



HAL
open science

Caractérisation moléculaire et immunoréactivité de deux allergènes chez *Gadus Morhua* (cabillaud de l'Océan Atlantique)

Sylvie das Dores

► **To cite this version:**

Sylvie das Dores. Caractérisation moléculaire et immunoréactivité de deux allergènes chez *Gadus Morhua* (cabillaud de l'Océan Atlantique). Biotechnologies. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN10295 . tel-01754421

HAL Id: tel-01754421

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754421>

Submitted on 30 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I

FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

N° attribué par la bibliothèque

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I

Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement
Spécialité : Bioingénierie

présentée et soutenue publiquement

par

Sylvie DAS DORES

le 14 novembre 2002

***Caractérisation moléculaire et immunoréactivité
de deux allergènes chez Gadus morhua
(cabillaud de l'Océan Atlantique)***

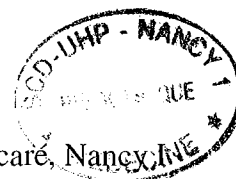
Directeurs de thèse :

Jean-Louis Guéant, Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes

Membres du Jury

Présidente :	A. Barbaud	Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	A. Romano	Professeur à l'Université Catholique, Rome, Italie
	P. Demoly	Praticien Hospitalier, HDR, Montpellier
Examineurs :	J. Fleurence	Professeur à l'Université de Nantes
	J.L. Guéant	Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy I
	C. Chopin	Chargée de Recherche à l'IFREMER, Nantes



Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Jean-Louis GUEANT pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences, et pour la confiance qu'il m'a témoignée durant ces trois années de thèse. Ses conseils et ses critiques m'ont permis d'avancer et d'apprendre...

Je remercie également Monsieur le Professeur Joël FLEURENCE et Madame le Docteur Christine CHOPIN pour avoir co-dirigé ce travail. Leur disponibilité, leur aide et leur collaboration dans ce travail, malgré les kilomètres qui nous séparaient, m'ont été plus qu'utiles. J'ai eu un réel plaisir à travailler avec eux. Merci aussi à eux d'avoir accepté de juger ma thèse en acceptant de faire partie de mon jury.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur Antonino ROMANO pour sa collaboration dans la collecte des sérums des patients. En effet, cette étude n'aurait pu être menée à bien rapidement sans son concours. Je tiens d'autre part à le remercier d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie aussi Monsieur le Docteur Pascal DEMOLY pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner mon travail malgré son emploi du temps chargé.

Je remercie également Madame le Professeur Annick BARBAUD d'avoir accepté de juger ce travail en faisant partie du jury.

D'autre part, je remercie Marc MERTEN pour sa patience et ses relectures constructives, ainsi qu'Armelle ROPARS pour sa disponibilité et ses cours « accélérés » d'immunologie.

Merci aussi à toute ma Famille qui a, depuis toujours, su me donner confiance pour me faire avancer. Merci pour vos encouragements inconditionnels et pour votre intérêt pour mon travail.

Et enfin, un grand, grand, très grand merci à ma nouvelle famille des
« Biochimistes Nancéiens » :

Céline, Sandrine, Sonia, Isabelle S., Alexandre, Jean-Marc, Anne-Catherine, Olivier, Martine, Philippe, Laurent P., Nathalie, Virginie, Romain, Mélanie, Isabelle M., et Gaëlle...

Je garderai bien sûr en mémoire

- votre disponibilité à toute épreuve côté boulot : merci pour vos conseils techniques, pour nos discussions, vos suggestions, vos coups de souris et vos relectures, ...

- mais aussi et surtout tout le reste : merci pour votre accueil, pour votre soutien dans toutes les situations, merci pour votre confiance et surtout merci pour nos fous rires !!!...

Avant-Propos

A mon arrivée au Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition à Nancy, URM IFREMER n°20, j'ai été accueillie par l'équipe du Pr J.-L. Guéant dont un des thèmes de recherche, développé en collaboration avec l'IFREMER de Nantes, concerne les propriétés allergéniques et nutritionnelles des produits d'origine marine. L'étude des propriétés allergéniques est menée sur le cabillaud de l'océan atlantique (*Gadus morhua*), et l'étude nutritionnelle est effectuée sur les protéines d'une algue rouge (*Palmaria palmata*). Les objectifs de l'URM s'inscrivent dans une finalité à la fois physiopathologique et appliquée.

Les précédents travaux ont montré l'existence de nombreuses protéines susceptibles d'être des allergènes chez le cabillaud. Un lourd travail d'identification et de caractérisation de ces différentes protéines est alors nécessaire pour pouvoir indiquer aux patients allergiques ou non les choix à faire en matière de consommation de poisson. La meilleure connaissance des allergènes majeurs ouvre des perspectives pour la traçabilité et la préparation d'aliments adaptés présentant des allégations Santé, qui intéressent directement l'industrie agro-alimentaire. Par ailleurs, elle permet d'optimiser la démarche et les tests diagnostiques en pratique allergologique.

Liste des publications

Das Dores S., Chopin C., Quaratino D., Villaume C., Fleurence J., Guéant J.L.

A novel oligomeric parvalbumin allergen of atlantic cod (Gad ml) encoded by a gene distinct from that of Gad cl.

Allergy, 2002, 57(Suppl. 72) : 79-83

Das Dores S., Chopin C., Romano A, Galland-Irmouli A.V., Quaratino D., Pascual C., Fleurence J., Guéant J.L.

IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allergen of codfish.

Allergy, 2002, 57(Suppl. 72) : 84-87

Communications orales

Das Dores S., Chopin C., Romano A, Galland-Irmouli A.V., Quaratino D., Pascual C., Fleurence J., Guéant J.L.

Novel food allergens from peanut and codfish : identification, cross-reactivity and production of the recombinant proteins

V^e International Consensus Conference of Allergology and Clinical Immunology - Rome, Italy 22-25 Avril 2001

Das Dores S., Chopin C., Fleurence J., Guéant J.L.

Etude de deux nouveaux allergènes de cabillaud

Les journées des thèses de l'IFREMER - Nantes, France, 17-18 Avril 2002

Posters

Das Dores S.

Etude de nouveaux allergènes de cabillaud

Doctoriales de Lorraine - La Bresse, France, 6-13 octobre 2000

Sommaire

AVANT-PROPOS	3
---------------------	----------

LISTE DES PUBLICATIONS	4
-------------------------------	----------

ABREVIATIONS	8
---------------------	----------

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
------------------------------	----------

1 L'ALLERGIE ET LES ALLERGIES ALIMENTAIRES	10
1.1 L'ALLERGIE	10
1.1.1 Définitions de l'allergie	10
1.1.2 Le paradigme Th1 / Th2	11
1.1.3 Hypothèses du développement d'une allergie	11
1.2 L'ALLERGIE ALIMENTAIRE	12
1.2.1 Historique de l'allergie alimentaire	12
1.2.2 Généralités sur l'allergie alimentaire	13
1.2.3 Mécanisme de l'allergie IgE-dépendante	14
1.2.4 Mécanisme naturel de tolérance aux aliments	15
1.2.5 Symptômes cliniques de l'allergie alimentaire	16
1.2.6 Diagnostic d'allergie alimentaire	17
1.2.6.1 Les tests cutanés (prick-tests)	17
1.2.6.2 Taux d'IgE totales	17
1.2.6.3 Taux d'IgE spécifiques	18
1.2.6.4 Test de provocation orale en double aveugle contre placebo (DBPCFC)	18
1.2.6.5 Histamino-libération Leucocytaire (HLL)	18
1.2.7 Epidémiologie de l'allergie alimentaire	18
1.2.7.1 Prévalence de l'allergie alimentaire	18
1.2.8 Qu'est-ce qu'un allergène alimentaire ?	20
1.2.8.1 Nature des aliments allergisants	20
1.2.8.2 Propriétés des allergènes alimentaires	20
1.2.9 Réactions allergiques croisées	21
1.2.10 Notion d'allergène majeur	21
1.2.11 Thérapies de l'allergie alimentaire	22
1.2.11.1 Traitement de l'allergie alimentaire	22
1.2.12 Immunothérapies de l'allergie alimentaire	23
1.2.12.1 Stratégies spécifiques de l'allergène	23
1.2.12.2 Stratégies non spécifiques de l'allergène	25
1.2.12.3 Modèles animaux	26
2 L'ALLERGIE AU POISSON	27
2.1 INTRODUCTION	27
2.2 LES ALLERGENES DE POISSON	28

2.2.1	Les allergènes de type parvalbumine	28
2.2.1.1	L'allergène majeur du cabillaud	28
2.2.1.2	L'allergène majeur du saumon	31
2.2.1.3	L'allergène majeur de la carpe	31
2.2.1.4	Parvalbumines	32
2.2.1.5	Conservation entre espèces	34
2.2.1.6	Autres allergènes de la famille des protéines fixatrices de calcium	34
2.2.2	Autres types d'allergènes chez le cabillaud	34
2.2.2.1	Différentes cartographies d'allergènes de cabillaud	34
2.2.2.2	La P41	36
2.2.2.3	La P24	36

BUT DU TRAVAIL **37**

MATERIELS ET METHODES **39**

1	IDENTIFICATION DES PROTEINES ALLERGENIQUES P24 ET P41 PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	40
1.1	ORIGINE DU MATERIEL	40
1.2	IDENTIFICATION DES ADNc DES PROTEINES ALLERGENIQUES P24 ET P41	40
1.3	FICHES TECHNIQUES 1 A 9	40
2	EXPRESSION RECOMBINANTE DE LA PROTEINE P41	50
2.1	CLONAGE DE LA P41 DANS LE VECTEUR pCDNA3	50
2.2	EXPRESSION DE LA P41	50
2.2.1	Expression recombinante de la P41 en lysat de réticulocytes de lapin	50
2.2.2	Expression recombinante de la P41 dans le système eucaryote COS-1	50
2.3	FICHES TECHNIQUES 10 A 18	51
3	ALLERGENICITE DE LA PROTEINE P41 EXTRAITE OU RECOMBINANTE	63
3.1	TESTS IGE-RIA	63
3.2	IMMUNODETECTION DE LA P41	63
3.2.1	Immunodétection par l'antisérum anti-P41 de lapin	63
3.2.2	Immunodétection de la P41 par les sérums des patients	63
3.3	FICHES TECHNIQUES 19 A 27	63

RESULTATS **78**

1	IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES ADNc CORRESPONDANT AUX PROTEINES ALLERGENIQUES P24 ET P41	79
1.1	OBTENTION DE MATERIEL GENETIQUE DE CABILLAUD	79
1.2	OBTENTION DE L'ADNc DE LA P24 PAR RT-PCR	79
1.2.1	Identification et caractérisation de la protéine P24	80
1.2.1.1	Analyse de la séquence nucléotidique	80
1.2.1.2	Analyse de la séquence en acides aminés	80
1.2.2	Obtention de l'ADNc de la P41 par RT-PCR	82
1.2.3	Identification et caractérisation de la protéine P41	85
1.2.3.1	Analyse de la séquence nucléotidique	85
1.2.3.2	Analyse de la séquence en acides aminés	86

2	EXPRESSION DE LA PROTEINE ALLERGENIQUE P41 RECOMBINANTE	89
2.1	CLONAGE DE L'ADNC DE LA P41 DANS LE PLASMIDE PCDNA3	89
2.2	EXPRESSION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE EN LYSAT DE RETICULOCYTES DE LAPIN	89
2.3	EXPRESSION DE LA P41 RECOMBINANTE DANS UN SYSTEME EUCARYOTE : LES CELLULES COS-1	90
3	IMMUNOREACTIVITE DE LA PROTEINE P41	91
3.1	CHOIX DES PATIENTS ET DES TEMOINS	91
3.2	IMMUNOGENICITE DE LA GAPDH NATIVE	92
3.3	IMMUNOGENICITE DE LA GAPDH RECOMBINANTE	93
3.4	LA P41 : ALLERGENE MAJEUR OU MINEUR ?	95
3.5	REACTIONS CROISEES ENTRE LES DIFFERENTES GAPDH D'AUTRES ESPECES	96
3.5.1	Tests de fixation des IgE sur des GAPDH fixées sur epoxy-Sepharose	96
3.5.2	Tests d'inhibition sur epoxy-Sepharose	98
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>		<u>100</u>
1	DISCUSSION	101
1.1	LA PROTEINE P24	101
1.1.1	Caractérisation de la P24	101
1.1.1.1	La P24, le premier allergène identifié chez <i>Gadus morhua</i>	101
1.1.1.2	Gad mI (<i>Gadus morhua</i>) isoforme de Gad cI (<i>Gadus callarias</i>)	101
1.1.2	Dimérisation	102
1.2	LA PROTEINE P41	103
1.2.1	La P41, deuxième allergène identifié chez <i>Gadus morhua</i>	103
1.2.2	Qu'est-ce qu'une GAPDH	104
1.2.3	Les GAPDH : une nouvelle superfamille d'allergènes ?	105
1.2.4	Réactions croisées	105
1.2.4.1	Problème des réactions croisées entre aliments	105
1.2.4.2	Problème d'autoimmunité	106
1.2.5	Allergène majeur ?	107
1.2.6	Marqueur allergénique des conditions de stockage	107
2	PERSPECTIVES	108
2.1	IDENTIFICATION DES MOTIFS IMMUNOGENES	108
2.2	EVALUATION DE L'IMMUNOREACTIVITE CROISEE DES DIFFERENTES ESPECES DE POISSONS	108
2.3	QUALITE ALIMENTAIRE	108
2.3.1	Fabrication de sondes de détection	108
2.3.1.1	Sonde de détection d'allergènes	108
2.3.1.2	Sonde de détection de l'état de fraîcheur du poisson	109
2.3.1.3	Sondes d'identification	109
2.3.2	Modifications industrielles pour l'obtention de produits hypoallergéniques	109
2.4	IMMUNOTHERAPIE	110
3	CONCLUSION	110
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		<u>111</u>
<u>ARTICLES</u>		<u>124</u>

Abréviations

BCA	BiCinchoninic Acid
BSA	Bovine Sérum Albumin
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
cpm	Coup par minute
DBPCFC	Test de provocation alimentaire en double aveugle contre placebo
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DTT	DiThioThréitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
Gad cl	Allergène majeur du cabillaud (<i>Gadus callarias</i>)
GALT	Gut Associated lymphoid tissue
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate-déshydrogénase
h	heure
IEF	Iso Electro Focalisation
IFREMER	Institut Français de Recherche sur l'Exploitation de la mer
ISS-ODN	Séquence oligodéoxynucléotidique immunostimulante
IgE	Immunoglobuline de classe E
IgAs	Immunoglobuline de classe A sécrétoire
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
kDa	Kilo Dalton
kUI/L	Kilo Unité Internationale par litre
M	Molaire
mA	Milli Ampère
min	Minute
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanomètre
ODN	Oligodéoxynucléotidique
P24	Bande protéique IgE-réactive de 24 kDa du cabillaud
P41	Bande protéique IgE-réactive de 41 kDa du cabillaud
PAGE	Poly Acrylamine Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	Point Isoélectrique
PK	Prausnitz-Kustner
RAST	Radio Sorbent Test
RIA	Radio Immuno Assay
RT	Reverse Transcription
s	Seconde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBS	Tris Buffer Saline
Th1	Lymphocyte T auxiliaire de type 1
Th2	Lymphocyte T auxiliaire de type 2
Tris	Tris [hydroxyméthyl] aminométhane
V	Volt
W	Watt

Revue Bibliographique

1 L'ALLERGIE ET LES ALLERGIES ALIMENTAIRES

1.1 L'allergie

1.1.1 Définitions de l'allergie

L'allergie est une réaction anormale du système immunitaire contre certains antigènes naturellement présents dans l'environnement. Cette hypersensibilité est le plus souvent dépendante des immunoglobulines E (IgE), mais peut faire intervenir d'autres acteurs de l'immunité. Gell et Coombs ont établi une classification des différents types d'hypersensibilités rencontrées (Coombs R, *et al.* 1963 ; Gell PGH, *et al.* 1975) :

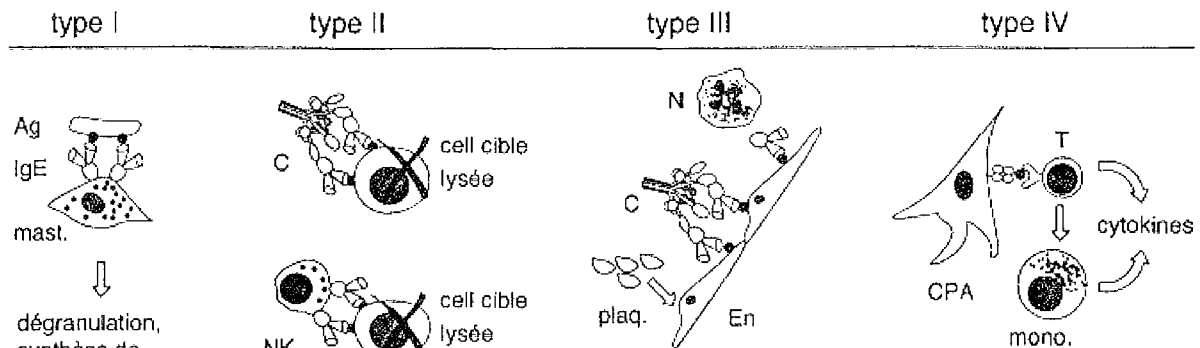
- L'hypersensibilité de **type I**. Elle est immédiate et médiée par les IgE lors d'un second contact avec l'antigène. Elle est aussi appelée atopie ou anaphylaxie.
- L'hypersensibilité de **type II**. Cette réaction semi-retardée est due à l'action des IgG éventuellement associés à des IgM et IgA. Ces anticorps sont dirigés contre un antigène naturel ou exogène fixé à la surface d'une cellule ou d'un tissu. La réaction se manifeste 4 à 8h après l'ingestion. Elle est aussi appelée réaction cytotoxique.
- L'hypersensibilité de **type III**. Elle est médiée par les IgG circulants, ou des complexes immuns qui sont des complexes antigènes-anticorps. Elle est aussi dite hypersensibilité à complexes immuns. Cette réaction est elle aussi semi-retardée puisque les symptômes se déclarent 4 à 6 heures après l'ingestion.
- L'hypersensibilité de **type IV** fait agir l'immunité cellulaire (les lymphocytes). Se manifestant 1 à 3 jours après l'ingestion, elle est aussi appelée hypersensibilité retardée.

La Figure 1 résume les différents types d'hypersensibilités.

Les études épidémiologiques montrent une réelle augmentation des maladies allergiques. De nombreux facteurs tels que les habitudes alimentaires, l'hérédité et l'environnement y participent (Katz DH 1978). Dans les pays développés, l'allergie chronique concerne 15 à 30% de la population (European Allergy White Paper 1997) (Burks AW, *et al.* 1998 ; Moneret-Vautrin DA, *et al.* 1996).

Figure 1. Classification des réactions d'hypersensibilité spécifique selon Coombs et Gell (1963).

Ag : antigène, *mast.* : mastocyte, *C* : complément, *NK* : natural killer, *cell* : cellule, *plaq.* : plaquette, *N* : neutrophile, *En* : cellule endothéliale, *CPA* : cellule présentatrice de l'antigène, *mono* : monocyte, *T* : lymphocyte T



D'après Revillard, 1998

1.1.2 Le paradigme Th1 / Th2

En 1986, la découverte des cytokines (issues des lymphocytes T) régulant la production d'IgE par les lymphocytes B, a permis la description des lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2. Couramment, les réactions allergiques apparaissent comme étant le résultat d'une réponse des lymphocytes de type Th2.

A la naissance, les réponses immunitaires sont naturellement dirigées par des Th2 car le compartiment intra-utérin l'est (Wegmann TG, *et al.* 1993). Au contact des bactéries et virus, il y a normalement une déviation de la réponse Th2 vers une réponse Th1. Pourtant, sans que l'on sache pourquoi, chez 35% des enfants âgés de plus de 5 ans, cette déviation semble ne pas se faire puisque leur fort taux d'IgE persiste, et augmente même parfois.

En fait, les cellules T *in utero* en réponse aux allergènes environnementaux transplacentaires et en présence de facteurs placentaires inhibiteurs de Th1 amorcent le biais Th2 des cellules T. Après la naissance, ces populations peuvent se diriger vers plusieurs voies : le renforcement des Th2, la déviation immunitaire Th2 vers Th1, ou l'induction de la tolérance (Holt PG, *et al.* 1997).

1.1.3 Hypothèses du développement d'une allergie

Romagnani élabore l'« hypothèse Th2 » dans l'allergie qui est aujourd'hui acceptée par la plupart des auteurs (Romagnani S 1998). L'allergie est alors définie comme une hypersensibilité à des antigènes inoffensifs due aux lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) et dont les origines complexes sont à la fois génétiques et environnementales. Quelques gènes impliqués dans le développement et la régulation des lymphocytes Th2, pourraient expliquer l'augmentation de la prévalence des allergies dans les pays occidentaux.

Pourtant l'« hypothèse de l'hygiène » de Strachan *et al.* en 1989 suggère que l'amélioration de l'hygiène et les expositions réduites aux agents infectieux dans les pays développés, annuleraient le développement habituel de l'immunité innée (tolérance) *via* les lymphocytes Th1, et contribueraient ainsi à altérer l'équilibre des réponses Th1 et Th2 vis-à-vis des antigènes inoffensifs, en faveur des réponses allergiques dirigées par les lymphocytes Th2 (Strachan DP 1989).

Yazdanbakhsh attire cependant l'attention sur certaines contradictions (Yazdanbakhsh M, *et al.* 2002). En effet, des maladies auto-immunes dont le rôle prépondérant est joué par les Th1, telles que le diabète de type 1, sont aussi en augmentation et peuvent être associées à des maladies allergiques comme l'asthme (Stene LC, *et al.* 2001). De même, les infections par des helminthes (vers parasites) des populations des pays en voie de développement sont accompagnées de fortes réponses Th2 mais ne sont pas associées à des allergies. Une des hypothèses est que la plupart des IgE produites à l'issue d'une invasion parasitaires ne sont pas spécifiques. Ces IgE non spécifiques satureraient les récepteurs des mastocytes et bloqueraient ainsi la fixation des IgE dirigées contre les allergènes exogènes conduisant à l'absence de dégranulation et donc d'hypersensibilité immédiate pour ces allergènes (Masters S, *et al.* 1985). Ceci suggère que le déséquilibre Th1/Th2 ne suffit pas à tout expliquer.

1.2 L'allergie alimentaire

1.2.1 Historique de l'allergie alimentaire

Il y a 2000 ans déjà, Hippocrate décrivait des réactions allergiques contre les aliments mais la communauté médicale était très réticente à reconnaître et à faire des recherches sur ces troubles jusqu'à présent (Sampson HA 1999a). D'autres savants grecs ont eux aussi observé des réactions contre le lait de vache au I^{er} et II^e siècles (Cohen SG, *et al.* 1989). Les premières réactions allergiques n'ont été rapportées que bien plus tard : au XVI^e siècle par Donati en réaction à l'œuf, et au XVII^e siècle par Sachs en réaction au poisson (Sampson 1999a).

A partir de 1902, les Français ont été les premiers à individualiser l'anaphylaxie alimentaire en clinique et à réaliser des travaux chez l'animal. Les médecins ont alors commencé à parler d'enfants présentant des éruptions d'eczéma aggravées par les allergies alimentaires (Blackfan H 1920). En 1931, l'américain Rowe publia un livre qui a permis la reconnaissance de l'allergie alimentaire (Rowe A, *et al.* 1931).

Ce n'est qu'en 1950 que Loveless utilisa pour la première fois un test d'allergie contrôlé avec un placebo et en aveugle pour établir un diagnostic d'allergie alimentaire (Loveless M

1950). En 1961, Halpern *et al.* montrent la réalité du passage d'antigènes alimentaires intacts à travers la muqueuse et montrent clairement la tolérance alimentaire chez le sujet normal. Depuis, de nombreux travaux n'ont fait que confirmer leurs dires. C'est aussi en 1961 que paraît le premier livre français sur l'allergie digestive écrit par Sarles et Gauthier (Sarles H, *et al.* 1961). De 1971 à 1981, les connaissances immunologiques se concrétisent et Tomasi lance le concept de systèmes immunologiques locaux comme par exemple celui du tube digestif : le GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue* pour « Tissu lymphoïde associé à l'intestin ») (Tomasi TB, *et al.* 1972). De nouveaux moyens de diagnostic font alors leur apparition comme le DBPCFC (*Double Blinded Placebo Controlled Food Challenge* pour « Test de provocation alimentaire en double aveugle contre placebo ») dérivé du test de Loveless (May CD 1976) qui est toujours utilisé, ou bien encore les tests de caractérisation des IgE spécifiques d'un aliment.

1.2.2 Généralités sur l'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire est une hypersensibilité à des aliments ingérés. Elle est très répandue dans les pays occidentaux. Comme le montrent les études de Novembre *et al.*, plus de la moitié des réactions allergiques sévères chez les enfants italiens sont d'origine alimentaire (Novembre E, *et al.* 1998). D'autre part, lors d'une étude au Royaume-Uni menée en 1994, Young a rapporté que 20% de la population s'est déjà plainte de symptômes d'allergie alimentaire et au pays de Galles 19% des hommes et 26% des femmes croient être allergiques à des aliments (Burr ML, *et al.* 1983). De même, aux Pays-Bas c'est 12,4% de la population qui suspecte être sujette à l'allergie alimentaire (Jansen JJ, *et al.* 1994). Aux Etats-Unis, 28% des allergies alimentaires supposées se sont révélées être des allergies vraies chez des enfants de moins de 3 ans (Bock SA 1987).

Pourtant derrière le terme allergie alimentaire se cachent plusieurs formes de réactions contre les aliments mais seules quelques unes mettent en cause le système immunitaire (Bruijnzeel-Koomen C, *et al.* 1995 ; Ortolani C, *et al.* 1995 ; Pascual CY, *et al.* 2000 ; Young E, *et al.* 1994).

- ◆ *les réactions "toxiques"*, auxquelles n'importe quel individu est exposé, sont des réactions contre une contamination ou une substance naturellement présente dans l'aliment, comme par exemple la présence d'histamine dans certains poissons ou fromages,... (Arnold SH, *et al.* 1978 ; Taylor SL, *et al.* 1989). C'est **l'intoxication alimentaire**.
- ◆ *les réactions "non toxiques"* dépendent de la susceptibilité de chacun envers un aliment et qui comprennent :
 - *les réactions non immunitaires* : c'est **l'intolérance alimentaire**, le système immunitaire n'est pas mis en cause. Par exemple, la déficience en une enzyme comme la lactase qui induit une intolérance au lait (Sandine WE, *et al.* 1979) ou les propriétés histamino-

libératrices de certains aliments comme les fraises ou le chocolat, sont autant de facteurs responsables d'intolérances alimentaires.

- *les réactions immunitaires* sont les **allergies alimentaires vraies** qui regroupent les hypersensibilités de type I, II, III, et IV classiques de l'allergie.

L'allergie alimentaire la plus fréquente est celle de type I (ou IgE-dépendante). C'est d'autre part la seule dont le mécanisme immunologique est bien connu. D'autres mécanismes immunitaires ont été suggérés, mais aucun n'est encore bien compris ni démontré (Bruijnzeel-Koomen, et al. 1995 ; Ortolani and Vighi 1995).

1.2.3 Mécanisme de l'allergie IgE-dépendante

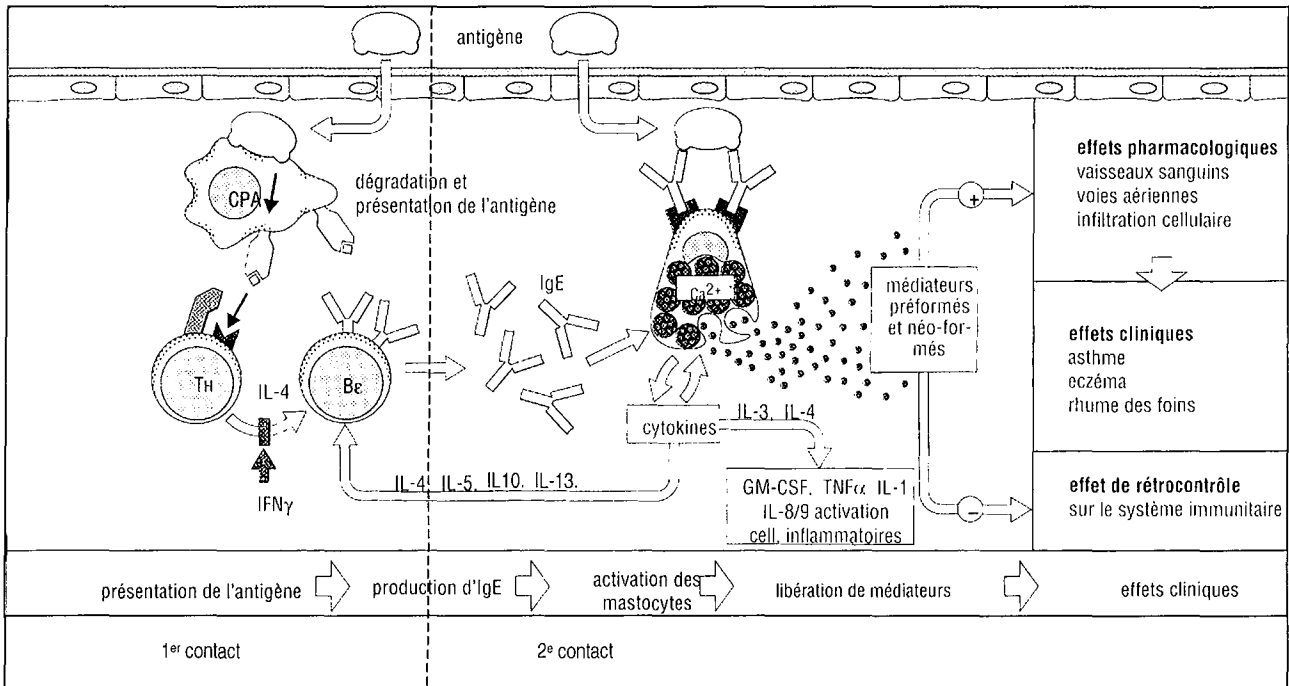
Dans le cas des allergies IgE-dépendantes, deux étapes sont indispensables pour déclencher une réaction allergique :

- Lors du premier contact avec l'allergène, des IgM et IgD solubles sont sécrétées par tous les individus, allergiques ou non. Pourtant, la personne allergique effectue une commutation de classe des IgM et IgD en IgE et ses cellules deviennent des cellules B mémoires. L'allergie n'apparaît pas.

- Lors d'un second contact avec l'allergène chez l'individu allergique, il y a prolifération des cellules B mémoires. Des IgE solubles sont produites et se fixent aux basophiles et mastocytes au niveau des récepteurs de haute affinité pour les IgE (FcεRI). Les basophiles et les mastocytes libèrent alors des médiateurs chimiques tels que l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes et les cytokines. L'interaction entre ces médiateurs inflammatoires et les récepteurs tissulaires déclenchent les symptômes de l'allergie (David B 1996 ; Guenounou M 1998) (Figure 2).

Figure 2. Mécanisme d'allergie IgE-dépendante d'après Roitt I, *et al.* (1994).

Des allergènes pénètrent par les muqueuses et sont captés par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) qui les dégradent et les présentent aux lymphocytes Th. La coopération entre les lymphocytes Th et les lymphocytes B, par contact membranaire et libération de médiateurs solubles, induit la prolifération des lymphocytes B, conduisant à la production d'IgE spécifiques de l'allergène. Les IgE sensibilisent les mastocytes. Ultérieurement, lorsque l'antigène atteint les mastocytes sensibilisés, il établit un pontage d'IgE induisant une augmentation du calcium intracellulaire qui provoque la libération de médiateurs préformés comme l'histamine. Les médiateurs néoformés comme les leucotriènes et les prostaglandines sont à l'origine des signes cliniques de l'allergie



D'après Roitt, *et al.* (1994) modifié

Malgré la connaissance de ce mécanisme, on ne sait toujours pas pourquoi un individu produit des IgE spécifiques d'un aliment alors qu'un autre n'en produira pas (Jaffuel D, *et al.* 2001). En effet, chez l'individu normal, une tolérance orale est acquise (Sampson 1999a).

1.2.4 Mécanisme naturel de tolérance aux aliments

L'organisme humain développe normalement, grâce à un système immunitaire spécialisé associé aux muqueuses digestives (GALT pour *gut-associated lymphoid tissue*) (estomac, intestin grêle, colon) une tolérance digestive pour les éléments du non-soi que sont les aliments afin de permettre leur absorption par l'organisme (Brandtzaeg P 2001 ; Moneret-Vautrin DA, *et al.* 1990). Les plaques de Peyer en particulier jouent un rôle primordial dans l'induction ou non d'une réponse immunitaire. Elles constituent en effet la source des plasmocytes intestinaux et le site privilégié des rencontres entre antigènes et immunocytes

(Moneret-Vautrin D, *et al.* 1983). Pourtant, il semble que les nodules lymphoïdes mésentériques peuvent à eux seuls induire la tolérance orale (Spahn TW, *et al.* 2001 ; Spahn TW, *et al.* 2002).

Les blastes B situés au niveau des plaques de Peyer gagnent les ganglions mésentériques par le réseau lymphatique sous-muqueux, puis la circulation sanguine à travers le canal thoracique. Ils migrent ensuite dans la muqueuse intestinale sur toute la longueur du tractus digestif. Au cours de ce cycle, ils subissent une maturation progressive. Les lymphoblastes B perdent leurs IgA intracytoplasmiques et se transforment en plasmocytes en sécrétant des IgA après avoir migré dans la muqueuse.

Contrairement aux IgA sériques monovalentes et d'isotype IgA₁, les IgA intestinales sécrétoires (IgAs) sont faites de dimères associés par une pièce J synthétisée par les plasmocytes intestinaux. Les IgA sont transcytosées dans la lumière intestinale, où elles peuvent exercer leurs fonctions protectrices, par les entérocytes qui expriment, sur leur membrane basolatérale, un récepteur capable de lier les immunoglobulines polymériques. Les complexes formés par les récepteurs et les IgA sont internalisés dans des vésicules à clathrine et sont transportés vers le pôle apical des entérocytes. Les IgA contribuent à protéger la muqueuse contre les bactéries en les immobilisant, en interférant avec leur attachement à l'épithélium, en favorisant l'éviction des plasmides pathogènes (Cerf-Bensussan N, *et al.* 1993).

Les IgAs diminuent la pénétration des antigènes solubles alimentaires en formant des complexes immuns qui peuvent être englobés par le mucus dans la lumière intestinale et éliminés par le péristaltisme.

Les effets protecteurs des IgAs peuvent aussi être exercés par les IgG qui diffusent massivement à travers les espaces intercellulaires et surtout par les IgM qui sont transportés dans la lumière par les mêmes mécanismes que les IgA.

Un individu allergique à un aliment fait une réaction immunitaire anormale contre l'aliment en question avec une synthèse excessive d'IgE spécifiques d'une ou plusieurs protéines de cet aliment (Guenounou 1998 ; Moneret-Vautrin et Kanny 1996).

1.2.5 Symptômes cliniques de l'allergie alimentaire

Les symptômes d'allergie alimentaire apparaissent de quelques minutes à quelques heures après l'ingestion de l'aliment incriminé. Dans la majorité des cas (allergies de type I), les manifestations se déclarent dans la première heure. En règle générale, plus les symptômes apparaissent tard, moins la réaction allergique est sévère (Sampson HA 2000).

L'allergie alimentaire se traduit par les mêmes symptômes que les autres types d'allergie. Toutefois, certains symptômes sont plus fréquents et/ou plus évocateurs. Ainsi, les symptômes les plus communément observés sont essentiellement d'ordre digestifs, respiratoires et cutanés. En Grande Bretagne, par exemple, Minford en 1982 montre que 70%

des enfants âgés de 1 mois à 11 ans atteints d'allergie alimentaire présentent des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées). Les problèmes cutanés (urticaire, eczéma) représentent 24%, et les troubles respiratoires (asthme, rhinite) 6% des manifestations allergiques (Minford AM, *et al.* 1982) . Les mêmes observations ont été faites chez les enfants américains (Bock 1987). Des problèmes cardiovasculaires et des troubles du comportement peuvent aussi apparaître (Bock 1987 ; Bock SA, *et al.* 1994 ; Novembre, *et al.* 1998). Le choc anaphylactique est plus rare (~ 0,5% chez les enfants), mais peut conduire à la mort (Sampson HA 1998 ; Sampson HA, *et al.* 1992) . C'est la réaction allergique la plus brutale et la plus grave, conséquence de la diminution généralisée du tonus musculaire (Revillard JP 1998).

Ces manifestations cliniques ne sont pas spécifiques, c'est pourquoi il faut bien distinguer l'intolérance alimentaire de l'allergie alimentaire. Dans les intolérances alimentaires, le système immunitaire n'est pas mis en cause. Elles expliquent probablement la majorité des réactions contre les aliments (Sampson 1999a)

1.2.6 Diagnostic d'allergie alimentaire

Un diagnostic d'atopie est posé lorsque parmi les quatre critères suivants deux au moins sont présents :

- antécédents personnels d'eczéma, d'asthme ou de rhinite allergique, ou de pollinose
- positivité des tests cutanés aux pneumallergènes courants
- un taux d'IgE supérieur à la normale
- un test de provocation orale positif

1.2.6.1 Les tests cutanés (prick-tests)

Ils permettent de mettre en évidence si les mastocytes sont sensibilisés.

Une goutte de solution contenant l'allergène suspecté est déposée sur l'avant-bras, puis une piqûre est pratiquée au centre de la goutte avec la pointe d'une aiguille ou d'une bague multipointe. La réaction locale dépendante des IgE est caractérisée par une réponse érythémopapuleuse urticarienne atteignant son maximum en 15 minutes (réaction immédiate) (Revillard 1998) Le test est considéré comme positif lorsque la différence entre les diamètres des papules obtenues avec la solution contrôle et l'aliment testé est de 3 mm (Sampson HA 1988).

1.2.6.2 Taux d'IgE totales

Il met en évidence la quantité d'IgE totales circulantes.

Quarante-trois pour-cent des adultes porteurs d'une allergie alimentaire ont un taux en IgE totales supérieur à 300 U/mL (taux normal <150 U/mL) contre 2% dans la population sans troubles allergiques. De même 83% des enfants porteurs d'une allergie alimentaire ont un taux d'IgE totales supérieur à la normale. Néanmoins il n'existe pas de lien direct entre l'allergie

alimentaire et le taux d'IgE. Il ne donne qu'une probabilité d'allergie de type immédiat (Moneret-Vautrin et André 1983).

1.2.6.3 Taux d'IgE spécifiques

Il met en évidence la quantité d'IgE circulantes spécifiques de l'allergène.

Ce dosage ne peut être prescrit que lorsqu'on a une idée des antigènes en cause, après un interrogatoire minutieux et la connaissance des résultats des tests cutanés. Le test le plus couramment utilisé est le RAST (Radioallergo-sorbent test). L'allergène est fixé en phase solide. Le sérum étudié est ajouté pour permettre la fixation des IgE. Les anticorps non fixés sont éliminés par lavages et les anticorps fixés révélés par anticorps anti-IgE radiomarqués à l'iode ¹²⁵I.

Cette technique proposée par Johansson *et al.* en 1971 a permis une meilleure connaissance des allergies de type immédiat (Johansson SG, *et al.* 1971).

1.2.6.4 Test de provocation orale en double aveugle contre placebo (DBPCFC)

En pratique, ce test est réalisé en conditions hospitalières. Il consiste en l'administration d'une dose initiale faible (25 à 500 mg) de l'aliment frais ou d'un placebo, placée dans une capsule opaque ou mélangée à une boisson capable de masquer le goût. La dose est doublée toutes les 15 à 60 minutes. Ni le patient ni l'observateur ne connaissent le contenu de la capsule. Le test est considéré comme positif lorsque des symptômes cutanés, rhino-pharyngés, pulmonaires ou gastro-intestinaux surviennent dans les deux heures qui suivent l'administration orale (Bock SA 1986 ; Sampson 1988 ; Sampson HA 1999b).

1.2.6.5 Histamino-libération Leucocytaire (HLL)

Elle met en évidence les basophiles circulants ayant des IgE à leur surface. La fixation de l'allergène par deux IgE provoquera la dégranulation des basophiles et une libération de médiateurs, en particulier de l'histamine (Osler AG, *et al.* 1968).

Le test d'histamino-libération est une méthode de recherche de laboratoire spécialisée. Cette méthode ne trouve son indication dans le diagnostic des allergies alimentaires que pour des aliments non disponibles sous forme d'extraits commerciaux.

1.2.7 Epidémiologie de l'allergie alimentaire

1.2.7.1 Prévalence de l'allergie alimentaire

La prévalence de l'allergie alimentaire semble en augmentation. En France par exemple, les formes les plus sévères ont été multipliées par un facteur cinq entre les années 1980 et 1993 (Moneret-Vautrin DA, *et al.* 1995).

Différentes études épidémiologiques ont montré des allergies alimentaires chez 0,8 à 6% de la population totale et chez 0,8 à 27% des enfants (Tableau 1). D'autre part, à l'âge adulte, les femmes sont plus sujettes à tous les types d'intolérances alimentaires (Young, *et al.* 1994), alors que chez les enfants ce sont les garçons les plus fréquemment atteints.

Tableau 1. Prévalence de l'allergie alimentaire vraie

Pays	Enfants	Adultes	Auteurs
Etats-Unis	0,8 à 1,8%		Asthma and Allergy Foundation (Etats-Unis)
France	3,52%		(Kanny G, <i>et al.</i> 2001)
Hollande	2%		(Jansen, <i>et al.</i> 1994)
Royaume Uni	1,4 à 1,8%		(Young, <i>et al.</i> 1994)
Etats-Unis	8% (< 3 ans)		(Bock 1987)
Finlande	{ 19% à 1 an 27% à 3 ans 8% à 6 ans		(Kajosaari M 1982)
Australie du Sud	7,3%		(Boros CA, <i>et al.</i> 2000)
Suède		6%	(Bjornsson E JC, <i>et al.</i> 1996)

La prévalence est plus importante chez les sujets atopiques : ainsi, Björnsson (1996) note 6% d'allergies alimentaires dans la population générale et 8% lorsque sont ajoutés à la population générale des sujets atopiques (Bjornsson E 1996). Un terrain atopique a d'ailleurs été retrouvé chez 63% des adultes allergiques alimentaires et jusqu'à 90% chez les enfants (Moneret-Vautrin et Kanny 1996 ; Oehling A, *et al.* 1998). En effet, un sujet atopique possède des antécédents personnels (rhinite, asthme, pollinose, eczéma), ou une biologie particulière d'hyperproduction d'IgE (Hassoun S 1997).

1.2.7.1.1 Age

Les allergies alimentaires sont très communes dans l'enfance. Néanmoins, des différences sont observées en fonction de l'âge : ainsi, 19%, 27% et 8% des enfants de 1, 3 et 6 ans respectivement présentent des allergies alimentaires (Kajosaari 1982).

