Cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud : étude de la présence d'un épitope de l'allergène Gad c I et étude préliminaire de l'influence de l'état de fraicheur sur l'allergénicité

Daniel Dory

▶ **To cite this version:**

Daniel Dory. Cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud : étude de la présence d'un épitope de l'allergène Gad c I et étude préliminaire de l'influence de l'état de fraicheur sur l'allergénicité. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1998. Français. NNT : 1998NAN11006 . tel-01754431

HAL Id: tel-01754431
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754431

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 POINCARE, NANCY I

FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

N° attribué par la bibliothèque
|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I

Ecole Doctorale *Biologie et Santé*
Spécialité : *Biologie Structurale Moléculaire et Cellulaire*

Présentée et soutenue publiquement

Par

Daniel DORY

Le 19 mai 1998

CARTOGRAPHIE DES BANDES IgE-REACTIVES DU CABILLAUD

ETUDE DE LA PRESENCE D'UN EPITOPE DE L'ALLERGENE Gad c I ET ETUDE PRELIMINAIRE DE L'INFLUENCE DE L'ETAT DE FRAÎCHEUR SUR L'ALLERGENICITE

Recherches effectuées au Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EP CNRS 616 (faculté de médecine de Nancy) sous la direction de Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, et au Laboratoire de Qualité et Physico-Chimie (IFREMER Nantes) sous la direction de Madame le Docteur Christine Chopin et de Monsieur le Docteur Joël Fleurence

JURY

Madame Denise-Anne Moneret-Vautrin, Professeur à l'université Henri-Poincaré (Nancy I), Président
Monsieur A. de Weck, Professeur à l'université de Berne et directeur de l'institut Gerimum de Fribourg (Suisse), Rapporteur
Monsieur Y. Malthiery, Professeur de biochimie et biologie moléculaire à l'université d'Angers, Rapporteur
Madame Christine Chopin, Chargée de recherche à l'IFREMER (Nantes)
Madame Laurence Guérin, Directrice d'ALLERBIO (Varennes-en-Argonne)
Monsieur Joël Fleurence, Chef de Laboratoire IFREMER (Nantes), Directeur de thèse
Monsieur Jean-Louis Guéant, Professeur à l'université Henri-Poincaré (Nancy I), Directeur de thèse

D 007 137958 7

De nombreuses personnes ont contribué à la réalisation de cette thèse. Que tout le monde qui a participé de près ou de loin à ce travail en soit remercié.

Je tiens à vous remercier tout particulièrement, **monsieur Jean-Louis Guéant**. En 1992 j'ai poussé la porte de votre laboratoire pour acquérir une formation pratique en biologie moléculaire. J'ai immédiatement été intégré dans votre équipe de recherche, alors que je n'étais qu'en maîtrise, et j'ai collaboré notamment avec **Isabelle Gastin**. Depuis vous n'avez cessé de m'accorder votre confiance, et cela m'honore beaucoup. J'ai été très touché lorsque vous m'avez confié ce travail de recherche, au début de la collaboration avec l'IFREMER. J'ai pu bénéficier d'un financement et découvrir la recherche à l'IFREMER.

Monsieur Joël Fleurence, vous avez également eu un rôle essentiel dans la réalisation de cette thèse. Vous avez déployé beaucoup d'énergie pour que le projet de collaboration entre l'FREMER et le laboratoire dirigé par monsieur Guéant aboutisse. Ceci m'a permis de bénéficier d'une bourse de thèse. Vous m'avez accueilli avec beaucoup de chaleur dans votre équipe. Je suis fier que vous m'avez également accordé une totale confiance. Je tiens également à vous remercier car vous avez toujours été sensible et compréhensible pour ma situation personnelle particulière.

J'ai été particulièrement heureux de travailler avec toi, **Christine**. Tu m'as également permis de bien m'intégrer dans l'équipe du laboratoire QP. Tu m'as guidé et aidé dans un grand nombre de travaux décrits dans ce manuscrit. Je ne vais pas écrire des tartines, car je sais que tu n'aimes pas ça, mais j'ai juste envi de te dire *merci*. Et je connais toute l'ampleur qu'a ce mot…

Je suis très touché par l'intérêt que vous avez porté à ce travail, **madame Moneret-Vautrin**, et je suis honoré que vous ayez accepté de faire partie des membres du jury de cette thèse.

Madame Laurence Guérin, vous avez synthétisé gracieusement des disques d'allergènes qui nous ont permis de réaliser les dosages et les inhibitions des IgE. Je suis heureux que vous ayez pris en considération notre demande de faire partie du jury de thèse.

Je vous suis reconnaissant, **monsieur de Weck**, d'avoir accepté d'être rapporteur de mon jury de thèse. Je sais que votre emploi du temps est très chargé, et je suis très honoré que vous ayez trouvé un créneau pour pouvoir assister à la soutenance. Je vous remercie vivement pour la qualité de l'accueil que vous m'avez réservé au cours de mon séjour à Fribourg.

Je vous remercie, **monsieur Malthiery**, d'avoir accepté notre proposition d'être rapporteur de mon jury de thèse.

Anne-Valérie, j'ai été très heureux de travailler avec toi sur la même thématique de recherche.

Je vous remercie, **Céline et Laurent**, de m'avoir apporté votre aide dans la réalisation de certaines manipulations.

Je tiens à remercier toutes les autres personnes du laboratoire de biochimie et de département VP qui m'ont soutenu et aidé au cours de la thèse.

Je veux remercier **Nathalie Monhoven** (service commun de biologie moléculaire du CHU de Nancy) qui a synthétisé les amorces et qui m'a permis de lire la séquence de la bande de 460 pb.

Je remercie également **monsieur Alain Faivre** de l'INSERM de Nantes qui m'a aidé lors de la révélation des immunoempreintes à l'aide du phosphorimager.

J'ai également une petite pensée pour **André Daniel** (IFREMER) qui m'a fait découvrir l'océan atlantique et l'île de Noirmoutiers.

Isabelle, depuis que je suis au laboratoire j'ai toujours travaillé avec toi. Maintenant tu es devenue une amie que j'apprécie énormément.

Philippe, tu as été l'un des premiers à m'accueillir au laboratoire. Je tiens à te remercier personnellement car tu as toujours été à l'écoute de mes difficultés, et tu m'as toujours aidé efficacement.

A Graziella

Ces deux années d'éloignement et de sacrifices arrivent à leur fin

La patience est amère, mais son fruit est doux

A mes parents et à ma famille

A mamie qui doit m'observer du ciel

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES 2

ABREVIATIONS 4

PUBLICATIONS 6

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 7

A. ALLERGIE ALIMENTAIRE ET ALLERGIE AU POISSON 7
B. LES ALLERGÈNES DE POISSONS 9
1. Purification et caractérisation de l'allergène majeur Gad c I du cabillaud *9*
2. Caractérisation d'autres bandes allergéniques de cabillaud *12*
3. Purification de l'allergène majeur Sal s I de saumon *14*
C. PARVALBUMINES 15
D. INFLUENCE DES PROCÉDÉS TECHNOLOGIQUES SUR L'ALLERGÉNICITÉ DU POISSON 20
E. DÉGRADATION *POSTMORTEM* DU POISSON (HUSS, 1995) 21

II. BUTS ET DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE 23

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES 24

1. Sérums de patients allergiques au cabillaud *24*
2. Préparation des extraits protéiques de cabillaud *24*
3. Détermination de la concentration protéique *25*
4. Dosage des IgE spécifiques au cabillaud dans des séra de patients allergiques *26*
5. Electrophorèse PAGE-SDS *27*
6. Coloration du gel au nitrate d'argent *27*
7. Immunoempreintes *28*
7.1 Détection des protéines fixées avec des séra de patients allergiques 28
7.2 Détection des bandes protéiques fixées avec un anticorps monoclonal dirigé contre les parvalbumines (Sigma, St. Louis, USA) 30
8. Chromatographie échangeuse d'anions (DEAE) *30*
9. Dot-blotting *31*
10. Electrophorèse à élution continue *31*
11. Extraction de l'ARN total de cabillaud *32*
12. Obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) de cabillaud *33*
13. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) *34*
14. Electrophorèse des produits PCR *36*
15. Purifications des produits PCR *36*
16. Estimation de la quantité de fragments d'ADN par électrophorèse *36*
17. Clonage d'un produit PCR dans un vecteur pGEM®-T *37*
17.1 Description du vecteur 37
17.2 Clonage d'un produit PCR dans le plasmide pGEM®-T 38
18. Réaction de séquençage des produits clonés *39*

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION 41

A. IDENTIFICATION DE BANDES IGE-RÉACTIVES 41
1. Mise en place des outils *41*
2. Séparation des protéines de cabillaud *pre rigor mortis* par chromatographie échangeuse d'anions (DEAE) *43*
3. Influence du calcium sur la distribution relative des bandes IgE-réactives de l'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis* *53*
B. PURIFICATION DE LA BANDE PROTÉIQUE IGE-RÉACTIVE DE 104 KDA : ÉTUDE DE DEUX VOIES DE PURIFICATION 54
C. CLONAGE D'UN ADNC DE CABILLAUD POSSÉDANT LE PREMIER SITE DE FIXATION DU CALCIUM DE GAD C I 56
1. Synthèse par RT-PCR d'un ADN complémentaire à l'aide d'une amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I *56*
2. Clonage de l'ADNc de 460 pb dans un vecteur pGEM-T® (Promega, Madison, USA) *58*

D. INFLUENCE DE LA FRAÎCHEUR SUR L'ALLERGÉNICITÉ DU CABILLAUD : ÉTUDE PRÉLIMINAIRE 61
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 64
BIBLIOGRAPHIE 66
LISTE DES FIGURES 77
LISTE DES TABLEAUX 81
ANNEXES 82
ABRÉVIATIONS UTILISÉES POUR DÉSIGNER LES ACIDES AMINÉS 82
PUBLICATIONS 82

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

ABREVIATIONS

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

A : Adénine

ADN : Acide déoxyribonucléique

ADNc : Acide déoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adénosine diphosphate

Ala : Alanine

AMP : Adénosine monophosphate

AMV : Avian myeloblastosis virus

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

Asp : Aspartate

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : Adénosine triphosphatase

BCIP/NBT : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium

BSA : Bovine serum albumin

CAP-RAST : CAP-radio allergo sorbent test

cpm : coups par minute

Da : Dalton

DEAE : Diethylaminoethyl

DEPC : Diethyl pyrocarbonate

dNTP : Déoxynucléosides triphosphate

DO : Densité optique

DTT : Dithiothréitol

EGTA : Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

G : Guanine

Glu : Glutamate

HPLC : High performance liquid chromatography

IgE : Immunoglobuline de type E

IgG : Immunoglobuline de type G

Ile : Isoleucine

IMP : Inosine monophospate

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

IPTG : Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

kb : kilobase

kDa : kilo dalton

kUI/l : kilo unité internationale / litre

LB : Luria-Bertaini

Leu : Leucine

Lys : Lysine

mA : milliampère

NaCl : Sodium chloride

Oligo-dT : Oligothymidylic acid

PAGE-SDS : Polyacrylamide gel electrophoresis – sodium dodecyl sulfate

pb : paire de bases

PCR : Polymerization chain reaction

Phe : Phénylalanine

Poly-A : Polyadenylic acid

Poly dT : Poly deoxy thymidylic acid

RACE : Rapid amplification of cDNA ends

RIA : Radioimmunoassay

RNAse : Ribonucléase

rpm : round per minute

RT-PCR : Reverse transcription – polymerization chain reaction

SDS : Sodium dodecyl sulfate

T : Thymine

Tm : Melting temperature

TMAO : Oxyde de triméthylamine

v/v : volume / volume

w/v : weight / volume

X-Gal : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

PUBLICATIONS

D. Dory, C. Chopin, I. Aimone-Gastin, J.L. Guéant, L. Guérin, J. Sainte-Laudy, D.A. Moneret-Vautrin, J. Fleurence

Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in a cod extract

Allergy, 1988, 53, 42-50

A.V. Galland, D. Dory, L. Pons, C. Chopin, H. Rabesona, J.L. Guéant, J. Fleurence

Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein

J. Chrom. B, 1998, 706, 63-71

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

I. Etude bibliographique

L'ingestion d'aliments peut entraîner le développement de plusieurs types de réactions adverses. Il est important de différencier l'allergie alimentaire de l'intolérance alimentaire (Brostoff, 1991). L'allergie alimentaire est une réaction anormale du système immunitaire à l'encontre d'un allergène. Dans le cas de l'intolérance alimentaire, le système immunitaire n'est pas mis en cause. La contamination des aliments par des micro-organismes produisant des toxines (dans les viandes), la teneur en substances naturelles comme l'histamine qui peut atteindre des niveaux importants dans les fromages, les vins et certaines espèces de poisson (Taylor *et al*, 1989), la déficience en enzyme telle que la lactase, la présence de certains additifs alimentaires (glutamate monosodique et sulfites, ...) sont autant de facteurs responsables de réactions d'intolérances alimentaires.

A. Allergie alimentaire et allergie au poisson

L'allergie alimentaire touche entre 1,5 et 3 % de l'ensemble de la population (Moneret-Vautrin, 1986 ; Niestijl *et al*, 1994; Young *et al*, 1994). Les enfants sont particulièrement atteints par cette maladie (Moneret-Vautrin, 1986 ; Bock, 1987). Un nombre limité d'aliments est responsable de la majorité des allergies alimentaires : arachide, noisette, soja, noix, lait de vache, œufs, poissons, crustacés, mollusques, blé (Nordlee *et* Taylor, 1995). Les aliments incriminés dépendent de l'âge du patient et du type d'alimentation du pays.

Le poisson est un aliment fréquemment impliqué dans le déclenchement des allergies (Moneret-Vautrin, 1986 ; Sampson, 1989; Nordlee *et* Taylor, 1995; James *et* Burks, 1994; Carter, 1995). En particulier, le poisson est un aliment très consommé dans les pays du nord

de l'Europe ; il provoque de nombreuses allergies chez les enfants suédois (Dannaeus *et* Inganas, 1981).

De nombreuses espèces de poissons sont incriminées (Aas, 1966a). Dix pour cent des enfants souffrant d'asthme et d'urticaire chroniques suivis par Aas dans les années 60 étaient allergiques à au moins une espèce de poisson. Le cabillaud provoquait une allergie pour 88 % des enfants suivis, et la truite pour 28 % des enfants. Treize enfants sur vingt cinq enfants allergiques au cabillaud ont eu des tests cutanés positifs pour huit espèces de poissons (cabillaud, saumon, aiglefin, flétan, hareng, anchois, maquereau, brochet) (Aas, 1966c).

Les réactions croisées entre différentes espèces de poissons ont été également mises en évidence *in vitro* (Martino (de) *et al,* 1990; Martino (de) *et al,* 1993). Par exemple, l'anchois inhibait fortement le dosage des IgE spécifiques dirigées contre le cabillaud. Par contre le thon n'inhibait que très faiblement ce dosage. Des allergènes communs entre différents extraits protéiques de poissons, ainsi que des allergènes spécifiques aux espèces ont été mis en évidence par immunoempreintes (Bernhisel-Broadbent *et al*, 1992a; Hansen T.K. *et al*, 1997 ; James *et al*, 1997).

Les manifestations allergiques au poisson sont essentiellement dermatologiques et respiratoires (Martino (de) *et al*, 1993). L'urticaire, l'asthme et les angio-oedèmes sont les symptômes les plus fréquemment rencontrés. L'allergie IgE-médiée du poisson a lieu dans les minutes qui suivent l'ingestion de l'aliment (Helbling *et al*, 1996). Le système immunitaire reconnaît l'allergène alimentaire comme n'appartenant pas à l'organisme et déclenche une réaction immunologique de défense. Dans un tel mécanisme les allergènes stimulent la synthèse d'anticorps, les immunoglobulines de type E (IgE), par les lymphocytes B au cours d'une première exposition (Nordlee *et* Taylor, 1995). Cette étape correspond à la sensibilisation. Les IgE vont se fixer sur les basophiles et les mastocytes. Au cours d'une exposition ultérieure les allergènes vont se fixer sur les IgE ; le pontage créé entre deux IgE

voisines va entraîner une libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine, les prostaglandines et les leucotriènes. Ces médiateurs vont interagir avec des récepteurs tissulaires et déclencher les symptômes de l'allergie.

B. Les allergènes de poissons

Peu d'allergènes de poissons ont été décrits dans la littérature. L'allergène majeur Gad c I du cabillaud a été purifié et parfaitement caractérisé. Par ailleurs l'allergène majeur Sal s I du saumon a également été purifié.

1. Purification et caractérisation de l'allergène majeur Gad c I du cabillaud

Quatre vingt huit pour cent des enfants allergiques au poisson suivis par Aas étaient allergiques au cabillaud (*Gadus morhua*) (Aas, 1966a; Aas, 1966d). C'est donc cette espèce de poisson qui a servi, et qui sert toujours, de référence pour la caractérisation des protéines responsables de l'allergie au poisson.

