

## Intérêt des allergènes recombinants dans le diagnostic de l'allergie alimentaire

### Improvement of the diagnosis of food allergy with recombinant allergens

M. Morisset<sup>a,\*</sup>, F. Codreanu<sup>a,b</sup>, C. Astier<sup>b</sup>, R. Olivier<sup>c</sup>, S. Jacquenet<sup>c</sup>,  
B. Bihain<sup>c</sup>, D.-A. Moneret-Vautrin<sup>a,b</sup>, G. Kanny<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Médecine interne, immunologie clinique et allergologie, hôpital Central, CHU Nancy, 54035 Nancy cedex, France

<sup>b</sup> EA3999 Allergic Diseases: Diagnosis and Therapeutics, MTM, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>c</sup> Genclis, 15, rue du Bois de la Champelle, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Disponible sur Internet le 14 mars 2008

#### Résumé

À ce jour, aucun test *in vitro* ni *in vivo* ne permet d'établir avec fiabilité le diagnostic d'allergie alimentaire (AA). La production d'allergène recombinant permet d'améliorer la standardisation des extraits allergéniques ou d'enrichir des extraits naturels et d'obtenir ainsi des tests de dépistage plus sensibles. Les progrès biotechnologiques facilitent la démarche diagnostique qui s'appuie désormais sur la définition des profils individuels de sensibilisation à des allergènes bien caractérisés sur le plan moléculaire. Le développement des tests diagnostiques utilisant des protéines recombinantes ou des peptides exprimant certains epitopes d'intérêt, pourrait améliorer le dépistage individuel d'allergies alimentaires sévères et/ou persistantes, afin de guider les mesures thérapeutiques qui en découlent.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

To date, neither *in vitro* nor *in vivo* tests can establish with reliability the diagnosis of food allergy. The availability of recombinant allergens (RA) has led to improvement in the standardization of allergenic extracts and enrichment of natural extracts, resulting in more sensitive screening tests. These biotechnological advances facilitate the diagnostic approach which now rests on an individual reaction profile (component resolved diagnosis) with well-characterized allergens classified on a molecular basis. Development of diagnostic tests using RA or peptides expressing some distinctive epitopes of interest may improve the prediction of severe and/or persistent food allergies and guide the choice of the therapeutic measures that follow.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés* : Allergie alimentaire ; Allergènes alimentaires ; Allergènes recombinants

*Keywords*: Food allergy; Food allergens; Recombinant allergens

#### 1. Introduction

Le diagnostic d'allergie alimentaire (AA) repose classiquement sur un ensemble d'éléments comprenant en premier lieu diverses manifestations cliniques déclenchées par l'absorption d'aliment et disparaissant après éviction. Lors-

qu'il s'agit d'une AA IgE-dépendante, le mécanisme est objectivé par des *prick-tests* (PT) positifs avec l'extrait alimentaire ainsi que par la présence d'IgE sériques se fixant aux protéines contenues dans cet extrait. La mise en évidence d'une sensibilisation *in vitro* ou *in vivo* n'est pas suffisante pour affirmer le diagnostic. La sensibilité ou spécificité des tests peut s'avérer médiocre, avec des faux négatifs ou des diagnostics par excès [1]. Seul le test de provocation orale (TPO) en double insu versus placebo permet de valider le diagnostic d'AA [2].

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [m.morisset@chu-nancy.fr](mailto:m.morisset@chu-nancy.fr) (M. Morisset).

La qualité des extraits naturels est parfois médiocre et c'est la raison pour laquelle la pratique de PT avec des aliments natifs est recommandée. En effet, les protéines peuvent s'altérer au cours des étapes de purification ou de stockage, notamment celles des fruits et légumes [3] ou les procédés d'extraction habituels sont inopérants, comme cela a été montré pour certaines anaphylaxies au sésame [4]. À l'inverse, en particulier chez les polliniques, on observe des sensibilisations à divers fruits et légumes sans que le patient ne présente pour autant de symptômes lors de leur ingestion. Cela peut être dû à une dénaturation des protéines alimentaires par la cuisson [5] ou la digestion [6] ou à une tolérance orale naturelle à l'aliment.

