

Intérêt diagnostique des allergènes recombinants

G. PAULI

RÉSUMÉ

Les techniques de génie génétique appliquées aux allergènes ont permis de produire des allergènes recombinants. La validation des allergènes recombinants implique que leur activité immunologique et leur identité avec l'allergène naturel soient confirmées par des techniques *in vitro* et *in vivo* portant sur un nombre suffisamment important de sujets allergiques. Les résultats actuellement disponibles pour les principaux pneumallergènes sont ici rapportés. Ainsi, pour le bouleau, la validité de l'allergène recombinant Bet v 1 a été confirmée par des tests *in vitro*, mais également par des tests cutanés et des tests de provocation nasale et bronchique. L'association de quatre allergènes recombinants de la phléole a permis la détection *in vitro* d'une sensibilisation aux pollens de graminées chez 94,5 p. cent de patients. Pour les acariens, la validité des allergènes recombinants du groupe 2 a été confirmée. Des systèmes d'expression permettant la glycosylation des protéines recombinantes ont été nécessaires pour valider les protéines recombinantes des allergènes du groupe I. L'allergène recombinant Blo t 5 a été testé *in vitro* et *in vivo*, il s'est avéré efficace dans la détection de la sensibilisation à *Blomia tropicalis*, allergène domestique des pays subtropicaux. Seul l'allergène recombinant Bla g 4 a été testé *in vitro* et *in vivo*, les réactions étant positives chez près de 50 p. cent des sujets sensibilisés à la blatte. Le recombinant Asp f 1 a été testé chez les sujets atteints d'aspergillose bronchopulmonaire allergique, il est positif dans 60 à 85 p. cent des cas. Des études sont également disponibles pour les allergènes recombinants de la phospholipase A2, allergène majeur du venin d'abeille. Les conséquences de la mise au point d'allergènes recombinants sont ensuite analysées : obtention d'allergènes mieux standardisés pour les tests diagnostiques, étude du spectre des spécificités des IgE induites par un allergène, quantification des IgE spécifiques, meilleure approche des allergies croisées à l'aide d'allergènes recombinants des principaux allergènes croisés. L'application des allergènes recombinants à la recherche fondamentale a conduit à la production d'allergènes recombinants modifiés : synthèse de polypeptides recombinants correspondant aux épitopes T, production d'allergènes recombinants d'isoformes

Suite résumé p. suivante

SUMMARY

Diagnostic value of recombinant allergens. – Genetic engineering techniques applied to allergens have allowed the production of recombinant allergens. Validation of recombinant allergens demands confirmation of their immunological activity and their identity with natural allergens by *in vivo* and *in vitro* techniques on a sufficiently large number of allergic subjects. The results currently available for the main respiratory allergens are reported. For example, the validity of the birch recombinant allergen Bet v 1 was confirmed by *in vitro* tests, but also by skin tests and nasal and bronchial challenge tests. The combination of four recombinant allergens of timothy allowed the *in vitro* detection of sensitization to Gramineae pollens in 94.5% of patients. The validity of group 2 recombinant allergens has been confirmed for house dust mites. Systems of expression allowing glycosylation of recombinant proteins were necessary to validate group 1 recombinant allergen proteins. Recombinant allergen Blo t 5 has been tested *in vitro* and *in vivo*, and was found to be effective in the detection of sensitization to *Blomia tropicalis*, a domestic allergen in subtropical countries. Only recombinant allergen Bla g 4 has been tested *in vitro* and *in vivo*, with positive reactions in almost 50% of subjects sensitized to cockroaches. Recombinant Asp f 1 was tested in subjects suffering from allergic bronchopulmonary aspergillosis, and was positive in 60 to 85% of cases. Studies are also available for recombinant allergens of phospholipase A2, the major allergen of bee venom. The consequences of the development of recombinant allergens are then analysed: better standardized allergens for diagnostic tests, study of the spectrum of specificities of the IgE induced by an allergen, quantification of specific IgE, better approach to cross-allergies using recombinant allergens of the main cross allergens. The application of recombinant allergens to basic research has led to production of modified recombinant allergens: synthesis of recombinant polypeptides corresponding to T epitopes, production of recombinant allergen isoforms with reduced allergenic activity, production of recombinant allergens of allergenic molecules modified by directed mutations. The use of these modified recombinant

Summary continued on next page

Service de Pneumologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, BP 426, 67091 STRASBOURG.

Tirés à part : Dr G. Pauli (même adresse).

PAULI G. – Intérêt diagnostique des allergènes recombinants.
Rev. fr. Allergol., 1997, 37 (8), 1093-1101.

Fin résumé

Summary continued

à activité allergénique réduite, production d'allergènes recombinants de molécules allergéniques modifiées par des mutations dirigées. L'utilisation de ces allergènes recombinants modifiés est une des voies de recherche pouvant conduire, dans le futur, à de nouvelles modalités de la désensibilisation spécifique. D'autres voies sont également en cours d'investigation : inhibition des réaction antigènes-anticorps par l'utilisation de molécules recombinantes de Fab-bloquants, de molécules recombinantes d'haptènes immunodominants.

allergens is one line of research which, in the future, may lead to new modalities of specific desensitization. Other lines of research are also under investigation: inhibition of antigen-antibody reactions by the use of recombinant Fab-blocking molecules, and recombinant molecules of immunodominant haptens.

MOT-CLÉ : Allergènes recombinants.

KEY-WORD : Recombinant allergens.

Le diagnostic des maladies allergiques est basé sur l'histoire clinique étayée de moyens diagnostiques permettant la mise en évidence d'une sensibilisation médiée par les IgE. Les méthodes utilisées tant *in vivo* qu'*in vitro*, utilisent des extraits allergéniques naturels, et les résultats des moyens diagnostiques utilisés dépendent de la qualité des extraits allergéniques utilisés. Ces extraits sont hétérogènes, contenant à la fois des molécules allergéniques et des molécules non allergéniques. Leur standardisation peut être difficile. Le contenu en molécules allergéniques dépend des caractéristiques de la source de production utilisée : à titre d'exemple, citons les pollens de bétulacées dont le contenu allergénique peut varier d'un arbre à l'autre ; les moisissures dont l'activité allergénique peut varier selon le stade de maturation de la culture qui est à l'origine de la préparation de l'extrait ; les extraits allergéniques animaux pouvant avoir des activités allergéniques différentes selon qu'il sont préparés à partir de différents constituants tels que la peau, le pelage, l'urine ; l'allergénicité d'extraits végétaux tels que la pomme qui peut être variable selon l'espèce de pomme utilisée et son degré de maturation.

