

Intérêts des allergènes recombinants dans le diagnostic et le traitement des allergies respiratoires et alimentaires

Séminaire de formation continue
10. 02. 05, CHUV

François Spertini
Division of Allergy and Immunology
CHUV, Lausanne

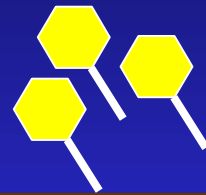
Production des allergènes recombinants



Source allergénique

préparation du mRNA

synthèse du cDNA

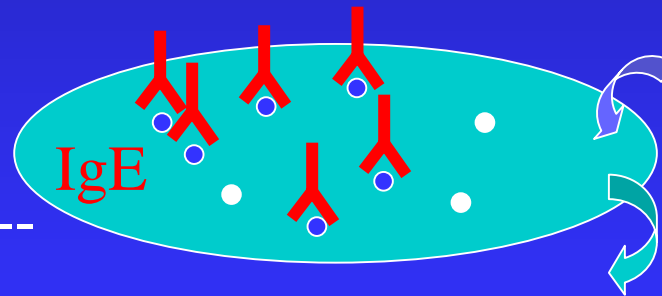


Librairies de phages



Infection d'E. Coli

Incubation avec sérum



IgE

Isolation du DNA
— phagique

Clonage dans un vecteur



Séquençage

Expression



--TACAATGATTCAGGT---

Caractérisation des extraits d'allergènes

- Identification
- Purification
- Isolation des allergènes sous forme recombinante

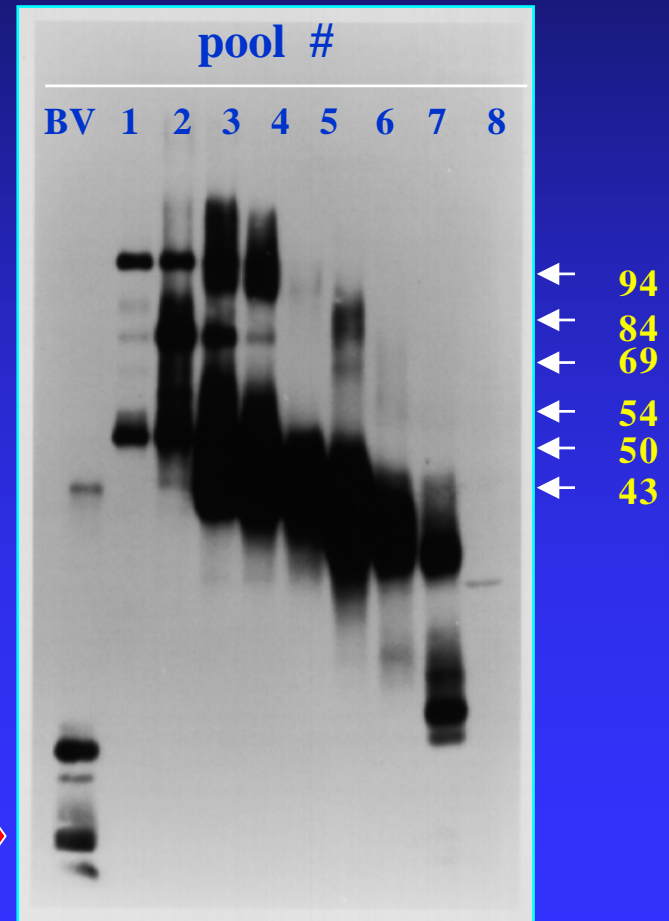
➔ Meilleure caractérisation des mélanges complexes d'allergènes

Hyaluronidase ➔

PLA2 ➔

Mellitine ➔

*Kettner et al., Clin
Exp Allergy,*

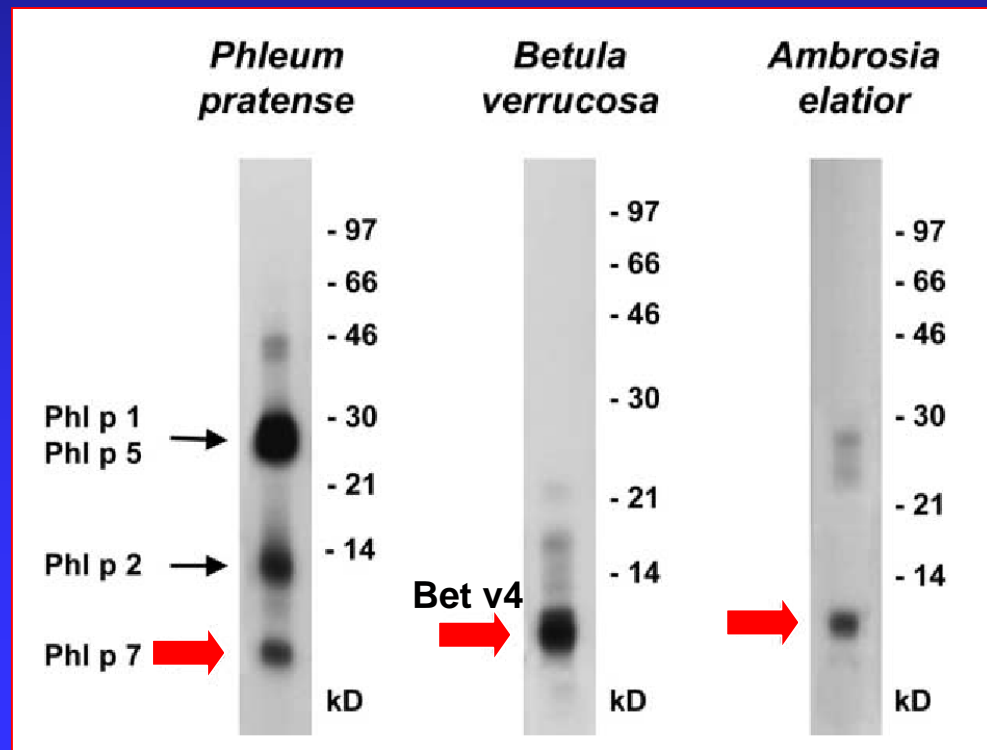


Caractérisation des extraits d'allergènes

- Identification des allergènes majeurs et mineurs

Kazemi-Shirazi, Int Arch Allergy Immunol, 2002;127:259-268

Ca²⁺ binding proteins

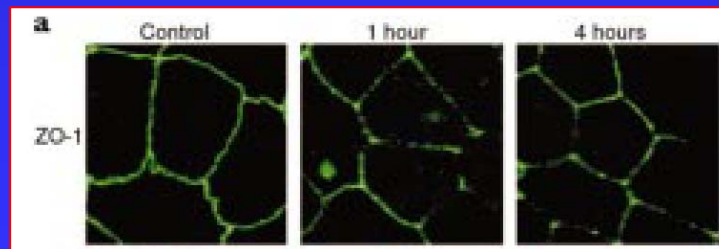


Allergènes recombinants polliniques

Source	Nom	Fonction	Poids mol. (kD)	Fréq. liaison IgE	
Phleum pratense	Phl p1	expansine	27	96	
	Phl p2	inconnu	10,0	60	
	Phl p4	inconnu	55	56	
	Phl p5	ribonucléase	32-38	80	
	Phl p6	P-particle associated	13	75	
	Phl p7	Ca-binding	6-8,6	10	
	Phl p12	profiline	14	20	
	Phl p13	polygalacturonase	55-60	50	
Betula	Bet v1	IPR prot	17	90-95	
	Bet v2	profiline	14,1	20	
	Bet v4	Ca ²⁺ binding	6-8,6	10	
	Bet v5	isoflavone réductase	33	30	
	Bet v6	inconnu	30-35	?	
	Bet v8	pectinestérase	55	?	

Identification des allergènes recombinants

- ◆ Caractérisation structure/ fonction
 - ◆ activité enzymatique (protéase Der p1, PLA2)
 - ◆ Der p1
 - Allergène majeur de l'acariens *D. pter*
 - rôle dans la production d'IgE¹
 - ↑ production de sCD23
 - ◆ rôle proinflammatoire/ dénature les cellules épithéliales

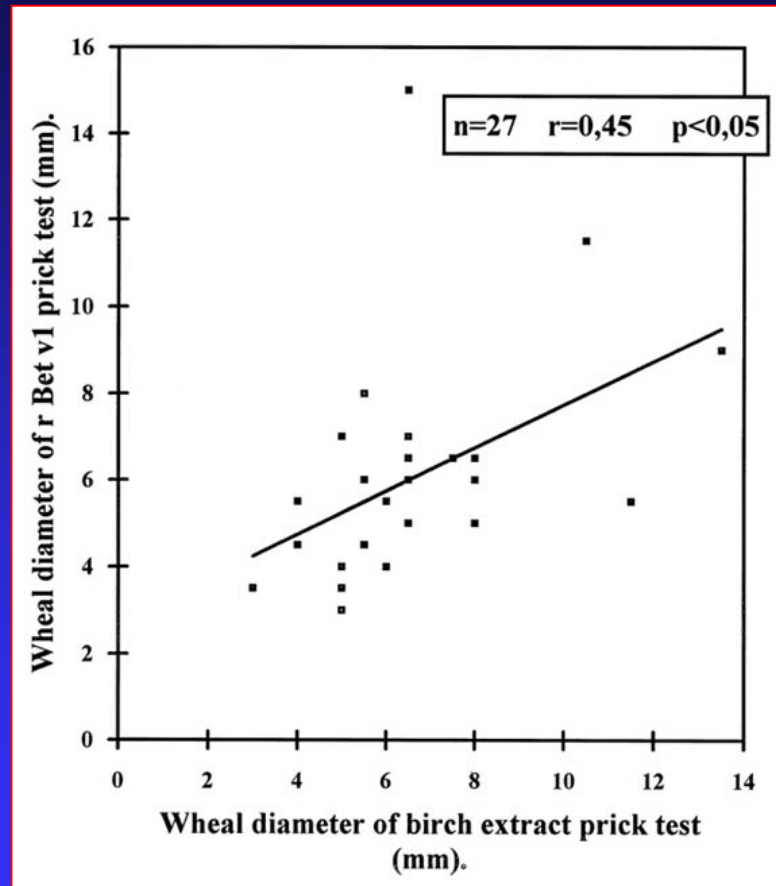


¹Pene J. et al., *EJI*, 1988, 18:929; ²Wan H et al., *J. Clin Invest.* 104:123–133 (1999)

