

Nouveaux outils pour le diagnostic biologique de l'allergie

F. Bienvenu

Quels sont les défauts des extraits allergéniques naturels?

- **Composition variable et hétérogène** : mélange de protéines allergéniques et non allergéniques :
 - Obtenus à partir de sources allergéniques complexes: grains de pollens, squames et phanères d'animaux, cultures d'acariens ou de blattes.
 - Composition variable en fonction des sources, des procédés d'extraction, de purification et de stockage utilisés.
 - Composition variable en fonction des propriétés d'hydrosolubilité des protéines allergéniques.

Evolution de la biologie de l'allergie

- IgE totales
- Tests de screening :
 - Mélanges d'allergènes (Phadiatop, Trophatop)
 - CLA
- IgE spécifiques avec allergènes naturels



Manque de spécificité

- **Approche moléculaire :**

- *Allergène majeur* : **pertinence clinique** (LTP, albumine...)
- *Panallergènes* : mise en évidence de **réactions croisées** (profiline, IgE anticarbohydrates)

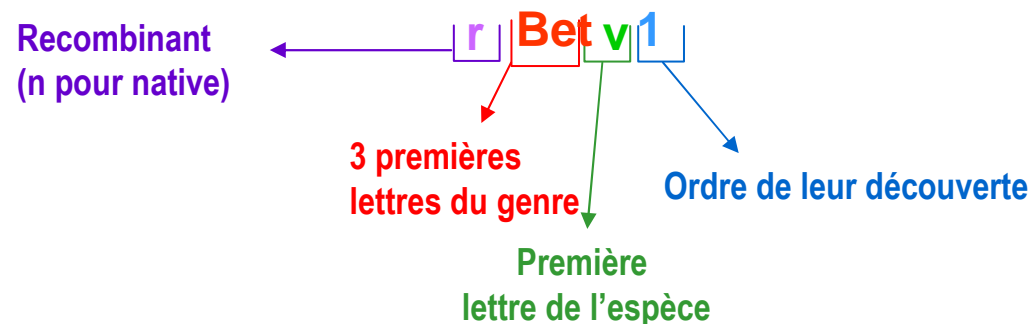
Progrès dans la biotechnologie appliquée aux allergènes

- Identification et séquençage de nombreux allergènes :
 - Production d'allergènes recombinants
 - Identification des régions immunoréactives :
épitopes T et B
- Développement de nouveaux outils diagnostiques et de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Allergènes purifiés et recombinants

- De nombreux allergènes ont déjà été identifiés, séquencés et peuvent être reproduits par technique recombinante
- Désignation selon une nomenclature officielle, précédée de « n » pour l'allergène naturel purifié, et « r » pour recombinant :

Exemple du bouleau, *betula verucosa* :



Les allergènes recombinants

- L'application de la technologie DNA recombinante pour la production des protéines allergéniques permet :
 - Une *standardisation* des réactifs
 - Une production à grande échelle
 - Une excellente reproductibilité lot à lot
 - Une pureté supérieure aux allergènes purifiés

Apport pratique des allergènes recombinants

1. Outil pour améliorer les tests biologiques
2. Outil pour contribuer au diagnostic positif
3. Outil pour « dépister » les réactions croisées sur des bases moléculaires et aider à l'interprétation des polysensibilisations cutanées.
4. Outil pour améliorer les indications de l'immunothérapie spécifique.

Amélioration des tests biologiques

- **Latex (k82) :**

Hev b 5 : allergène majeur, en faible quantité dans les extraits de latex

↳ Enrichissement du test k82 en rHev b5

↳ Meilleure détection des patients monosensibilisés à Hev b 5

- **Noisette (f17) :**

Cor a 1 : PR-10 : Protéine « fragile »

↳ Enrichissement du test f17 en rCor a1

Allergènes recombinants

=

Outil pour expliquer les **réactions croisées**

Interprétation des polysensibilisations:

Allergies croisées / cosensibilisations?

