

Allergènes du pollen de *Parietaria officinalis* et leur interaction avec les anticorps IgG et IgE spécifiques

D. GERACI, R. COCCHIARA, A. GIALLONGO, U. ORESTE et A. RUFFILLI *

Les allergènes sont des substances de poids moléculaire élevé tel que des protéines, des glycoprotéines ou hydrates de carbone. La caractérisation des allergènes hautement purifiés constitue un préalable essentiel à l'étude des bases de la sensibilisation allergénique de l'homme. De nombreux allergènes ont été purifiés à partir de différentes sources telles que les plantes, les animaux, les substances chimiques ; les revues complètes de ce sujet incluent celles de KING [4], MARSH [8], STANWORTH [10]. Après introduction dans l'organisme par inhalation, injection ou contact, l'allergène réagit avec les IgE fixées aux cellules déterminant une réaction en chaîne aboutissant à la libération finale de médiateurs chimiques tels que l'histamine. Dans le même temps, il a été observé des réactions avec des IgG non réagéniques disposant d'une activité bloquante (LICHTENSTEIN et coll. [7]). Les principes immunologiques de l'hyposensibilisation des malades atopiques, par injection d'extraits allergéniques, ne sont pas complètement compris. Nous n'en connaissons actuellement que l'influence sur les paramètres suivants :

- augmentation du niveau des anticorps bloquants IgG,
- baisse du niveau des IgE après une augmentation initiale.

Cependant, le rôle de ces IgG anticorps bloquants et leur importance dans les traitements d'hyposensibilisation est encore très controversée (LEVY et coll. [6], IRONS et coll. [3], ZEISS et coll. [11]). Une information plus complète sur l'interaction des IgG et IgE avec des molécules d'allergènes au niveau du déterminant est nécessaire à une meilleure appréciation de la fonction des IgG dans la réaction allergique. La présente étude rapporte les données relatives à la purification de deux fractions allergéniques hétérogènes dialysables et non dialysables. La relation existant entre les déterminants allergéniques et antigéniques est également analysée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le pollen de *Parietaria officinalis* contenant 75 à 85 p. cent de pollen pur a été obtenu d'Allergon, Engelholm (Suède). Les séphadex G-25 et G-75 et la protéine A Sépharose ont été obtenus de Pharmacia. Les marqueurs de poids moléculaire, la pepsine, le cytochrome-c et l'ovalbumine ont été obtenus de Sigma.

EXTRACTION DES POLLENS

Le pollen non dégraissé de pariétaire a été extrait dans l'eau bi-distillée pendant trois jours en chambre froide sous agitation continue. Le surnageant, obtenu après centrifugation, a été précipité par addition à 4 °C de sulfate d'ammonium solide jusqu'à une concentration finale de 70 p. cent en saturation. Le culot, obtenu par centrifugation, a été dissout dans 20 mM Tris-HCl pH 7,9 et filtré à travers une colonne de Séphadex G-25 équilibrée puis éluée avec le même tampon. Les fractions ont été essayées pour leur activité allergénique en Prick-test. Les pics actifs ont été collectés et passés en chromatographie à travers une colonne DE-52 équilibrée avec le même tampon en molarité croissante. Les pics actifs ont été séparés et dialysés après une étape de désalage.

DIALYSE

La dialyse a été réalisée en tube de A. H. Thomas Co, avec une limite d'exclusion de 12 000 daltons. Le pic actif a été dialysé fortement dans une solution Tris-HCl pH 7,9 20nM, renouvelée jusqu'à épuisement de l'activité allergénique de la solution de dialyse.

GERACI D., COCCHIARA R., GIALLONGO A., ORESTE U., RUFFILLI A. — Allergènes du pollen de *Parietaria officinalis* et leur interaction avec les anticorps IgG et IgE spécifiques. *Rev. franç. Allergol.*, 1980, 20 (n° 4-5), 213-216.

* Institut d'Anatomie Comparée, Université de Palerme. Institut International de Génétique et de Biophysique, CNR, Naples (Italie).

PROTÉINE A-SÉPHAROSE

Des volumes de 1 à 2 ml de sérum humain, dialysé contre 0,14 M de phosphate de sodium à pH 8, ont été introduits dans une colonne et équilibrés pendant 15 minutes. Les protéines non adsorbées ont été lavées à l'aide d'une solution 0,14 M de phosphate de sodium pH 8 jusqu'à ce qu'il ne soit plus observé d'absorption à 280 Å. Les matériaux adsorbés ont ensuite été élués avec une solution de citrate de sodium 0,14 M pH 3.

