



# Les allergènes moléculaires : évolution ou révolution dans le diagnostic de l'allergie

## *Component resolved diagnosis: Evolution or revolution in allergy diagnosis*

J. Bienvenu <sup>a,\*,b,c</sup>, P. Rouzaire <sup>a,b,c</sup>, F. Bienvenu <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'immunologie, CHU Lyon-Sud, 165, chemin du Grand-Revoynet, 69495 Pierre-Bénite cedex, France

<sup>b</sup> Inserm U851, 21, avenue Tony-Garnier, 69007 Lyon, France

<sup>c</sup> Université Lyon-1, IFR 128, 69007 Lyon, France

### Résumé

Les développements récents en biologie moléculaire ont permis la production d'allergènes recombinants. Ces allergènes, ainsi que les allergènes naturels purifiés, sont aujourd'hui disponibles pour le dosage des IgE spécifiques sous forme soit de tests unitaires, soit de micro-arrays. Ces réactifs très standardisés représentent un progrès important par rapport aux extraits allergéniques naturels employés jusqu'alors pour les tests de diagnostic in vitro et ils contribuent à définir très précisément le profil de sensibilisation d'un patient. Ainsi, s'ouvre l'ère de l'allergie moléculaire qui doit permettre de réaliser des études épidémiologiques, d'améliorer la spécificité de la détermination des IgE (diminution des réactions croisées et donc meilleure compréhension des polysensibilisations), d'identifier des marqueurs de sévérité, de persistance ou de guérison de la maladie allergique. Ces nouvelles technologies, une fois maîtrisées, s'appliqueront également aux tests cutanés qui utiliseront des allergènes moléculaires et à l'immunothérapie qui mettra en œuvre une induction de tolérance adaptée à chaque patient en fonction de son profil de sensibilisation.

© 2011 Publié par Elsevier Masson SAS.

**Mots clés :** Allergène moléculaire ; Micro-array ; IgE spécifiques ; Réaction croisée ; Épidémiologie

### Abstract

The recent developments in molecular biology made it possible to produce recombinant allergens. These allergens together with natural purified allergens are now available for specific IgE measurement either under an individual or a microarray format. Compared to natural extracts these standardized reagents represent an important breakthrough for the in vitro allergy diagnosis and they allow the precise characterisation of the sensitization profile of a given patient. Thus, we are now entering the molecular allergy era which will permit to conduct epidemiological studies, to improve the specificity of IgE determination (decrease of cross-reactivity and better understanding of polysensitization), to develop the component resolved diagnosis of allergy, to identify severity, persistence or recovery markers of allergy. These new technologies will be rapidly extended to skin tests, which will use molecular allergens and to a tailored immunotherapy defined according to the individual sensitization profile of the allergic patient.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS.

**Keywords:** Component resolved diagnosis; Microarray; Specific IgE; Cross-reactivity; Epidemiology

L'allergie de type 1, médiée par les IgE, représente un problème de santé publique important puisqu'elle affecte environ 20 % de la population occidentale et qu'elle peut mettre

en danger la vie des patients qui en souffrent. Le diagnostic de ces affections doit donc être fiable : il repose sur une histoire clinique documentée mettant en cause un ou plusieurs allergènes, la démonstration d'une sensibilisation à l'aide de tests in vivo (tests cutanés) ou in vitro (dosage des IgE spécifiques d'allergènes). Cependant, ces tests ne révèlent qu'une sensibilisation à un ou des allergènes et ne permettent

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jacques.bienvenu@chu-lyon.fr (J. Bienvenu).

pas de conclure définitivement à une allergie clinique car leur valeur prédictive positive est insuffisante. Aussi, le test de provocation reste le « gold standard », mais il peut poser des problèmes de réalisation pratiques et éthiques.

Il existe donc un réel besoin de tests in vitro validés contribuant à améliorer le diagnostic d'allergie clinique en diminuant la nécessité de recourir aux tests de provocation pour établir un diagnostic de certitude. La disponibilité d'allergènes moléculaires spécifiques soit purifiés à partir d'une source naturelle, soit dits « recombinants » obtenus par biologie moléculaire a ouvert l'ère de l'allergie moléculaire. Cette nouvelle approche dénommée « component-resolved diagnosis » en 1999 par R. Valenta [1] permet d'analyser le profil de sensibilisation d'un sujet dans le but d'identifier les allergènes à l'origine de la maladie allergique. Elle constitue pour certains une véritable révolution, pour d'autres une simple évolution dans le diagnostic de l'allergie.