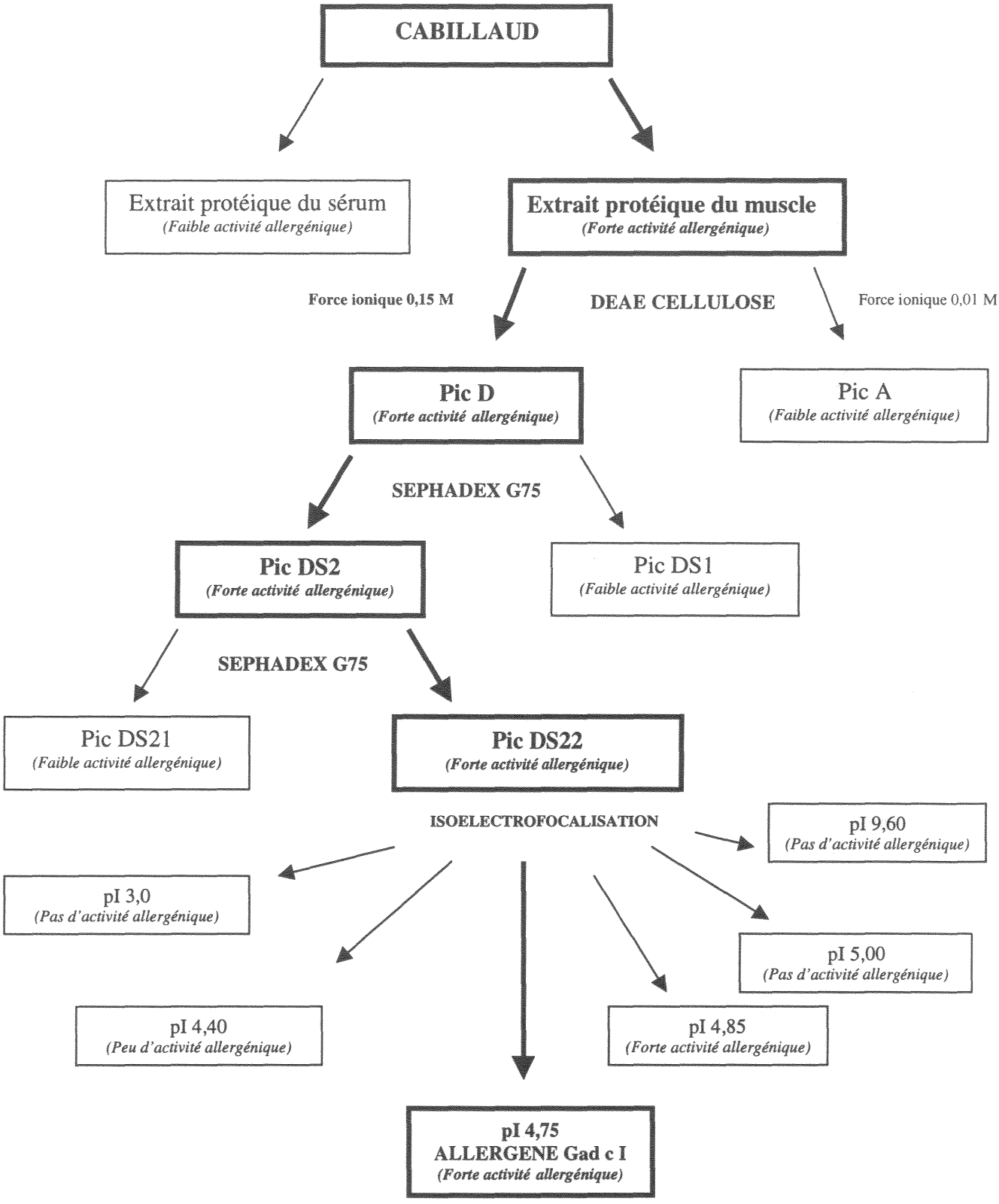
Le filet de cabillaud a été broyé dans 0,9 % NaCl, 0,5 % phénol, pH 5,6 (Aas, 1966b). Les protéines solubles ont été récupérées après centrifugation du broyât. Quatre vingt dix sept pour cent des enfants allergiques au cabillaud ont eu un test cutané positif avec cet extrait. De même les protéines du sérum de cabillaud ont été extraites ; il n'y avait qu'un seul test cutané sur dix qui était positif avec ces protéines. Donc l'extrait protéique musculaire était le plus allergénique ; la purification de l'allergène majeur de cabillaud a été réalisée à partir de cet extrait. Deux pics ont été obtenus après séparation des protéines par chromatographie échangeuse d'anions en utilisant le support DEAE-Cellulose : pic A et pic D (Aas, 1967). Le pic D provoquait un test cutané positif chez vingt enfants allergiques au cabillaud, tandis que

le pic A ne provoquait aucun test positif. La réactivité du pic D a été également étudiée par des tests de provocation orale.

Les deux pics ont été analysés par électrophorèse sur disque (Aas, 1967). Le pic A était composé de quatre bandes protéiques et le pic D était composé de six bandes protéiques. Les masses moléculaires des différentes bandes n'étaient pas indiquées ; les bandes étaient différenciées par leur distance de migration. Les bandes P3 et P4 du pic D, qui migraient le plus loin, provoquaient les réactions cutanées les plus fortes pour dix patients allergiques au cabillaud. De plus elles contenaient au moins un site allergénique commun puisqu'elles se neutralisaient mutuellement dans les tests cutanés.

Deux pics, DS1 et DS2, ont été obtenus par séparation du pic D par filtration sur gel à l'aide de la matrice Sephadex G75 (Aas *et* Jebsen, 1967). Le pic DS1 était composée de sept bandes protéiques, dont la bande P3. Le pic DS2 était composé de trois bandes : P2, P3 et P4. Le pic DS2, qui provoquait les réactions cutanées les plus fortes, a été fractionné dans les mêmes conditions sur gel Sephadex G75 en deux pics allergiquement actifs : DS21 et DS22. Le même type de séparation a été obtenu pour DS22 ; donc DS21 était un produit de dégradation de DS22. DS22 cristallisée provoquait des réactions cutanées de cent à dix mille fois plus fortes que l'extrait protéique brut du muscle de cabillaud (Aas *et* Jebsen, 1967). Cinquante six patients allergiques au cabillaud présentaient un fort taux d'IgE spécifiques dirigés contre DS22 (Aas *et* Lundkvist, 1973).

DS22 a été fractionnée par isoélectrofocalisation (Elsayed *et* Aas, 1971a). Une fraction majeure de point isoélectrique 4,75 et cinq fractions mineures de points isoélectriques compris entre 3,0 et 9,60 ont été obtenues. La fraction majeure de point isoélectrique 4,75 provoquait les réactions cutanées les plus intenses. Cette protéine correspond à l'allergène majeur du cabillaud Gad c I. La purification de Gad c I est présenté sur la figure 1.



<u>Figure 1</u> : Purification de l'allergène Gad c I de cabillaud. Ce schéma reprend l'ensemble des travaux de Aas et de son équipe entre 1966 et 1973.

Une stratégie de séquençage de Gad c I a été élaborée à partir de sa composition en acides aminés (Elsayed *et al*, 1972). En effet il n'y avait qu'un seul résidu arginine ; l'hydrolyse tryptique au niveau de ce résidu de Gad c I bloqué par l'acide trifluoroacétique (les NH_2 des lysines sont bloqués) a permis de scinder cet allergène en deux fragments : TM1 et TM2. Ces deux fragments étaient moins allergéniques que l'allergène Gad c I (Elsayed *et al*, 1974). Les séquences de TM1 et de TM2 ont été déterminées par la dégradation d'Edman, ce qui a permis d'obtenir la séquence de l'allergène Gad c I (figure 2) (Elsayed *et al*, 1973; Elsayed *et al*, 1974; Elsayed *et* Bennich, 1975).

Gad c I est une protéine de 113 acides aminés de masse moléculaire 12328 Da. La plupart des résidus sont neutres. Quatorze résidus lysine confèrent la charge positive de cette protéine. Quinze résidus aspartate et onze résidus glutamate confèrent la nature acide. Des résidus hydrophobes composent également cette molécule. Elle contient une molécule de glucose (Elsayed *et al*, 1971). Cet allergène présente une forte similitude de séquence avec des protéines fixant le calcium d'autres espèces de poisson : les parvalbumines (Kretsinger *et* Nockolds, 1973). Par analogie l'allergène Gad c I est constitué de trois domaines structuraux : AB, CD et EF. Les domaines CD et EF sont des sites de fixation du calcium (figure 3). Les caractéristiques et propriétés des parvalbumines seront présentées plus loin dans cet exposé.

La séquence primaire de Gad c I étant connue, la détermination des séquences allergéniques de cette molécule a été entreprise. L'allergène Gad c I réduit par l'urée 8 M gardait sa réactivité dans les tests cutanés (Elsayed *et* Aas, 1971b). Donc l'activité allergénique de Gad c I était due à un ou plusieurs épitopes séquentiels. L'activité allergénique était maintenue en l'absence du résidu alanine situé à l'extrémité C-terminale et de la glycine située à l'extrémité N-terminale de Gad c I (Elsayed *et* Aas, 1970).

1 10 20 30 40 47

COOHAFKGILSNADIKAAEAACFKEGSFDEDGFYAKVGLDAFSADELKKLF

50 60 70 80 90 97

KIADEDKEGFIEEDELKLFLIAFAADLRALTDAETKAFLKAGDSDGDGKI

100 110 113

GVDEFGALVDKWGAKGNH_2

Figure 2 : Séquence primaire de l'allergène Gad c I (d'après Elsayed *et al*, 1975)

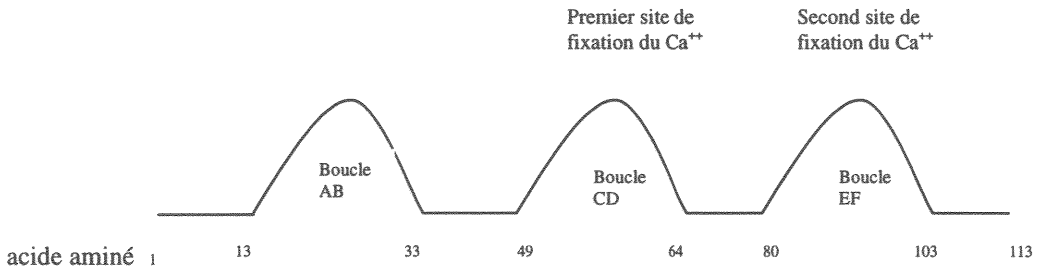


Figure 3 : Représentation schématique de l'allergène Gad c I (d'après Elsayed *et* Apold, 1983)

L'allergène Gad c I hydrolysé de manière limitée a permis d'obtenir des fragments capables d'inhiber le dosage des IgE spécifiques dirigées contre l'allergène Gad c I (Apold *et al*, 1979; Elsayed *et al*, 1976; Elsayed *et* Apold, 1977). D'autre part certains fragments de l'allergène Gad c I obtenus par synthèse peptidique ont présenté également une activité inhibitrice du dosage des IgE (Elsayed *et al*, 1981; Elsayed *et al*, 1980; Elsayed *et al*, 1982; Elsayed *et* Apold, 1983). D'après l'ensemble de ces résultats les séquences 13-32, 33-44, 49-64, 65-74 et 88-96 correspondent à des sites reconnus par les IgE de patients allergiques au cabillaud. Les séquences 49-64 et 88-96 contiennent respectivement le premier et le second site de fixation du calcium.

2. Caractérisation d'autres bandes allergéniques de cabillaud

L'allergène Gad c I n'est pas le seul allergène de cabillaud. Quelques études ont mis en évidence d'autres bandes IgE-réactives dans le cabillaud et dans d'autres espèces de poissons.

L'allergénicité du surimi de cabillaud, un produit de transformation du cabillaud où la majorité des protéines sarcoplasmiques ont été éliminées, a été comparée à celle du cabillaud non transformé (Mata *et al*, 1994). Le surimi apparaissait comme étant moins allergénique que le cabillaud. L'extrait protéique du surimi ainsi que celui du cabillaud ont été séparés par filtration sur gel en deux pics, I et II, qui inhibaient le dosage des IgE spécifiques dirigées contre le cabillaud. Le pic I obtenu avec l'extrait protéique de cabillaud était composé des bandes de 13, 25, 37 et 63 kDa, tandis que le même pic obtenu avec l'extrait de surimi n'était composé que de la bande de 63 kDa. Cette bande de 63 kDa était donc allergénique.

L'allergène majeur du cabillaud Gad c I a été purifié à partir du pic protéique D obtenu par séparation de l'extrait brut de cabillaud par chromatographie DEAE. Les protéines

formant ce pic ont été analysées par électrophorèse PAGE-SDS (Hemmens *et al*, 1989). Le pic semi-purifié D de Gad c I était composé de quinze bandes ; les masses moléculaires variaient entre 12 et 92 kDa. Ces protéines ont été analysées par immunoempreintes à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre Gad c I et des séra de patients allergiques au cabillaud. L'anticorps monoclonal 17/20 reconnaissait quatorze des quinze bandes protéiques du pic D, et l'anticorps 21/4 en reconnaissait douze (tableau I). Les sites reconnus sur Gad c I par ces anticorps n'étaient pas connus. Six bandes protéiques de masses moléculaires apparentes de 12, 21, 24, 33, 47 et 61 kDa ont été détectées par les IgE de patients allergiques au cabillaud par immunoempreintes (tableau I). Les IgE de deux séra qui étaient adsorbées sur la bande de 12 kDa ont été éluées et utilisées dans d'autres expériences d'immunoempreintes. Dans un cas les IgE dirigées contre Gad c I ne reconnaissaient que Gad c I. Par contre dans l'autre cas les IgE dirigées contre Gad c I reconnaissaient en plus les bandes protéiques de masses moléculaires apparentes de 17, 21, 24 et 47 kDa. Ainsi il existait au moins un site antigènique commun entre Gad c I et ces autres bandes protéiques du pic D.

D'autres immunoempreintes ont été réalisées avec des extraits bruts de protéines solubles de différentes espèces de poissons avec un sérum de patient allergique au saumon : poisson-chat, bar, perche, maquereau, thon, saumon, truite, cabillaud et carrelet (Bernhisel-Broadbent *et al*, 1992a). Les extraits protéiques de poissons ont été préparés avant et après la cuisson des poissons. Sept bandes protéiques de masses moléculaires apparentes de 12, 35, 38, 44, 60, 66 et 78 kDa ont été détectées dans l'extrait de cabillaud cru. Seules les bandes de masses moléculaires apparentes de 12, 66 et 78 kDa ont encore été détectées lorsque le cabillaud a été préalablement cuit. Tous les extraits de poisson étudiés, sauf celui du thon, présentaient une bande de 12 kDa reconnue par les IgE.

Enfin une étude publiée en 1997 a fait état de huit bandes IgE-réactives détectées dans le cabillaud (Hansen *et al*, 1997). Pour cela huit immunoempreintes ont été réalisées avec huit

Tableau I : Bandes protéiques du pic semi-purifié D de Gad c I séparées par électrophorèse PAGE-SDS. Analyse du pic D par immunoempreintes avec des anticorps monoclonaux dirigés contre Gad c I ou avec des séra de patients allergiques au cabillaud (d'après Hemmens *et al*, 1989).

Masse moléculaire apparente (kDa)	Anticorps monoclonaux dirigés contre Gad c I		Séra de patients allergiques au cabillaud		
	17/20	21/4	Merr	At (47)	Mo
92	+	+			
71	+	+			
61	++	++	+	+	+
57	+				
52	+				
47	+	+	+	+	+
46					
43	+	+			
41	+	+			
35	+	+			
33	++	++	+	+	+
24	++	++	++	++	++
21	++	++	++	++	++
17	+	+			
12	++++	++++	++++	++++	++++

sérums de patients allergiques au cabillaud, en utilisant un seul sérum par analyse. Les masses moléculaires apparentes des bandes étaient de 12, 17, 21, 28, 42, 50, 85 et 101 kDa. Un seul profil présentait les huit bandes. Les sept autres profils étaient constitués de certaines de ces bandes.

Ainsi les profils des bandes IgE-réactives obtenus par ces différentes équipes n'étaient pas semblables. Certaines bandes semblaient communes à plusieurs études, et d'autres bandes n'étaient rencontrées que dans telle ou telle étude. Chaque étude n'a mis en évidence qu'une partie des bandes protéiques du cabillaud reconnues par les IgE. Ceci est dû au fait que les IgE des sérums utilisés dans les différentes études pouvaient reconnaître les mêmes épitopes, mais reconnaissaient aussi des épitopes spécifiques à chaque sérum.

3. Purification de l'allergène majeur Sal s I de saumon

Un autre allergène majeur de poisson a été purifié : l'allergène Sal s I de saumon (Lindstrøm *et al*, 1996). Tout comme Gad c I, il s'agit d'une parvalbumine. La purification de cet allergène comportait les étapes suivantes : chromatographie DEAE, filtration sur gel (séphadex G75) et chromatographie HPLC en phase inverse. La séquence N-terminale de Sal s 1 a permis de synthétiser une amorce antisens pour les réactions de RT-PCR. Des amorces sens ont été synthétisées à partir des séquences communes entre différentes parvalbumines, et qui correspondaient au premier site de fixation du calcium. Des fragments d'amplification de tailles attendues ont été obtenus et ont servi de sonde pour identifier deux clones codant pour Sal s I dans une banque d'expression λgt10 de saumon. Le clone λ24.1 avait 58 % d'homologie de séquence avec l'allergène Gad c I de cabillaud.

C. Parvalbumines

L'allergène majeur de cabillaud Gad c I appartient à la famille des parvalbumines (Elsayed *et al*, 1974), qui sont des protéines de petites tailles solubles dans l'eau : *parv* est le préfixe grec qui signifie *petit* et *albumine* fait référence à la solubilité dans l'eau. Malgré leur nom les parvalbumines n'ont aucun rapport avec les albumines.

Les parvalbumines sont rencontrées chez les poissons, les vertébrés inférieurs et les mammifères et sont des protéines très conservées (Tinner *et al*, 1990). Ces protéines lient les ions divalents tels que le calcium et le magnésium. Elles sont présentes en grande quantité dans les muscles à contraction rapide des poissons et des vertébrés inférieurs. Elles sont moins nombreuses dans les muscles des vertébrés supérieurs (Blum *et al*, 1977). Elles sont également rencontrées dans certains tissus non musculaires (Celio *et al*, 1988; Berchtold *et al*, 1982).

Il existe deux types de parvalbumines, à savoir des parvalbumines α et β. Elles différent par une dizaine de résidus, ainsi que par leurs points isoélectriques ; si le point isoélectrique est inférieur à cinq il s'agit d'une parvalbumine de type β, et si le point isoélectrique est supérieur à cinq il s'agit d'une parvalbumine de type α. Chez les poissons et les amphibiens plusieurs parvalbumines des deux types ont été rencontrées dans un même tissu (Conlon *et al*, 1992; Maximov *et* Mitin, 1979; Pechère *et al*, 1971; Gerday *et al*, 1979; Lindstrøm *et al*, 1996; Blum *et al*, 1977; Cox *et al*, 1979; Coffee *et* Bradshaw, 1973; Pechère *et* Focant, 1965). Par exemple les parvalbumines de la carpe sont au nombre de trois. Cela a été montré aussi chez le colin, la perche, la roussette, ... Par contre chez les mammifères les parvalbumines ont été sélectivement retrouvées dans les tissus sans coexpression.

