural characterization. *Biochemistry*, 1995, 34, 6700-6710.
17. Lopez de Haro M.S., Perez-Martinez M., Garcia C., Nieto A. – Binding of retinoids to uteroglobin. *FEBS Letters*, 1994, 349, 249-251.
18. Lorusso J.R., Moffat S., Ohman J.L. – Immunologic and biochemical properties of the major mouse urinary allergen (Mus ml). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1986, 78, 928-937.
19. Mancini M.A., Majumdar D., Chatterjee B., Roy A.K. – Alpha-2 μ -globulin in modified sebaceous glands with pheromonal functions: localization of the protein and its mRNA in preputial, meibomian and perianal glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, 37, 149-157.
20. Morgenstern J.P., Griffith I.J., Brauer A.W., Rogers B.L., Bond J.F., Chapman M.D., Kuo M.C. – Amino acid Sequence of Fel dl, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1991, 88, 9690-9694.
21. Newcomer M.E., Jones T.A., Åqvist J., Sundelin J., Erijsen U., Rask L., Peterson P.A. – The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J.*, 1984, 3, 1451-1454.
22. Ohman J.L. Jr., Lowell F.C., Bloch K.J. – Allergens of mammalian origin: III: Properties of a major feline allergen. *J. Immunol.*, 1974, 113, 1668-1677.
23. Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulos E.E., North A.C.T., Findlay J.B.C., Sivaprasadarao R., Jones T.A., Newcomer M.E., Kraulis P.J. – The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 1986, 324, 383-385.
24. Prahl P., Weeke B., Löwenstein H. – Quantitative immunoelectrophoretic analysis of extract from cow hair and dander. *Allergy*, 1978, 33, 241-253.
25. Prahl P., Bucher D., Plesner T., Weeke B., Löwenstein H. – Isolation and partial characterization of three allergens in an extract from cow hair and dander. *Int. Arch. Allergy Appl. Imm.*, 1982, 67, 293-301.
26. Sansom C.E., North A.C.T., Sawyer L. – Structural analysis and classification of lipocalins and related proteins using a profile-search method. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1208, 247-255.
27. Schou C., Svendsen U.G., Löwenstein H. – Purification and characterization of the major dog allergen, can fl. *Clin. Exp. Allergy*, 1991, 21, 321-328.
28. Schou C. – Defining allergens of mammalian origin. *Clin. Exptl. Allergy*, 1993, 23, 7-14.
29. Schumacher M.J. – Characterization of allergens from urine and pelts of laboratory mice. *Mol. Immunol.*, 1980, 17, 1087-1095.
30. Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. – The retinoids biology, chemistry and medicine. 2nd Edition. New York, Raven Press, 1994.
31. Thomas W.R., Stewart G.A., Simpson R.J., Chua K.Y., Plozza T.M., Dilworth R.J., Nisbet A., Turner K.J. – Cloning and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen der pl in *Escherichia coli*. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 1988, 85, 127-129.
32. Walls A.F., Longbottom J.L. – Quantitative immunoelectrophoresis analysis of rat allergen extracts: I, Antigenic characterization of fur, urine, saliva and other rat -derived materials. *Allergy*, 1983, 38, 419-431.
33. Walls A.F., Longbottom J.L. – Quantitative immunoelectrophoresis analysis of rat allergen extracts : II, fur, urine and saliva studied by crossed radio immuno-electrophoresis. *Allergy*, 1983, 38, 501-502.