Dans cette mise au point, après avoir défini l'intérêt de l'utilisation des allergènes moléculaires par rapport aux extraits naturels, nous précisons ce que peut apporter leur utilisation dans le diagnostic et le pronostic de l'allergie, ainsi que dans l'aide à la décision d'instaurer une induction de tolérance.

## 1. Des extraits allergéniques naturels aux allergènes moléculaires : une avancée majeure dans le dosage des IgE spécifiques

Peu de temps après la découverte des IgE, la première technique de dosage de cette classe d'immunoglobulines, le Radio Allergo Sorbent Test (RAST), est publiée en 1967. Aujourd'hui, les techniques immunoenzymatiques qui ont remplacé la radio-immunologie sont les plus utilisées pour détecter dans le sérum d'un patient des IgE dirigées contre un ou plusieurs allergènes présents dans un extrait allergénique naturel.

### 1.1. Les limites de l'utilisation des extraits allergéniques naturels

Un allergène est un antigène particulier qui induit dans certaines conditions la synthèse d'IgE spécifiques chez des sujets génétiquement prédisposés. Les extraits allergéniques sont obtenus par extraction aqueuse d'une source allergénique naturelle telle que les pollens, les aliments ou squames et phanères d'animaux. Ces extraits présentent un certain nombre de limites pour la recherche d'IgE spécifiques. Ce sont des mélanges complexes qui renferment des molécules allergéniques et des molécules non allergéniques, ce qui apporte un « bruit de fond » qui peut nuire à la sensibilité des tests diagnostiques. Ils posent un problème de standardisation car leur contenu en allergènes peut différer d'un lot à l'autre du fait de la variabilité de ces sources naturelles. L'extraction aqueuse ne permet pas de recueillir les allergènes qui ne sont pas hydrosolubles (oléosines de l'arachide, par exemple), certains procédés de fabrication notamment le chauffage (en particulier pour les extraits de plantes et de fruits) peuvent conduire à la dégradation d'allergènes fragiles expliquant ainsi des résultats faussement négatifs de recherche d'IgE spécifiques. Cela a conduit à surcharger certaines préparations d'extraits naturels à l'aide de protéines recombinantes (rHev b 5 pour l'extrait de latex naturellement pauvre en cet allergène, rCor a 1 pour la noisette) [2]. Ces difficultés ont justifié le développement du projet européen Create [3] visant à améliorer la qualité des extraits, mais des problèmes persistent. Les extraits bruts peuvent également conduire à des résultats faussement positifs, liés à des réactions croisées ou à la contamination d'allergènes (présence d'acariens dans des extraits d'épithélium de chat, développement de moisissures dans des extraits de pollen).

Les extraits naturels posent donc des problèmes d'exactitude tant sur le plan des tests cutanés que des tests in vitro pour le diagnostic d'allergie du fait de ce manque de standardisation des préparations. Ils ne permettent pas non plus de faire la

Tableau 1  
Familles biochimiques et allergènes.