Sensibilisation et Allergie

- On parle de **sensibilisation** à un allergène quand les tests cutanés ou sanguins sont positifs
- Mais la présence d'une sensibilisation n'implique pas obligatoirement qu'il se produira une réaction allergique clinique
- Les sujets **allergiques aux pollens** présentent 2 à 3 fois + fréquemment une allergie alimentaire que la population générale

Différents types de réactions croisées

1. Réactions croisées entre *espèces taxonomiquement proches* :

Ex : acariens (d1,d2) , graminées (dactyle et phléole). Ex : frêne / olivier : famille des Oléacées

2. Réactions croisées entre *espèces taxonomiquement éloignées* :

La relation botanique ne permet plus d'expliquer les RC.

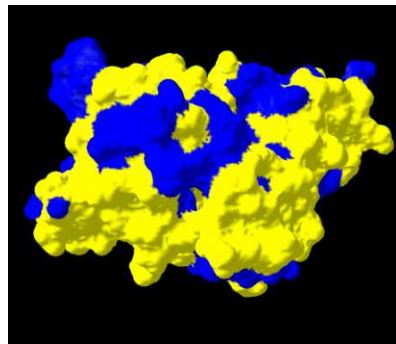
- Explication par la structure des allergènes et leur fonction :
notion de *famille moléculaire* (rassemble des protéines provenant de divers allergènes et ayant la même *fonction physiologique*)

Familles moléculaires

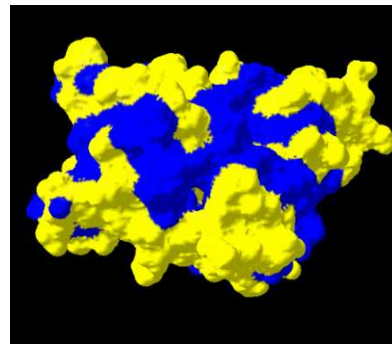
- **Profilines** : rBet v2, rHev b8, rPhl p12, rPru p4
- **Tropomyosines** : rPen a1
- **LTP (Lipid Transfer Proteins)** : rPru p3, rCor a8
- **Protéines PR-10 (Bet v 1-like)** : rBet v1, rGly m4 , r Ara h8, rPru p1, Api g1
- **Polcalcines** : rBet v4
- **2S Albumines** : rAra h2
- **Beta expansines** : rPhl p1
- **Albumines** : nFel d2, rCan f3
- **Caséines** : nBos d8
- **Lipocalines** : rCan f1
- **11S Globulines** : rAra h3
- **7S Vicilin-like Globulines** : rAra h1
- **Chitinases de classe 1** : rHev b6.01
- **Thaumatococcus-like protéines**

Communauté entre allergènes

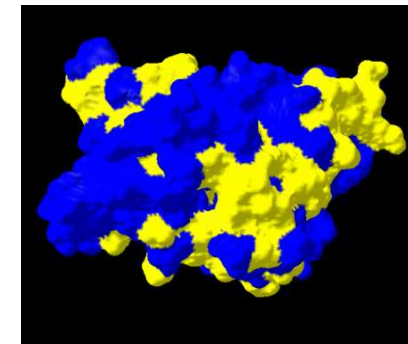
Identité/allergène	Bet v 1	Mal d 1	Gly m 4	Api g 1
% séquences	100	56	47	39
% surface	100	71	60	47



Bet v 1 vs. Mal d 1



Bet v 1 vs. Gly m 4



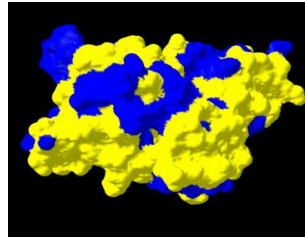
Bet v 1 vs. Api g 1

Degré de similarité des épitopes conformationnels

Exemples de réactions croisées entre espèces taxonomiquement éloignées :