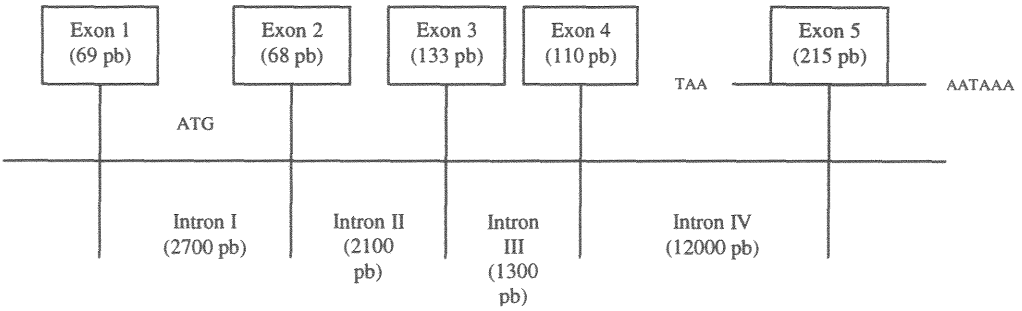
Les parvalbumines ont été étudiées comme marqueur moléculaire au cours de l'évolution. Une parvalbumine de la raie bouclée, qui est considérée comme un poisson primitif, possède des séquences caractéristiques communes aux parvalbumines α et β

(Thatcher *et* Pechère, 1977). Ainsi toutes les parvalbumines auraient pour origine une même protéine ; la scission entre α et β aurait eu lieu il y a quatre cent millions d'années. Par ailleurs les parvalbumines ont été étudiées chez un autre poisson primitif, le coelacanthe. Ce poisson, pêché à quelques exemplaires depuis 1938, présente la particularité d'avoir des ébauches de membres de tétrapodes au niveau des nageoires ; ce poisson serait ainsi à l'origine des mammifères. Ce poisson a peu évolué et est semblable à ses lointains ancêtres du dévonien (quatre cent millions d'années). En tout cinq parvalbumines, réparties en deux groupes d'après leur composition en acides aminés, ont été identifiées chez ce poisson (Jauregui-Adell *et* Pechère, 1978a). Les parvalbumines de points isoélectriques 5,44 et 4,95 appartiennent au groupe α (Pechère *et al*, 1978). Elles ont de fortes homologies de séquence avec les parvalbumines α du brochet et du lapin, ce qui prouve l'origine commune entre les parvalbumines de mammifères et de poisson. La parvalbumine majeur du coelacanthe de point isoélectrique 4,52 est de type β (Jauregui-Adell *et* Pechère, 1978b). Le fait de rencontrer les paravalbumines des types α et β chez ce poisson est en accord avec la position de ce poisson dans la phylogénèse, à savoir à la jonction entre des poissons plus primitifs présentant des parvalbumines ayant à la fois les caractéristiques α et β et les mammifères et les poissons.

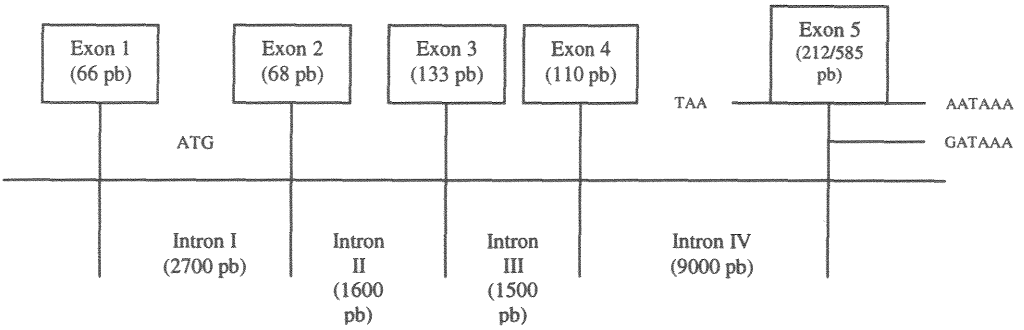
La structure du gène de la parvalbumine a été déterminée chez l'homme, le rat et la souris (Pauls *et al*, 1996) (figure 4). Ce gène est constitué de quatre introns et de cinq exons. Trois exons correspondant à la majorité de la partie codante de la protéine ont exactement la même taille chez les trois espèces étudiées. Ainsi il existerait un gène commun à l'origine des différentes parvalbumines.

De nombreuses séquences de parvalbumines ont été déterminées, que ce soit chez les poissons ou chez les vertébrés inférieurs et supérieurs. Les séquences des parvalbumines entre les différentes espèces sont très conservées (Thatcher *et* Pechère, 1977), et notamment au niveau des sites de fixation du calcium (Lindstrøm *et al*, 1996).

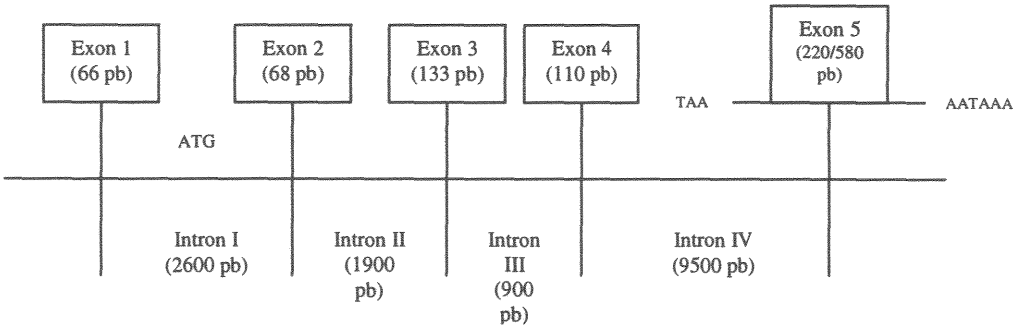
Homme (Chromosome 22q12 :q13 :1)



Rat



Souris (Chromosome 15 E)



<u>Figure 4</u> : Comparaison de la structure des gènes de parvalbumines de l'homme, du rat et de la souris (d'après Pauls *et al*, 1996).

Ce gène est constitué de quatre introns et de cinq exons. Trois exons (2, 3 et 4) qui correspondent à la majorité de la partie codante ont exactement la même taille chez les trois espèces étudiées.

Des séquences consensus de parvalbumines ont été obtenues par alignement de vingt sept séquences de parvalbumines provenant de différentes espèces de poissons, de vertébrés inférieurs et de mammifères. Ceci a permis de synthétiser une sonde utilisée pour cloner l'ADN complémentaire de la parvalbumine de saumon (Lindstrøm *et al*, 1996). Par ailleurs, des anticorps dirigés contre la paravalbumine B de carpe reconnaissaient les parvalbumines d'autres espèces de poisson, de poulet, de rat, de souris, de singe et de l'homme (Celio *et al*, 1988; Tinner et al, 1990).

Les parvalbumines ont des propriétés physico-chimiques conservées (Berchtold *et al*, 1982; Coffee *et* Bradshaw, 1973; Malencik *et al*, 1975; Capony *et al*, 1973; Thatcher *et* Pechère, 1977; Gerday *et al*, 1979; Heizmann, 1984; Blum *et al*, 1977). Leurs tailles varient entre 11000 et 13000 Da. Ces protéines comportent de vingt cinq à trente résidus acides, ce qui leur confère un point isoélectrique inférieur à 6. Deux isoparvalbumines de protoptère ont des points isoélectriques de 6,0 et 6,5, mais ceci est une exception (Gerday *et al*, 1979). Les paravalbumines comportent de huit à dix phénylalanines, les autres résidus aromatiques n'étant présents qu'à un ou deux exemplaires par molécule. Dans la plupart des cas l'unique arginine se situe à la position 75, et le motif lysine-lysine se trouve en position 44-45. Ces protéines sont très résistantes à la chaleur (Haiech *et al*, 1979b) et aux enzymes protéolytiques. L'acide aminé N-terminal est bloqué (Pechère *et al*, 1971; Gerday *et al*, 1979). Les études de dichroïsme circulaire ont révélé que plus de 40 % d'hélices α constituaient la protéine lorsque les deux sites de fixation ont été saturés par du calcium ou du magnésium (Donato *et* Martin, 1974; Cox *et al*, 1979).

La structure tridimensionnelle de la parvalbumine B de carpe a été déterminée par diffraction aux rayons X (Kretsinger *et* Nockolds, 1973) (figure 5). Six hélices α (A à F) constituent cette protéine. Cette protiéne comporte trois domaines structuraux AB, CD et EF. Les domaines CD et EF fixent le calcium et le magnésium.

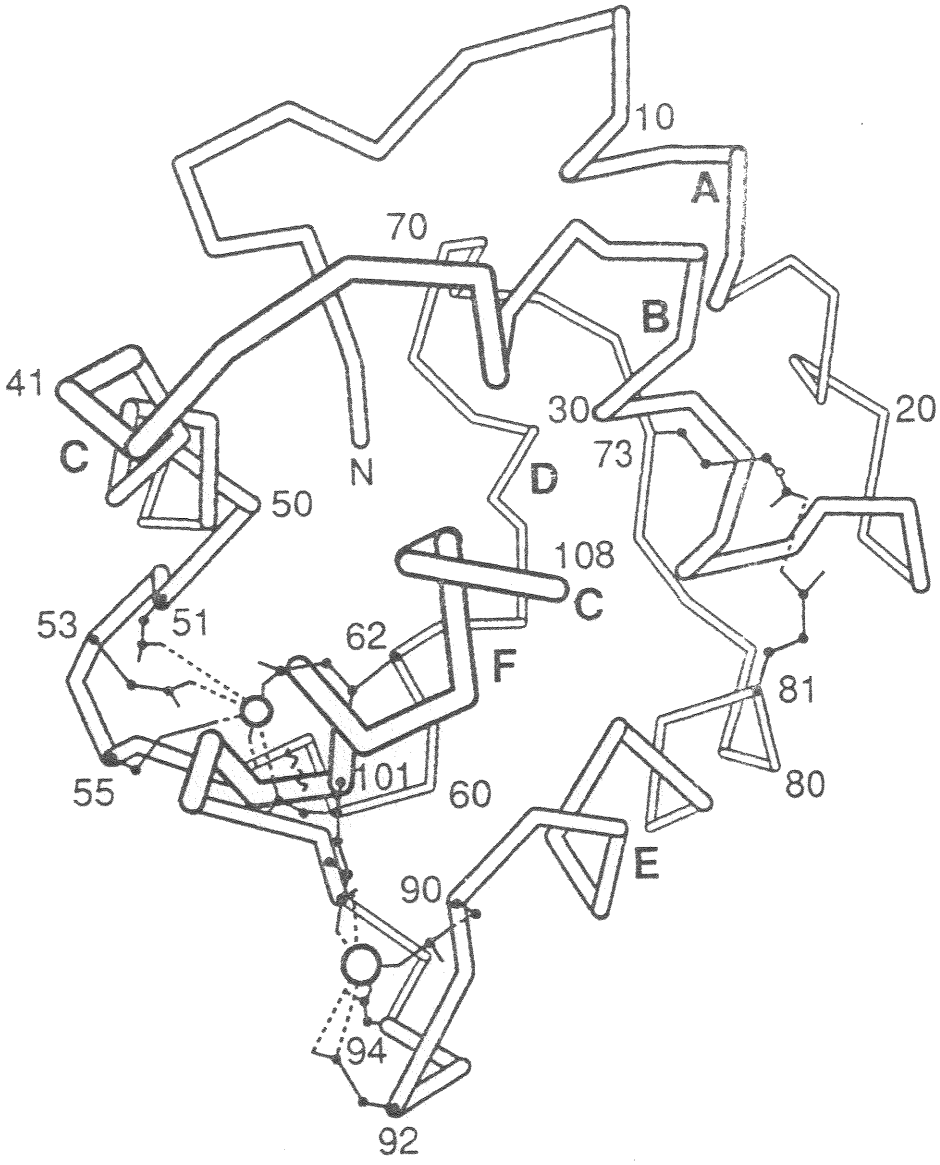


Figure 5 : structure tridimenssionnelle de la parvalbumine B de carpe. Détermination par diffraction aux rayons X (Kretsinger *et* Nockolds, 1973)

La configuration de la région EF est similaire à la main droite où le pouce pointe vers l'extrémité –COOH de l'hélice F et l'index pointe vers l'extrémité $-NH_2$ de l'hélice E. Le pouce et l'index forment un angle droit ; les autres doigts sont serrés contre la paume de la main. Le site de fixation du calcium et du magnésium se situe à la jonction entre le pouce et l'index (figure 6). Du fait de cette structure la métaphore suivante a été faite : le domaine EF est un site de fixation du calcium à motif *main EF*. Lorsque le domaine EF pivote autour de deux axes de rotation, ce domaine se trouve dans la même configuration que le domaine CD.

Enfin le domaine AB ne lie pas de calcium ; la boucle entre les hélices A et B est plus courte de deux résidus par rapport à celles des domaines CD et EF. Les deux hélices A et B sont parallèles (Kretsinger *et* Nockolds, 1973). Plusieurs études ont abouties à la même hypothèse : les trois domaines composant les parvalbumines auraient le même gène précurseur (Maximov *et* Mitin, 1979; Kretsinger, 1972; McLachlan, 1972).

D'autres protéines possèdent des sites de fixation du calcium présentant un motif *main EF* : la calmoduline, la troponine C, les calpaïnes... Il est intéressant de noter que l'antiparvalbumine musculaire a reconnu un fragment de dégradation de 11000 Da de la troponine C (Malencik *et al*, 1975). Les similitudes entre la parvalbumine et la troponine ont été notées en 1971 (Pechère *et al*, 1971). Les comparaisons de séquences d'ADN complémentaire confirment ces observations (Zot *et al*, 1987). Ainsi la partie de 11000 Da de la troponine C aurait une origine commune à celle des parvalbumines. Par ailleurs les structures du gène de la parvalbumine, de l'oncomoduline (qui possèdent une structure tridimensionnelle voisine) (Pauls *et al*, 1996; Berchtold *et al*, 1987), de la mysosine de souris et de la protéase calcium dépendante du poulet sont très proches (Berchtold *et al*, 1987). Toutes ces protéines possèdent des sites de fixation du calcium de type *main EF*.

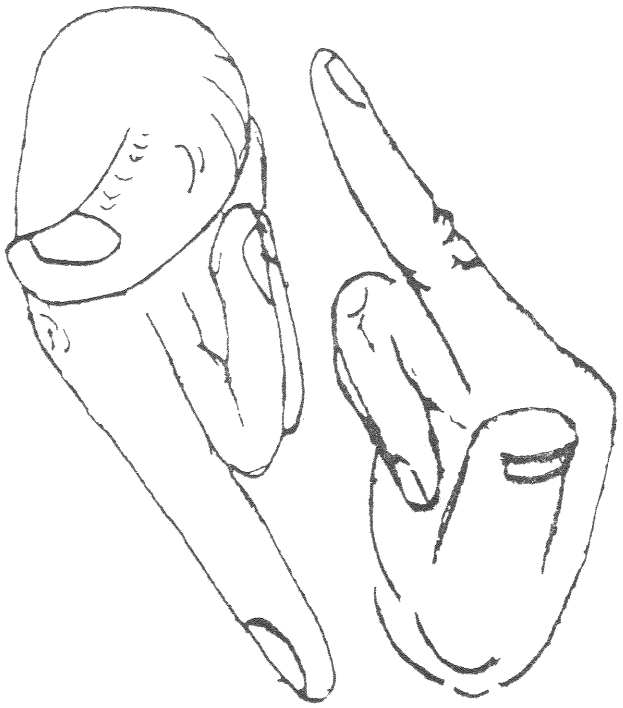


Figure 6 : Représentation symbolique des domaines CD et EF des parvalbumines (D'après Kretsinger *et* Nockolds, 1973).

La configuration de la région EF est similaire à la main droite où le pouce pointe vers l'extrémité –COOH de l'hélice F et l'index pointe vers l'extrémité $-NH_2$ de l'hélice E. Le pouce et l'index forment un angle droit ; les autres doigts sont serrés contre la paume de la main. Le site mixte de fixation du calcium et du magnésium dans la boucle EF se situe au niveau de la jonction entre le pouce et l'index. Du fait de cette structure la métaphore suivante a été faite : le domaine EF est un site de fixation du calcium à motif *main EF*. Lorsque le domaine EF pivote autour de deux axes de rotation, le domaine EF a alors la même configuration que le domaine CD.

Ceci, ajouté aux similitudes observées entre la troponine C et les parvalbumines, montrerait que les protéines musculaires liant le calcium et ayant le motif *main EF* auraient une origine commune.

Les parvalbumines musculaires interviendraient dans la relaxation des muscles à contraction rapide (Haiech *et al*, 1979a; Gerday *et al*, 1979; Celio *et* Heizmann, 1982; Heizmann, 1984; Gazzaz *et* Rasco, 1993; Pauls *et al*, 1996). En effet les parvalbumines sont présentes en grande quantité dans les muscles de poisson à contraction rapide (muscles blancs). Elles ont été détectées dans les muscles de rat à partir du troisième ou du quatrième jour après leur naissance, ce qui coïncide avec les changements de propriétés musculaires, à savoir une relaxation du muscle plus rapide (Celio *et* Heizmann, 1982). De plus lorsque les parvalbumines ont été injectées dans des muscles à contraction lente du rat (Pauls *et al*, 1996) ou à des myofibrilles excitées (Gerday *et* Gillis, 1976), la relaxation du muscle a été accélérée. Ces protéines ont deux sites mixtes calcium-magnésium. Dans le muscle ces sites ne sont jamais à l'état libre, mais ont toujours une conformation stabilisée par la fixation d'ions (magnésium ou calcium). Ainsi lorsque le muscle est au repos les parvalbumines ont leurs deux sites occupés par le magnésium. La concentration musculaire en magnésium est de 1 mM et en calcium est de 0,01 µM (Heizmann, 1984; Pauls *et al*, 1996) ; en fait le calcium est contenu dans le réticulum sarcoplasmique (figure 7). La troponine C liée aux myofibrilles permet la contraction du muscle. Elle possède quatre site de fixation pour le calcium : deux de ces sites fixent exclusivement le calcium, et les deux autres sites peuvent fixer le calcium et le magnésium. Lorsque le muscle est au repos les deux sites de fixation stricte du calcium sont libres et les deux sites de fixation mixte calcium-magnésium sont occupés par le magnésium. Pendant l'excitation du muscle le calcium est libéré dans le sarcoplasme, et sa concentration musculaire passe de 0,01 à 1 µM.