| Allergènes d'origine végétale                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PR-10 ou Bet v 1-like ( <i>pathogenesis related</i> ) | Bouleau (Bet v 1), noisette (Cor a 1), arachide (Ara h 8), soja (Gly m 4), céleri (Api g 1), pêche (Pru p 1), kiwi (Act d 8), pomme (Mal d 1), cerise (Pru av 1)...<br>Pêche (Pru p 3), noisette (Cor a 8), arachide (Ara h 9), armoise (Art v 3), pariétaire (Par j 2), pomme (Mal d 3), cerise (Pru av 3)... |
| LTP ( <i>lipid transfer proteins</i> , PR-14)         | Pêche (Pru p 2), pomme (Mal d 2), kiwi (Act d 2), banane (Mus a 4)...                                                                                                                                                                                                                                          |
| TLP (Thaumatococcus-like proteins)                    | Arachide (Ara h 2, Ara h 6), noix du Brésil (Ber e 1), sésame (Ses i 1)...                                                                                                                                                                                                                                     |
| Albumines 2S                                          | Arachide (Ara h 3), noisette (Cor a 9), soja (Gly m 6), noix cajou (Ana o 2)                                                                                                                                                                                                                                   |
| Protéines 11S                                         | Arachide (Ara h 1), noisette (Cor a 11), soja (Gly m 5), lentille (Len c 1)...                                                                                                                                                                                                                                 |
| Protéines 7S                                          | Bouleau (Bet v 2), phléole (Phl p 12), latex (Hev b 8), pêche (Pru p 4)...                                                                                                                                                                                                                                     |
| Profilines                                            | Bouleau (Bet v 4), phléole (Phl p 7), olivier (Ole e 3)...                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Polcalcines                                           | Pollens de graminées (Phl p 1)...                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Bêta expansines                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Allergènes d'origine animale                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Tropomyosines                                         | Crevette (Pen a 1), acariens (Der p 10), blatte (Bla g 7), anisakis (Ani s 3)...                                                                                                                                                                                                                               |
| Parvalbumines                                         | Carpe (Cyp c 1), morue (Gad c 1)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Lipocalines                                           | Chat (Fel d 4), chien (Can f 1, Can f 2), vache (Bos d 5), souris (Mus m 1)...                                                                                                                                                                                                                                 |
| Albumines                                             | Chat (Fel d 2), chien (Can f 3), vache (Bos d 6)...                                                                                                                                                                                                                                                            |

différence entre une réaction croisée avec ou sans traduction clinique et une vraie co-sensibilisation à différentes sources allergéniques dans une population où le nombre de sujets polysensibilisés ne cesse de croître.

La définition de familles biochimiques, qui dépasse souvent les classifications botaniques et zoologiques habituelles, a permis de mieux comprendre l'origine de ces réactions croisées (Tableau 1). Ainsi, ont été caractérisées des familles (correspondant souvent à des panallergènes) représentées chez les végétaux par les protéines de défense PR-10 (*pathogenesis related*), les *lipid transfer proteins* (LTP), les *thaumatin-like proteins*, les albumines 2S, les profilines, les polcalcines et chez les animaux par les tropomyosines, les parvalbumines ou les albumines. L'exemple des profilines est à ce titre très illustratif avec des séquences protéiques et des structures spatiales tridimensionnelles conservées dans les pollens, les fruits ou les légumes au cours de l'évolution des espèces. De plus, les structures glucidiques des allergènes peuvent présenter de fortes homologues et être à l'origine de réactions croisées avec production d'IgE dites anti-cross-reactive carbohydrate determinants (CCD). Ainsi, la détection d'IgE dirigées contre les profilines et/ou les CCD (structures retrouvées dans les extraits naturels) correspondant à une réactivité croisée large entre pollens, fruits, latex, venin peut conduire à un diagnostic erroné de maladie allergique car ce type d'anticorps n'est que très rarement responsable de manifestations cliniques. L'utilisation d'allergènes recombinants parfaitement identifiés sur le plan moléculaire permet de résoudre la majorité de ces problèmes.

## 1.2. Le développement des allergènes moléculaires dans le diagnostic de l'allergie de type 1

Les progrès récents en biochimie, en biologie cellulaire et moléculaire ainsi que le développement de méthodes analytiques et séparatives très performantes a ouvert la voie de l'allergie moléculaire. Les allergènes majeurs ont pu être caractérisés, purifiés à partir de source naturelle ou produits par génie génétique sous forme de protéines dites « recombinantes ». Le premier allergène cloné en 1988 a été Der p 1, allergène majeur de *Dermatophagoides pteronyssinus* [4]. Un très grand nombre d'allergènes recombinants ou natifs purifiés qui reproduisent la complexité des épitopes reconnus par les IgE à la surface des allergènes naturels est aujourd'hui disponible. La liste des allergènes, leurs séquences, leurs fonctions biologiques et leur classification dans différentes familles peuvent être retrouvées sur des bases de données telles que Allergome (<http://www.allergome.org>) ou AllFam (<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/>). Il faut souligner que seulement 5 % des familles protéiques renferment des allergènes documentés. À ce jour, 1004 allergènes regroupés en 175 familles ont été identifiés (données AllFam du 4 février 2011). Les cellules de procaryotes telles que *Escherichia coli* ne peuvent réaliser la glycosylation telle qu'elle existe dans de nombreuses protéines naturelles allergéniques. Cela constitue une limite à l'utilisation de ces protéines si ces allergènes natifs nécessitent la présence de CCD pour être reconnus par les IgE comme c'est le cas pour la