La pratique des TPO est une procédure lourde, nécessitant une hospitalisation car elle n'est pas dénuée de risques [2]. Divers auteurs ont tenté d'« affûter » les outils de prédiction de l'AA en analysant le diamètre des PT avec l'extrait alimentaire ou la valeur des IgE spécifiques. Des valeurs prédictives positives (VPP) ou négatives (VPN) d'AA avec des intervalles de confiance satisfaisants ont été publiées pour arachide, œuf, lait et poisson [7]. Les seuils varient selon l'âge et les manifestations dominantes dans la population sélectionnée au départ pour les déterminer. Atteints et étudiés pour un nombre limité d'aliments, ils peuvent également varier selon l'extrait commercial utilisé. Enfin, lorsque que les valeurs, pour un aliment et un sujet donnés, sont dans l'intervalle compris entre VPP et VPN, le problème diagnostique reste posé.

L'amélioration des connaissances a montré qu'au sein d'un même aliment, diverses protéines peuvent être impliquées, leur allergénicité et la gravité des manifestations associées [8], étant souvent liée à leurs propriétés physicochimiques. La sévérité de l'allergie à la noisette (*Corylus avellana*) par exemple, est liée à la nature des protéines auquel le sujet est sensibilisé. Lorsque le sujet est sensibilisé à une profiline (*Cor a 2*) ou une protéine de type PR-10 (*Bet v 1 like*) (*Cor a 1*) [9], la réaction clinique est souvent mineure. Le patient, en général un sujet pollinique, ne présente généralement qu'un syndrome oral et ces manifestations sont rarement observées après absorption de noisettes grillées [10]. Les réactions après ingestion de noisette crues ou grillées sont en revanche potentiellement plus graves lorsqu'un sujet est sensibilisé à une albumine 2S, une globuline 11S (*Cor a 9*), une 7S *vicilin-like protéine* (*Cor a 11*) ou une protéine de transfert lipidique (*Cor a 8*) [11].

Le concept de panallergènes (profilines, tropomyosines, albumines animales etc. . .) a permis de mieux comprendre le phénomène des allergies croisées, dépassant le cadre trop restreint des classifications botaniques et zoologiques. Les structures tridimensionnelles et séquences constitutives en acides aminés des profilines présentes dans les pollens et de nombreux fruits et légumes, ont été conservées au cours de l'évolution des espèces. Ainsi, en présence d'IgE spécifiques de *r Bet v 2*, marqueur global de sensibilisation, la prescription d'autres dosages d'IgE pour des profilines est inutile.

Le diagnostic d'AA passe désormais par un raisonnement au niveau moléculaire basé sur une définition précise pour chaque individu de son profil de sensibilisation protéique pour mieux prédire la sévérité de l'AA, les risques de réactions croisées et moduler les conseils d'éviction alimentaire (consommation

sous forme crue ou cuite). Des procédés faiblement consommateurs en sérum permettant l'évaluation concomitante de l'IgE réactivité des patients vis-à-vis de plusieurs dizaines de protéines recombinantes (PR) et/ou naturelles purifiées, sont en cours de développement (méthode *chip* ou *microarray*) [12–13]. À terme, ces procédés guideront des immunothérapies avec un mélange de protéines non redondantes, éventuellement modifiées, adapté au profil individuel de sensibilisation IgE et lymphocyte T dépendante.

La mise en place de cette cartographie passe soit par une purification des protéines naturelles, soit par la production de PR de plus en plus accessibles, grâce aux progrès biotechnologiques.

## 2. Intérêt des protéines recombinantes

### 2.1. Standardisation des extraits

Le premier avantage des PR par rapport à un extrait naturel non purifié est l'obtention d'un extrait allergénique à teneur quantifiable et stable [14]. Différentes PR peuvent être mélangées afin d'approcher la composition d'un extrait naturel mais dont les différentes protéines constitutives sont à teneur et proportion fixes, non soumises aux variations d'ordre génétique ou environnementale (climat, saison, pollution, hormones, . . .). La sensibilité de l'ImmunoCAP<sup>®</sup> (ImmunoCAP<sup>®</sup> Phadiatop) composé de trois PR : *r Pru av 1*, *r Pru av 3* et *r Pru av 4* est ainsi supérieure à celle de l'extrait naturel pour le diagnostic de l'allergie à la cerise [15].