Chez les enfants, les allergies alimentaires sont souvent transitoires (Bock 1987). Par exemple 50 à 90% des symptômes causés par l'œuf, le lait et le soja disparaissent après 3 à 5 ans (Bjornsson E 1996). De même, Sampson & Scanlon remarquent une perte des symptômes allergiques dans plus de 40% des cas chez les enfants en 1 à 3 ans même si les résultats des tests (IgE totales (RAST) et test cutané) restent inchangés (Sampson HA, *et al.* 1989). Malheureusement les allergies à l'arachide, aux fruits secs, aux poissons et aux fruits de mer ne disparaissent pas en vieillissant (Sampson 2000).

1.2.7.1.2 Géographie et habitudes alimentaires

La prévalence varie aussi d'un pays à un autre et ceci en fonction des habitudes alimentaires de chacun. Citons par exemple les pays scandinaves où les hypersensibilités sont essentiellement dues aux fruits et au poisson, alors qu'au Japon c'est l'allergie au soja qui prédomine (Moneret-Vautrin DA 1986) et aux Etats-Unis celle à l'arachide (Ewan PW 1996 ; Sampson 1999a ; Sampson 2000). Sachant qu'un américain consomme environ 3,5 kg d'arachides par an (Ewan 1996) alors qu'un italien n'en mange que 0,68 kg/an (Perelli M, *et al.* 1994) un parallèle peut donc être fait entre la forte consommation d'un aliment et une prévalence élevée de l'allergie à cet aliment.

1.2.8 Qu'est-ce qu'un allergène alimentaire ?

Pour être allergénique, une protéine doit simplement atteindre les cellules immunitaires et les mastocytes, et les stimuler.

Les aliments contiennent habituellement un grand nombre de protéines allergéniques parmi lesquelles on distingue un à trois allergènes majeurs et plusieurs allergènes mineurs. Ainsi on observe une grande variation dans le profil d'IgE antigènes-spécifiques chez des patients pourtant allergiques au même aliment.

1.2.8.1 Nature des aliments allergisants

Les allergènes alimentaires sont très divers. Ils sont aussi bien d'origine animale que végétale (Bonneau JC 1997) mais il semblerait que la plupart des aliments d'origine animale aient un pouvoir allergénique plus important que les fruits ou les légumes (Moneret-Vautrin 1986). Les aliments les plus impliqués dans les maladies allergiques alimentaires sont le poisson (15,4%), les fruits de mer (12,7%), les œufs (12,2%) et le lait (12,2%). Chez l'enfant l'œuf, l'arachide, le poisson et le lait sont les aliments les plus à risque alors que chez les nourrissons le lait est le plus souvent mis en cause du fait de sa consommation presque exclusive (Moneret-Vautrin et André 1983 ; Moneret-Vautrin 1986 ; Moneret-Vautrin et Kanny 1996 ; Moneret-Vautrin DA, *et al.* 1998 ; Young, *et al.* 1994). D'autre part, les additifs, colorants, conservateurs, agents de texture, exhausteurs de goût ou autres enzymes présents dans les préparations culinaires peuvent aussi être allergisants (Moneret-Vautrin 1986). De plus, de nouveaux épitopes allergéniques peuvent résulter de transformations technologiques, de la digestion ou du traitement à la chaleur (Helm RM, *et al.* 2000).

1.2.8.2 Propriétés des allergènes alimentaires

Malgré sa tentative de classification d'environ 40 allergènes connus selon leur structure bi- et tri-dimensionnelle, Aalberse a conclu que les allergènes n'ont pas de traits structuraux communs à tous. Les allergènes étudiés appartiennent en effet à 4 familles structurales

différentes : (1) feuillets β anti-parallèles, (2) feuillets β anti-parallèles associés à une (des) hélice(s) α , (3) structures α et β non intimement associées et (4) des structures en hélices α (Aalberse RC 2000). Toutefois, des caractéristiques générales se dégagent de son étude. Dans la plupart des cas, les allergènes sont des protéines extracellulaires solubles de petite taille (10 à 40 kDa) (Moneret-Vautrin et Kanny 1996), stables, qui ont une structure tri-dimensionnelle compacte. La plupart sont glycosylées (Hefle SL 1999 ; Taylor SL, *et al.* 1996). De plus, une éventuelle activité enzymatique pourrait activer non spécifiquement les cellules immunitaires (Helm et Burks 2000). Les épitopes impliqués sont conformationnels (la structure de surface et celle de l'épitope en particulier étant un critère pertinent pour la fixation de l'anticorps), et/ou séquentiels (l'ordre des acides aminés suffit à conférer l'allergénicité). Pour les allergènes alimentaires ingérés, la digestibilité aussi est à prendre en compte (Aalberse 2000). L'arachide, par exemple, du fait de la faible digestibilité de ses protéines, est un aliment très allergisant (Moneret-Vautrin 1986).

Exception faite de l'arachide, la plupart des allergènes de légumes tels que la banane, la pomme de terre, la pomme sont thermolabiles alors que les allergènes d'origine animale sont thermostables.

1.2.9 Réactions allergiques croisées

Les allergies croisées correspondent à des manifestations cliniques vis-à-vis de plusieurs agents allergéniques différents sans qu'il y ait eu une sensibilisation préalable à chacun de ces agents. Ces manifestations reposent sur une sensibilisation croisée liée à la production d'IgE croisantes capables de reconnaître les différents allergènes en cause. Ces allergènes présentent des homologues allant de la présence d'épitopes communs à l'identité de structure (Jaffuel, *et al.* 2001). Ainsi, selon Aalberse, 70% d'identité entre les deux allergènes sont nécessaires pour observer des réactions croisées. Elles sont rares entre deux allergènes ayant moins de 50% d'identité (Aalberse 2000).

Des réactions croisées entre différents aliments sont souvent observées, ainsi que des réactions entre des allergènes polliniques et alimentaires (certains fruits et légumes) comme par exemple, entre le céleri et l'armoise ou entre la pomme et les bétulacées.

1.2.10 Notion d'allergène majeur

La définition d'allergène majeur n'est pas encore standardisée. Ainsi, pour Aalberse *et al.*, la définition d'un allergène majeur est basée sur la prévalence des IgE ou des réactions cutanées chez les sujets sensibilisés à l'extrait total. Un allergène est dit majeur si plus de 20% des patients sensibilisés à l'extrait total présentent pour l'allergène en question plus de 20% de l'activité observée avec l'extrait total (Aalberse 2000). Pour Moneret-Vautrin *et*

al., le terme allergène majeur est utilisé pour désigner les allergènes contre lesquels au moins 50% des sérums de patients allergiques à l'aliment donné réagissent (Moneret-Vautrin et Kanny 1996).

1.2.11 Thérapies de l'allergie alimentaire

1.2.11.1 Traitement de l'allergie alimentaire

1.2.11.1.1 Eviction de l'aliment incriminé

L'éviction de l'aliment ou d'une famille d'aliments responsable est actuellement le seul traitement efficace. Pour cela, il est bien sûr nécessaire de connaître la composition de tous les aliments ingérés (Sampson HA 1989 ; Taylor SL 1985). Malheureusement cela est parfois rendu difficile par l'absence d'étiquetage informatif précis sur les aliments industriels (Dubuisson C, *et al.* 2002 ; Moneret-Vautrin et Kanny 1996). Il a d'ailleurs été remarqué que la plupart des adultes perdaient leur allergie après une période d'élimination de l'aliment incriminé (Bock SA 1985 ; Ford RP, *et al.* 1982 ; Sampson et Scanlon 1989). Ainsi, afin de déterminer si leur hypersensibilité persiste, il est conseillé aux individus allergiques de retester les aliments responsables tous les 1 à 2 ans, et tous les 3 à 6 ans pour l'arachide, les fruits secs, le poisson et les autres fruits de mer pour lesquels les allergies durent plus longtemps (Sampson 1989).

1.2.11.1.2 Traitement médicamenteux

Les antihistaminiques et l'adrénaline sont essentiellement prescrits pour les symptômes présentés après un épisode allergique. (Atkins FM 1983a). Néanmoins, il semblerait que l'assimilation d'antihistaminiques avant la consommation de lait de vache en permettrait la tolérance en faible quantité (Bahna SL, *et al.* 1983).

1.2.11.1.3 Prévention de l'allergie alimentaire

- L'allaitement

L'allaitement comme traitement préventif est encore débattu. Plusieurs études ont été menées et les résultats s'opposent (Burr ML 1983). L'effet « protecteur » de l'allaitement exclusif au sein pendant 4 à 6 mois (voire plus) vis-à-vis de l'eczéma, paraît en effet établi, cependant, il n'est pas prouvé pour les autres manifestations. (Molckhou P 1999).

Néanmoins, dans le cas de familles à risque atopique, il est aussi conseillé à la mère qui allaite d'éviter certains aliments sensibilisants tels que le lait de vache, l'œuf de poule, le soja, l'arachide et le poisson (Zeiger RS, *et al.* 1989). Le lait maternel protège l'enfant contre une sensibilisation précoce mais n'empêche pas par la suite le développement d'une sensibilisation aux aliments.

- Rythme d'introduction des aliments chez l'enfant

L'introduction différée des aliments retarde, voir diminue, la prévalence de la dermatite atopique avec une relation proportionnelle selon le nombre d'aliments solides introduits avant 4 mois. Kajosaari note de plus que l'association allaitement maternel et introduction différée des aliments (Kajosaari M 1994) est bénéfique en ce qui concerne l'asthme, et la dermatite atopique. En effet, à l'âge de 5 ans, 40% d'un groupe d'enfants ne bénéficiant pas de ces mesures, sont atopiques, contre 27 % pour les enfants ayant longtemps été allaités et dont l'introduction des aliments a été différée.

Ainsi, en pratique il est conseillé aux mères de famille à haut risque atopique de ne diversifier l'alimentation qu'à partir de 6 mois, et d'éviter l'œuf, l'arachide, les oléagineux, le kiwi et le poisson jusqu'à au moins 1 an (Rancé F, *et al.* 2000).

1.2.12 Immunothérapies de l'allergie alimentaire

Plusieurs types d'immunothérapies existent. L'immunothérapie traditionnelle est la désensibilisation, qui fait partie des immunothérapies allergène-spécifiques. Mais d'autres approches non spécifiques de l'allergène ont été envisagées depuis que le déséquilibre Th1/Th2 est reconnu dans l'allergie. Ainsi, en bloquant le développement des lymphocytes Th2 ou la production des molécules effectrices de l'inflammation allergique par les Th2, ou encore en induisant une réponse anti-inflammatoire, les réactions allergiques semblent atténuées voire éteintes.

1.2.12.1 Stratégies spécifiques de l'allergène

1.2.12.1.1 Désensibilisation classique par l'allergène

La désensibilisation est l'administration de petites quantités croissantes d'allergène, la plupart du temps en sous-cutané. Elle est utilisée depuis près d'un siècle. En 1911 déjà, Noon et Freeman s'en servaient contre les pollinoses et les rhinites allergiques (Freeman J 1930 ; Noon L, *et al.* 1911).

La désensibilisation semble d'ailleurs porter ses fruits dans les cas d'allergies aux piqûres d'insectes (Muller U, *et al.* 1992), aux pollens (Di Stanislao C, *et al.* 1997), aux mites (Haugaard L, *et al.* 1993) et au chat (Alvarez-Cuesta E, *et al.* 1994 ; Hedlin G 1991).

Elle reste cependant très controversée pour le traitement des allergies alimentaires (Atkins FM 1983b ; Helm et Burks 2000 ; Soothill JF 1983 ; Soothill JF, *et al.* 1983). En 1998, Patriarca met en place chez les enfants, un protocole standardisé de désensibilisation orale pour l'allergie alimentaire (lait, œuf, cabillaud, pomme) dont le taux de réussite est de 100% pour les individus qui sont allés jusqu'au bout du programme (Patriarca G, *et al.* 1998). Pourtant, l'immunothérapie traditionnelle n'est pas couramment recommandée pour les allergies

alimentaires. En effet, la désensibilisation en sous-cutané a été testée pour l'allergie à l'arachide mais le rapport risque/bénéfice n'est pas acceptable (Nelson HS, *et al.* 1997 ; Oppenheimer JJ, *et al.* 1992).

En ce qui concerne l'allergie au poisson, Freeman fut le premier à tenter de désensibiliser un enfant avec succès. Pourtant cinq mois après la désensibilisation les réactions allergiques s'étaient rétablies (Freeman 1930). Depuis, seules les équipes de Casimir et de Patriarca ont réussi à désensibiliser deux enfants à l'aide d'extraits de cabillaud (Casimir G, *et al.* 1997 ; Patriarca, *et al.* 1998).

Ces contradictions sur l'efficacité de la désensibilisation pour les maladies alimentaires s'expliquent sans doute par les nombreuses différences entre les types d'allergies, les organes cibles, la longueur du traitement et les contraintes des protocoles expérimentaux (Helm et Burks 2000).

D'une manière générale, depuis une vingtaine d'année l'utilisation de la désensibilisation diminue en raison des risques anaphylactiques provoqués parfois sévères, et de l'inefficacité à guérir les patients multi-allergiques. D'autant que les traitements médicamenteux actuels permettent un meilleur rapport risque/bénéfice.

D'autres approches utilisant des protéines recombinantes, des peptides d'allergènes (Norman PS, *et al.* 1996) ou des protéines mutées (Li XM, *et al.* 2000 ; Stanley JS, *et al.* 1997) sont d'ailleurs à l'étude. Elles promettent, par exemple, d'inverser l'allergie à l'arachide chez le modèle murin. Il semblerait que ce type d'allergène induise un état de non-réactivité (anergie) des cellules T une diminution de la quantité d'IgE spécifiques de l'allergène et le passage d'une réponse Th2 à une réponse Th1. Les tests cliniques restent à effectuer (von Garnier C, *et al.* 2000).

Une meilleure connaissance des allergènes majeurs pourraient donc ouvrir la voie à de nouveaux traitements de l'allergie alimentaire ou bien encore à la conception d'aliments hypoallergéniques (Burks W, *et al.* 2001 ; Moneret-Vautrin et Kanny 1996).

1.2.12.1.2 Thérapie à ADN

C'est à partir des années 90 que l'on entend parler de thérapie à ADN.

La première approche utilise l'ADN codant l'allergène. Chez la souris, un plasmide codant un antigène (pDNA) est injecté en sous-cutanée. Le pDNA est pris en charge *in vivo* par les cellules de la souris hôte qui synthétisent alors l'antigène en question. Cette protéine allergénique produite de façon endogène est vraisemblablement présentée aux lymphocytes T *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices de l'antigène (Pardoll DM, *et al.* 1995 ; Raz E, *et al.* 1994 ; Slater JE, *et al.* 1998 ; Spiegelberg HL, *et al.* 1997). L'hôte présente alors une réponse immunitaire durable humorale et cellulaire spécifique de l'antigène. La souris produit alors des anticorps de type IgG_{2a} qui évoquent une réponse

immunitaire où les lymphocytes T helper de type 1 (Th1) prédominent : les isotypes IgG_{2a} étant préférentiellement induits par l'interféron (IFN) γ produit par les Th1. Au contraire, une immunothérapie classique par injection de la protéine native induit préférentiellement une commutation de classe des immunoglobulines IgM en IgE et IgG₁. Ce phénomène est associé à une réponse Th2 où l'interleukine (IL) 4 joue un rôle essentiel (Raz E, *et al.* 1996).

De même, la prise orale de particules de chitosan (dérivé de la chitine) contenant un plasmide codant le gène Ara h2 (allergène de l'arachide) module la réaction allergique murine. L'ADN est protégé de la digestion par le complexe avec le chitosan et est endocyté au niveau gastro-intestinal grâce à la propriété adhésive du chitosan pour la paroi intestinale. Le résultat alors obtenu est une réponse protectrice de type Th1 chez les souris ainsi vaccinées et le basculement de la réponse Th2 pré-existante vers une réponse Th1 (Helm et Burks 2000 ; Li XM, *et al.* 2001 ; Li, *et al.* 2000 ; Nguyen MD, *et al.* 2001 ; Roy K, *et al.* 1999).

Les premières stratégies d'immunothérapies par pDNA montrent l'induction d'une réponse Th1, protectrice contre l'allergie. De plus, chez les rongeurs développant une réponse allergique Th2, on peut inverser le processus et les protéger de l'allergie (Horner AA, *et al.* 2000 ; Hsu CH, *et al.* 1996 ; Nguyen, *et al.* 2001 ; Raz, *et al.* 1996 ; Roy, *et al.* 1999 ; Slater, *et al.* 1998 ; Tighe H, *et al.* 2000).

Par ailleurs, plusieurs équipes (Horner, *et al.* 2000 ; Nguyen, *et al.* 2001 ; Tighe, *et al.* 2000) ont montré que la vaccination par l'allergène associé à une séquence oligodéoxynucléotidique immunostimulante (ISS-ODN en anglais) réduit significativement le risque de mortalité après présentation de l'allergène, par passage en réponse Th1 chez les souris, lapins ou singes ayant une réponse Th2 pré-existante. De plus, le niveau d'histamine plasmatique est réduit. Ce type de vaccin à ADN empêche le développement d'une réponse Th2 dominante. Par contre la vaccination par la protéine seule, qui est l'équivalent de la désensibilisation traditionnelle, ne fournit pas de protection contre l'anaphylaxie et n'empêche pas le passage en réponse Th2. Les séquences ISS-ODN sont des séquences simples brins palindromiques du type « 5' purine-purine-CpG-pyrimidine-pyrimidine 3' » dont le motif CpG non méthylé est immunostimulateur (immunité innée) (Klinman DM, *et al.* 1996 ; Sato Y, *et al.* 2000 ; Sato Y, *et al.* 1996 ; Yamamoto S, *et al.* 1992). L'ISS-ODN joue dans ce cas un rôle d'adjuvant qui induit la sécrétion d'IFN α , IFN β , IFN γ et IL-12 nécessaire à l'induction d'une réponse Th1, mais elle peut aussi être administrée seule (Bohle B, *et al.* 1999), ou avec un ADN codant l'allergène (Hsu, *et al.* 1996).

1.2.12.2 Stratégies non spécifiques de l'allergène

Ces stratégies devraient convenir aux patients multi-allergiques pour lesquels le traitement de chaque allergie est complexe et onéreux. En effet, en inhibant le développement des Th2 ou en inhibant les molécules effectrices de la réaction inflammatoire de l'allergie telles

que l'IL4, l'IL5, l'IL13, les IgE les patients devraient « tolérer » les allergènes en basculant en réponse immunitaire Th1 majoritaire.

Des essais de thérapie par anticorps anti-IgE sont en test aux Etats-Unis. Ainsi les IgE fixées aux anti-IgE sont incapables de fixer leurs récepteurs sur les mastocytes et les basophiles (Burks, *et al.* 2001 ; Milgrom H, *et al.* 1999 ; Nelson, *et al.* 1997 ; Sampson 2000). Rudolf *et al.* suggèrent que les anti-IgE changeraient la conformation des IgE et les empêcheraient ainsi de reconnaître leurs récepteurs (Rudolf MP, *et al.* 1996). Un autre type de thérapie par ODN (oligodéoxynucléotidique) utilise des ADN anti-sens pour inhiber la production des médiateurs de l'inflammation allergique ou de leurs récepteurs (Metzger WJ, *et al.* 1999).

Des ADNc codant l'IFN γ et/ou l'IL-12 sont utilisés comme adjuvants pour l'induction de réponse de type Th1 dans le cas de l'asthme induit par allergène (Kumar M, *et al.* 2001). Kang a lui mis en évidence qu'un ADNc codant l'IL-4, co-injecté avec l'ovalbumine, supprime la production d'IgE en inhibant la voie Th2 plutôt que de l'accentuer (Helm et Burks 2000 ; Kang KW, *et al.* 1999 ; Metzger et Nyce 1999).

1.2.12.2.1 Stratégie anti-inflammatoire

Malgré toutes les recherches effectuées dans le but de faire basculer une réponse allergique Th2 en réponse Th1, les travaux de Yazdanbahsh *et al.* suggèrent une toute autre stratégie qui est de s'orienter plutôt vers l'induction d'une voie de régulation anti-inflammatoire où l'importance de l'IL-10 est d'ailleurs mise en évidence (Yazdanbakhsh, *et al.* 2002). Il semble, en effet, que les patients parasités par des helminthes dans les pays en voie de développement, présentent de fortes réponses de type Th2 aux allergènes mais ne développent pas d'allergies. Leur forte exposition aux pathogènes a « éduqué » leur système immunitaire. Selon Yazdanbahsh *et al.*, des cellules T régulatrices produiraient des cytokines supprimeuses permettant ainsi le contrôle des cellules T (Th1 et Th2) et des effecteurs. Cela pourraient probablement être la clef du contrôle des maladies allergiques

1.2.12.3 Modèles animaux

Les études pré-cliniques *in vivo* sont essentiellement effectuées chez la souris et le rat. Bien qu'il n'existe pas de modèle animal totalement satisfaisant pour étudier les allergies alimentaires, quelques modèles animaux sont à l'étude. Ils permettent d'étudier les particularités cliniques et les mécanismes d'immunopathogénicité des allergies alimentaires médiées par IgE. Les principales recherches visent à établir des modèles animaux d'anaphylaxie induite par les aliments, à améliorer une allergie médiée par IgE en cours et à prévenir l'allergie alimentaire.

Par exemple, Li *et al.* ont récemment mis au point un modèle murin pour l'allergie à l'arachide qui mime les réponses allergiques humaines (Li, *et al.* 2000).

Pour leur part, Oettgen *et al.* ont montré que des souris sans IgE (portant une mutation « null » homozygote du gène $C\epsilon$) et sensibilisées à un allergène, et des souris sauvages elles aussi sensibilisées, développent les mêmes réponses allergiques (Oettgen HC, *et al.* 1994). Elles ne sont donc pas le modèle idéal pour étudier les allergies IgE-médiées. En effet, il semble que chez l'homme, l'anaphylaxie allergène-spécifique soit principalement médiée par la dégranulation des mastocytes provoquée par la fixation des IgE spécifiques sur les récepteurs (Rfc ϵ) des mastocytes eux-mêmes, alors que chez les souris les voies sont multiples (Sampson 1999a).

Hengge *et al.* ont montré qu'un vecteur codant la β -galactosidase est pris en charge par des cellules cutanées humaines transplantées chez une souris nude immunodéprimée (Hengge UR, *et al.* 1996). Et Tighe *et al.* a fait des tests probants chez la souris, le lapin et les primates avec des ISS-ODN conjuguées à l'allergène (Tighe, *et al.* 2000).

Le passage aux tests cliniques chez l'humain est encore rare.

2 L'ALLERGIE AU POISSON

2.1 Introduction

Le poisson est l'un des cinq aliments les plus incriminés dans l'allergie alimentaire. Il provoque 3 à 5% des allergies alimentaires. En Italie par exemple, avec le lait et les fruits de mer, le poisson est l'un des aliments le plus souvent responsable de chocs anaphylactiques (Novembre, *et al.* 1998).

L'allergie au poisson n'est pas différente des autres allergies alimentaires. Toutefois des cas d'allergie au poisson ont été décrits après simple inhalation de vapeurs de cuisson de poisson (Crespo JF, *et al.* 1995 ; Rodriguez J, *et al.* 1997), ou encore par simple contact (Alonso MD, *et al.* 1993 ; Dominguez C, *et al.* 1996 ; Sanchez CD, *et al.* 1994) Les principales manifestations cliniques sont de type cutané, digestif et/ou respiratoire.

D'autre part, de nombreuses réactions croisées sont observées entre différentes espèces de poissons. Ainsi une personne allergique au cabillaud est souvent allergique à d'autres poissons (Aas K 1966a ; Aas K 1966c ; de Martino M, *et al.* 1990 ; Pascual C, *et al.* 1992). C'est pourquoi le cabillaud est un bon index pour l'étude de l'allergie au poisson (de Martino, *et al.* 1990).

2.2 Les allergènes de poisson

2.2.1 Les allergènes de type parvalbumine

2.2.1.1 L'allergène majeur du cabillaud

2.2.1.1.1 Purification de l'allergène majeur du cabillaud

Le premier allergène de poisson a été isolé chez le cabillaud de la mer Baltique (*Gadus callarias*) par Aas *et al.* en 1966 : les protéines musculaires du cabillaud ont tout d'abord été extraites dans une solution de NaCl 0,9%, phénol 0,5% pH5,6 (Aas K 1966b). Elles ont ensuite été séparées par chromatographie DEAE-Cellulose (Aas K 1967). Deux pics DEAE I et DEAE III ont été élués respectivement avec des forces ioniques de 0,01 M et 0,15 M. Leur allergénicité a été étudiée par tests cutanés : sur 20 enfants allergiques au cabillaud testés, aucun n'a donné de réponse positive avec la fraction DEAE I alors que tous ont répondu positivement avec la fraction DEAE III. Un des enfants a subi les tests Prausnitz-Küstner (PK) reposant sur le transfert passif de l'allergie à un receveur. Les tests sont positifs pour les 2 fractions mais est moindre d'un facteur 10^6 avec la fraction DEAE III. Des tests de provocation orale ont aussi été effectués sur un des enfants. L'ingestion de 15 mg de la fraction DEAE I ne lui a provoqué aucune réaction, alors qu'à peine 2 minutes après l'ingestion de 0,05 mg de la fraction DEAE III, il a déclenché une violente réaction (Aas 1967).

Les deux fractions DEAE I et DEAE III ont été analysées par électrophorèse sur disque. Elles présentent respectivement 4 et 6 bandes protéiques. Les bandes P3 et P4 de la fraction DEAE III ont provoqué les réactions cutanées les plus fortes chez les patients allergiques au cabillaud (Aas 1967).

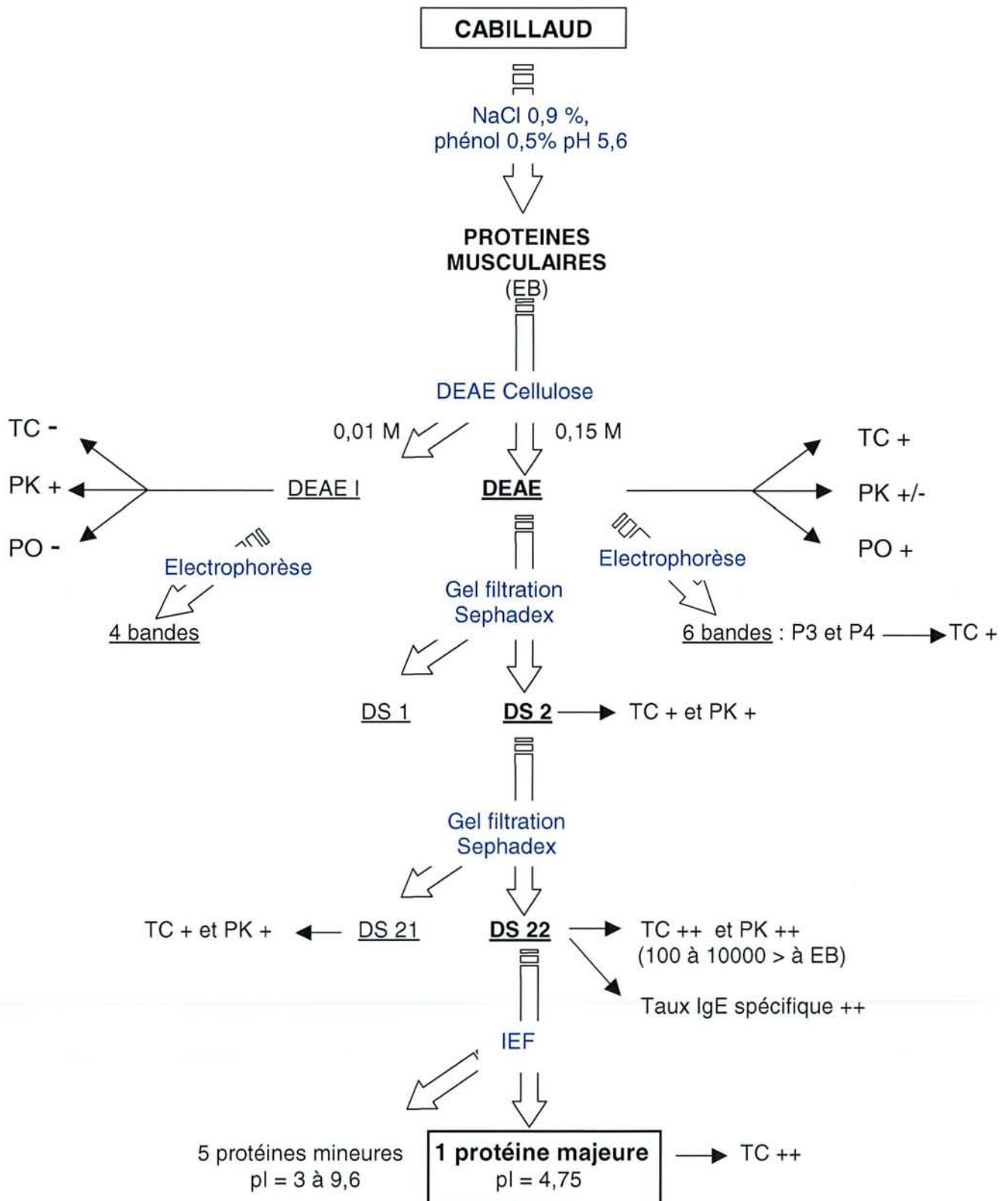
Les protéines de la fraction DEAE III (aussi appelée fraction D) ont été séparées par filtration sur gel Sephadex G75 (Aas K, *et al.* 1967). Deux pics, DS1 et DS2, ont été obtenus. La fraction DS2 présentait l'activité allergénique la plus forte d'après les tests cutanés et PK effectués. La fraction DS2 a elle-même été fractionnée sur gel Sephadex 75 dans les mêmes conditions. Les fractions DS21 et DS22 obtenues montrent toutes les deux une activité allergénique, la plus forte étant associée à DS22. La fraction DS22 se montre 100 à 10000 fois plus allergénique que l'extrait brut de cabillaud en tests cutanés et PK. D'autre part, les enfants allergiques au cabillaud testés présentaient un fort taux d'IgE spécifiques dirigées contre la fraction DS22 (Aas K, *et al.* 1973).

Pour finir, la fraction DS22 a été séparée sur une colonne d'isoélectrofocalisation (IEF). Une fraction majeure de point isoélectrique (pI) 4,75 et cinq fractions mineures de pI compris entre 3,0 et 9,6 ont été obtenues. La fraction majoritaire de pI 4,75 provoquait les réactions cutanées les plus intenses (Elsayed S, *et al.* 1971b). Cette protéine a été baptisée allergène M (pour allergène majeur) ou Gad cl (pour 1^e allergène isolé chez *Gadus callarias*) selon la

nomenclature officielle. Un schéma récapitulatif de la purification de l'allergène majeur du cabillaud est présenté en Figure 3.

Figure 3. Purification de l'allergène majeur de *Gadus callarias*

PK : test de Prausnitz-Küstner TC : test cutané, PO test de provocation orale, + : positif, ++ : très positif, - : négatif, +/- : faible



2.2.1.1.2 Caractérisation de l'allergène majeur du cabillaud

- Séquence protéique

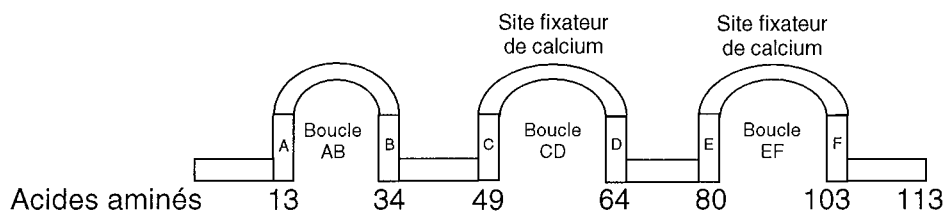
L'allergène M a ensuite été caractérisé par Elsayed, membre de l'équipe de Aas. Une stratégie de séquençage peptidique lui a permis de déterminer la composition en acides aminés de Gad cl (Elsayed S, *et al.* 1975). L'hydrolyse à la trypsine de cette protéine a généré deux fragments TM1 et TM2 séquencés séparément par dégradation d'Edman (Elsayed S, *et al.* 1972 ; Elsayed et Bennich 1975 ; Elsayed S, *et al.* 1973 ; Elsayed S, *et al.* 1974).

Gad cl est une parvalbumine β composée de 113 acides aminés et d'une molécule de glucose (Elsayed SM, *et al.* 1970). Sa masse moléculaire est d'environ 12,3 kDa. Quinze résidus aspartate et 11 résidus glutamate lui confèrent un caractère acide (pI 4,75).

Par analogie avec les autres parvalbumines connues, l'allergène Gad cl est constitué de 3 domaines structuraux : AB, CD et EF, les domaines CD et EF fixant le Ca^{2+} (Figure 4).

L'allergène Gad cl sert aujourd'hui de référence en terme d'allergènes de poisson.

Figure 4. Représentation schématique de l'allergène Gad cl d'après Elsayed et Apold (1983).
Les zones grisées A, B, C, D, E, et F sont des hélices α .



- Séquences allergéniques

La détermination des séquences allergéniques a été entreprise par Elsayed *et al.* L'activité allergénique de Gad cl conservée après dénaturation par l'urée 8 M suggérait que l'activité allergénique était principalement due à la séquence en acides aminés (Elsayed S, *et al.* 1971a). Une hydrolyse trypsique limitée a été effectuée pour scinder l'allergène en plusieurs fragments. Les fragments comprenant les résidus 21-44, 21-45 et 33-48 ont inhibé le dosage des IgE spécifiques dirigées contre Gad cl (Elsayed S, *et al.* 1976). La région **33-44** à la jonction des boucles AB et CD apparaît donc comme étant un site allergénique. De même, les régions **88-96** au niveau du site de fixation du Ca^{2+} de la boucle EF et **65-76** à la jonction de la boucle CD et EF sont également des sites allergéniques (Apold J, *et al.* 1980 ; Elsayed S, *et al.* 1977). Les fragments 33-44 et 65-76 présentent une forte homologie de séquence en acides aminés suggérant à Apold & Elsayed (1980) la répétition de déterminants allergéniques dans la protéine Gad cl (Apold et Elsayed 1980). Les fragments non accessibles par hydrolyse ont été

synthétisés. L'allergénicité de la région 88-96 a été confirmée par la synthèse du fragment 88-103, et celle des fragments **13-32** et **41-64** correspondant respectivement aux boucles AB et CD a aussi été établie (Elsayed S, *et al.* 1983 ; Elsayed S, *et al.* 1981 ; Elsayed S, *et al.* 1980). La région 41-64 possède de plus, trois tétrapeptides DExK séparés par six résidus dans un segment de 24 résidus qui constituerait la séquence minimale d'un épitope allergénique (Elsayed S, *et al.* 1982)

2.2.1.2 L'allergène majeur du saumon

Chez le saumon (*Salmo salar*), deux isoformes d'un même allergène ont été identifiées (Lindstrom CD, *et al.* 1996). Cet allergène est nommé Sal si selon la nomenclature et les deux isoformes 14.1 et 24.1. Ces deux isoformes sont comme Gad cl chez le cabillaud, des parvalbumines β . Sal si est l'allergène majeur du saumon car sept patients sur 11 testés présentent des IgE spécifiques. Le séquençage nucléotidique de deux clones de parvalbumine de saumon a permis d'identifier les deux isoformes 14.1 et 24.1 présentant respectivement 50,1% et 57,4% d'identité avec Gad cl. Ces pourcentages sont plus élevés au niveau des boucles CD et EF où sont situés certains déterminants allergéniques de Gad cl.

2.2.1.3 L'allergène majeur de la carpe

L'allergène majeur de la carpe a été purifié par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie DEAE Sepharose, et caractérisé par isoélectrofocalisation (IEF), dichroïsme circulaire et spectrométrie de masse (Bugajska-Schretter A, *et al.* 2000). Sa structure tridimensionnelle (Figure 5) est connue depuis 1973 (Kretsinger RH, *et al.* 1973). Son allergénicité a été testée par immunodétection, inhibitions et histamino-libération. Comme pour le cabillaud et le saumon il s'agit d'une parvalbumine β . Son pI est de 4,7. Sa masse moléculaire d'environ 11,5 kDa correspond bien à celui de la parvalbumine de carpe déjà étudiée par Coffee *et al.* (Coffee CJ, *et al.* 1973). Le tableau 2 présente un récapitulatif des différents parvalbumines responsables d'allergies alimentaires.

Figure 5. Structure tridimensionnelle de la parvalbumine β de carpe déterminée par diffraction aux rayons X. Les sphères roses sont des ions Ca^{2+} fixées au niveau des boucles CD et EF.

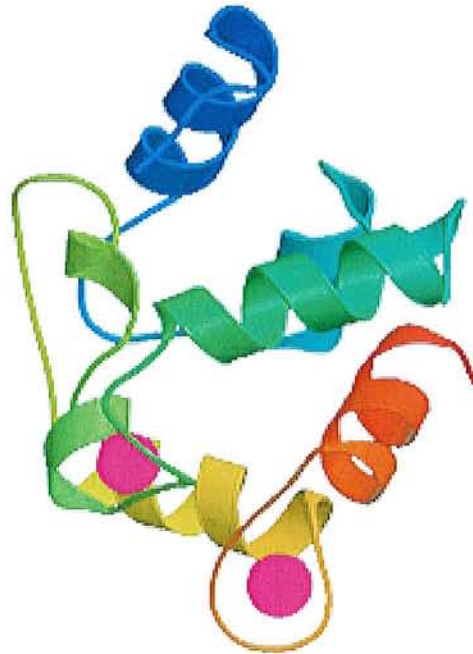


Tableau 2. Parvalbumines allergéniques identifiées dans les aliments.
Aucune parvalbumine n'a été détectée sous forme d'oligomères

Nom	Origine	Masse moléculaire	pI
Sal s1 (12.1 et 24.1)	<i>Salmo salar</i> (saumon)	11,4 kDa	4,74
Gad c1	<i>Gadus callarias</i> (cabillaud de la mer Baltique)	12,3 kDa	4,75
Cyp c1 (01 et 02)	<i>Cyprinus carpio</i> (carpe)	11,4 kDa	4,74
Ran s1	<i>Rana sp.</i> (grenouille)	11,9 kDa	4,90
Ran e1	<i>Rana esculenta</i> (grenouille)	11,7 kDa	4,95

2.2.1.4 Parvalbumines

2.2.1.4.1 Caractéristiques

Les parvalbumines représentent une sous-famille de protéines à "mains EF" liant le calcium (Berchtold MW 1989 ; Goodman M, *et al.* 1979 ; Hermann A, *et al.* 1991). Elles ont tout d'abord été identifiées comme étant de petites protéines acides (10-12 kDa, pI 3,9-5,5) présentes dans les muscles à contraction rapide des vertébrés inférieurs et supérieurs (Blum HE, *et al.* 1977 ; Coffee et Bradshaw 1973 ; Declercq JP, *et al.* 1991 ; Kretsinger et Nockolds 1973 ; Lehky P, *et al.* 1974 ; Pechere JF, *et al.* 1971a ; Pechere JF, *et al.* 1971b ; Pechere JF, *et al.* 1971c). Elles ont ensuite été rencontrées dans d'autres tissus tels que ceux du système nerveux central (Endo T, *et al.* 1985a ; Heizmann CW 1993 ; Hof PR, *et al.* 1999)

et dans les glandes endocrines (Endo T, *et al.* 1985b). D'autre part, elles ont aussi été observées chez les végétaux (Valenta R, *et al.* 1998).

2.2.1.4.2 Structure

Les parvalbumines sont constituées de six segments hélicoïdaux (A à F) formant six motifs en « mains EF » (AB, CD, et EF). Chaque motif est formé de 2 hélices α relié par une boucle centrale fixatrice de l'ion Ca^{2+} . Seules deux des trois « hélices-boucles-hélices » (CD et EF) sont fonctionnelles et peuvent donc chélater les ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} , le 3^e domaine (AB) formant une sorte de coiffe couvrant la surface hydrophobe des deux domaines fonctionnels (Declercq, *et al.* 1991 ; Kretsinger et Nockolds 1973). Les boucles des domaines de fixation CD et EF sont constituées des 12 acides aminés en orientation perpendiculaire par rapport aux hélices du domaine tandis que la boucle AB est tronquée (10 acides aminés) et se situe en position antiparallèle aux hélices (Pauls TL, *et al.* 1996). Les sites de fixation CD et EF présentent aussi de courts segments en structure β importants pour le couplage des deux motifs "en main EF". En effet, le motif « double main EF » est l'élément structural de base à toutes les protéines fixatrices de calcium.

Si l'on tient compte de la séquence protéique, la famille des parvalbumines peut être subdivisée en deux sous-familles : les parvalbumines de type α (généralement 109 acides aminés, $pI > 5$) et les parvalbumines de type β (le plus souvent 108 acides aminés, $pI < 5$) qui comprend l'oncomoduline (Goodman M, *et al.* 1977). La fixation du Ca^{2+} ou Mg^{2+} induit des réarrangements conformationnels (Haiech J, *et al.* 1979) mais à ce jour aucun ligand n'a été identifié. Les parvalbumines sont nommées « buffer proteins » car elles diminuent la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique libre par un système passif, par opposition à d'autres protéines en « mains EF » nommées « trigger proteins » qui activent de nombreuses autres protéines lorsque le Ca^{2+} y est fixé (Hof, *et al.* 1999).

2.2.1.4.3 Fonctions

- Rôle dans la contraction / relaxation des muscles

C'est le rôle le plus connu des parvalbumines : les parvalbumines seraient impliquées dans le processus de relaxation des muscles à contraction rapide des vertébrés supérieurs et inférieurs en facilitant le transport des ions Ca^{2+} des myofibrilles vers le réticulum sarcoplasmique (Heizmann CW 1984 ; Heizmann CW, *et al.* 1982 ; Pauls, *et al.* 1996).

- Rôle dans le maintien de la concentration cellulaire en calcium

Les fonctions physiologiques des parvalbumines ne sont pas encore bien déterminées mais elles pourraient aussi intervenir indirectement dans de nombreuses activités mettant en jeu les ions calcium.

Il se pourrait par exemple qu'elles aient un rôle indirect sur le signal de transduction où les modifications du niveau d'ions Ca^{2+} cytosoliques influent sur l'expression de gènes précoces tels que *c-fos* et *c-jun* (Bading H, *et al.* 1993 ; Werlen G, *et al.* 1993), ou bien encore sur le contrôle du cycle cellulaire ou de la différenciation.

Des effets de protection contre la surcharge en ions Ca^{2+} (souvent un événement précoce dans le développement de problèmes cellulaires) ont été observés (Chard PS, *et al.* 1993 ; Dowd DR 1995 ; Heizmann 1993 ; Nitsch C, *et al.* 1989 ; Pauls, *et al.* 1996). Par exemple, l'absence de parvalbumine et de calbindin-D28K dans les moto-neurones les rend plus vulnérables, ce qui peut avoir pour conséquence une sclérose amyotrophique latérale (Appel SH, *et al.* 2001).

