

Les allergènes recombinants des pollens de graminées

G. PELTRE

Il existe deux méthodes principales de production d'allergènes recombinants appliquées aux pollens de graminées dont nous verrons les avantages et les inconvénients.

Un nombre de plus en plus important d'allergènes recombinants a été produit. Nous en dresserons le répertoire.

Enfin, des applications parfois très originales résultent de cet effort de recherche. Que peut-on en penser ou en espérer ?

PRODUCTION DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS

Il existe deux stratégies pour produire des allergènes recombinants.

La première consiste à partir de l'allergène natif, de le purifier, de déterminer sa séquence en acides aminés, d'en déduire la séquence en nucléotides de l'ADN qui le code, de construire cet ADN, de l'incorporer dans un vecteur qui ira infecter une cellule hôte (bactérie, levure...) dans laquelle ce gène pourra s'exprimer sous la forme d'une molécule d'allergène recombinant.

La deuxième approche consiste à isoler l'ensemble de l'ARN messager du pollen d'une gra-

minée, à le faire exprimer après l'avoir copié en ADN (cDNA) dans des cellules hôtes. Ces cellules seront alors capables de produire un grand nombre de molécules présentes dans le pollen dont les allergènes. Ces allergènes recombinants seront reconnus, après lyse des cellules hôtes, par les anticorps IgE de malades allergiques. L'identification des allergènes recombinants ainsi produits nécessite alors une étude immunochimique soignée.

Chacune de ces deux approches possède ses avantages et inconvénients.

À partir de l'allergène purifié

Un nombre relativement restreint d'allergènes de pollen hautement purifiés à été produit à ce jour. Ces allergènes ont pu subir des altérations de structure lors de leur purification et parfois sont peu ou pas reconnus par les IgE de malades. C'est ainsi que le groupe 4 des allergènes de graminées est très sensible à la dénaturation imposée par la séparation en SDS-PAGE. Cela explique que très peu d'équipes de recherche ne l'ont retenu comme un allergène majeur. Il n'existe pas encore à l'état de recombinant. Seuls les allergènes très hydrosolubles ont été étudiés par les techniques physico-chimiques habituelles qui sont effectuées dans des solutions aqueuses. Cela ne représente

peut-être qu'une partie des molécules potentiellement allergisantes.

De nombreux allergènes et des séquences N-terminales bloquées rendront difficile, voire impossible, le microséquençage nécessaire à la détermination de la séquence oligo-nucléotidique. Dans le pollen de graminée, deux groupes d'allergènes semblent être dans ce cas, leur clonage n'a donc pas encore été effectué.

À partir de l'ARN-messager

Les allergènes recombinants ainsi produits ne sont peut-être pas dans leur configuration native et peuvent ne pas être reconnus par les anticorps IgE de tous les malades allergiques à ces molécules. Même si ces molécules recombinantes sont reconnues par les IgE humaines, la caractérisation physico-chimique classique des allergènes (point isoélectrique ou pI et masse moléculaire Mr) n'est pas facile, soit à cause de modifications conformationnelles, soit par l'addition à leur chaîne d'acides aminés d'un fragment protéique recombinant co-exprimé. Dans ce cas, leur caractérisation peut se faire par inhibition par l'allergène recombinant de la reconnaissance de l'allergène natif par les IgE humaines. Cependant, cette technique est extrêmement précieuse d'une part pour la recherche d'allergènes très fragilisés par l'environnement du pollen ou les procédés d'extraction des allergènes, d'autre part pour les allergènes très difficiles à extraire du pollen tels les allergènes non hydrosolubles. En effet, l'expression de ces allergènes au niveau du génome évite les difficultés rencontrées pour leur purification en tant que protéines. Leur identification avec les critères classiques pI et Mr restera une source de controverses.

RÉPERTOIRE DES ALLERGÈNES

En ce début d'année 1995, dix groupes d'allergènes ont été décrits avec précision : les groupes 1, 2 et 3 semblent présents dans la plupart des graminées, qu'elles soient fourragères ou céréales. Les groupes 2 et 3 présentent de fortes homologues avec la partie C terminale du groupe 1. Chacun de ces groupes est parfois polymorphe, comprenant 5 à 6 isomorphes. Des allergènes recombinants ont été produits pour quelques espèces de graminées. Le groupe 1b très basique (pI 10,0) présente une certaine homologie avec le groupe 1.