Le contenu allergénique des extraits dépend également des procédés d'extraction, de purification et de stockage utilisés. Ainsi, la copurification d'enzymes peut dégrader des molécules allergéniques, le chauffage et le traitement par le dodécylsulfate de sodium peut dénaturer les allergènes ; certains allergènes peuvent ne pas être hydrosolubles et ne seront pas isolés avec les techniques classiques. La validation d'un extrait allergénique utilisé pour le diagnostic impose que l'extrait contienne à la fois les allergènes majeurs et les allergènes mineurs. L'application de la technologie de l'ADN recombinant pour la production des protéines allergéniques qui se lient aux IgE, a permis d'obtenir des réactifs standardisés parfaitement caractérisés sur le plan immunochimique, qui théoriquement peuvent être produits à grande échelle. Au cours des 5 dernières années, un grand nombre d'allergènes ont été clonés, ce qui a permis la production des allergènes recombinants

correspondants. Il est probable que la pratique allergologique sera influencée dans les années à venir par l'utilisation diagnostique et thérapeutique des allergènes recombinants. Plusieurs revues générales ont été consacrées à ce sujet d'avenir [4, 48, 9].

MÉTHODES PERMETTANT LA VALIDATION DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS

L'utilisation à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques nécessite une validation des allergènes recombinants. Celle-ci comprend plusieurs étapes : vérification de la pureté des allergènes recombinants, de leur absence de toxicité (par exemple la phospholipase A2 du venin d'abeille, la ribotoxine de l'*Aspergillus* devront être testées sur des modèles animaux), de leur stabilité (l'utilisation des allergènes recombinants à de très faibles concentrations peut entraîner leur adsorption sur les parois de leurs contenants) [4].

Il faudra surtout établir l'activité immunologique des allergènes recombinants et démontrer leur identité avec l'allergène naturel en effectuant des techniques *in vitro* et *in vivo* sur un nombre suffisamment important de sujets allergiques.

Les techniques *in vitro* ont pour but de démontrer la capacité de fixation de l'allergène recombinant sur des anticorps IgE spécifiques issus de sérums de sujets sensibilisés à l'allergène naturel. Différentes techniques sont utilisées : ELISA, RAST, CAP, inhibition de l'ELISA ou du RAST, l'allergène naturel étant fixé sur la phase solide, comparaison de l'immunoblot de l'allergène naturel avec celui de l'allergène recombinant. Les tests cellulaires comprennent l'histaminolibération des basophiles provenant de sujets sensibilisés, qui indiquent la capacité des allergènes recombinants à se lier aux anticorps IgE spécifiques fixés sur les basophiles. La prolifération des cellules T en présence des allergènes recombinants peut être étudiée en utilisant des clones de cellules T spécifiques de l'allergène naturel.

Les techniques *in vivo* comportent l'étude de modèles expérimentaux animaux qui visent à mettre en évidence l'induction d'IgE spécifiques vis-à-vis des allergènes recombinants chez la souris ou le singe [19]. Des différences d'allergénicité de Bet v 1 et Bet v 2, allergènes du bouleau, ont ainsi pu être mises en évidence [51].

Les études *in vivo* réalisées chez l'homme ont pour but de démontrer la capacité des allergènes recombinants à induire des tests cutanés positifs, à stimuler l'organe cible par l'étude des tests de provocation nasale ou bronchique. Les réactions induites (cutanées, nasales ou bronchiques) seront comparées à celles induites par l'allergène naturel. Pour les tests cutanés, différentes méthodes ont été utilisées : comparaison du seuil de réactivité cutanée de l'allergène naturel et de l'allergène recombinant, étude quantitative de la réaction cutanée induite par les allergènes naturel et recombinant en utilisant des dilutions séquentielles et en traçant des courbes dose-réponse. Selon les études, la méthode des prick-tests ou des intradermoréactions a été utilisée.

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES PRINCIPAUX ALLERGÈNES RECOMBINANTS

Bouleau

En 1991, Valenta et coll. [45] ont pu montrer que sur 100 sujets présentant une pollinose au bouleau, 97 p. cent avaient des IgE spécifiques vis à vis de rBet v 1, 9,2 p. cent vis-à-vis de rBet v 2, et 6 p. cent vis-à-vis des deux allergènes. Dans une étude personnelle [36] incluant 51 patients, nous notions les pourcentages suivants : 92 p. cent de sensibilisations vis-à-vis de rBet v 1, 19,6 p. cent vis à vis de rBet v 2 et 7 p. cent pour les deux allergènes recombinants. Ces résultats sont corroborés par les tests cutanés réalisés avec les allergènes recombinants [36, 28]. 100 p. cent des patients de notre étude ayant une sensibilité à l'allergène naturel du pollen de bouleau sont détectés à l'aide des deux allergènes recombinants Bet v 1 et Bet v 2 [36]. Une pollinose exclusive au pollen de bouleau correspond toujours à une sensibilisation à l'allergène majeur rBet v 1. L'activité biologique des deux allergènes recombinants Bet v 1 et Bet v 2 est également corroborée par la technique de l'histaminolibération des basophiles provenant de patients sensibilisés [36, 44]. Plus récemment, 293 sérums de patients sensibilisés aux pollens de bouleau, provenant de localisations géographiques différentes (Suède, Finlande, France, Autriche, Suisse, Italie) ont pu être testés par la technique Pharmacia CAP-System avec les deux allergènes recombinants Bet v 1 et Bet v 2 [17]. Le pourcentage de patients sensibilisés à rBet v 1