Bet v 1



Mal d 1



- **pomme / bouleau** : allergie orale chez # 50% des allergiques au pollen de bouleau (*PR10* : Betv1-Mald1)
- **Graminées/latex** : Ac anti-latex chez patients souffrant de pollinose (profiline : Hevb8, Phlp12...)
- **Acariens/blattes/crustacés/escargot** : *tropomyosines*

Allergènes recombinants

=

outils pour améliorer le diagnostic

(Latex, Arachide)

Latex : Aide au diagnostic

Trois allergènes recombinants **rHev b6.01**, **rHev b5** et **rHev b8** apparaissent particulièrement intéressants :

- rHev b6.01 et rHev b5 pour confirmer le diagnostic d'allergie au latex dans la majorité des cas
- rHev b8 pour comprendre les réactions croisées (k82 faussement positif) chez certains patients polliniques.

Apport des allergènes recombinants en allergie alimentaire

- Etablissement de « profil de sensibilisation » expliquant des réactions croisées :
 - entre allergènes inhalés (pollens) et allergènes alimentaires.
 - entre allergènes alimentaires (Rosacées, fruits à coques, poissons, crustacés...)
- Aide objective à la prise de décision de la conduite à tenir (éviction totale, TPO pour essai de réintroduction...)

Familles moléculaires
et allergie alimentaire aux végétaux

- LTP (Lipid transfer proteins)
- PR-10 protéines (homologues de Bet v1)
- Profilines
- Protéines de stockage (cupines et prolamines)
- CCD (déterminants carbohydate)
- Oléosines

Apport des allergènes recombinants en allergie alimentaire

- Suivant la famille moléculaire impliquée :
Expression clinique de l'allergie différente :
syndrome oral
ou réaction systémique grave

↪ PR-10 : Allergènes sensibles:

↪ à la pepsine

↪ à la chaleur/cuisson :

- Symptômes uniquement si les aliments sont consommés crus
- Syndrome oral

↪ LTP : Allergènes résistants à la pepsine et à la cuisson : structure préservée dans le tractus digestif :

→ risque de réactions systémiques.

Apport des allergènes de l'arachide

- + **spécifiques** / f13 :
(résultats de Nancy)

	sensibilité	spécificité
f13	100 %	42,5 %
Ara h 1	78,7 %	95 %
Ara h 2	98,9 %	97,5 %
Ara h 3	66 %	92,5 %

Suspicion d'allergie à l'arachide

Tester **Arachide (f13)** + rAra h 2

Arachide : négatif
rAra h 2 : négatif

Faible risque
d'allergie à
l'arachide.

Arachide : positive
rAra h 2 : négatif

*Risque d'allergie à
l'arachide avec des
réactions sévères et/ou
locales. Rechercher les IgE
des allergènes :*

nsLTP (rPru p 3,
rAra h 1
rAra h 3
rAra h 8
CCD

Risque élevé
↑
Réactions sévères ?
Risque faible

Arachide : positive
rAra h 2 : positif

Risque élevé
d'allergie à
l'arachide avec
possibilité de
réactions
systémiques et
sévères