Intérêts des allergènes recombinants

- Applications
 - ◆ diagnostiques
 - ◆ thérapeutiques

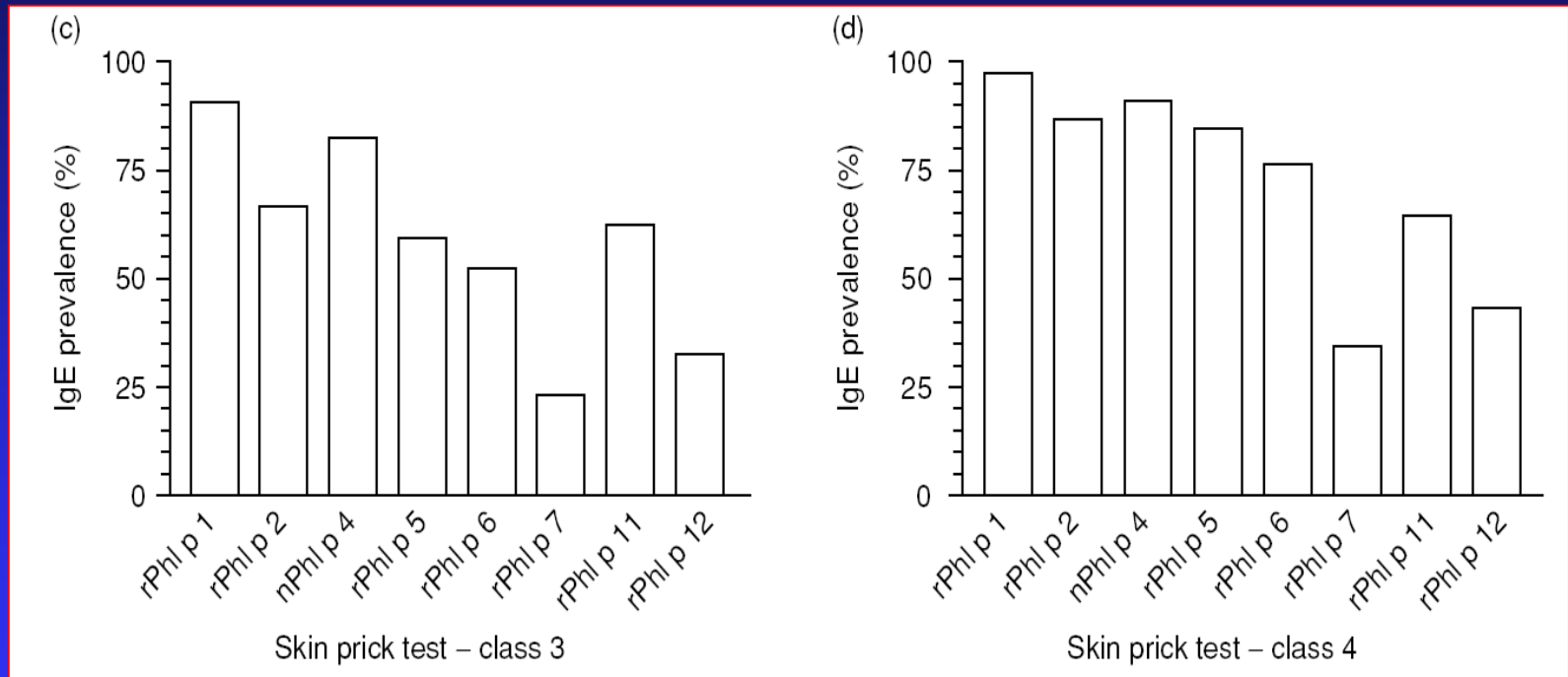
Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2 : Diagnostic value for birch pollen and associated allergies *Pauli et al., JACI, 1996;97:1100-9*



- Correlation of wheal diameters obtained by prick tests with birch extract (Stallergene, 100 IR) and prick tests with rBet v 1 (3 µg/ml) in 27 patients.

Corrélation IgE spécifiques – tests cutanés

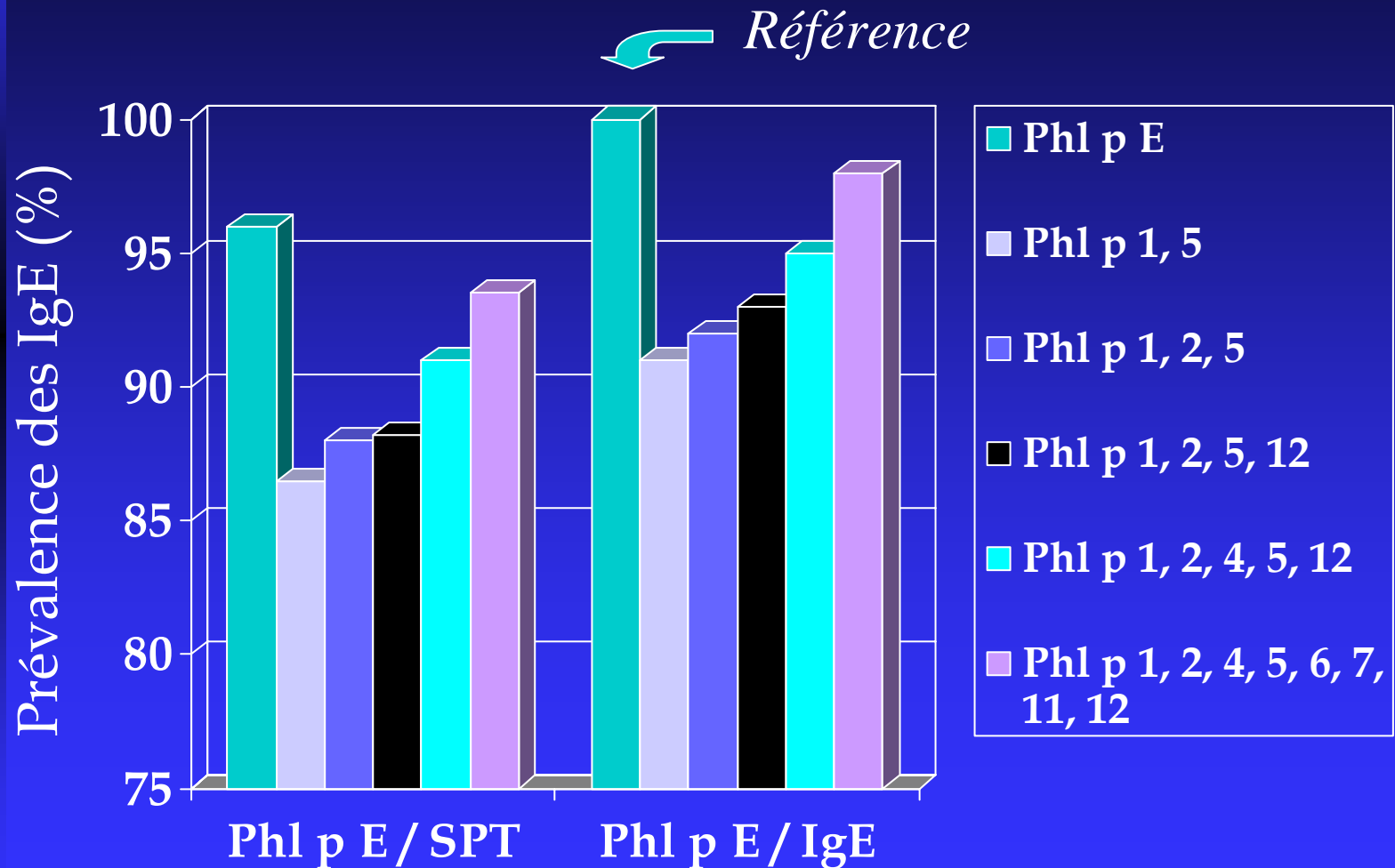
Mari A., CEA 2003;33, 43



- Corrélation tests cutanés en prick par l'extrait total et prévalence des IgE spécifiques anti-recombinants de *Phleum pratense*