varie selon les pays de 100 p. cent en Suède et Finlande, à seulement 62 p. cent en Italie. Par contre, seulement 5 à 7 p. cent des patients sont sensibilisés à rBet v 2 en Suède et en Finlande, alors que 20 à 38 p. cent des patients sont sensibilisés à rBet v 2 dans les pays du Sud de l'Europe. Dans cette étude, les résultats obtenus par la technique Pharmacia CAP-System sont bien corrélés aux résultats obtenus avec la technique de l'immunoblot et des tests cutanés. Une autre étude italienne portant sur 65 sujets, confirme l'augmentation de fréquence des sensibilisations à rBet v 2 dans les pays de l'Europe du Sud (56,7 p. cent des cas) [39]. Enfin, dans une étude récente, Godnic-Cvar et coll. [21] ont pu montrer que l'allergène recombinant rBet v 1 utilisé en test de provocation induisait chez 10 patients atteints de rhinite, une réaction nasale positive mesurée par l'augmentation des résistances nasales. De même, chez 10 patients présentant un asthme pollinique, la dose provoquant 20 p. cent de chute du VEMS (PD20) après inhalation de l'allergène recombinant, n'était pas statistiquement différente de la PD20 après inhalation de l'allergène naturel ($0,81 \pm 1,74 \mu\text{g}$ versus $0,62 \pm 1,4 \mu\text{g}$). De plus, 5 patients présentaient des réactions retardées tant avec l'allergène naturel qu'avec l'allergène recombinant. Chez les sujets contrôles, l'inhalation d'allergènes recombinants n'entraînait jamais de réaction de bronchoconstriction. De même, dans les études où furent effectués des tests cutanés avec les allergènes recombinants, les sujets contrôles n'avaient jamais de réaction positive vis-à-vis des allergènes recombinants pour les concentrations utilisées [36, 28].

Graminées

Des allergènes recombinants ont été produits pour quelques espèces de graminées. R. Valenta et coll. [46] ont identifié dans une première étude 97 sérums sur 98 chez des patients allergiques aux pollens de graminées, en utilisant les allergènes recombinants de la phléole Phl p 1 et Phl p 5, ainsi que la profiline. Ils purent montrer que les sérums des patients qui avaient une réaction très positive vis à vis de l'allergène naturel réagissaient également très fortement avec les allergènes recombinants. A l'inverse des réactions plus faibles vis-à-vis de l'allergène naturel allaient de pair avec des réactions modérées vis à vis des allergènes recombinants. Dans cette série, un patient sensibilisé au groupe IV des allergènes de graminées ne fut pas détecté par les allergènes recombinants utilisés. Dans une étude ultérieure [25], la capacité de fixation des anticorps anti-pollens de graminées sur 4 allergènes recombinants de la phléole (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 et la profiline) fut démontrée chez 183 patients provenant de régions géographiques diverses (Europe, Canada, Japon). Chez 94,5 p.

cent des patients, l'allergie aux pollens de graminées fut détectée. Les patients ayant des réactions négatives avaient de faibles taux d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'allergène naturel. Des variations importantes des réactions positives vis-à-vis des allergènes recombinants furent notées selon les pays d'origine des patients : avec le recombinant Phl p 1 les tests sont positifs dans 95 à 100 p. cent des cas en Autriche, en France et au Danemark, par contre ils ne sont positifs que chez 65 p. cent des patients japonais. L'allergène recombinant Phl p 5 est reconnu par 58 p. cent des sujets français et seulement par 13 p. cent des sujets canadiens. Il existe cependant pour les 183 sérums une bonne corrélation entre les taux d'IgE spécifiques anti-phléole mesurées par la technique CAP-RAST et les IgE spécifiques dirigées contre la combinaison des 4 allergènes recombinants ($r = 0,87$). L'adjonction d'un autre anticorps recombinant des graminées (Phl p 4) n'améliore que faiblement la sensibilité des tests in vitro. L'activité immunologique des allergènes recombinants de la phléole (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5) est également démontrée par l'histaminolibération des basophiles provenant de patients sensibilisés aux graminées. L'allergène recombinant rDac g 3 explore la reconnaissance des allergènes de Dactyle. Guérin-Marchand et coll. [23] ont démontré son activité immunologique par la technique de l'histaminolibération. Il s'agit d'un allergène majeur reconnu par des sérums de patients sensibilisés au Dactyle dans 65 p. cent des cas. Le recombinant Dac g 2 est reconnu avec une moindre fréquence (33 % des cas) [37].

Autres pollens

D'autres allergènes recombinants ont été testés chez des patients sensibilisés à d'autres variétés de pollens. Ainsi, l'allergène recombinant rPar j 2 semble être un allergène majeur reconnu par 82 p. cent des sérums provenant de sujets sensibilisés à la pariétaire (23 sur 28) [15].

Acariens

La plupart des allergènes recombinants des acariens ont montré leur capacité à se lier aux IgE circulantes ou aux IgE fixées sur les mastocytes cutanés en-dehors de l'allergène recombinant Der p 1 et Der f 1. Ainsi, 22 sérums sur 24 provenant de sujets allergiques aux acariens reconnaissent le recombinant Der p 2 [11]. Dans l'étude de Lynch [27], sur 32 patients sensibilisés à un extrait global d'acariens, 20 répondent à l'allergène recombinant Der p 2 en tests cutanés. Aucune réaction non spécifique n'est notée chez des sujets contrôles. Iwamoto et coll. [24] démontrent également chez 7 sujets que le recombinant Der f 2 détecte, par la mesure des IgE sériques spécifiques

et les tests cutanés, les patients sensibilisés à l'allergène naturel Der f 2. Noguchi [34], dans une série plus importante portant sur les sérums de 150 enfants et adolescents sensibles à *Dermatophagoïdes farinae*, trouve 92 p. cent de réactions positives à l'allergène rDer f 2 dans les tranches d'âge de 2 à 20 ans. La corrélation entre les taux d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'allergène rDer f 2 et l'allergène naturel Der f 2 étant très forte ($r = 0,96$, $p < 0,01$). Pour l'allergène recombinant Der p 5, Lin et coll. [26] détectent des IgE sériques spécifiques dans 50 p. cent des sérums de patients sensibilisés aux acariens, l'allergène recombinant Der p 5 utilisé en tests cutanés donnant 60 p. cent de réactions positives chez des asthmatiques allergiques aux acariens, et 29 p. cent de réactions positives chez des patients atteints de rhinite isolée. Pour Chapman et coll. [10], la prévalence de la sensibilisation cutanée au recombinant Der p 5 est de 30 à 50 p. cent selon les origines géographiques des patients testés. Shen et coll. [42] ont étudié le pourcentage de réactions positives obtenues chez 41 sujets allergiques aux acariens avec les allergènes recombinants Der p 2 et Der p 7. Les IgE spécifiques étaient détectées respectivement dans 88 et 46 p. cent des cas. Pour rDer p 7, le pourcentage de réactions positives est le même que celui qui est obtenu avec l'allergène naturel Der p 7 (53 p. cent de réactions positives chez des sujets allergiques aux acariens). Enfin, l'allergène recombinant de la tropomyosine, allergène des acariens récemment découvert, a également été testé chez 31 sujets allergiques aux acariens [1] : les IgE spécifiques de 80 p. cent des patients reconnaissent l'allergène naturel de la tropomyosine ainsi que l'allergène recombinant, mais les réactions sont moins importantes avec l'allergène recombinant. Des intradermoréactions effectuées chez 13 sujets allergiques aux acariens donnent chez 5 patients des réactions positives, mais de moindre intensité avec l'allergène recombinant.