2.2.1.5 Conservation entre espèces

De nombreuses réactions croisées ont été observées entre différents poissons. Ainsi, un patient allergique à une espèce de poisson en particulier a de fortes chances d'être allergiques à d'autres espèces (de Martino, *et al.* 1990 ; Hansen TK, *et al.* 1997 ; Swoboda I, *et al.* 2002). Les allergènes présentent donc d'une espèce à une autre des épitopes communs ou très conservés.

Chez les parvalbumines par exemple la conservation entre différentes espèces de poissons a été observée par l'alignement des séquences notamment au niveau des sites de fixation du calcium qui sont des épitopes allergéniques (Gazzaz SS, *et al.* 1993 ; Lindstrom, *et al.* 1996 ; Thatcher DR, *et al.* 1977).

2.2.1.6 Autres allergènes de la famille des protéines fixatrices de calcium

Les allergènes de la famille des protéines liant le calcium ont été identifiés chez des plantes (pollen essentiellement), des poissons (muscle) ou chez l'homme (dans différents organes). Les allergènes peuvent contenir d'une à quatre « mains EF ». Par exemple, les allergènes Bet v 4 de pollen de bouleau (Engel E, *et al.* 1997 ; Twardosz A, *et al.* 1997) et Ole e 3 de pollen d'olivier (Batanero E, *et al.* 1996) contiennent deux mains EF tandis que Bet v 3 un autre allergène de pollen de bouleau (Seiberler S, *et al.* 1994) et Gad cl, l'allergène majeur du cabillaud de la mer Baltique (Aas et Jebsen 1967) en contiennent trois (Ikura M 1996 ; McPhalen CA, *et al.* 1991).

2.2.2 Autres types d'allergènes chez le cabillaud

2.2.2.1 Différentes cartographies d'allergènes de cabillaud

Gad cl n'est pas le seul allergène de cabillaud. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence d'autres bandes IgE-réactives dans le cabillaud.

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE de la fraction DEAE III ayant servi à purifier Gad cl, a permis de révéler 15 bandes protéiques de 12 à 92 kDa (Hemmens VJ, *et al.* 1989) dont 6 sont détectées par les IgE de patients allergiques au cabillaud. Les IgE spécifiques de Gad cl de deux patients ont été éluées et retestées sur la fraction DEAE III montrant dans un des cas une fixation exclusive sur Gad cl et dans l'autre cas une fixation à Gad cl et à quatre autres bandes protéiques de 17, 21, 24, et 47 kDa. Ceci suggère qu'il existerait au moins un déterminant allergénique commun à différents allergènes du cabillaud.

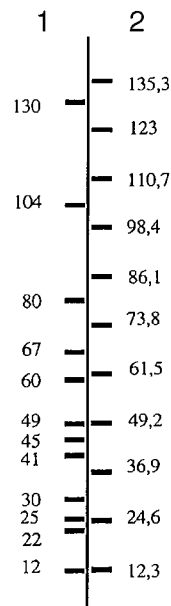
En 1992, une autre équipe a obtenu en immunodétection, à partir d'un extrait protéique de cabillaud cru, sept bandes IgE-réactives de masses moléculaires apparentes comprises entre 12 et 78 kDa, en utilisant le sérum d'un patient allergique au saumon (Bernhisel-Broadbent J, *et al.* 1992a ; Bernhisel-Broadbent J, *et al.* 1992b).

Notre équipe (Mata E, *et al.* 1994) a alors comparé l'allergénicité du cabillaud avec le surimi de cabillaud, produit de transformation dont la plupart des protéines sarcoplasmiques ont été éliminées. Les protéines allergéniques des extraits ont été isolées par filtration sur gel et séparées par SDS-PAGE. L'extrait protéique de cabillaud contenait 4 bandes de 13, 25, 37, et 63 kDa alors que seule la bande protéique de 63 kDa était observée dans l'extrait de surimi.

Une autre étude réalisée sur 8 patients allergiques au cabillaud a révélé 8 bandes IgE-réactives (Hansen, *et al.* 1997). Les tailles apparentes de ces protéines étaient comprises entre 12 et 101 kDa. Seul un des patients présentait un profil à 8 bandes.

Enfin la cartographie la plus complète a été réalisée par notre équipe en 1998 (Dory D, *et al.* 1998). La mise au point d'un protocole optimisé d'immunodétection a permis d'identifier 15 bandes IgE-réactives présentes dans des extraits de cabillaud *pre rigor mortis*, *post rigor mortis* et obtenus après chromatographie échangeuse d'ions. Huit bandes IgE-réactives ont été obtenues en utilisant un mélange de 12 sérums de patients allergiques au cabillaud. Les tailles des protéines observées à partir de cabillaud *pre rigor mortis* sont de 12, 22, 30, 45, 60, 67, 104, et 130 kDa. Plusieurs bandes IgE-réactives n'avaient jamais été visualisées comme par exemple celles de hauts poids moléculaires à 104 et 130 kDa. Sept bandes supplémentaires de tailles 13, 23, 25, 41, 49, 55, et 80 kDa ont été détectées par séparation de l'extrait brut de cabillaud sur chromatographie échangeuse d'ions. La plupart de ces bandes protéiques sont par ailleurs également reconnues par un anticorps dirigé contre les parvalbumines suggérant que le site reconnu par cet anticorps, à savoir un site de fixation du calcium, pourrait être commun à plusieurs bandes IgE-réactives. D'autre part, compte tenu des masses moléculaires apparentes des bandes IgE réactives observées, l'hypothèse d'une oligomérisation de l'allergène majeur de cabillaud (une parvalbumine liant le calcium) a été envisagée par notre groupe (Figure 6). Une étude préliminaire met d'ailleurs en évidence une plus faible détection des protéines susceptibles d'être des oligomères en présence de 5mM d'EDTA, par les IgE d'un mélange de sérums de patients allergiques au cabillaud (Dory, *et al.* 1998).

Figure 6. Comparaison entre les bandes IgE-réactives de cabillaud et reconnues par l'anticorps anti-parvalbumine, et les multiples d'allergène majeur du cabillaud.
Piste 1 : bandes IgE réactives et reconnues par une anti-parvalbumine ; piste 2 multiples d'allergène majeur Gad cl (Gadus callarias).



D'après Dory *et al.*, 1998

2.2.2.2 La P41

Notre équipe a alors choisi d'étudier la protéine de poids moléculaire apparent 41 kDa (P41) et dont la teneur relative dans les tissus était influencée par l'état de conservation du cabillaud. La P41 a été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium 80% de l'extrait protéique brut de cabillaud *pre rigor mortis*, suivie d'une chromatographie sur gel d'hydroxylapatite. Le pic I obtenu à force ionique 0,01 M est alors séparé par électrophorèse préparative en conditions dénaturantes et réductrices (Galland AV, *et al.* 1998). Un début de caractérisation de la P41 a été entrepris par Galland *et al.* Cette protéine de masse moléculaire apparente de 41 kDa semble être non glycosylée et avoir un pI estimé à 5,8 par isoélectrofocalisation réalisée en conditions natives sur PhastSystem. Sa composition en acides aminés a été déterminée, et le peptide N-terminal « DEVxINGFGKIGxL » ainsi qu'un peptide interne « VIHDNFGIVE » ont été séquencés. Ces séquences peptidiques montrent des similitudes avec la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase de plusieurs espèces (Galland-Irmouli AV 1999).

2.2.2.3 La P24

La P24 est la deuxième protéine que nous avons choisi d'étudier suite à la cartographie effectuée par Dory *et al.* Cette protéine semble en effet proche de l'allergène majeur du cabillaud de la mer Baltique Gad cl, car elle est détectée par un anticorps anti-parvalbumine (Dory, *et al.* 1998). Elle présente néanmoins des propriétés électrophorétiques différentes puisque sa masse moléculaire apparente en SDS-PAGE est de 24 kDa.

But du travail

Devant l'accroissement des cas d'allergies alimentaires, de nombreuses équipes se sont attachées à faire progresser les connaissances sur les mécanismes de l'allergie et sur les facteurs les influençant, dans l'espoir de trouver des méthodes de prévention ou de traitement efficaces.

D'autre part, le développement de méthodes de détection des allergènes et la caractérisation précise de ces allergènes semblent impératifs pour une bonne gestion du risque allergique par les industriels.

Le Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition de Nancy en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie des Protéines et Qualité de l'Iframer de Nantes s'est intéressé au poisson (l'un des aliments les plus allergisants) dans le cadre d'une étude des propriétés allergéniques des produits d'origine marine. Ceci afin de mieux maîtriser la qualité des produits de la mer. Le type d'allergie qui est étudié est l'allergie IgE-dépendante.

Le présent travail s'inscrit dans la continuité des précédents travaux de notre équipe qui ont mis en évidence de nombreuses protéines IgE-réactives susceptibles d'être des allergènes et ont isolé certaines d'entre elles.

Nous nous sommes focalisés sur deux protéines allergéniques différentes de par leur taille, leur famille protéique et leur quantité dans les tissus de cabillaud. L'une d'entre elles est une protéine de masse moléculaire apparente de 24 kDa qui est détectée par un anticorps anti-parvalbumine comme les allergènes majeurs connus chez le poisson. La seconde quant à elle, est une protéine de masse moléculaire apparente de 41 kDa et dont la teneur relative dans les tissus est fonction du temps de conservation du cabillaud.

La purification des protéines et le séquençage de peptides a permis de débiter notre travail d'identification et de caractérisation de nouveaux allergènes de cabillaud.

Les objectifs de ce travail étaient de mieux comprendre la physiopathologie de ces deux allergènes dans le but de proposer des outils de diagnostics, de traçabilité, voire de tester la vaccination par ADN. Cette étude a donc d'abord consisté à identifier les deux protéines choisies, et à les caractériser d'un point de vue moléculaire et allergénique. L'étape d'identification est effectuée par biologie moléculaire. L'étude de l'immunoréactivité est réalisée *in vitro* grâce à des sérums de patients allergiques, d'une part à partir de protéine extraite, et d'autre part à partir de protéine recombinante.

Matériels et Méthodes

1 Identification des protéines allergéniques P24 et P41 par la biologie moléculaire

1.1 Origine du matériel

Les cabillauds utilisés pour l'étude ont été pêchés par l'IFREMER lors de campagnes océanographiques au large de la Bretagne. Les filets sont prélevés sur les poissons *pre rigor mortis* et congelés à bord du bateau. Ils arrivent ainsi congelés au laboratoire.

1.2 Identification des ADNc des protéines allergéniques P24 et P41

Les ARN totaux sont alors extraits du muscle de cabillaud par gradient de Chlorure de Césium (Fiche 1). Par ailleurs, les microséquençages des deux protéines, effectués par le Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Institut Pasteur, ont permis d'obtenir les séquences de plusieurs peptides (deux pour chacune des protéines) (Fiche 2). De ces peptides ont été déduits des amorces nucléotidiques dégénérées ou non dégénérées correspondantes (Fiche 3). Les ADNc de muscle de cabillaud sont obtenus par transcription inverse (RT) à partir des ARN totaux extraits et d'une amorce s'hybridant avec la queue poly-A des ARNm (Fiche 4). Les séquences des ADNc correspondant à chacune des protéines allergéniques sont obtenues en testant par de nombreuses PCR les oligonucléotides déduits des séquences peptidiques ou déduits des séquences des produits PCR précédemment obtenus (Fiche 5). Les côtés 3' des ADNc ont été obtenus par 3'RACE (Fiche 6). La masse moléculaire des produits PCR est estimée sur gel d'agarose 1% par comparaison avec des marqueurs (Fiche 7). Les produits PCR peuvent être purifiés pour subir une seconde amplification ou pour être séquencés. Le produit PCR est purifié directement s'il ne contient pas de bande parasite ou à partir du gel d'agarose en découpant la bande qui nous intéresse (Fiche 8). Les séquençages des produits PCR sont effectués par Génome Express (Montreuil, France) par technique fluorescente selon le principe de Sanger (Sanger F, *et al.* 1977) (Fiche 9).

Par chevauchement des différentes séquences nucléotiques obtenues, les séquences totales des ADNc correspondant à chacune des protéines allergéniques sont déduites. L'alignement avec les séquences des banques de données (NCBI) servent à identifier les protéines étudiées.

1.3 Fiches techniques 1 à 9

Fiche 1

Extraction des ARN totaux à partir de filets de cabillaud

- Broyer 2 g de muscle de cabillaud (utiliser un mortier préalablement refroidi sur un lit de glace)
- Transférer le broyat dans un tube stérile conique de 50 mL
- Ajouter 15 mL de tampon de guanidium thiocyanate⁽¹⁾
- Homogénéiser à l'Ultra-turrax[®] T25 (vitesse maximale 20500 tr/min, 3x10 sec)
- Incuber au moins 1 h à - 80°C
- Ajouter 150 µL de β-mercaptoéthanol et 1,5 mL de L-lauryl sarcosine 5%. Homogénéiser à la pipette
- Répartir 2,5 mL de chlorure de césium dans 6 tubes et déposer délicatement sur le coussinet de chlorure de césium 2,5 mL de lysat
- Equilibrer et ultracentrifuger les tubes pendant 21 h à 35000 g et à 20°C
- Placer les tubes dans la glace
- Aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur sous vide (en tournant sur la paroi du tube)
- Ajouter 1 mL d'éthanol 70% froid et laisser reposer 3 min sur la glace
- Aspirer l'éthanol à l'aide d'une pipette Pasteur sous vide et retourner les tubes sur un papier absorbant
- Laisser les culots sécher à l'air avant de les reprendre dans 100 µL d'H₂O DEPC⁽²⁾ (dans 200 µL si le culot est très gros)
- Mélanger les culots resuspendus dans plusieurs microtubes
- Ajouter 1/10^e du volume d'acétate de sodium⁽³⁾, puis de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Homogénéiser par retournement à chaque ajout et les placer à -80°C au moins 1h
- Centrifuger les tubes pendant 10 min à 14000 g et à 4°C. Eliminer le surnageant par aspiration
- Ajouter 1 mL d'éthanol 70% froid
- Recentrifuger 5 min à 14000 g et aspirer le surnageant par aspiration
- Laisser les culots sécher à l'air
- Reprendre les culots dans 150 µL d'H₂O DEPC (ou plus selon la taille du culot)
- Doser les ARN par mesure de l'absorbance sur un spectrophotomètre⁽⁴⁾ à 260 nm et 280 nm⁽⁵⁾

① Guanidium thiocyanate 4 M, Tris-HCl 0,1 M, filtré 0,45µm

② H₂O traitée avec du DEPC à 0,1% (v/v) pendant 24 h sous agitation puis autoclavée

③ Acétate de sodium 3 M ajusté à pH 5,2 avec de l'acide acétique glacial

④ Spectrophotomètre UVIKON[®] 923 (Bio-Tek Kontron Instruments, St Quentin, France)

⑤ $A_{260}=1 \rightarrow 40 \mu\text{g/mL}$ et $1,8 < A_{260}/A_{280} \leq 2,0$

Fiche 2

Séquençages de peptides internes et N-terminaux des allergènes de cabillaud

Les séquençages ont été réalisés par le Laboratoire de Séquençage des Protéines de L'Institut Pasteur de Paris

- Peptide interne

La protéine en gel de polyacrylamide est digérée dans 200 à 250 µL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,6, SDS 0,03% (p/v) à 35°C pendant 18 heures en présence de 0,4 µg d'endolysine-C (Roche). Après digestion, les peptides sont séparés par HPLC⁽¹⁾, détectés à 214 nm et collectés. Les séquences des peptides sont déterminées selon la méthode de dégradation récurrente d'Edman⁽²⁾ dans un séquenceur à phase gazeuse ABI 473A (PE Biosystems). Les dérivés phénylthiohydantoïnes sont identifiés en ligne par HPLC en phase inverse.

- Peptide N-terminal

L'échantillon protéique a été digéré avec de la trypsine de pancréas bovin traitée TPCK (réduit la chymotrypsine habituellement copurifiée avec la trypsine) (Sigma) à un ratio enzyme:protéine de 1:50 dans un tampon Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) pendant 6,5 h à 37 °C. La solution peptidique acidifiée (pH 2,5) par ajout de TFA a été séparée sur une colonne C₄ avec un gradient d'acétonitrile dans un mélange eau/TFA. Les peptides ont été détectés à 214 nm et collectés manuellement. La séquence a été déterminée selon la méthode de la dégradation récurrente d'Edman⁽²⁾ dans un séquenceur à phase gazeuse ABI 470A (PE Biosystems). Les dérivés phénylthiohydantoïnes (PTH) ont été identifiés en ligne par CLHP en phase inverse dans un analyseur ABI 120A.

① colonnes en ligne de DEAE-C18 d'un diamètre de 2,1mm dans un gradient de 1 à 45% d'acétonitrile / TFA 0,1%

② Edman (1950) *Acta Chem. Scand.*, **4** : 283-293

Fiche 3

Oligonucléotides utilisés pour les réactions de RT, PCR et clonage
des P41 et P24

Nom de l'amorce ⁽¹⁾ et application	Sens	Séquence ⁽²⁾ 5'→3'	Déduite de	Taille (mers)	Tm ⁽³⁾ (°C)
P41					
PCR et séquençage					
COD N	Sens	ATC AAC GG(AC) TT(TC) GG(AC) AAG AT	Séquence peptidique N-terminale	20	57
COD IS1	Sens	ATC CAT GAC AAC TTT GGC AT	Séquence peptidique interne	20	56
SC S	Sens	ATG TTC GTC ATG GGA GTG AA	Séquence 5' partielle de l'ADNc ⁽⁴⁾	20	58
SC AS	Antisens	AGG CCA TGC CAG TGA TCT TA	Séquence 3' partielle de l'ADNc ⁽⁴⁾	20	60
COD I	Antisens	ATG CCA AAG TTG TCA TGG AT	Séquence peptidique interne	20	56
RACE 3'					
Anchor*	Antisens	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	-	22	70
RT					
PolydT-Anchor ⁽⁵⁾	Antisens	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA (T ₁₆)(AGC)	-	38	- ⁽⁶⁾
Insertion dans pcDNA3					
P41-5' / Bam HI	Sens	acg cgg atc cAC CAT GGT GAA AGT AGG AAT CAA T	Séquence totale de l'ADNc	34	56
P41-3' / Xba I	Antisens	cta gtc tag aTT ACT CCT TCG AGG ACA TGT G	Séquence totale de l'ADNc	31	62
Séquençage P41 dans pcDNA3					
pcDNA3 Sens	Sens	GGC TAA CTA GAG AAC CCA CT	Séquence [823-842] du plasmide	20	60
pcDNA3 Antisens	Antisens	TGG CAA CTA GAA GGC ACA GT	Séquence [1041-1060] du plasmide	20	60
P24					
PCR et séquençage					
S6	Sens	GA(AG) AT(ACT) AT(ACT) GA(CT) CA(AG) GA(CT) AA	Séquence peptidique interne	20	54
INT S2	Sens	AGG ACA AGA GTG ACT TTG TT	Séquence partielle de l'ADNc ⁽⁴⁾	20	56
Parv II	Sens	CCT TCG CCG GTC TTA ACG AT	Alignement de séquence	20	62
AS 2	Antisens	ATC AT(ATGC) GC(ATGC) CC(AG) AA(TC) TC(GA) TC	Séquence peptidique interne	20	59
AS 7	Antisens	GCC TTG ATC ATG GCG CCA AA	Séquence partielle de l'ADNc ⁽⁴⁾	20	62
RACE 3'					
Anchor*	Antisens	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	-	22	70
RT					
PolydT-Anchor*	Antisens	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA (T ₁₆)(AGC)	-	38	- ⁽⁶⁾
Insertion dans pcDNA3					
P24-5' / Bam HI (Ser)	Sens	acg cgg atc cAC CAT GTC CTT CGC CGG TCT TAA	Séquence totale de l'ADNc	33	60
P24-5' / Bam HI (Ala)	Sens	acg cgg atc cAC CAT GGC CTT CGC CGG TCT TAA	Séquence totale de l'ADNc	33	62
P24-3' / Xba I	Antisens	cta gtc tag aCT ATG CCT TGA TCA TGG CGC CAA A	Séquence totale de l'ADNc	34	72
Séquençage P24 dans pcDNA3					
pcDNA3 Sens	Sens	GGC TAA CTA GAG AAC CCA CT	Séquence [823-842] du plasmide	20	60
pcDNA3 Antisens	Antisens	TGG CAA CTA GAA GGC ACA GT	Séquence [1041-1060] du plasmide	20	60

① Les oligonucléotides ont été synthétisés par Génome Express (Montreuil, France).

② Site de restriction en minuscules

③ Le Tm est calculé (4°C pour G ou C et 2°C pour A ou T) sans tenir compte des sites de restriction

④ Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du programme Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse internet, <http://www.genome.wi.mit.edu>, sauf * qui sont des séquences du kit 5'/3'RACE (Boehringer Mannheim)

⑤ La séquence polydT permet de n'amplifier en RT que les ARNm puisqu'ils possèdent une queue polyA

⑥ Température d'utilisation préconisée à 55°C

Fiche 4

Transcription inverse des ARN (RT)

- Dans un microtube de 0,5 mL stérile, mélanger dans l'ordre :

	Volume	Concentration finale
H ₂ O ultrapure	qsp 19 μ L	
Tampon RT 5X ⁽¹⁾	4 μ L	1X
DTT 0,1 M	2 μ L	10 mM
dNTP 10 mM	1 μ L	0,50 mM
Amorce ⁽²⁾ (12,5 μ M)	1 μ L	0,625 mM
ARN totaux		3,5 μ g/19 μ L

- Vortexer puis centrifuger brièvement
- Incuber 3 min à 65°C puis placer 2 min sur la glace
- Ajouter 200 U (= 1 μ L) de M-MLV⁽³⁾ et ~20 U (= 0,5 μ L) d'inhibiteur d'ARNase⁽⁴⁾
- Incuber le mélange réactionnel à 37°C pendant 1 h
- Inactiver l'enzyme par chauffage à 95°C pendant 3 min
- Conservation du produit de la réaction à -20°C

① Tampon M-MLV 5X : Tris-HCl 250 mM (pH 8,5), MgCl₂ 40 mM, KCl 150 mM et DTT 5 mM (Gibco - Life Technology)

② Amorce oligonucléotidique spécifique de l'ARNm étudié oligo(dT)-anchor (voir Fiche 3)

③ M-MLV : Transcriptase inverse du virus Moloney Murine Leukemia : 200 U/ μ L (Gibco - Life Technology). Enzyme à vitesse et à activité ARNase H élevées

④ RNAGuard[®], enzyme isolée à partir de placenta humain, inhibitrice des ARNases A, B et C (inefficace sur l'activité ARNase H de la transcriptase inverse) : 38,6 U/ μ L (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

Fiche 5

Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

- Dans un microtube de 0,2 mL stérile à paroi fine⁽¹⁾, mélanger dans l'ordre :

	Volume		Concentration finale
H ₂ O ultra-pure stérile	qsp	50 µL	
Tampon PCR 10X ⁽²⁾		5 µL	1X
MgCl ₂ 25 mM		2 µL	1 mM
dNTP 1,25 mM		4 µL	0,1mM
Amorce sens (12,5 µM) ⁽³⁾		1 µL	0,25 µM
Amorce anti-sens (12,5 µM) ⁽³⁾		1 µL	0,25 µM
ADN complémentaire, plasmidique		-	50-300 ng / 50 µL
Ampli Taq DNA polymérase ⁽⁴⁾		0,25µL	1,25 U / 50 µL

- Programme PCR⁽⁵⁾

	Température	Durée	
dénaturation initiale	94°C	2 min	
30 à 35 cycles {	dénaturation	94°C	
	hybridation	Tm ⁻⁽⁶⁾ - 5°C	15 sec
	élongation	72°C	20 à 60 sec (selon amorce)
		1 min/kb d'ADN à amplifier	
terminaison de la réaction	72°C	5 min	

① Tube PCR en polypropylène Thermowell™ (Corning-Costar, Elmira, NY, USA)

② Tampon Ampli Taq® 10X : Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), KCl 500 mM (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)

③ Voir liste détaillée des amorces (Fiche 3)

④ Ampli Taq® DNA Polymerase : 5 U/µL (Perkin Elmer). Enzyme dépourvue d'activité exonucléase 3'→5' et possédant une activité transférase terminale-like ajoutant le plus souvent une base A non matricielle en 3' des amplimères

⑤ Thermocycleur : GeneAmp® PCR System 2400 (PE Biosystems)

⑥ Tm⁻ = Tm le plus bas des 2 amorces du couple choisi

Fiche 6

Amplification Rapide de l'Extrémité 3' des ADNc (RACE 3')^(1,2)

- Synthèse de l'ADNc : protocole identique à celui d'une transcription inverse classique. L'amorce utilisée pour la réaction étant l'oligo(dT)-Anchor
- Amplification des ADNc par PCR. Dans un microtube de 0,2 mL stérile, mélanger dans l'ordre :

	Volume	Concentration finale
H ₂ O ultrapure stérile	qsp 50 µL	
Tampon PCR 10X ⁽⁴⁾	5 µL	1X
MgCl ₂ 25 mM	2 µL	1 mM
dNTP 1,25 mM	4 µL	0,10 mM
Amorce sens (12,5 µM) ⁽⁴⁾	1 µL	0,25 mM
Anchor primer (12,5 µM) ⁽⁴⁾	1 µL	0,25 mM
ADNc	1 µL	-
Taq ADN Polymérase ⁽⁵⁾	0,25 µL	1,25 U / 50 µL

- L'analyse des résultats sur gel d'agarose révèle un signal spécifique généralement faible qui est intensifié au moyen d'une seconde amplification. Cette PCR est réalisée à partir de 5 µL de produit de première amplification dilué au 1/100^{ème} et avec le même couple d'amorces.

① Frohman *et al.* (1993) *Methods in Enzymol.* 218 : 340-356

② 5'/3' RACE Kit (Boehringer Mannheim)

③ Tampon Ampli Taq[®] 10X : Tris-HCl 100 mM, (pH 8,3), KCl 500 mM (Perkin Elmer)

④ Voir liste détaillée des amorces (Fiche 3)

⑤ Ampli Taq[®] DNA Polymerase : 5 U/µL (Perkin Elmer)

Fiche 7

Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

- Fermer hermétiquement les 2 bords ouverts du support de gel (10x15 cm) avec du ruban adhésif et positionner le peigne en Téflon®
- Peser l'agarose afin de préparer un gel à 0,8-1% (p/v) selon la taille des ADN étudiés
- Dissoudre l'agarose dans du tampon TBE 1X⁽¹⁾ (80-100 mL) par chauffage au four à micro-ondes jusqu'à un début d'ébullition puis laisser refroidir à ~50°C sur la paillasse
- Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Verser délicatement la solution chaude d'agarose dans le support de gel et laisser polymériser pendant 15 min
- Retirer le peigne et les 2 rubans adhésifs puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse horizontale⁽²⁾ remplie avec du tampon TBE 1X
- Déposer dans les puits du gel, 10 µL de produits PCR mélangés à 2 µL de solution de dépôt⁽³⁾ ainsi que des marqueurs de taille⁽⁴⁾
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu
- Faire migrer l'ADN sous une tension constante de 130 V pendant 50 min (18 V/cm)
- L'ADN contenu dans le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm)

① Tampon TBE 10X: Tris 890 mM-acide borique 890 mM, EDTA 20 mM (pH 8,0)

② Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad)

③ Solution de dépôt 5X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v) (Sigma)

④ - φX174 RF DNA/*Hae*III Fragments : 72-1353 pb (11 bandes) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)

- 100 bp DNA Ladder : 100-1000 pb (11 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)

- 1 kb DNA Ladder : 250-10000 pb (14 bandes) (Promega)

- SmartLadder : 200-10000 pb (14 bandes) marqueur de quantification (Eurogentec)

Fiche 8

Purification des produits PCR⁽¹⁾

- Ajouter 5 volumes de tampon (PB)⁽²⁾ pour 1 volume de produits de PCR à purifier et mélanger
- Appliquer le mélange sur une microcolonne formée d'un disque de silice, adaptée sur un microtube de 1,5 mL
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- Eliminer le filtrat
- Ajouter 0,75 mL de tampon de lavage (PE) puis centrifuger 1 min à 10000 g
- Eliminer le filtrat et centrifuger à nouveau 1 min à 12000 g pour assécher la silice
- Placer la microcolonne sur un tube propre
- Verser 30 µL d'H₂O ultrapure (pH 7,0-8,5) ou de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5) sur la colonne
- Laisser 1 min à température ambiante. Centrifuger 1 min à 10000 g
- Quantifier l'ADN élué sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme de standards

Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose⁽³⁾

- Découper l'agarose contenant la bande d'ADN à purifier à l'aide d'une lame de scalpel stérile
- Déterminer la masse d'agarose découpée et ajouter 3 volumes de tampon de dissolution (QG1) pour 1 volume de gel (100 mg de gel \cong 100 µL)
- Afin de faire fondre le gel, chauffer à 50°C pendant 10 min en vortexant le tube 2 à 3 fois durant l'incubation
- Appliquer le mélange sur une microcolonne renfermant un disque de silice. La colonne est adaptée sur un microtube de 1,5 mL
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- Eliminer le filtrat
- Ajouter 0,75 mL de tampon de lavage (PE) et centrifuger 1 min
- Eliminer le filtrat, et centrifuger à nouveau 1 min à 12000 g pour assécher la silice
- Placer la microcolonne sur un tube propre
- Ajouter 30 µL d'H₂O ultrapure (pH 7,0-8,5) ou de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5)
- Laisser 1 min à température ambiante. Centrifuger 1 min à 10000 g
- Quantifier l'ADN sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme de standards

① QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen)

② Tampon PB : tampon optimisé pour favoriser l'adsorption de l'ADN (0,1-10 kb) sur la silice

③ QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen)

Fiche 9

Séquençage automatique de l'ADN par technique fluorescente⁽¹⁾

Le principe général de cette technique repose sur un arrêt statistique de la réaction de polymérisation par des didésoxynucléotides (ddNTP)⁽²⁾. Les 4 ddNTP sont marqués par des fluorochromes différents (fluorescéine, NBD, rouge Texas et tétraméthylrhodamine) et incubés dans un même tube. Les brins d'ADN néosynthétisés sont séparés par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide. La migration se fait à front perdu et les ADN marqués sont identifiés en sortie de gel par un photomètre à laser couplé à un ordinateur.

A) Réaction de séquençage

- Mélanger dans un microtube de 0,2 mL stérile :

ADN db	5 à 20 ng	pour un produit de PCR purifié (500 -1000 pb)
Amorce ⁽³⁾ S ou AS	3,2 pmol	
Terminator mix ⁽⁴⁾	8,0 µL	
H ₂ O ultrapure	qsp	20 µL

- Programme d'amplification :

	Température	Durée
25 cycles	dénaturation	96°C / 30 sec
	hybridation	T _m - 5°C / 15 sec
	élongation	60°C / 4 min

B) Retrait des ddNTP non incorporés par précipitation des produits de la réaction

- Transvaser le mélange réactionnel dans un microtube de 1,5 mL stérile
- Ajouter 19 µL de MgCl₂ 2 mM puis 55 µL d'éthanol 95% (v/v) et vortexer brièvement
- Laisser précipiter à température ambiante pendant au moins 15 min
- Centrifuger à 14000 g pendant 20 min
- Aspirer promptement la totalité du surnageant (contenant les ddNTP en excès) avec une pipette Pasteur stérile branchée sur une pompe à vide
- Sécher le culot (visible ou non) pendant 1-3 min au Speed Vac[®]

C) Séquençage automatique

Réalisé par le Service Commun de Biologie Moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, par Mme N. Monhoven sur un séquenceur ABI PRISM 373A piloté par le logiciel Sequencing Analysis Software v. 1.2.1 (PE Biosystems)

La plupart des séquençages des ADN ont été sous-traités à Génome Express (Montreuil, France) : les ADN ont été envoyés directement après la PCR (sans les étapes 1 et 2). Le séquenceur utilisé est l'ABI PRISM 377 piloté par le logiciel Sequencing Analysis Software v. 3.3 (PE Biosystems)

① ABI PRISM[™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit avec l'Ampli^{Taq}[®] DNA Polymerase, FS (Perkin Elmer)

② Sanger *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 5463-5467

③ Amorce spécifique du produit de PCR (séquençage direct)

④ Terminator premix : (A/G/C/T)-DyeDeoxy Terminator, dITP, dATP, dCTP, dTTP dans tampon Tris-HCl (pH 9,0) contenant du MgCl₂ et l'Ampli^{Taq}[®] DNA polymérase, FS. Cette *Taq* ADN polymérase est une forme mutée à l'activité 5'→3' exonucléase négligeable et qui ne fait quasiment plus de discrimination entre les ddNTP fluorescents et les dNTP

2 Expression recombinante de la protéine P41

2.1 Clonage de la P41 dans le vecteur pcDNA3

La séquence entière de l'ADNc correspondant à la P41 obtenue par PCR a été clonée dans le vecteur pcDNA3. Pour cela, une PCR a été effectuée dans le but d'ajouter à la séquence ADNc les sites de restriction *Bam HI* (en 5') et *Xba I* (en 3') nécessaires à l'insertion dans le plasmide (Fiche 3). Le plasmide pcDNA3 contenant le gène de résistance à l'ampicilline, ainsi que le produit PCR ont alors été digérés par les enzymes de restriction *Bam HI* et *Xba I* (Fiche 10) puis purifiés (Fiche 8). Une étape de ligature permet d'intégrer le fragment PCR dans le plasmide (Fiche 11). Des bactéries *E. coli* JM109 sont alors transformées par le plasmide recombinant par choc thermique ou électroporation (Fiche 12). Les bactéries transformées sont sélectionnées grâce à un milieu contenant de l'ampicilline et quelques colonies sont récupérées pour une culture secondaire (Fiche 13). Les cultures secondaires permettent d'effectuer des mini, midi, ou maxi-préparations de plasmides (Fiches 14 et 15) afin d'obtenir du plasmide purifié. L'insertion d'un fragment PCR dans le plasmide est vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1% du plasmide recombinant linéarisé par simple digestion par *Bam HI* ou *Xba I*. L'insertion correcte de la séquence ADNc de la P41 dans le plasmide peut alors être vérifiée par séquençage. Un clone contenant un plasmide recombinant pcDNA3-P41 correct est ainsi choisi.

2.2 Expression de la P41

2.2.1 Expression recombinante de la P41 en lysat de réticulocytes de lapin

Dans le but de vérifier si la construction plasmidique est bien traduisible, le plasmide a été placé en présence d'un lysat de réticulocytes de lapin et d'un mélange d'acides aminés dont la méthionine est marquée au ³⁵S (Fiche 16). Les protéines néosynthétisées par le lysat de réticulocytes sont donc marquées radioactivement. D'autre part, les protéines produites sont immunoprécipitées par un antisérum anti-P41 produit chez le lapin (Fiche 17) qui se fixe à un gel epoxy-Sepharose-protéine A (Fiche 16).

2.2.2 Expression recombinante de la P41 dans le système eucaryote COS-1

Les cellules COS-1 sont des cellules rénales de singe vert. Les cellules COS-1 sont transfectées par le pcDNA3-P41 grâce au transfectant Exgen (Fiche 18). Des témoins non transfectés et transfecté par le plasmide pcDNA3 natif sont traités en parallèle. Les cellules non transfectées ou transfectées par le plasmide recombinant ou natif sont récupérées 48 heures après la transfection, et lysées par sonication. A partir de ces lysats cellulaires, l'expression de

la protéine P41 dans les cellules transfectées, est visualisée par la mesure d'activité enzymatique de la P41 (Fiche 18).

2.3 Fiches techniques 10 à 18

Fiche 10

Coupure de l'ADN par une enzyme de restriction

- Mélanger 75 ng à 2,5 µg d'ADN (vecteur plasmidique ou insert) avec 3 µL de tampon 10X spécifique de l'enzyme⁽¹⁾, ajuster le volume à 30 µL avec de l'eau ultrapure stérile et ajouter 40 à 50 U d'enzyme de restriction⁽²⁾.
- Incuber à 37°C (ou à la température recommandée) pendant 2 à 3 h selon l'enzyme.

① Dans le cas de coupures multiples, commencer par digérer avec l'enzyme dont le tampon est le moins concentré en sel et/ou précipiter l'ADN entre chaque réaction de coupure

② New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA

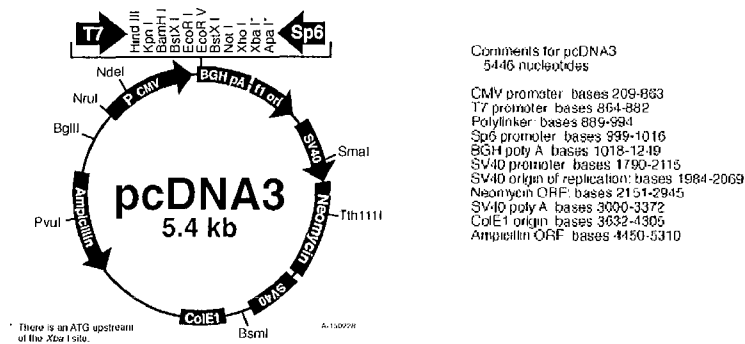
Fiche 11

Choix du plasmide de clonage et
Ligature de fragments de restriction dans le vecteur pcDNA3⁽¹⁾

A) Choix du vecteur de clonage

Le plasmide utilisé pour le clonage de la protéine P41 est le pcDNA3⁽¹⁾. L'ADNc codant la P41 au niveau des sites de restriction *Bam* HI et *Xba* I du polylinker.

Ce vecteur contient le promoteur fort du cytomégalovirus humain (CMV) pour l'expression dans la majorité des cellules de mammifères, le promoteur T7 pour la transcription *in vitro*, les gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine, et l'origine de réplication de *E. coli*.



B) Ligature

- Dans un tube de 1,5 mL stérile, mélanger dans l'ordre :

Vecteur plasmidique digéré	30 ng
Tampon de ligature 10X ⁽²⁾	2 µL
Insert digéré	ADN qsp ratio insert:vecteur de 1:1 et 2:1 et 4:1 ⁽³⁾
ADN ligase de T4 ⁽⁴⁾	80 U
H ₂ O ultrapure stérile	qsp 20 µL

- Effectuer un témoin de ligature : ADN plasmidique digéré par une des enzymes sans insert
- Effectuer un témoin de digestion : ADN plasmidique doublement digéré sans insert et sans ligase
- Incuber 16 h à 16°C (cryothermostat)

① Invitrogen, Life Technology, France

② Tampon de ligature A 10X (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) : Tris-HCl 500 mM (pH 7,5), MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, BSA 250 µg/mL (conserver en aliquotes à -20°C car l'ATP se dégrade rapidement)

③ Détermination de la quantité d'insert à ajouter en fonction du ratio insert:vecteur choisi :

$$\frac{50 \text{ ng de vecteur} \times \text{taille de l'insert (kb)}}{\text{taille du vecteur (kb)}} \times \text{ratio molaire insert:vecteur} = \text{ng d'insert}$$

④ T4 DNA Ligase : 400 U/µL (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). La ligase est diluée au 1/5ème dans du tampon de ligature 1X. Ajouter 1 µL de la dilution au milieu réactionnel

Fiche 12

Transformation des bactéries

A) Transformation par choc thermique

- Dans un tube de 1,5 mL stérile préalablement refroidi sur la glace, mélanger dans l'ordre 2 μ L de produit de ligature et 50 μ L de la suspension d'*E. coli* JM109⁽¹⁾. Un plasmide contrôle est fourni avec les JM109 permettant d'évaluer le rendement de transformation du système
- Placer le tube sur la glace pendant 20 min. Eviter de bousculer le tube
- Plonger rapidement le tube dans un bain-marie à exactement 42°C pendant 45-50 sec
- Transférer rapidement le tube dans la glace
- Ajouter 950 μ L de milieu SOC⁽²⁾ à température ambiante
- Incuber 1h30 à 37°C sous agitation horizontale (~150 tr/min)

B) Transformation par électroporation

- Dans un tube de 1,5 mL stérile préalablement refroidi sur la glace, mélanger dans l'ordre 2 μ L de produit de ligature et 50 μ L de la suspension d'*E. coli* JM109⁽¹⁾. Un plasmide contrôle est fourni avec les JM109 permettant d'évaluer le rendement de transformation du système
- Placer le mélange dans une cuvette (0,2 cm) d'électroporation stérile préalablement refroidie sur la glace et éliminer les bulles en tapotant la cuvette
- Essuyer soigneusement la cuvette avant de la placer entre les électrodes de l'électroporateur⁽³⁾
- Effectuer l'impulsion en pressant le bouton de l'appareil (Programme Ec2 pour *E. coli* : 1 impulsion à 2,5 kV)
- Ajouter 950 μ L de milieu SOC⁽²⁾ à température ambiante dans la cuvette
- Retransvaser le tout dans un tube de 15 mL
- Incuber 1h30 à 37°C sous agitation horizontale (~150 tr/min)

① Souche compétente JM109 : Souche rendue compétente par une perméabilisation de sa membrane plasmique avec du CaCl₂ (Promega). Souche dépourvue de système de recombinaison, qui supporte la croissance de vecteurs renfermant des mutations *ambre* et qui modifie mais ne restreint pas l'ADN transfecté

Génotype : *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*

② Milieu SOC : pour 100 mL de milieu, 2 g Bacto[®]-Tryptone, 1,5 g Bacto[®]-Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 1 mL NaCl 1 M, 0,25 mL KCl 1 M, 98 mL H₂O distillée. Autoclaver. Ajouter 1 mL Mg²⁺ 2 M (MgCl₂.6 H₂O 1M / MgSO₄.7H₂O 1 M) filtré et 1 mL glucose

③ Micropulser (Bio-Rad)

2 M filtré. Stériliser le milieu complet par filtration sur membrane de 0,22 μ m

Fiche 13

Sélection des bactéries transformées par le plasmide recombinant

- Étaler au râteau 100 μL de la suspension bactérienne sur une boîte de Petri LB-gélose⁽¹⁾ contenant de l'ampicilline⁽²⁾ à une concentration finale de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour les plasmides possédant un mode de sélection supplémentaire *via* le gène *lacZ* (comme le plasmide contrôle) étaler au préalable l'IPTG⁽³⁾ à 0,5 mM final puis le X-Gal⁽⁴⁾ à 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final
- Centrifuguer à 300 *g* pendant 5 min le reste de la suspension bactérienne et retirer le surnageant pour n'en laisser que 100 μL
- Homogénéiser le culot bactérien dans ce volume et étaler la totalité sur une boîte de Petri sélective
- Incuber 1 nuit à 37°C
- Compter les colonies bactériennes sur chaque boîte. Les bactéries transformées avec un plasmide contenant le gène *lacZ* ininterrompu, sont colorées car elles métabolisent le X-Gal en un substrat bleu sous l'action de l'inducteur IPTG de l'opéron.