### 2.2. Stabilité immunochimique

Les PR ont des propriétés immunochimiques stables et leur immunoréactivité objectivée par tests d'activation cellulaire, peut être équivalente à celle d'allergènes naturels [16]. Wallowitz et al. [17], ont étudié l'activation passive des basophiles de donneurs atopiques sains (TABm) par la globuline 11 S recombinante du sésame, *rSes i 6*, et de la noix *rJug r 4*, en présence de sérum de patients allergiques à la noix ou au sésame ou aux deux. Le TABm avec expression du CD63 et 203c, permettrait de faire la distinction pour la noix et le sésame, entre sensibilisation croisée et réactivité croisée cliniquement relevante [17].

### 2.3. PR et Ac anticarbohydriques.

Un des intérêts des PR par rapport aux protéines naturelles purifiées, repose sur le fait que la synthèse de protéines par des bactéries transfectées (*E. coli*) permet d'obtenir des PR non glycosylées et de s'affranchir de réactivités croisées in vitro, non cliniquement « relevantes », liées aux IgE anti-CDD [18]. Cependant, dans certains cas, l'absence de glycosylation des PR pourrait réduire leur immunoréactivité et la sensibilité du test par rapport aux extraits naturels. Ainsi la production sur levures (*Pichia pastoris*.) ou par le système baculovirus/cellules d'insectes pourrait être plus performante, pour certains allergènes alimentaires.

#### 2.4. Production des protéines à l'échelle industrielle

Les progrès biotechnologiques permettent désormais de produire des protéines à l'échelle industrielle. Le couplage des PR à des méthodes immuno-enzymatiques validées a permis de commercialiser des kits de détection d'IgE sériques vis-à-vis de diverses PR alimentaires (ImmunoCAP<sup>®</sup> Phadiatop) :

- l'oméga 5 gliadine (r *Tri a 19*) ;
- l'albumine 2S de la noix du Brésil (r *Ber e 1*) [13] ;
- r *Gly m 4*, protéine PR-10, *Bet v 1 like*, impliquée dans certaines anaphylaxies au soja [19] ;
- *Ara h 1, 2, 3*, allergènes majeurs de l'arachide et *Ara h 8*, protéine *Bet v 1 like* [20] ;
- divers allergènes de la pêche: r *Pru p 1*, protéine *Bet v 1 like*, r *Pru p 3*, LTP thermorésistante [21] et r *Pru p 4*, une profiline ;
- la parvalbumine de carpe r *Cyp c 1* [16] et la tropomyosine de crevette r *Pen a 1* [22].

Dans d'autres kits de mesure des IgE spécifiques, une certaine quantité de PR est ajoutée à l'extrait naturel, pour améliorer la sensibilité du test. L'ImmunoCAP<sup>®</sup> de Phadia pour la détection d'IgE à la noisette est ainsi « spiké » avec r *Cor a 1.04* [23].

#### 2.5. Application au diagnostic par protéines microarrays

La comparaison de la réactivité cutanée et in vitro vis-à-vis des allergènes recombinants majeurs de l'arachide a montré que r *Ara h 2* est corrélé avec la sévérité de l'allergie à l'arachide [14]. La synthèse de peptides recombinants avec expression des epitopes majeurs de l'allergène étudié, pourrait contribuer à l'amélioration du diagnostic d'AA ou bien à une meilleure prédiction d'AA sévère ou persistante. En effet, certains epitopes de caséine par ex., sont corrélés avec une AA au lait persistante [24]. Alonzi et al ont récemment étudié en microarray, la fixation des IgE et IgG4 sur les epitopes de caséine, au cours de la désensibilisation orale au lait de vache [25]. Chez les sujets répondant à l'immunothérapie, on observe une réduction de la fixation des IgE sur l'épitope AA 171-180 préalablement décrit par Jarvinen et al. [24].

#### 2.6. Perspectives thérapeutiques

Sur le plan thérapeutique, Swoboda et al., [26] ont récemment produit après mutation dirigée, une parvalbumine recombinante de carpe modifiée. Cette protéine dont on a réduit le potentiel d'activation des basophiles a toutefois gardé son immunogénicité [26]. La production de PR par des bactéries probiotiques, comme cela a été récemment publié pour r *Ara h 2* [27], ouvre également de nouvelles voies thérapeutiques.

### 3. Conclusions

Le développement des biotechnologies a permis une amélioration considérable de la compréhension et du diagnostic de l'allergie alimentaire IgE dépendante. Elles ouvrent aussi de

nouvelles voies thérapeutiques. Il faut espérer que ces développements puissent un jour permettre également de mieux comprendre et diagnostiquer les allergies alimentaires répondant à d'autres mécanismes mais pour lesquelles les protéines alimentaires ont également un rôle central.