Allergènes recombinants
et
immunothérapie

Immuno thérapie spécifique / aide à l'indication



❶ Allergie IgE-médiée confirmée à la source allergénique

BOULEAU

❷ IgE spécifiques des allergènes recombinants

rBet v1

←····· Allergènes majeurs

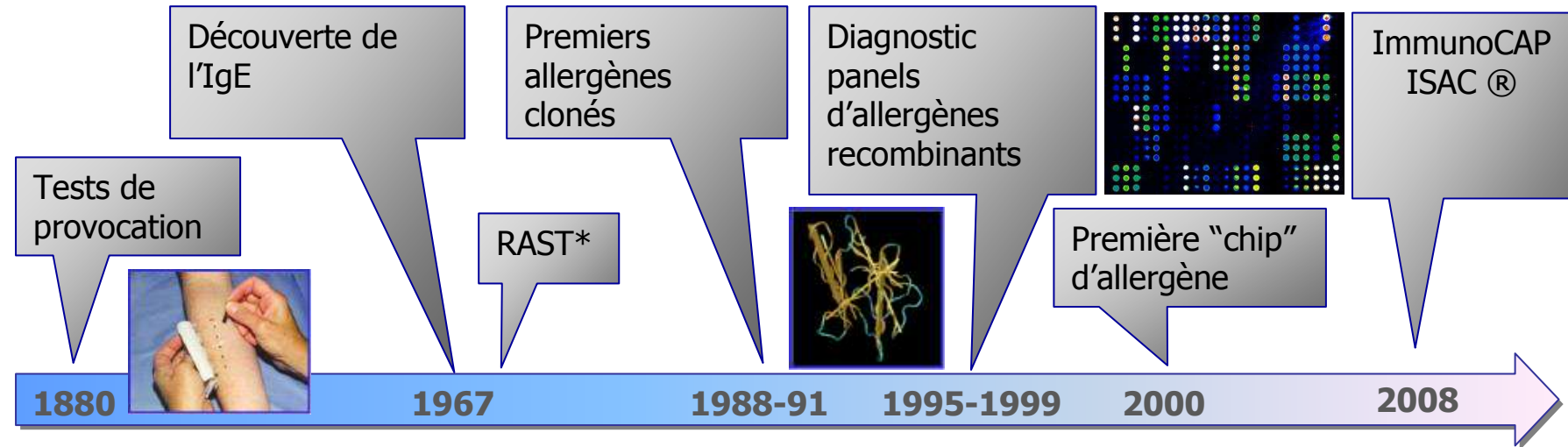
rBet v2 + rBet v4

←····· Allergènes mineurs

❸ Indication de l'immuno thérapie

Allergènes majeurs Bet v 1	Négatifs	Positifs	Positifs
Allergènes mineurs Bet v 2 + 4	Positifs / Négatifs	Positifs	Négatifs
	↓ Faible	↓ Moyenne	↓ Forte