Culture secondaire des colonies sélectionnées

- Gratter la surface d'une colonie isolée à l'aide d'un embout de pipette stérile
- Ejecter l'embout dans un tube conique stérile de 50 mL contenant 3 mL de milieu LB liquide⁽⁵⁾ à température ambiante supplémenté avec de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation horizontale vigoureuse (~200 tr/min)
- Purifier l'ADN plasmidique à partir de 2 mL de suspension bactérienne par mini-préparation

① Milieu LB solide : autoclaver 7,5 g de Bacto[®]-Agar (Difco, Detroit, MI, USA) dans 500 mL de milieu LB

② Solution d'ampicilline à 50 mg/mL stérilisée par filtration et congelée en aliquotes à -20°C

③ 100 μL d'une solution d'IPTG à 100 mM stérilisée par filtration

④ 20 μL d'une solution de X-Gal à 50 mg/mL dans N, N' diméthylformamide (photosensible)

⑤ Milieu LB liquide : pour 1 L de milieu, 10 g Bacto[®]-Tryptone, 5 g Bacto[®]-Yeast Extract (Difco, Detroit, MI, USA) et 5 g NaCl. Ajuster à pH 7,0 avec NaOH

Fiche 14

Purification de petites quantités d'ADN plasmidique par un Mini-kit⁽¹⁾

- Transférer 1 à 2 mL de suspension bactérienne obtenue après une nuit de culture à 37°C, dans un microtube de 2 mL
- Centrifuger les cellules à 300 g pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 200 µL de solution de suspension⁽¹⁾
- Ajouter 250 µL de solution de lyse⁽¹⁾ et mélanger doucement par inversion du tube
- Ajouter 250 µL de solution de neutralisation⁽¹⁾ et mélanger à nouveau doucement par inversion du tube
- Centrifuger à 14000 g pendant 5 min
- Récupérer le surnageant dans un microtube stérile et mélanger avec 200 µL d'une suspension de terre de diatomée (exosquelette de SiO₂)⁽¹⁾
- Verser la suspension dans une microcolonne⁽¹⁾ munie d'un filtre, adaptée sur un microtube. Centrifuger à 14000 g pendant 30 sec
- Eliminer le filtrat
- Laver la matrice avec 500 µL de solution de lavage⁽¹⁾ et centrifuger 30 sec
- Eliminer le filtrat et assécher la matrice par une centrifugation de 2 min
- Placer la colonne sur un microtube propre
- Eluer l'ADN plasmidique avec 50 µL H₂O ultrapure stérile, centrifuger 30 sec

① Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad)

Fiche 15

Purification de grandes quantités d'ADN plasmidique avec un Midi-kit ou un Maxi-kit⁽¹⁾

- Effectuer une préculture bactérienne d'*E. coli* JM109 transformées dans 3 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline pendant 8 h à 37°C sous agitation horizontale vigoureuse
- Inoculer 100 mL de milieu LB-ampicilline contenu dans un Erlenmeyer de 250 mL avec 0,2 mL de préculture (1/500^{ème}) et incuber une nuit à 37°C sous agitation vigoureuse
- Centrifuger à 6000 *g* pendant 15 min une suspension bactérienne de 30 mL ou 100 mL dans un rotor à angle variable (rotor JA-14)
- Eliminer toutes traces de surnageant en renversant délicatement le tube
- Reprendre la totalité du culot bactérien dans 4 mL ou 10 mL de tampon de suspension⁽²⁾ (P1)
- Ajouter 4 mL ou 10 mL de tampon de lyse⁽³⁾ (P2), mélanger doucement par inversion du tube 4 à 6 fois et incuber 5 min à température ambiante
- Ajouter 4 mL ou 10 mL de tampon de neutralisation⁽⁴⁾ (P3) glacé, mélanger immédiatement mais doucement par inversion du tube 4-6 fois et incuber sur la glace pendant 15 min ou 20 min
- Mélanger puis centrifuger à 20000 *g* pendant 30 min (4°C) (rotor JA-14)
- Prélever promptement le surnageant limpide contenant l'ADN plasmidique
- Recentrifuger le surnageant à 20000 *g* pendant 15 min (4°C) (rotor JA-14) et récupérer le surnageant
- Pendant ce temps, équilibrer une colonne échangeuse d'anions⁽⁵⁾ avec 4 mL ou 10 mL de tampon d'équilibration⁽⁶⁾ QBT en laissant ce dernier s'écouler par gravité
- A l'issue de la centrifugation, verser immédiatement le surnageant dans la colonne et laisser le pénétrer la résine par gravité
- Laver la colonne avec 2 x 10 mL ou 2 x 30 mL de tampon QC⁽⁷⁾
- Eluer l'ADN avec 5 mL ou 15 mL de tampon QF⁽⁸⁾, collecter l'ADN dans un tube stérile en polypropylène de 30 mL à bouchon
- Précipiter l'ADN avec 3,5 mL ou 10,5 mL (0,7 volume) d'isopropanol à température ambiante (cette température minimise la précipitation des sels)
- Mélanger et centrifuger à 5000 *g* pendant 1 h (4°C) (rotor JA-14)
- Renverser délicatement le surnageant
- Laver le culot translucide d'ADN avec 2 mL ou 5 mL d'éthanol à 70% (v/v) à température ambiante
- Centrifuger à 5000 *g* pendant 1 h (JA-14)
- Aspirer doucement le surnageant sans perturber le culot
- Sécher le culot à l'air pendant 5-10 min et le solubiliser dans un volume approprié (~200 µL) d'eau ultrapure stérile ou de tampon TE⁽⁹⁾
- Déterminer la concentration en ADN au spectrophotomètre à 260 nm et analyser sur gel
- Stocker l'ADN plasmidique purifié sous forme d'aliqots à -20°C

① Plasmid Purification Midi Kit et Maxi Kit (Qiagen)

② Tampon de suspension (P1) : Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM contenant ARNase A 100 µg/mL (extemporané)

③ Tampon de lyse (P2) : NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v)

④ Tampon de neutralisation (P3) : acétate de potassium 3 M (pH 5,5)

⑤ Qiagen[®]-tip 100 et Qiagen[®]-tip 500 : colonnes renfermant une résine DEAE

⑥ Tampon d'équilibration (QBT) : MOPS 50 mM (pH 7,0), NaCl 750 mM, isopropanol 15% (v/v), Triton[®] X-100 0,15% (v/v)

⑦ Tampon de lavage (QC) : MOPS 50 mM (pH 7,0), NaCl 1,0 M, isopropanol 15% (v/v)

⑧ Tampon d'élution (QF) : Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), NaCl 1,25 M, isopropanol 15% (v/v)

⑨ Tampon TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)

Fiche 16

Transcription / Traduction couplée *in vitro* de la P41 de cabillaud⁽¹⁾
et immunoprécipitation des produits de la réaction

A) Transcription-traduction *in vitro* dans un système de lysat de réticulocytes de lapin

- Insérer l'ADNc de la P41 dans le vecteur pcDNA3⁽²⁾ au niveau du polylinker situé entre le promoteur de l'ARN polymérase de T7 et la séquence de polyadénylation
- Cloner et purifier le plasmide recombinant
- Dans un microtube stérile de 1,5 mL, mélanger dans l'ordre :

Lysat de réticulocytes ⁽¹⁾	25 µL
Tampon de réaction ⁽¹⁾	2 µL
ARN polymérase de T7 ⁽¹⁾	1 µL
Mélange d'acides aminés sans Met ⁽¹⁾	0,02 mM
[³⁵ S]-Met ⁽³⁾	4 µL
Inhibiteur de ribonucléase ⁽⁴⁾	40 U
ADN plasmidique (circulaire)	1 µg
H ₂ O ultrapure	qsp 50 µL

- Préparer de la même façon 2 tubes contrôles respectivement, sans ADN et avec l'ADN de la luciférase (61 kDa)
- Incuber à 30°C pendant 1h30

① TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI, USA)

② Vecteur de clonage et de transcription pcDNA3 5446 pb

③ Redivue™ L-[³⁵S]-Méthionine : 10 mCi/mL et 1000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

④ Rnasin® Ribonuclease inhibitor : 40 U/µL (Promega, Madison, WI, USA)

B) Immunoprécipitation avec l'antisérum de lapin anti-P41⁽¹⁾

- Immédiatement après l'incubation, ajouter 400 µL de tampon NET⁽²⁾ à 4°C et 50 µL d'antisérum de lapin anti-P41 de cabillaud (dilution finale 1/10^{ème})
- Incuber pendant 1h30 à 4°C sous agitation rotative
- Ajouter 75 µL d'une suspension 1:1 de gel Sepharose[®]-protéine A⁽³⁾
- Placer le mélange à 4°C sous agitation rotative pendant 2h30
- Sédimer le gel par une centrifugation à 200 g pendant 3 min (4°C)
- Retirer le surnageant, resuspendre le gel avec 1 mL de tampon NET et placer sous agitation rotative à 4°C pendant 20 min
- Centrifuger à 200 g pendant 3 min et éliminer le surnageant
- Laver encore 2 fois le gel avec du tampon NET et une dernière fois avec un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) contenant Nonidet[®] P-40 à 0,1% (v/v)
- Désorber les culots de gel avec 50 µL de tampon de dépôt⁽⁴⁾ contenant de l'urée et chauffer à 100°C pendant 5 min en tapotant les tubes par intermittence
- Centrifuger les tubes à 12000 g pendant 5 min et analyser 50 µL de surnageant sur un minigel SDS-PAGE à 12% d'épaisseur 1,5 mm
- Après électrophorèse, fixer les protéines du gel dans une solution méthanol 40% (v/v) et acide acétique 10% (v/v) pendant au moins 30 min
- Plonger le gel pendant 30 min dans de l'Amplify^{®(5)} et le sécher sur un papier Whatman[®] 3MM
- Exposer le gel contre un film autoradiographique⁽⁶⁾ pendant 1 nuit (³⁵S) à 2 jours (¹⁴C) dans une cassette sans écrans amplificateurs placée à -70°C

① Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3 : 18.44-18.46

② Tampon NET: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Nonidet[®] P-40 0,1% (v/v), EDTA 1 mM

③ Protein A-Sepharose[®] CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, UK) équilibré dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 0,1% (v/v) Nonidet[®] P-40 (à laver avec l'équivalent de 20 volumes de gel)

④ Tampon de dépôt : Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), DTT 100 mM, SDS 2% (p/v), urée 5 M, glycérol 10% (v/v) et bleu de bromophénol 0,01% (p/v) (conservé en aliquotes à -20°C)

⑤ Amplify[™] (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

⑥ Hyperfilm[™] MP (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

Fiche 17

Préparation d'un antisérum de lapin anti-P41 de cabillaud

La campagne d'immunisation a été menée sur 2 lapins New Zealand White âgés de 2-3 mois⁽¹⁾. Le sérum préimmun a été prélevé 1 jour avant la première injection de l'antigène. L'allergène P41 purifié (25 µg) repris dans 500 µL d'eau a été mélangé à 500 µL d'adjuvant de Freund complet et injecté par voie intradermique en 2 points sur le dos du lapin. Les injections rappels avec la même quantité d'antigène mais mélangées avec de l'adjuvant de Freund incomplet ont été réalisées à 14, 28 et 42 jours après la première injection. Les prélèvements sanguins ont été effectués par légère incision de la veine de l'oreille.

① Eurogentec Bel SA, Seraing, Belgique

Fiche 18 Culture de cellules COS-1⁽¹⁾

Les cellules COS-1 sont issues de cellules rénales fibroblastiques de singe, transformées par SV40. Elles sont ensemencées à $3,4 \cdot 10^3$ cellules/cm² dans du milieu MEM⁽²⁾ additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF)⁽³⁾ (décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min) et de 2% de glutamine⁽⁴⁾. Elles sont maintenues en culture en boîtes⁽⁵⁾ de 25 cm² dans une étuve⁽⁶⁾ à 37°C en présence de 10% de CO₂. Les changements de milieux sont effectués 2 fois par semaine.

Transfection transitoire de cellules COS-1 par le pcDNA3-P41 avec l'Exgen⁽⁷⁾

A) La veille de la transfection

- Ensemencer 10^5 cellules COS-1 par puits de plaque 24 puits⁽⁸⁾ dans 0,5 mL de milieu

B) Une heure avant la transfection

- Remplacer le milieu de culture de chaque puits à transférer par 1 mL de milieu sans SVF et sans glutamine

C) La transfection

- Pour chaque transfection :
 - Mélanger 0,5 µg du plasmide d'intérêt⁽⁹⁾ dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL. Homogénéiser au vortex et centrifuger brièvement
 - Mélanger 2,5 µL d'Exgen dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL. Homogénéiser au vortex et faire une petite centrifugation
 - Ajouter la solution d'Exgen à la solution d'ADN et non l'inverse. Vortexer immédiatement et laisser reposer 10 min à température ambiante
 - Déposer goutte à goutte les 100 µL de mélange Exgen / ADN sur le milieu et mélanger rapidement par agitation douce
- Placer les cellules à 37°C et à 10% de CO₂ pendant 4 à 6 heures
- Remplacer le milieu de chaque puits par 0,5 mL de milieu avec SVF et glutamine.
- Remplacer les cellules à 37°C et à 10% de CO₂ pendant 48 heures

① Cellules COS-1 (ATCC, Manassas, USA)

② Milieu MEM Eagle 25mM HEPES avec Sels d'Earle et sans L-glutamine (Gibco, Invitrogen Corp, UK)

③ Sérum de veau fœtal (Gibco, Invitrogen Corp, UK)

④ Glutamine (Gibco, Invitrogen Corp, UK)

⑤ Boîtes 25 cm² (Costar, Corning Inc. NY, USA)

⑥ Incubateur IG150 (Jouan, France)

⑦ Exgen 500 (Euromedex, France)

⑧ Plaques 24 puits (Costar, Corning Inc. NY, USA)

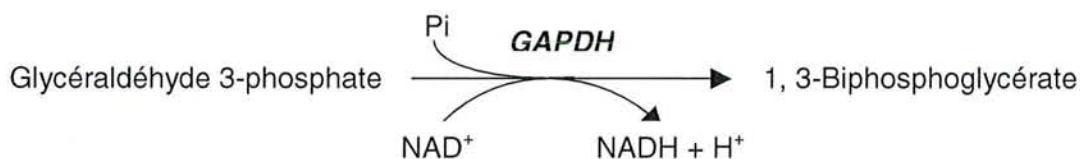
⑨ pcDNA3-P41 : l'ADNc de la P41 a été insérée aux sites de restriction *Bam* *HI* et *Xba* *I* du plasmide pcDNA3 (Invitrogen, Life Technology, France). Une transfection avec le plasmide pcDNA3 natif sert de témoin négatif de transfection.

D) Récupération de l'extrait cellulaire

- Remplacer le milieu par du PBS⁽¹⁾ afin de décoller les cellules à l'aide d'un grattoir
- Prélever les cellules décollées et les mettre dans des microtubes. Centrifuger 3 min à 1500 g
- Reprendre les cellules dans 200 µL de tampon de lyse⁽²⁾ et y ajouter 20 µL d'un mélange d'inhibiteurs de protéases⁽³⁾
- Ultrasoniquer les cellules pendant 30 sec dans la glace, au maximum de la puissance de l'appareil⁽⁴⁾
- Centrifuger 5 min à 4°C, à 5000 g afin d'éliminer les plus gros débris cellulaires et transvaser dans de nouveaux microtubes
- Centrifuger à 5000 g pendant 1 h à 4°C et transvaser le surnageant

E) Dosage de l'activité enzymatique GAPDH⁽⁵⁾ des cellules COS-1

La GAPDH est une enzyme du cytoplasme (Michels PA, *et al.* 1986) jouant un rôle clef dans la glycolyse et la néoglucogenèse. Elle catalyse une réaction d'oxydo-réduction couplée à une réaction de phosphorylation permettant de stocker l'énergie (issue de l'oxydation du glucose) via le 1, 3-Biphosphoglycérate.



C'est en fait l'apparition du NADH qui absorbe à 340 nm qui est observée pour mesurer l'activité enzymatique de la GAPDH.

Le mélange réactionnel est fait directement dans la cuve de spectrophotomètre :

Tampon réactionnel pH 8,9 ⁽⁶⁾	100 µL
DL-glycéraldéhyde 3-phosphate ⁽⁷⁾ (20 mM)	200 µL
β-NAD ⁽⁸⁾ (20 mM)	100 µL
Extrait de protéines totales	20 µg
H ₂ O distillée	qsp 1 mL

La cinétique enzymatique est menée pendant 5 min par lecture de l'absorbance à 340 nm dans un spectrophotomètre⁽⁹⁾. La quantité de GAPDH présente dans l'extrait est proportionnelle à la vitesse initiale d'apparition de NADH puisque la réaction est équimolaire.

① PBS sans Calcium ni Magnésium (Gibco, Invitrogen Corp, UK)

② Tampon de lyse : Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 , NaCl 150 mM

③ Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues (Sigma, St Louis, USA)

④ Sonifier Cell Disruptor B30

⑤ Ferdinand, 1964 *Biochem J* 92 : 578-85 modifié

⑥ Tampon réactionnel (solution stock) : KH₂PO₄ 500 mM, EDTA 2 mM, Triéthanolamine 400 mM, pH 8,9

⑦ Sigma, St Louis, USA

⑧ Sigma, St Louis, USA

⑨ Spectrophotomètre UVIKON® 923 (Bio-Tek Kontron Instruments, St Quentin, France)

3 Allergénicité de la protéine P41 extraite ou recombinante

Les patients choisis pour l'étude sont des patients ayant manifesté des réactions allergiques au poisson et dont le taux d'IgE anti-protéines totales de cabillaud spécifiques (dosé en RAST) est significatif.

Les tests indirects utilisent la protéine étudiée mais d'une autre espèce, alors que les tests directs sont effectués à partir de la protéine P41 semi-purifiée, ou des lysats de cellules COS-1 contenant la P41 recombinante. La concentration protéique des solutions totale, semi-purifiée (Fiche 19) et purifiée (Fiche 20) est évaluée par le dosage BCA (Fiche 21) et la pureté contrôlée en SDS-PAGE (Fiche 22) après coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent (Fiche 23). L'allergénicité de la protéine est caractérisée par son pouvoir à être « reconnue » par des IgE spécifiques d'un patient. Cette fixation est détectée par immunodétection, slot-blot, dosage IgE-RIA, et test d'inhibition.

3.1 Tests IgE-RIA

Les tests IgE-RIA sont effectués sur une phase solide d'époxy-Sepharose à laquelle est fixée la protéine à étudier. Pour les tests de fixation, plusieurs gels-protéine ont été fabriqués : la P41 a été fixée, ainsi que la protéine homologue appartenant à d'autres espèces (Fiche 24).

Pour les inhibitions, le gel utilisé est celui couplé à la protéine homologue humaine ; la protéine compétitrice est un mélange semi-purifié de P41 (Fiche 24).

3.2 Immunodétection de la P41

Les immunodétections sont effectuées à partir de protéine P41 native purifiée (Slot-blot) ou de protéine recombinante produite dans les cellules COS-1. En slot blot, la protéine est déposée directement sur la membrane de nitrocellulose (Fiche 25), mais dans les autres cas un transfert des protéines ayant migré en SDS-PAGE est effectué (Fiche 26).

3.2.1 Immunodétection par l'antisérum anti-P41 de lapin

La membrane de nitrocellulose est mise en présence de l'antisérum anti-P41 (1/100^e) de lapin. Le second anticorps est un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase révéle par le substrat précipitant 4-Chloro-1-Naphtol (Fiche 27A).

3.2.2 Immunodétection de la P41 par les sérums des patients

La membrane est tout d'abord mise en présence du sérum du patient. Le second anticorps est un anticorps anti-IgE couplé à la peroxidase et révéle par chimiluminescence (Fiche 27B) ou un anticorps anti-IgE radiomarqué à l'iode ¹²⁵I (Fiche 27C) révéle par autoradiographie.

3.3 Fiches techniques 19 à 27

Fiche 19

Extraction des protéines totales du muscle de poisson

- Broyer 20 g de filet de poisson au robot ménager
- Ajouter 2 mL de tampon phosphate 0,07 M, pH 7,0 par gramme de poisson
- Homogénéiser à l'Ultra-Turrax⁽¹⁾, trois fois 20 secondes, à vitesse maximale et à 4 °C
- Centrifuger à 20000 g pendant 20 min et à 4°C
- Filtrer le surnageant (0,45 µm), faire des aliquotes et congeler

Purification de la P41 par fractionnement au sulfate d'ammonium à 80%

- Le volume de départ Vd (en Litre) de la solution de protéines totales à précipiter est noté
- La masse X_{80%} de sulfate d'ammonium à ajouter est calculée : $X_{80\%} = Vd \times 561 / 1000$
- Le sulfate d'ammonium est finement broyé à l'aide d'un mortier, et ajouté peu à peu sous agitation à 4°C
- Laisser le mélange sous agitation pendant 30 minutes sous agitation
- Centrifuger à 20000 g pendant 20 minutes, à 4°C
- Récupérer le surnageant et le dialyser contre au moins 200 fois le volume de tampon phosphate 0,01 M, pH 7,0 une nuit à 4°C

① Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik)

Fiche 20

Purification de la P41 par électrophorèse préparative
à système d'élution continue⁽¹⁾

Tris-Glycine SDS-PAGE⁽²⁾

A) Coulage de la colonne de gel de polyacrylamide (7,0×3,7 cm D.I.)

- Fixer la colonne de verre d'un diamètre intérieur 3,7 cm sur son socle de coulage au moyen des 4 vis
- Glisser la tige centrale de refroidissement à l'intérieur du tube en verre et la bloquer par rotation de 90°
- Brancher la tige centrale à une pompe et faire circuler de l'eau à 4°C (garantit une polymérisation complète et régulière du gel de polyacrylamide, gage de reproductibilité)
- Couler le gel de séparation en versant délicatement le mélange de polyacrylamide dégazé⁽³⁾ le long de la tige centrale (à l'aide d'une pipette de 10 mL), jusqu'à une hauteur de 7,4 cm (en polymérisant le gel se rétracte de ~0,4 cm)
- Taper le socle sur la pailasse afin de déloger les éventuelles bulles piégées dans le fond de la colonne
- Recouvrir délicatement la surface du liquide avec de l'isopropanol à l'aide d'une pipette pasteur plastique prolongée d'un fin capillaire
- Vérifier l'horizontalité du socle de coulage avec le niveau à bulle et laisser polymériser une nuit
- Le lendemain, aspirer l'isopropanol en veillant à ne pas heurter la surface du gel et rincer abondamment à l'eau distillée
- Couler le gel de concentration⁽⁴⁾ sur une hauteur de 1,4 cm en prévision d'une hauteur finale de ~1 cm
- Recouvrir d'isopropanol et laisser polymériser pendant 1 à 2 h avec le système de refroidissement en route
- Aspirer l'isopropanol et rincer la surface du gel abondamment à l'eau distillée
- Déconnecter le système de refroidissement
- Dévisser puis séparer la colonne de verre du socle de coulage en faisant levier avec une spatule
- Rincer la surface inférieure du gel à l'eau distillée, elle doit être lisse et régulière

① Prep Cell Model 491 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

② Laemmli (1970) *Nature*, 227 : 680-685

③ Gel de séparation : 12% (p/v) acrylamide:bisacrylamide (37,5:1) (Bio-Rad) dans tampon Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) (dégazé 20 min dans une fiole à vide de 100 mL) et polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,025% (p/v) et TEMED 0,025% (v/v) (préparer 60 mL)

④ Gel de concentration : 4% (p/v) acrylamide:bisacrylamide (37,5:1) (Bio-Rad) dans du tampon Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,1% (v/v) (préparer 10 mL)

B) Assemblage de la cellule d'électrophorèse

- Visser fermement la colonne de gel sur la base circulaire de la chambre d'élution qui contient 2 frittés (imprégnés de tampon d'élution) séparés par une membrane de dialyse au seuil de coupure de 6000 Da
- Fixer au-dessus de la colonne de gel, la chambre supérieure de tampons qui comprend un réservoir périphérique (indépendant) pour le tampon d'élution et un réservoir central pour le tampon cathodique puis connecter les tubulures d'élution et de refroidissement sur leurs pores respectifs
- Remplir les 2 réservoirs de tampon d'électrodes⁽⁵⁾. Filtrer et dégazer le tampon d'élution
- Vérifier l'étanchéité du système
- Poser l'ensemble sur la chambre inférieure constituée du réservoir de tampon anodique rempli de tampon d'électrodes⁽⁵⁾
- Purger l'air contenu dans la chambre d'élution en injectant doucement du tampon d'élution par le canal de sortie avec une seringue de 20 mL

C) Branchement des appareils périphériques

- Relier la tige centrale de refroidissement à une pompe branchée sur le réservoir de tampon anodique en circuit fermé (débit de ~100 mL/min). La circulation de tampon limite l'échauffement de la colonne de gel de polyacrylamide lors de la migration
- Connecter le tubule de sortie de la chambre d'élution à une pompe péristaltique P-3⁽⁶⁾ vers un détecteur UV⁽⁷⁾ couplé à un intégrateur chromatographique⁽⁸⁾ jusqu'à un collecteur de fractions Ultrarac[®] II⁽⁹⁾

D) Préparation et dépôt de l'échantillon

- Mélanger 5 mg d'extrait protéique (extrait obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium 70%⁽¹⁰⁾) dans 700 µL de tampon de dépôt^⑩ dans un microtube de 1,5 mL et vortexer vigoureusement
- Chauffer à 100°C pendant 3 min
- Centrifuger à 10000 g pendant 5 min
- Prélever le surnageant et le déposer sur la surface du gel à l'aide d'une seringue de 1 mL prolongée d'un fin capillaire

E) Conditions d'électrophorèse et de collection

- Brancher la cellule d'électrophorèse sur un générateur de courant continu réglé pour délivrer un courant constant (limite l'échauffement lié à l'effet Joule)
- Commencer la migration à 20 mA jusqu'à ce que l'échantillon arrive à mi-hauteur du gel de concentration puis porter l'ampérage à sa valeur définitive de 40 mA constant. Le voltage augmente de 150 V à 240 V en fin d'électrophorèse (24 h de migration)
- Lorsque le front de bleu de bromophénol atteint le bas de la colonne de gel, lancer l'élution à un débit de 0,4 mL/min et collecter des fractions toutes les 5 min (2 mL)
- Enregistrer parallèlement le profil d'élution à 280 nm

⑤ Tampon d'électrodes : Tris 25 mM contenant glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl) (préparer 5 L)

⑥ Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède

⑦ Model 117 (Gilson Inc., Middleton, WI, USA)

⑧ Merck D-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japon

⑨ LKB Broma

⑩ Galland *et al.* (1998) *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 706 (1) : 63-71

⑩ Tampon de dépôt : Tris-HCl 30 mM (pH 6,8) contenant SDS 3% (p/v), DTT 125mM, glycérol 30% (v/v) et bleu de bromophénol 0,05% (p/v)

F) Analyse fine des fractions collectées

- Analyser les fractions du pic correspondant à la P41 (temps de rétention 12 à 32 h) sur minigels SDS-PAGE à 12% avec coloration au nitrate d'argent
- Rassembler les fractions enrichies en protéines de 17 kDa et concentrer le volume obtenu (~20 mL) par centrifugation à 2000 *g* (4°C) dans une unité d'ultrafiltration munie d'une membrane au seuil de coupure de 10000 Da⁽¹⁾ jusqu'à un volume final de ~300 µL
- Doser la concentration en protéines par la méthode du BCA

① Centriprep, Amicon, Millipore, Bedford MA 01730 USA

Fiche 21

Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)⁽¹⁾

Le principe de base de ce dosage repose sur la réaction du Biuret consistant en une réduction par les protéines des ions cuivrique (Cu^{2+}) en ions cuivreux (Cu^+) en milieu alcalin. Le complexe hydrosoluble formé par l'interaction de 2 molécules d'acide bicinchoninique avec un ion Cu^+ produit une coloration pourpre, absorbant fortement à 562 nm selon la loi de Beer-Lambert. Ce dosage est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay[®] Reagent⁽²⁾

- Préparer une gamme étalon (25 à 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) à partir d'une solution stock de BSA⁽³⁾ diluée dans la même solution que les échantillons à doser
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA)⁽⁴⁾ avec 1 volume de réactif B (CuSO_4)⁽⁵⁾
- Distribuer 25 μL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits. Deux blancs sont réalisés avec 25 μL de diluant seul
- Ajouter 200 μL de réactif de travail et agiter la plaque
- Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques à 570 nm (Fluostar BIOLISE)
- La droite étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite par le logiciel

① Smith *et al.* (1985) *Anal. Biochem.*, 150 : 76-85

② Pierce, Rockford, IL, USA

③ Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN_3 à 0,05% (p/v)

④ Réactif A : solution aqueuse contenant BCA- Na_2 1% (p/v), Na_2CO_3 2% (p/v), tartrate- Na_2 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO_3 0,95% (p/v) (pH 11,25)

⑤ Réactif B : solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

⑥ Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France)

Fiche 22

Electrophorèses analytiques des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)⁽¹⁾

Tris-Glycine SDS-PAGE

- Visser les plaques de verre séparées par des espaceurs sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage
- Couler le gel de séparation⁽²⁾ entre les plaques de verre à l'aide d'une pipette de 10 mL jusqu'à une hauteur de 5 cm environ et recouvrir sa surface avec de l'isopropanol
- Laisser polymériser pendant 30 min à température ambiante
- Aspirer l'isopropanol et rincer abondamment la surface du gel à l'eau distillée
- Eliminer toutes traces d'eau et couler le gel de concentration⁽³⁾ avec une pipette
- Positionner le peigne en Téflon® en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser à nouveau 30 min. La hauteur du gel de concentration est de 1 cm à partir du bas des puits de dépôt
- Retirer le peigne et rincer soigneusement chaque puits avec une pissette d'eau distillée afin d'enlever l'acrylamide non polymérisé. Eliminer l'eau restant dans les puits
- Former le réservoir de tampon cathodique en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes en forme de U
- Remplir ce réservoir central jusqu'en haut avec du tampon cathodique⁽⁴⁾ (115 mL) et contrôler l'étanchéité
- Disposer l'ensemble dans la cuve de tampon anodique⁽⁴⁾ remplie au 1/3 (300 mL)
- Ajouter 1 volume de tampon de dépôt⁽⁵⁾ pour 2 volumes d'échantillon
- Chauffer à 100°C pendant 3 min les échantillons et les marqueurs de taille⁽⁶⁾
- Charger les puits du gel avec les échantillons et les standards dénaturés
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration débute à 50 V constant (~10 mA) le temps que les protéines pénètrent dans le gel de concentration puis 120 V (25 mA) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel (au total 1h30)

① Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad)

② Gel de séparation : 12% (p/v) acrylamide:bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad) dans tampon Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) et polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05% (v/v), SDS 0,1% (préparer 15 mL pour 2 minigels)

③ Gel de concentration : 4% (p/v) acrylamide:bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad) dans tampon Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05% (v/v) SDS 0,1% (préparer 5 mL pour 2 minigels)

④ Tampon d'électrodes : Tris 25 mM contenant glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)

⑤ Tris-HCl 30 mM, pH6,8, EDTA 3 mM, SDS 3% (p/v), DTT 120 mM, glycérol 30% (v/v), bleu de bromophénol 0,05% (p/v) (Laemmli (1970) Nature, 227 : 680-685 modifié)

⑥ Marqueurs de poids moléculaires : *Low Molecular Weight* (LMW - Amersham Pharmacia, UK) : Phosphorylase b 97 kDa, Albumin 66 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Carbonic anhydrase 30 kDa, Trypsin inhibitor 20,1 kDa, α -Lactalbumin 14,4 kDa ; *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad) : Myosin 209 kDa, β -galactosidase 125 kDa, Bovine serum albumin 70 kDa, Carbonic anhydrase 42,8 kDa, Soybean trypsin inhibitor 32,6 kDa, Lysozyme 17,6 kDa, Aprotinin 7,5 kDa ; *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen - Life Technology) : ~184,5 kDa, ~121,3 kDa, ~85,9 kDa, ~68,8 kDa (couleur rose), ~52,5kDa, ~40,0 kDa, ~28,4 kDa, ~21,7 kDa, ~16,8 kDa, ~9,1 kDa

Fiche 23

Colorations des protéines après électrophorèse
sur gel de polyacrylamide

1) Coloration au bleu de Coomassie® R250

- Dissoudre 2 g de bleu de Coomassie® R250⁽¹⁾ dans 200 mL d'eau distillée et agiter pendant 5 à 10 min
- Filtrer cette solution stock de colorant à 1% (p/v) sur filtre 0,45µm et la stocker à température ambiante
- Pour la coloration d'un gel, préparer 50 mL une solution finale à 25% (p/v) en mélangeant 12,5 mL de solution stock à 5 mL d'acide acétique et à 25 mL de méthanol
- Incuber 15 à 20 min sous agitation légère et à température ambiante
- Vider la solution de colorant et décolorer le gel avec un mélange méthanol / acide acétique / eau distillée (4:1:5, v/v/v) renouvelé régulièrement

2) Révélation au nitrate d'argent

- Préparer toutes les solutions avec de l'eau ultrapure⁽²⁾
- Agiter légèrement le gel au cours des différentes étapes de la coloration
- Fixer le gel dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (4:1:5, v/v/v) pendant au moins 1 h
- Faire 3 lavages de 20 min chacun avec une solution d'éthanol à 30% (v/v)
- Incuber 1 min avec une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (p/v) (réduction)
- Laver 3 fois 20 sec le gel avec de l'eau ultrapure
- Incuber 20 min dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% (p/v) et formaldéhyde (37%) à 0,02% (v/v) (extemporanée)
- Laver abondamment 3 fois 20 sec avec de l'eau ultrapure
- Développer le gel avec une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 3% (p/v), formaldéhyde à 0,05% (v/v) et thiosulfate de sodium à 0,0005% (p/v) (extemporanée)
- Laver le gel abondamment 2 fois 30 sec avec de l'eau ultrapure
- Arrêter la réaction de développement avec une solution de glycine à 0,5% (p/v)
- Laver 2 fois 30 min le gel dans de l'eau ultrapure

3) Séchage des gels de polyacrylamide sur papier

- Tremper le gel dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (7:5:88, v/v/v) contenant du glycérol 1% (v/v) pendant au moins 1 h
- Rincer rapidement à l'eau courante
- Placer le gel sur un papier filtre⁽³⁾ humidifié à l'eau et le recouvrir d'un film plastique⁽⁴⁾
- Lisser la surface du gel afin d'éliminer toutes bulles
- Placer l'ensemble entre 2 papiers Whatman® secs dans le sécheur de gel⁽⁵⁾
- Sécher à 80°C pendant 2 h avec un cycle de montée en température lent

① PhastGel® Blue R conçu pour l'unité de révélation de l'automate d'électrophorèse PhastSystem™ (Pharmacia, UK)

② H₂O Milli-Q® (Millipore)

③ Papier filtre 3MM pour chromatographie (Whatman)

④ Saran® (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)

⑤ Gel dryer Model 583 (Bio-Rad)

Fiche 24

Dosage⁽¹⁾ des IgE spécifiques sur epoxy-Sepharose^{®(2)}
et test d'inhibition

A) Préparation du gel

- Laisser gonfler 0,65 g d'epoxy Sepharose dans de l'eau distillée (1g d'epoxy-Sepharose = 3 mL de gel hydraté)
- Laver successivement le gel avec 200 fois le volume de gel hydraté des solutions suivantes dans un verre fritté n°1 :
 - eau distillée
 - NaCl 0,5 M
 - tampon carbonate de sodium⁽³⁾

B) Couplage de la protéine au gel

- Fixer 1 mg de protéine purifiée de façon covalente à de l'epoxy-Sepharose[®], en incubant la protéine avec le gel pendant 18 h minimum à 37°C sous agitation rotative

C) Lavage du gel

- Laver successivement le gel avec 200 fois le volume de gel hydraté des solutions suivantes dans un verre fritté n°1 :
 - eau distillée
 - NaCl 0,5 M
 - tampon Tris⁽⁴⁾

D) Test de fixation des IgE

- Incuber 50 µL de gel-protéine en suspension avec 50 µL de sérum de patient allergique (ou de témoin) pendant 3 h à température ambiante sous agitation
- Laver la phase solide 3 fois avec 2 mL de tampon phosphate⁽⁵⁾
- Incuber avec 50 µl d'anticorps⁽⁶⁾ anti-IgE humaine marqués à l'iode ¹²⁵I à température ambiante pendant 18h sous agitation
- Laver de nouveau la phase solide 3 fois avec 2 mL de tampon phosphate⁽⁵⁾
- La radioactivité γ fixée à la phase solide est comptée⁽⁷⁾ : Le test est considéré comme positif quand le pourcentage de fixation des IgE du patient allergique (P) est **2 fois supérieur** au pourcentage de fixation du patient témoin (T)

E) Test d'inhibition

Lorsque (P) n'est que 2 à 3 fois supérieur à (T) lors du test de fixation, une étape d'inhibition est réalisée avant de mettre le sérum en contact avec le gel-protéine

- Incuber le sérum avec une solution de protéine purifiée pendant 1 h
- Y ajouter les 50 µL de gel-protéine en suspension et agiter pendant 3 h à température ambiante et continuer comme précédemment
- Le pourcentage d'inhibition est estimé : $\%I = [(cpm_0 - cpm_i) / cpm_0] \times 100$ par comptage γ⁽⁷⁾, avec cpm₀ la radioactivité adsorbée sans préincubation du sérum avec la protéine et cpm_i la radioactivité adsorbée avec préincubation

① Olszewski *et al.* (1998) *Clin Exp Allergy* 28 (7) : 850-9

② Epoxy-activated Sepharose[®] 6B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède)

③ Tampon carbonate de sodium 0,1 M, pH 9,4

④ Tris-HCl 0,02 M pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M et NaN₃ 0,02%

⑤ Tampon phosphate 0,05 M pH 7,4, NaCl 0,5 M, BSA 0,02%

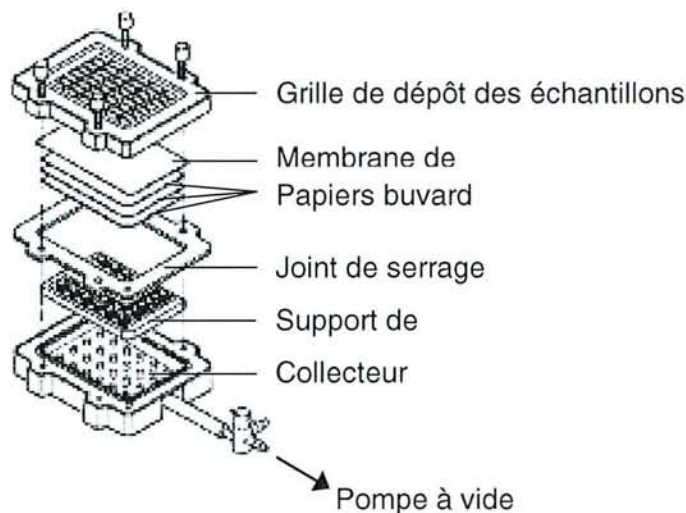
⑥ Beckman Coulter, France

⑦ Compteur Auto-Gamma[®] CobraTMII Série (Packard Instrument Company, Meriden, USA)

Fiche 25

Dépôt de protéine purifiée sur membrane de nitrocellulose (Slot-blot)

- Découper une membrane de nitrocellulose⁽¹⁾ et 2 papiers buvard⁽²⁾ à la taille du support⁽³⁾ de membrane (11,55 cm x 7,9 cm) et les immerger dans du TBS⁽⁴⁾
- Superposer les différents éléments sur le support de membrane dans l'ordre suivant :
 - les 2 papiers buvard
 - la membrane de nitrocellulose
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique (10 mL), cassée en deux, sur la membrane
- Visser la grille de dépôt sur le collecteur⁽³⁾
- Relier le collecteur à une pompe à vide⁽⁵⁾
- Faire 2 lavages de la membrane en déposant pour chacun des lavages 200 μ L de TBS / puits, et en aspirant en faisant le vide
- Déposer 2 μ g de protéine P41 purifiée dans un volume final de 200 μ L / puits, aspirer en faisant le vide. La protéine se fixe à la membrane
- Faire un lavage avec 200 μ L de TBS / puits, aspirer en faisant le vide
- Dévisser le montage. Récupérer la membrane et annoter le côté où sont fixées les protéines
- Rincer la membrane dans du TBS
- Visualiser les protéines par coloration au rouge Ponceau S⁽⁶⁾ pendant 5 min
- Décolorer à l'eau distillée et laisser sécher la membrane
- La membrane peut être conservée à 4°C



① Membrane de nitrocellulose pure de porosité 0,2 μ m (Bio-Rad)

② Paper blotting (Sigma P-6803)

③ Appareil utilisé : Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad)

④ TBS : Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4

⑤ Pompe à vide électrique

⑥ Solution filtrée de rouge Ponceau S (Sigma) à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v)

Fiche 26

Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose⁽¹⁾

A) Electro-transfert semi-sec⁽²⁾

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans du tampon de transfert à 4°C⁽³⁾
- Couper la membrane de nitrocellulose⁽⁴⁾, les papiers filtres⁽⁵⁾ et buvards⁽⁶⁾ à la dimension du gel (~5x8 cm) et immerger les dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - un papier buvard
 - un papier filtre Whatman® 3MM
 - la membrane de nitrocellulose
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre Whatman® 3MM
 - un papier buvard
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, cassée en deux, sur le sandwich
- Eponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 15 V pendant 30 min
- Démontez le sandwich et récupérer la membrane de nitrocellulose
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S⁽⁷⁾ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

① Towbin *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350-4354

② Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad)

③ Tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20% (v/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)

④ Membrane de nitrocellulose pure de porosité 0,2 µm (Bio-Rad)

⑤ Papier filtre 3MM pour chromatographie (Whatman)

⑥ Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma)

⑦ Solution filtrée de rouge Ponceau S (Sigma) à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v)

B) Electro-transfert « liquide »⁽¹⁾

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans du tampon de transfert à 4°C⁽²⁾
- Couper la membrane de nitrocellulose⁽³⁾, les papiers filtres⁽⁴⁾ à la dimension du gel (~5x8 cm) et les immerger dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - éponge
 - un papier filtre
 - la membrane de nitrocellulose
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre
 - éponge
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, cassée en deux, sur le sandwich
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle refermer l'appareil avec son capot.
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 250 mA pendant 1h
- Démontez le sandwich et récupérez la membrane de nitrocellulose
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S⁽⁵⁾ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

① Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad)

② Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM , SDS 0,0375% (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl)

③ Membrane de nitrocellulose pure de porosité 0,2 µm (Bio-Rad)

④ Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma)

⑤ Solution filtrée de rouge Ponceau S (Sigma) à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v)

Fiche 27

Détection immunologique de la P41 de cabillaud,
Révélation par colorimétrie, chimiluminescence et autoradiographie

A) Immunodétection par révélation colorimétrique de l'activité peroxidase
grâce à l'antisérum anti-P41 de lapin

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de nitrocellulose dans du tampon de blocage⁽¹⁾ pendant 1 h à température ambiante sous agitation
- Rincer 3 fois 10 min avec du tampon de lavage⁽²⁾
- Incuber la membrane avec l'antisérum de lapin anti-P41 dilué au 1/100^{ème} dans du tampon d'incubation⁽³⁾ pendant 2h à température ambiante, sous agitation lente
- Laver la membrane de nitrocellulose 3 fois avec le tampon de lavage (10 min chaque fois)
- Immerger la membrane dans la solution d'anticorps secondaires marqués à la peroxidase⁽⁴⁾ diluée au 1/1000^{ème} pendant 1 h sous agitation lente à température ambiante
- Laver 3 fois la membrane avec du tampon de lavage (10 min chaque fois) et 1 fois avec du TBS (5 min)
- L'activité peroxidase est révélée avec le substrat précipitant, 4-Chloro-1-Naphtol⁽⁵⁾. Préparer une solution stock en dissolvant 1 tablette⁽⁶⁾ (~32 mg) dans 10 mL de méthanol par agitation vigoureuse (conserver à 4°C à l'abri de la lumière)
- Ajouter 2 mL de cette solution stock méthanol à 10 mL de tampon triéthanolamine⁽⁷⁾ et juste avant de verser le mélange sur la membrane, ajouter 5 µL d'une solution récente d'H₂O₂ à 30% (v/v) (substrat à une concentration finale de 0,05%, p/v)
- Incuber au moins 5 min sous légère agitation à température ambiante
- Arrêter la coloration en rinçant abondamment la membrane à l'eau courante
- Conserver la membrane séchée à l'abri de la lumière

① Tampon de blocage : Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant BSA 3% (p/v)

② Tampon de lavage : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,05% (v/v)

③ Tampon d'incubation : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,1% (v/v)

④ Anticorps monoclonal anti-IgG de lapin (spécifique des chaînes γ) couplé à la peroxidase de raifort (ratio molaire IgG : peroxidase de 0,9 à 1,0) en solution dans du TBS contenant du Tween[®] 20 à 0,3% (v/v) (Sigma)

⑤ Nakane *et al.* (1968) *J. Histochem. Cytochem.*, 16 : 557-560

⑥ Tablettes de 4-Chloro-1-Naphtol (Sigma)

⑦ Tampon triéthanolamine : triéthanolamine 2,8% (v/v), NaCl 0,12 M ajusté à pH 7,5 avec un peu d'HCl 1 N

B) Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase grâce à des sérums de patients allergiques

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de nitrocellulose dans du tampon de blocage⁽¹⁾ pendant 2 h à température ambiante sous agitation
- Rincer 2 fois 10 min avec du tampon de lavage⁽²⁾
- Incuber la membrane avec le sérum d'un patient allergique au cabillaud dilué au 1/10^{ème} dans du tampon d'incubation⁽³⁾ pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane de nitrocellulose 5 fois avec le tampon de lavage (10 min chaque fois)
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase⁽⁴⁾ diluée au 1/10000^{ème} pendant 1 nuit sous agitation rotative à 4°C (technique des sacs scellés)
- Laver 5 fois la membrane avec du tampon de lavage (10 min chaque fois) et 1 fois avec du TBS (5 min)
- L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence⁽⁵⁾
- Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique⁽⁶⁾
- Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel, puis recouvrir d'un film plastique
- Laisser 5 min, puis sécher la membrane
- Disposer la membrane entre 2 films plastique
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique⁽⁷⁾ pendant 1 à 5 min
- Révélation du film autoradiographique dans un bain de développement⁽⁸⁾ jusqu'à apparition des premières tâches (~30 s)
- Rinçage à l'eau
- Bain de fixation⁽⁹⁾ jusqu'à transparence du film (~2 min)

① Tampon de blocage : Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20[®] à 0,3% (v/v)

② Tampon de lavage : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,05% (v/v)

③ Tampon d'incubation : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,1% (v/v)

④ Anticorps de Chèvre anti-IgE humaine (spécifique des chaînes ϵ) couplé à la peroxydase (ratio molaire IgG : peroxydase de 0,8 à 1,5) (Sigma) en solution dans du TBS contenant du Tween[®] 20 à 0,3% (v/v)

⑤ ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinium émettant une lumière intense

⑥ Saran[®] (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)

⑦ BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film, NY, USA)

⑧ Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)

⑨ Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

C) Immunodétection par révélation autoradiographique à l'iode ¹²⁵I
grâce à des sérums de patients allergiques

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de nitrocellulose dans du tampon de blocage⁽¹⁾ pendant 2 h à température ambiante sous agitation
- Rincer 2 fois 10 min avec du tampon de lavage⁽²⁾
- Incuber la membrane avec le sérum d'un patient allergique au cabillaud dilué au 1/10^{ème} dans du tampon d'incubation⁽³⁾ pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane de nitrocellulose 5 fois avec le tampon de lavage (10 min chaque fois)
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires radioactifs ¹²⁵I⁽⁴⁾ diluée au 1/10^{ème} pendant 1 nuit sous agitation rotative à 4°C (technique des sacs scellés)
- Laver 5 fois la membrane avec du tampon de lavage (10 min chaque fois) et 1 fois avec du TBS (5 min)
- Envelopper la membrane encore humide (protéines vers le haut) dans un film plastique⁽⁵⁾
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique⁽⁶⁾ et placer le tout dans une cassette avec écran amplificateur pendant 20 jours à -80°C
- Révéler le film autoradiographique dans un bain de développement⁽⁷⁾ jusqu'à apparition des premières tâches (~30 s)
- Rincer à l'eau
- Immerger dans un bain de fixation⁽⁸⁾ jusqu'à transparence du film (~2 min)

① Tampon de blocage : Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20[®] à 0,3% (v/v)

② Tampon de lavage : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,05% (v/v)

③ Tampon d'incubation : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,1% (v/v)

④ Anticorps monoclonal ¹²⁵I anti-IgE humaine (Beckman Coulter, France) en solution dans du TBS contenant du Tween[®] 20 à 0,1% (v/v), BSA 0,1% (p/v)

⑤ Saran[®] (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)

⑥ Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

⑦ Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)

⑧ Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

Résultats

Les précédents travaux menés au laboratoire sur les allergènes de poisson ont permis de détecter de nombreuses protéines IgE-réactives. Deux protéines ont été choisies et purifiées par notre équipe.