Le groupe 4, à l'origine décrit comme un allergène de pI 10 et de Mr 60 kDa, n'est pas encore

produit à l'état de recombinant. Nous avons montré qu'il est un allergène majeur (6 % des protéines solubles du pollen) reconnu par au moins 70 % des malades allergiques au pollen de graminées. Nous avons produit des anticorps monoclonaux anti-4. Une ambiguïté subsiste à son sujet : certains chercheurs lui attribuent une Mr d'environ 50 kDa et des pI variant de 6,5 à 8,5. Nous pensons que ces caractéristiques correspondent à un groupe d'allergènes non encore reconnus et donc non séquencés.

Le groupe 5 est le plus polymorphe des allergènes de pollen de graminées. Il est hétérogène à la fois selon la charge : son pI varie de 5,0 à 8,8 et sa masse moléculaire de 28 à 33 kDa. Nous distinguons deux grands sous-groupes d'environ une vingtaine d'isomorphes : le sous-groupe acide de pI 5,0 à 6,1 et le sous-groupe basique de 6,4 à 8,8. Plusieurs anticorps monoclonaux ont été produits contre ces deux sous-groupes. Certains reconnaissent d'ailleurs l'ensemble du groupe 5. Ce groupe est reconnu par près de 80 % des malades et induit chez eux une forte production d'IgE. Quelques isomorphes recombinants ont été produits. Il semblerait que ce soit une RNAase.

Le groupe 6 uniquement trouvé dans le pollen de phléole semble être un allergène mineur.

Le groupe 9 a été décrit par erreur. Il s'agit en fait du sous-groupe 5 basique.

Le groupe 10 est un allergène mineur. Nous pensons que moins de 20 % des malades polliniques le reconnaissent. Il est très basique (pI 10,0) et de Mr 14 kDa. Il possède les caractéristiques d'un cytochrome C.

Le groupe 11, décrit récemment, est fortement glycosylé. Sa partie « sucre » serait allergénique, c'est-à-dire reconnue par des IgE.

Enfin, la profiline, un pan-allergène présent dans tout cytosquelette, associé à l'actine, se confond en pI et Mr au groupe 2. Environ 20 % des malades le reconnaîtraient. Sa présence dans de nombreuses sources d'allergènes pourrait expliquer les réactions croisées observées parfois entre pollens et différentes sources d'autres végétaux telles que les principaux légumes.

QUELQUES PROPRIÉTÉS DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS

Les allergènes recombinants sont de remarquables sources d'allergènes hautement purifiés qui ont permis de spectaculaires progrès en recherche tant fondamentale qu'appliquée.

En voici quelques exemples.

Étude des anticorps anti-allergènes

Des immunoadsorbants ont permis de purifier des anticorps spécifiques et donc de mieux étudier la quantité et la qualité de ces anticorps (isotypes, affinité...).

Étude des réactions croisées entre allergènes

La connaissance des séquences nucléotidiques ou d'acides aminés des allergènes permet la recherche en banque de données des identités ou homologies existant avec d'autres molécules déjà connues. C'est ainsi que nous avons pu identifier à la fois Dac g 3 et Dac g 10 du pollen de *Dactyle*.

Étude des épitopes

La recherche des épitopes B peut se faire à l'aide d'un ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule entière, native ou recombinante, soit par la technique ELISA ou mieux par la technique des biosensors. Une carte des épitopes peut être dressée et comparée à la reconnaissance de la molécule par les anticorps humains. Les épitopes T peuvent être étudiés par des peptides ou fragments d'allergènes obtenus soit par génétique moléculaire, synthèse *in vitro* de peptides chevauchants ou par hydrolyse enzymatique. Incubés avec des suspensions cellulaires, leur capacité à induire une stimulation *in vitro* sera recherchée.

Étude des isomorphes d'allergènes

La complexité de ces systèmes, leur signification au niveau botanique et au point de vue de l'allergie constituent encore un défi. Des progrès récents montrent de subtiles différences dans le spectre de ces iso-allergènes, à la fois selon l'origine et la nature de la plante ainsi que dans la réponse immunitaire de malade à malade. Ces variants moléculaires constituent des outils naturels ou recombinants pour l'étude fine de la spécificité de la réponse immunitaire aux allergènes.

CONCLUSION

La génétique moléculaire qui a permis la production d'allergènes recombinants a conduit à des progrès décisifs dans l'étude de la structure des allergènes et en particulier des allergènes de pollen de graminées. Cependant, il n'est pas encore possible à ce jour de dire pourquoi un allergène est un allergène. On sait que seules certaines molécules d'un extrait complexe sont des allergènes pour l'homme ou pour quelques animaux de laboratoire voire domestiques. Nous sommes incapables donc d'associer cette propriété que possèdent quelques molécules de notre environnement à des détails structuraux spécifiques de ces molécules. Une réponse à cette question permettrait cependant d'envisager de nouvelles stratégies de lutte contre l'allergie.