Corrélation IgE spécifiques – tests cutanés

Mari A., CEA 2003;33, 43

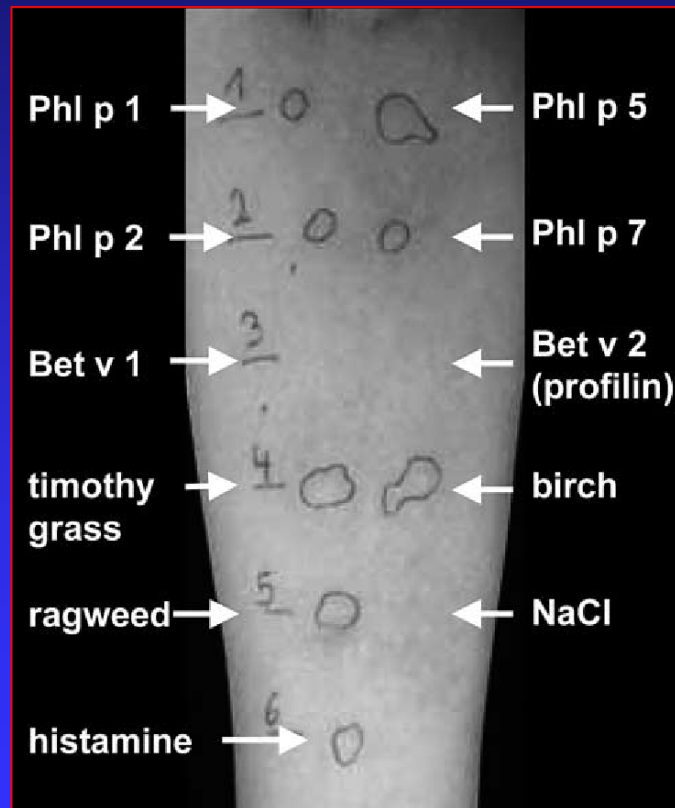


Diagnostic de l'aéroallergie

- Component-resolved diagnosis
 - ◆ Remplacement de l'extrait pollinique total par ses composants majeurs (et mineurs), mais sous forme recombinante
 - ◆ Standardisation aisée
 - ◆ Stabilité contrôlable
 - ◆ Interactions interprotéiques contrôlables
 - ◆ Miniaturisation sous forme de microarrays

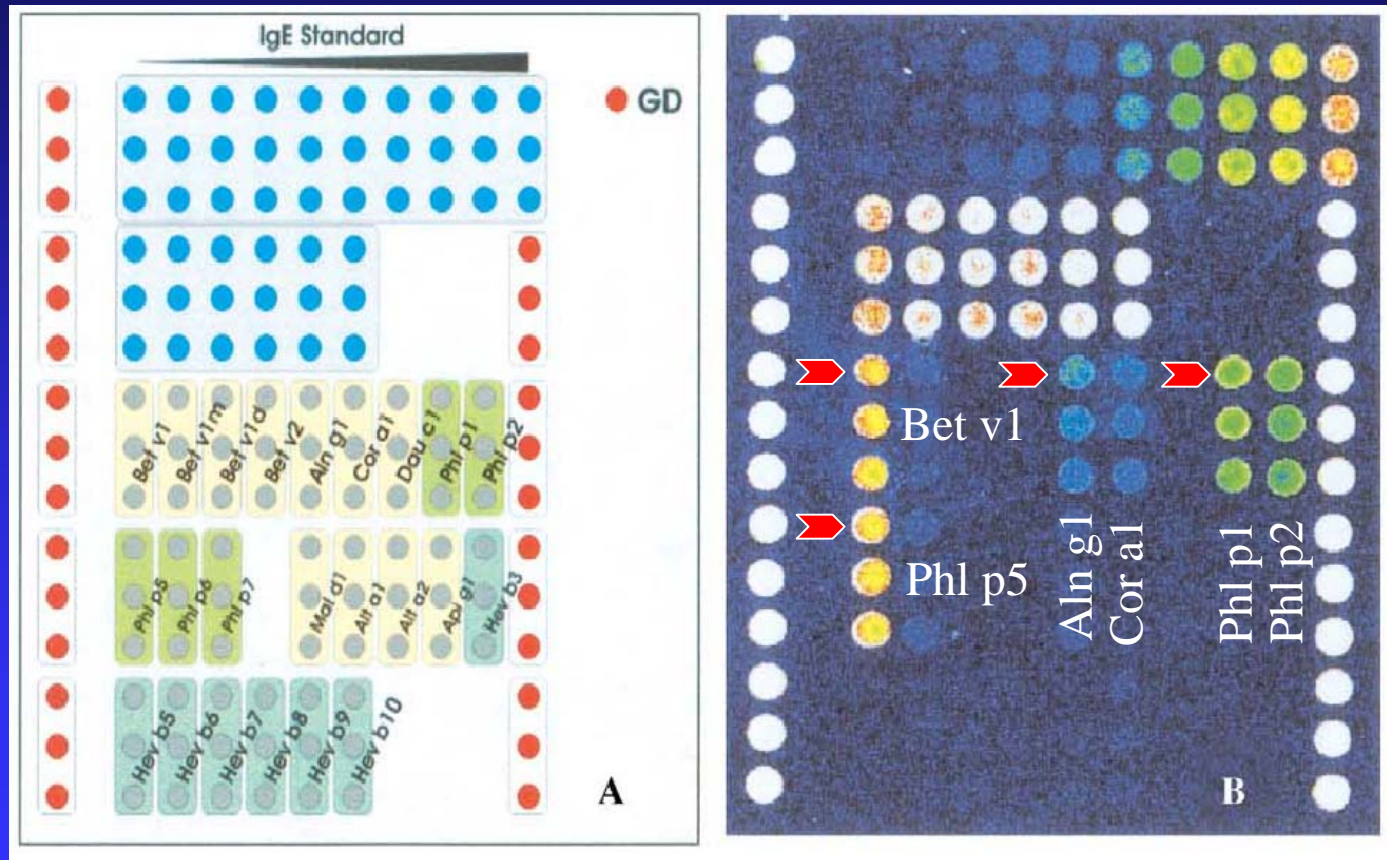
Allergènes recombinants en tests cutanés

Kazemi-Shirazia, Int Arch Allergy Immunol, 2002; 127: 259–268



- Patient cliniquement allergiques aux graminées
- Extraits classiques
 - ◆ Pos. Gram., Bouleau, Ambroisie
- Recombinants
 - ◆ Bet v1 et v2 nég.
- Conclusion
 - ◆ Allergie au graminées
 - ◆ Faux pos. des extraits graminées et ambroisie
 - ◆ Réactivité croisée (Phl p7, Bet v4, Amb a)

Microarrayed recombinant allergens

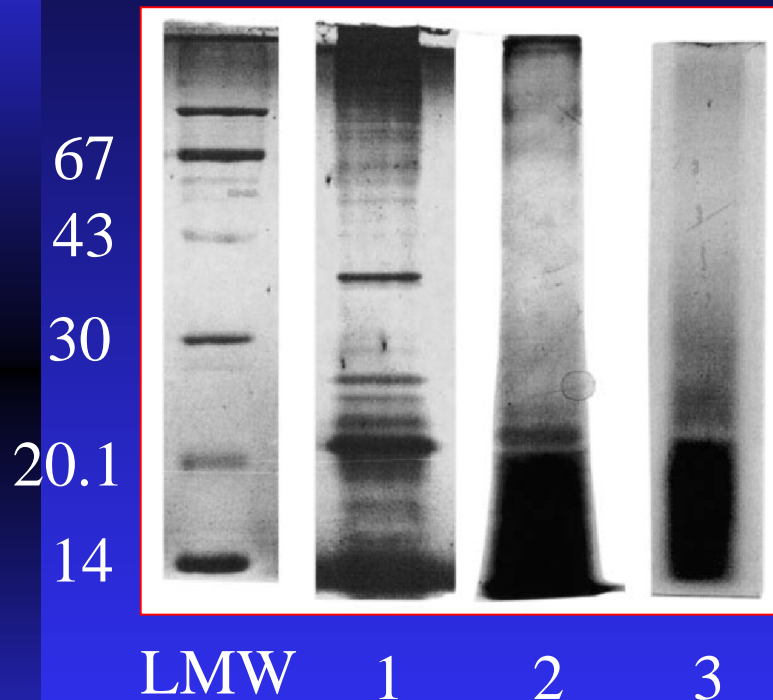


Diagnostic de l'allergie alimentaire

- VPP de l'allergie alimentaire avec les extraits standard est très médiocre
 - ◆ Dégradation très rapide
- Prick-pricks avec l'aliment frais nettement plus performant
 - ◆ Standardisation impossible