ELISA

Une phosphatase alcaline a été conjuguée à du sérum de lapin anti-IgG humaine, par addition de glutaraldéhyde jusqu'à une concentration finale de 0,2 p. cent. Les conjugués ont été conservés à 4 °C dans 50 mM de tampon Tris HCl pH 8, contenant 1 p. cent de sérum albumine bovine et 0,02 p. cent d'acide de sodium. Des micro-plaques jetables en polystyrène ont été utilisées pour les essais immunologiques. L'allergène dialysable de pariétaire d'un poids moléculaire de 12 000 daltons a été fixé aux parois des puits à la concentration finale de 50 µg/ml dans un tampon carbonate de sodium 15 mM pH 9,6. Après incubation, les produits non fixés ont été éliminés par lavage au tampon phosphate. La fraction anticorps, obtenue par la protéine A-sépha-rose chromatographie a été alors mise en contact avec les molécules d'allergènes fixées aux parois. Après lavage de l'excès, l'anti-IgG humaine conjuguée à la phosphatase alcaline a été ajoutée dans les puits et incubée pendant une nuit. La quantité de conjugué fixé aux parois a été mesurée par addition de substrat enzymatique au paranitrophényl-phosphate. La digestion enzymatique a été bloquée par addition de NaOH 1 M et le produit libéré, mesuré au spectrophotomètre à 400 nm.

RÉSULTATS

La technique utilisée pour la purification des allergènes extraits du pollen de pariétaire est montrée sur le tableau I. L'extrait aqueux, solution brun foncé contenant toute l'activité allergénique, a été filtré à travers une colonne de Sephadex G 25. La distribution protéique des produits élués a été mesurée au spectrophotomètre à 280 nm. L'activité allergénique de chaque fraction a été appréciée par tests cutanés directs sur des malades porteurs d'une allergie bien établie à la pariétaire. Il a été observé deux pics bien séparés de protéines et toute l'activité allergénique a été retrouvée au niveau du premier pic (fig. 1). Les produits isolés du premier pic ont été alors chargés dans une colonne de DE 52, équilibrée avec du Tris HCl 20 mM pH 7,9. La colonne a été lavée dans un volume du même tampon puis il a été procédé à une étape d'élu- tion graduelle. Un

TABLEAU I

DESCRIPTION SCHEMATIQUE DES METHODES UTILISEES POUR PURIFIER LES ALLERGENES DU POLLEN DE *PARIETARIA OFFICINALIS*

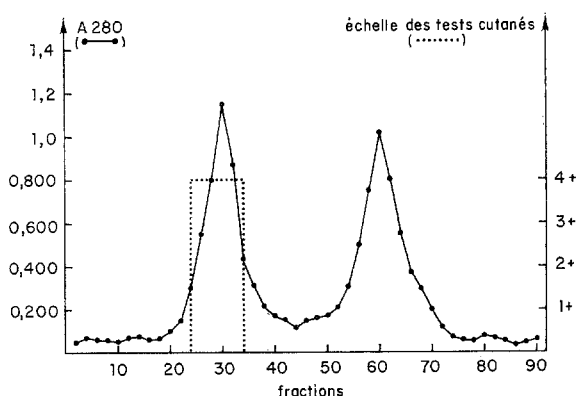
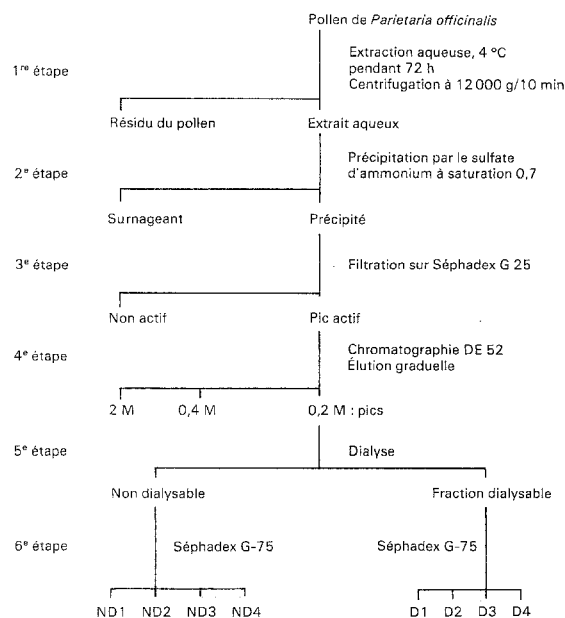