La connaissance des allergènes mis en cause dans l'allergie étant nécessaire pour envisager de nombreuses perspectives appliquées (diagnostic, traitement, produits industriels,...), nous avons dans un premier temps identifié les deux protéines choisies par biologie moléculaire. Puis dans une deuxième partie, nous avons exprimé de façon recombinante l'une des deux protéines allergéniques afin de pouvoir étudier, dans un dernier temps, l'immunoréactivité de la protéine sous sa forme purifiée ou sous forme recombinante.

1 IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES ADNc CORRESPONDANT AUX PROTEINES ALLERGENIQUES P24 ET P41

1.1 Obtention de matériel génétique de cabillaud

Les ARN totaux sont extraits de filets de cabillaud *pre rigor mortis* par gradient de chlorure de césium afin d'être utilisés en RT-PCR.

1.2 Obtention de l'ADNc de la P24 par RT-PCR

La protéine P24 a été purifiée par chromatographie DEAE à l'IFREMER de Nantes. La bande protéique observée en SDS-PAGE a été découpée et envoyée au Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Institut Pasteur à Paris.

De la protéine P24, ont été séquencés quatre peptides dont les peptides « VFEIIDQDK » et « IGVDEFGAMIK ».

Les quatre séquences peptidiques obtenues ont permis de dessiner de nombreuses séquences nucléotidiques dégénérées correspondantes (sens et antisens), utilisées comme amorces pour l'obtention de l'ADNc par RT-PCR et le séquençage. Toutes les amorces ont été testées par couple en RT-PCR mais seules les amorces S6 et AS2 issues des deux peptides indiqués ci-dessus ont donné des résultats (voir Fiche 3). Les amplifications ayant généré des produits d'intérêt ont été effectuées selon la stratégie suivante (Figure 7) :

- Le couple d'amorces S6 / AS2 génère un fragment de taille inférieure à 194 pb. Ce produit de PCR a pu être séquencé sur environ 170 pb ce qui nous a permis de dessiner une nouvelle amorce sens INT S2
- Le couple INT S2 / Anchor génère un fragment d'environ 640 pb par 3'RACE. La séquence 3' de l'ADNc de la P24 est ainsi déterminée.

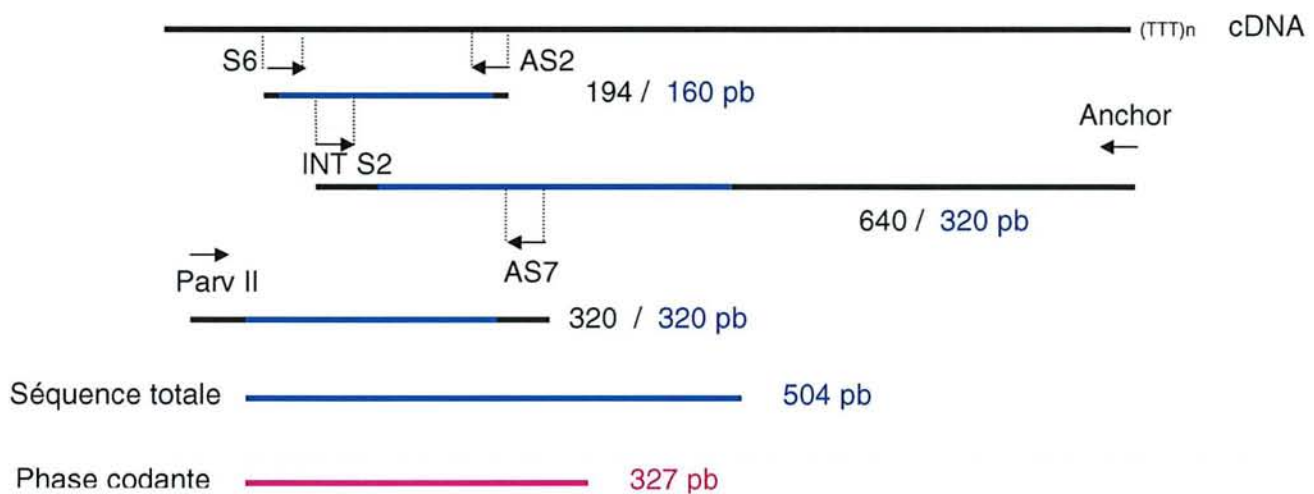
Pour obtenir la séquence 5' de l'ADNc, une recherche de séquence sur la banque de données NCBI a été effectuée (BLAST). La séquence se rapprochant le plus du fragment de P24 déjà déterminé est celle de la parvalbumine β de saumon. L'amorce Parv II a été dessinée d'après celle-ci.

- Le couple Parv II / AS7 génère un fragment de 300 pb qui est alors séquencé. La partie 5' de l'ADNc de la P24 est donc déterminée.

Par chevauchement des séquences obtenues, la quasi totalité de la séquence de l'ADNc de la P24 est identifiée (Figure 8).

Figure 7. Stratégie de séquençage de la protéine P24

Les noms des amorces sont indiqués au niveau des flèches. La taille des produits d'amplification est indiquée en noir. La taille des séquences obtenues par séquençage est indiquée en bleu. La séquence codante est déduite (en rose).



1.2.1 Identification et caractérisation de la protéine P24

1.2.1.1 Analyse de la séquence nucléotidique

L'ADNc a été séquencé sur 500 nucléotides. La séquence codante est incomplète puisque l'ATG n'est pas présent. La recherche sur la banque de données NCBI (BLAST) indique néanmoins que l'ADNc code une parvalbumine. Le signal de polyadénylation est observé (AAATAA en gras) (Figure 8).

1.2.1.2 Analyse de la séquence en acides aminés

La séquence en acides aminés est déduite des codons correspondants. Ainsi 106 acides aminés ont pu être déduits. Néanmoins, l'ATG n'a pas été séquencé. Par alignement de la séquence obtenue avec les séquences de la banque de données NCBI, la protéine P24 doit être composée d'environ 108 acides aminés comme l'allergène majeur du saumon Sal sl (cl.2) avec qui elle possède le plus d'homologies. Le nucléotide +4 de la P24 n'a pas pu être

séquencé rendant incertaine l'identification de l'acide aminé +2 (une alanine ou sérine d'après les nucléotides +5 et +6).

Pour contrôle, un nouveau peptide « AGDSDGDGAIGVDEW » a été microséquençé. Celui-ci est bien présent dans la séquence déduite de l'ADNc.

1.2.1.2.1 Masse moléculaire de la P24

La masse moléculaire de la protéine P24 déduite de la séquence en acides aminés est d'environ 11,4 kDa d'après les logiciels MWCALC et Expasy au lieu des 24 kDa déduits des gels SDS-PAGE dans les travaux précédents (Dory, *et al.* 1998). L'hypothèse la plus simple est alors que la bande protéique observée à 24 kDa est un dimère de parvalbumines.

1.2.1.2.2 Point isoélectrique de la P24 théorique calculé

Le point isoélectrique de la P24 théorique calculé grâce aux logiciels MWCALC et Expasy est d'environ 4,6.

1.2.1.2.3 Alignement de séquences

Les séquences des parvalbumines des différentes espèces sont très conservées. La protéine, composée d'environ 108 acides aminés est une parvalbumine β . Par alignement, cette parvalbumine du cabillaud de l'océan Atlantique (*Gadus morhua*) montre une identité de 75,2% avec l'isoforme 2 de parvalbumine de saumon (Sal sl cl.2) contre 62,3% avec la parvalbumine (Gad cl) du cabillaud de la mer Baltique (*Gadus callarias*). Nous appellerons le monomère de P24, Gad ml selon la nomenclature. Sal sl (isoformes 1 et 2) et Gad cl sont déjà connus comme étant les allergènes majeurs des poissons correspondants (Aas K, *et al.* 1969 ; Lindstrom, *et al.* 1996). Gad ml semble donc être une des isoformes d'allergène majeur de *Gadus morhua*.

La bande protéique P24 étudiée s'est révélée être un dimère de parvalbumine. Cette parvalbumine est aujourd'hui très bien connue puisque plusieurs isoformes ont été décrites depuis 1966 chez différents poissons (*Gadus callarias*, *Samo salar*, *Cyprinus carpio*) comme l'allergène majeur. C'est pourquoi, l'étude de la P24 ne sera pas développée davantage.

Figure 8. Séquences ADNc et peptidique de la P24

Le codon stop et le signal de polyadénylation sont indiqués en gras. Les peptides microséquencés ayant permis de dessiner les amorces nécessaires aux RT-PCR sont soulignés en bleu, le peptide contrôle (microséquencé après connaissance de la séquence de la P24) est souligné en rose. La seule cystéine de la P24 est entourée

1	***	*CC	TTC	GCC	GGT	CTT	AAC	GAT	GCT	GAC	ATC	ACT	GCA	GCC	CTG	GCG	GCC	<u>TGC</u>	AAA	GCT
1	M	S/A	F	A	G	L	N	D	A	D	I	T	A	A	L	A	A	C	K	A
61	GAG	GGC	TCC	TTC	GAC	CAC	AAG	GCG	TTC	TTC	ACT	AAA	GTC	GGC	CTG	GCC	GCC	AAG	TCC	CCC
21	E	G	S	F	D	H	K	A	F	F	T	K	V	G	L	A	A	K	S	P
121	GCT	GAC	ATC	AAG	AAG	GTG	TTT	GAG	ATC	ATT	GAC	CAG	GAC	AAG	AGT	GAC	TTT	GTT	GAG	GAG
41	A	D	I	K	K	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	S	D	F	V	E	E
181	GAT	GAG	CTG	AAG	CTG	TTC	CTC	CAG	AAC	TTC	AGC	GCC	GGT	GCC	AGA	GCT	CTG	AGT	GAC	GCT
61	D	E	L	K	L	F	L	Q	N	F	S	A	G	A	R	A	L	S	D	A
241	GAG	ACC	AAG	GTT	TTC	CTG	AAG	GCC	GGA	GAC	TCT	GAC	GGT	GAC	GGC	AAG	ATC	GGA	GTT	GAT
81	E	T	K	V	F	L	K	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>D</u>
301	GAG	TTT	GGC	GCC	ATG	ATC	AAG	GCA	TAG	ACTGTTCTCCACCAACTAGACCAGATGCTTACCCACCTACTC										
101	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	A	Stop											

AGAAGGAACACTGGAGCTGAGACCACCTCCTCACCCCTCTCTCGCTCATCTCTCAACAACAATTTTATATA**AAATAAC**CTTT

AACCTAACCCCCCCCCCCCCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

1.2.2 Obtention de l'ADNc de la P41 par RT-PCR

La protéine P41 a été purifiée par (Galland, *et al.* 1998). Son microséquençage peptidique effectué au Laboratoire de microséquençage de l'Institut Pasteur à Paris, a permis d'obtenir les séquences d'un peptide N-terminal « DEV?INGFGKIG?L » et d'un peptide interne « VIHDNFGIVE ».

De ces 2 séquences en acides aminés ont été déduites les séquences nucléotidiques dégénérées correspondantes (voir Fiche 3), utilisées comme amorces pour l'obtention de l'ADNc par RT-PCR et le séquençage (Figure 9). Comme pour la protéine P24, toutes les combinaisons d'amorces ont été testées en RT-PCR. Une des combinaisons (CODN/CODI) a permis d'obtenir un premier fragment de l'ADNc. La stratégie complète d'obtention de l'ADNc est indiquée en Figure 9 :

- Le couple d'amorces CODN / CODI génère deux fragments : l'un de 330 pb et l'autre de 540 pb. La séquence de 330 pb s'avère être la même que les 330 pb en 3' du fragment de 540 pb. L'amorce sens COD N s'est en fait hybridée à la place voulue (en aval proche de l'ATG), mais aussi en amont de l'ATG générant ainsi le plus grand des deux fragments. Par séquençage du produit de PCR de 540 pb, la séquence 5' de l'ADNc de la P41 est déterminée.

- Le couple COD IS1 / Anchor génère un fragment de 740 pb par 3'RACE. La séquence 3' de l'ADNc de la P41 est ainsi déterminée. L'absence de recouplement des séquences 5' et 3' ainsi que les alignements effectués avec les ADNc d'autres espèces indiquent qu'une petite séquence entre les 2 fragments n'a pas été séquencée. Les amorces SCS et SCAS sont alors dessinées d'après les séquences 5' et 3' respectivement.
- Le couple SCS / SCAS génère un fragment de la taille attendue 290 pb qui est alors séquencé.

Par chevauchement des 3 séquences obtenues, la séquence totale de l'ADNc de la P41 est déterminée (Figure 10).

Figure 9. Stratégie de séquençage de la protéine P41

Les amorces sont indiquées au niveau des flèches. La taille des produits d'amplification est indiquée en noir. Les séquençages ont permis de déterminer la partie des produits PCR indiquée en bleu. La séquence codante est déduite (en rose).

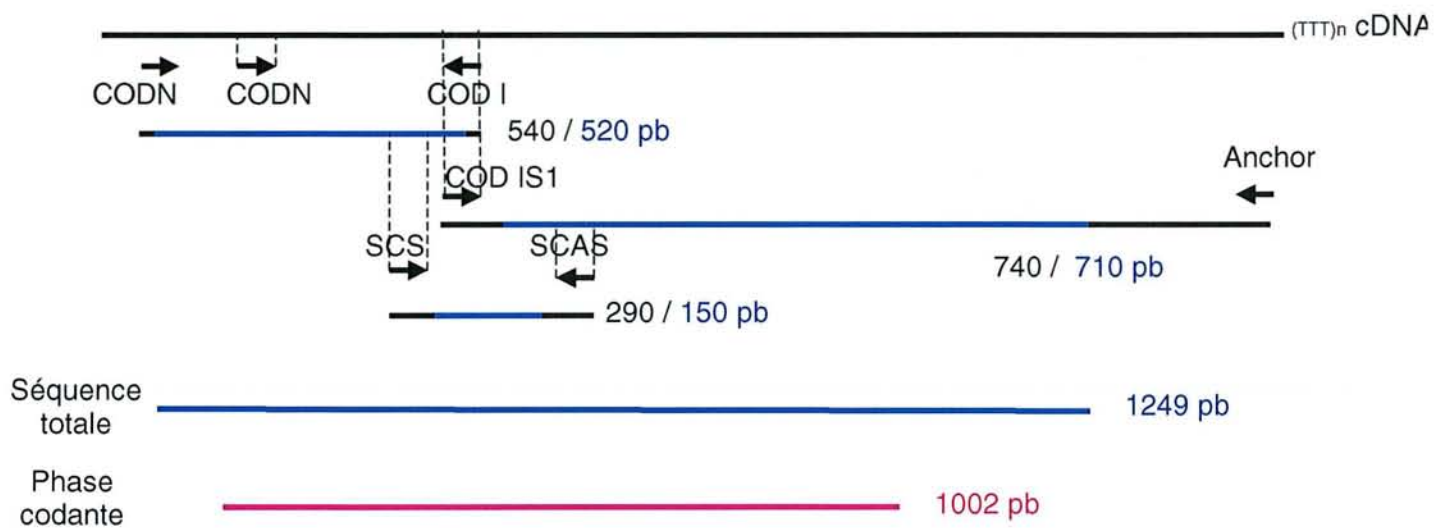


Figure 10. Séquences ADNc et en acides aminés de la P41
La séquence de Kozak, le codon d'initiation, le codon stop et le signal de polyadénylation sont indiqués en gras. Les peptides microséquencés ayant permis de dessiner les amorces nécessaires aux RT-PCR sont soulignés en bleu, le peptide contrôle (microséquencé après connaissance de la séquence de la P41) est souligné en rose. Les codons susceptibles d'avoir généré des initiations internes sont entourés.

- 26

AACGAGGACTATCCAACCCAGAAAAA

1	ATG	GTG	AAA	GTA	GGA	ATC	AAT	GGA	TTT	GGC	CGC	ATC	GGT	CGT	CTG	GTG	ACC	CGC	GCT	GGT
1	M	V	K	V	G	I	N	G	F	G	R	I	G	R	L	V	T	R	A	G
61	TTC	CAG	TCC	AAG	AAG	GTG	GAG	ATC	GTA	GCC	ATC	AAT	GAC	CCG	TTC	ATT	GAC	CTG	GAG	TAC
21	F	Q	S	K	K	V	E	I	V	A	I	N	D	P	F	I	D	L	E	Y
121	ATG	GTC	TAC	ATG	TTC	AAG	TAC	GAC	TCC	ACC	CAC	GGA	CGT	TTC	CAC	GGT	GAG	GTC	AAG	ATC
41	M	V	Y	M	F	K	Y	D	S	T	H	G	R	F	H	G	E	V	K	I
181	GAG	GGT	GAC	AAG	CTG	GTC	ATC	GAC	GGA	CAC	AAG	ATC	AGC	GTG	TTC	CAC	GAG	AGG	GAC	CCC
61	E	G	D	K	L	V	I	D	G	H	K	I	S	V	F	H	E	R	D	P
241	GCC	AAC	ATC	AAG	TGG	GGC	GAT	GCT	GGA	GCC	CAG	TAC	GTG	GTG	GAG	TCC	ACC	GGC	GTG	TTC
81	A	N	I	K	W	G	D	A	G	A	Q	Y	V	V	E	S	T	G	V	F
301	ACC	ACC	ATC	GAG	AAG	GCG	TCC	GCT	CAC	TTG	AAG	GGA	GGC	GCC	AAG	AGA	GTC	ATC	ATC	TCC
101	T	T	I	E	K	A	S	A	H	L	K	G	G	A	K	R	V	I	I	S
361	GCC	CCT	AGT	GCC	GAC	GCA	CCC	ATG	TTC	GTC	ATG	GGA	GTG	AAC	CAC	GAG	AAG	TAC	GAG	AAC
121	A	P	S	A	D	A	P	M	F	V	M	G	V	N	H	E	K	Y	E	N
421	TCC	CTG	CAG	GTT	GTC	AGC	AAT	GCT	TCC	TGC	ACC	ACC	AAC	TGC	CTG	GCC	CCC	CTG	GCC	AAG
141	S	L	Q	V	V	S	N	A	S	C	T	T	N	C	L	A	P	L	A	K
481	GTC	ATC	CAT	GAC	AAC	TTT	GGC	ATC	GTT	GAG	GGA	CTG	ATG	AGC	ACA	GTC	CAC	GCC	ATC	ACC
161	V	I	H	D	N	F	G	I	V	E	G	L	M	S	T	V	H	A	I	T
541	GCC	ACC	CAG	AAG	ACA	GTG	GAC	GGA	CCC	TCC	GGA	AAG	CTG	TGG	AGG	GAC	GGC	CGC	GGC	GCC
181	A	T	Q	K	T	V	D	G	P	S	G	K	L	W	R	E	G	R	G	A
601	AGC	CAG	AAC	ATC	ATC	CCC	GCC	TCC	ACT	GGA	GCC	GCC	AAG	GCT	GTG	GGC	AAG	GTC	ATC	CCC
201	S	Q	N	I	I	P	A	S	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V	I	P
661	GAG	CTC	AAC	GGT	AAG	ATC	ACT	GGC	ATG	GCC	TTC	CGC	GTG	CCC	ACC	CCC	AAT	GTG	TCC	GTG
221	E	L	N	G	K	I	T	G	M	A	F	R	V	P	T	P	N	V	S	V
721	GTC	GAC	CTG	ACC	GTC	CGC	CTG	GAG	AAG	CCT	GCC	AAA	TAT	GAT	GAC	ATC	AAG	AAG	GTC	ATA
241	V	D	L	T	V	R	L	E	K	P	A	K	Y	D	D	I	K	K	V	I
781	AAG	GCT	GCC	TCT	GAG	GGA	CCC	ATG	AAG	GGA	ATT	CTG	GGA	TAC	ACA	GAG	GAC	CAG	GTG	GTG
261	K	A	A	S	E	G	P	M	K	G	I	L	G	Y	T	E	D	Q	V	V

```

841   TCC ACA GAT TTC AAC GGA GAT ATC CGC TCC TCT ATC TTT GAT GCT GGT GCT GGC ATT GCC
281   S   T   D   F   N   G   D   I   R   S   S   I   F   D   A   G   A   G   I   A

901   CTC AAT GAC CAC TTT GTC AAG CTG GTC ACA TGG TAC GAC AAT GAG TTC GGC TAC AGC AAC
301   L   N   D   H   F   V   K   L   V   T   W   Y   D   N   E   F   G   Y   S   N

961   CGC GTC ATC GAC CTG ATG GCC CAC ATG TCC TGC AAG GAG TAA ATCAAGCACTACGTCTCATGCTAAACTGTG
321   R   V   I   D   L   M   A   H   M   S   C   K   E   stop

1034  TGGCCTATCGCTCTGTCAGATTCCCTTGATAGGTTGAAAGTTTTACGTTAATGAC CAATCTATTTTTGTATAGTAAAATCCCTGCGTCTGTGCCAACGT

1135  GGACAGATGGAGCGCATGTCCGCCTGTCTGTGGCACCATGTGGCCACTTTCAGATGTGCAATAAA GTCCTCGGTTTGTGAGAAACACAT
    
```

1.2.3 Identification et caractérisation de la protéine P41

1.2.3.1 Analyse de la séquence nucléotidique

L'ADNc a été séquencé sur 1249 nucléotides. La séquence codante (du codon ATG au codon stop TAA) comporte 1002 pb et code une protéine de 333 acides aminés. La séquence de Kozak et le signal de polyadénylation sont observés. La séquence d'ADNc est soumise à une recherche sur la banque de données NCBI (BLAST). La protéine P41 est identifiée comme étant une Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les séquences ADNc les plus proches (94 et 95% d'homologies) sont celles des GAPDH de *paralichthys olivaceus*, un poisson plat japonais, et de la truite (Tableau 3).

La GAPDH est une protéine ubiquitaire. C'est une enzyme clef de la glycolyse (et de la néoglucogénèse) qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction couplée à une réaction de phosphorylation sur le glycéraldéhyde 3-phosphate formant ainsi du 1,3-diphosphoglycérate (Michels, *et al.* 1986).

Tableau 3. Pourcentages d'identités et d'homologies entre des GAPDH de différentes espèces et celle de *Gadus morhua*

Espèces comparées GAPDH	% d'identités avec la GAPDH de <i>Gadus morhua</i>	% d'homologies avec la GAPDH de <i>Gadus morhua</i>
<i>Paralichthys olivaceus</i>	91 %	94 %
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite)	91 %	95 %
<i>Anguilla japonica</i> (anguille)	88 %	93 %
<i>Sus scrofa</i> (porc)	86 %	92 %
<i>Gallus gallus</i> (poulet)	85 %	92 %
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	85 %	93 %
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (lapin)	85 %	92 %
<i>Homo sapiens</i> (humain)	85 %	92 %
<i>Mus musculus</i> (souris)	85 %	93 %

1.2.3.2 Analyse de la séquence en acides aminés

La séquence en acides aminés est déduite par traduction des codons. La protéine P41 est composée de 333 acides aminés. Pour contrôle, un nouveau peptide (WGDAG) a été microséquéncé. Celui-ci est bien présent dans la séquence déduite de l'ADNc. La protéine dont l'ADNc vient d'être séquéncé est bien la protéine P41 isolée et purifiée par Galland *et al.* en 1998.

1.2.3.2.1 Composition en acides aminés de la P41

La composition totale en acides aminés déduite de la séquence codante de l'ADNc diffère assez de celle obtenue par le LEIMA de l'INRA de Nantes (Galland, *et al.* 1998). Elle est riche en valine, glycine, alanine, isoleucine et lysine, mais pauvre en tryptophane et cystéine (Tableau 4).

Tableau 4. Composition en acides aminés de la P41 déduite d'après l'ADNc

Acides aminés	Composition (%)	Acides aminés	Composition (%)
Asn	4,5	Tyr	2,7
Gln	1,8	Val	10,21
Ser	6,31	Cys	0,9
Gly	9,61	Ile	7,81
His	3	Leu	4,8
Arg	3,6	Phe	4,2
Thr	5,41	Lys	7,81
Ala	8,71	Met	3
Pro	3,6	Trp	0,9
Asp	6,31	Glu	4,8

1.2.3.2.2 Masse moléculaire de la P41

La masse moléculaire de la protéine P41 déduite de la séquence en acides aminés est d'environ 36 kDa d'après les logiciels MWCALC et Expasy au lieu de 41 kDa déduit des gels des travaux précédents (Galland, *et al.* 1998). Après vérification des gels SDS-PAGE, la masse moléculaire observée semble en effet plus proche de 36 kDa que de 41 kDa.

Malgré sa masse moléculaire corrigée, nous continuerons de la nommer P41, ou GAPDH.

1.2.3.2.3 Point isoélectrique de la P41 théorique calculé

Le point isoélectrique de la P41 théorique calculé grâce aux logiciels MWCALC et Expasy est d'environ 8,3 au lieu de 5,8 en isoélectrofocalisation (IEF) (Galland, *et al.* 1998). La différence entre les points isoélectriques, observé et théorique, est certainement due au fait que le *pI* obtenu expérimentalement a été déterminé en conditions natives alors que le point

isoélectrique théorique calculé par les logiciels ne tient pas compte de la conformation de la protéine.

1.2.3.2.4 Alignement de séquences

Les séquences des GAPDH des différentes espèces sont très conservées (Tableau 3 & Figure 11). Elles sont d'ailleurs utilisées comme outil phylogénétique puisqu'elles ont au minimum 40% d'identité, chez les procaryotes et eucaryotes confondus.

Figure 11. Alignements de séquences de GAPDH de différentes espèces
(Clustal W 1.81 matrice Blosum)

Paralichthys	--MVKVGINGFGRIGRLVTRAAFTSKK-VEIVAINDPFIDLEYMVYMFKYDSTHGFRFKGE
Cabillaud	--MVKVGINGFGRIGRLVTRAGFQSKK-VEIVAINDPFIDLEYMVYMFKYDSTHGFRFHGE
Truite	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAAFHSKKGVEIVAINDPFIDLDMVYMFKYDSTHGFRFHGE
Lapin	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNNSGK-VDVVAINDPFIDLHYMVYMFQYDSTHGKFFHGT
Porc	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNNSGK-VDIVAINDPFIDLHYMVYMFQYDSTHGKFFHGT
Humain	MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNNSGK-VDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKFFHGT
Souris	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAICSGK-VEIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKFNNGT
Rat	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFSCKD-VDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKFNNGT
Poulet	--MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAVLSGK-VQVVAINDPFIDLNYMVYMFKYDSTHGKFFKGT
Homard	--SKIGINGFGRIGRLVLRALSCGA--QVVAVNDPFIALEYMVYMFKYDSTHGKFFKGE
	::*:*:*:*:*:* * * . . . :*:*:***** *.******:***** *:*
Paralichthys	VKIEGDKLVIDGHKITVFHERDPTNIKWGDAGAHYVVESTGVFTTIEKASAHKGGAKKV
Cabillaud	VKIEGDKLVIDGHKISVFERDPANIKWGDAGAQYVVESTGVFTTIEKASAHKGGAKRV
Truite	VKAEGGKLVIDGHKITVFHERDPANIKWGDAGATYVVESTGVFTTIEKASTHLKGGAKRV
Lapin	VKAENGLVINGKAITIFQERDPANIKWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHKGGAKRV
Porc	VKAENGLVINGKAITIFQERDPANIKWGDAGATYVVESTGVFTTMEKAGAHKGGAKRV
Humain	VKAENGLVINGNPITIFQERDPSKI KWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHKGGAKRV
Souris	VKAENGLVINGKIPITIFQERDPTNIKWGEAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHKGGAKRV
Rat	VKAENGLVINGKIPITIFQERDPANI KWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHKGGAKRV
Poulet	VKAENGLVINGHAITIFQERDPSNI KWADAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHKGGAKRV
Homard	VKMEDGALVVDGKKITVFNEMKPENIPWSKAGAEYVVESTGVFTTIEKASAHKGGAKKV
	** * . . *:*:* *:*:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Paralichthys	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYDKSLQVVSNSACTTNCLAPLAKVINDNFGIIEGLMSTVH
Cabillaud	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYENSLQVVSNSACTTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMSTVH
Truite	VISAPSADAPMFVMXVNHKEYENSLKVVSNASCXTNCLAPLAKVIHDNYHIIEGLMXTVX
Lapin	IISAPSDAPMFVGMVNHKEYDNSLKI VSNASCXTNCLAPLAKVIHDHFGIVEGLMTTVH
Porc	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYDNSLKI VSNASCXTNCLAPLAKVIHDHFGIVEGLMTTVH
Humain	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYDNSLKI I VSNASCXTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVH
Souris	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYDNSLKI VSNASCXTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVH
Rat	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYDNSLKI VSNASCXTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVH
Poulet	IISAPSADAPMFVGMVNHKEYDKSLKI VSNASCXTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVH
Homard	VISAPSADAPMFVCGVNLEKYSKDMTVVSNASCXTNCLAPVAKVLHENFEIVEGLMTTVH
	:***** ***** * * * * . . . :*:***** *****:***:***: *:* * * * *
Paralichthys	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGASQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPN
Cabillaud	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGASQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKITGMAFRVPTPN
Truite	AVTATQKTEDGSPGKLRDGRGASQNI I PASTGXRKAVGKVI PELNGXDHCMAFRVPTPN
Lapin	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGAAQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPN
Porc	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGAAQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPN
Humain	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGALQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTAN
Souris	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGAAQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPN
Rat	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGAAQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPN
Poulet	AITATQKTVDGSPGKLRDGRGAAQNI I PASTGAAKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPN
Homard	AVTATQKTVDGSPAKDWRGGRGAAQNI I PSSTGAAKAVGKVI PELDGKLTGMAFRVPTPD
	::*:*:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Paralichthys	VSVVDLTVRLEKPAKYENIKKVVKAAAEQPMKGYLAYTEHQVVSTDFNGDTHSSIFDAGA
Cabillaud	VSVVDLTVRLEKPAKYDDIKKVIKAAAEQPMKGYLAYTEHQVVSTDFNGDIRSSIFDAGA
Truite	VSVVDLTVRLEKPAKYDAIKKVVNAAADGPMKGYLAYTEHQVVSSDFNGDTHSSIFDAGA
Lapin	VSVVDLTVRLEKAAKYDDIKKVVKQASEGPKGILGYTEHQVVSCDFNSATHSSTFDAGA
Porc	VSVVDLTVRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPKGILGYTEHQVVSCDFNSDTHSSTFDAGA
Humain	VSVVDLTVRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPKGILGYTEHQVVSSDFNSDTHSSTFDAGA
Souris	VSVVDLTVRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPKGILGYTEHQVVSCDFNSNSHSTFDAGA
Rat	VSVVDLTVRLEKPAKYDDIKKVVKQAAEGPKGILGYTEHQVVSCDFNSNSHSTFDAGA
Poulet	VSVVDLTVRLEKPAKYDDIKRNVKAAADGPKGILGYTEHQVVSCDFNGDTHSSTFDAGA
Homard	VSVVDLTVRLGKESYDDIKAAAMKTASEGPKQGFQGYTEHQVVSSDFIGDNRSSIFDAKA
	***** * * * * . . * : * * . . : *:*:*:* * * * * . * * * * * * * * *
Paralichthys	GIALNDHFVKLVSWYDNEFGYSNRVCDLMAHMASKE--
Cabillaud	GIALNDHFVKLVTWYDNEFGYSNRVIDLMAHMSCKE--
Truite	GIALNDHFVKLVTWYDNEFGYSNRVIDLMAHMATKE--
Lapin	GIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMVHMASKE--
Porc	GIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMVHMASKE--
Humain	GIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE--
Souris	GIALNDNFVKLISWYDNEYGYSNRVVDLMAYMASKE--
Rat	GIALNDNFVKLISWYDNEYGYSNRVVDLMAYMASKE--
Poulet	GIALNDHFVKLVSWYDNEFGYSNRVVDLMVHMASKE--
Homard	GIQLSKTFVVKVSWYDNEFGYSQRVIDLLKHMVKVDSA

2 EXPRESSION DE LA PROTEINE ALLERGENIQUE P41 RECOMBINANTE

2.1 Clonage de l'ADNc de la P41 dans le plasmide pcDNA3

L'ADNc codant la P41 est cloné dans le vecteur pcDNA3 par insertion aux sites de restriction *Bam* *HI* et *Xba* *I* du polylinker. Ce vecteur contient le promoteur fort du cytomégalovirus humain (CMV) pour l'expression dans la majorité des cellules de mammifères, le promoteur T7 pour la transcription *in vitro*, les gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine, et l'origine de répllication de *E. coli*.

La séquence d'ADNc introduite dans le pcDNA3 est vérifiée par séquençage. Une inversion est décelée au niveau des bases 992 et 993. Le codon 331 TGC (Cys) est ainsi remplacé par un codon TCG (Ser).

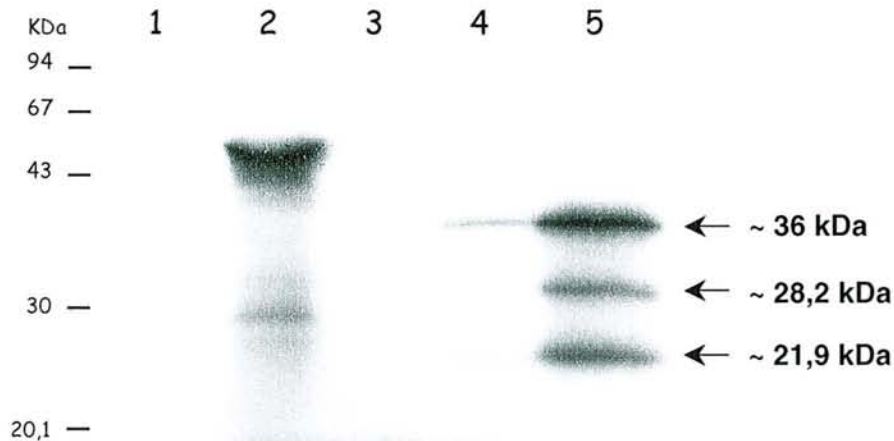
2.2 Expression de la protéine recombinante en lysat de réticulocytes de lapin

Le plasmide pcDNA3-P41 est placé en présence de lysat de réticulocytes de lapin qui contient toute la machinerie nécessaire à la transcription et à la traduction, ainsi que d'un mélange d'acides aminés avec des méthionines-³⁵S. Afin de visualiser la protéine exprimée parmi toutes les protéines du lysat de réticulocytes, une immunoprécipitation est réalisée grâce à l'antisérum anti-P41 de lapin en présence de Sepharose[®]-protéine A. Un témoin de transcription est effectué ainsi que des témoins d'immunoprécipitation. L'autoradiographie du gel SDS-PAGE est présentée en Figure 12. Sur la piste 5, la transcription/traduction du plasmide pcDNA3-P41 génère 3 fragments de P41 de masses moléculaires apparentes 36 kDa, 28,2 kDa et 21,9 kDa et immunoprécipitée par l'antisérum anti-P41. La protéine de 36 kDa correspond à la P41 (ou GAPDH) synthétisée dans sa totalité, alors que les 2 autres bandes protéiques sont certainement issues d'initiations internes, classiques en lysat de réticulocytes. Ces initiations internes ont eu lieu au niveau des ATG 130 et 391 de l'ADNc de P41 générant des protéines tronquées de 290 et 203 acides aminés et dont les masses moléculaires calculées seraient d'environ 31,2 et 21,8 kDa respectivement. Les pistes 2 et 3 montrent que le β -gal est exprimée mais non immunoprécipitée par l'antisérum anti-P41. La piste 4 montre la co-expression β -gal / P41 où seule la P41 est immunoprécipitée par l'antisérum anti-P41.

L'ADNc de la P41, cloné dans le vecteur pcDNA3 est donc bien transcrit puis traduit. La protéine recombinante produite par le lysat de réticulocytes de lapin est bien reconnue par l'antisérum anti-P41.

Figure 12. Autoradiographie de la P41 exprimée en lysat de réticulocytes et immunoprécipitée.