Diagnostic de l'allergie alimentaire

Cerise



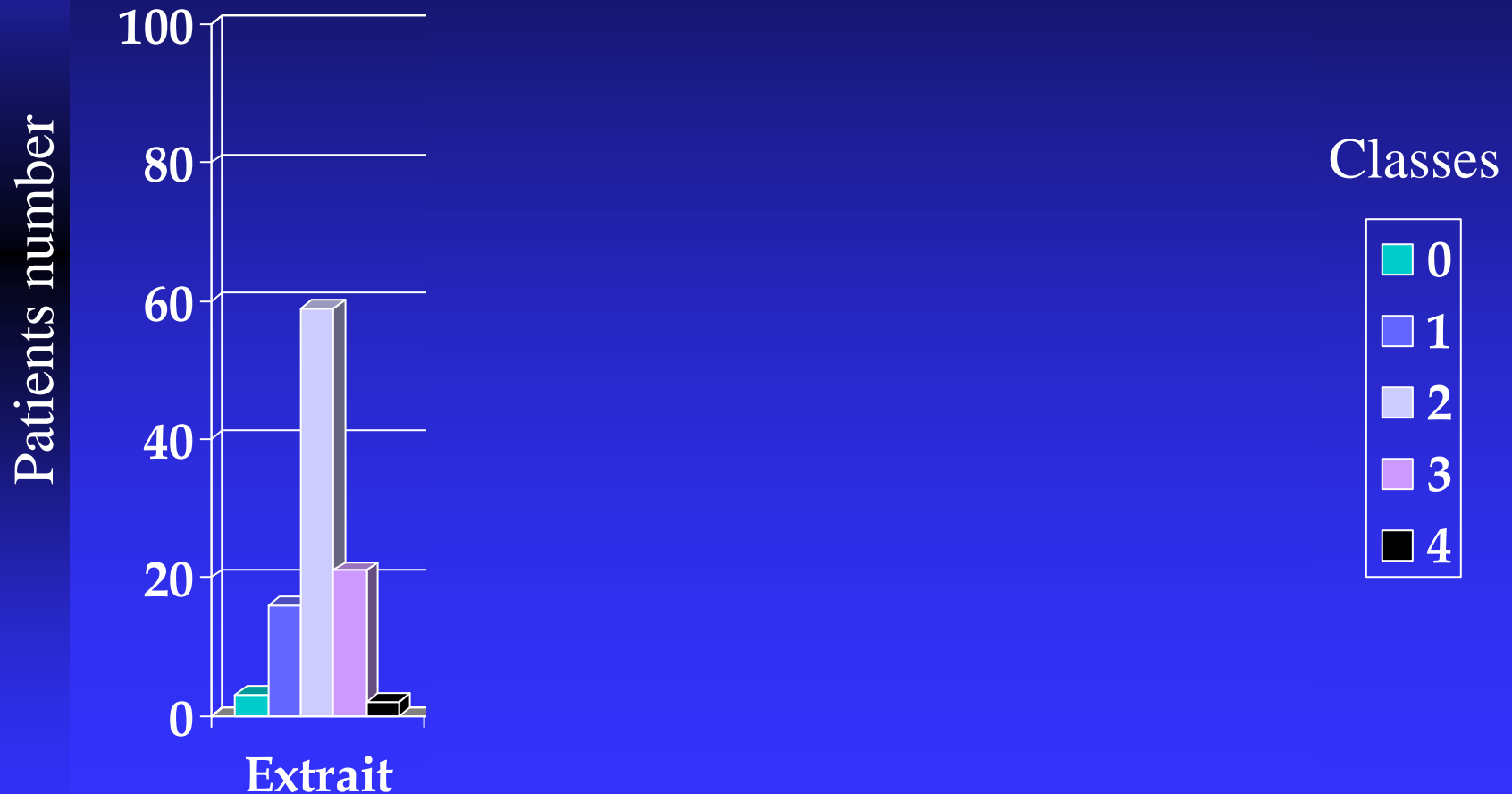
Pru av1 (18kD) Bet v1 homologue
Pru av3 (9kD) Lipid transfer prot
Pru av4 (14kD) Profiline

*S. Vieths, et al.,
Allergy, 2001, 56
Suppl 67, 78*

1. Low temperature acetone powder method (méth. optimisée)
2. Extrait de pelure
3. Extrait commercial

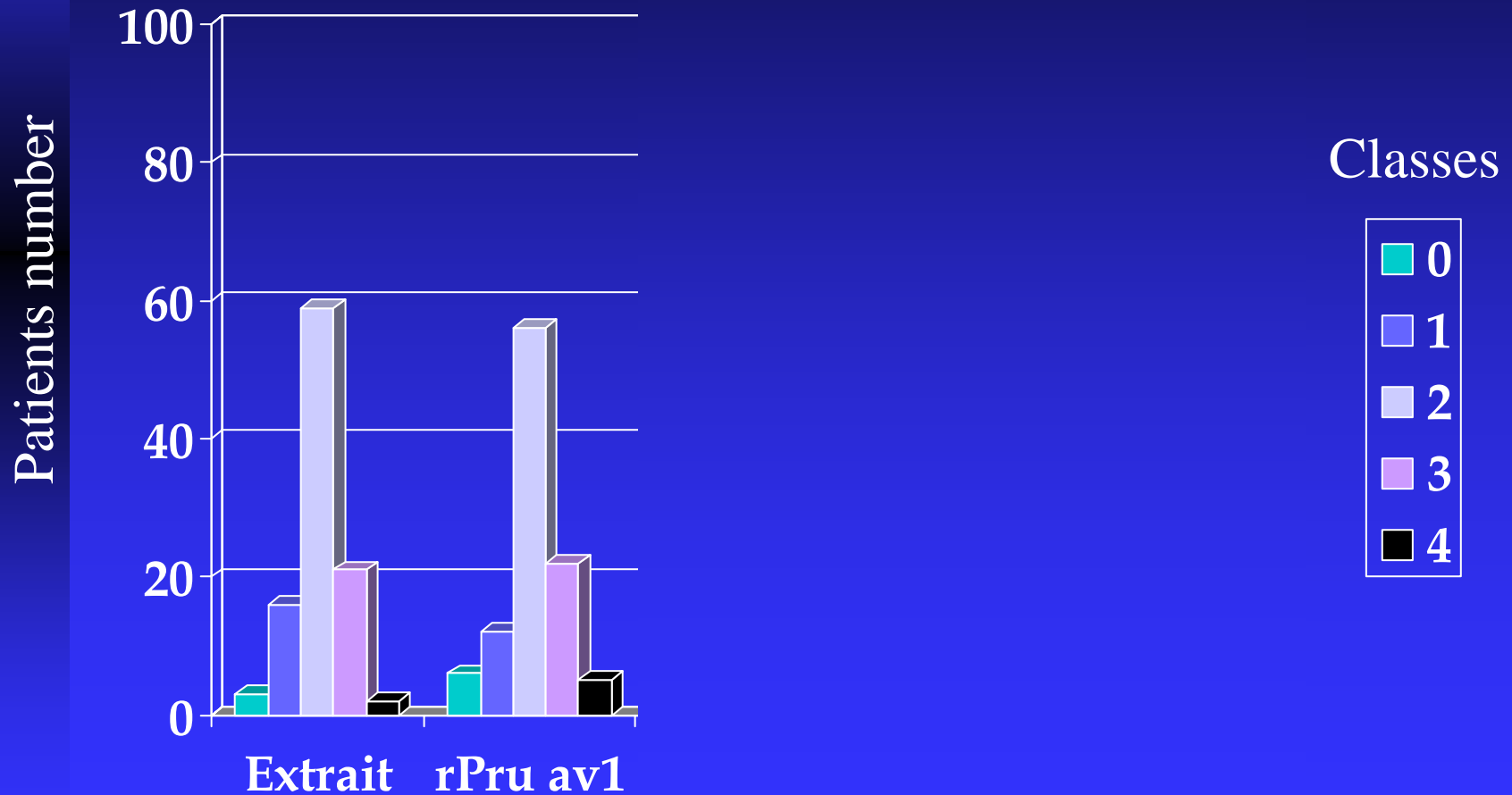
Serological data of 101 patients with pollen-related allergy to cherry

S. Vieths, et al., Allergy, 2001, 56 Suppl 67, 78



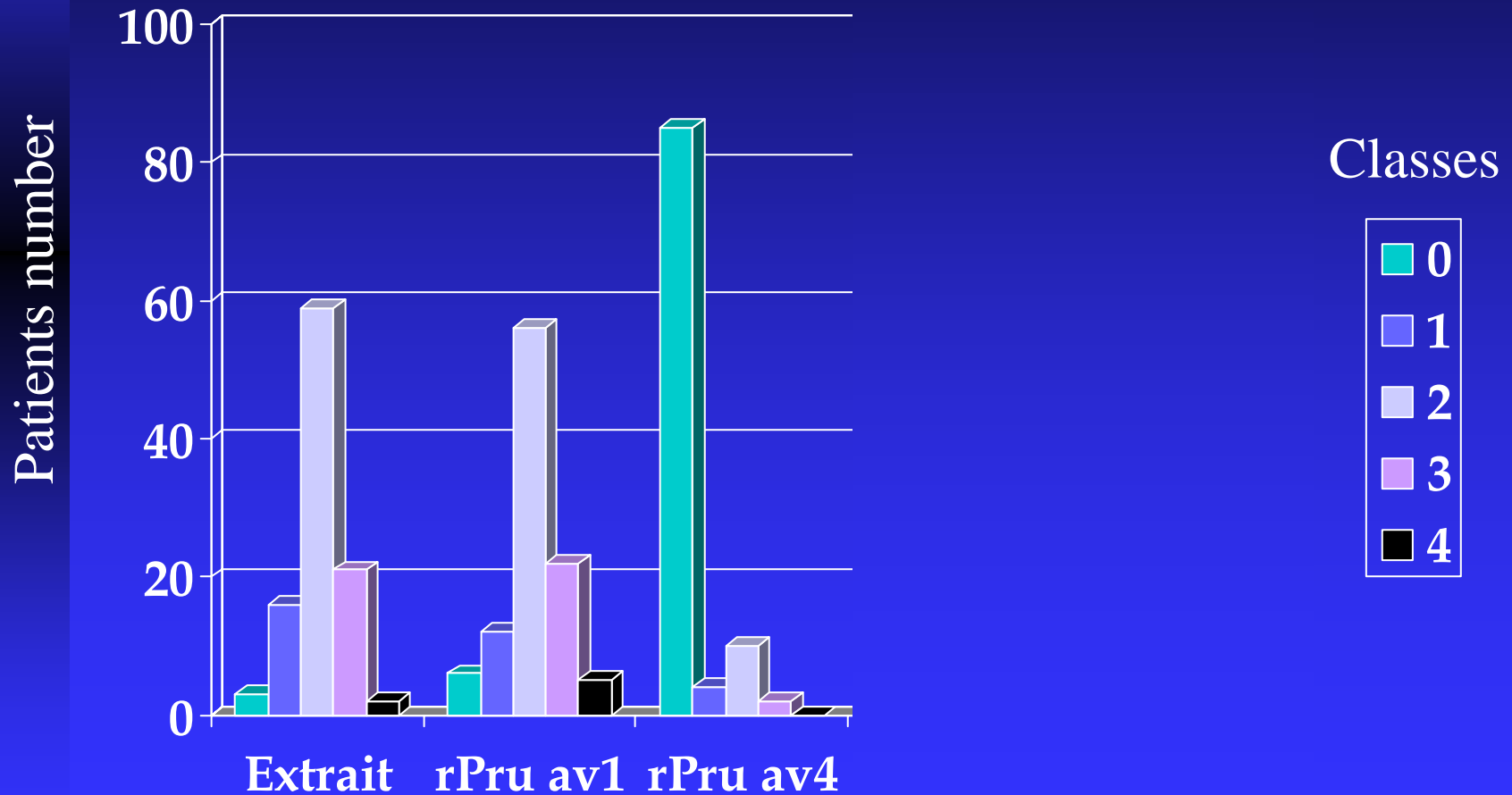
Serological data of 101 patients with pollen-related allergy to cherry