hyaluronidase du venin d'abeille (Api m 2) [5] ou l'allergène majeur de l'armoise (Art v 1) [6]. De plus, d'autres absences de modifications post-translationnelles telles que la phosphorylation ou la formation de pont disulfures peuvent altérer le repliement (*folding*) et modifier la structure tridimensionnelle des protéines recombinantes par rapport à l'allergène originel, pouvant ainsi aboutir à la suppression de certains épitopes conformationnels. Les allergènes recombinants présentent le grand avantage de pouvoir être produits en grande quantité (ce qui n'est pas le cas des allergènes naturels purifiés) et de façon très reproductible de lot-à-lot. Il convient, néanmoins, de démontrer que ces allergènes recombinants présentent bien les mêmes caractéristiques allergéniques que leurs correspondants naturels. Les méthodes de validation mettent en œuvre la spectrométrie de masse pour comparer les structures des allergènes naturels et recombinants, l'immunodétection à l'aide de sérums de sujets sensibilisés à l'allergène natif et des tests d'inhibition compétitive réalisés soit avec des allergènes naturels, soit avec des allergènes recombinants.

## 2. Les technologies utilisant les allergènes moléculaires et leur évolution : des tests unitaires aux micro-arrays

Rapidement, sont apparus pour la recherche des IgE spécifiques des tests unitaires utilisant non plus des extraits naturels, mais des allergènes moléculaires. Sur le plan industriel, cette technologie a été fortement développée par la société Phadia qui a fixé sur des capsules de cellulose activée (CAP) des allergènes moléculaires uniques. À ce jour, 84 allergènes moléculaires sont commercialisés. Ainsi, s'ouvre véritablement l'ère du « component resolved diagnosis » qui utilise des marqueurs allergéniques spécifiques pour explorer la véritable sensibilisation initiale d'un patient vis-à-vis d'une source allergénique donnée. Cette approche permet aussi de mettre en évidence des sensibilisations avec une faible traduction clinique en utilisant des profilines ou des structures glycaniques (CCD) comme substrat des IgE. Il est donc possible de déterminer un profil de sensibilisation propre à chaque individu. Le prérequis fondamental à l'utilisation des allergènes moléculaires est de ne pas perdre en sensibilité par rapport à l'extrait allergénique naturel qui renferme de nombreux allergènes majeurs et mineurs. Souvent, la détermination d'un profil permettant de contribuer au diagnostic nécessitera la réalisation de nombreux tests unitaires et même pour une source allergénique donnée, plusieurs allergènes majeurs devront être analysés comme dans le cas du latex (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6) ou de l'arachide (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3). En conséquence, sur un plan pratique, il deviendra rapidement impossible chez un sujet polysensibilisé de tester individuellement toutes les molécules allergéniques par des tests unitaires, ce qui justifie pleinement de développer le concept de micro-array (ou micropuces, ou microchips) pour rechercher simultanément des IgE dirigées contre de multiples allergènes. En effet, les avancées des nanotechnologies permettent de déposer de manière reproductible et d'immobiliser un grand nombre de protéines sur de très faibles surfaces. Ces dépôts de quelques micromètres correspondent à des

concentrations de quelques nanogrammes ou fentogrammes de protéines. Cette technologie est tout à fait adaptée à la détermination du profil d'IgE spécifiques d'un patient en un test unique utilisant une surface miniaturisée recouverte d'une très large variété d'allergènes moléculaires. Les difficultés techniques de développement sont nombreuses. Les allergènes possèdent une complexité intrinsèque propre liée à leur taille, leur charge, leur solubilité, leur structure tridimensionnelle qui doit être bien prise en compte lors du procédé d'immobilisation afin de maintenir l'accessibilité des épitopes allergéniques aux IgE. Il est évident que le procédé d'immobilisation qui est unique ne peut être optimisé pour chacun des allergènes individuels et des compromis sont donc nécessaires sur le plan technologique. La reproductibilité lot-à-lot de la préparation des micro-arrays est essentielle. Un désavantage potentiel des micro-arrays est que les allergènes déposés ne se trouvent pas en excès contrairement aux tests unitaires ce qui, potentiellement, peut conduire à un manque de sensibilité dans la détection d'IgE spécifiques. Les quantités limitées d'antigènes déposées peuvent aussi induire une compétition entre IgG et IgE pour la liaison à ces allergènes particulièrement pour les aliments ou chez des patients pour lesquels une induction de tolérance est en cours. Cependant, l'affinité des IgE ( $10^{-10}$  à  $10^{-11}$  M) pour les allergènes est beaucoup plus forte que celle des IgG ( $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  M).