FIG. 1. — Filtration sur Sephadex G 25 de l'extrait aqueux de pollen. La colonne est équilibrée et élue avec 20 mM de Tris HCl, pH 7,9. Des fractions de 2,0 ml ont été collectées et l'activité allergénique mesurée en tests cutanés.

premier pic de protéine a été élué avec un tampon 200 mM. La colonne a été élue avec ce tampon jusqu'à ce qu'il ne soit plus observé d'absorption à 280 nm. Il a alors été ajouté un tampon 400 mM et la colonne a été élue jusqu'à ce qu'aucune absorption ne soit détectable. Il a ainsi été obtenu un second pic de protéine. Un troisième pic protéique a été élué avec du tampon 2 M. Toute l'activité allergénique a été retrouvée dans le premier pic protéique, élué avec le Tris HCl 200 mM pH 7,9 (fig. 2). Ce produit a été désalé par filtration à tra-

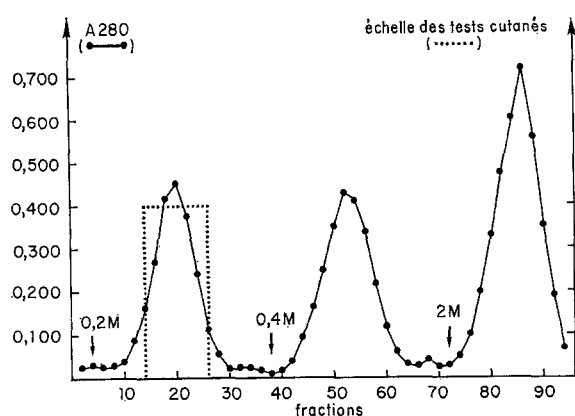


FIG. 2. — Chromatographie sur DE 52 du pic actif obtenu après filtration sur le Sephadex G 25. La colonne a été équilibrée avec du Tris HCl 20 mM, pH 7,9. La fraction allergénique dans le Tris HCl 20 mM, pH 7,9 a été introduite dans la colonne et chromatographiée en utilisant 0,2 M, 0,4 M, 2 M de tampon HCl, pH 7,9. Les fractions ont été essayées en tests cutanés pour leur activité allergénique.

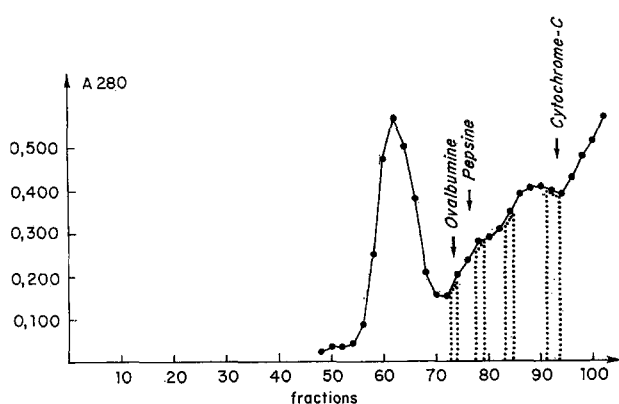


FIG. 3. — Gel filtration sur Sephadex G 25 du pic allergéniquement actif provenant de la chromatographie DE 52. La colonne a été équilibrée et éluée avec 20 mM de tampon Tris HCl, pH 7,9. Les protéines utilisées comme marqueurs : ovalbumine (43 000 PM), pepsine (35 000 PM), cytochrome (11 700 PM) et leurs positions sur la colonne ont été déterminées.