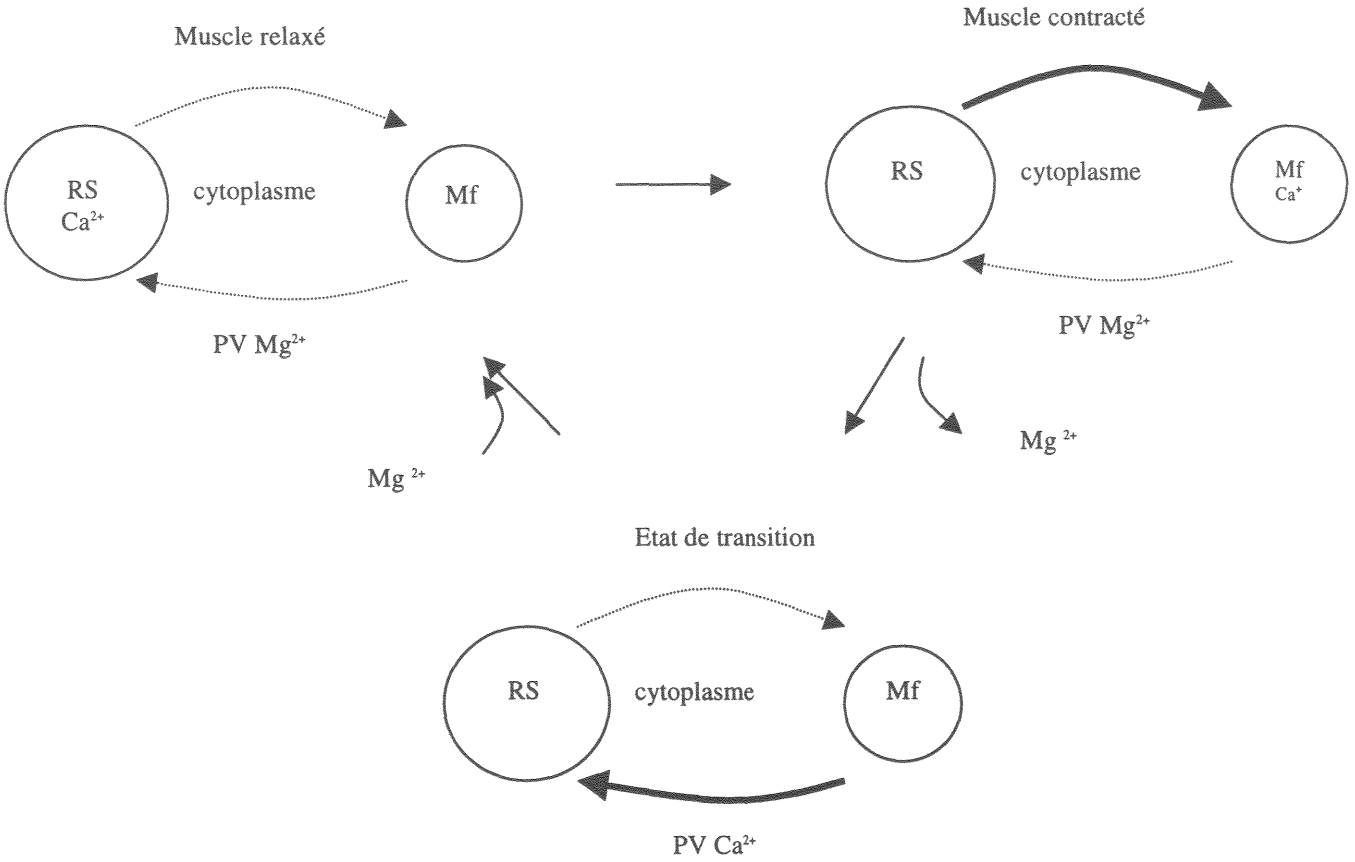


Figure 7 : Rôle présumé des parvalbumines dans le muscle d'après Heizmann (1984)

Lorsque le muscle est au repos la concentration musculaire en magnésium est de 1 mM et celle en calcium est de 0,01 µM ; en fait le calcium est principalement contenu dans le réticulum sarcoplasmique. La troponine C liée aux myofibrilles a deux sites strictes de fixation du calcium libres. La parvalbumine a ses deux sites de fixation mixtes calcium-magnésium occupés par le magnésium. Pendant l'excitation du muscle le calcium est libéré dans le sarcoplasme, et sa concentration musculaire passe de 0,01 à 1 µM. Il est d'abord pris en charge par les sites libres de la troponine C liée aux myofibrilles ; ceci permet la contraction du muscle. L'affinité des parvalbumines pour le calcium est supérieure à celle pour le magnésium, et est également supérieure à l'affinité de la troponine C pour le calcium. Ceci permet de décrocher le calcium des troponines C, et de relaxer le muscle. Puis le calcium est transféré dans le réticulum sarcoplasmique.

RS : Réticulum Sarcoplasmique ; Mf : myofibrilles ; PV : parvalbumines

Il est d'abord pris en charge par les sites stricts libres de fixation du calcium des troponines C ; ceci permet la contraction du muscle. L'affinité des parvalbumines pour le calcium est supérieure à celle pour le magnésium, et est également supérieure à l'affinité des sites strictes de fixation du calcium de la troponine C pour le calcium. Ceci permet de décrocher le calcium de la troponine C, et donc de relâcher le muscle. Puis le calcium est transféré dans le réticulum sarcoplasmique. Cette hypothèse est controversée en raison du temps trop long de dissociation du magnésium des parvalbumines (270 ms) par rapport au temps de contraction-relaxation (27 ms, 70 ms) du muscle (Cox *et al*, 1979).

D. Influence des procédés technologiques sur l'allergénicité du poisson

L'étude de l'allergénicité du surimi de cabillaud a permis, en plus de la mise en évidence d'une bande IgE-réactive de 63 kDa, de montrer que l'allergène majeur du cabillaud Gad c I, une parvalbumine, était éliminé au cours de l'élaboration du surimi (Mata *et al*, 1994, 8). En fait les parvalbumines sont solubles dans l'eau (Pechère *et* Focant, 1965). Gad c I a donc été éliminé au cours des étapes de lavage de la pulpe de poisson. La bande IgE réactive de 63 kDa n'a pas été éliminée, et contribuait à l'allergénicité résiduelle du surimi. D'autres études ont montré que le surimi restait encore allergénique (Helbling *et al*, 1992; Musmand *et al*, 1996).

Par ailleurs les influences d'autres procédés technologiques sur l'allergénicité du poisson ont été étudiées. Les traitements à la chaleur n'inactivaient pas l'allergène Gad c I du cabillaud (Bernhisel-Broadbent *et al*, 1992a). En fait les sites allergéniques de Gad c I sont des épitopes séquentiels (Elsayed *et* Aas, 1971b). Les bandes IgE-réactives de 66 et 78 kDa restaient également actives après la cuisson. Par contre, les bandes de 35, 38, 44 et 60 kDa étaient inactivées après la cuisson du cabillaud.

D'autre part vingt et une personnes allergiques au thon et ayant eu un test cutané positif avec le thon cru ont pu manger ce poisson mis en conserve sans apparition de symptômes allergiques (Bernhisel-Brodbent *et al*, 1992b). Ceci était dû au fait que le thon cru ne possèdait pas l'allergène de 12 kDa retrouvé dans d'autres espèces de poisson, mais possédait d'autres allergènes dont l'activité allergénique était éliminée par la chaleur (Bernhisel-Broadbent *et al*, 1992a).

Enfin la lyophilisation n'a aucun effet sur l'activité des allergènes de la perche, du cabillaud et du saumon (Bernhisel-Broadbent *et al*, 1992a).

E. Dégradation *postmortem* du poisson (Huss, 1995)

La dégradation *post mortem* du poisson entraîne des changements d'apparence, d'odeur, de texture et de goût de celui-ci. Aucune étude de la littérature n'a porté sur l'influence de la désorganisation *post mortem* du muscle sur l'allergénicité du poisson. En effet le muscle subit un ensemble de transformations complexes, et des produits de dégradation sont formés.

Juste après la mort, le muscle du poisson est relaxé et élastique. Cette texture peut persister pendant plusieurs heures. Sous certaines conditions (poisson stressé pendant la pêche ou affamé, température de conservation) la durée de cette étape est considérablement réduite. Ensuite débute l'étape de rigidité cadavérique appelée *rigor mortis* qui pourra se prolonger jusqu'à quatre vingt seize heures après la mort du poisson. Les muscles du poisson sont contractés. Après l'étape *rigor mortis* a lieu une troisième phase *post rigor mortis* où les muscles du poisson se relâchent complètement.

Des activités autolytiques dûes à certaines enzymes, associées à l'action de bactéries, sont à l'origine de ces modifications. Les cathepsines D et L sont des protéases acides présentes dans les lysozomes. Elles sont libérées dans le muscle après la mort du poisson, surtout après des congélations et décongélations. Elles ont une activité maximale à un pH acide de 4,0. La cathepsine D est impliquée dans la digestion de certaines protéines myofibrillaires (actinomyosine) et de certains tissus connectifs.

Les calpaïnes sont des endoprotéases intracellulaires. Leur pH optimal est le pH physiologique. Elles dégradent les stries Z des myofibrilles. La myosine est digérée par la calpaïne ; un premier fragment de dégradation d'une masse moléculaire de 150000 Da est produit.

Le collagène, qui participe à la structure du muscle, est dégradé par des collagénases.

Les carboxypeptidases, chymotrypsines et trypsines sont des protéases qui ont également des activités auto-protéolytiques responsables du relâchement du muscle du poisson.

Ces dégradations protéolytiques conduisent à des fragments protéiques dont l'activité allergénique n'a pas encore été démontrée à ce jour.

II. Buts et déroulement de l'étude

L'allergène majeur du cabillaud Gad c I est souvent décrit comme étant l'allergène alimentaire le mieux caractérisé du point de vue biochimique et allergénique. Il est souvent considéré comme étant le seul allergène du cabillaud. Les travaux réalisés en 1995 par Mata *et al* ont montré que Gad c I n'est pas le seul allergène de cabillaud, car un allergène protéique de poids moléculaire apparent de 63 kDa a été mis en évidence. Trois autres études ont montré également qu'il existait en plus de Gad c I d'autres bandes IgE-réactives du cabillaud. Les profils des bandes IgE-réactives n'étaient pas semblables. Certaines bandes semblaient communes à plusieurs études, et d'autres bandes n'étaient rencontrées spécifiquement que dans telle ou telle étude. Chaque étude ne mettait donc en évidence qu'une partie des bandes protéiques du cabillaud reconnues par les IgE.

Il existait donc peu d'informations précises concernant la composition en allergènes du cabillaud. Ce contexte justifiait donc d'établir la cartographie, la plus précise possible, des allergènes du cabillaud. Elle a été réalisée par immunoempreintes en utilisant des séra de patients allergiques au cabillaud. Par ailleurs il est également apparu opportun de purifier certains de ces allergènes pour en obtenir une caractérisation plus précise, et aussi pour préparer des sondes immunologiques ou moléculaires utiles à la détection de ces allergènes dans d'autres espèces de poisson, ainsi que dans des produits dérivés du poisson. Enfin un troisième objectif de l'étude était d'apprécier l'influence éventuelle de l'état de désorganisation *post mortem* du muscle de cabillaud, représentatif de l'état de fraîcheur du poisson, sur l'allergénicité du cabillaud.

III. Matériels et méthodes

1. Sérums de patients allergiques au cabillaud

Douze patients ont eu une réaction allergique immédiate après l'ingestion de cabillaud. Trois de ces patients étaient suivis dans le service d'allergologie du centre hospitalier universitaire de Nancy : ils présentaient des signes cliniques d'allergie au cabillaud. Les tests cutanés avec des extraits protéiques de cabillaud étaient positifs pour ces trois patients. Les neuf autres patients ont subi un examen sanguin au laboratoire Cerba (Paris, France) après la réaction allergique pour doser les IgE spécifiques au cabillaud. Onze des douze patients de cette étude présentaient des IgE spécifiques dirigées contre le cabillaud détectées par le dosage CAP-RAST f3 (Pharmacia, Uppsala, Suède).

Le sang a été collecté dans des tubes secs. Il a été centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes. Le sérum a été aliquoté et placé à -80°C.

Neuf sérums de personnes non allergiques au cabillaud ont été utilisés comme témoins négatifs. Les taux d'IgE totales étaient inférieurs à 30 KUI/l pour ces séra.

2. Préparation des extraits protéiques de cabillaud

Un premier extrait a été préparé avec du cabillaud *pre rigor mortis*. Juste après sa pêche un filet a été découpé et placé dans de l'azote liquide. Ainsi la dégradation *post mortem* ne s'était pas encore produite. Un second extrait a été préparé avec du cabillaud *post rigor mortis* obtenu dans des conditions particulières : le filet a été placé dans l'azote liquide juste après la rigidité *post mortem* du cabillaud. Ces deux filets ont été fournis par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Nantes, France). Ils ont été conservés à – 20°C jusqu'à l'extraction des protéines. Enfin un troisième extrait a été préparé

avec un filet non congelé de cabillaud acheté chez un poissonnier nantais. Les protéines ont été extraites moins d'une heure après l'achat.

Les filets ont été broyés et homogénéisés dans du tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 avec ou sans NaCl 0,6 M dans un bain de glace pendant trois cycles de vingt secondes. Un gramme de tissu a été broyé dans 2 ml de tampon. Le broyat a été centrifugé à 20 000 g pendant vingt minutes à + 4°C. Le surnageant a été filtré (pores du filtre : 0,22 µm) et lyophilisé. Le lyophilisat a été conservé à 4°C. Moins d'un mois après les extraits de cabillaud ont été séparés par chromatographie échangeuse d'anions (DEAE), et moins de six mois après ils ont été utilisés dans les autres expériences. Seules les protéines solubles, essentiellement des protéines sarcoplasmiques, ont été extraites dans un tampon de faible force ionique. Les protéines myofibrillaires, telles que les complexes d'actine et de myosine, ont été solubilisées dans 0,6 M NaCl.

3. Détermination de la concentration protéique

Les concentrations protéiques des extraits et des fractions chromatographiques ont été déterminées par la méthode de Bradford (1976) en utilisant le kit Coomassie®Plus Protein Assay Reageant (Pierce, Rockford, USA) en respectant les instructions du fournisseur. Six microlitres de solution protéique ont été incubés avec 300 µl de solution de bleu de coomassie fournie dans le kit. Le colorant s'était lié aux protéines ce qui a entraîné un changement de maximum d'absorbance de 465 à 595 nm. La BSA (Bovine Serum Albumin) a été utilisée pour la réalisation de la gamme étalon.

4. Dosage des IgE spécifiques au cabillaud dans des séra de patients allergiques

Les protéines de cabillaud *pre rigor mortis* ont été couplées à des disques de nitrocellulose. Ces disques ont été préparés par la société ALLERBIO (Varennes-en-Argonne, France).

Pour chaque sérum ce dosage a été effectué en double (Mata *et al*, 1994, Moutete *et al*, 1994). Cinquante microlitres de sérum ont été incubés avec un disque de nitrocellulose. Après trois heures d'incubation sous agitation à température ambiante le disque a été lavé à trois reprises avec 2 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,5 M NaCl et 0,02 % (w/v) BSA. Puis le disque a été incubé la nuit à température ambiante avec 50 µl (30 000 cpm) d'anti-IgE marqué à l'iode 125 (Immunotech, Marseille, France). Le disque a ensuite été lavé à trois reprises comme décrit ci-dessus. La radioactivité fixée sur le disque a été mesurée à l'aide d'un compteur de radioactivité γ. Le pourcentage de fixation de la radioactivité sur le disque a été déterminé pour chaque sérum, et le rapport entre le pourcentage de radioactivité fixée pour le sérum du patient sur le pourcentage moyen des séra de témoins non allergiques a été calculé. Un rapport supérieur à trois indiquait la présence d'IgE spécifiques au cabillaud dans le sérum du patient.

Pour le test d'inhibition du dosage des IgE spécifiques au cabillaud avec une solution protéique le sérum du patient a été incubé une heure avec 50 µl de la solution protéique étudiée avant d'être incubé avec le disque de nitrocellulose. Puis le disque a été traité comme ci-dessus. Le pourcentage d'inhibition (IP) a été déterminé d'après la formule suivante : $IP=[(cpm_i - cpm_0)/cpm_0]x100$ où cpm_0 représente la radioactivité fixée sur le disque sans incubation préalable du sérum avec la solution protéique et cpm_i représente la radioactivité fixée avec incubation préalable du sérum avec la solution protéique.

5. Electrophorèse PAGE-SDS

Les électrophorèses des extraits protéiques de cabillaud (*pre rigor mortis* avec ou sans incubation avec 5 mM d'EDTA, *post rigor mortis*, fractions de la chromatographie DEAE-sepharose® ou de l'électrophorèse à élution continue, filet de cabillaud acheté chez le poissonnier) en présence de sodium dodecyl sulfate ont été réalisées avec des gels de polyacrylamide et un tampon de migration 20 mM Tris pH 8,3, 0,18 M glycine, 0,1 % (w/v) SDS (électrophorèse PAGE-SDS), dans une cuve d'électrophorèse verticale Mini Protean®II (Biorad, Richmond, USA). Les échantillons ont été préparés dans une solution constituée de 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 3 mM EDTA, 3 % (w/v) SDS, 120 mM DTT, 30 % (v/v) glycérol, 0,05 % (w/v) bleu de bromophénol. Avant le dépôt les préparations protéiques ont été placées trois minutes à 100°C. La séparation des protéines s'est effectuée à 30 mA constant par gel jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint l'extrémité inférieure du gel. Deux mélanges de protéines de masses moléculaires connues ont été alternativement utilisés. Le premier témoin de migration était fourni par Pharmacia (Uppsala, Sweden). Les protéines étaient la phosphorylase b (94 kDa), l'albumine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur de trypsine (20,1 kDa) et la lactalbumine (14,4 kDa). Le second a été fourni par Biorad. Les protéines étaient la myosine (208 kDa), la β-galactosidase (144 kDa), la BSA (87 kDa), l'anhydrase carbonique (44,1 kDa), l'inhibiteur de la trypsine de soja (32,7 kDa), le lysozyme (17,7 kDa) et l'aprotinine (7,1 kDa).

6. Coloration du gel au nitrate d'argent

Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau de type Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Les protéines ont été fixées en incubant le gel pendant une heure dans une

solution composée de 40 % (v/v) de méthanol et de 10 % (v/v) d'acide acétique. Puis le gel a été lavé à trois reprises pendant vingt minutes dans une solution de 30 % (v/v) d'éthanol. Le gel a été incubé pendant une minute dans 0,02 % (w/v) de thiosulfate de sodium. Il a été rincé à trois reprises avec de l'eau Milli-Q. Le gel a été incubé pendant vingt minutes dans 0,2 % (w/v) de nitrate d'argent, 0,02 % (v/v) formaldéhyde. Après trois rinçages avec de l'eau Milli-Q, le gel a été incubé avec la solution de développement : 3 % (w/v) de carbonate de sodium, 0,05 % (v/v) de formaldéhyde, 0,0005 % (w/v) de thiosulfate de sodium. Lorsque la coloration des bandes était suffisante, le gel a été rincé avec de l'eau Milli-Q, puis a été incubé pendant une heure dans 0,5 % (w/v) de glycine.