Piste 1 : sans ADN ; piste 2 : produits du plasmide β -gal non précipités par l'antisérum anti-P41 ; piste 3 : précipitat du produit du plasmide β -gal par antisérum anti-P41 ; piste 4 : co-expression des plasmides β -gal et pcDNA3-P41 + immunoprécipitation par l'antisérum anti-P41 ; piste 5 : expression de pcDNA3-P41 et immunoprécipitation par l'antisérum anti-P41



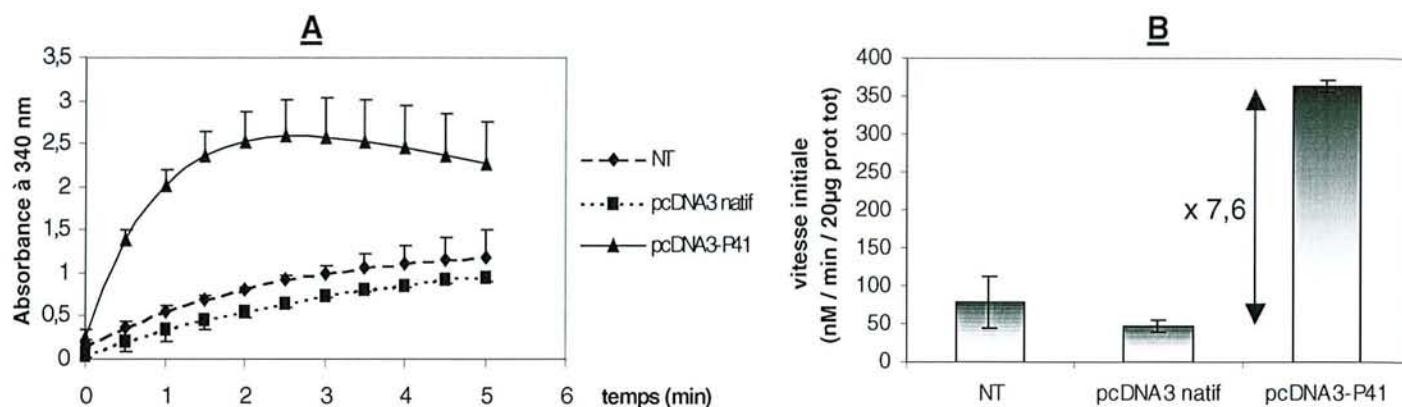
2.3 Expression de la P41 recombinante dans un système eucaryote : les cellules COS-1

La protéine traduite à partir du plasmide pcDNA3-P41 possédant bien la taille attendue, nous avons alors cherché à savoir si la GAPDH recombinante est fonctionnelle. Pour cela, nous avons choisi d'exprimer la P41 dans un système eucaryote : les cellules COS-1, afin de garantir les éventuelles modifications post-traductionnelles nécessaires à la fonctionnalité de la GAPDH de cabillaud. Ces cellules sont des cellules rénales de singe vert.

Les cellules COS-1 sont transfectées de façon transitoire par les plasmides pcDNA3-P41 et pcDNA3 natif. L'activité GAPDH des cellules transfectées ainsi que celle de cellules non transfectées, est mesurée *via* la vitesse initiale de production de NADH (qui absorbe à 340 nm) lors de la réaction enzymatique catalysée par la GAPDH (Figure 18). L'activité GAPDH des cellules transfectées par le plasmide natif est considérée comme celle correspondant au niveau endogène des cellules. Une activité supérieure, suggère la présence de GAPDH recombinante.

La réaction étant équimolaire, la quantité de GAPDH présente est proportionnelle à la quantité de NADH produit.

Figure 13. Activité GAPDH des cellules COS-1 transfectées ou non transfectées.
 L'activité est mesurée par l'apparition du NADH produit par la réaction (340 nm)
 A/ Cinétiques enzymatiques de la GAPDH exprimée dans les COS-1 transfectées ou non (NT n=6/6) par les plasmides pcDNA3 natif (n=3/4) et pcDNA3-P41 (n=3/10)
 B/ Vitesses initiales des cinétiques enzymatiques



La synthèse de protéine P41 (= GAPDH) recombinante à partir du plasmide pcDNA3-P41 est confirmée. La P41 recombinante est de plus fonctionnelle (ou active). La quantité de GAPDH recombinante est 7,6 fois égale à celle de la GAPDH endogène

3 IMMUNOREACTIVITE DE LA PROTEINE P41

3.1 *Choix des patients et des témoins*

Au cours de l'étude, une cinquantaine de sérums de patients allergiques au cabillaud nous ont été envoyés par l'Unité d'Allergie du département de Médecine Interne et Gériatrie de Columbus à Rome (Italie), par le Laboratoire d'Immunoallergie de l'Hôpital d'enfants La Paz à Madrid (Espagne) et par le Laboratoire Pasteur-Cerba à Paris (France). Tous ces patients présentent au moins un des symptômes d'allergie. Pourtant, seuls 28 patients possédant des IgE spécifiques au cabillaud et 9 patients n'en possédant pas sont choisis pour les tests d'immunoréactivité, à cause de volumes de sérums insuffisants pour mener à bien l'étude. Les patients témoins ne sont pas allergiques et ne présentent pas d'IgE spécifiques pour le cabillaud (RAST classe 0). Les patients choisis sont répertoriés dans le Tableau 5.

L'utilisation des sérums est fonction de leur disponibilité au moment de l'étude et de leur classe RAST.

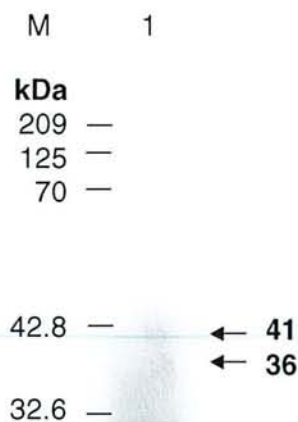
Tableau 5. Patients choisis pour les tests immunologiques

n° Patients	Pays d'origine	RAST cabillaud kUI/L	Classe	n° Patients	Pays d'origine	RAST cabillaud kUI/L	Classe
1	Italie	>100	6	20	Italie	4,1	3
2	Espagne	61,0	5	21	Italie	83,0	5
3	Espagne	54,8	5	22	Italie	0,64	1
4	Espagne	53,0	5	23	Italie	1,85	2
5	Espagne	48,7	4	24	France	15,2	3
6	France	43,5	4	25	France	0,78	2
7	Espagne	40,8	4	26	France	2,7	2
8	Espagne	31,0	4	27	Espagne	19,7	4
9	Espagne	23,6	4	28	France	0,72	2
10	Espagne	23,4	4	A	Italie	<0,35	0
11	Espagne	22,4	4	B	Italie	<0,35	0
12	Espagne	19,5	4	C	Italie	<0,35	0
13	France	16,9	3	D	Italie	<0,35	0
14	France	23,3	4	E	Italie	<0,35	0
15	Italie	26,4	4	F	Italie	<0,35	0
16	Italie	65,4	5	G	Italie	<0,35	0
17	Italie	4,0	3	H	Italie	<0,35	0
18	Italie	1,0	2	I	Italie	<0,35	0
19	Italie	2,0	2	Témoins	France	<0,35	0

3.2 Immunogénicité de la GAPDH native

La bande correspondant à la P41 native extraite du muscle de cabillaud a été déjà détectée grâce à des sérums de patients par Galland *et al.* Pourtant, il apparaît parfois deux bandes de 36 et 41 kDa, après immuno-empreinte d'extrait de cabillaud purifié en présence des sérums de patients allergiques au cabillaud (Figure 14).

Figure 14. Immunodétection de l'extrait de cabillaud par des IgE
Piste M : marqueurs de poids moléculaires, piste 1 : immunodétection avec le patient n°1



Ces deux bandes protéiques correspondent probablement à la même protéine glycosylée (41 kDa) et non-glycosylée (36 kDa). Il existe en effet deux sites putatifs de N-glycosylation dans la P41 en positions 147-150 (NASC) et 237-240 (NVSV). Pourtant les premières études effectuées à l'aide de lectines reconnaissant sélectivement les sucres N-terminaux, concluaient à la non-glycosylation de la P41 (Galland-Irmouli 1999).

3.3 Immunogénicité de la GAPDH recombinante

Classiquement dans la littérature, l'allergénicité d'une protéine est contrôlée par l'allergénicité de sa protéine recombinante. C'est pourquoi, nous avons effectué des transfections dans les cellules eucaryotes COS-1 de singe vert, afin d'exprimer la P41 de façon recombinante.

La P41 (ou GAPDH), étant une protéine ubiquitaire, nous serons « gênés » par la GAPDH endogène des cellules elles-mêmes. La Figure 15 montre le profil protéique des lysats cellulaires des cellules COS-1 transfectées ou non transfectées.

La GAPDH a ensuite été immunodétectée par les IgE spécifiques d'un patient allergique au cabillaud (patient n°21) ainsi que par l'antisérum anti-P41 produit chez le lapin (Figure 16)

Figure 15. SDS-PAGE des lysats cellulaires COS-1 coloré au nitrate d'argent.

Migration de 1µg de protéines totales des lysats de COS-1. Piste M : marqueurs de poids moléculaires, piste 1 : cellules non transfectées, piste 2 : cellules transfectées par le pcDNA3 natif, piste 3 : cellules transfectées par pcDNA3-P41, piste 4 : GAPDH humaine (Sigma), piste 5 : GAPDH de poulet (Sigma).

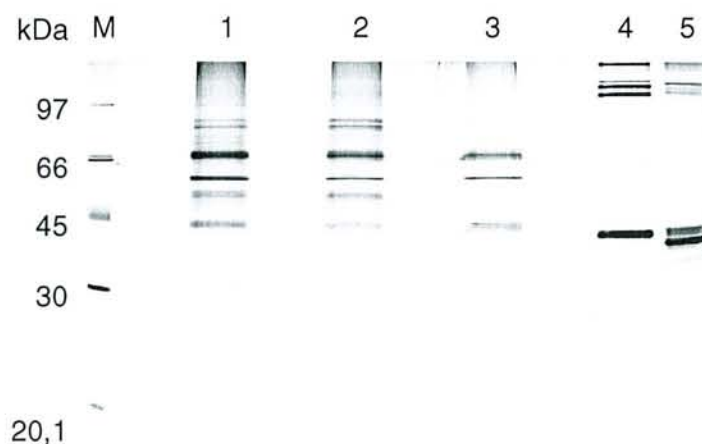
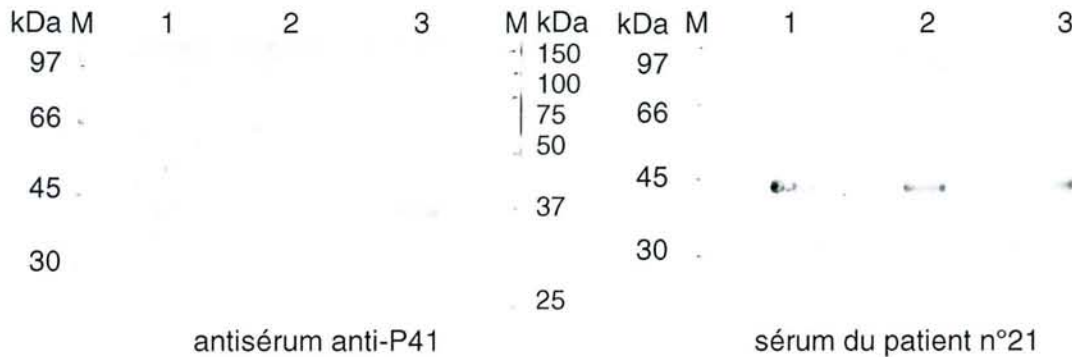


Figure 16. Immunodétections de la GAPDH recombinante par les IgE spécifiques d'un patient allergique au cabillaud (révélation par ECL+) et par l'antisérum de lapin anti-P41 (révélation par Phosphatase Alcaline).
Pistes 1 : lysat cellulaire COS-1 non transfecté, pistes 2 : lysat cellulaire COS-1 transfecté par le pcDNA3 natif, pistes 3 : lysat cellulaire COS-1 transfecté par pcDNA3-P41



Les mesures d'activité GAPDH des différentes cellules montrent que la quantité totale de GAPDH (endogène + recombinante) présente dans les cellules transfectées par le plasmide pcDNA3-P41 est supérieure à celle des cellules non transfectées ou transfectées par le plasmide natif. L'immunodétection de la protéine P41 avec les anticorps antisérum anti-P41 est cohérente puisque sa quantité semble suffisante pour être détectée chez les cellules COS-1 transfectées par le plasmide recombinant pcDNA3-P41 alors qu'elle ne l'est pas chez les cellules qui n'expriment que la GAPDH endogène.

Les IgE du patient n°21 reconnaissent la GAPDH dans les trois types cellulaires sans différence d'intensité ce qui ne nous permet pas de conclure à l'immunodétection de la GAPDH recombinante par les IgE. Bien que la technique de chimiluminescence soit une bonne méthode de quantification, le choix de la dilution des anticorps est très importante. Le signal pourrait se trouver saturé en cas d'excès d'anticorps couplé à la peroxydase. C'est peut-être le cas dans notre expérience.

La seconde hypothèse est que l'antisérum anti-P41 produit chez le lapin est plus spécifique que les IgE des patients envers la GAPDH. L'antisérum anti-P41 ne reconnaîtrait alors que la P41 de poisson, à savoir la GAPDH de poisson recombinante produite dans les cellules de singe vert, mais pas la GAPDH endogène. Il a pourtant déjà été montré en immunodétection que l'antisérum anti-P41 reconnaît la GAPDH de poulet (données non présentées). La GAPDH de cabillaud présente d'autre part autant d'homologies avec les GAPDH humaine et de poulet. La GAPDH de singe vert n'est pas connue mais nous pouvons supposer qu'elle est très proche de celle de l'humain, c'est pourquoi il semble difficile de croire que l'antisérum anti-P41 ne reconnaisse que les GAPDH de poisson et poulet et pas celles d'humain ou de singe vert. Notons néanmoins que la quantité de GAPDH de poulet déposée et détectée par l'antisérum anti-P41 (utilisée comme témoin positif) est bien supérieure à la

quantité de GAPDH présente dans le dépôt des lysats des cellules COS-1 transfectées. La quantité de GAPDH des cellules COS-1 n'est peut-être pas suffisante pour être détectée en immunodétection par l'antisérum anti-P41.

3.4 La P41 : allergène majeur ou mineur ?

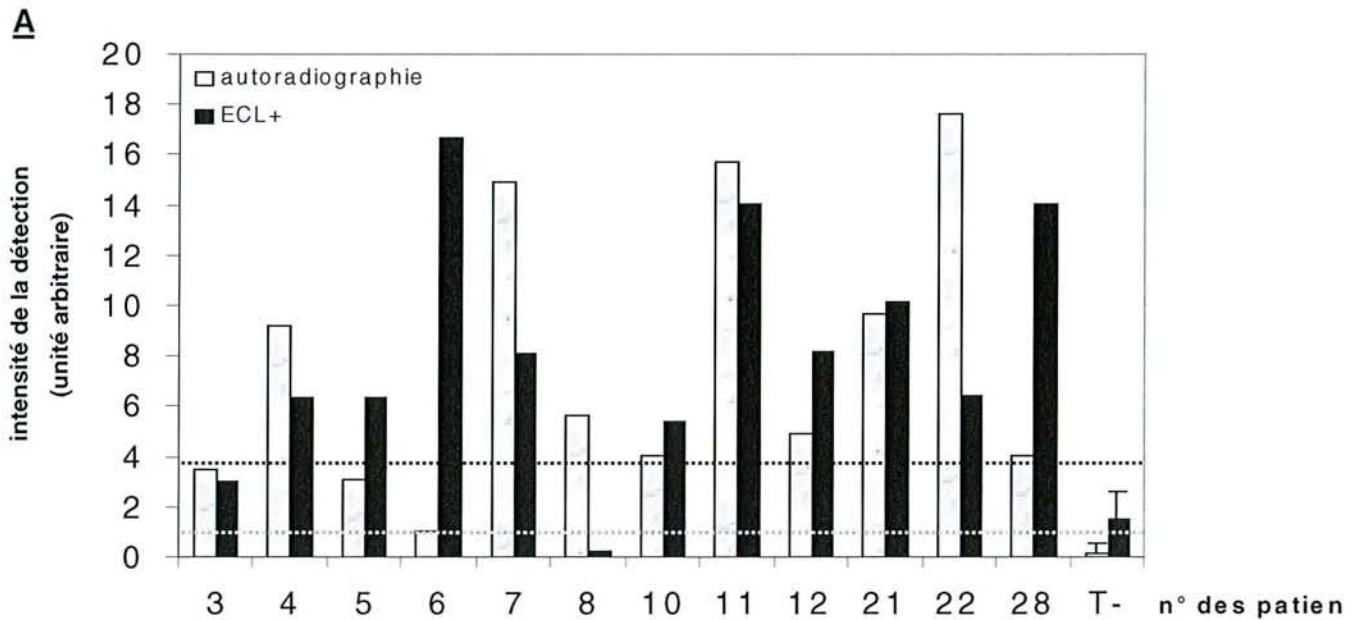
Immunodétection de la P41 par les IgE des patients allergiques

Deux microgrammes de protéine P41 purifiée sont déposés sur une membrane de nitrocellulose à l'aide de l'appareil Bio-Dot. La protéine fixée à la membrane est alors mise en présence des différents sérums des patients puis d'un anticorps anti-IgE humain, afin de révéler par chimiluminescence ou autoradiographie, la fixation des IgE du sérum sur la protéine fixée.

Vingt cinq patients allergiques au cabillaud (n°1 à 28 sauf 14, 24 et 27) et 8 témoins sont ainsi testés par les deux méthodes de révélation (Figure 17A). La comparaison des deux modes de révélation n'a montré que de faibles discordances (2/25) indiquées en Figure 17B. La technique chimiluminescente qui s'avère donc assez fiable, sera choisie pour sa rapidité de révélation. En effet, une exposition de quelques minutes suffisent contre plusieurs semaines pour l'autoradiographie.

Au moins douze patients parmi les 25 testés possèdent des IgE spécifiques de la P41 (Figure 17). Ainsi, selon la définition de Moneret-Vautrin (Moneret-Vautrin et Kanny 1996), la protéine P41 serait un allergène majeur. Aalberse (Aalberse 2000) quant à lui fait intervenir l'intensité de réactivité à l'allergène étudié par rapport à celle de l'extrait total, ce que nous n'avons pas étudié ici.

Figure 17. Immunodétection de la P41 par les sérums des patients réalisé en Slot-Blot.
 A/ La révélation est effectuée à la fois par autoradiographie (anti-IgE ¹²⁵I) et par chimiluminescence ECL+ (anti-IgE peroxidase). Les seuils de positivité sont indiqués par des pointillés : révélation par autoradiographie (.....) et ECL+ (.....)
 B/ Comparaison des deux méthodes de révélations



B

Patients	3	4	5	6	7	8	10	11	12	21	22	28	Patients
Autoradio	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	Autoradio
ECL+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	ECL+

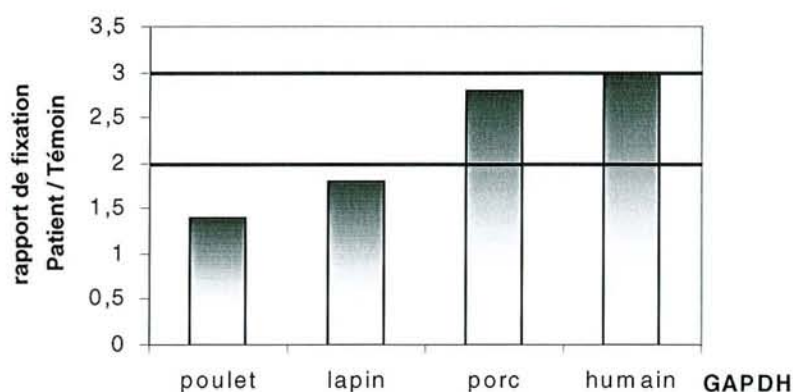
3.5 Réactions croisées entre les différentes GAPDH d'autres espèces

La P41 étant une GAPDH, protéine ubiquitaire et très conservée, des tests sur les GAPDH d'autres espèces ont d'abord été réalisés.

3.5.1 Tests de fixation des IgE sur des GAPDH fixées sur epoxy-Sepharose

De la GAPDH de poulet, lapin, porc et homme est fixée sur de l'époxy-Sepharose. Les sérums des patients allergiques sont mis en présence des différentes GAPDH ainsi fixées. La fixation des IgE spécifiques sur la protéine est révélée par un anticorps anti-IgE marqué à l'iode ¹²⁵I.

Le sérum du patient n°14 (RAST classe 4) allergique au cabillaud a permis de tester les différentes GAPDH. Celui-ci semble posséder des IgE spécifiques pour la GAPDH porcine et humaine ou qui croisent, puisque son pourcentage de fixation à la protéine est au moins 2 fois supérieur à celui du témoin (Figure 18).

Figure 18. Test de fixation des IgE spécifiques sur les différentes GAPDH (patient n°14)

Treize autres sérums de patients « positifs » en RAST (classe 3 à 6), ainsi que 9 patients « négatifs » en RAST (classe 0) n'ont été testés que pour leur fixation à la GAPDH humaine. Notons que parmi les 14 patients « positifs » testés ici, seuls 4 reconnaissent la GAPDH humaine (Tableau 6). Les deux patients possédant le plus d'IgE spécifiques sont des patients de classe 5 pour le cabillaud. Pourtant, deux autres patients de classe 5 pour le cabillaud, sont négatifs pour la GAPDH humaine, ce qui suggère qu'il n'y a pas de réactivité croisée entre la GAPDH et les autres protéines contenues dans le test RAST (l'allergène majeur du cabillaud en majorité). D'autre part, un des sérums de patients « négatifs » en RAST semble détecter la GAPDH humaine alors qu'il ne répond pas en RAST. La quantité de GAPDH dans l'extrait de cabillaud contenu dans le kit RAST est peut-être insuffisante ou nulle pour être détectée. Cela remet en cause la négativité des RAST cabillaud pour les allergènes dont la concentration dans les tissus de cabillaud et donc dans le kit RAST sont faibles.

Tableau 6. Dosages des IgE spécifiques pour la GAPDH humaine dans nos sérums de patients

n° Patient	CAP-RAST cabillaud		IgE-RIA (GAPDH humaine)		
	kUI/L	Classe	% fixation	P/T	Interprétation
1	>100	6	22,9	7,6	+
2	61	5	2,9	1	-
3	54.8	5	20,8	6,9	+
4	53	5	4,5	1,5	-
5	48.7	4	2,8	0,9	-
6	43.5	4	7,2	2,4	+/-
7	40.8	4	2,6	0,9	-
8	31	4	1,8	0,6	-
9	23.6	4	2,3	0,8	-
10	23.4	4	6,1	2	+/-
11	22.4	4	2,5	0,8	-
12	19.5	4	3,4	1,1	-
13	16.9	3	15,1	5	+
14	23.3	4	2,4	3	+
A	<0,35	0	3,8	1,6	-
B	<0,35	0	3,0	1,2	-
C	<0,35	0	3,3	1,4	-
D	<0,35	0	4,0	1,7	-
E	<0,35	0	6,1	2,5	+/-
F	<0,35	0	4,6	1,9	-
G	<0,35	0	6,3	2,6	+/-
H	<0,35	0	9,4	3,9	+
I	<0,35	0	3,5	1,5	-
Témoins	< 2	0	~0,4 à 3,1*		

* variable selon expériences

3.5.2 Tests d'inhibition sur epoxy-Sepharose

Afin de vérifier la spécificité des IgE fixées sur la protéine du gel epoxy-Sepharose, nous avons effectué des tests d'inhibition (rapport $2 < P/T < 3$). Pour cela, nous avons utilisé le gel fixé à de la GAPDH humaine. Les sérums sont préincubés avec des extraits de GAPDH des différentes espèces plus ou moins dilués, avant d'être testés pour leur fixation sur la protéine du gel.

Les résultats confirment que les IgE des sérums des patients (1,3, 13) reconnaissent spécifiquement la GAPDH humaine, puisqu'une inhibition est observée (Figure 19A). D'autre part, une réaction croisée entre la GAPDH de cabillaud et la GAPDH humaine est observée puisque les IgE du patient n°1 (RAST classe 6) allergique au cabillaud, reconnaissent à la fois la GAPDH de cabillaud et la GAPDH humaine (Figure 19A et B). Par contre, les réactions croisées sont faibles avec la GAPDH de lapin, voire nulles, avec celles de poulet et de porc

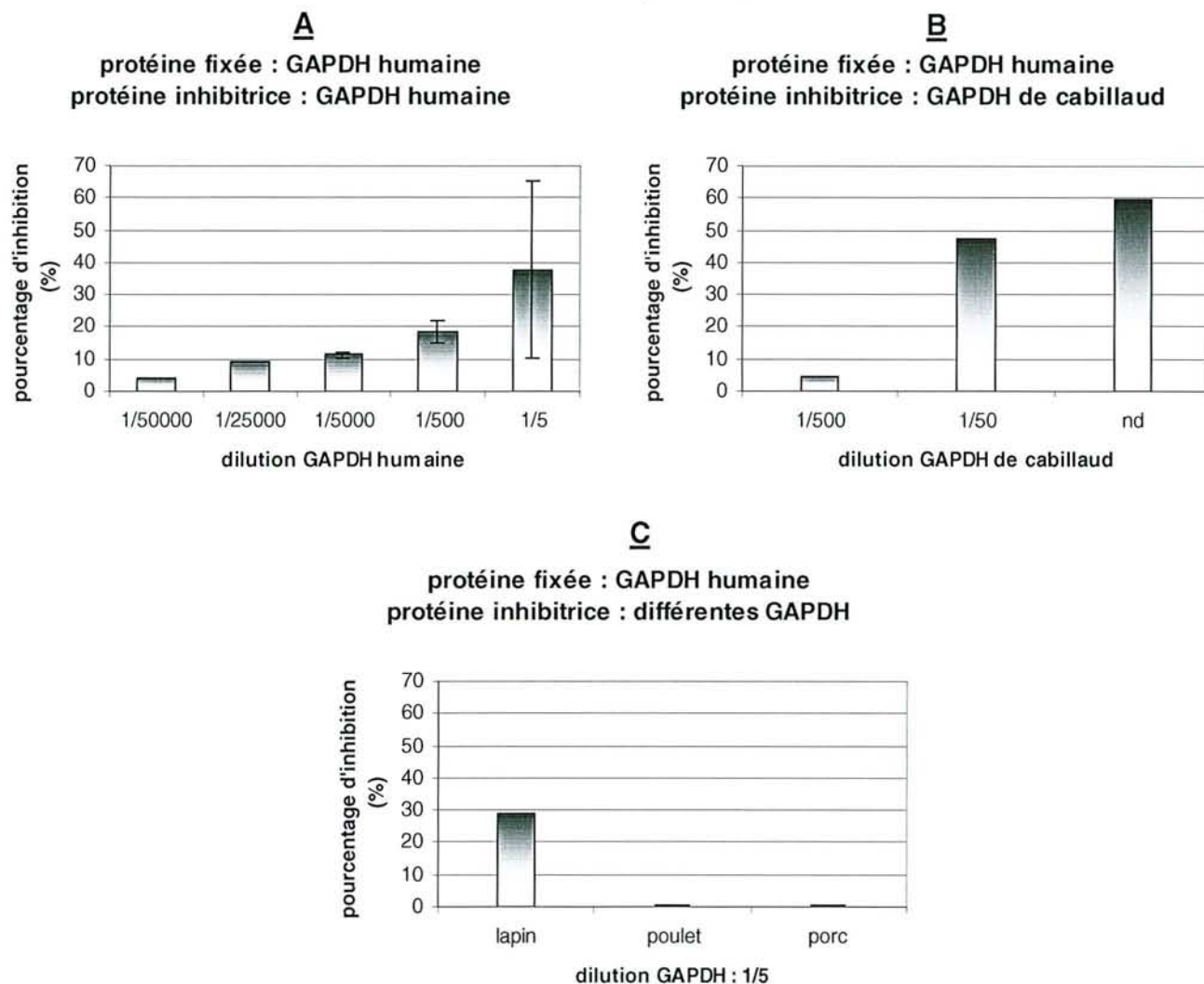
(Figure 19C). Les patients 1, 3, 13, et 14 présentent tous des réactions croisées entre les GAPDH de cabillaud et d'humain. Ils possèdent certainement des anticorps anti-P41 communs.

Figure 19. Inhibition de la fixation des IgE spécifiques par différentes GAPDH

A : patients n°1, 3 et 13

B et C : patient n°1

B : la GAPDH de cabillaud utilisée est semi-purifiée ; nd : non dilué



Discussion et Perspectives

L'allergie au poisson est très répandue pourtant la connaissance des allergènes n'a que peu évolué depuis l'identification en 1966 de l'allergène majeur Gad cl du cabillaud de la mer Baltique. Il nous a semblé important de continuer ce travail de caractérisation afin de mieux comprendre quelles protéines sont allergéniques, et éventuellement proposer des outils pour pallier aux allergies.

Deux protéines ont été étudiées. L'une d'entre elles, nommée Gad ml (cl. 2) est une isoforme de parvalbumine comme l'allergène majeur du cabillaud de la mer Baltique. La seconde protéine que nous avons identifiée est nommée Gad mll. Il s'agit de la première Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase à avoir été décelée comme étant un allergène.

1 Discussion

1.1 La protéine P24

1.1.1 Caractérisation de la P24

1.1.1.1 La P24, le premier allergène identifié chez *Gadus morhua*

Les premières recherches menées en 1966 sur les allergènes de cabillaud avaient été effectuées sur *Gadus callarias*, le cabillaud de la mer Baltique, par des Norvégiens pour des raisons évidentes de disponibilité du matériel d'étude. Néanmoins, le cabillaud consommé en France étant le cabillaud de l'océan Atlantique, nous avons utilisé celui-ci pour notre étude.

Gad ml est le premier allergène identifié chez *Gadus morhua*, le cabillaud de l'océan Atlantique. Nous l'avons, sans le savoir, isolé sous la forme d'un dimère (la protéine P24), mais l'identification moléculaire a révélé qu'il s'agissait d'une parvalbumine β comme l'allergène majeur identifié par l'équipe norvégienne de Aas.

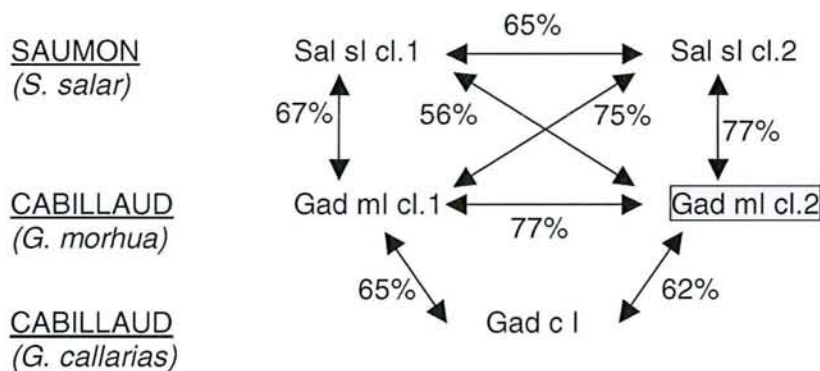
1.1.1.2 Gad ml (*Gadus morhua*) isoforme de Gad cl (*Gadus callarias*)

Le monomère appelé Gad ml est le premier allergène identifié chez *Gadus morhua*. Il présente 62% d'identité avec Gad cl, l'allergène majeur de *Gadus callarias*. Cette relative différence entre les parvalbumines de ces deux cabillauds (de la mer Baltique et de l'océan Atlantique) suggère que Gad ml (*Gadus morhua*) est une nouvelle parvalbumine, isoforme de Gad cl (*Gadus callarias*). L'existence de deux isoformes d'allergène majeur a déjà été décrit chez le saumon (Lindstrom, *et al.* 1996) où le pourcentage d'identité entre les deux isoformes de Sal sl s'élève à 65%. Gad ml a d'ailleurs plus d'identité avec Sal sl cl.2 qu'avec Sal sl cl.1 comme l'indique la comparaison entre les allergènes majeurs de saumon et de cabillaud en Figure 20. Nous l'appellerons désormais Gad ml cl.2 par analogie avec les allergènes de saumon.

D'autre part, l'équipe d'Elsayed a séquencé 14 mois après nous (juin 2001) exactement la même séquence que celle de Gad ml cl.2, ainsi qu'une seconde isoforme que nous nommerons Gad ml cl.1. En juillet 2002, Elsayed révisé la séquence de Gad ml cl.2 : une isoleucine est ajoutée en position +6 de la protéine.

Ainsi, il a été observé chez le cabillaud *Gadus morhua* et le saumon deux isoformes de parvalbumines allergéniques. C'est aussi le cas chez la carpe . Il semble donc probable que chez le cabillaud *Gadus callarias*, une deuxième isoforme existe. Il suffirait pour l'identifier d'en obtenir l'ADNc en choisissant des amorces oligonucléotidiques dans les zones les plus conservées entre parvalbumines et d'effectuer des PCR comme nous l'avons fait pour Gad ml cl.2.

Figure 20. Pourcentages d'identité entre les différentes isoformes de parvalbumines du saumon *S. salar* et des cabillauds *G. callarias* et *G. morhua*.



1.1.2 Dimérisation

Les résultats du séquençage effectué sur l'ADNc de la P24 comparés à ceux provenant des gels de protéines, suggèrent qu'il s'agit d'un dimère de parvalbumine β . D'autres expériences vont d'ailleurs dans ce sens. Par exemple, plusieurs protéines de *Gadus morhua* séparées par SDS-PAGE en conditions réductrices ont été détectées par un anticorps anti-parvalbumine. Ces protéines de masses moléculaires apparentes différentes (12, 24, 38 kDa) suggèrent que l'allergène majeur (11,4 kDa) du cabillaud s'oligomérisé. Les conditions réductrices appliquées en SDS-PAGE ne dissocient donc pas complètement les oligomères.

La protéine étudiée a une masse moléculaire de 11,4 kDa et une tendance à se dimériser. La formation d'un pont disulfure est possible au niveau de la cystéine en position 18, mais il est probable que d'autres interactions, notamment hydrophobes, interviennent dans la dimérisation. Le logiciel ProtScale sur ExPASy prédit en effet plusieurs segments hydrophobes pour Gad ml selon un profil d'hydrophobicité de Kyte & Doolittle (en utilisant une fenêtre 9). Ces segments hydrophobes sont susceptibles d'oligomériser deux protéines Gad ml (Kyte J, *et al.* 1982).

Alors qu'aucune étude n'aborde les éventuelles oligomérisations des parvalbumines de poisson, des oligomères de parvalbumine de thymus de poulet ont été observés en absence d'agent réducteur. Le dimère se forme *via* un pont disulfure en Cys 72 et en présence d'ions divalents, mais des cas d'association non covalente ont aussi été observés (Hapak RC, *et al.* 1994 ; Henzl MT, *et al.* 1995). D'autres protéines fixatrices de calcium proches des parvalbumines semblent se dimériser. En effet, la dimérisation de l'oncomoduline a déjà été décrite ; malgré les conditions réductrices appliquées en SDS-PAGE, un pont disulfure en Cys18 est créé en présence de calcium (Mutus B, *et al.* 1988).

L'oligomérisation de deux protéines Gad mI pourrait de plus augmenter le risque de pontage d'IgE spécifiques par présentation de deux épitopes identiques (un épitope par protéine) rendus proches par la dimérisation et rendre ainsi l'allergénicité du dimère plus importante que celle du monomère.

D'autre part, la question du rôle de chacune des isoformes reste posée. Aucune étude ne montre la différence de fonctions des deux isoformes de parvalbumines rencontrées chez plusieurs espèces. Nous pouvons cependant imaginer que les deux protéines ont bien le même rôle mais qu'elles interviennent à différents moments de la vie du poisson, ou pour des types de contractions musculaires différentes. Il reste à savoir aussi si les parvalbumines jouent un rôle particulier sous forme de dimère et si les dimères sont des dimères d'isoformes différentes ou identiques. La dimérisation pourrait par exemple jouer un rôle dans la contraction du muscle par fixation d'une plus grande quantité de calcium sur le complexe, pour un besoin musculaire intense par exemple.

1.2 La protéine P41

1.2.1 La P41, deuxième allergène identifié chez *Gadus morhua*

Nous avons identifié une seconde protéine allergénique chez *Gadus morhua*. La P41 est une glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase que nous avons nommée selon la nomenclature, Gad mII. Or aucune GAPDH n'avait encore été identifiée comme étant un allergène.

La protéine P41 (Gad mII) purifiée par notre équipe en 1998, fixait à la fois les IgE des patients sensibilisés au cabillaud, et un anticorps monoclonal anti-parvalbumine reconnaissant spécifiquement le premier site de fixation du calcium des parvalbumines (DEDKEGFIEEDE) (Galland, *et al.* 1998). Pourtant, en cherchant à aligner Gad mII à cette séquence, il s'avère que Gad mII ne contient ni la séquence reconnue par l'anti-parvalbumine ni de séquence proche. La fixation détectée semble donc être due à une aspécificité de l'anticorps anti-parvalbumine.

L'aspécificité de cet anticorps pourrait éventuellement s'expliquer si les deux protéines présentaient des similitudes de structures tridimensionnelles.

1.2.2 Qu'est-ce qu'une GAPDH

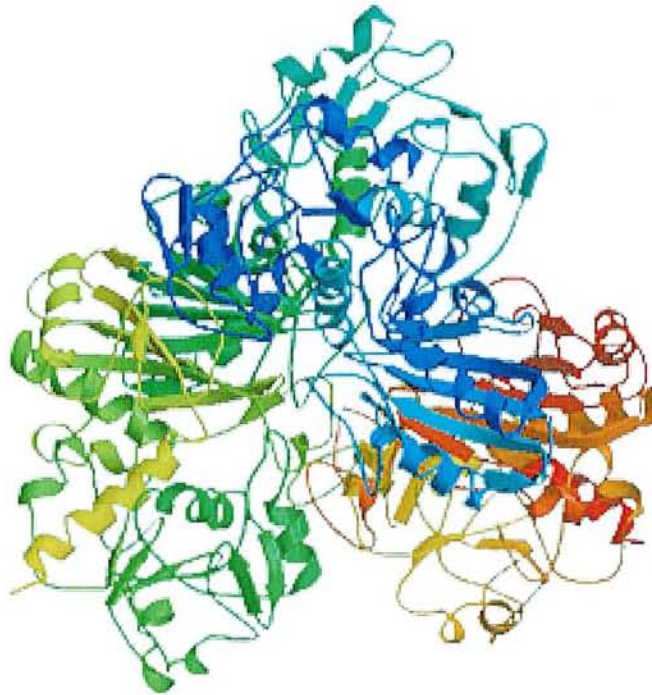
La GAPDH est une protéine cytoplasmique (Michels, *et al.* 1986). C'est une enzyme clef de la glycolyse et de la néoglucogenèse qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction couplée à une réaction de phosphorylation permettant de stocker l'énergie issue de l'oxydation du glucose *via* du 1,3-diphosphoglycérate.

Cette enzyme d'environ 330 acides aminés est codée par le gène *gap*. Certains mammifères possèdent plusieurs copies mais qui sont le plus souvent des pseudogènes (Benham FJ, *et al.* 1984 ; Garcia-Meunier P, *et al.* 1993) sans expression fonctionnelle de l'enzyme (Fothergill-Gilmore LA, *et al.* 1993).

Sa structure primaire et sa structure tridimensionnelle sont déjà connues (Buehner M, *et al.* 1974b). D'autre part, il s'agit d'une protéine très conservée au cours de l'évolution, elle semble même être un outil phylogénétique intéressant puisque les GAPDH des procaryotes et des eucaryotes confondus, possèdent au minimum 40% d'identité. Son domaine C-terminal en particulier qui est impliqué dans la glycolyse, est le domaine le plus hautement conservé de tous les domaines des enzymes glycolytiques (Fothergill-Gilmore et Michels 1993).

Les GAPDH forment des tétramères où chacune des sous-unités fixe un NAD⁺ comme cofacteur. En 1974, la première structure cristallographique de la GAPDH de homard est obtenue (Buehner M, *et al.* 1974a). Murphy *et al.* montrent les formes holo et apo de l'enzyme (Murthy MR, *et al.* 1980). Depuis, la structure tridimensionnelle de plusieurs GAPDH sont connues. Celle du homard est présentée en Figure 21.

Figure 21. Structure tridimensionnelle de la GAPDH de homard sous forme tétramérique, obtenue par diffraction aux rayons X.



1.2.3 Les GAPDH : une nouvelle superfamille d'allergènes ?

De nombreux allergènes sont aujourd'hui rattachés à une famille moléculaire précise. Des réactions croisées sont possibles entre deux allergènes issus d'aliments pourtant différents mais appartenant à une même famille moléculaire. Les multiallergies de certains patients sont souvent expliquées de cette façon. Citons par exemple, la famille des profilines (pneumallergènes) qui est composée de l'armoise, le céleri, et les épices. La famille des chitinases engendre le syndrome latex-fruits. La famille des protéines liant le calcium regroupe-t-elle aussi des allergènes d'origines diverses comme le bouleau, le cabillaud, la carpe, etc.

Les GAPDH sont des protéines très conservées au cours de l'évolution (Figure 11). Gad mII est d'autre part reconnue comme un allergène chez près de la moitié des patients sensibilisés au cabillaud. Les GAPDH pourraient constituer une nouvelle famille de superallergènes.

1.2.4 Réactions croisées

1.2.4.1 Problème des réactions croisées entre aliments

Nous avons vu que des patients sensibilisés au cabillaud le sont aussi à d'autres poissons. Cela a été démontré en particulier pour l'allergène majeur, parvalbumine très conservée entre les différentes espèces de poissons.

Or le nouvel allergène Gad mII est une GAPDH, une autre protéine très conservée au cours de l'évolution : il semble donc probable qu'un patient sensibilisé à la GAPDH de cabillaud puisse se sensibiliser aux GAPDH d'autres poissons. Par ailleurs, la GAPDH est très conservée chez les poissons mais aussi chez d'autres animaux. C'est pourquoi, il est concevable de voir des patients sensibilisés à Gad mII se sensibiliser à d'autres animaux consommés tels que le poulet ou le lapin par exemple. Le risque de multiallergies n'est donc pas négligeable pour de tels allergènes si conservés. En effet, le risque de réactions croisées est déjà présent au sein d'une même superfamille d'allergène, il est encore plus grand entre protéines homologues.

Pourtant dans le cas des patients étudiés, rien n'indique qu'ils sont sensibilisés à ces aliments. Il est cependant difficile de croire que les protéines homologues de poulet et de cabillaud par exemple (qui présentent 86% d'identité) et qui croisent en tests *in vitro* avec les IgE des patients (données non présentées) ne croisent pas *in vivo*. Si des patients allergiques au cabillaud détectent la GAPDH de cabillaud mais ne sont pas allergiques aux autres espèces consommées, c'est peut-être parce que leurs anticorps ne reconnaissent que les zones des GAPDH qui diffèrent d'une espèce à l'autre. Cette hypothèse semble pourtant assez peu probable. Peut-être y a-t-il chez le poisson un composé rendant la GAPDH allergénique, qui n'est pas présent chez les autres animaux consommés. Ce co-allergène pourrait par exemple être une autre protéine s'agrégant avec la GAPDH et formant un complexe allergénique par pontage des IgE qu'il formerait au niveau des mastocytes. Il pourrait aussi s'agir d'un composé présent chez le poisson uniquement et qui en se fixant à la GAPDH en modifierait sa conformation la rendant plus allergénique que chez les autres animaux.

Il faut noter que dans le cas de l'allergène majeur Gad cI, protéine elle aussi très conservée et présente dans les muscles des différentes espèces consommées, ce problème n'a pas été soulevé, alors que les patients sont aussi spécifiquement allergiques au cabillaud et pas aux autres espèces.

1.2.4.2 Problème d'autoimmunité

La sensibilisation à sa propre GAPDH par réaction croisée est un risque encore plus grave. Ceci reste assez improbable car la GAPDH est séquestrée dans la cellule et n'est donc normalement pas présentée aux cellules immunitaires. Néanmoins le problème serait à vérifier dans le cas des manifestations inflammatoires chroniques telles que la dermatite atopique par exemple. Il a en effet été suggéré que chez les patients atteints de dermatite atopique, des autoantigènes pouvaient être libérés après un dommage tissulaire (Natter S, *et al.* 1998).