vers une colonne de Sephadex G 25 lyophilisée, dialysée intensivement contre du tampon Tris HCl 20 mM pH 7,9, renouvelé plusieurs fois jusqu'à ce qu'aucune activité allergénique ne soit trouvée dans le tampon externe de la dialyse. L'activité dialysable après concentration a été passée à travers une colonne de Sephadex G 75 préalablement calibrée en utilisant, comme marqueur protéique de poids moléculaire connu, ovalbumine, pepsine et cytochrome-c. La figure 3 montre le profil des densités protéiques et la distribution de l'activité allergénique de la fraction D. Quatre pics d'activité allergénique de poids moléculaire approximatif de 41 000, 30 000, 20 000

et 12 000 daltons ont été trouvés dans le dialysat. Sachant que les tubes retiennent des molécules d'un poids moléculaire égal ou supérieur à 12 000 daltons, nos résultats peuvent s'expliquer en supposant qu'il apparaît un processus d'aggrégation de l'allergène après l'étape de dialyse ce qui détermine la production de molécules d'un poids moléculaire supérieur au seuil des tubes de dialyse. La fraction non dialysable était également allergéniquement active et donnait quatre pics d'activité après passage à travers une colonne de Sephadex G 75.

Dans cet article, nous sommes concernés par la fraction dialysable ; les quatre pics allergéniques avaient une activité spécifique différente, précisément les allergènes d'un poids moléculaire de 12 000 et 14 000 daltons étaient environ cent fois plus actifs que ceux à 20 000 et 30 000 daltons. La relation antigénique entre les quatre allergènes fut analysée par immuno-diffusion en utilisant des anti-sérums de lapins obtenus contre la fraction non dialysable. Les quatre allergènes montrèrent une réaction d'identité. L'activité allergénique des quatre allergènes fut stable pendant plusieurs mois de conservation dans du Tris HCl 20 mM pH 7,9 à 4 °C. Elle demeura stable après deux heures d'ébullition. Une consommation des allergènes par la pronase pendant des temps inférieurs à 4 heures n'a pas supprimé l'activité allergénique. Après quatre heures cette activité était détruite. L'interaction entre cet allergène et les anticorps spécifiques IgG humaines et IgE humaines a été analysée en utilisant l'allergène dialysable de 12 000 daltons et l'ELISA. En utilisant une colonne de protéine 1-Sépharose, les anticorps IgE provenant de sérums de malades allergiques à la pariétaire ont été séparés des IgG spécifiques. Les anticorps IgE spécifiques n'ont pas été retenus et se sont donc trouvés élués avec les IgA, IgD, IgM et les composants non immunoglobuliniques du sérum humain. En utilisant la méthode ELISA, il n'a été détecté aucune IgG spécifique dans l'allergène de cette fraction, les substances fixées à la protéine A-Sépharose ont été éluées en changeant le tampon d'éluion. Il a été trouvé dans cette fraction des IgG spécifiques, mais une contamination par des IgE spécifiques a été démontrée par l'ELISA. Pour cette raison, nous avons seulement utilisé la réaction entre la fraction IgG et l'allergène pour déterminer une compétition entre les IgG et les IgE. Après que les allergènes aient été saturés par les IgG, il a été déterminé un temps d'incubation entre les conjugués et le substrat puis l'allergène dialysable de pariétaire 12 000 daltons a été fixé aux parois. On a alors ajouté les puits 200 µg d'une série de dilutions des fractions d'IgE et ce pour une période d'incubation de 6 heures. Après élimination des IgE non fixées aux allergènes, les puits ont été incubés avec 200 µg de la fraction IgG avec la même quantité dans chaque puit. Après une incubation avec le conjugué enzyme anti-IgG humaine, on obtient les résultats présentés sur la figure 4. Ce protocole a été répété avec les

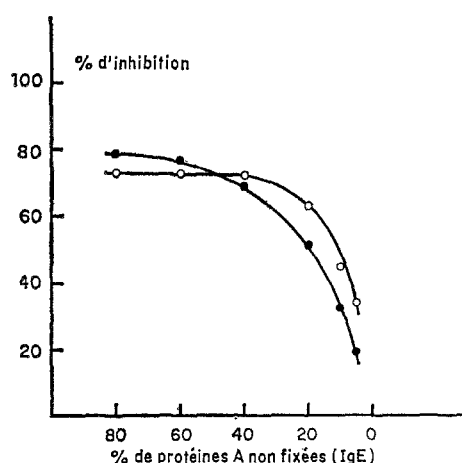


FIG. 4. — Courbe de titration en inhibition de l'ELISA de la fraction IgG fixée à la protéine A et de l'allergène couvrant dans les puits. Les courbes montrent le pourcentage d'inhibition obtenu :

- avec les deux fractions anticorps additionnées simultanément aux allergènes recouvrant les puits (points noirs) ;
- avec les deux fractions d'anticorps additionnées en deux étapes : la fraction IgE a été d'abord incubée avec la molécule d'allergène puis après élimination de l'extrait par lavage, la fraction IgG a été ajoutée (points blancs).

modifications suivantes : les deux fractions anticorps ont été ajoutées en même temps sous un volume total de 200 μ g, la fraction IgG était diluée au 1/100 par rapport à la concentration d'origine du sérum, il a été identique pour chaque puit alors que la fraction IgE variait en concentration du 1/125 au 1/2 000. Les résultats présentés sur la figure 4 donnent à penser que les IgE et les IgG entrent en compétition par le même déterminant antigénique de la molécule d'allergène.