7. Immunoempreintes

Après la séparation par électrophorèse PAGE-SDS, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0.2 µm Trans-Blot®Transfert Medium, Biorad, Richmond, USA) à l'aide d'une cellule de transfert Trans-Blot®Cell (Biorad). La solution de transfert était la suivante : 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glycine, 20 % (v/v) méthanol. Le transfert semi-sec a duré vingt minutes à un voltage constant de 17 volts.

7.1 Détection des protéines fixées avec des séra de patients allergiques

La membrane a été traitée en suivant la méthode de Moutété *et al* (1994) en utilisant du tween 20 comme agent de saturation (Vieths *et al*, 1994). Les sites non occupés de la membrane ont été saturés en incubant celle-ci avec 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 0,3 % (v/v) Tween 20 et 0,15 M NaCl pendant une heure à température ambiante. La membrane a

été lavée à trois reprises avec 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 0,05 % (v/v) Tween 20 et 0,15 M NaCl, puis elle a été incubée trois heures à température ambiante avec des sérums de patients allergiques au cabillaud dilués dix fois dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 0,3 % (v/v) Tween 20 et 0,15 M NaCl. Un millilitre de sérums dilué a été utilisé par extrait protéique testé. La membrane a été lavée à trois reprises et a été incubée durant la nuit à température ambiante avec un traceur anti-IgE marqué à l'iode 125 dilué au dixième dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 0,3 % (v/v) Tween 20 et 0,15 M NaCl. Un millilitre de la solution de traceur a été utilisé par préparation protéique. Après trois lavages la membrane a été exposée sur un écran de phosphore (Phosphor screen, PhosphorImager, Molecular Dynamics) ou sur un film autoradiographique X-OMAT (Kodak, Rochester, USA). Les images produites sur l'écran de phosphore ont été analysées après quelques heures d'exposition à l'aide d'un PhosphorImager 445 SI. Le film autoradiographique a été révélé après quelques jours d'exposition avec la solution de développement (Kodak).

Dans certains cas (extraits *pre rigor mortis* avec ou sans incubation avec 5 mM EDTA, *post rigor mortis* et poisson acheté chez le poissonnier) l'allergénicité relative a été déterminée pour chaque bande protéique IgE-réactive formant la préparation. Les intensités de chaque bande protéique de la préparation reconnue par les IgE ont été additionnées. L'allergénicité relative a été calculée en déterminant le rapport entre l'intensité de la bande sur la somme des intensités des bandes de l'extrait x 100.

7.2 Détection des bandes protéiques fixées avec un anticorps monoclonal dirigé contre les parvalbumines (Sigma, St. Louis, USA)

La membrane a été saturée comme décrit ci-dessus. Elle a été incubée avec un anticorps monoclonal dirigé contre les parvalbumines (clone PA-235, Sigma) (Tinner *et al*, 1990) dilué mille fois dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 0,1 % (v/v) Tween 20 et 0,15 M NaCl pendant trois heures à température ambiante. Un millilitre de solution d'anticorps a été utilisé par préparation protéique. La membrane a été rincée à trois reprises et a été incubée avec de l'anti-IgG de souris (molécule entière) marquée à la phosphatase alcaline (Sigma) dilué dix mille fois dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 0,3 % (v/v) Tween 20 et 0,15 M NaCl pendant trois heures à température ambiante. Un ml de cette solution d'anticorps a été utilisé par préparation protéique. La membrane a été lavée à trois reprises et a été incubée avec le substrat de la phosphatase alcaline, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (tablettes de tampon BCIP/NBT, Sigma). Le substrat a été éliminé lorsque la coloration de la membrane a été suffisante. La membrane a été rincée avec de l'eau distillée.

8. Chromatographie échangeuse d'anions (DEAE)

Les protéines de cabillaud ont été séparées par chromatographie échangeuse d'anions (DEAE-Sepharose®CL-6B de Pharmacia, Uppsala, Suède). La colonne avait un diamètre intérieur de 16 mm et une hauteur de 200 mm ; le volume de la colonne était de 40 ml. Les protéines ont été éluées avec un gradient de NaCl : le gradient a été formé avec du tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 et du tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 contenant 1 M NaCl. L'élution des protéines a été suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm.

9. Dot-blotting

Les protéines ont été appliquées directement sur une membrane de nitrocellulose (0,2 µm Trans-Blot®Transfert Medium, Biorad, Richmond, USA) en utilisant l'appareil de microfiltration Bio-Dot® (Biorad). La membrane de nitrocellulose a été traitée comme cela a été décrit pour l'immunoempreinte, en utilisant seulement 250 µl de sérums dilué par préparation protéique déposée.

L'allergénicité relative a été déterminée pour chaque fraction protéique obtenue après chromatographie sur DEAE-Sepharose®. L'intensité de la réponse obtenue avec 10 µg d'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis* a servi de référence. L'allergénicité relative a été calculée en déterminant le rapport de l'intensité de la réponse pour la fraction sur celle de l'extrait brut.

10. Electrophorèse à élution continue

L'extrait protéique brut de cabillaud *pre rigor mortis* a été séparé par électrophorèse à élution continue dans des conditions dénaturantes (PAGE-SDS). Cette électrophorèse a été réalisée avec une cellule PrepCell® (Biorad, Richmond, USA). Le gel de concentration contenait 4 % (w/v) d'acrylamide (29 : 1 acrylamide/bisacrylamide, 2,6 % C, Biorad) tandis que le gel de séparation contenait 7,5 % (w/v) d'acrylamide. Quatre mg et demi de protéines ont été préparées dans 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 contenant 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, 40 mM DTT, 10 % (v/v) glycérol et 0,015 % (w/v) bleu de bromophénol. Elles ont été incubées à 100°C pendant trois minutes avant le dépôt. La colonne (8 cm de hauteur et 2,8 cm de diamètre interne) a été éluée avec 25 mM Tris, pH 8,3, 0,18 M glycine, 0,1 % (w/v) SDS à un

flux constant de 0,4 ml / minute. La séparation a été effectuée à un ampérage constant de 40 mA pendant huit heures. Des fractions de 1 ml ont été collectées. L'élution des protéines a été suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm. La recherche des fractions contenant la protéine à purifier s'est effectuée par électrophorèse PAGE-SDS. Les fractions contenant la protéine recherchée ont été dialysées contre du Tris-HCl 10 mM pH 7,4.

11. Extraction de l'ARN total de cabillaud

L'ARN total d'un filet de cabillaud *pre rigor mortis* a été extrait en utilisant le TRIZOL®Reagent (GibcoBRL, Gaithersburg, USA). Le filet a été conservé à – 80°C après la pêche du poisson. Deux grammes de filet de cabillaud ont été broyés dans 20 ml de solution de TRIZOL®Reagent. L'homogénat a été incubé pendant cinq minutes à température ambiante. Puis 4 ml de chloroforme ont été ajoutés, et le mélange a été incubé trois minutes à température ambiante. L'homogénat a été centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. L'ARN a été précipité en ajoutant 10 ml d'isopropanol à la phase aqueuse et en l'incubant dix minutes à température ambiante. Puis cette phase a été centrifugée dix minutes à 12000 g à 4°C. L'ARN a été rincé avec 20 ml d'une solution d'éthanol à 75 %, et a été centrifugé cinq minutes à 7500 g à 4°C. Le culot d'ARN a été repris dans 200 µl d'eau Milli-Q contenant 0,1 % (v/v) de DEPC (Sambrook *et al*, 1989a). Le DEPC inhibait les RNAses.

L'ARN a été dosé par une lecture de la densité optique à 260 nm. Une unité de DO à cette longueur d'onde correspondait à 40 µg d'ARN par ml de solution (Sambrook *et al*, 1989b). La pureté de l'ARN a été vérifiée par le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm. La teneur en ARN était considérée suffisament élevée si ce rapport était compris entre 1,8 et 2,0 (Sambrook *et al*, 1989b). L'ARN a été conservé à –80°C.

12. Obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) de cabillaud

L'ADNc de cabillaud a été obtenu par la technique 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Schaefer *et al*, 1995). Sa synthèse a été initialisée avec une amorce oligo-dT particulière complémentaire à la queue poly-A des ARN messagers (ARNm). L'acide nucléique du coté 3' de la séquence poly-dT qui était différent de la thymine permettait de positionner exactement l'amorce oligo-dT sur le début de la queue poly-A de l'ARNm (figure 8). Du côté 5' se trouvait une séquence supplémentaire appelée anchor qui servait de site de fixation d'une amorce antisens non dégénérée au cours de la réaction de PCR.

La séquence de l'amorce oligo-dT anchor était la suivante :

5' GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV 3', où V=A,C ou G.

Le mélange suivant a été incubé dix minutes à 60°C :

Tampon de la reverse transcriptase AMV (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) (10 X)	2 µl
$MgCl_2$ (Perkin Elmer, Foster City, USA)	2,5 mM
dNTP (Boehringer Mannheim)	0,3 mM
Oligo-dT anchor (Boehringer Mannheim)	8,5 µM
H_2O DEPC (0,1 %) qsp	18,5 µl

Le mélange a été incubé pendant dix minutes à 60°C. Puis il a été placé à 4°C pendant deux minutes. Seize unités de l'inhibiteur de RNAses RNAGuard (1 µl) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) et vingt cinq unités de Reverse Transcriptase AMV (0,5 µl) (Boehringer Mannheim) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé pendant une heure à 42°C.

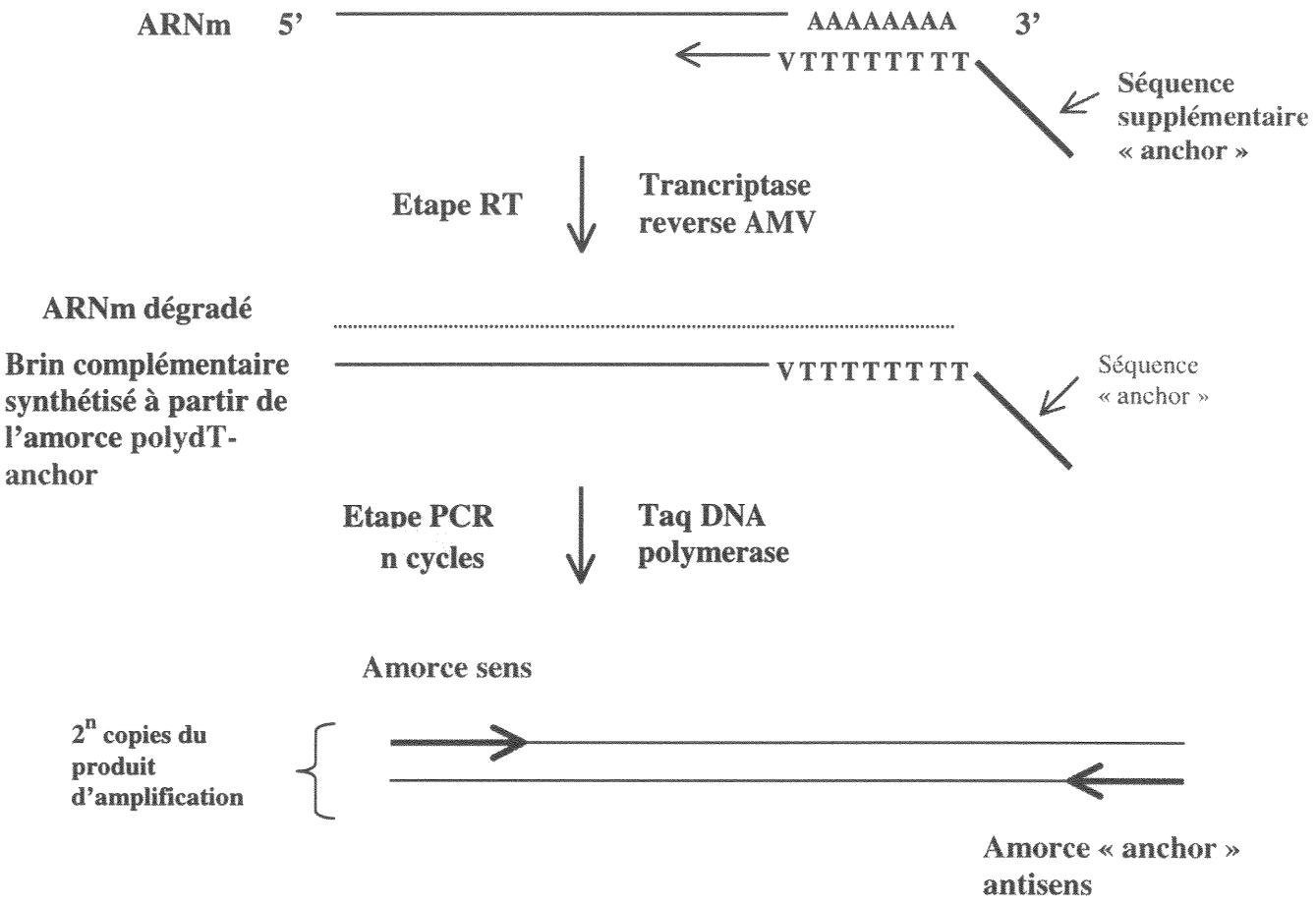


Figure 8 : Principe de la technique 3' RACE (d'après Schaefer *et al*, 1995)

13. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette technique permet d'amplifier un fragment d'ADN compris entre deux séquences nucléotidiques reconnues par des amorces, une amorce sens et une amorce antisens. Le premier site de fixation du calcium de Gad c I a permis de synthétiser une amorce sens Gad c I 50 S. Le second site de fixation du calcium de Gad c I a permis de synthétiser une amorce antisens Gad c I 92 AS (figure 9).

D'autres amorces ont également été utilisées : l'oligo-dT anchor, les sites universels T7 et SP6 du plasmide pGEM-T®(Promega, Madison, USA). Toutes les amorces ont été synthétisées par le service commun de biologie moléculaire du CHU de Nancy. Les séquences des différentes amorces étaient les suivantes :

Amorce Gad c I 50 S : 5' GC(A,C,G,T)- GA(C,T)-GA(A,G)-GA(C,T)-AA(A,G)-GA(A,G)-GG(A,C,G,T)-TT(C,T)-AT(A,C,T)-GA(A,G)-GA 3' ; le Tm moyen était de 67°C

Amorce Gad c I 92 AS : 5' TC(A,G)-TC(A,C,G,T)-AC(A,C,G,T)-CC(A,G,T)-AT(C,T)-TT(A,C,G,T)-CC(A,G)-TC(A,C,G,T)-CC(A,G)TC 3' ; le Tm moyen était de 68°C

Amorce anchor : 5' GAC-CAC-GCG-TAT-CGA-TGT-CGA-C 3' ; le Tm était de 58,4°C

Amorce T7 : 5' TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GGC-GA 3' ; le Tm était de 53,4°C

Amorce SP6 : 5' TTT-AGG-TGA-CAC-TAT-AGA-ATA-C 3' ; le Tm était de 47,3°C.

Premier site de fixation du calcium qui a permis de synthétiser l'amorce Gad c I 50 S

	50																												61
Séquence primaire		A			D			E			D			K			E			G			F			I			E			E	
Séquence de l'ADNc	G	C	A	G	A	C	G	A	A	G	A	C	A	A	A	G	A	A	G	G	A	T	T	C	A	T	A	G	A	A	G	A	A
			C			T			G			T			G			G			C			T			C			G			G
			G																		G						T						
			T																		T												

Deuxième site de fixation du calcium qui a permis de synthétiser l'amorce Gad c I 92 AS

	92																																101
Séquence primaire		D			G			D			G			K			I			G			V			D			E				
Séquence de l'ADNc	G	A	C	G	G	A	C	A	C	G	G	A	A	A	A	A	T	A	G	G	A	G	G	A	G	A	C	G	A	A			
			T			C			T			C			G			C			C			C			C			G			
						G						G						T			G			G										
						T						T									T			T										

Figure 9 : Séquences des sites de fixation du calcium de Gad c I et séquence de l'ADN complémentaire correspondant. Ces séquences ont permis de synthétiser les amorces Gad c I 50 S et Gad c I 92 AS.

Le protocole de PCR nécessitait une mise au point particulière et précise. En effet il fallait ajuster la concentration en $MgCl_2$, la température d'hybridation des amorces et les temps de dénaturation, d'hybridation et d'élongation des cycles de la PCR. Les résultats des différentes mises au point ont permis d'établir le protocole de PCR. La composition du mélange réactionnel était la suivante :

Tampon PCR de l'AmpliTaq® DNA polymerase de Perkin Elmer (Foster City, USA) 10X	5 µl
dNTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)	0,12 mM
$MgCl_2$ (Perkin Elmer)	1 mM
Amorces (Sens, Antisens)	0,25 µM
ADN (ADN complémentaire, ADN de plasmide ou ADN de première amplification récupéré par aiguille et dissout dans 20 µl d'eau Milli-Q)	1 µl
AmpliTaq®DNA polymerase (Perkin Elmer)	1,25 U
Eau Milli-Q qsp	50 µl.

L'amplification a été réalisée sur le thermocycleur GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) à l'aide du programme suivant : Dénaturation : deux minutes à 96°C

Vingt cinq cycles : Dénaturation : vingt cinq secondes à 96°C

Hybridation : trente secondes à 50°C

Elongation : une minute dix à 72°C

Elongation terminale : sept minutes à 72°C.

14. Electrophorèse des produits PCR

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) de 1,5 % (w/v) avec une cuve d'électrophorèse horizontale (Biorad, Richmond, USA). Le gel a été préparé avec du tampon TBE (0,045 M Tris-borate, 0,001 M EDTA) contient 0,00007 % (v/v) bromure d'éthidium qui permettait la visualisation des produits d'amplification après l'électrophorèse en exposant le gel aux ultraviolets. La solution d'acides nucléiques a été mélangée au bleu de dépôt (Sigma), et le mélange a été déposé sur le gel. La migration a duré cinquante minutes à un voltage constant de 130 Volts.