En 2002, Hiller et al. [7] sont les premiers à appliquer les micro-arrays aux allergènes moléculaires en fixant 94 allergènes purifiés (78 allergènes recombinants et 16 allergènes naturels) représentatifs des pollens, aliments, acariens, moisissures, insectes, venins et latex. Le profil de sensibilisation apparaissait être un bon reflet des données cliniques, mais il n'existait pas de relation entre l'intensité de la fluorescence des micro-arrays et l'intensité de la positivité des tests cutanés chez les patients. Rapidement, des micro-arrays ont été commercialisés par la société Phadia qui propose le système *immuno solid phase allergen chip* (ISAC) développé par la société autrichienne VBC Genomix. Cent trois allergènes issus de 47 sources allergéniques sont déposés en triple exemplaire sur une plaque de verre modifiée chimiquement. Chaque plaque de verre renferme quatre micro-arrays identiques. Vingt microlitres de sérum non dilué sont déposés et laissés deux heures en contact pour permettre la fixation des IgE spécifiques sur les allergènes correspondants. Après lavage, la fixation des IgE est révélée par l'addition d'un anticorps anti-IgE fluorescent. Après incubation et lavage, le signal de fluorescence est lu sur un lecteur confocal équipé d'un double laser. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires dites ISU pour « ISAC standardized unit ». La composition de la puce ISAC doit prochainement évoluer avec une meilleure représentativité des allergènes du blé (LTP Tri a 14), des allergènes de la noix (Jug r 1, 2, 3) et des fruits à coque.

Une étude comparative entre ISAC et la technologie unitaire conventionnelle CAP a montré une bonne corrélation entre les deux méthodes pour les allergènes de la phléole (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 et Phl p 6) et du bouleau (Bet v 1 et Bet v 2) [8]. Un autre travail portant sur 120 patients a rapporté par la méthode ROC des performances comparables entre micro-array et la

méthode CAP unitaire pour les pollens de bouleau et de graminées ainsi que pour l'épithélium de chat [9] ; néanmoins, il est noté une moindre sensibilité de l'ISAC pour les acariens et pour l'armoise. Ce dernier résultat peut s'expliquer par l'absence de CCD dans r Art v 1, CCD importants pour la reconnaissance de cet allergène par les IgE de certains patients allergiques. Chez 130 enfants, Ott et al. [10] ont rapporté pour les allergènes du lait de vache et de l'œuf des résultats équivalents par micro-arrays à ceux observés par les techniques in vitro classiques utilisant des extraits allergéniques et par les tests cutanés in vivo. Les auteurs insistent sur l'intérêt du micro-array pour de très jeunes enfants car la technique utilise de faibles quantités de prélèvement (20 µL) qui autorisent le prélèvement capillaire. En résumé, il apparaît nécessaire de réaliser une étude exhaustive molécule par molécule de la sensibilité et de la spécificité des micro-arrays en comparant les performances de cette nouvelle technique par rapport au test unitaire correspondant.

### 3. Apport des allergènes moléculaires dans le diagnostic de l'allergie

Le développement des allergènes moléculaires permet d'analyser le profil de sensibilisation d'un patient avec de nombreuses applications.

#### 3.1. Études épidémiologiques

Il s'agit, bien entendu, d'un domaine privilégié pour l'utilisation des micro-arrays qui, grâce à la standardisation, permettront de déterminer et de comparer la sensibilisation de patients dans différentes régions du monde, dans des populations ciblées et de suivre l'évolution de cette sensibilisation au cours du temps. G. Pauli [11] a déjà souligné les grandes variations entre les continents pour rPhl p 1 avec 95 % de sensibilisation en Europe et seulement 65 % au Japon ; en Espagne, une différence de prévalence pour la LTP Ole e 7 et la  $\beta$ -glucanase Ole e 9 est observée en fonction de la culture plus ou moins intensive de l'olivier alors que la prévalence vis-à-vis de l'allergène majeur Ole e 1 est sensiblement constante dans toutes les régions (prévalence de 60 %). Il n'existe pas de données épidémiologiques relatives à la sensibilisation de la population française et des études doivent absolument être initiées pour définir le profil de sensibilisation dans différentes régions de France, en particulier au Nord et au Sud. De plus, le suivi de l'évolution de la sensibilisation au cours du temps serait très utile au suivi des modifications de l'environnement et devrait être conduit en collaboration avec les réseaux sentinelles.