S. Vieths, et al., Allergy, 2001, 56 Suppl 67, 78



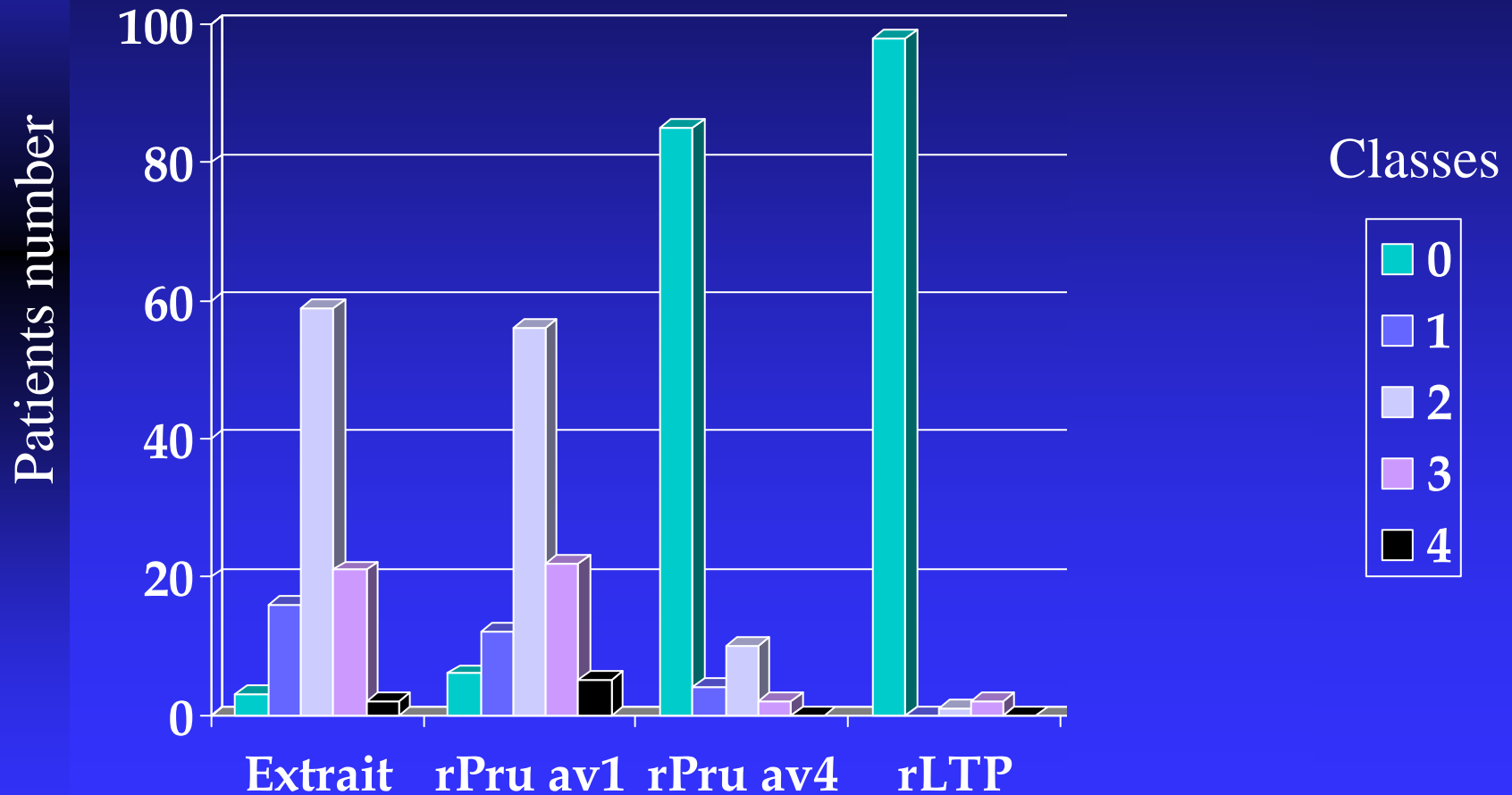
Serological data of 101 patients with pollen-related allergy to cherry

S. Vieths, et al., Allergy, 2001, 56 Suppl 67, 78



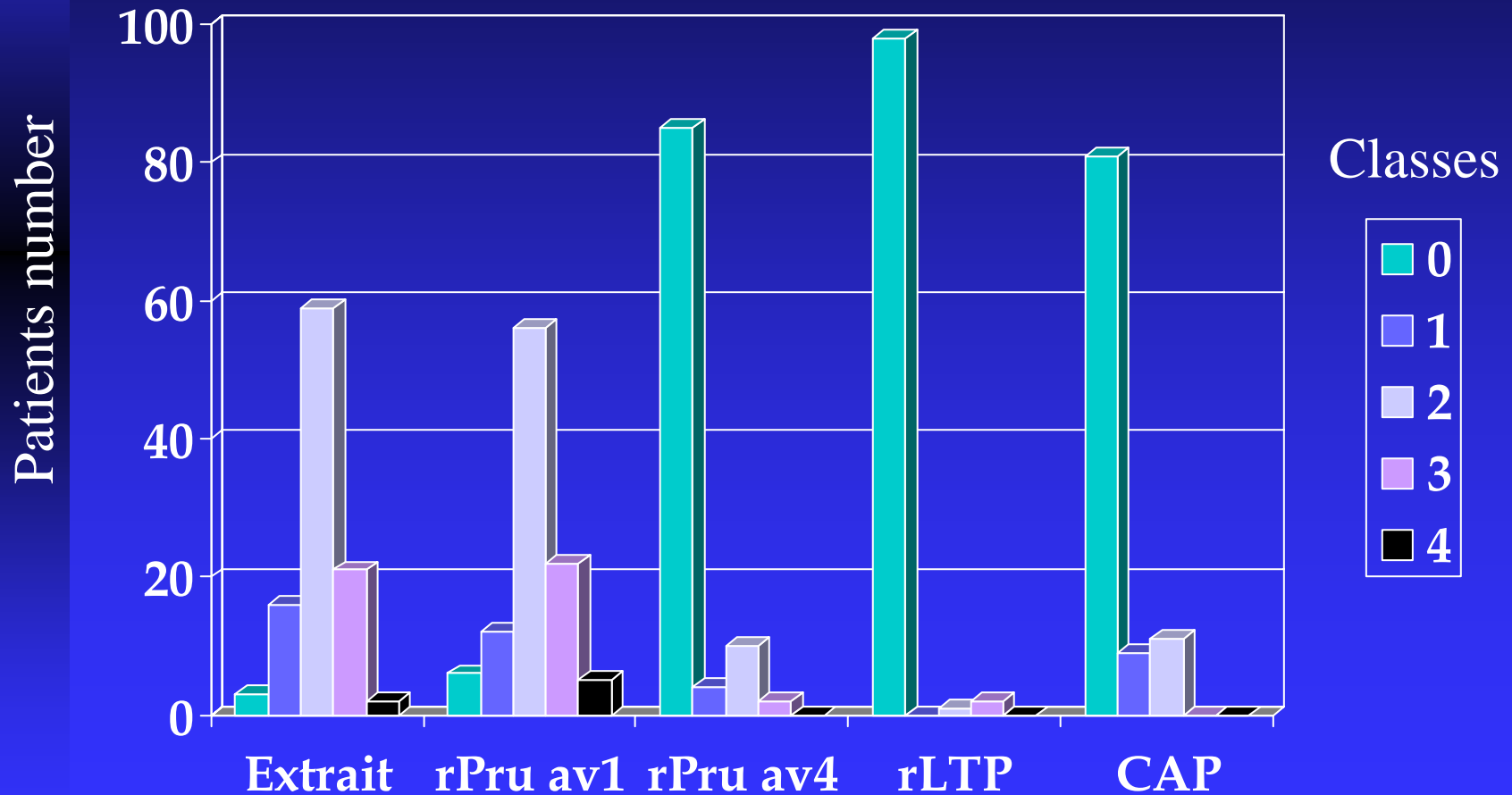
Serological data of 101 patients with pollen-related allergy to cherry

S. Vieths, et al., Allergy, 2001, 56 Suppl 67, 78



Serological data of 101 patients with pollen-related allergy to cherry

S. Vieths, et al., Allergy, 2001, 56 Suppl 67, 78



Bet v1



tree pollen



spices



fruits



Bet v 1



hazel nuts



vegetables

Bet v 1 versus profilin

Bet v2



man???