15. Purifications des produits PCR

Une purification simple consistait à piquer une aiguille dans la bande et de tremper l'aiguille dans 20 µl d'eau Milli-Q. Ce fragment a pu être amplifié à nouveau par PCR. D'autres purifications ont été réalisées avec le kit QIAquick®spin de QIAGEN (Hilden, Germany). Une membrane de silice, placée au fond d'une micro-colonne adaptable sur un microtube de 2 ml, adsorbait l'ADN si le pH était inférieur à 7,5. Ceci permettait d'extraire l'ADN de la solution de PCR ou de l'agarose. La purification a été réalisée en suivant les instructions du fournisseur.

16. Estimation de la quantité de fragments d'ADN par électrophorèse

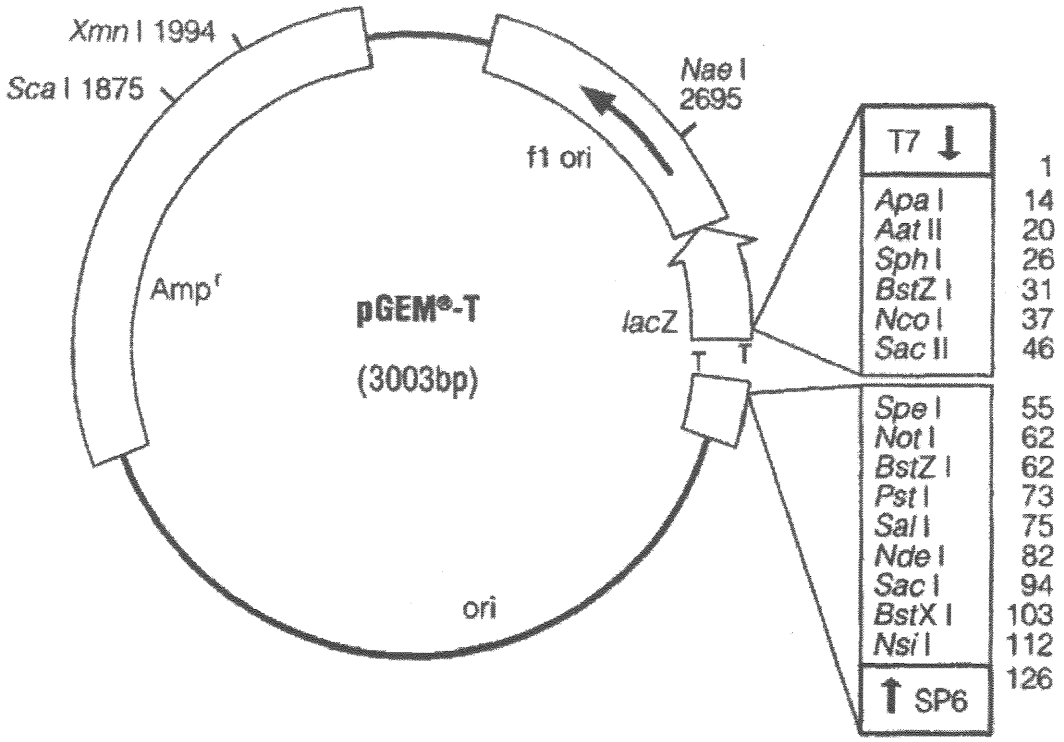
La quantité des fragments d'ADN a été estimée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,5 % (w/v) (GibcoBRL, Gathersburg, USA). Parallèlement à l'échantillon a été déposé un marqueur de poids moléculaire dont la quantité de chaque bande le constituant était

connue. Cela permettait d'apprécier de manière semi-quantitative la quantité d'ADN des bandes de produits d'amplification. Lorsque 5 µl du marqueur 100 pb de Promega (Madison, USA) ont été déposés, la bande de 500 paires de bases contenait 150 ng d'ADN et les autres bandes contenaient 50 ng d'ADN. Il suffisait, après l'électrophorèse, de comparer l'intensité de la bande étudiée avec celle d'une bande du marqueur dont la taille était proche.

17. Clonage d'un produit PCR dans un vecteur pGEM®-T

17.1 Description du vecteur

Le plasmide pGEM®-T a été fourni par Promega (Madison, USA) (figure n°10). Ce vecteur était composé d'un double brin d'ADN circulaire. Sa taille était de 3,0 kb. Pour permettre l'insertion d'un produit PCR ce vecteur a été coupé par *Eco*RV au niveau de la région codant pour le peptide α de la β-galactosidase. Ce site d'insertion était intéressant car il permettait de différencier le plasmide ayant un insert (β-galactosidase inactive) d'un plasmide non recombinant (β-galactosidase active) en utilisant l'IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) et X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). L'IPTG est un inducteur non métabolisable de l'opéron lactose et X-Gal est un galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β-galactosidase. Par ailleurs une thymine terminale a été ajoutée aux deux extrémités 3' du double brin d'ADN plasmidique. Ceci a permis l'hybridation du produit PCR obtenu avec l'AmpliTaq®DNA polymerase (Perkin Elmer, Foster City, USA) car il avait une adénine supplémentaire non appariée aux deux extrémités 5'. L'insertion du produit PCR n'était pas orientée.



Les différents sites du vecteur :

Site d'initiation de la transcription de la polymérase T7 ARN dépendante	1
Site d'initiation de la transcription de la polymérase SP6 ARN dépendante	126
Promoteur de la polymérase T7 ARN dépendante	2987-6
Promoteur de la polymérase SP6 ARN dépendante	121-143
Sites de clonage	10-113
Codon d'initiation de *lac* Z	165
Opéron *lac*	2824-2984, 151-380
Opérateur *lac*	151-201
Région codante de la β-lactamase	1322-2182
Région du phage f1	2368-2823

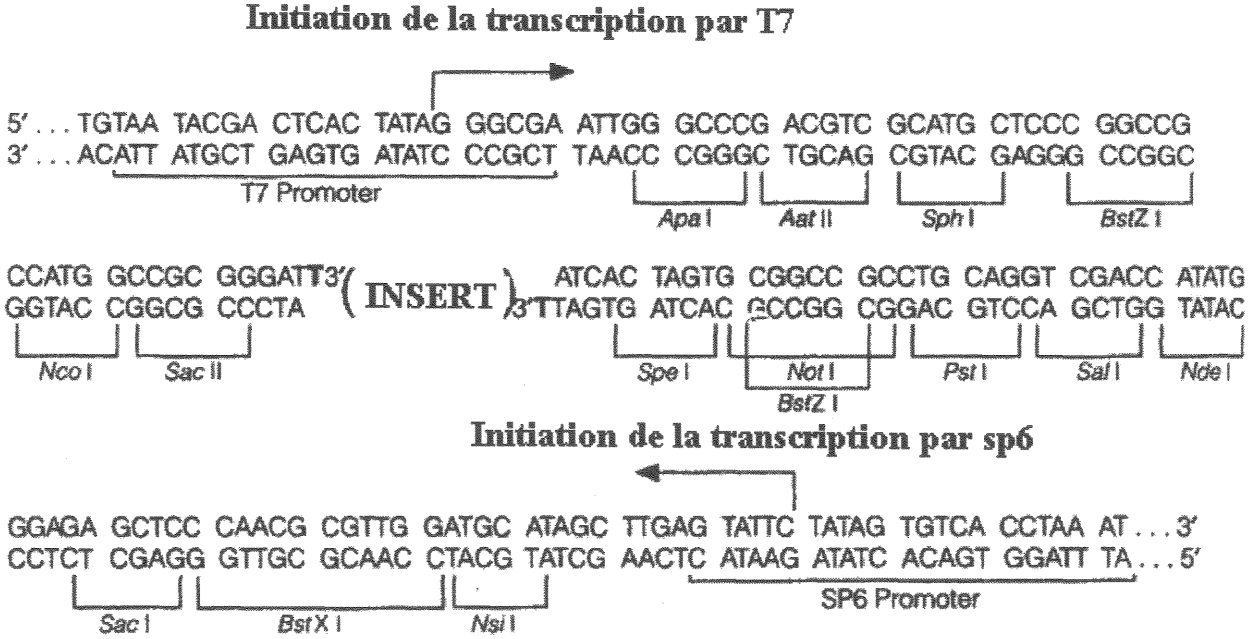


Figure 10 : La carte du vecteur pGEM®-T

Ce vecteur possèdait aussi plusieurs sites de restriction ainsi que les sites d'initiation de la transcription des ARN polymérases T7 et SP6. Ce vecteur possèdait également un gène qui lui confèrait une résistance à l'ampicilline (*amp*).

17.2 Clonage d'un produit PCR dans le plasmide pGEM®-T

Toutes les étapes du clonage ont été réalisées suivant les instructions du fournisseur. La première étape consistait à insérer le produit PCR dans le plasmide. Cinquante nanogrammes de vecteur ont été utilisés par réaction de ligation. Proportionnellement trois molécules de produit d'amplification et une molécule de vecteur ont été mises en présence. La formule suivante a permis de déterminer la quantité de produit PCR à ajouter :

$$\frac{\text{Quantité de vecteur (50 ng) x taille insert (kb)}}{\text{Taille du vecteur (3,0 kb)}} \times \frac{3}{1} = \text{quantité de produit PCR en ng}$$

La réaction d'insertion a eu lieu dans un tampon 3 mM Tris-HCl, pH 7,8 contenant 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT et 1 mM ATP. Trois unités de T_4 DNA ligase ont catalysé la réaction d'insertion. Le mélange a été placé à 4°C durant la nuit. Deux contrôles de ligation ont été réalisés : un contrôle positif de la réaction à l'aide d'un insert fourni, ainsi qu'un contrôle d'auto-ligation du plasmide linéarisé.

Des bactéries *E. Coli* JM 109 ont été fournies compétentes par Promega (Madison, USA). Elles étaient sensibles à l'ampicilline et de phénotype lac^- (10^8 UFC/µg ADN). Cinquante microlitres de bactéries JM109 ont été incubées avec 2 µl du produit de ligation. Un contrôle de transformation a été réalisé avec un vecteur non coupé. Après vingt minutes d'incubation à 4°C, un choc thermique a été pratiqué en plaçant le mélange à 42°C

exactement pendant quarante cinq secondes. Puis le mélange a été incubé encore deux minutes à 4°C. Neuf cent cinquante microlitres de milieu SOC (2 % (w/v) Bacto®-Tryptone, 0,5 % (w/v) d'extrait de levure, 10 mM NaCl, KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM $MgSO_4$, 5 mM glucose) ont été ajoutés au mélange, et le tout a été incubé une heure trente à 37°C sous agitation (150 rpm). Le produit de transformation a été étalé sur du milieu LB solide (1 % (w/v) Bacto®-Tryptone, 0,5 % (w/v) d'extrait de levure, 0,5 % (w/v) NaCl et 15 g/l d'agar) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 0,5 mM d'IPTG et 80 µg/ml de X-Gal. Pour chaque produit de transformation deux boites ont été étalées, l'une avec 100 µl du produit et l'autre avec le culot du reste du produit repris dans 100 µl de milieu SOC. Les boites ont été incubées pendant seize heures à 37°C. Des colonies blanches isolées ont été incubées dans 4 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline pendant vingt quatre heures à 37°C afin d'extraire l 'ADN plasmidique. Les cellules ont été centrifugées pendant deux minutes à 10000 g. Le surnageant a été éliminé. Les plasmides ont été extraits des cellules en utilisant le kit «WIZARD®PLUS Minipreps DNA Purification System » de Promega (Madison, USA) et en suivant les instructions du fournisseur.

18. Réaction de séquençage des produits clonés

La réaction de séquençage des produits clonés a été réalisée en utilisant le kit « ABI PRISM®Dye Terminator » de Perkin Elmer (Foster City, USA). L'AmpliTaq®DNA FS a été utilisé. La réaction de séquençage a été réalisée avec le thermocycleur GeneAmp 2400 de Perkin Elmer. Le mélange « Terminator Ready Reaction Mix » du kit contenait les quatre deoxynucléotides triphosphates et les quatre bases colorées stoppant la réaction d'élongation, ainsi que de la polymérase et son tampon d'activité. Les quantités de chaque composant n'étaient pas indiquées.

Le mélange suivant permettait la réaction :

Mélange « Terminator Ready Reaction Mix »	8 µl
Produit PCR du produit cloné (500 à 1000 paires de base)	20 ng
Amorce T7 ou SP6	3,2 pmol
H_2O qsp	20 µl

La réaction de séquençage s'est déroulée en vingt cinq cycles :

Dix secondes à 96°C

Cinq secondes à 50°C

Quatre minutes à 60°C.

Les produits de séquençage ont ensuite été précipités en ajoutant 74 µl d'EtOH 70% contenant 0,05 mM de $MgCl_2$. Le mélange a été incubé quinze minutes à température ambiante, centrifugé à 10000 g pendant vingt minutes et le surnageant a été éliminé. Le culot a été séché. Puis la séquence a été lue au service commun de biologie moléculaire du CHU de Nancy à l'aide d'un ABI PRISM®310 (Perkin Elmer).

IV. Résultats et discussion

A. Identification de bandes IgE-réactives

Le choix de l'extrait protéique de cabillaud à étudier a été dicté par la volonté d'avoir une cartographie de référence précise. C'est pourquoi l'extrait de cabillaud *pre rigor mortis* a été utilisé. En effet ce poisson n'a pas subi de dégradation *post mortem* et a pu servir à ce titre de référence.

1. Mise en place des outils

Les IgE spécifiques dirigées contre les allergènes de cabillaud des patients ont été dosées par RIA (radioimmunoassay) avec des disques de nitrocellulose où ont été fixées les protéines de cabillaud *pre rigor mortis*. Ces disques ont été préparés par Allerbio (Varennes-en-Argonne, France). Les douze sérums de patients allergiques au cabillaud qui étaient à notre disposition avaient un rapport du pourcentage de fixation des anti-IgE radioactifs sur celui des séra de patients non allergiques supérieur à trois (tableau II). Les rapports étaient compris entre 3,5 et 31,7. Ceci indiquait que ces sérums possédaient des IgE spécifiques dirigées contre les protéines de cabillaud. La valeur moyenne du pourcentage de la fixation de la radioactivité pour les neuf sérums de sujets non allergiques était de 2,3 ± 0,7 %. Par ailleurs le dosage des IgE spécifiques au cabillaud était également réalisé par la technique CAP-RAST de Pharmacia (Uppsala, Sweden) ; les résultats positifs de ces dosages confirmaient les résultats obtenus avec le dosage RIA.

Tableau II : Résultats des dosages des IgE spécifiques de patients allergiques au cabillaud par CAP-RAST (f3) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) et par RIA avec des disques de nitrocellulose où sont adsorbées des protéines de cabillaud *pre rigor mortis*. Les disques ont été préparés par Allerbio (Varennes-en-Argonne, France).

Patient	Age (ans)	Dosage des IgE spécifiques au cabillaud par CAP-RAST f3 (Pharmacia)		Adsorption des IgE sur les disques de nitrocellulose de cabillaud	
		Taux d'IgE spécifiques (kUI/l)	classe	% radioactivité fixée	Ratio patient/contrôles
CJ	13	5.3	3	42	18.3
MM	5	8.3	3	63	27.4
DW	55	92.9	4	52	22.6
CJ2	13	3.3	2	37	16.1
DM	4	3.7	3	36	15.6
SS	44	1.9	2	8	3.5
RY	18	63.2	4	73	31.7
LD	17	Non déterminé		11	4.8
SC	5	3.9	3	35	15.2
BJ	1	9.8	3	45	19.6
BM	13	4.4	3	37	16.1
EC	7	4.3	3	44	19.1

Dans tous les cas les dosages RIA ont donné un rapport patient / sujets non allergiques supérieur à trois, ce qui indiquait la présence d'IgE spécifiques dans le sérum du patient. Le pourcentage moyen de la radioactivité fixée sur les disques de nitrocellulose pour les neuf sera des sujets non allergiques était de 2,3 ± 0,7 (valeur maximale : 3,1 et valeur minimale : 1,2).

Les protéines de cabillaud *pre rigor mortis* ont été extraites dans un tampon phosphate 0,07 M, pH 7,0 avec ou sans 0,6 M NaCl. Les protéines sarcoplasmiques étaient essentiellement extraites à faible force ionique. Les protéines myofibrillaires étaient extraites en plus des protéines sarcoplasmiques avec 0,6 M NaCl. Les deux extraits ont été analysés par inhibition du dosage des IgE spécifiques au cabillaud du patient CJ. Les courbes d'inhibition étaient superposables et la concentration protéique de 1 mg/l inhibait 50 % des IgE spécifiques au cabillaud dans les deux cas (figure 11). Ceci montrait que les deux extraits avaient la même allergénicité.

La mise en place de la technique de l'immunoempreinte a été délicate. Les protéines de l'extrait de cabillaud *pre rigor mortis* ont été séparées par électrophorèse PAGE-SDS, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Puis elles ont été étudiées avec le sérum du patient CJ. Lorsque la gélatine, le lait en poudre ou la BSA ont été utilisés comme agent saturant de la membrane aucune bande protéique n'a été mise en évidence. Lorsque des aliquots du sérum du patient CJ ont été incubés dans une solution contenant une concentration croissante en agent saturant, avant d'être incubés avec les disques de nitrocellulose, le pourcentage de fixation des anti-IgE radioactifs sur les disques variait (figure 12). Dans les trois cas les IgE fixées sur les disques étaient augmentés. Mais contrairement à l'incubation du sérum avec les extraits protéiques de cabillaud (figure 11) l'aspect des courbes montrait qu'il existait des interactions non spécifiques entre les IgE spécifiques au cabillaud et la gélatine, le lait en poudre ou la BSA. Il est à noter aussi que les concentrations pour les inhibitions avec les agents saturants étaient fortes par rapport à celles des extraits protéiques de cabillaud. En effet les concentrations utilisées ici étaient de l'ordre de 1 mg/ml, alors que 1 mg/l de protéines de cabillaud inhibait 50 % du dosage des IgE spécifiques au cabillaud.

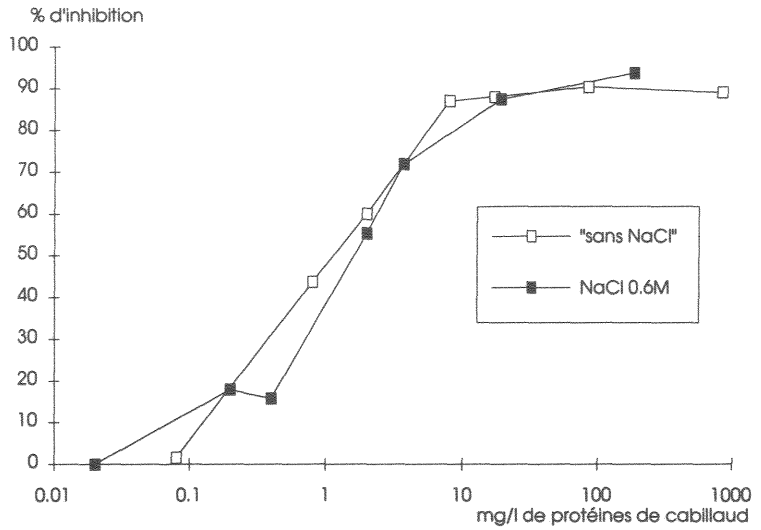


Figure 11 : Inhibition du dosage RIA des IgE spécifiques des protéines de cabillaud après incubation du sérum du patient CJ avec des concentrations croissantes de protéines de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues dans deux conditions différentes : extraction dans un tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 et dans un tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 contenant 0,6 M NaCl.