Les études épidémiologiques doivent permettre de mieux comprendre l'histoire naturelle de l'allergie au début de la vie et les relations entre les gènes et l'environnement. Peu de résultats d'études épidémiologiques sont aujourd'hui disponibles. La plus importante est celle de Scala et al. [12] qui ont étudié chez 23 077 Italiens le profil de sensibilisation vis-à-vis de 75 allergènes en utilisant la technologie ISAC de première génération. 71,1 % des sujets avaient des IgE spécifiques vis-à-

vis d'au moins un allergène. Les trois allergènes les plus souvent reconnus étaient l'allergène Cup a 1 du cyprès (42,7 %), Der f 2 des acariens (38,7 %) et Phl p 1 de la phléole (37,9 %). Le premier allergène alimentaire retrouvé était la LTP de la pêche Pru p 3 reconnu uniquement par 9,79 % des sujets. Par ailleurs, la prévalence de sensibilisation varie beaucoup en fonction de l'âge et du sexe.

### 3.2. Identification des marqueurs de sensibilisation initiale à une source allergénique : distinction entre sensibilisation et allergie

L'introduction des allergènes moléculaires a permis de définir des marqueurs allergéniques spécifiques de la sensibilisation initiale à une source allergénique. Une revue générale de ces marqueurs a été récemment publiée par Sastre [13]. Pour l'arachide, Ara h 1, 2, 3 et 6 sont des marqueurs d'une sensibilisation initiale avec un intérêt majeur pour Ara h 2. Dans une étude réalisée dans notre laboratoire, chez 66 enfants présentant une allergie clinique à l'arachide, une sensibilisation vis-à-vis de rAra h 2 était notée chez 91 % des enfants alors qu'elle n'était que de 76 % et 68 % pour rAra h 1 et rAra h 3, respectivement. Dans ce même travail, nous avons noté que la présence d'IgE dirigées contre rAra h 9 s'accompagnait souvent de symptômes sévères alors qu'ils étaient mineurs chez des patients monosensibilisés à Ara h8. D'autres allergènes d'aliments, de plantes et d'arbres sont reconnus comme des marqueurs de sensibilisation initiale comme à titre d'exemples Gly m 5 et Gly m 6 pour le soja, Tria a 19 ( $\omega$ -5 gliadine) pour les réactions à l'effort après ingestion de blé, rDau c 1.0201 pour la carotte, Ber e 1 pour la noix du Brésil, Act d 1 et Act d 5 (kiwelline) pour le kiwi ou Bet v 1 pour le pollen de bouleau (mais des IgE vis-à-vis de Bet v1 peuvent être aussi retrouvées chez des patients ayant une sensibilisation primaire à d'autres fagales).

La sensibilisation au latex posait un problème particulier car elle était souvent rencontrée chez des sujets qui ne présentaient pas de signes cliniques. Cette observation était fréquente lorsque la recherche des IgE était réalisée à l'aide d'extraits allergéniques naturels. L'apport des allergènes moléculaires a été majeur chez ce type de patients. rHev b 1, rHev b 3, rHev b 5 et rHev b 6.02 sont associés à une allergie primaire au latex et Ebo et al. [14] ne relèvent jamais une réactivité IgE vis-à-vis de ces allergènes chez des sujets témoins ou des sujets ne présentant pas une allergie au latex avec expression clinique. Une réactivité isolée vis-à-vis de la profiline Hev b 8 a très peu de signification clinique. Hev b 1 a une forte prévalence chez les enfants atteints de spina bifida et qui ont subi de nombreuses opérations chirurgicales. Hev b 6 est souvent associé au syndrome latex-fruit. Les allergènes Der p 1 et Der p 2 de *D. pteronyssinus* sont des marqueurs spécifiques de sensibilisation aux acariens. Le diagnostic de l'allergie au venin d'hyménoptères a bénéficié de la découverte d'allergènes majeurs spécifiques d'espèces comme Api m 1 (phospholipase A2) pour l'abeille, Pol d 5 pour la guêpe poliste, et Ves v 1 (phospholipase A1) et Ves v 5 (antigène 5) pour la guêpe vespula.