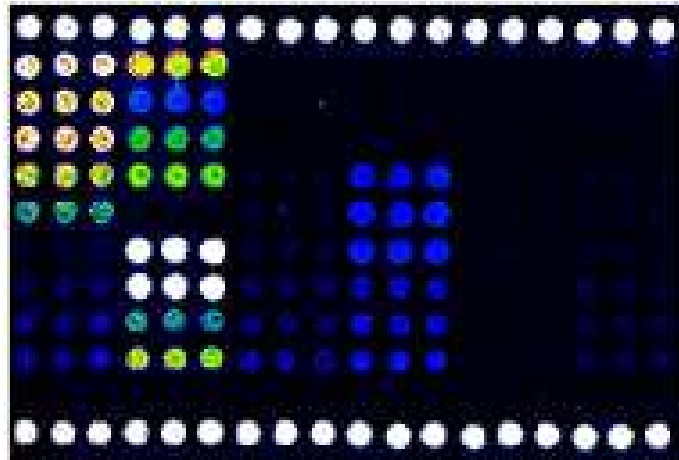
Diagnostic de l'Allergie



ImmunoCAP ISAC®

Immuno Solid-Phase Allergen Chip

103 allergènes sur une microchip

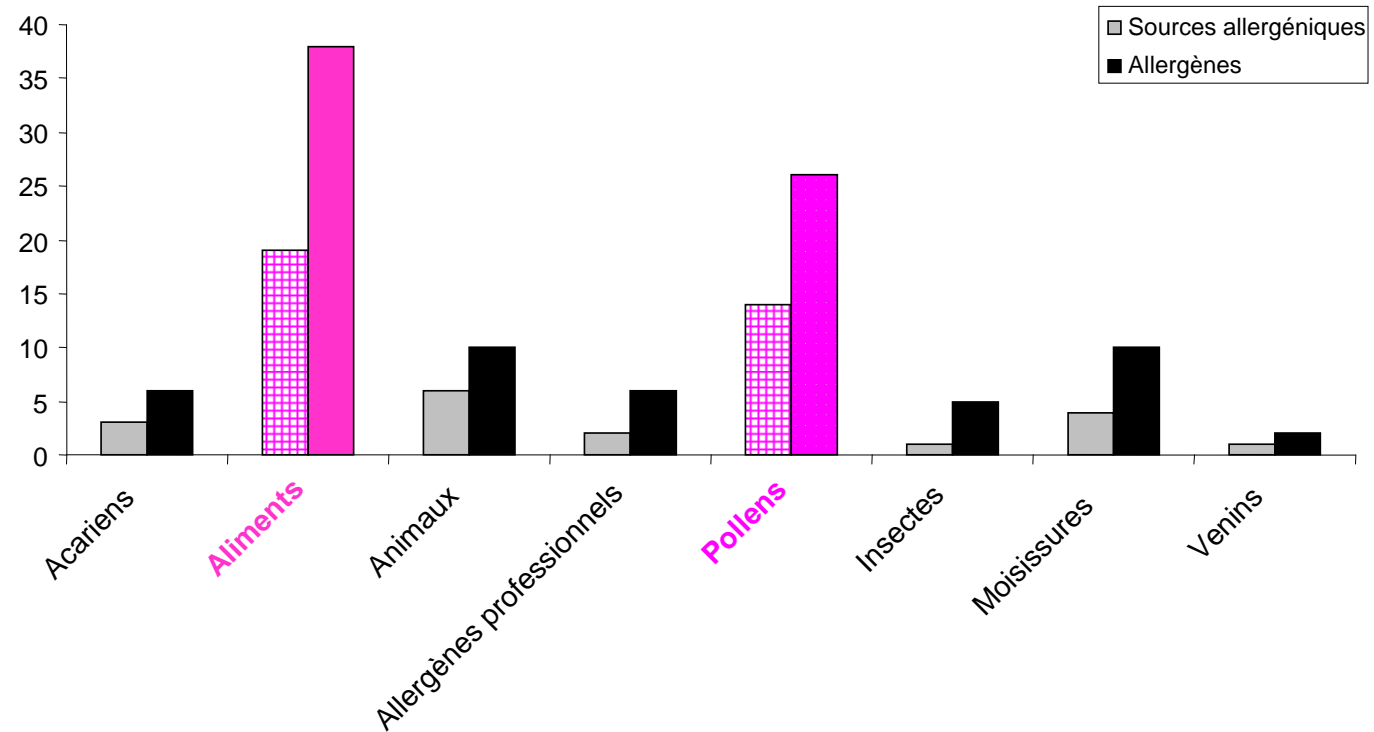


Qu'est-ce que la technologie Biochip ?

- La possibilité de fixer différentes biomolécules sur un format microscopique
- La possibilité d'obtenir simultanément un (très) grand nombre de résultats
- La possibilité d'exploration parallèles (ex: IgE / IgG)
- D'infimes quantités de sérum (**20 μ L**) et de réactifs

La puce actuellement commercialisée par Phadia comporte **103 allergènes recombinants ou purifiés** (/60 immunoCap)

103 allergènes représentant 49 sources allergéniques



Positionnement de ce test?

- Un outil *complémentaire* à la disposition des spécialistes :
 - Patients chez lesquels les tests traditionnels n'ont pas permis de poser un diagnostic
 - En particulier les patients *polysensibilisés*
- Un outil pour des études *épidémiologiques*
 - Profil de sensibilisation

Qualité des résultats = obligation pour le biologiste

- Technique maîtrisée : bien choisie, bien suivie, bien contrôlée
- Interprétation d'un résultat biologique : tenir compte de l'anamnèse et de la clinique
- Dialogue clinico-biologique pour la meilleure prise en charge du patient