Les allergènes du groupe 1 produits dans les bactéries ne réagissent que dans 50 p. cent des cas avec les IgE spécifiques des patients sensibilisés aux acariens, comparativement à l'allergène naturel Der p 1. D'autres systèmes d'expression ont été utilisés : Chua et coll. [12] trouvent des réactions positives dans 9 cas sur 11 lorsque l'expression est faite dans une levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Noguchi et coll. [34] utilisent le système d'expression baculovirus/cellules d'insectes qui permet la glycosylation des protéines recombinantes et une bonne corrélation est observée entre les RAST réalisés avec l'allergène naturel Der f 1 et le recombinant Der f 1 ; de même, l'allergène recombinant a une activité équivalente à l'allergène naturel dans les expériences d'inhibition. Dans cette étude, 125 enfants et adolescents ont des RAST positifs avec l'allergène recombinant Der f 1 dans 92 à 100 p. cent des cas.

D'après Chapman [9], une combinaison de 3 à 4 allergènes recombinants des acariens pour les tests *in vitro* et les tests cutanés, permettrait d'affirmer le diagnostic positif de sensibilisation aux *Dermatophagoïdes*.

Blomia tropicalis est un acarien de la famille des glycyphagidae, qui dans les régions tropicales et subtropicales est un allergène de l'environnement domestique. L'allergène recombinant Blo t 5 a une certaine homologie avec rDer p 5, et a été testé chez 136 sujets originaires principalement du Brésil et de Virginie par la détection des IgE spécifiques et la réalisation de tests cutanés, pricks et intradermoréactions [3]. La prévalence d'une sensibilisation à IgE détectée *in vitro* est de 45 p. cent au Brésil et seulement de 20 p. cent en Virginie. Ces chiffres s'expliquent par l'exposition fréquente à *Blomia tropicalis* dans l'environnement domestique dans les pays tropicaux ; par contre, en Virginie la prévalence des réactions sérologiques positives pour Blo t 5 peut être liée uniquement à l'homologie qui existe entre Blo t 5 et Der p 5 allergène des acariens *Dermatophagoïdes* largement retrouvés en Virginie. L'allergène recombinant Blo t 5 pourrait, en association avec d'autres allergènes recombinants de *Blomia tropicalis*, être utilisé pour diagnostiquer les sensibilisations à cet allergène domestique dans les pays tropicaux et subtropicaux.

Blattes

La prévalence des sensibilisations aux 4 allergènes de la blatte (Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5) a été établie sur plus de 70 sérums provenant de patients allergiques aux blattes. Elle a montré que plus de 95 p. cent des patients réagissaient à au moins un des allergènes majeurs [8]. La production d'allergènes recombinants a été possible pour Bla g 4 et Bla g 5. Ainsi, Arruda et coll. [2] a pu montrer que sur 73 sérums provenant de sujets allergiques aux blattes, les IgE spécifiques reconnaissaient l'allergène recombinant Bla g 4 dans 40 à 60 p. cent des cas selon la technique utilisée. Ces auteurs montrent également que les intradermoréactions sont positives avec l'allergène recombinant Bla g 4 de 10^{-3} à 10^{-5} µg/ml, alors que les sujets témoins ne réagissent pas à 1 µg/ml. La même équipe a également observé que le recombinant Bla g 5 donnait des réponses positives en intradermoréaction de 10^{-1} à 10^{-4} µg/ml. La production d'allergènes recombinants pour Bla g 2 qui a été cloné, s'est révélée jusque-là infructueuse, tant en utilisant comme système d'expression des bactéries que des levures. Néanmoins, il paraît probable que dans le futur des réactifs basés sur l'association de 4 allergènes recombinants de blattes devraient être suffisants pour détecter des sensibilisations aux blattes.

Aspergillus fumigatus

Dès 1992 le groupe Suisse de R. Crameri a produit l'allergène recombinant correspondant à l'allergène majeur Asp f 1 d'*Aspergillus fumigatus* [30], et démontra son activité par la réalisation de tests cutanés chez des patients sensibilisés à *Aspergillus fumigatus*. Dans une publication ultérieure, rAsp f 1 fut testé chez 15 sujets présentant une aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) confirmée : 10 sont détectés par les tests cutanés et par la détection d'IgE spécifiques vis à vis de l'allergène recombinant [31]. Dans une étude plus récente portant sur 30 patients porteurs d'une ABPA et 10 asthmatiques sensibilisés à *Aspergillus fumigatus*, l'allergène rAsp f 1 testé en prick test à 100 µg/ml donne des réponses positives dans 70 p. cent des cas. Les patients ayant des tests cutanés positifs avec l'allergène recombinant Asp f 1 avaient également des IgE spécifiques vis-à-vis de l'allergène recombinant détectables dans leurs sérums. Enfin, il existait une parfaite corrélation entre les résultats obtenus par une technique ELISA utilisant le recombinant Asp f 1 et l'Immunocap rAsp f 1 Pharmacia ($r = 0,997$, $p < 0.0001$) [13]. Par contre, la corrélation était très faible avec l'Immunocap m³ (extrait total d'*Aspergillus*) ($r = 0,314$, $p = 0,04$). Ces résultats s'expliquent, car seulement 60 à 85 p. cent des patients sont sensibilisés à l'allergène Asp f 1 et que par ailleurs des sensibilisations à d'autres allergènes d'*Aspergillus fumigatus* peuvent être impliquées chez les différents patients. Pour l'allergène recombinant Asp f 1, les résultats obtenus chez les témoins étaient toujours négatifs tant pour les tests cutanés que pour les tests *in vitro*.