Les allergènes recombinants qui ne présentent pas de résidus glycosylés ne sont pas reconnus par les IgE anti-CCD à

l'origine de faux-positifs dans la recherche d'IgE spécifiques. Les CCD sont présents dans les glycoprotéines de plantes et d'insectes et correspondent à des déterminants glucidiques qui n'existent pas chez les mammifères. La sensibilisation contre les CCD ne s'accompagne que très rarement de symptômes cliniques. La recherche des IgE anti-CCD par le test broméline (Ana c 2) ou le test MUX F3 peut être réalisée pour résoudre la question de sensibilisation asymptomatique détectée par des tests in vitro utilisant des extraits allergéniques. Environ 20 % des patients polysensibilisés aux pollens possèdent des IgE anti-CCD. La recherche des anti-CCD est particulièrement utile en cas de sensibilisation à des aliments, au latex chez un sujet allergique au pollen sans facteur de risque professionnel, chez des sujets positifs aux extraits des venins d'hyménoptères. Ainsi, un test positif témoigne d'une réactivité croisée reliée au CCD.

Il faut mentionner que récemment a été rapporté dans le sérum de certains sujets la présence d'IgE anti-galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -gal) [15]. Ces IgE sont capables de déclencher des réactions anaphylactiques graves après administration de l'anticorps monoclonal cetuximab ainsi que des réactions anaphylactiques anormalement retardées après consommation de viande de bœuf, de porc ou d'agneau. L'apparition de ces IgE serait induite par des piqûres de tiques.

### 3.3. Identification de marqueurs de sévérité de l'allergie

La détermination de facteurs prédictifs de gravité est particulièrement importante pour l'allergie alimentaire. La sévérité des réactions est différente selon les familles moléculaires auxquelles appartiennent les allergènes à l'origine de la sensibilisation du patient.

D'une manière générale, les symptômes cliniques seront graduellement de plus en plus sévères dans l'ordre des familles suivantes : CCD, profilines, PR-10 (Bet v 1-like), LTP et protéines de stockage. La structure des protéines permet d'expliquer cette variabilité de réaction clinique. Les LTP à l'origine de réactions systémiques possèdent, en effet, une structure tridimensionnelle très compacte avec des ponts disulfure intra- et interchaîne qui rendent ces protéines résistantes à la cuisson et aux enzymes digestives. À l'inverse, les PR-10 sont beaucoup plus labiles et seront responsables de syndromes oraux. Ces données sont confirmées par des études cliniques qui démontrent que les LTP de la pêche (Pru p 3), de la noix (Cor a 8), de la pomme (Mal d 3) déclenchent des réactions allergiques sévères contrairement aux PR-10 respectivement Pru p 1, Cor a 1 et Mal d 1 à l'origine de syndromes oraux. Dans ce contexte, il faut mentionner l'étude de Fernandez-Rivas et al. [16] qui ont analysé l'influence du profil de sensibilisation sur l'expression clinique de l'allergie à la pomme en Europe. Aux Pays-Bas, en Autriche et en Italie, les manifestations cliniques de l'allergie à la pomme sont légères avec des syndromes oraux dans plus de 90 % des cas en relation avec une pollinose au bouleau et une sensibilisation à Bet v 1 et à son homologue Mal d 1 de la pomme. Au contraire, en Espagne les réactions sont sévères avec plus de 35 % de réactions systémiques et sont liées à une allergie à la pêche et à une sensibilisation à la LTP Mal d 3. Les allergènes

moléculaires apportent une information essentielle sur le mode de sensibilisation et contribuent au développement d'une stratégie préventive en matière d'allergie alimentaire.

Dans l'allergie au lait de vache, l'utilisation d' $\alpha$ -lactalbumine recombinante constitue une aide au diagnostic d'allergie sévère [17]. De plus, dans les cas graves d'allergie au lait de vache, il est observé une plus large diversité de reconnaissance épitopique et une plus grande affinité des IgE pour des peptides issus des caséines et de la  $\beta$ -lactoglobuline à l'aide d'une technologie micro-array [18].