Les deux courbes ont été superposables, ce qui montrait que les deux extraits avaient la même allergénicité. Dans les deux cas la concentration de 1 mg/l inhibait 50 % des IgE spécifiques au cabillaud du sérum du patient CJ.

Le Tween 20 a finalement été utilisé comme agent de saturation (Vieths *et al*, 1994). Six bandes protéiques IgE-réactives de masses moléculaires apparentes de 12, 19, 29, 39, 62 et 104 kDa ont été révélées (figure 13).

La technique d'immunoempreinte était ainsi optimisée en limitant les interactions non spécifiques entre les IgE dirigées contre le cabillaud et l'agent de saturation de la membrane de nitrocellulose.

2. Séparation des protéines de cabillaud *pre rigor mortis* par chromatographie échangeuse d'anions (DEAE)

Les outils de détection des allergènes étaient en place. La cartographie des bandes IgE-réactives a donc pu être réalisée. Le fait de séparer les protéines par chromatographie était un facteur favorisant la précision de la cartographie. C'est pourquoi les protéines de l'extrait de cabillaud *pre rigor mortis* ont été séparées par chromatographie échangeuse d'anions avec le support DEAE Sepharose®CL 6B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) en référence à la purification de l'allergène Gad c I (Aas, 1967). L'extrait obtenu sans NaCl a été injecté sur la colonne. En effet les courbes d'inhibition des IgE spécifiques au cabillaud avec les protéines de cabillaud *pre rigor mortis* solubilisées avec ou sans NaCl 0,6 M étaient superposables (figure 11). Ces deux extraits avaient donc la même allergénicité. Plusieurs gradients de NaCl ont été étudiés : gradient continu entre 0 et 1 M NaCl sur trois volumes de colonne, gradients discontinus. La meilleure séparation a été obtenue avec un gradient discontinu ; le gradient passait de 0 à 1 M NaCl par des augmentations périodiques de 0,1 M NaCl à chaque volume de colonne (figure 14). Le flux était de 1 ml/min et les fractions étaient collectées par volume de 5 ml.

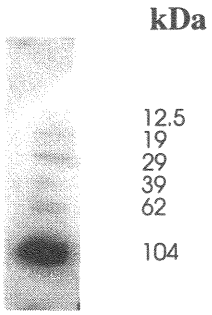
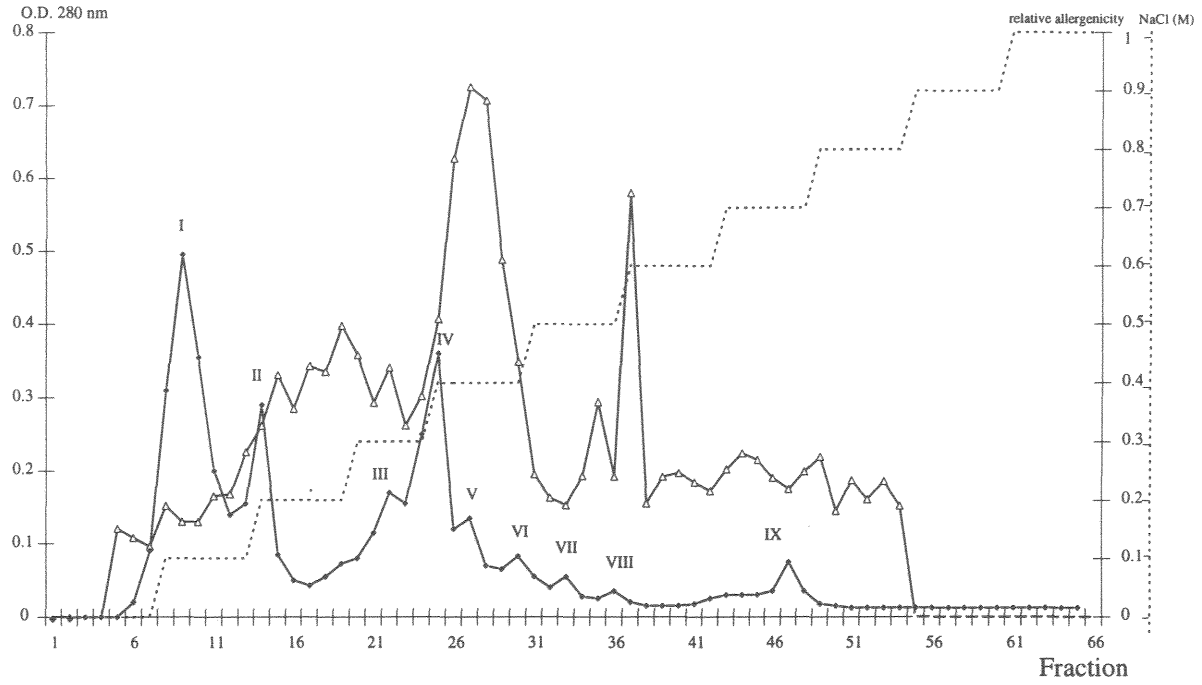


Figure 13 : Western-blot réalisé avec le sérum CJ et les protéines de l'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis*. Le tween 20 était l'agent bloquant. Dix microgrammes de protéines ont été déposées.

Six bandes IgE-réactives de masses moléculaires apparentes variant de 12,5 à 104 kDa ont été détectées. Celle de 12,5 kDa pourrait correspondre à l'allergène majeur du cabillaud Gad c I.



<u>Figure 14</u> : Séparation des protéines de cabillaud *pre rigor mortis* par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-sepharose et allergénicité relative des fractions obtenues.

◆ Elution des protéines suivie par lecture de l'absorbance à 280 nm

Δ Allergénicité relative déterminée par dot-blot avec un mélange de douze séra de patients allergiques au cabillaud

--- Gradient en NaCl

Neuf pics ont été obtenus. Les pics III, V et VIII avaient les allergénicités relatives les plus élevées.

Trois pics majoritaires (I, II et IV) et six pics minoritaires (III, V, VI, VII, VIII et IX) ont été obtenus. Aas n'avait séparé son extrait protéique de cabillaud qu'en deux pics (Aas, 1967). Ainsi la séparation décrite ici était beaucoup plus fine puisque neuf pics ont été obtenus.

Les pics ont été analysés par électrophorèse PAGE-SDS (figure 15). Chaque fraction collectée a été analysée par dot-blot en utilisant pour la révélation 250 µl de mélange dilué dix fois des douze sérums de patients allergiques au cabillaud ; ils contenaient des IgE spécifiques dirigés contre le cabillaud. Les allergénicités relatives les plus fortes ont été observées pour les pics III, IV, V et VIII (figure 14). Par ailleurs des immunoempreintes ont été réalisées avec les protéines de chacun des pics élués, ainsi qu'avec l'extrait protéique brut de cabillaud *pre rigor mortis*. Le mélange des douze sérums de patients allergiques utilisé pour le dot-blot était également employé lors de la réalisation des immunoempreintes. Un millilitre de mélange dilué dix fois a été utilisé par extrait ou fraction protéique.

Huit bandes IgE-réactives de masses moléculaires apparentes de 12, 22, 30, 45, 60, 67, 104 et 130 kDa ont été détectées dans l'extrait brut (figure 16, tableau III). Les bandes de 12, 30 et 67 kDa avaient les intensités les plus fortes. La bande de 12 kDa était présente dans les neuf fractions de la chromatographie. Il pouvait s'agir de Gad c I, ou d'autres isoformes de parvalbumines (Gazzaz *et* Rasco, 1993). Les bandes de 104 et 130 kDa étaient plus intenses dans les fractions IV et V que dans l'extrait brut. Les bandes de 13, 23, 25, 41, 49, 55 et 80 kDa étaient détectées dans les fractions obtenues après la chromatographie, mais pas dans l'extrait brut. La bande de 13 kDa pouvait correspondre à une isoforme de parvalbumine.

Ainsi notre étude a permis de mettre en évidence quinze bandes IgE-réactives du cabillaud, dont les masses moléculaires apparentes variaient de 12 à 130 kDa (figure 17).

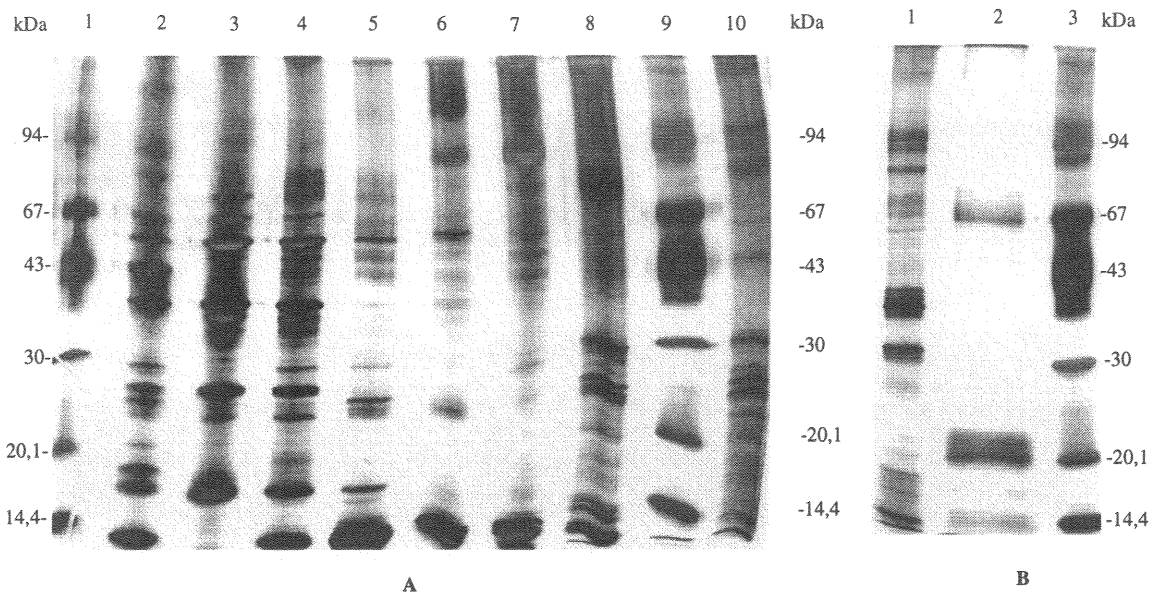


Figure 15 : Electrophorèse PAGE-SDS des fractions protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues par chromatographie DEAE. Gel de polyacrylamide 10 – 20 % coloré à l'argent.

Gel A : piste 1 : marqueur de taille ; piste 2 : extrait brut ; piste 3 : pic DEAE I ; piste 4 : pic DEAE II ; piste 5 : pic DEAE III ; piste 6 : pic DEAE IV ; piste 7 : pic DEAE V ; piste 8 : pic DEAE VI ; piste 9 : marqueur de taille ; piste 10 : pic DEAE VII. **Gel B** : piste 1 : pic DEAE VIII ; piste 2 : pic DEAE IX ; piste 3 : marqueur de taille.

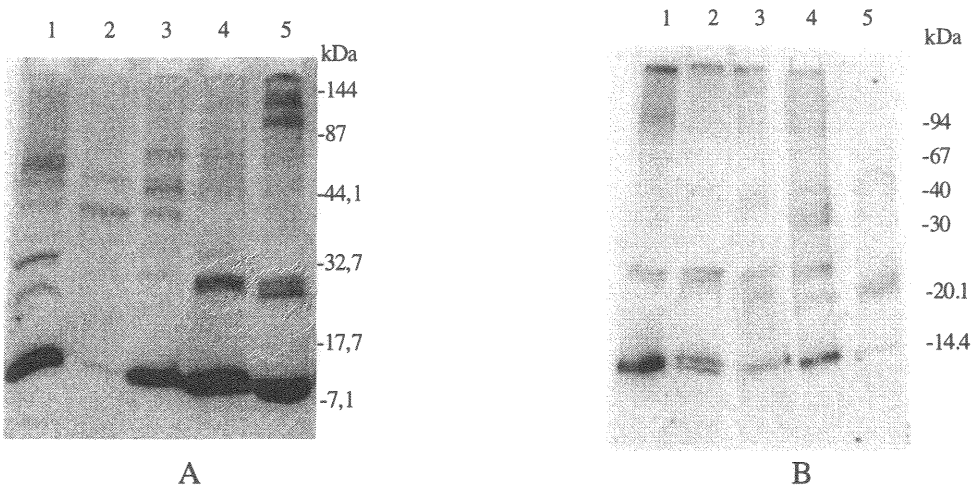


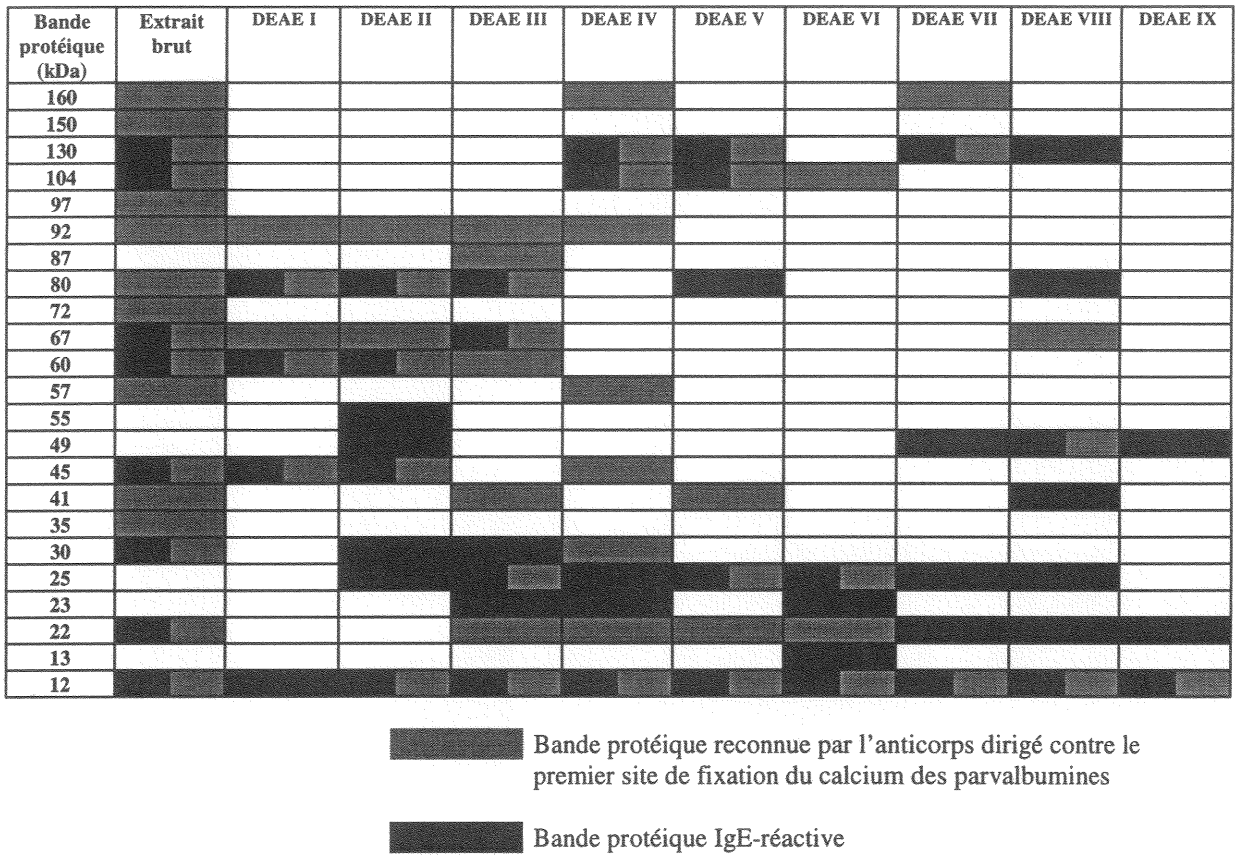
Figure 16 : Bandes protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* reconnues par les IgE d'un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud dans l'extrait brut et dans les pics protéiques obtenues par chromatographie DEAE.

Dix microgrammes de protéines ont été déposées par extrait ou fraction.

Gel A : Piste 1 : extrait protéique brut de cabillaud *pre rigor mortis* ; piste 2 : pic DEAE I ; piste 3 : pic DEAE II ; piste 4 : pic DEAE III ; piste 5 : pic DEAE IV. **Gel B :** Piste 1 : pic DEAE V ; piste 2 : pic DEAE VI ; piste 3 : pic DEAE VII ; piste 4 : pic DEAE VIII ; piste 5 : pic DEAE IX.

L'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis* était constitué de quinze bandes IgE-réactives dont les masses moléculaires aparentes variaient de 12 à 130 kDa : huit bandes ont été détectées dans l'extrait non séparé par chromatographie DEAE, et sept bandes supplémentaires ont été détectées dans les fractions chromatographiques.

<u>Tableau III</u> : Distribution des bandes protéiques détectées par les IgE d'un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud ainsi que par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium des parvalbumines dans les différentes fractions obtenues par chromatographie DEAE et dans l'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis*.



L'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis* était composé de quinze bandes IgE-réactives : huit bandes ont été détectées dans l'extrait non séparé par chromatographie, et sept bandes supplémentaires ont été détectées dans les fractions chromatographiques. Les masses moléculaires apparentes de ces bandes variaient entre 12 et 130 kDa.

Des bandes de mêmes masses moléculaires apparentes que les bandes IgE-réactives détectées dans l'extrait brut non séparé par chromatographie et que trois bandes IgE-réactives (25, 49 et 80 kDa) détectées dans les fractions DEAE ont été reconnues par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium des parvalbumines.