Venin d'abeille (phospholipase A2)

La phospholipase A2 est l'allergène majeur du venin d'abeille. L'activité *in vivo* de l'allergène recombinant rPLA, produit chez *E. coli*, fut comparée à l'activité de la phospholipase A2 naturelle, d'abord chez 6 patients en établissant des courbes dose-réponse pour évaluer la taille des intradermoréactions réalisées avec différentes concentrations d'allergène naturel ou recombinant [32]. Les deux extraits donnaient des réactions positives, mais les pentes des courbes dose-réponse étaient différentes, indiquant qu'il n'y avait pas identité absolue de l'activité allergénique des deux préparations. La capacité à induire l'histaminolibération à partir de basophiles de patients sensibilisés au venin d'abeille est identique pour la phospholipase A2 naturelle et recombinante. Cette propriété persiste si l'allergène recombinant est dépourvu de son activité enzymatique, mais elle disparaît si la structure tridimensionnelle n'est pas conservée. L'absence de glycosylation de l'allergène recombinant produit dans une bactérie ne

paraît pas non plus affecter les propriétés d'induire l'histaminolibération IgE-dépendante [20]. Une étude plus étendue concerne 85 patients allergiques au venin d'hyménoptères, chez lesquels les tests cutanés avec rPLA sont positifs dans 84 cas. La détection d'IgE spécifiques vis-à-vis du venin d'abeille, de la phospholipase naturelle et de rPLA a montré des résultats concordants avec les IgE anti-venin d'abeille chez 86 p. cent des patients lorsqu'on comparait avec les IgE anti-phospholipases naturelles et chez 78 p. cent lorsque la comparaison était effectuée avec l'allergène recombinant rPLA. L'analyse des discordances a montré que certains patients étaient sensibilisés à d'autres allergènes du venin d'abeille (hyaluronidase, phosphatase acide), et que certains patients n'avaient pas d'IgE spécifiques détectables avec l'allergène recombinant, mais avaient cependant des tests cutanés positifs avec rPLA, montrant ainsi une plus grande sensibilité des tests cutanés [33]. Une meilleure sensibilité des tests diagnostiques dans l'allergie au venin d'abeille pourrait être obtenue en utilisant une association d'allergènes recombinants incluant à côté du recombinant de l'allergène majeur rPLA des allergènes recombinants d'autres allergènes du venin d'abeille.

Autres allergènes

D'autres allergènes recombinants ont été produits, mais leur validation chez les sujets allergiques reste encore limitée. Des allergènes recombinants des deux chaînes polypeptidiques de l'allergène majeur Fel d 1 se lient *in vitro* aux IgE spécifiques des sujets sensibilisés au chat et stimulent leurs cellules T *in vitro* [38]. L'allergène recombinant Equ c 1 produit à partir d'un système d'expression bactérien *Escherichia coli* se lie aux IgE de patients allergiques au cheval [22]. L'allergène recombinant Ara h 1 produit également dans *E. coli* se lie en immunoblot aux IgE spécifiques de 17 patients sur 18 présentant une allergie à la cacahuète [6]. Pour l'allergène recombinant rAlt a 2 produit dans la levure *Pichia pastoris*, une étude par dot-blotting donne des réactions positives avec 16 sérums sur 26 provenant d'asthmatiques sensibilisés à la moisissure *Alternaria* [7].

INTÉRÊT DE L'UTILISATION DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS DANS LES TESTS DIAGNOSTIQUES

De nombreux travaux ont validé en l'espace de quelques années les allergènes recombinants d'allergènes majeurs, vis-à-vis desquels un grand nombre de patients sont sensibilisés de par le monde. Certaines applications pratiques pour-

raient être très rapides, en particulier en ce qui concerne la qualité et la standardisation des extraits utilisés pour le diagnostic des maladies allergiques. D'autres applications concernant de nouvelles voies thérapeutiques ne se feront peut-être qu'à moyen terme. Cependant, dès à présent, la validation de nouveaux axes thérapeutiques doit passer au préalable par des tests cutanés effectués chez des patients sensibilisés et par des analyses *in vitro* effectuées sur un panel suffisamment étendu de sérums provenant de sujets allergiques [14, 35].

Amélioration des allergènes utilisés pour les tests diagnostiques

Pour les acariens de stockage, des extraits de qualité ne sont pas disponibles. Cependant, des allergènes majeurs ont été clonés, et certains allergènes recombinants sont dès à présent validés par des études cliniques suffisamment étendues. C'est le cas en particulier pour *Blomia tropicalis* qui est en fait un allergène domestique dans les pays tropicaux et subtropicaux. La validation de rBlot 5 [3] peut en faire un outil irremplaçable pour des études épidémiologiques dans le futur. Pour d'autres allergènes, un cocktail d'allergènes recombinants pourrait remplacer les extraits actuels en incluant tous les allergènes recombinants correspondant aux allergènes majeurs et mineurs. Seules des études effectuées sur un grand nombre de sujets allergiques permettront de définir le nombre nécessaire d'allergènes recombinants qui permettra de poser un diagnostic positif avec la meilleure efficacité. La détection de l'allergie aux graminées chez 94,5 p. cent de 183 patients provenant de trois continents différents, permet d'envisager théoriquement l'utilisation rapide de ces nouveaux réactifs [25]. La standardisation des extraits allergéniques devrait également être améliorée par une véritable quantification des allergènes majeurs et mineurs présents dans un extrait, reproductible de lot à lot [29]. La pureté des allergènes recombinants peut être supérieure à celle des allergènes purifiés naturels ; c'est le cas pour l'allergène recombinant de la phospholipase A₂ qui contrairement à la phospholipase A₂ naturelle du venin d'abeille ne contient pas de traces de hyaluronidases [33]. La stabilité des extraits sera également améliorée : certains extraits naturels contiennent des protéases qui peuvent dégrader les protéines allergiques durant la préparation ou la conservation de l'extrait.