### Références

- [1] Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(4):444–51.
- [2] Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Beaudouin E, Morisset M. Méthodologie des tests de provocation orale standardisés à double insu pour le diagnostic de l'allergie alimentaire. *Revue de la littérature et expérience du service de médecine interne, immunologie clinique et allergologie de Nancy. Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000;40(2):237–50.
- [3] Ferrer A, Carnés J, Gallego MT, Andréu C, Fernández-Caldas E. Characterization and improvement of apple extracts for the diagnosis of apple IgE-mediated allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;95(5):462–7.
- [4] Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JTC, Morisset M, Guerin L, Kanny G. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy* 2006;61:349–56.
- [5] Davis PJ, Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 1998;53:102–5.
- [6] Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996;14:1269–73.
- [7] Niggemann B, Rolinck-Werninghaus C, Mehl A, Binder C, Ziegert M, Beyer K. Controlled oral food challenges in children - when indicated, when superfluous? *Allergy* 2005;60(7):865–70.
- [8] Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, et al. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report. *Food Chem Toxicol* 2007;45(7):1116–22.
- [9] Lüttkopf D, Müller U, Skov PS, Ballmer-Weber BK, Wüthrich B, Skamstrup Hansen K, et al. Comparison of four variants of a major allergen in hazelnut (*Corylus avellana*) Cor a 1.04 with the major hazelnut pollen allergen Cor a 1.01. *Mol Immunol* 2002;38(7):515–25.
- [10] Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Lüttkopf D, Skov PS, Wüthrich B, Bindslev-Jensen C, et al. Roasted hazelnut—allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy* 2003;58(2):132–8.
- [11] Schocker F, Lüttkopf D, Scheurer S, Petersen A, Cisteró-Bahima A, Enrique E, et al. Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(1):141–7.
- [12] Shreffler WG, Lencer DA, Bardina L, Sampson HA. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(4):893–9.
- [13] Alcocer MJ, Murtagh GJ, Wilson PB, Progiás P, Lin J, Archer DB. The major human structural IgE epitope of the Brazil nut allergen Ber e 1: a chimaeric and protein microarray approach. *J Mol Biol* 2004;343(3):759–69.
- [14] Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, et al. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(1):250–6.
- [15] Reuter A, Lidholm J, Ostling J, Scheurer S, Enrique E, Cisteró-Bahima A, et al. A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy* 2006;36:815–23.
- [16] Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, Valent P, et al. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol* 2002;168(9):4576–84.
- [17] Wallowitz ML, Chen RJ, Tzen JT, Teuber SS. Ses i 6, the sesame 11S globulin, can activate basophils and shows cross-reactivity with walnut in vitro. *Clin Exp Allergy* 2007;37(6):929–38.
- [18] Malandain H. IgE-reactive carbohydrate epitopes—classification, cross-reactivity, and clinical impact. *Allerg Immunol* 2005;37(4):122–8.

- [19] Mittag D, Vieths S, Vogel L, Becker WM, Rihs HP, Helbling A, et al. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(1):148–54.
- [20] Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Becker WM, et al. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(6):1410–7.
- [21] Díaz-Perales A, Sanz ML, García-Casado G, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Lombardero M, et al. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(3):628–33.
- [22] Reese G, Schick Tanz S, Lauer I, Randow S, Lüttkopf D, Vogel L, et al. Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Clin Exp Allergy* 2006;36(4):517–24.
- [23] Andersson K, Ballmer-Weber BK, Cistero-Bahima A, Ostling J, Lauer I, Vieths S, et al. Enhancement of hazelnut extract for IgE testing by recombinant allergen spiking. *Allergy* 2007;62(8):897–904.
- [24] Järvinen K-M, Beyer K, Vila L, Chatchatee P, Busse PJ, Sampson HA. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:293–7.
- [25] Alonzi C, Shreffler W, Pollastrini E, Pecora V, Li J, Bardina L, et al. Evaluation of peptide microarray immunoassay of IgE and IgG4 epitopes during specific desensitisation to milk. *Allergy* 2007;62(Suppl. 83). p 56, Abs 137.
- [26] Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, et al. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *J Immunol* 2007;178(10):6290–6.
- [27] Glenting J, Poulsen LK, Kato K, Madsen SM, Frøkiær H, Wendt C, et al. Production of Recombinant Peanut Allergen Ara h 2 using *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact* 2007;6(1):28.