### 3.4. Identification de marqueurs de persistance ou de guérison d'allergie

Les allergènes moléculaires fournissent des éléments nouveaux dans l'aide à la décision de réaliser un test de provocation par voie orale. Ainsi, la recherche des IgE spécifiques dirigés contre l'ovomucoïde est utile pour documenter une tolérance à l'œuf avec des concentrations d'IgE inférieures à 1 kUI/L associées à un faible risque de réaction à l'œuf cuit même si le sujet développe des réactions à l'œuf cru [19]. L'analyse du rapport IgG4 sur IgE spécifiques de l'ovalbumine est aussi une piste prometteuse.

Pour l'allergie à l'arachide, Nicolaou et al. ont montré que l'allergène Ara h 2 était le plus performant pour distinguer les enfants allergiques à l'arachide des enfants tolérants [20].

## 4. Perspectives

La possibilité de déterminer avec précision des IgE qui reconnaissent spécifiquement des allergènes moléculaires recombinants ou des allergènes naturels purifiés ouvre une ère nouvelle dans le domaine de l'allergologie. La véritable performance diagnostique de ces nouveaux outils en particulier des micro-arrays doit être encore précisée par des études cliniques bien documentées. L'information fournie par les résultats des micro-arrays est très dense et doit être parfaitement maîtrisée pour donner une information pertinente à l'allergologue. C'est là un nouvel enjeu pour les professionnels en charge des patients allergiques : ils doivent acquérir les bases fondamentales relatives aux composants allergéniques pour pouvoir réaliser une bonne interprétation des résultats et les confronter aux données cliniques. Les tests cutanés doivent aussi grandement bénéficier de l'apport des allergènes moléculaires avec une amélioration de leur spécificité. Une fois ces outils bien maîtrisés, il sera possible de déterminer un profil de sensibilisation caractéristique d'un patient donné et de décider de la sélection de la composition des allergènes les mieux adaptés à la mise en place d'une induction de tolérance à la carte évitant ainsi le risque de néosensibilisation. C'est seulement quand cette étape sera validée que nous pourrons dire que les allergènes moléculaires constituent une révolution dans la prise en charge du sujet allergique.

## Conflit d'intérêt

Les auteurs n'ont pas transmis de conflit d'intérêt.

## Références

- [1] Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;29: 896–904.
- [2] Lundberg M, Chen Z, Rihs HP, Wrangsjö K. Recombinant spiked allergen extract. *Allergy* 2001;56:794–5.
- [3] Van Ree R. CREATE Partnership. The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe. *Allergy* 2004;59:571–4.
- [4] Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;85:127–9.
- [5] Soldatova L, Crameri R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:691–8.
- [6] Schmid-Grendelmeier P, Holzmann D, Himly M, Weichel M, Tresch S, Ruckert B, et al. Native Art v1 and recombinant Art v1 are able to induce humoral and T cell-mediated *in vitro* and *in vivo* responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1328–36.
- [7] Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002;16:414–6.
- [8] Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison to microarray using recombinant allergen with conventional diagnostic methods to detect serum allergen specific immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1443–9.
- [9] Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006;61:633–9.
- [10] Ott H, Baron JM, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk HF, et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy* 2008;63:1521–8.
- [11] Pauli G. Les allergènes recombinants: leur apport à l'allergologie en 2006. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2007;47:72–9.
- [12] Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, Ferrara R, Palazzo P, Pomponi D, et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy* 2010;40:911–21.
- [13] Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1442–60.
- [14] Ebo DG, Hagendorens MM, De Knop KJ, Verweij MM, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray. *Clin Exp Allergy* 2010;40:348–58.
- [15] Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- $\alpha$ -1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008;358:1109–17.
- [16] Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, Van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:481–8.
- [17] Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Civaj V, Balic N, et al. Visualization of clustered IgE epitopes on  $\alpha$ -lactalbumin. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1279–85.
- [18] Wang J, Lin J, Bardina L, Goldis M, Nowak-Wegrzyn A, Shreffler WG, et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:695–702.
- [19] Ando H, Movérare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres MP, et al. Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:583–8.
- [20] Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, Simpson A, Winell H, Kerry G, et al. Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:191–7.