Mesures qualitatives et quantitatives des anticorps anti-allergène

Un test cutané ou une recherche d'IgE spécifiques positifs vis-à-vis d'un extrait allergénique classique, indique seulement que le patient est sensibilisé à au moins un des composants de l'extrait.

L'utilisation d'allergènes recombinants permet de distinguer parmi les IgE polyclonales dirigées contre l'extrait allergénique, les anticorps IgE spécifiques d'un constituant allergénique défini, permettant d'établir pour un patient donné le spectre des spécificités des IgE (spectrotype). De plus, il est possible de connaître le pourcentage d'IgE spécifiques dirigées contre les différents constituants, et de repérer les constituants qui ont induit des taux élevés d'IgE spécifiques. La sélection des constituants allergéniques à partir du spectrotype du patient, pourrait guider le traitement de désensibilisation en évitant d'injecter des constituants antigéniques d'un extrait contre lequel le patient n'a pas encore développé d'IgE spécifiques.

Intérêt de la connaissance des allergènes croissants pour l'utilisation des allergènes recombinants comme méthode diagnostique

La connaissance des séquences d'acides aminés des allergènes, ou des séquences nucléotidiques de leurs gènes, a permis la recherche, dans des banques de données, des identités ou des homologies avec d'autres molécules déjà connues ; le degré d'homologie entre les protéines allergéniques pouvant être plus ou moins important. Les réactivités croisées d'allergènes ayant un certain degré d'homologie ont été également prouvées par des expériences d'inhibition utilisant des sérums de sujets sensibilisés. Ainsi, des réactions croisées ont été démontrées pour des allergènes végétaux à l'intérieur des groupes suivants : groupe des profilines, groupe des protéines de la famille de Bet v 1 incluant les allergènes majeurs des fagales ainsi que les allergènes des rosacées et du céleri, allergènes des groupes 1, 2 et 5 des graminées, groupe des oléacées... mais d'autres allergènes croissants sont retrouvés pour les allergènes d'origine animale : groupe 1 et 2 des *Dermatophagoides*, groupe 5 des allergènes des acariens, tropomyosine des crustacés et des insectes, albumine des mammifères. Ces similarités mises en évidence au sein des allergènes devraient permettre de n'utiliser qu'un nombre restreint d'allergènes recombinants soigneusement sélectionnés pour identifier le spectrotype des sujets allergiques, ce qui pourrait également conduire à une approche plus moléculaire de la désensibilisation [48].

Intérêt des tests diagnostiques effectués avec des allergènes recombinants modifiés pour une meilleure connaissance des phénomènes fondamentaux en immunoallergie

Le clonage des allergènes a permis l'étude des épitopes T et B des allergènes. Les épitopes T dépendent de la structure primaire de la molécule

allergénique et sont formés de 10 à 12 acides aminés. Leur étude a été possible grâce à l'utilisation de peptides chevauchants, dont l'activité stimulante a été étudiée sur des clones de cellules T spécifiques provenant de différents sujets allergiques. Ces études ont montré que les épitopes T sont multiples, mais que certaines régions peuvent être immunodominantes [50]. Les épitopes B ont une structure tridimensionnelle et sont conformationnels. La détermination des épitopes B peut se faire par les anticorps monoclonaux murins, ces épitopes déterminés chez l'animal seront ensuite comparés avec les épitopes reconnus par les IgE humaines.

Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, la synthèse de polypeptides recombinants correspondant à des épitopes T, devrait entraîner une modulation de l'activité des cellules T et conduire à une hyposensibilisation vis-à-vis d'un allergène naturel. Ces *polypeptides recombinants* correspondant aux épitopes T ne se lient pas aux IgE spécifiques, et cette propriété peut être testée par des tests cutanés *in vivo* ou par des tests *in vitro* mettant en jeu les IgE humaines ou les basophiles. Des progrès récents ont montré qu'il existait des molécules allergéniques naturelles selon l'origine et la nature de la plante, qui n'ont que de minimes différences dans leur structure primaire avec l'allergène majeur. Ces variants moléculaires appelés *isoformes* peuvent avoir des réactivités immunologiques différentes [50, 16]. Ainsi, 13 isoformes de Bet v 1 ont été isolées à partir du pollen de bouleau. Les molécules recombinantes correspondant à ces isoformes ont été testées quant à leur potentialité à stimuler les clones de cellules T, et quant à leur aptitude à se lier aux IgE humaines et à réagir en tests cutanés chez des sujets sensibilisés aux pollens de bouleau. Ainsi, l'isoforme rBet v 1 d, qui est un bon activateur des cellules T et qui ne se lie ni aux IgE circulantes ni aux IgE des mastocytes, ne diffère que de 7 acides aminés de Bet v 1 a qui a les deux réactivités immunologiques [18]. Ces molécules recombinantes d'isoformes à activité allergénique réduite pourraient être des candidats pour de nouvelles stratégies thérapeutiques dont le but serait d'injecter des doses importantes d'allergènes modulant l'activité des cellules T, sans qu'il y ait risque de réactions allergiques. Des *mutations dirigées* au niveau des acides aminés d'une molécule allergénique peuvent en modifier également la capacité à se lier aux IgE tout en maintenant la capacité de la molécule à stimuler les cellules T. Ainsi, il a été montré pour l'allergène Der p 2, que les tests cutanés sont réduits de 100 fois lorsqu'une substitution de deux cystéines a été effectuée au niveau de la séquence des acides aminés [43].