tree pollen



nuts



Profilin



grass pollen



vegetables



fruits



weed pollen

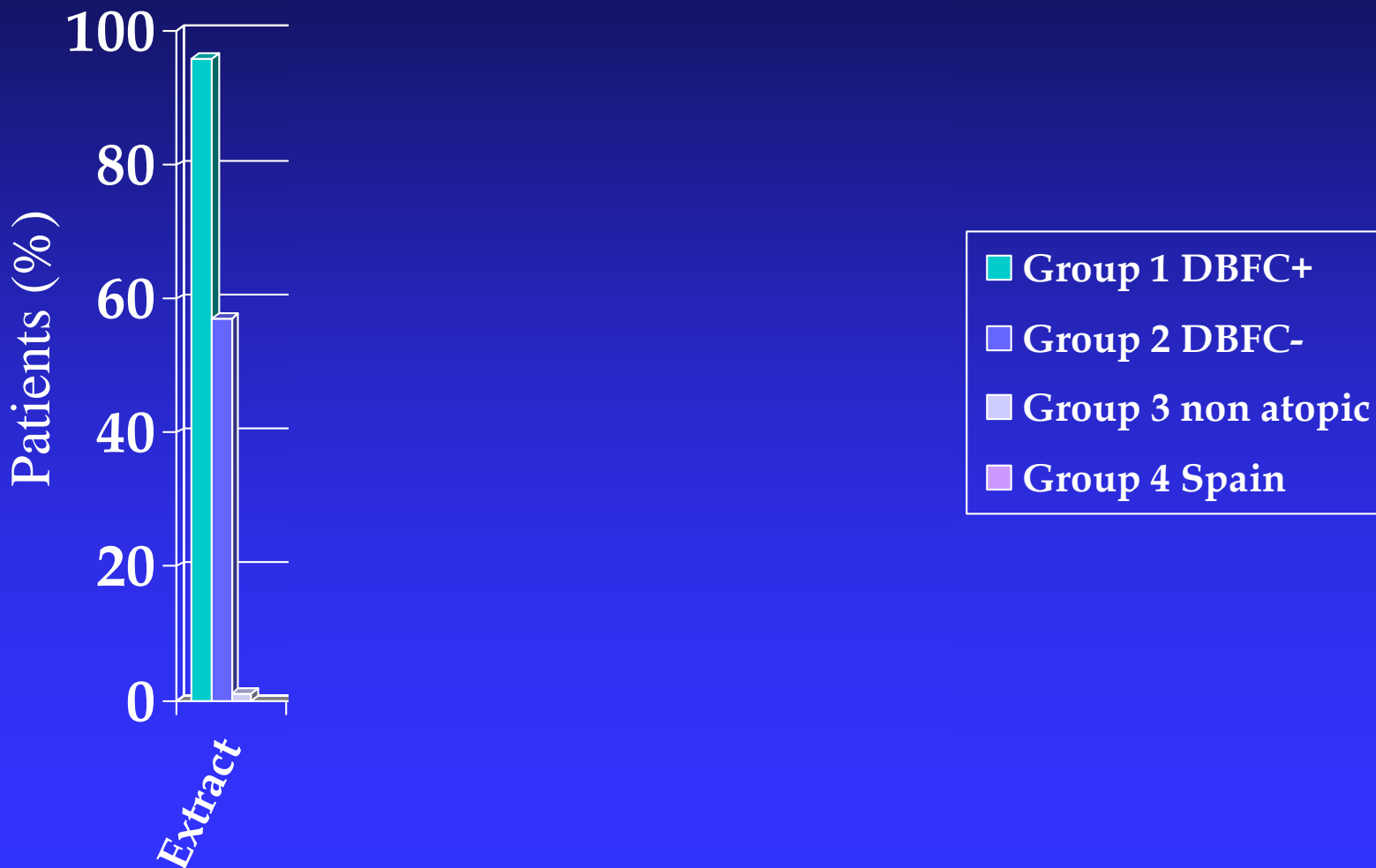
Lili Kazemi-Shirazia,
*Int Arch Allergy
Immunol*,
2002;127:259-268

Réactivités croisées: débat ouvert

- Réalité clinique de la crossréactivité
 - ◆ Bet v1 par rapport à Bet v2 et autres profilines
 - ◆ La profiline est rarement le seul allergène en cause (sauf à un stade très initial?)
- Intérêt de substituer Bet v1 ou Bet v2 aux extraits instables d'aliments contenant des allergènes homologues
 - ◆ Ne permet néanmoins pas d'identifier l'aliment avec précision

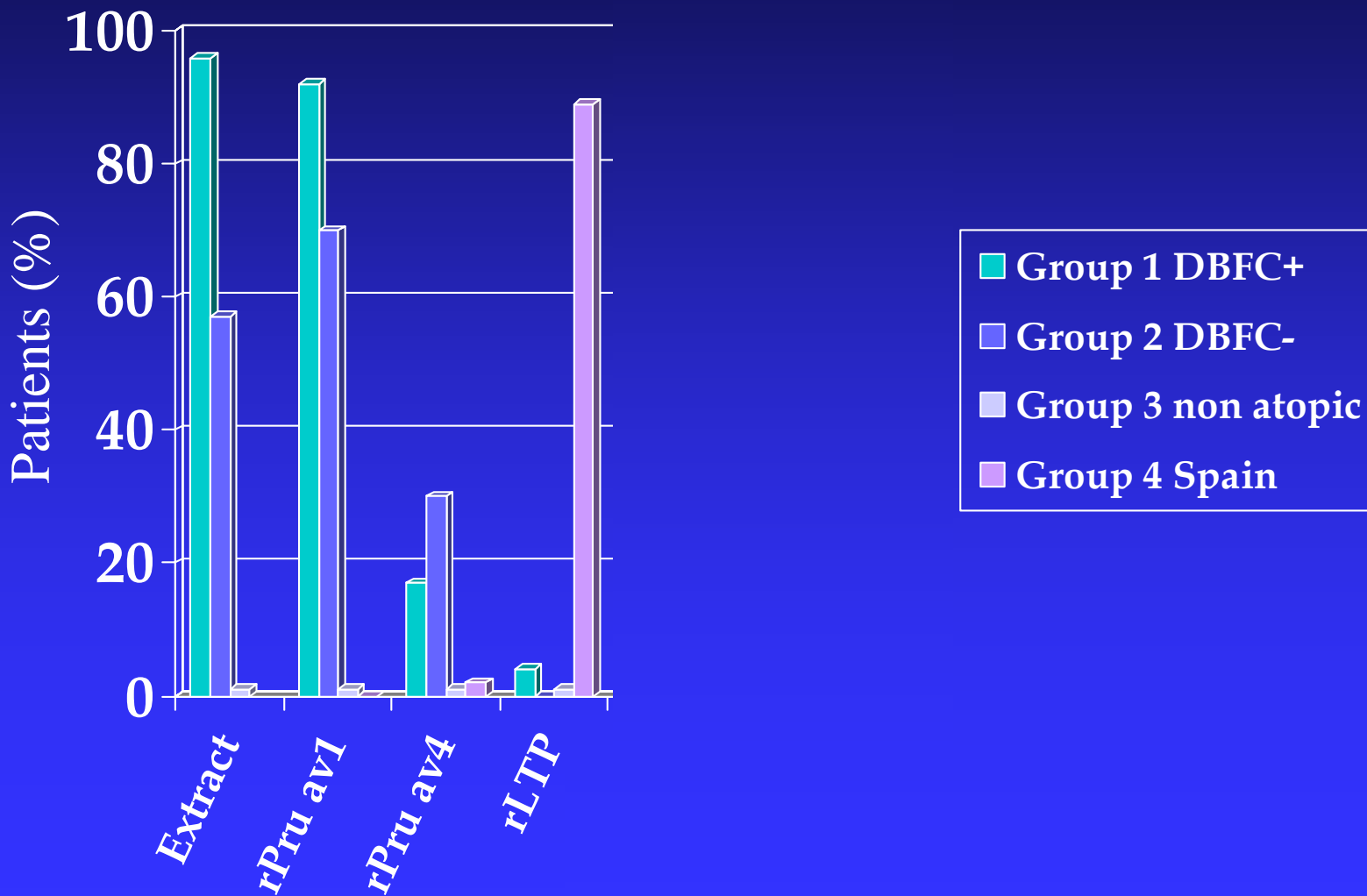
Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy

Ballmer-Weber et al., JACI, 2002, 110:167



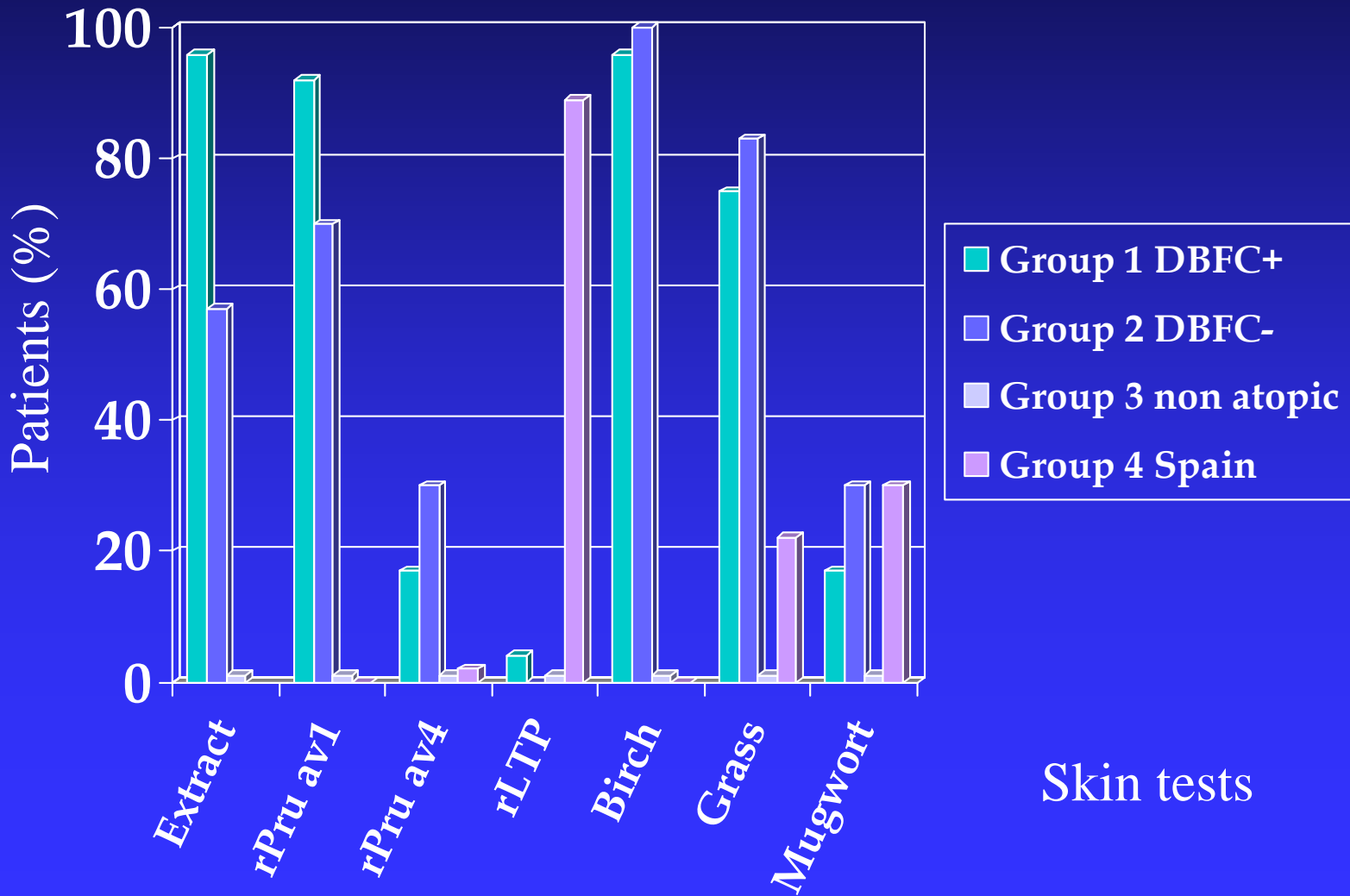
Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy

Ballmer-Weber et al., JACI, 2002, 110:167



Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy

Ballmer-Weber et al., JACI, 2002, 110:167



Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy

Ballmer-Weber et al., JACI, 2002, 110:167

- Valeur prédictive de *l'allergène rec.* vis-à-vis *des Sx de SOC* médiocre (60%)
- rPru v1 10/18 monosensibilisés
 - ◆ Sx de SOC modéré (prurit oral)
- rPru v3 (LTP) 6/8 monosensibilisés
 - ◆ Sx sévères (urticaire, angioedème) (Fisher test $p=0.75$)

Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods

R. Asero et al., JACI, 2003, 112:427

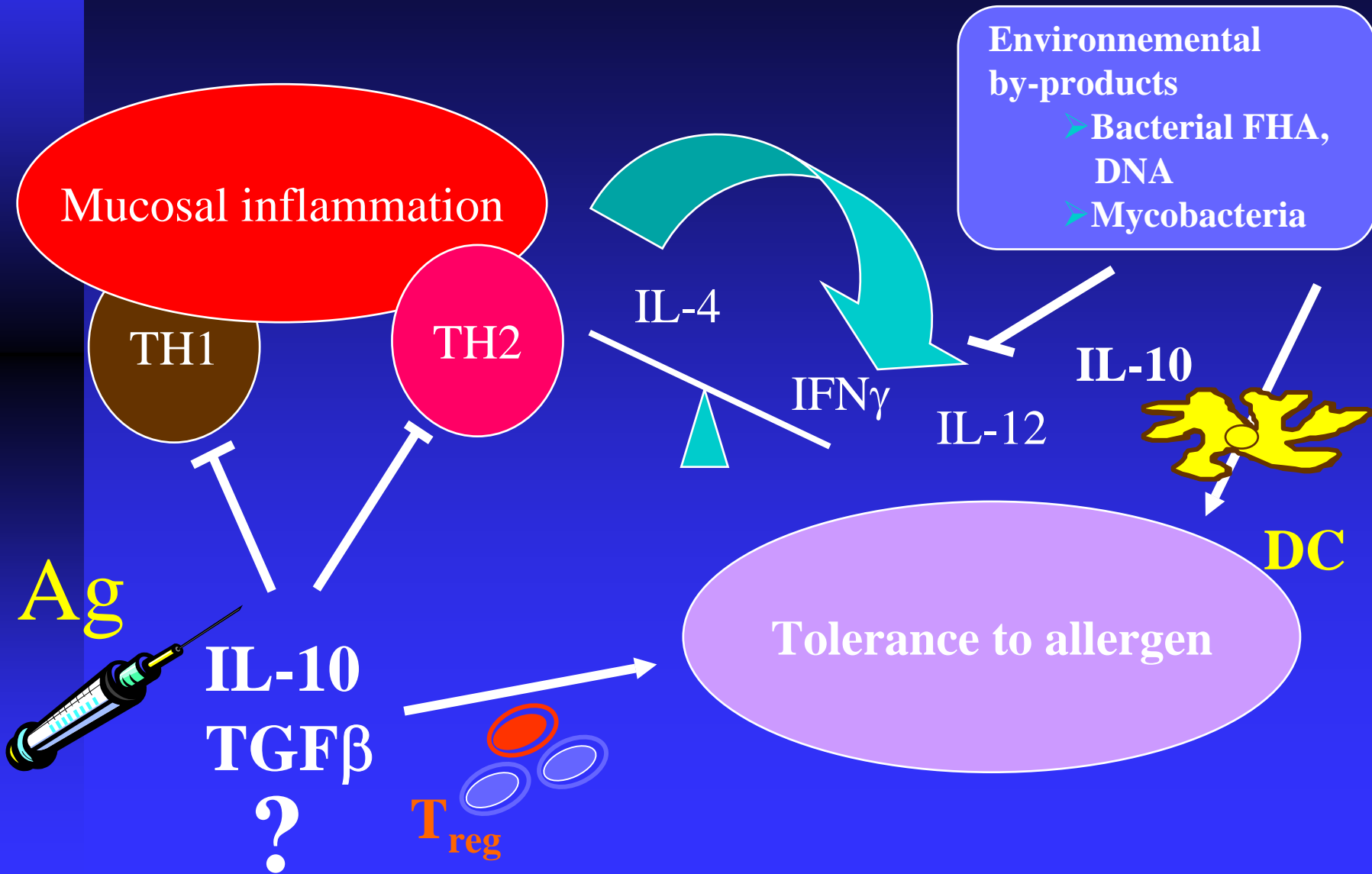
- 71 patients, allergie démontrée à des fruit et des légumes (Hx et/ou provocation)
 - ◆ Pas de sensibilisation à LTP ou latex
- Classification selon leur réactivité à Bet v1 ou Bet v2 ou les deux
 - ◆ Bet v1 monosensibilisés
 - ◆ Pomme, noisette ($p < 0.001$ vs Bet v2)
 - ◆ Bet v2 monosensibilisés
 - ◆ Citron, melon, banane, tomate ($p < 0.001$ vs Bet v1)
 - ◆ Bet v1 +v2
 - ◆ Pomme, noisette, citron, melon, banane, tomate

Conclusion

- Les monosensibilisés sont le plus souvent anti-profiline ou CCD négatifs
- Les polysensibilisés sont plus souvent positifs à la profiline en plus de l'allergène majeur
 - ◆ Relevance clinique des profilines « fréquente » et des CCD faible (mais peut-être pas nulle)
- Intérêt d'une série allergénique type component-resolved

Treating allergy with rec. allergens

Adjuvant

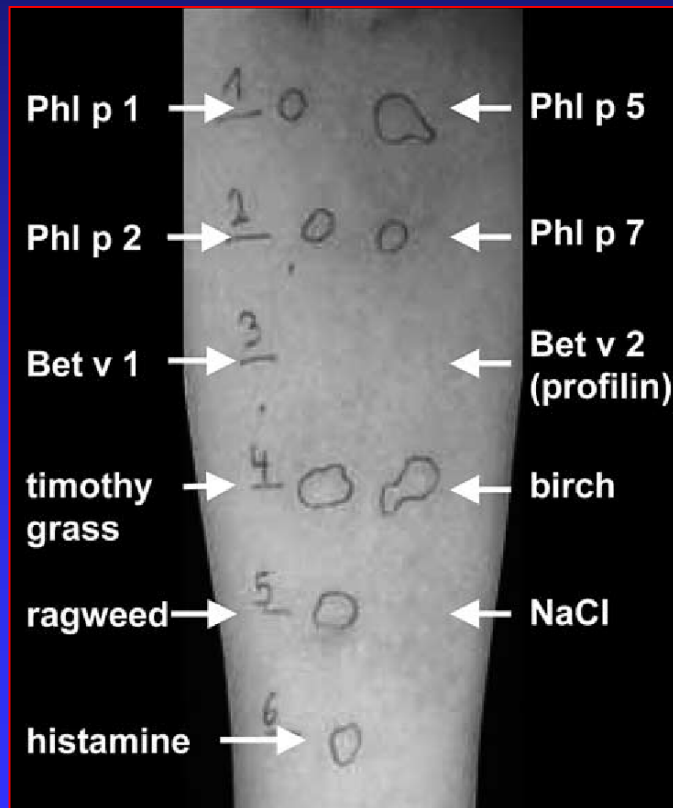


Qu'attendre des allergènes recombinants sur le plan thérapeutique?