Dans la plupart des maladies auto-immunes connues, des auto-anticorps sont détectés. Ils sont dirigés contre des récepteurs (RF ϵ RI) dans le cas de l'urticaire chronique (Tong LJ, *et al.* 1997), ou des protéines (insuline, anti-décarboxylase de l'acide glutamique, tyrosine phosphatase IA2) dans le diabète insulino-dépendant (Zimmet PZ, *et al.* 1994). Pourtant,

certaines maladies telles que la sclérose en plaques, ou le psoriasis, qui relèvent certainement d'un mécanisme auto-immun, ne s'accompagnent pas d'auto-anticorps.

Dans le cas des allergies, la recherche d'auto-anticorps (contre le possible auto-antigène GAPDH) au niveau des lésions des patients ayant une maladie chronique, pourrait se révéler intéressante. Du fait que la plupart des allergènes appartiennent à des familles protéiques très conservées, les réactions croisées possibles avec la protéine du soi pourraient engendrer une maladie auto-immune.

1.2.5 Allergène majeur ?

Près de 50% de nos patients allergiques au cabillaud immunodétectent la GAPDH. L'allergène Gad mII est un allergène bien représenté voire un allergène majeur compte tenu de la définition de Moneret-Vautrin *et al.* L'allergène Gad mII doit donc être pris en compte dans l'allergie au cabillaud.

1.2.6 Marqueur allergénique des conditions de stockage

Il a été démontré par notre équipe que la quantité relative de P41 (Gad mII) dans les tissus de cabillaud augmente avec le temps de conservation (Galland-Irmouli 1999). La lyse tissulaire augmenterait donc la quantité de Gad mII dans le muscle du poisson sans que l'on puisse pour l'instant, expliquer pourquoi. Gad mII semble donc ne pas être dégradée par des enzymes pendant la dégradation du poisson.

Les patients sensibilisés à cette protéine risquent donc de faire plus de réactions allergiques en consommant du cabillaud longtemps conservé ou mal conservé. Malgré la faible dose nécessaire au déclenchement d'une réaction allergique, il est probable qu'un patient tolérant la consommation du cabillaud puisse se sensibiliser si la dose de l'allergène est plus forte.

Les conditions de stockage de l'aliment pourraient alors déclencher des hypersensibilités chez de nouvelles personnes. Cela rend d'autant plus difficile les comparaisons entre les études car les conditions de stockage sont certainement différentes d'une étude à l'autre.

Il est établi que des traitements physico-chimiques employés par les industriels de l'alimentation modifient les conformations protéiques. Ces changements peuvent détruire ou générer des épitopes allergéniques. Les conditions et le temps de stockage du cabillaud (et certainement d'autres poissons) sont désormais un nouveau point à prendre en compte pour éviter les allergies alimentaires par les distributeurs mais aussi par les consommateurs.

2 Perspectives

Ce travail amène de nombreuses perspectives tant sur le plan fondamental qu'appliqué. Les connaissances fondamentales déjà acquises et futures pourront en effet être utilisées à des fins industrielles, de contrôle, de diagnostic ou de thérapie à plus ou moins long terme.

2.1 Identification des motifs immunogènes

Chez le patient allergique, des anticorps et en particulier les IgE reconnaissent les épitopes de certaines protéines. Il existe de plus des réactions croisées entre les aliments en raison de la présence de protéines homologues dans différents aliments. La détection des motifs immunogènes pourrait s'avérer intéressante pour diagnostiquer une allergie par la protéine ou la famille de protéine responsable plutôt que par l'aliment entier.

La digestion des allergènes est donc envisagée à court terme pour évaluer l'immunoréactivité de chacun des peptides obtenus, afin de définir la plus petite région suffisante à déclencher une réaction allergique chez des patients sensibilisés. Cela a d'ailleurs été fait pour l'allergène Gad cl de *Gadus callarias* (Elsayed et Apold 1977 ; Elsayed, *et al.* 1976). Ce travail permettra peut-être de définir des motifs immunogènes communs à différentes protéines.

2.2 Evaluation de l'immunoréactivité croisée des différentes espèces de poissons

Plusieurs études ont déjà permis de comparer les protéines allergéniques de différents poissons. La réactivité croisée entre les différentes parvalbumines de poissons semble claire. Dans tous les poissons étudiés, la parvalbumine est un allergène majeur. De plus un patient sensibilisé au cabillaud a de très fortes chances de l'être aussi à d'autres poissons.

Ce travail reste à faire pour tous les autres allergènes de poissons et à plus forte raison s'il s'agit d'allergènes majeurs. Ceci permettra de pouvoir conseiller à un patient la consommation d'un type de poisson plutôt qu'un autre si les réactions croisées ne se font pas entre tous les poissons. Cette étude pourrait aussi être effectuée sur les dérivés de poissons issus de transformations industrielles puisqu'il a déjà été montré que le surimi contenait moins d'allergènes que le poisson non modifié (Mata, *et al.* 1994).

2.3 Qualité alimentaire

2.3.1 Fabrication de sondes de détection

2.3.1.1 Sonde de détection d'allergènes

Les transformations faites sur le poisson par les groupes agroalimentaires diminuent la plupart du temps l'allergénicité du produit. Le contrôle grâce à des anticorps de détection

d'allergènes leur permettrait de pouvoir garantir un produit sans allergène majeur de poisson. Un étiquetage adéquat pourrait alors être établi pour ce type d'aliments.

La connaissance des motifs immunogènes des allergènes visés simplifiera d'ailleurs la fabrication de telles sondes.

2.3.1.2 Sonde de détection de l'état de fraîcheur du poisson

Puisque la quantité relative de Gad mII augmente dans les tissus de cabillaud, un anticorps anti-Gad mII permettrait d'évaluer l'état de fraîcheur du poisson. En définissant un plafond pour la quantité de Gad mII, les contrôles sanitaires auraient un moyen précis de détecter les poissons impropres à la consommation.

2.3.1.3 Sondes d'identification

Des sondes ADN peuvent s'avérer intéressantes dans un but de traçabilité. En effet, il semble que les parvalbumines de poissons bien que très conservées soient suffisamment différentes pour permettre d'identifier avec certitude de quelle espèce il s'agit. Ces sondes (contre les différentes parvalbumines) pourraient aussi servir d'outil phylogénétique.

2.3.2 Modifications industrielles pour l'obtention de produits hypoallergéniques

La connaissance des motifs immunogènes des allergènes et de leur sensibilité aux modifications physico-chimiques, permettrait de mettre en place des traitements physico-chimiques adaptés à la dénaturation des allergènes majeurs des poissons utilisés pour les plats cuisinés. Ainsi, en fonction de la nature et de la spécificité des différents allergènes présents, il sera envisagé plusieurs traitements successifs comme le traitement à la chaleur, la protéolyse ou l'extrudation afin d'en éliminer un maximum.

2.4 Immunothérapie

Vaccination par ADN pour induire la tolérance et une réponse immunitaire de type Th1

Nous avons vu que différentes immunothérapies ont déjà été testées pour le traitement de l'allergie. Certaines comme la désensibilisation aux pollens fonctionnent bien et sont couramment utilisées. Néanmoins pour l'allergie alimentaire les essais de désensibilisation ne se sont pas révélés suffisamment convaincants pour être utilisés comme traitement en médecine.

La meilleure connaissance des mécanismes d'immunologie et du rôle de l'équilibre Th1/Th2 dans les réactions allergiques, a conduit les chercheurs à tenter d'inverser la tendance d'une réponse Th2 vers une réponse Th1 chez les patients allergiques. L'immunothérapie par ADN avec ou sans allergène semble un moyen efficace pour induire une tolérance aux allergènes et même à inverser une réponse immunitaire déjà installée.

Etant en possession des plasmides contenant les ADNc codant les deux allergènes de cabillaud identifiés Gad ml et Gad mll, nous pourrions envisager de les utiliser en vaccinothérapie chez les patients allergiques. Une évaluation s'avère donc nécessaire et une première étude devra être menée sur des rats sensibilisés aux allergènes de poisson.

3 Conclusion

L'objectif principal de ce travail était d'identifier et de caractériser de nouvelles protéines potentiellement allergéniques chez *Gadus morhua*. Les deux protéines étudiées s'avèrent effectivement être de nouveaux allergènes. L'une de ces protéines est une isoforme de parvalbumine, protéine déjà connue comme étant un allergène majeur de poisson. La seconde protéine est une protéine qui n'avait jamais été détectée comme allergène et qui fait potentiellement partie d'une nouvelle famille de superallergènes.

Les perspectives de ce travail à court ou à long terme sont nombreuses : en effet d'un point de vue fondamental, il est intéressant de connaître les protéines et les motifs immunogènes générant les allergies alimentaires. La connaissance de celles-ci permettra d'autre part, de nombreuses applications agroalimentaires, diagnostiques, voire même de thérapie. Il nous semble donc indispensable de continuer ce travail de caractérisation des allergènes potentiels et de mettre en place des collaborations avec des industriels de l'agro-alimentaire et avec des laboratoires pharmaceutiques.

Bibliographie

- Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106 (2) : 228-38.
- Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Allergological and serological differentiation between various species of fish. *Int Arch Allergy*, 1966a, 31 : 239-60
- Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Characterization of different allergen extracts from fish with respect to content of protein antigens and allergenic activity. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1966b, 30 (1) : 1-14
- Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Preparation and characterization of extracts from cod and salmon. *Int Arch Allergy*, 1966c, 29 : 453-69
- Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Studies of different fractions of extracts from cod muscle tissue. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1967, 31 (3) : 239-60
- Aas K and Elsayed SM. Characterization of a major allergen (cod). Effect of enzymic hydrolysis on the allergenic activity. *J Allergy*, 1969, 44 (6) : 333-43.
- Aas K and Jebsen JW. Studies of hypersensitivity to fish. Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1967, 32 (1) : 1-20
- Aas K and Lundkvist U. The radioallergosorbent test with a purified allergen from codfish. *Clin Allergy*, 1973, 3 (3) : 255-61.
- Alonso MD, Davila I, Conde Salazar L, Cuevas M, Martin JA, Guimaraens MD and Losada E. Occupational protein contact dermatitis from herring. *Allergy*, 1993, 48 (5) : 349-52.
- Alvarez-Cuesta E, Cuesta-Herranz J, Puyana-Ruiz J, Cuesta-Herranz C and Blanco-Quiros A. Monoclonal antibody-standardized cat extract immunotherapy : risk-benefit effects from a double-blind placebo study. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 93 (3) : 556-66.
- Apold J and Elsayed S. The immunochemical reactivity of regions encompassing Tyr-30 and Arg-75 of allergen M from cod. *Mol Immunol*, 1980, 17 (3) : 291-6.
- Appel SH, Beers D, Siklos L, Engelhardt JI and Mosier DR. Calcium : the Darth Vader of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2001, 2 Suppl 1 : S47-54.
- Arnold SH and Brown WD. Histamine (?) toxicity from fish products. *Adv Food Res*, 1978, 24 : 113-54
- Atkins FM. The basis of immediate hypersensitivity reactions to foods. *Nutr Rev*, 1983a, 41 (8) : 229-34.
- Atkins FM. The multiple etiology of food hypersensitivity. *Nutr Rev*, 1983b, 41 (8) : 245-8.
- Bading H, Ginty DD and Greenberg ME. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*, 1993, 260 (5105) : 181-6.
- Bahna SL and Gandhi MD. Milk hypersensitivity. I. Pathogenesis and symptomatology. *Ann Allergy*, 1983, 50 (4) : 218-23.

Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente XS and Rodriguez R. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem*, 1996, 241 (3) : 772-8.

Benham FJ, Hodgkinson S and Davies KE. A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene on the short arm of the human X chromosomes defines a multigene family. *Embo J*, 1984, 3 (11) : 2635-40.

Berchtold MW. Structural organization of the human parvalbumin gene. *Adv Exp Med Biol*, 1989, 255 : 251-6

Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM and Sampson HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 1992a, 89 (3) : 730-7.

Bernhisel-Broadbent J, Strause D and Sampson HA. Fish hypersensitivity. II : Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J Allergy Clin Immunol*, 1992b, 90 (4 Pt 1) : 622-9.

Bjornsson E JC, Plaschke P, Norrman E, Sjoberg O. Prevalence of sensitization to food allergens in adult Swedes. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 1996, 77 (4) : 327-32.

Blackfan H. A consideration of certain aspects of protein hypersensitivities in children. *Am J Med Sci*, 1920, 160 : 341-50

Blum HE, Lehky P, Kohler L, Stein EA and Fischer EH. Comparative properties of vertebrate parvalbumins. *J Biol Chem*, 1977, 252 (9) : 2834-8.

Bock SA. Natural history of severe reactions to foods in young children. *J Pediatr*, 1985, 107 (5) : 676-80.

Bock SA. A critical evaluation of clinical trials in adverse reactions to foods in children. *J Allergy Clin Immunol*, 1986, 78 (1 Pt 2) : 165-74.

Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*, 1987, 79 (5) : 683-8.

Bock SA and Sampson HA. Food allergy in infancy. *Pediatr Clin North Am*, 1994, 41 (5) : 1047-67.

Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, Kraft D and Ebner C. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol*, 1999, 29 (7) : 2344-53.

Bonneau JC. [Food allergens]. *Allerg Immunol (Paris)*, 1997, 29 Spec No : 21-4.

Boros CA, Kay D and Gold MS. Parent reported allergy and anaphylaxis in 4173 South Australian children. *J Paediatr Child Health*, 2000, 36 (1) : 36-40.

Brandtzaeg P. Nature and function of gastrointestinal antigen-presenting cells. *Allergy*, 2001, 56 (Suppl 67) : 16-20.

Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D and Wuthrich B. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy*, 1995, 50 (8) : 623-35.

- Buehner M, Ford GC, Moras D, Olsen KW and Rossmann MG. Structure determination of crystalline lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol*, 1974a, 82 (4) : 563-85.
- Buehner M, Ford GC, Olsen KW, Moras D and Rossmann MG. Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol*, 1974b, 90 (1) : 25-49.
- Bugajska-Schretter A, Grote M, Vangelista L, Valent P, Sperr WR, Rumpold H, Pastore A, Reichelt R, Valenta R and Spitzauer S. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen : different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut*, 2000, 46 (5) : 661-9.
- Burks AW and Stanley JS. Food allergy. *Curr Opin Pediatr*, 1998, 10 (6) : 588-93.
- Burks W, Bannon G and Lehrer SB. Classic specific immunotherapy and new perspectives in specific immunotherapy for food allergy. *Allergy*, 2001, 56 (Suppl 67) : 121-4.
- Burr ML. Does infant feeding affect the risk of allergy? *Arch Dis Child*, 1983, 58 (7) : 561-5.
- Burr ML and Merrett TG. Food intolerance : a community survey. *Br J Nutr*, 1983, 49 (2) : 217-9.
- Casimir G, Cuvelier P, Allard S and Duchateau J. Life-threatening fish allergy successfully treated with immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*, 1997, 8 (2) : 103-5.
- Cerf-Bensussan N, Durandy A, Guy-Grand D and Brousse N. Développement de la barrière immune intestinale chez l'homme. Paris. 1993. 73-84
- Chard PS, Bleakman D, Christakos S, Fullmer CS and Miller RJ. Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol*, 1993, 472 : 341-57.
- Coffee CJ and Bradshaw RA. Carp muscle calcium-binding protein. I. Characterization of the tryptic peptides and the complete amino acid sequence of component B. *J Biol Chem*, 1973, 248 (9) : 3302-12.
- Cohen SG and Saavedra-Delgado AM. Through the centuries with food and drink, for better or worse. *Allergy Proc*, 1989, 10 (4) : 281-90.
- Coombs R and Gell P. The classification of allergic reaction underlying disease. 1963. 317-37
- Crespo JF, Pascual C, Dominguez C, Ojeda I, Munoz FM and Esteban MM. Allergic reactions associated with airborne fish particles in IgE-mediated fish hypersensitive patients. *Allergy*, 1995, 50 (3) : 257-61.
- David B. [From synthesis of immunoglobulins E to allergic syndromes]. *Rev Prat*, 1996, 46 (8) : 935-41.
- de Martino M, Novembre E, Galli L, de Marco A, Botarelli P, Marano E and Vierucci A. Allergy to different fish species in cod-allergic children: in vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 86 (6 Pt 1) : 909-14.
- Declercq JP, Tinant B, Parello J and Rambaud J. Ionic interactions with parvalbumins. Crystal structure determination of pike 4.10 parvalbumin in four different ionic environments. *J Mol Biol*, 1991, 220 (4) : 1017-39.

Di Stanislao C, Di Bernardino L, Bianchi I and Bologna G. A double-blind, placebo-controlled study of preventive immunotherapy with E.P.D., in the treatment of seasonal allergic disease. *Allerg Immunol*, 1997, 29 (2) : 39-42

Dominguez C, Ojeda I, Crespo JF, Pascual C, Ojeda A and Martin-Esteban M. Allergic reactions following skin contact with fish. *Allergy Asthma Proc*, 1996, 17 (2) : 83-7.

Dory D, Chopin C, Aimone-Gastin I, Gueant JL, Guerin L, Sainte-Laudy J, Moneret-Vautrin DA and Fleurence J. Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract. *Allergy*, 1998, 53 (1) : 42-50.

Dowd DR. Calcium regulation of apoptosis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1995, 30 : 255-80

Edman. *Acta Chem Scand*, 1950, 4 : 283-93

Elsayed S and Aas K. Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. *J Allergy*, 1971a, 47 (5) : 283-91.

Elsayed S and Aas K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1971b, 40 (3) : 428-38

Elsayed S, Aas K, Sletten K and Johansson SG. Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochemistry*, 1972, 9 (6) : 647-61.

Elsayed S and Apold J. Allergenic structure of allergen M from cod. II. Allergenicity of the limited tryptic hydrolysis peptides of fragment TM 2. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1977, 54 (2) : 171-5

Elsayed S and Apold J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M : locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy*, 1983, 38 (7) : 449-59.

Elsayed S, Apold J, Aas K and Bennich H. The allergenic structure of allergen M from cod. I. Tryptic peptides of fragment TM 1. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1976, 52 (1-4) : 59-63

Elsayed S and Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol*, 1975, 4 (2) : 203-8

Elsayed S, Ragnarsson U, Apold J, Florvaag E and Vik H. Allergenic synthetic peptide corresponding to the second calcium-binding loop of cod allergen M. *Scand J Immunol*, 1981, 14 (2) : 207-11.

Elsayed S, Sletten K and Aas K. The primary structure of a major allergen (COD) : NH₂-terminal amino acid sequence of fragment TM2. *Immunochemistry*, 1973, 10 (10) : 701-5.

Elsayed S, Sornes S, Apold J, Vik H and Florvaag E. The immunological reactivity of the three homologous repetitive tetrapeptides in the region 41-64 of allergen M from cod. *Scand J Immunol*, 1982, 16 (1) : 77-82.

Elsayed S, Titlestad K, Apold J and Aas K. A synthetic hexadecapeptide derived from allergen M imposing allergenic and antigenic reactivity. *Scand J Immunol*, 1980, 12 (2) : 171-5

Elsayed S, von Bahr-Lindstrom H and Bennich H. The primary structure of fragment TM2 of allergen M from cod. *Scand J Immunol*, 1974, 3 (5) : 683-6

- Elsayed SM and Aas K. Characterization of a major allergen (cod.) chemical composition and immunological properties. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1970, 38 (5) : 536-48
- Endo T, Kobayashi S and Onaya T. Parvalbumin in rat cerebrum, cerebellum and retina during postnatal development. *Neurosci Lett*, 1985a, 60 (3) : 279-82.
- Endo T, Takazawa K and Onaya T. Parvalbumin exists in rat endocrine glands. *Endocrinology*, 1985b, 117 (2) : 527-31.
- Engel E, Richter K, Obermeyer G, Briza P, Kungl AJ, Simon B, Auer M, Ebner C, Rheinberger HJ, Breitenbach M and Ferreira F. Immunological and biological properties of Bet v 4, a novel birch pollen allergen with two EF-hand calcium-binding domains. *J Biol Chem*, 1997, 272 (45) : 28630-7.
- Ewan PW. Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations. *Bmj*, 1996, 312 (7038) : 1074-8.
- Ferdinand W. The isolation and specific activity of rabbit-muscle Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem J*, 1964, 92 : 578-85
- Ford RP and Taylor B. Natural history of egg hypersensitivity. *Arch Dis Child*, 1982, 57 (9) : 649-52.
- Fothergill-Gilmore LA and Michels PA. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol*, 1993, 59 (2) : 105-235
- Freeman J. "Rush" inoculation, with a special reference to hay fever treatment. *Lancet*, 1930, i : 744-47
- Galland AV, Dory D, Pons L, Chopin C, Rabesona H, Gueant JL and Fleurence J. Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 706 (1) : 63-71.
- Galland-Irmouli AV. Etude des propriétés allergéniques et nutritionnelles de protéines d'origine marine (cabillaud, algue rouge *Palmaria palmata*). 1999. Th.
- Garcia-Meunier P, Etienne-Julan M, Fort P, Piechaczyk M and Bonhomme F. Concerted evolution in the GAPDH family of retrotransposed pseudogenes. *Mamm Genome*, 1993, 4 (12) : 695-703.
- Gazzaz SS and Rasco BA. Parvalbumins in fish and their role as food allergen : a review. *Rev Fish Sci*, 1993, 1 : 1-26
- Gell PGH, Coombs RRA and Lachmann PJ. *Clinical Aspects of Immunology*. 3rd ., Philadelphia. 1975
- Goodman M and Pechere JF. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method. *J Mol Evol*, 1977, 9 (2) : 131-58.
- Goodman M, Pechere JF, Haiech J and Demaille JG. Evolutionary diversification of structure and function in the family of intracellular calcium-binding proteins. *J Mol Evol*, 1979, 13 (4) : 331-52.
- Guenounou M. [Cytokines and allergic response]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1998, 56 (3) : 297-304.
- Haiech J, Derancourt J, Pechere JF and Demaille JG. Magnesium and calcium binding to parvalbumins : evidence for differences between parvalbumins and an explanation of their relaxing function. *Biochemistry*, 1979, 18 (13) : 2752-8.

- Hansen TK, Bindslev-Jensen C, Skov PS and Poulsen LK. Codfish allergy in adults : IgE cross-reactivity among fish species. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1997, 78 (2) : 187-94.
- Hapak RC, Zhao H and Henzl MT. Oligomerization of an avian thymic parvalbumin. Chemical evidence for a Ca(2+)-specific conformation. *FEBS Lett*, 1994, 349 (2) : 295-300.
- Hassoun S. [Food allergy : definition--physiopathology]. *Allerg Immunol (Paris)*, 1997, 29 Spec No : 4-5.
- Haugaard L, Dahl R and Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite : clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol*, 1993, 91 (3) : 709-22.
- Hedlin G. Treatment with cat allergy vaccines. *Clin Exp Allergy*, 1991, 21 Suppl 1 : 211-5.
- Hefle SL. Impact of processing on food allergens. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 459 : 107-19
- Heizmann CW. Parvalbumin, a relaxing factor in muscle and a neuronal marker in brain. *Prog Clin Biol Res*, 1984, 168 : 205-10
- Heizmann CW. Calcium signaling in the brain. *Acta Neurobiol Exp*, 1993, 53 (1) : 15-23
- Heizmann CW, Berchtold MW and Rowleson AM. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79 (23) : 7243-7.
- Helm RM and Burks AW. Mechanisms of food allergy. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12 (6) : 647-53.
- Hemmens VJ, Baldo BA, Underwood PA, Holen E and Elsayed S. Common antigenic and allergenic determinants on codfish proteins detected with mouse monoclonal IgG and human IgE antibodies. *Mol Immunol*, 1989, 26 (5) : 477-84.
- Hengge UR, Walker PS and Vogel JC. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest*, 1996, 97 (12) : 2911-6.
- Henzl MT, Zhao H and Saez CT. Self-association of CPV3, an avian thymic parvalbumin. *FEBS Lett*, 1995, 375 (1-2) : 137-42.
- Hermann A, Pauls TL and Heizmann CW. Calcium-binding proteins in *Aplysia* neurons. *Cell Mol Neurobiol*, 1991, 11 (4) : 371-86.
- Hof PR, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA and Vogt Weisenhorn DM. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals : phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat*, 1999, 16 (2) : 77-116.
- Holt PG and Macaubas C. Development of long-term tolerance versus sensitisation to environmental allergens during the perinatal period. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9 (6) : 782-7.
- Horner AA, Nguyen MD, Ronaghy A, Cinman N, Verbeek S and Raz E. DNA-based vaccination reduces the risk of lethal anaphylactic hypersensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106 (2) : 349-56.

Hsu CH,Chua KY,Tao MH,Lai YL,Wu HD,Huang SK and Hsieh KH. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med*, 1996, 2 (5) : 540-4.

Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21 (1) : 14-7.

Jaffuel D, Demoly P and Bousquet J. Les allergies alimentaires. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2001, 41 : 169-86

Jansen JJ, Kardinaal AF, Huijbers G, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BP and Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 93 (2) : 446-56.

Johansson SG, Bennich H and Berg T. In vitro diagnosis of atopic allergy. 3. Quantitative estimation of circulating IgE antibodies by the radioallergosorbent test. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1971, 41 (2) : 443-51

Kajosaari M. Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. *Acta Paediatr Scand*, 1982, 71 (5) : 815-9.

Kajosaari M. Atopy prevention in childhood: the role of diet. Prospective 5-year follow-up of high-risk infants with six months exclusive breastfeeding and solid food elimination. *Pediatr Allergy Immunol*, 1994, 5 (6) : 26-8.

Kang KW, Kim TS and Kim KM. Interferon-gamma- and interleukin-4-targeted gene therapy for atopic allergic disease. *Immunology*, 1999, 97 (3) : 462-5.

Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M and Thevenin F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108 (1) : 133-40.

Katz DH. The allergic phenotype : manifestation of 'allergic breakthrough' and imbalance in normal 'damping' of IgE antibody production. *Immunol Rev*, 1978, 41 : 77-108

Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J and Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93 (7) : 2879-83.

Kretsinger RH and Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem*, 1973, 248 (9) : 3313-26.

Kumar M, Behera AK, Hu J, Lockey RF and Mohapatra SS. IFN-gamma and IL-12 plasmid DNAs as vaccine adjuvant in a murine model of grass allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108 (3) : 402-8.

Kyte J and Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157 (1) : 105-32.

Lehky P, Blum HE, Stein EA and Fischer EH. Isolation and characterization of parvalbumins from the skeletal muscle of higher vertebrates. *J Biol Chem*, 1974, 249 (13) : 4332-4.

Li XM, Kleiner G, Huang CK, Lee SY, Schofield B, Soter NA and Sampson HA. Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 107 (4) : 693-702.

Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA and Sampson HA. A murine model of peanut anaphylaxis : T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106 (1 Pt 1) : 150-8.

Lindstrom CD, van Do T, Hordvik I, Endresen C and Elsayed S. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand J Immunol*, 1996, 44 (4) : 335-44.

Loveless M. Allergy for corn and its derivatives : experiments with a masked ingestion test for its diagnosis. *J Allergy*, 1950, 21 : 500-9

Masters S and Barrett-Connor E. Parasites and asthma--predictive or protective? *Epidemiol Rev*, 1985, 7 : 49-58

Mata E, Favier C, Moneret-Vautrin DA, Nicolas JP, Han Ching L and Gueant JL. Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63-kDa protein. *Allergy*, 1994, 49 (6) : 442-7.

May CD. Objective clinical and laboratory studies of immediate hypersensitivity reactions to foods in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*, 1976, 58 (4) : 500-15.

McPhalen CA, Strynadka NC and James MN. Calcium-binding sites in proteins : a structural perspective. *Adv Protein Chem*, 1991, 42 : 77-144

Metzger WJ and Nyce JW. Oligonucleotide therapy of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 104 (2 Pt 1) : 260-6.

Michels PA, Poliszczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, Wierenga RK, Borst P and Opperdoes FR. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, 1986, 5 (5) : 1049-56.

Milgrom H, Fick RB, Jr., Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML and Metzger WJ. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N Engl J Med*, 1999, 341 (26) : 1966-73.

Minford AM, MacDonald A and Littlewood JM. Food intolerance and food allergy in children: a review of 68 cases. *Arch Dis Child*, 1982, 57 (10) : 742-7.

Molckhou P. Allergies alimentaires : problèmes actuels et futurs. Institut UCB de l'allergie, 1999

Moneret-Vautrin D and André C. Immunopathologie de l'allergie alimentaire et fausses allergies alimentaires. Paris. 1983

Moneret-Vautrin DA. Food antigens and additives. *J Allergy Clin Immunol*, 1986, 78 (5 Pt 2) : 1039-46.

Moneret-Vautrin DA, Bene MC, Gueant JL, Champigneulle B, Nicolas JP and Faure G. GALT involvement in food allergy. *Food Addit Contam*, 1990, 7 (Suppl 1) : S73-81.

Moneret-Vautrin DA and Kanny G. [Food-induced anaphylaxis. A new French multicenter study]. *Bull Acad Natl Med*, 1995, 179 (1) : 161-72, 78-84 ; discussion 73-7.

Moneret-Vautrin DA and Kanny G. [Food hypersensitivities]. *Rev Prat*, 1996, 46 (8) : 961-7.

Moneret-Vautrin DA, Kanny G and Thevenin V. A population study of food allergy in France ; a survey concerning 33100 individuals. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 101 : S87

Muller U, Helbling A and Berchtold E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 89 (2) : 529-35.

Murthy MR, Garavito RM, Johnson JE and Rossmann MG. Structure of lobster apo-D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 3.0 Å resolution. *J Mol Biol*, 1980, 138 (4) : 859-72.

Mutus B, Palmer EJ and MacManus JP. Disulfide-linked dimer of oncomodulin : comparison to calmodulin. *Biochemistry*, 1988, 27 (15) : 5615-22.

Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem*, 1968, 16 (9) : 557-60

Natter S, Seiberler S, Hufnagl P, Binder BR, Hirschl AM, Ring J, Abeck D, Schmidt T, Valent P and Valenta R. Isolation of cDNA clones coding for IgE autoantigens with serum IgE from atopic dermatitis patients. *Faseb J*, 1998, 12 (14) : 1559-69.

Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A and Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99 (6 Pt 1) : 744-51.

Nguyen MD, Cinman N, Yen J and Horner AA. DNA-based vaccination for the treatment of food allergy. *Allergy*, 2001, 56 (Suppl 67) : 127-30.

Nitsch C, Scotti A, Sommacal A and Kalt G. GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia-induced neuronal death contain the Ca²⁺(+)-binding protein parvalbumin. *Neurosci Lett*, 1989, 105 (3) : 263-8.

Noon L and Cantab B. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*, 1911, i : 1572

Norman PS, Ohman JL, Jr., Long AA, Creticos PS, Geftter MA, Shaked Z, Wood RA, Eggleston PA, Hafner KB, Rao P, Lichtenstein LM, Jones NH and Nicodemus CF. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154 (6 Pt 1) : 1623-8.

Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, Mugnaini L, Caffarelli C, Cavagni G, Giovane A and Vierucci A. Anaphylaxis in children : clinical and allergologic features. *Pediatrics*, 1998, 101 (4) : E8.

Oehling A, Resano A, Sanz ML and Fernandez Benitez M. Importance of food allergy in atopic dermatitis. *Allergy*, 1998, 53 (46) : 139-42.

Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM and Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*, 1994, 370 (6488) : 367-70.

Olszewski A, Pons L, Moutete F, Aimone-Gastin I, Kanny G, Moneret-Vautrin DA and Gueant JL. Isolation and characterization of proteic allergens in refined peanut oil. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28 (7) : 850-9.

Oppenheimer JJ, Nelson HS, Bock SA, Christensen F and Leung DY. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 90 (2) : 256-62.

- Ortolani C and Vighi G. Definition of adverse reactions to food. *Allergy*, 1995, 50 (20) : 8-13.
- Osler AG, Lichtenstein LM and Levy DA. In vitro studies of human reaginic allergy. *Adv Immunol*, 1968, 8 : 183-231
- Pardoll DM and Beckerleg AM. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity*, 1995, 3 (2) : 165-9.
- Pascual C, Martin Esteban M and Crespo JF. Fish allergy : evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr*, 1992, 121 (5 Pt 2) : S29-34.
- Pascual CY, Crespo JF, Perez PG and Esteban MM. Food allergy and intolerance in children and adolescents, an update. *Eur J Clin Nutr*, 2000, 54 Suppl 1 : S75-8.
- Patriarca G, Schiavino D, Nucera E, Schinco G, Milani A and Gasbarrini GB. Food allergy in children : results of a standardized protocol for oral desensitization. *Hepatogastroenterology*, 1998, 45 (19) : 52-8.
- Pauls TL, Cox JA and Berchtold MW. The Ca²⁺(-)-binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes : new structural and functional findings. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1306 (1) : 39-54.
- Pechere JF, Capony JP and Ryden L. The primary structure of the major parvalbumin from hake muscle. Isolation and general properties of the protein. *Eur J Biochem*, 1971a, 23 (3) : 421-8.
- Pechere JF, Capony JP, Ryden L and Demaille J. The amino acid sequence of the major parvalbumin from hake muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971b, 43 (5) : 1106-11.
- Pechere JF, Demaille J and Capony JP. Muscular parvalbumins : preparative and analytical methods of general applicability. *Biochim Biophys Acta*, 1971c, 236 (2) : 391-408.
- Rancé F and Bidat E. *Allergie alimentaire chez l'enfant*. 2000
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA *et al*. Intradermal gene immunization : the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 (20) : 9519-23.
- Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL and Carson DA. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93 (10) : 5141-5.
- Revillard JP. *Immunologie*. 1998
- Rodriguez J, Reano M, Vives R, Canto G, Daroca P, Crespo JF, Vila C, Villarreal O and Bensabat Z. Occupational asthma caused by fish inhalation. *Allergy*, 1997, 52 (8) : 866-9.
- Roitt I, Brostoff J and Male D. *Immunologie*. Bruxelles. 1994
- Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm and allergic disorders. *Allergy*, 1998, 53 (46) : 12-5.
- Rowe A and Rowe A. *Food allergy - Its manifestations and control and the elimination diets*. C.C. Thomas, Springfield. 1931

Roy K, Mao HQ, Huang SK and Leong KW. Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med*, 1999, 5 (4) : 387-91.

Rudolf MP, Furukawa K, Miescher S, Vogel M, Kricek F and Stadler BM. Effect of anti-IgE antibodies on Fc epsilonRI-bound IgE. *J Immunol*, 1996, 157 (12) : 5646-52

Sambrook. 1989. 18.44-18.46

Sampson HA. Comparative study of commercial food antigen extracts for the diagnosis of food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 1988, 82 (5 Pt 1) : 718-26.

Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 84 (6 Pt 2) : 1062-7.

Sampson HA. Fatal food-induced anaphylaxis. *Allergy*, 1998, 53 (46) : 125-30.

Sampson HA. Food allergy. Part 1 : immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 1999a, 103 (5 Pt 1) : 717-28.

Sampson HA. Food allergy. Part 2 : diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*, 1999b, 103 (6) : 981-9.

Sampson HA. Food anaphylaxis. *Br Med Bull*, 2000, 56 (4) : 925-35

Sampson HA, Mendelson L and Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med*, 1992, 327 (6) : 380-4.

Sampson HA and Scanlon SM. Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*, 1989, 115 (1) : 23-7.

Sanchez CD, Matinez JL, Cadarso AI and Pan CV. Protein contact dermatitis associated with food allergy to fish. *Contact Dermatitis*, 1994, 31 : 55-7

Sandine WE and Daly M. Milk intolerance. *J. Food Protect.*, 1979, 42 : 435

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74 (12) : 5463-7.

Sarles H and Gauthier HP. *L'allergie digestive*. Masson, Paris. 1961

Sato Y and Kasukawa R. [DNA vaccines against allergy]. *Nippon Rinsho*, 2000, 58 (6) : 1307-14.

Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA and Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, 1996, 273 (5273) : 352-4.

Seiberler S, Scheiner O, Kraft D, Lonsdale D and Valenta R. Characterization of a birch pollen allergen, Bet v III, representing a novel class of Ca²⁺ binding proteins : specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca²⁺. *Embo J*, 1994, 13 (15) : 3481-6.

Slater JE, Paupore E, Zhang YT and Colberg-Poley AM. The latex allergen Hev b 5 transcript is widely distributed after subcutaneous injection in BALB/c mice of its DNA vaccine. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102 (3) : 469-75.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, 150 (1) : 76-85

Soothill JF. Prevention of atopic allergic disease. *Ann Allergy*, 1983, 51 (2 Pt 2) : 229-32.

Soothill JF and Dudgeon JA. Immunization reactions and immunodeficiency. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1983, 19 (3) : 339-41

Spahn TW, Fontana A, Faria AM, Slavin AJ, Eugster HP, Zhang X, Koni PA, Ruddle NH, Flavell RA, Rennert PD and Weiner HL. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol*, 2001, 31 (4) : 1278-87.

Spahn TW, Weiner HL, Rennert PD, Lugering N, Fontana A, Domschke W and Kucharzik T. Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol*, 2002, 32 (4) : 1109-13.

Spiegelberg HL, Orozco EM, Roman M and Raz E. DNA immunization : a novel approach to allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 1997, 52 (10) : 964-70.

Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, Cockrell G, Helm RM, West CM and Bannon GA. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 342 (2) : 244-53.

Stene LC and Nafstad P. Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet*, 2001, 357 (9256) : 607-8.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*, 1989, 299 (6710) : 1259-60.

Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, Valent P, Valenta R and Spitzauer S. 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.

Taylor SL. Food allergies. *Food Technol*, 1985, : 98-105

Taylor SL and Lehrer SB. Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1996, 36 (Suppl) : S91-118.

Taylor SL, Stratton JE and Nordlee JA. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning) : an allergy-like intoxication. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1989, 27 (4-5) : 225-40

Thatcher DR and Pechere JF. The amino-acid sequence of the major parvalbumin from thornback-ray muscle. *Eur J Biochem*, 1977, 75 (1) : 121-32.

Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van Nest G, Tuck S, Eiden JJ, Kagey-Sobotka A, Creticos PS, Lichtenstein LM, Spiegelberg HL and Raz E. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106 (1 Pt 1) : 124-34.

Tomasi TB and Grey HM. Structure and function of immunoglobulins. *Prog Allergy*, 1972, 16 : 81-213

Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinet JP and Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99 (4) : 461-5.

Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76 (9) : 4350-4.

Twardosz A, Hayek B, Seiberler S, Vangelista L, Elfman L, Gronlund H, Kraft D and Valenta R. Molecular characterization, expression in *Escherichia coli*, and epitope analysis of a two EF-hand calcium-binding birch pollen allergen, Bet v 4. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239 (1) : 197-204.

Valenta R, Hayek B, Seiberler S, Bugajska-Schretter A, Niederberger V, Twardosz A, Natter S, Vangelista L, Pastore A, Spitzauer S and Kraft D. Calcium-binding allergens : from plants to man. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 117 (3) : 160-6.

von Garnier C, Astori M, Kettner A, Dufour N, Heusser C, Corrandin G and Spertini F. Allergen-derived long peptide immunotherapy down-regulates specific IgE response and protects from anaphylaxis. *Eur J Immunol*, 2000, 30 : 1638-45

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L and Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 1993, 14 (7) : 353-6.

Werlen G, Belin D, Conne B, Roche E, Lew DP and Prentki M. Intracellular Ca²⁺ and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*, 1993, 268 (22) : 16596-601.

Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O and Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol*, 1992, 148 (12) : 4072-6.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG and van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 2002, 296 (5567) : 490-4.

Young E, Stoneham MD, Petrukevitch A, Barton J and Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet*, 1994, 343 (8906) : 1127-30.

Zeiger RS, Heller S, Mellon MH, Forsythe AB, O'Connor RD, Hamburger RN and Schatz M. Effect of combined maternal and infant food-allergen avoidance on development of atopy in early infancy : a randomized study. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 84 (1) : 72-89.

Zimmet PZ, Elliott RB, Mackay IR, Tuomi T, Rowley MJ, Pilcher CC and Knowles WJ. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin in islet cell antibody positive presymptomatic type 1 diabetes mellitus : frequency and segregation by age and gender. *Diabet Med*, 1994, 11 (9) : 866-71.

Articles

Das Dores S., Chopin C., Quaratino D., Villaume C., Fleurence J., Guéant J.L.

A novel oligomeric parvalbumin allergen of atlantic cod (Gad ml) encoded by a gene distinct from that of Gad cl.

Allergy, 2002, 57(Suppl. 72) : 79-83

Das Dores S., Chopin C., Romano A, Galland-Irmouli A.V., Quaratino D., Pascual C., Fleurence J., Guéant J.L.

IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allergen of codfish.

Allergy, 2002, 57(Suppl. 72) : 84-87

A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (*Gad mI*) encoded by a gene distinct from that of *Gad cI*

Background: The major allergen of Baltic cod (*Gadus callarias*) is a 12.3-kDa parvalbumin with two calcium-binding sites corresponding to EF-hand motifs. Our group found a 24-kDa IgE-reactive band that was also recognized by a monoclonal antiparvalbumin antibody in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Our purpose was to purify and to determine the cDNA deduced sequence of this new cod allergen.

Methods: Proteins from *pre rigor mortis* Atlantic cod were separated by gel filtration and the eluted peaks were analysed by SDS-PAGE and Western blotting with sera of sensitized patients and with antiparvalbumin. Protein bands were microsequenced, RNA transcripts were amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) using primer combinations overlapping the open reading frame.

Results: Four IgE and antiparvalbumin reactive proteins (12.5, 24, 38 and 51 kDa) were detected in gel filtration eluate. The cDNA deduced sequence of the 24 kDa protein had 109 amino acid residues with a molecular weight of 11.5 kDa and a theoretical pI of 4.34. The 24 kDa band corresponded therefore to a dimer of a β -parvalbumin. Its homology was higher with *Sal sI* than with *Gad cI*. This new allergen was named *Gad mI*.

Conclusion: We have characterized a new parvalbumin allergen in *Gadus morhua*. This protein formed oligomers in native and in reducing conditions. *Gad mI* and *Gad cI* may correspond to two distinct genes of *Gadus* species.

S. Das Dores^{1*}, C. Chopin^{2*},
C. Guillaume¹, J. Florence²,
J.-L. Guéant¹

¹Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EMI-INSERM 0014, URM IFREMER, n°20, Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ²Laboratoire de Biochimie des Protéines et Qualité, IFREMER, Nantes, France

Key words: codfish, parvalbumin, food allergy, cDNA sequencing.

Jean-Louis Guéant
Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition
EMI-INSERM 0014, URM IFREMER n°20
Faculté de Médecine de Nancy
Université Henri Poincaré
BP 184
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
France

Introduction

Fish is one of the foods most commonly involved in allergy in children (1, 2). *Gad cI*, the major allergen of Baltic cod (*Gadus callarias*), has been purified and characterized by Aas et al. (3, 4). This protein is a 12.3-kDa parvalbumin with two calcium-binding sites corresponding to EF-hand motifs (5–7).