L'étude des épitopes B reconnus par les IgE humaines a montré qu'il existait une hétérogé-

néité dans les spécificités des anticorps induits par un allergène majeur. Certains épitopes B correspondent à ceux qui sont les plus fréquemment reconnus dans une population de sujets sensibilisés. Bufer et coll. ont pu montrer que 11 sérums de sujets sensibilisés aux graminées reconnaissent de manière variable deux épitopes B de l'allergène majeur Phl p 5 [5]. Schramm et coll., en utilisant l'allergène recombinant rHol 1 et les sérums de sujets sensibilisés aux graminées, individualisent au moins 4 épitopes B pour cet allergène majeur, celui qui inclue l'extrémité C terminale étant immunodominant [41]. Des polypeptides recombinants correspondant aux épitopes B immunodominants d'un allergène majeur, pourraient constituer des outils diagnostiques performants. C'est également dans le domaine thérapeutique que des polypeptides recombinants correspondant aux épitopes B peuvent avoir une application : inhibition des réactions anaphylactiques par l'utilisation de molécules recombinantes de Fab-bloquant, de molécules recombinantes d'haptènes immunodominants. Un travail récent démontre que deux fragments correspondant à l'allergène recombinant Bet v 1 perdent leur capacité d'induire l'histaminolibération des basophiles sensibilisés et leur potentialité à réagir en tests cutanés ; par contre, ces deux fragments gardent leur aptitude à induire la prolifération de clones de cellules T spécifiques [52]. Dans ce cas, la perte de la structure tertiaire entraîne une altération des épi-

topes B, ce qui explique le caractère non allergénique des deux fragments recombinants. Par contre, ayant gardé tous les épitopes T de la molécule allergénique, ils pourraient également être des candidats pour les traitements de désensibilisation, car des doses élevées pourraient être administrées sans risque de réaction anaphylactique.

CONCLUSION

L'application récente des méthodes du génie génétique à l'étude des allergènes et la production d'allergènes recombinants représentent une avancée décisive en immuno-allergologie. Pour un nombre limité d'allergènes recombinants, les études ayant eu pour but leur validation chez des patients sensibilisés ont été concluantes. Il est nécessaire de poursuivre de telles études afin de mieux déterminer les modalités de l'utilisation des allergènes recombinants pour l'amélioration du diagnostic des maladies allergiques. Les possibilités thérapeutiques concernent essentiellement l'amélioration des traitements de désensibilisation. Dès à présent, une meilleure standardisation des extraits allergéniques utilisés pour ces traitements est envisageable ; dans le futur, les nombreux travaux de recherche actuellement en cours devraient conduire à de nouvelles formes de désensibilisation.

RÉFÉRENCES

1. Aki T., Kodama T., Fujikawa A., Miura K., Shigeta S., Wada T., Jyo T., Murooka Y., Oka S., Ono K. – Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 96, 74-83.
2. Arruda L.K., Vailes L.D., Hayden M.L., Benjamin D.C., Chapman M.D. – Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycons) as a cause of IgE antibody responses. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 31196-31201.
3. Arruda K., Vailes L.D., Platts-Mills T.A.E., Fernandez-Caldas E., Montealegre F., Lin K.L., Chua K.Y., Rizzo M.C., Naspitz C.K., Chapman M.D. – Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997, 155, 343-350.
4. Bousquet J., Valenta R. – *In vivo* and *in vitro* use of recombinant allergens. *ACI News*, 1994, 6, 54-59.
5. Bufer A., Becker W.M., Schramm G., Petersen A., Mamat U., Schlaak M. – Major allergen Phl p Va (timothy grass) bears at least two different IgE-reactive epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, 94, 173-181.
6. Burks A.W., Cockrell G., Stanley J.S., Helm R.M., Bannon G.A. – Recombinant peanut allergen Ara h 1 expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J. Clin. Invest.*, 1995, 96, 1715-1721.
7. Bush R., Sanchez H., Geisler D. – Recombinant Alt a 2 is a significant Alternaria allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 350 Abst.
8. Chapman M.D., Smith A.M., Vailes L.D., Arruda L.K. – Defined epitopes: *in vivo* and *in vitro* studies using recombinant allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997, 113, 102-104.
9. Chapman M.D., Smith A.M., Vailes L.D., Arruda L.K. – Recombinant mite allergens. *Allergy*, 1997, 52, 374-379.
10. Chapman M.D., Vailes L., Bavbek S. *et al.* – Multi-center study of the biologic activity of recombinant group 5 mite allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, in press.
11. Chua K.Y., Dilworth R.J., Thomas W.R. – Expression of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen, Der p II, in *Escherichia coli* and the binding studies with human IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1990, 91, 124-129.
12. Chua K.Y., Kehal P.K., Thomas W.R., Vaughan P.R., Macreadie I.G. – High-frequency binding of IgE to the Der p allergen expressed in yeast. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, 89, 95-102.
13. Cramer R., Lidholm J., Grönlund H., Stüber D., Blaser K., Menz G. – Automated specific IgE assay with recombinant allergens: evaluation of the recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I in the Pharmacia CAP System. *Clin. Exp. Allergy*, 1996, 26, 1411-1419.
14. Deviller P. – Allergènes naturels et allergènes recombinants. *Allergie et Immunol.* (Paris), 1995, 27, 316-319.
15. Duro G., Colombo P., Costa M.A., Izzo V., Porcasi R., Di Fiore R., Locorotondo G., Mirisola M.G., Cocchiara R., Geraci D. – cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Letters*, 1996, 3, 295-298.
16. Ebner C., Ferreira F. – Hypoallergenic isoform variants of allergens. A new concept for specific immunotherapy. *A.C.I. International*, 1997, 9, 69-71.
17. Elfman L., Svensson M., Lidholm J., Pauli G., Valenta R. – Different profiles in specific IgE to rBet v 1 and rBet v 2 in patients allergic to birch pollen from six countries. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997, 113, 249-251.