DISCUSSION

La première étape de la réaction en chaîne d'hypersensibilité est constituée, chez l'homme, par l'in-

teraction d'une molécule allergénique avec un anticorps spécifique du système IgE. Cependant, chez certains animaux de même que chez l'homme, la molécule allergénique est également capable de stimuler et de réagir avec les anticorps bloquants spécifiques IgG qui bloquent et neutralisent l'allergène et donc l'éliminent. Cela signifie que la molécule allergénique peut réagir avec deux classes différentes d'anticorps, les IgG et les IgE. Habituellement, les allergènes que l'on rencontre naturellement sont des protéines ou des polypeptides d'un poids moléculaire compris entre 40 000 et 5 000 daltons qui portent des zones définies, susceptibles de se combiner avec des régions complémentaires des anticorps spécifiques. Si la zone de la molécule allergénique qui réagit avec l'IgE est le déterminant allergénique et que celle qui réagit avec l'IgG est le déterminant antigénique, il se pose la question de savoir si les deux déterminants sont identiques ou différents ? Pour répondre à cette question, l'une des possibilités est de disposer d'une molécule d'allergène pure et d'analyser dans un système in vitro l'interaction des anticorps IgG et IgE avec les molécules d'allergènes. A partir de pollens de pariétaires, il a été purifié une fraction dialysable contenant quatre allergènes (MENEGOZZO et coll. [9], GÉRACI et coll. [2]). L'allergène d'un poids moléculaire de 12 000 daltons a été utilisé pour déterminer ces interactions avec les anticorps humains spécifiques IgG et IgE en employant la méthode ELISA. Elle a permis la détection d'anticorps spécifiques à une concentration de l'ordre du ng/ml (ENGEVALL et PERLMAN [1], KING et KOCHOUMIAN [5]). En utilisant les fractions IgG et IgE, obtenues par chromatographie de sérums humains sur une colonne de protéine A-Sépharose (ZOLA et coll. [12]), les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une compétition entre les deux classes d'anticorps pour le même déterminant de l'allergène de pariétaire. Des travaux sont nécessaires pour confirmer ce résultat et pour comprendre la réaction qui existe entre les déterminants antigéniques et allergéniques.

RÉFÉRENCES

1. ENGEVALL E., PERLMAN P. — *J. Immunol.*, 1972, 109, 129-135.
2. GERACI D., ORESTE U., RUFFILLI A. — *Immunochemistry*, 1978, 15, 491-498.
3. IRONS J. S., PRUZANSKY J. J., PATTERSON R. — *J. Allergy clin. Immunol.*, 1975, 56, 64-77.
4. KING T. P. — *Adv. Immunol.*, 1976, 23, 77.
5. KING T. P., KOCHOUMIAN L. — *J. Immunol. Methods*, 1979, 28, 201-210.
6. LEVY D. A., LICHTENSTEIN I. M., GOLDSTEIN E. O., ISHIZAKA K. — *J. clin. Invest.*, 1971, 50, 360-369.
7. LICHTENSTEIN I. M., HOLTZMAN N. A., BURNETT L. S. — *J. Immunol.*, 1968, 101, 317-324.
8. MARSH D. G. — In : *The Antigens*, Vol. 3, p. 271. Sela, 1975.
9. MENEGOZZO M., GERACI D., RUFFILLI A. — *Immunochemistry*, 1976, 13, 475.
10. STANWORTH D. R. — *Immediate hypersensitivity*. Amsterdam, North-Holland Publ.
11. ZEISS C. R., METGER W. J., LEVITZ D. — *Clin. exp. Immunol.*, 1977, 28, 250-255.
12. ZOLA H., GERLAND L. G., COX H. C., ADCOCK J. J. — *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1978, 56, 123-127.