- Amélioration de la standardisation des produits de désensibilisation ✓
 - ◆ Définir l'usage des allergènes majeurs ±
- Amélioration de la sécurité ±
- Catégoriser les patients selon leur pronostic ±

Allergènes recombinants en tests cutanés

Kazemi-Shirazia, Int Arch Allergy Immunol, 2002; 127: 259–268

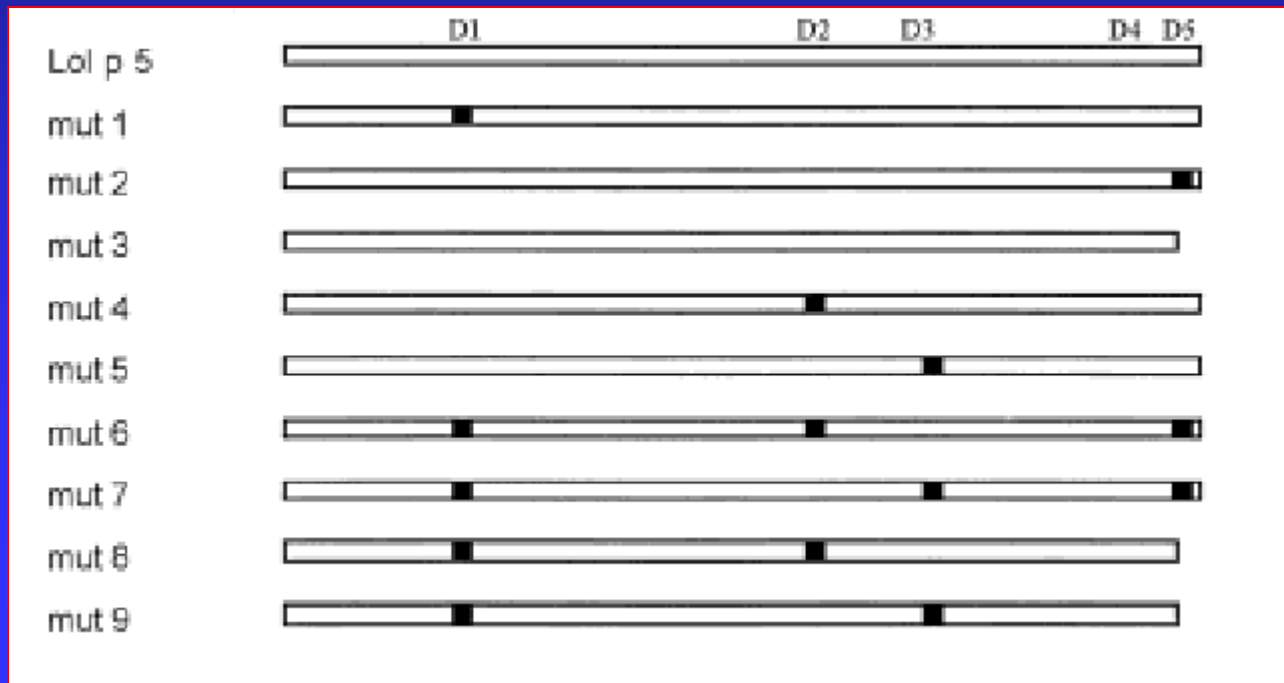


- Patient cliniquement allergiques aux graminées
- Extraits classiques
 - ◆ Pos. Gram., Bouleau, Ambroisie
- Recombinants
 - ◆ Bet v1 et v2 nég.
- Conclusion
 - ◆ Allergie au graminées
 - ◆ Faux pos. des extraits graminées et ambroisie
 - ◆ Réactivité croisée (Phl p7, Bet v4, Amb a)

Allergènes recombinants hypoallergeniques

- Mutations ponctuelles (site-directed mutagenesis) des épitopes IgE

Swoboda et al., EJI, 2002, 32:270



Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE-binding capacity: candidates for grass pollen-specific immunotherapy *Swoboda et al., EJI, 2002, 32:270*



Non atopique

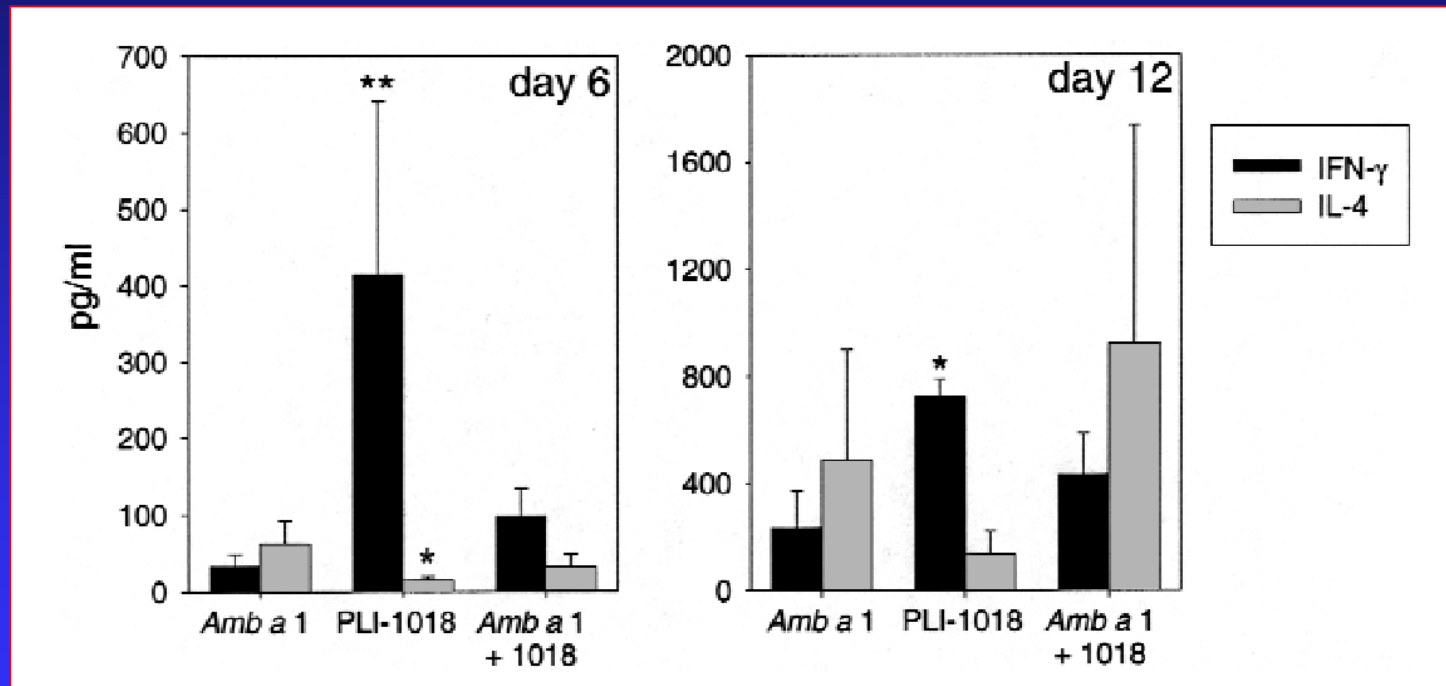
Allergique aux pollen
de graminées

Immunothérapie spécifique et CpG

- ITS et plasmides (vaccins DNA)
 - ◆ Plasmides exprimant l'allergène/ISS-ODN/CpG (pur-pur-CG-pyr-pyr)
 - ◆ Allergène protéique conjugué aux CpG-ODN
- Induction d'une réponse TH1 et correction des réponses TH2
 - ◆ Conjugués allergène/ISS-ODN comparés aux vaccins DNA
 - ◆ Plus immunogènes
 - ◆ Moins allergisants (TH2)

Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes TH1 cytokine expression while downregulating TH2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy

Marshall et al., JACI, 2001, 108:191



PLI (prot.-linked ISS) is more effective at enhancing IFN- γ and reducing IL-4 than stimulation with Amb a 1 and free ISSs.

Conclusions *Intérêt des AR*

■ Diagnostic

- ◆ Excellente stabilité
- ◆ Identification précise des sensibilités
 - ◆ Immunothérapie spécifique mieux ciblée
- ◆ Identification des réactions croisées
 - ◆ Appréciation de leur signification clinique

- ## ■ *Lege artis*, on ne peut néanmoins pas se passer pour autant de l'épreuve clinique (DBPCFC)

Conclusions *Intérêt des AR*

■ Thérapeutique

- ◆ Matériel standardisé, enregistrable
- ◆ Option minimale en ITS
 - ◆ Inclusion des allergènes majeurs sous forme AR
- ◆ Option « luxe »
 - ◆ ITS personnalisée....(doutes+++)
- ◆ Identification des réactions croisées alimentaires
 - ◆ Meilleur impact sur le SOC???