18. Ferreira F., Hirthenlehner K., Jilek A., Godnic-Cvar J., Breiteneder H., Grimm R., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breitenbach M., Rheiherger H.J., Ebner C. – Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: Potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J. Exp. Med.*, 1996, 183, 599-609.
19. Ferreira F., Mayer P., Sperr W.R., Valent P., Sciberler S., Ebner C., Liehl E., Scheiner O., Kraft D., Valenta R. – Induction of IgE antibodies with predefined specificity in rhesus monkeys with recombinant birch pollen allergens, Bet v 1 and Bet v 2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 97, 95-103.
20. Förster E., Dudler T., Gmachl M., Aberer W., Urbanek R., Suter M. – Natural and recombinant enzymatically active or inactive bee venom phospholipase A2 has the same potency to release histamine from basophils in patients with hymenoptera allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 95, 1129-1135.
21. Godnic-Cvar J., Susani M., Breiteneder H., Berger A., Havelec L., Waldhör T., Hirschwehr R., Valenta R., Scheiner O., Rüdiger H., Kraft D., Ebner C. – Recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, induces hypersensitivity reactions equal to those induced by natural Bet v 1 in the airways of patients allergic to tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 99, 354-359.
22. Gregoire C., Rosinski-Chupin I., Rabillon J., Alzari P.M., David B., Dandeu J.P. – cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ c 1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 32951-32959.
23. Guerin-Marchand C., Senechal H., Bouin A.P., Leduc-Brodard V., Taudou G., Weyer A., Peltre G., David B. – Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol. Immunol.*, 1996, 33, 797-806.
24. Iwamoto N., Nishiyama C., Yasuhara T., Saito A., Yuuki T., Okumura Y., Okudaira H. – Direct expression of Der f 2, a major house dust mite allergen, in *Escherichia coli*. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996, 109, 356-361.
25. Laffer S., Spitzauer S., Susani M., Pairleitner H., Schweiger C., Grönlund H., Menz G., Pauli G., Ishii T., Nolte H., Ebner C., Schon A.H., Kraft D., Eichler H.G., Valenta R. – Comparison of recombinant timothy grass pollen allergens with natural extract for diagnosis of grass pollen allergy in different populations. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 98, 652-658.
26. Lin K.L., Hsieh K.H., Thomas W.R., Chiang B.L., Chua K.Y. – Characterization of Der p V allergen, cDNA analysis, and IgE-mediated reactivity to the recombinant protein. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, 94, 989-996.
27. Lynch N.R., Thomas W.R., Chua Y., Garcia N., Di Prisco M.C., Lopez R. – *In vivo* biological activity of recombinant Der p II allergen of house-dust mite. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1994, 105, 70-74.
28. Menz G., Dolecek C., Schönheit-Kenn U., Ferreira F., Moser M., Schneider T., Suter M., Boltz-Nitulescu G., Ebner C., Kraft D., Valenta R. – Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. *Clin. Exp. Allergy*, 1996, 26, 50-60.
29. Mohapatra S.S. – Recombinant allergens and allergen standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991, 87, 621-625.
30. Moser M., Cramer R., Menz G., Schneider T., Dudler T., Virchow C., Gmachl M., Blaser K., Suter M. – Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. *J. Immunol.*, 1992, 149, 454-460.
31. Moser M., Cramer R., Brust E., Suter M., Menz G. – Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, 93, 1-11.
32. Müller U.R., Dudler T., Schneider T., Cramer R., Fischer H., Skrbic D., Maibach R., Blaser K., Suter M. – Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 96, 395-402.
33. Müller U., Fricker M., Wymann D., Blaser K., Cramer R. – Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. *Clin. Exp. Allergy*, 1997, 27, 915-920.
34. Noguchi E., Shibasaki M., Nishiyama C., Okumura Y., Takita H. – IgE responsiveness to *Dermatophagoides farinae* in young asthmatic children: IgE binding study using recombinant allergens of Der f 1, Der f 2 and mutant proteins of Der f 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996, 110, 380-387.
35. Pauli G. – Les allergènes recombinants : le point de vue du clinicien. *Rev. Fr. Allergol.*, 1996, 36, 455-458.
36. Pauli G., Oster J.P., Deviller P., Heiss S., Bessot J.C., Susani M., Ferreira F., Kraft D., Valenta R. – Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2: diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 97, 1100-1109.
37. Roberts A.M., Van Ree R., Cardy S.M., Bevan L.J., Walker M.R. – Recombinant pollen allergens from *Dactylis glomerata*: preliminary evidence that human IgE cross-reactivity between Dac g II and Lol p III is increased following grass pollen immunotherapy. *Immunology*, 1992, 76, 389-396.
38. Rogers B.L., Morgenstern J.P., Garman R.D., Bond J.F., Kuo M.C. – Recombinant Fel d 1: expression, purification, IgE binding and reaction with cat-allergic human T cells. *Mol. Immunol.*, 1993, 30, 559-568.
39. Rossi R.E., Monasterolo G., Operti D., Corsi M. – Evaluation of recombinant allergens Bet v 1 and Bet v 2 (profilin) by Pharmacia CAP System in patients with pollen-related allergy to birch and apple. *Allergy*, 1996, 51, 940-945.
40. Scheiner O., Kraft D. – Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy*, 1995, 50, 384-391.
41. Schramm G., Bufer A., Petersen A., Haas H., Schlaak M., Becker W.M. – Mapping of IgE-binding epitopes on the recombinant major group I allergen of velvet grass pollen rHol I 1. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 99, 781-787.
42. Shen H.D., Chua K.Y., Lin W.L., Chen H.L., Hsieh K.H., Thomas W.R. – IgE and monoclonal antibody binding by the mite allergen Der p 7. *Clin. Exp. Allergy*, 1996, 26, 308-315.
43. Smith A.M., Chapman M.D. – Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen, Der p 2. *Mol. Immunol.*, 1996, 33, 399-405.
44. Valenta R., Duchene M., Pettenburger K. et al. – Identification of profilin as novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized patients. *Science*, 1991, 253, 557-560.
45. Valenta R., Duchene M., Vrtala S. et al. – Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991, 88, 889-894.
46. Valenta R., Vrtala S., Ebner C., Kraft D., Scheiner O. – Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, 97, 287-294.
47. Valenta R., Speer W.R., Ferreira F., Valent P., Sillaber C., Tejki M., Duchene M., Ebner C., Lechner K., Kraft D., Scheiner O. – Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1993, 91, 88-97.
48. Valenta R., Kraft D. – Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol.*, 1995, 7, 751-756.
49. Valenta R., Steinberger P., Duchene M., Kraft D. – Immunological and structural similarities among allergens: prerequisite for a specific and component-based therapy of allergy. *Immunol. Cell Biol.*, 1996, 74, 187-194.
50. Van Neerven R.J.J., Ebner C., Yssel H., Kapsenberg M.L., Lamb J.R. – T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. *Immunol. Today*, 1996, 17, 526-532.
51. Vrtala S., Mayer P., Ferreira F., Susani M., Schon A.H., Kraft D., Valenta R. – Induction of IgE antibodies in mice and rhesus monkeys with recombinant birch pollen allergens: different allergenicity of Bet v 1 and Bet v 2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 98, 913-921.
52. Vrtala S., Hirtenlehner K., Vangelista L., Pastore A., Eichler H.G., Sperr W.R., Valent P., Ebner C., Kraft D., Valenta R. – Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope - Containing fragments candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99, 1673-1681.