The whole panel of cod allergens detected in Atlantic cod (*Gadus morhua*) remains to be characterized. Our group found, by Western blot of cod (*Gadus morhua*) protein extract, several IgE reactive bands over a wide (12–130 kDa) molecular range (8). In this study, a 24-kDa IgE-reactive band was also recognized by a monoclonal antiparvalbumin antibody (8). The purpose of the present work was to purify and to determine the cDNA deduced sequence of this new cod allergen.

Materials and methods

Sera

The patients of our study had an adverse reaction to Atlantic cod and were investigated to detect serum specific IgE against cod. Blood

samples were collected in dry tubes and centrifuged at 1000g for 5 min. Sera were aliquoted and stored at -80°C . A pool of control sera was collected from healthy subjects, with a total IgE serum level lower than 30 kU/l.

Preparation of crude cod extract

Cod used in this study was Atlantic cod (*Gadus morhua*) caught during a British oceanographic expedition. It was in the *pre rigor* state. Fillets were cut before the *post mortem* rigidity and placed immediately into liquid nitrogen before being stored at -80°C . Muscles were homogenized in phosphate buffer 0.07 M pH 7.0 in a 2-ml solution per gram of tissue. The mixture was centrifuged at 20 000g for 20 min. The samples were then dialysed against distilled water, lyophilized and stored at -20°C before use.

Protein concentration

The protein concentrations of the samples were determined by using the Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Bovine serum albumin (BSA) was used as reference.

Gel filtration chromatography

Cod proteins were separated by gel filtration on Superdex HR200 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Twenty-five milligrams of samples were diluted with 1 ml of water containing 30% isopropanol (v/v) and 0.001% Tetrafluoroacetic acid (v/v) pH 4.6. The constant flow

*The two first authors contributed equally to this article.

rate was 0.3 ml/min. The elution of the proteins was detected by UV-absorbance at 280 nm. The peaks were collected, dialysed against distilled water and analysed by SDS-PAGE and Western blotting.

Detection of the blotted proteins with a pool of cod allergic sera

Sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a 12% polyacrylamide gel in 20 mM Tris HCl, pH 8.3, 0.18 M glycine, and 0.1% SDS using a vertical Mini Protean[®] II apparatus (Biorad, Richmond, CA, USA) under 35 mA, 250 V, for 1 h. Proteins were transferred overnight at 20 V onto a nitrocellulose membrane (0.2 µm Trans-Blot[®] Transfer Medium, Bio-Rad) using a Trans-Blot[®] cell (Bio-Rad). Unoccupied protein binding sites were blocked by incubation with 0.3% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, and 0.15 M NaCl for 1 h. After three washings with 0.05% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, and 0.15 M NaCl, the nitrocellulose membrane was incubated for 3 h with 1 ml of serum diluted 1:10 in 0.1% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 and 0.15 M NaCl. The membrane was washed three times with the 0.05% Tween buffer and incubated for 3 h, at room temperature, with 2 ml anti-IgE diluted 1/10 in the 0.1% Tween buffer. After an additional three-step washing, the membrane was incubated overnight with antimouse IgG (whole molecule) horse-radish peroxidase conjugate (Amersham International) diluted 1/500 in the 0.1% Tween buffer. The membrane was rinsed 3 times during 5 min with 0.05% Tween at room temperature and incubated in the detection reagent ECL+[®] (Amersham International, UK). The membrane was washed briefly, placed subsequently in contact with an autoradiography film (Hyperfilm[®], Amersham International) during 2 min and developed immediately.

Detection of the blotted proteins with antiparvalbumin

The membrane was blocked as described above. It was incubated with monoclonal antiparvalbumin (clone PA-35, Sigma-Aldrich, Chesnes, France) diluted 1:1000 in 0.1% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris HCl, pH 7.4, and NaCl 0.15 M for 3 h at 20°C, washed three times, incubated during an additional 3 h with an antimouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich) diluted 1:10 000 (v/v) in 0.1% Tween 20, 20 mM Tris HCl, pH 7.4, and NaCl 0.15 M. The membrane was washed again 3 times and incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet, Sigma-Aldrich).

Peptides microsequencing

Semi-purified gel filtration fraction was run in SDS-PAGE and transferred on a PVDF membrane (Amersham International) using 50 mM Tris-borate buffer. The protein band of interest was cut and microsequenced for determination of peptides by the Institut Pasteur (Paris, France) on an Applied Biosystems Procise Sequencer (Applied Biosystems, Coutaboeuf, France).

Amplification of RNA transcripts by Reverse Transcription (RT), Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing of cDNA

Primers used for cDNA synthesis and PCR amplification were, respectively:

- S6: 5'-GA(AG)AT(ACT)AT(ACT)GA(CT)CA(AG)GA(CT)AA-3';
- As2: 5'-ATCAT(ATGC)GC(ATGC)CC(AG)AA(TC)TC(GA)TC-3';
- Ints2: 5'-AGGACAAGAGTGACTTTGTT-3';
- As7: 5'-GCCTTGATCATGGCGCCAAA-3';
- ParvII: 5'-CCTTCGCCGGTCTTAACGAT-3';

- PolydT-Anchor: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGA(T₁₆)(AGC)-3';
- Anchor: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGA-3'.

Primers S6, AS2, and AS7 were selected on the basis of the N-terminal and internal amino acid sequences obtained by micro-sequencing and INT S2 from the first generated PCR fragment. ParvII was chosen by alignment with already known sequences of the 5'-Salmo salar parvalbumin gene.

First strand cDNA was synthesized from 3.4 µg of total RNA in a reaction volume of 20 µl with Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). All PCR were performed with a pair of primers under the following conditions: 94°C for 15 s; hybridization temperature depending on the couple of primers used for 50 s; 72°C for 50 s; 35 cycles. For S6/AS2, the annealing temperature was 47°C, 51°C for INTS2/Anchor(3'-Rapid Amplification of cDNA Ends) and 57°C for parvII/AS7 couple. Sequencing of the purified PCR and 3'RACE products was achieved by the dideoxynucleotide chain termination method and ABI PRISM Dye Terminator kit as indicated by the manufacturer (PE France, Courtaboeuf, France). Analyses were performed on a ABI 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) by Genome Express (Montreuil, France).

Sequences alignment

Alignment was performed with ClustalW (version 1.81) (9), using the protein complete sequence. Homology research relied on the Blosum matrix series.

Results

The 7 proteins observed in silver stained SDS-PAGE of 30% isopropanol cod protein extract were cleared in 3 peaks in gel filtration chromatography. The second eluted peak contained the 24 kDa protein and 3 other proteins with molecular mass estimated, respectively, at 20.4 kDa, 18.5 kDa and 12.5 kDa (Fig. 1). Western-blotting of samples eluted from gel filtration was performed with chromatography with specific IgE sera against cod (Fig. 2). Four proteins with respective molecular weights at 12.5 kDa, 24, 38 and 51 kDa were detected in the first peak, while only the 12.5 and the 24 kDa were found in the second and the third peak (Fig. 2). The antiparvalbumin antibody also detected the 12.5 kDa, 24 and 38 kDa bands (Fig. 2). The N-terminal residue of the 24 kDa protein was not accessible to the Edman reaction. The tryptic digestion of the protein produced 40 peptides separated by HPLC. Three peptides had the following sequences: val-phe-glu-ile-ile-asp-gln-asp; ile-gly val-asp-glu-phe-gly ala-met-ile; ala-phe-phe-val-ile-asp-gln-asp.

The similarity search computed on the European Bioinformatic Institute server (Program FASTA 3) confirmed that the 24 kDa protein belonged to the parvalbumin family. The primers combination generated cDNA overlapping fragments of the open reading frame. The sequence of the 20 first nucleotides of the cDNA was uncertain when compared to those of Gad cI and Sal sI. It was verified by performing additional RT-PCR experiments with a primer encom-

Oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod

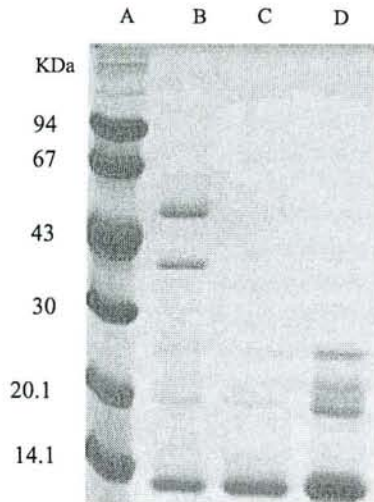


Figure 1. SDS-PAGE analysis of gel filtration protein. Electrophoresis was run in a 12% acrylamide gel. Ten micrograms of protein were loaded per line. Lane A: molecular weight markers (phosphorylase b: 94 kDa, albumin: 67 kDa, ovalbumin 43 kDa, carbonic anhydrase 30 kDa, soybean trypsin inhibitor 20.1 kDa, lactalbumin 14.4 kDa). Lane B: peak 1 of the gel filtration chromatography; Lane C: peak 3 of the gel filtration chromatography; Lane D: peak 2 of the gel filtration chromatography.

passing the 5'-untranslated region and the ATG codon, using the sequence of the corresponding region of Sal sI. The 500 bp cDNA sequence (Fig. 3) corresponded to a protein of 109 amino acids with a molecular weight of 11.5 kDa and a theoretical pI of 4.34. The 24 kDa band observed in SDS-PAGE corresponded therefore to a dimeric form. Sequence alignment of amino acids confirmed that the 11.5 kDa protein was a β -parvalbumin with typical characteristics: calcium-binding sites, a cysteine in position 18, an arginine in position 75 and a quadruplet of acidic residues in the region 59–62 (10). The sequence was compared with that of parvalbumins from other species (data not shown). The homology of the 11.5 kDa protein was higher with Sal sI clone 24.1 (11) than with Gad cI, the Baltic cod major allergen (12). According to the international nomenclature, this new allergen was called Gad mI.

Discussion

In our experimental conditions, four of the seven proteins were IgE-reactive with respective molecular sizes at 12.5, 24, 38 and 51 kDa. Their solubility in 30% isopropanol indicated that they had a relative hydrophobic surface. The 12.5 kDa IgE reactive band could correspond to the major cod allergen Gad cI and the 24 and 38 kDa bands to parvalbumins, as they also were also recognized by antiparvalbumins (8, 13–16).

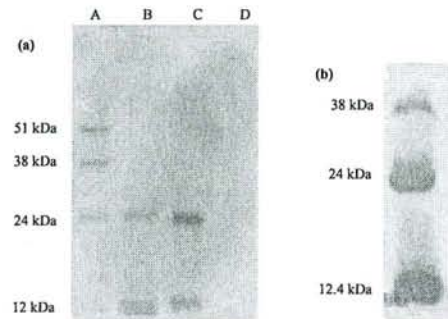


Figure 2. Western blot of eluted fractions from gel filtration. SDS-PAGE was run on a 12% polyacrylamide gel as described above. Some 10 μ g of proteins were transferred onto a 0.2- μ m nitrocellulose membrane. a) Eluted fractions of the gel filtration blotted with a pool of sera of sensitized patients. Lane A: Fraction 1 of the gel filtration chromatography; Lane B: Fraction 3 of the gel filtration chromatography; Lane C: Fraction 2 of the gel filtration chromatography; Lane D: molecular weight markers (no staining). b) Second fraction of gel filtration chromatography blotted with antiparvalbumin. Some 10 μ g of protein were transferred onto nitrocellulose membrane.

Fish parvalbumins represent the major allergen family involved in IgE-mediated hypersensitivity to fish and fish products. They belong to a family of calcium-binding proteins which may play a role in the relaxation of muscle tissue (6, 7, 17). Parvalbumin allergens have been already described in *Gadus callarias* (codfish from the Baltic Sea), *Salmo salar* (salmon) and *Cyprinus carpio* (carp) (4, 11, 18). This work is the first one providing the cDNA deduced sequence of a parvalbumin allergen in *Gadus morhua*. The parvalbumins can be divided into two evolutionary distinct lineages, α -type and β -type (5, 17). The present protein had a molecular size and an isoelectric point of a β -parvalbumin. The present parvalbumin had a 24-kDa molecular size in native conditions (e.g. gel filtration) and a 11.5-kDa molecular size deduced from the cDNA sequence. This showed therefore that it was present in dimeric form. In addition, western-blot after SDS-PAGE in reducing conditions of the semipurified protein also detected the 24 kDa and two other 38 and 51 kDa parvalbumins, which may therefore correspond to dimeric, trimeric and tetrameric forms, respectively. This indicated that reducing conditions did not completely dissociate the oligomers (Fig. 2). No indications of aggregation of fish parvalbumins have been previously described. They are regarded as soluble monomeric species (11, 18). Until now, only a few proteins of the parvalbumin family have been described in dimeric forms. Such an oligomerization has been previously observed in an avian thymic parvalbumin in the absence of reducing agents. Thymus parvalbumin oligomerization involved the presence of divalent ions and a disulphide bond in position Cys 72 (19). The consequences and the functions of the protein were not studied. By comparison, the dimerization of a related

1			F	A	G	L	N	D	A	D	I	T
1	---	-CC	TTC	GCC	GGT	CTT	AAC	GAT	GCT	GAC	ATC	ACT
13	A	A	L	A	A	C	K	A	E	G	S	F
37	GCA	GCC	CTG	GCG	GCC	TGC	AAA	GCT	GAG	GGC	TCC	TTC
						AB loop						
25	D	H	K	A	F	F	T	K	V	G	L	A
73	GAC	CAC	AAG	GCG	TTC	TTC	ACT	AAA	GTC	GGC	CTG	GCC
37	A	K	S	P	A	D	I	K	K	V	F	E
109	GCC	AAG	TCC	CCC	GCT	GAC	ATC	AAG	AAG	GTG	TTT	GAG
49	I	I	D	Q	D	K	S	D	F	V	E	E
145	ATC	ATT	GAC	CAG	GAC	AAG	AGT	GAC	TTT	GTT	GAG	GAG
						CD loop				Acidic residues		
61	D	E	L	K	L	F	L	Q	N	F	S	A
181	GAT	GAG	CTG	AAG	CTG	TTC	CTC	CAG	AAC	TTC	AGC	GCC

73	G	A	R	A	L	S	D	A	E	T	K	V
217	GGT	GCC	AGA	GCT	CTG	AGT	GAC	GCT	GAG	ACC	AAG	GTT
85	F	L	K	A	G	D	S	D	G	D	G	K
253	TTC	CTG	AAG	GCC	GGA	GAC	TCT	GAC	GGT	GAC	GGC	AAG
						EF loop						
97	I	G	V	D	E	F	G	A	M	I	K	A
289	ATC	GGA	GTT	GAT	GAG	TTT	GGC	GCC	ATG	ATC	AAG	GCA
	Stop											
325	TAG	ACTGTTCTCCACCAACTAGACCAGATGCTTACCCACCTACTCAGAAGGAACACTG										
383	GAG	CTGAGACCACCTCCTCACCCTCTCTCGCTCATCTCTCAACAACAATTTTATATAAATAA										
446	CCT	TTAACCTAACCCCCCCCCCCCCCCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT										

Figure 3. cDNA and deduced amino acid sequence of cod parvalbumin. The quadruplet of acidic residues and AB, CD, EF loops are underlined. Cysteine in position 18 and arginine in position 72 are encircled.

protein, oncomodulin (20), was formed by a disulphide bond in Cys 18 in presence of Ca²⁺, and it conferred a calmodulin-like activity. In addition, in a recent study using circular dichroism EF-hand peptides have been shown to bind calcium and to dimerize (21). Only 2 of the 3 "helix-loop-helix" EF-hand domains of parvalbumin can chelate divalent cations. The other domain may cover the hydrophobic surface of this pair of domains (22). Hydrophobic interactions related to apo- and holo-forms may be therefore implicated into oligomerization. Indeed, a disulphide bridge should be possible in Cys 18, but reductive conditions of SDS-PAGE could not separate the subunits. In regard to this hypothesis, it has been shown recently that the holo-form of carp parvalbumin is more favourable than the apo-form for IgE-binding (18). In the present work, we found an IgE-binding for both mono and oligomeric

forms of cod parvalbumin. Additional work should be performed to determine whether the oligomerization has an influence on the allergenicity of this protein.

IgE antibodies bind directly to the Ca²⁺-binding loops of parvalbumin. This motif is the most conserved structural motif in different Ca²⁺-binding proteins. It is often present in plant and animal protein allergens and may be responsible of cross-reacting sensitization (23). For example, distinct cross-reacting EF-hand type epitopes have been identified in pollen and vegetable allergens such as the major birch pollen allergen Bet v1 and profilins (24).

The Gad mI is a new allergen which had only 62.3% identity with Gad cI from *Gadus callarias*. This was surprising considering that its identity was higher (75%) with *Salmo salar* allergen (Sal sI). Since *Gadus morhua* is phylogenetically much closer to *Gadus callarias* than

Salmo salar, it may be hypothesized that Gad mI and Sal sI are encoded by the same gene in the two different species and that Gad mI and Gad cI correspond to two distinct genes which may be present in both *Gadus*

species. In conclusion, we have characterized a new parvalbumin allergen in Atlantic cod, which was named Gad mI. This protein formed oligomers in native and in reducing conditions.

References

1. ZEIGER RS. Dietary aspects of food allergy prevention in infants and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;**30**(Suppl.):S77-S86.
2. NIESTIJL JANSEN JJ, KARDINAAL AFM, HUIJBERS G, et al. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994;**93**:446-456.
3. AAS K. Studies of hypersensitivity to fish. Studies of different fractions of extracts from cod muscle tissue. *Int Arch Allergy* 1967a;**31**:239-260.
4. AAS K, JEBSEN JW. Studies of hypersensitivity to fish. Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod. *Int Arch Allergy* 1967b;**32**:1-20.
5. PAULS TL, COX JA, BERCHTOLD MW. The Ca²⁺-binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes: new structural and functional findings. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1306**:39-54.
6. KAWASAKI H, NAKAYAMA S, KRETSINGER RH. Classification and evolution of EF-hands proteins. *Biomol* 1998;**11**:277-295.
7. WEINMAN S. Calcium-binding proteins: an overview. *J Biol Buccale* 1991;**19**:90-98.
8. DORY D, CHOPIN C, AIMONE-GASTIN I, et al. Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract. *Allergy* 1998;**53**:42-50.
9. WILBUR WJ, LIPMAN DJ. Rapid similarity searches of nucleic and protein data banks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;**80**:726-730.
10. GERDAY C, COLLIN S, GERARDIN-OTTHIERS N. The amino acid sequence of the parvalbumin from the very fast swimbladder muscle of the toadfish (*Opsanus tau*). *Comp Biochem Physiol B* 1989;**93**:49-55.
11. LINDSTROM CDV, DØ TV, HØRDKVIK I, ENDRESEN C, ELSAYED S. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand J Immunol* 1996;**44**:335-344.
12. ELSAYED S, BENNICHI H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol* 1975;**4**:203-208.
13. BERNHISEL-BROADBENT J, SCALON SM, SAMPSON HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1992;**89**:730-737.
14. HANSEN TK, BINDSLEV-JENSEN C, SKOV PS, POULSEN LK. Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;**78**:187-194.
15. ELSAYED S, AAS K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. *Int Arch Allergy* 1971;**40**:428-438.
16. ELSAYED S, APOLD J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M. locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy* 1983;**38**:449-459.
17. GOODMAN M, PECHERE JF. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method. *J Mol Evol* 1977;**9**:131-158.
18. BUGAJSKA-SCHERTTER A, GROTE M, VANGELISTA L, et al. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut* 2000;**46**:661-669.
19. HENZL MT, ZHAO H, SAEZ CT. Self association of CPV3, an avian thymic parvalbumin. *FEBS Lett* 1995;**375**:137-142.
20. MUTUS B, PALMER EJ, MACMANUS JP. Disulfide-linked dimer of oncomodulin: comparison to calmodulin. *Biochemistry* 1988;**27**:5615-5622.
21. FRANCHINI PLA, REID RE. A model for circular dichroism monitored dimerization and calcium-binding in an EF-hand synthetic peptide. *J Theor Biol* 1999;**199**:199-211.
22. KRETSINGER RH, NOCKOLDS CE. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* 1973;**248**:3313-3326.
23. VALENTA R, HAYEK B, SEIBERLER S, et al. Calcium-binding allergens: from plants to man. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;**117**:160-166.
24. VIETHS S, AULEPP H, BECKER WM, et al. Characterization of labile and stable allergens in foods of plant origin. In: EISENBRAND G, AULEPP H, DAYAN AD, editors. *Food Allergies and Intolerances: Symposium*. VCH Weinheim, 1996:130-149.

IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allergen of codfish

Background: A 41-kDa IgE-reactive protein (p41) was purified from raw cod extract. This protein is homologous to an aldehyde phosphate dehydrogenase (APDH). The present study aims to evaluate the IgE-binding and the cross-reactivity of this protein in 13 patients allergic to codfish.

Methods: IgE binding of sera from 13 patients allergic to codfish was tested by Sepharose RIA and by Western blot.

Results: Among the 13 patients, only 4 had specific IgE to APDH detected by APDH-Sepharose RIA. The two patients who had the highest level of specific IgE to human APDH also had a class 5–6 CAP-RAST IgE level to codfish, but two other patients with a class 5 had a negative APDH-Sepharose IgE-RIA. Relative content of APDH was higher in extracts of commercial nonfrozen fish, compared to *pre rigor mortis*, *post rigor mortis* and frozen commercial codfish. A high homology of codfish APDH was found with the corresponding human enzyme. A significant inhibition of APDH-Sepharose by human and, to a lesser extent, by rabbit APDH was observed. Western blot of APDH codfish extract showed two bands at 41 and 36 kDa, respectively.

Conclusions: We have characterized a new allergen from codfish, which had a high level of homology in different species. The p41 relative content of extracts from nonfrozen codfish was higher than in the other samples assessed.

**S. Das Does¹, C. Chopin²,
A. Romano³, A.-V. Galland-Irmouli¹,
D. Quarantino³, C. Pascual⁴,
J. Fleurence², J.-L. Guéant^{1*}**

¹Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EMI INSERM 0014, URM IFREMER n°20, Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ²Laboratoire des Protéines et Qualité, IFREMER, Nantes, France; ³Department of Internal Medicine and Geriatrics, UCSC – Allergy Unit, CI Columbus, Rome and IRCCS Oasi Maria SS, Troina, Italy; ⁴Laboratorio de Inmunoalergia, Hospital Infantil La Paz, Madrid, Spain

Key words: codfish, dehydrogenase, food allergy, IgE.

Jean-Louis Guéant
Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition
EMI INSERM 0014, URM IFREMER n°20
Faculté de Médecine de Nancy
Université Henri Poincaré
BP 184
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
France

Introduction

Food allergy concerns 4–6% of children (1, 2) and 2% of the adult population (3). Fish has been reported to be one of the most commonly involved foods, after eggs, cow milk and peanuts (4–7). Moreover, fish allergy typically persists into adulthood (1). Symptoms are urticaria, atopic dermatitis, angioedema, asthma, diarrhoea or anaphylactic shock (5, 6, 8–12). Most children allergic to fish have specific IgE reacting against cod and patients allergic to cod also react to other species (13).

The major cod allergen, a 12.3-kDa parvalbumin, is well characterized. Nevertheless, many studies have detected other potential allergens (14–18). In our laboratory, a 41-kDa IgE-reactive protein (p41) was purified from raw cod extract by ammonium sulphate fractionation, hydroxyapatite chromatography and preparative electrophoresis (19). This protein is homologous to an aldehyde phosphate dehydrogenase (APDH) (unpublished data).

The present study aims to evaluate the IgE-binding and the cross-reactivity of this protein in patients with codfish allergy.

Materials and methods

Patients

Sera were collected from 13 patients allergic to codfish. One of them was from Italy, two were from France and the other 10 were from Spain. IgE antibodies specific to codfish were measured by RAST (CAP System Pharmacia, Uppsala, Sweden). All the patients had a positive RAST (class 3–6) (Table 1). Control sera were from individuals without allergy.

IgE-RIA

The assay was performed as described by Olszewski et al. (20). Briefly, human erythrocytes APDH (Sigma, St. Louis, USA) was covalently bound to epoxy-activated Sepharose 6B (Amersham-Pharmacia) (21–23) by mixing 0.65 g of gel expanded in water with 1 mg of human APDH. Some 50 µl of gel suspension was then incubated with 50 µl of sera from allergic patients for 3 h at room temperature. The solid phase was washed three times with 2 ml of 0.05 M phosphate buffer pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.02% BSA and was subsequently incubated with 50 µl of ¹²⁵I-labelled antihuman IgE (Immunotech, Marseille, France) for 18 h at room temperature. The reactive phase was washed again three times with the same buffer. Bound γ -radioactivity was counted to quantify specific IgE. The RIA was considered positive when the percentage of uptake of labelled anti-IgE with the patient sera (P) was two-fold higher than that of

IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allergen of codfish

control sera (C). The inhibition step was performed by incubating successively the sera with APDH solutions from different species for 1 h and with human APDH-Sepharose solid phase for 3 h. The inhibition percentage (IP) of the APDH used was estimated by γ -counting: $IP = [(cpm_i - cpm_0) / cpm_0] \times 100$, where cpm_0 was the radioactivity adsorbed without preincubation with APDH and cpm_i was the radioactivity adsorbed with preincubation with the APDH extract.

Electrophoretic detection and IgE-immunoblot of the p41 allergen extracted from *pre rigor* and *post rigor mortis* codfish and from commercially available codfish

p41 protein was purified from raw cod extract as described by Galland et al. by ammonium sulphate fractionation, hydroxyapatite chromatography and preparative electrophoresis (19).

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis was performed using a Mini-protean II electrophoresis unit (Bio-Rad, Hercules, USA). The stacking and the separating gel contained 4% and 12% of acrylamide, respectively. Proteins were separated for 2 h at 125 V in 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.192 M glycine, 0.1% SDS (w/v). The molecular mass markers used were LMW (Amersham-Pharmacia): phosphorylase b (94 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and lactalbumin (14.4 kDa) or Kaleidoscope (pre-stained marker from Bio-Rad): myosin (209 kDa), β -galactosidase (125 kDa), BSA (70 kDa), carbonic anhydrase (42.1 kDa), soybean trypsin inhibitor (32.6 kDa), lysozyme (17.6 kDa), and aprotinin (7.5 kDa). Protein bands were stained with Coomassie blue. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membrane (0.2 μ m, Bio-Rad) in 25 mM Tris buffer containing 192 mM glycine and 20% (v/v) methanol (pH 8.3). The transfer was done using a Trans-blot semidry transfer cell (Bio-Rad) during 30 min at 15 V. The membrane was blocked by incubation in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 mM NaCl (TBS), 3% (w/v) BSA for 2 h at room temperature and was then washed 2 times with gentle rocking in 20 mM Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl (TBS) with 0.05% (v/v) Tween 20. Nitrocellulose was then probed overnight with the serum from cod-allergic patient (diluted 1:5 in TBS with 0.1% Tween 20). It was washed again 5 times and incubated for one more night with 125 I-anti-IgE (Immunotech) (diluted 1:10 in TBS with 1% (w/v) BSA). All the incubations were performed at 4°C. IgE binding was detected by autoradiography. The film (Hyperfilm-MP from Amersham-Pharmacia) was kept at -80°C and exposed for 7 days.

Results and discussion

Among the 13 patients allergic to codfish, only 4 had specific IgE to human APDH. (Table 1). The two patients who had the highest level of specific IgE to human APDH also had a class 5-6 CAP-RAST IgE level to codfish (Table 1). Nevertheless, two other patients with a class 5 CAP-RAST had a negative APDH-Sepharose IgE-RIA. Taken together, these results suggested that no cross-reactivity of APDH occurs with the parvalbumin Gad cI. APDH was present as a soluble protein in the supernatant of ammonium sulphate fractionation of fish from 6 distinct species (Fig. 1). Its relative content was slightly increased in extracts of commercial nonfrozen codfish, compared to *pre rigor* and *post rigor mortis* codfish and to frozen commercial codfish (Fig. 1). It was detected in non-frozen commercial codfish extract but not in *pre rigor* and *post rigor mortis* frozen extracts, using Western blot

Table 1 Serum IgE specific to APDH determined by APDH-Sepharose IgE-RIA

Patient	CAP-RAST for codfish (kU/l)	Class	IgE-RIA with APDH-Sepharose		
			% uptake*	P/C†	Interpretation
1	>100	6	22.9	7.6	+
2	61	5	2.9	1	-
3	54.8	5	20.8	6.9	+
4	53	5	4.5	1.5	-
5	48.7	4	2.8	0.9	-
6	43.5	4	7.2	2.4	+
7	40.8	4	2.6	0.9	-
8	31	4	1.8	0.6	-
9	23.6	4	2.3	0.8	-
10	23.4	4	1.8	2	±
11	22.4	4	2.5	0.8	-
12	19.5	4	3.4	1.1	-
13	16.9	3	6.1	5	+
Controls	<2		≈1.7		

*% uptake corresponds to the 125 I-anti IgE bound to the solid reactive phase incubated with patient sera, as described in the section on Materials and methods. †The IgE-RIA was considered positive when the uptake of the tracer was at least 2-fold higher with patient sera (P) than with control sera (C).

performed with patient sera (15). This suggested that APDH could be an allergenic marker of storage conditions. In fact, APDH is an enzyme located within the cell. It may be therefore hypothesized that it is released from the cytosol after cell death and that this release increases in nonfrozen fish.

The amino acid sequence deduced from the cDNA sequence of the protein was compared to the corresponding enzyme from other animal species. In fact, the protein is well conserved in evolution, because a high level of homology was found with the codfish and the corresponding human enzyme. We investigated therefore the cross-reactivity between both enzymes by IgE-

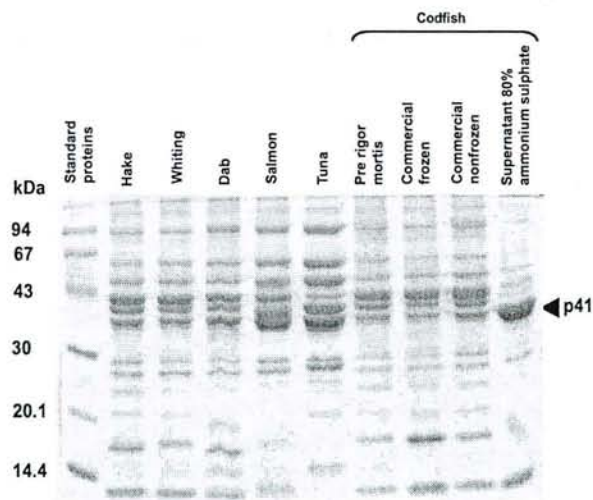


Figure 1. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) of proteins from fish extracts of 5 different fish species, as well as of codfish in various storage conditions: *pre rigor mortis* frozen, commercial frozen and nonfrozen. The last lane (right side) corresponds to an enriched fraction obtained by 80% ammonium sulphate precipitation. The p41 protein was observed in all extracts.

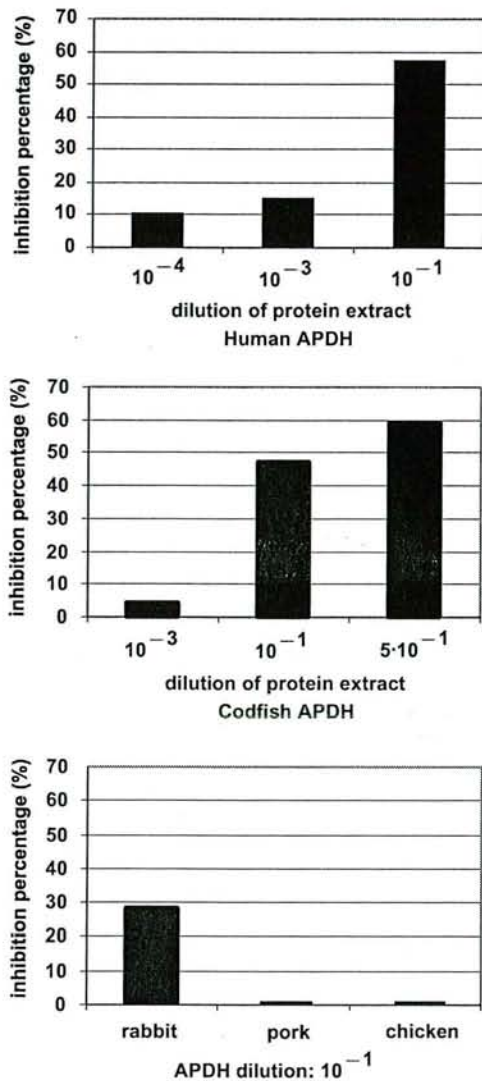


Figure 2. Inhibition tests of APDH-Sepharose IgE-RIA with different APDH extracts. The tests were performed by incubating the serum of patient 1 with APDH from human erythrocytes (top), codfish muscle (middle), rabbit, pork and chicken muscle (bottom). The serum was then subjected to APDH-Sepharose IgE-RIA as described in the methods section. A cross-inhibition was found between human and codfish ADPH. No inhibition was observed with pork and chicken APDH.

RIA inhibition test (Fig. 2). This was performed with the serum having the highest level of specific IgE to APDH. We found 1) a significant uptake of IgE to human APDH-Sepharose, and 2) a dose-related significant inhibition of human APDH-Sepharose RIA by codfish APDH extract. The cross-reactivity was much lower with rabbit APDH, while no inhibition was found with ADPH from pork and chicken (Fig. 2). The cross-reactivity of antifish APDH IgE with the human enzyme should not occur *in vivo*, as the native protein is sequestered in the cell.

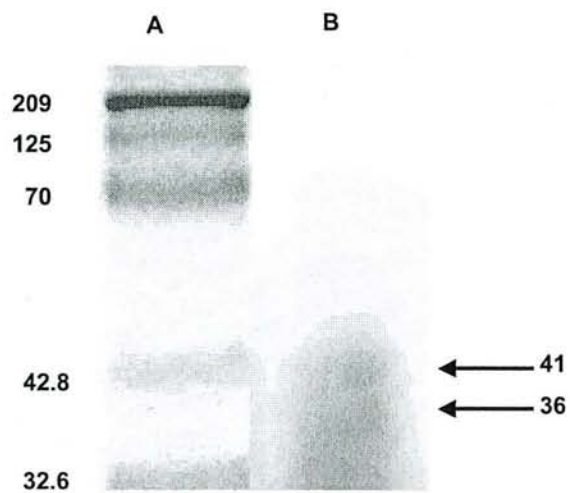


Figure 3. Western-blot of semipurified cod protein extract with IgE from an allergic patient. The proteins were blotted with the serum of patient 1 and radiolabelled with ^{125}I -iodinated anti-IgE (lane B). One main band with a molecular size of 41 kDa and a minor one of 36 kDa were identified by autoradiography. Standard proteins were run in lane A.

However, further studies should be performed to investigate whether a reactivity of IgE with the native enzyme occurs in chronic manifestations of fish allergy such as atopic dermatitis. The protein cross-reacts with an antiparvalbumin monoclonal antibody, in Western blot (15, 19). APDH shows a low homology with the calcium-binding domains of parvalbumins. The cross-reactivity with a monoclonal antiparvalbumin may therefore correspond to “nonspecific” binding. Another explanation could be that the acidic residues D, E and E of the calcium-binding domain DEDKEG-FIEEDE of parvalbumin are specifically recognized by the monoclonal antibody because these residues are separated by 3 distinct residues in both proteins. APDH may be one of the allergens, in addition to parvalbumin, which explains the cross-reactivity of allergen extracts from different fish species in patients allergic to codfish. A Western blot of codfish extract was performed with the serum of the patient who had the highest level of antip41 IgE (Fig. 3). We observed two bands, a main one at 41 kDa and a weaker band at about 36 kDa. This weaker band had been not previously observed by Galland et al. (19). The sequence of the cDNA of the open reading frame corresponded to a 333 amino acid protein with a molecular mass estimated at 36 kDa. The 36 kDa and the 41 kDa bands could correspond therefore to unglycosylated and glycosylated isoforms, respectively.

In conclusion, we have characterized a new allergen from codfish, which is an enzyme having a high level of homology in different animal species. The release of this intracellular enzyme depends on the storage conditions. This may explain our previous finding that IgE binding of p41 in nonfrozen codfish was higher than in the other samples assessed.



References

1. ZEIGER RS. Dietary aspects of food allergy prevention in infants and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;**30**(Suppl.):S77-S86.
2. JANSEN JJ, KARDINAAL AF, HUIJBERS G, et al. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994;**93**:446-456.
3. SAMPSON HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**103**:717-728.
4. GUILLET MH, GUILLET G. Management of atopic dermatitis: practical guidelines suggested by the conclusion of systematic assessment in 500 children. *Allerg Immunol* 2000;**32**:305-308.
5. DAVID TJ. Adverse reactions and intolerance to foods. *Br Med Bull* 2000;**56**:34-50.
6. PASCUAL C, ESTEBAN MM, CRESPO JF. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr* 1992;**121**:S29-S34.
7. SAMPSON HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1989;**84**:1062-1067.
8. KAJOSAARI M. Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. *Acta Paediatr Scand* 1982;**71**:815-819.
9. DE MARTINO M, NOVEMBRE E, GALLI L, et al. Allergy to different fish species in cod-allergic children: In vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol* 1990;**86**:909-914.
10. DE MARTINO M, PERUZZI M, DE LUCA M, et al. Fish allergy in children. *Ann Allergy* 1993;**71**:159-165.
11. HELBLING A, McCANTS ML, MUSMAND JJ, et al. Immunopathogenesis of fish allergy: identification of fish-allergic adults by skin test and radioallergosorbent test. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;**77**:48-54.
12. MONERET-VAUTRIN DA. Food antigens and additives. *J Allergy Clin Immunol* 1986;**78**:1039-1046.
13. AAS K. Studies of hypersensitivity to fish. A clinical study. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1966;**29**:346-363.
14. HEMMENS VJ, BALDO BA, UNDERWOOD PA, et al. Common antigenic and allergenic determinants on codfish proteins detected with mouse monoclonal IgG and human IgE antibodies. *Mol Immunol* 1989;**26**:477-484.
15. DORY D, CHOPIN C, AIMONE-GASTIN I, et al. Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract. *Allergy* 1998;**53**:42-50.
16. BERNHISEL-BROADBENT J, SCANLON SM, SAMPSON HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1992;**89**:730-737.
17. MATA E, FAVIER C, Moneret-Vautrin DA, et al. Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63 kDa protein. *Allergy* 1994;**49**:442-447.
18. HANSEN TK, BINDSLEV-JENSEN C, SKOV PS, POULSEN LK. Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;**78**:187-194.
19. GALLAND AV, DORY D, PONS L, et al. Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein. *J Chromatogr Biomed* 1998;**706**:63-71.
20. OLSZEWSKI A, PONS L, MOUTÉTÉ G, et al. Isolation and characterization of proteic allergens in refined peanut oil. *Clin Exp Allergy* 1998;**28**:850-859.
21. GUÉANT JL, MATA E, MONIN B, et al. Evaluation of a new reactive solid phase for radioimmunoassay of serum specific IgE against muscle relaxant drugs. *Allergy* 1991;**46**:452-458.
22. GUÉANT JL, MASSON C, LAXENAIRE MC. Biological tests for diagnosing the IgE-mediated allergy to anesthetic drugs. *Monogr Allergy* 1992;**30**:94-107.
23. GUÉANT JL, MATA E, NAMOUR F, et al. Criteria of evaluation and of interpretation of Sepharose drug IgE-RIA to anesthetic drugs. *Allergy* 1999;**54**(Suppl. 58):17-22.

Nom : Mlle DAS DORES
Prénom : Sylvie

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

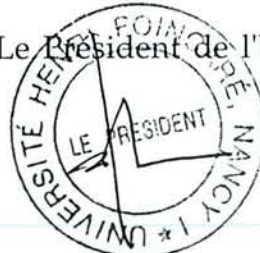
Spécialité : BIOINGÉNIERIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 744

Nancy, le 26 décembre 2001

Le Président de l'Université



C. BURLET

Résumé :

Le nombre de cas d'allergie alimentaire est en augmentation dans les pays occidentaux. Le poisson est l'un des cinq aliments les plus incriminés. Les différentes études menées sur les allergènes de poisson ont permis d'identifier une parvalbumine comme étant l'allergène majeur. Plusieurs auteurs ont pourtant effectué des cartographies répertoriant de nombreuses autres protéines détectées par les IgE des patients sensibilisés au poisson.

L'objectif de ce travail était d'identifier de nouveaux allergènes chez le cabillaud de l'Océan Atlantique, *Gadus morhua*. Deux allergènes ont été identifiés par transcription inverse et PCR, et comparaison avec les banques de données. L'un des allergènes, appelé Gad ml, est une parvalbumine comme tous les allergènes majeurs connus chez les poissons. Elle présente plus d'identité avec l'isoforme 2 de l'allergène majeur de saumon Sal sl qu'avec l'allergène majeur de Cabillaud de la Mer Baltique *Gadus callarias*, et semble se dimériser. Le second allergène, appelé Gad mlI, est une glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, protéine ubiquitaire qui n'avait encore jamais été détectée comme allergène. Gad mlI est un allergène très représenté puisqu'il est détecté par douze patients sur vingt-cinq patients allergiques au cabillaud testés. La détection, par les IgE des patients allergiques, de la protéine Gad mlI exprimée de façon recombinante, dans les cellules COS-1, confirme son allergénicité. Ce travail permet d'envisager des développements en industries agro-alimentaires et diagnostiques, ainsi qu'une étude de vaccinothérapie par ADN.

Mots-clés : Allergènes, cabillaud *Gadus morhua*, GAPDH, parvalbumine.

Discipline : Génie Biologique et Médical

UFR Médecine – Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition
EMI 00-14, URM IFREMER n°20 - Faculté de Médecine de Nancy
9, av. de la Forêt de Haye – BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex

Abstract :

The number of cases of allergy is increasing in Western countries. Fish is one of the five most incriminated food. The various studies undertaken on the fish allergens have permitted to identify a parvalbumin as the major allergen. Many authors however carried out cartographies indexing many other proteins detected by IgE of the patients sensitized by fish.

The purpose of this work was to identify new allergens in the atlantic cod, *Gadus morhua*. Two allergens have been identified by reverse-transcription and PCR, and by comparison with data banks. One of the allergens, called Gad ml, is a parvalbumin like all major allergens known in fish. It presents more identity with isoform 2 of the major allergen Sal sl of salmon than with the major allergen of the baltic cod, *Gadus callarias*, and seems to make dimers. The second allergen, called Gad mlI, is a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, an ubiquitous protein which had never been detected as an allergen. Gad mlI is a very represented allergen since it is detected by twelve patients out of twenty-five tested allergic-to-cod patients. Detection by allergic patients' IgE of recombinant protein Gad mlI, in COS-1 cells, confirms its allergenicity. This work enables to consider developments in food and diagnostic industries, as well as a study of vaccinothérapie by ADN.

Key words : Allergens, codfish *Gadus morhua*, GAPDH, parvalbumin.