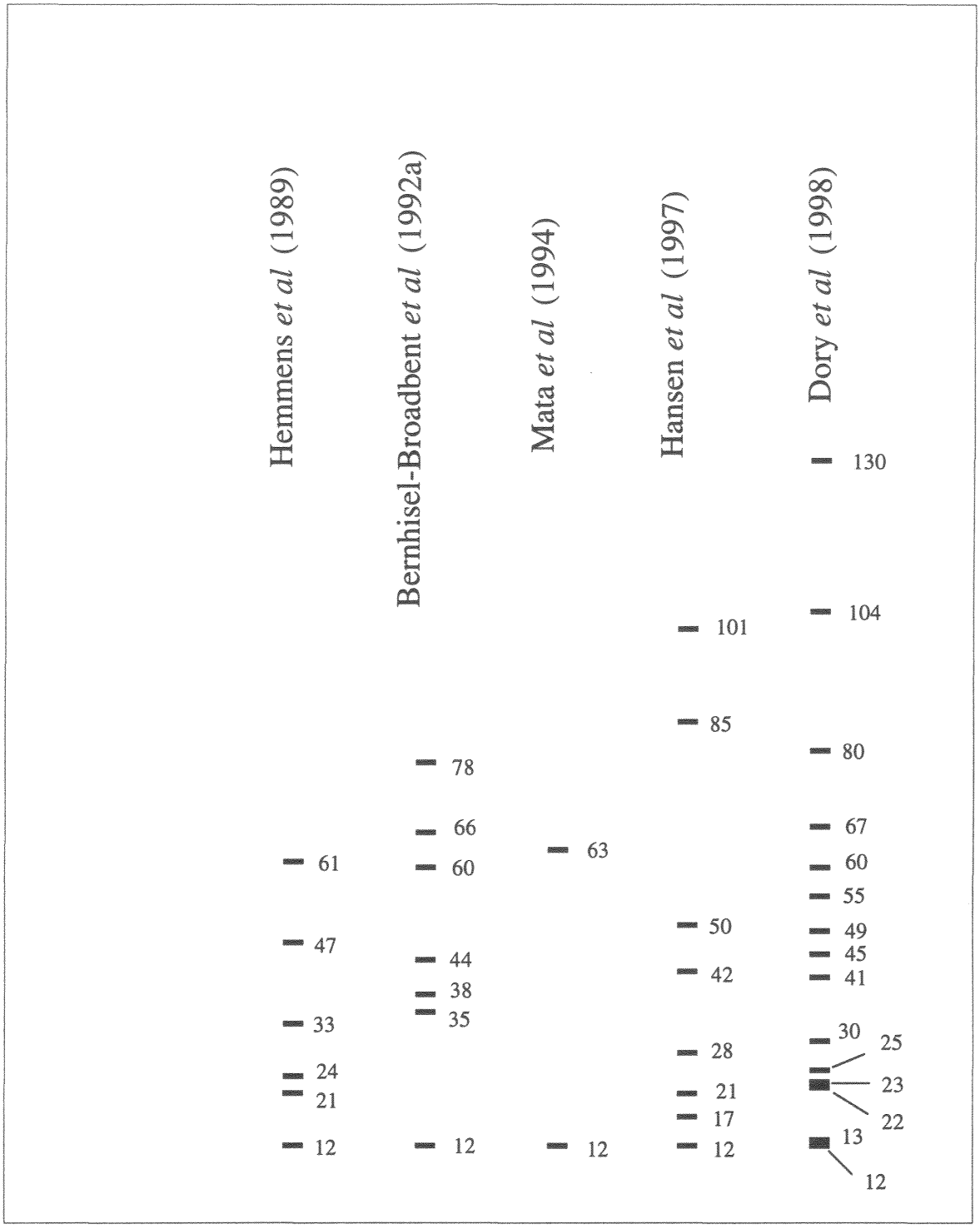


Figure 17 : Comparaison entre les distributions de bandes IgE-réactives du cabillaud réalisées dans différentes études.

Les masses moléculaires apparentes sont indiquées en kDa.

Pour cette présente étude (Dory *et al*) le profil présenté synthétise les résultats obtenus avec l'extrait brut non séparé par chromatographie ainsi que les résultats obtenus avec les différentes fractions DEAE.

Les études réalisées sur ce sujet avant notre travail n'ont permis de mettre en évidence que six (Hemmens *et al*, 1989), sept (Bernhisel-Broadbent *et al*, 1992a) ou huit bandes IgE-réactives (Hansen *et al*, 1997). Notre cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud était la plus complète réalisée jusqu'à ce jour. Il est à noter que, hormis les bandes de 130 et de 55 kDa, les autres bandes détectées au cours de notre étude avaient une masse moléculaire apparente proche de bandes détectées dans les études précédentes. Ainsi, par exemple, nous avons mis en évidence une bande de 80 kDa et l'équipe de Bernhisel-Broadbent (1992a) a mis en évidence une bande de 78 kDa. Nous ne pouvons pas affirmer que ces deux bandes soient les mêmes, mais, compte tenu des différences de modes opératoires (concentration en acrylamide, concentration en sels, marqueurs de masses moléculaires, ...) et des erreurs de mesure inévitables, nous pouvons penser que ces bandes soient les mêmes. De même nous avons fait les rapprochements pour les autres bandes détectées dans notre étude. Par contre nous n'avons pas mis en évidence de bandes de masses moléculaires apparentes proches des bandes de 35, 38 et 85 kDa qui ont été décrites dans les études précédentes. Ceci montre donc que bien que ce soit la cartographie la plus complète notre étude n'a pas mis en évidence toutes les bandes IgE-réactives du cabillaud. Ceci est du au fait que les sérums utilisés dans notre étude et ceux utilisés dans les études précédentes étaient différents. Les épitopes reconnus par les IgE de ces séra n'étaient pas forcément les mêmes.

Les pics protéiques III, IV, V et VIII obtenus par chromatographie DEAE avaient les allergénicités relatives les plus fortes (figure 14). D'après la figure 16, l'augmentation de l'allergénicité relative du pic III devait être due aux bandes de 12 et 30 kDa puisque ces bandes apparaissaient plus intenses dans ce pic. L'augmentation de l'allergénicité relative pour les pics IV et V devait être due aux bandes de 12, 104 et 130 kDa puisque ces trois bandes apparaissaient plus intenses dans ces pics. L'augmentation observée pour le pic VIII pouvait être due aux bandes de 30 et 41 kDa, qui étaient plus intenses dans ce pic.

Trois facteurs ont contribué à obtenir une cartographie des bandes IgE-réactives plus complète : l'optimisation des immunoempreintes, la séparation des protéines par chromatographie et le fait qu'un mélange de douze sérums ait été utilisé. Bien entendu cette démarche ne permettait pas de classer les allergènes en allergènes mineurs et majeurs, mais le but du travail était d'établir dans un premier temps une liste des bandes IgE-réactives servant de base pour la suite du travail. Dans un second temps il est envisagé d'opérer cette classification.

Chaque pic protéique DEAE ainsi que l'extrait brut de cabillaud ont été analysés par immunoempreinte en utilisant un anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium sur les parvalbumines (Tinner *et al*, 1990) (Sigma, clone PA-235) (figure 18, tableau III). Cet anticorps était utilisé car Gad c I, l'allergène majeur du cabillaud, était une parvalbumine. De plus l'épitope reconnu par cet anticorps était un site allergénique de Gad c I. Pour toutes les bandes IgE-réactives détectées dans l'extrait brut non séparé par chromatographie il existait une bande de même masse moléculaire apparente reconnue par l'anticorps dirigé contre les parvalbumines. Nos conditions expérimentales ne nous permettaient pas de dire si les bandes reconnues par cet anticorps étaient les mêmes que les bandes IgE-réactives. C'est pourquoi le terme de « bande de même masse moléculaire apparente » est utilisé.

Les bandes de 25, 41, 49 et 80 kDa qui n'étaient détectées par les IgE que dans les pics DEAE avaient également des bandes de mêmes masses moléculaires apparentes détectées par cet anticorps. Enfin des bandes non détectées par les IgE ont été reconnues par cet anticorps ; c'était le cas des bandes de 57, 72, 87, 92, 97, 150 et 160 kDa.

En résumé les bandes IgE-réactives de masses moléculaires apparentes de 12, 22, 25, 30, 41, 45, 49, 60, 67, 80, 104 et 130 kDa avaient des bandes de mêmes tailles reconnues par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium de type main EF des parvalbumines (figure 19).

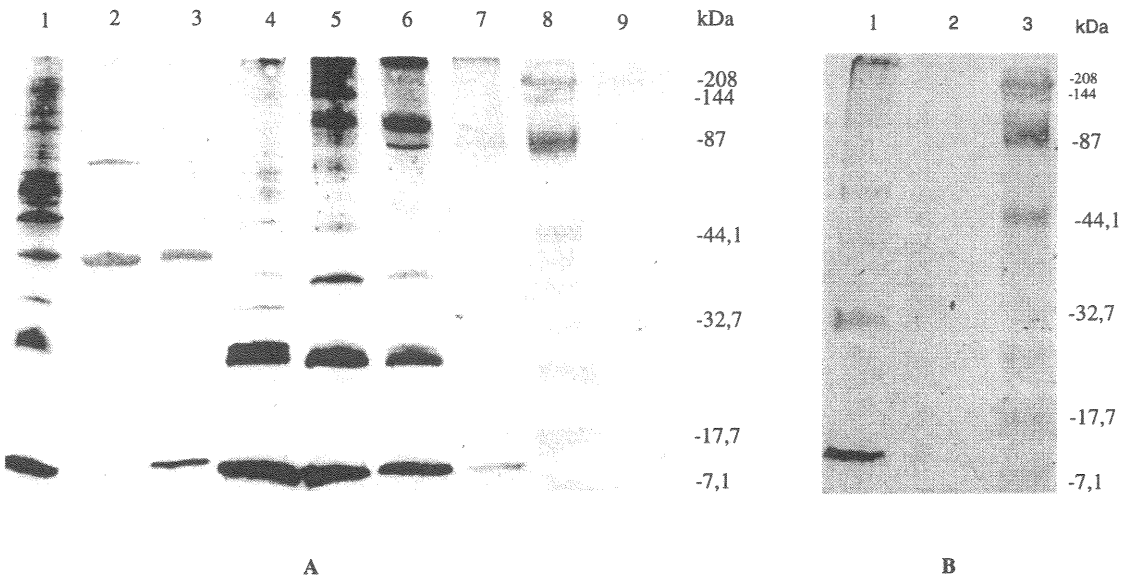


Figure 18 : Bandes protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* reconnues par un anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium sur les parvalbumines. Les protéines des neuf pics DEAE et de l'extrait brut ont été analysées. Dix microgrammes de protéines ont été séparées par électrophorèse PAGE-SDS sur gel de polyacrylamide 10 - 20 %.

Membrane A : Piste 1 : extrait brut; piste 2 : pic DEAE I ; piste 3 : pic DEAE II ; piste 4 : pic DEAE III ; piste 5: pic DEAE IV ; piste 6 : pic DEAE V ; piste 7 : pic DEAE VI ; piste 8 : marqueur de taille ; piste 9 : pic DEAE VII ; **membrane B :** piste 1 : pic DEAE VIII ; piste 2 : pic DEAE IX ; piste 3 : marqueur de taille.

Dix huit bandes protéiques, dont les masses moléculaires apparentes variaient de 12 à 160 kDa, ont été reconnues par l'anticorps anti-parvalbumine.

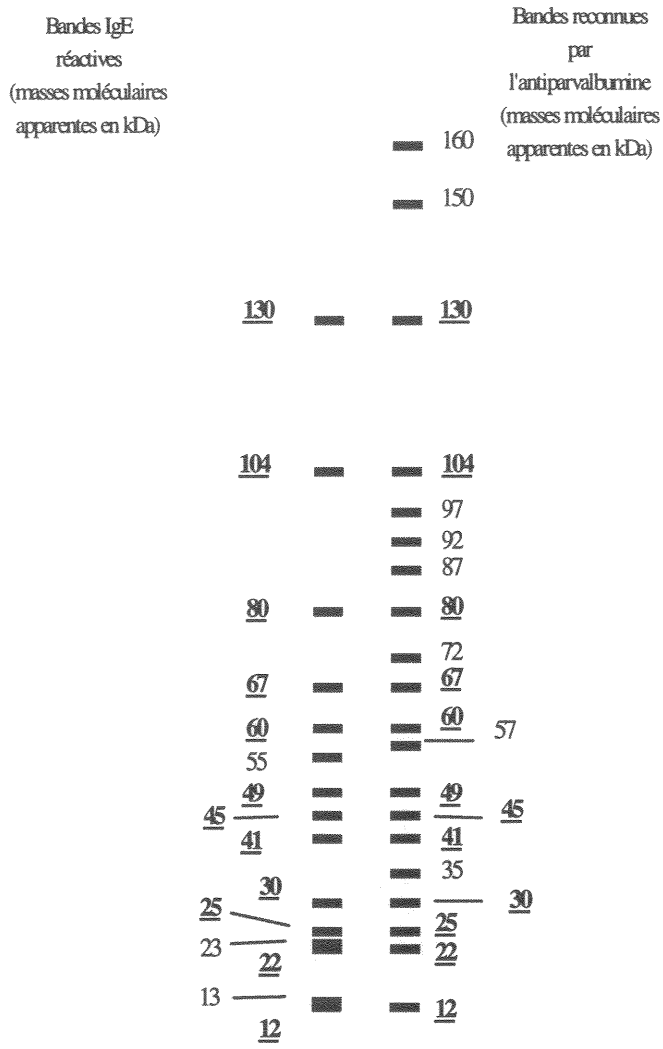


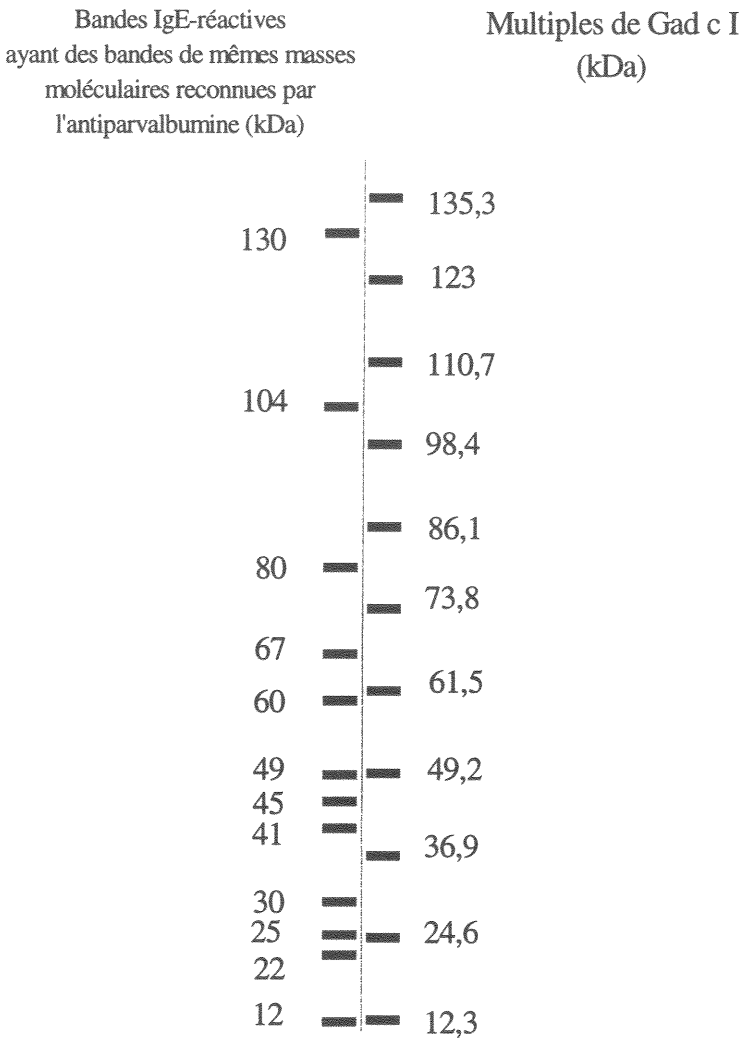
Figure 19 : Bandes IgE-réactives du cabillaud et bandes reconnues par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium des parvalbumines.

Ces deux profils synthétisent les résultats obtenus avec l'extrait brut de cabillaud non séparé par chromatographie et ceux obtenus pour les différentes fractions obtenues par chromatographie DEAE

Ces résultats nous ont permis de formuler trois hypothèses concernant ces bandes IgE-réactives du cabillaud. La première hypothèse est que certaines de ces bandes correspondent à des oligomères ou des agrégats de l'allergène Gad c I. La seconde hypothèse repose sur la possibilité que Gad c I se soit adsorbé à certaines protéines. Enfin, troisième hypothèse, il existerait un site antigénique commun correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I entre certaines de ces bandes IgE-réactives.

Il est à noter que l'équipe de Elsayed a montré que les bandes IgE-réactives du cabillaud de masses moléculaires apparentes de 12, 21, 24, 33, 47 et 61 kDa, dont les tailles ont été déterminées d'après leurs conditions expérimentales, avaient des bandes de même taille reconnues par deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'allergène Gad c I (Hemmens *et al*, 1989) (tableau I). Les épitopes reconnus par ces anticorps n'étaient pas connus. Cette équipe a montré aussi que les IgE dirigés contre Gad c I reconnaissaient les bandes de masses moléculaires apparentes de 17, 21, 24 et 47 kDa. Là aussi les épitopes reconnus par les IgE n'étaient pas connus. Il n'existait pas d'éléments pouvant nous permettre de répondre à nos interrogations dans les résultats de cette équipe, mais ces résultats nous ont fait aboutir aux mêmes hypothèses formulées plus haut.

Pour pouvoir apporter un premier élément de réponse nous avons simulé le résultat d'une électrophorèse PAGE-SDS avec des multiples de Gad c I, correspondant à des polymères ou des agrégats de Gad c I (figure 20). La masse moléculaire de Gad c I est de 12,3 kDa. Ce profil a été confronté à la distribution des bandes IgE-réactives du cabillaud ayant une bande de même masse moléculaire apparente détectée par l'antiparvalbumine obtenue expérimentalement par immunoempreintes. Le profil théorique des agrégats de Gad c I était très nettement différent de celui obtenu par immunoempreintes.



<u>Figure 20</u> : Comparaison entre la distribution des bandes IgE-réactives du cabillaud ayant une bande de même masse moléculaire apparente reconnue par l'antiparvalbumine et la distribution théorique des polymères ou agrégats de l'allergène majeur du cabillaud Gad c I. Gad c I est une parvalbumine d'une masse moléculaire de 12,3 kDa.

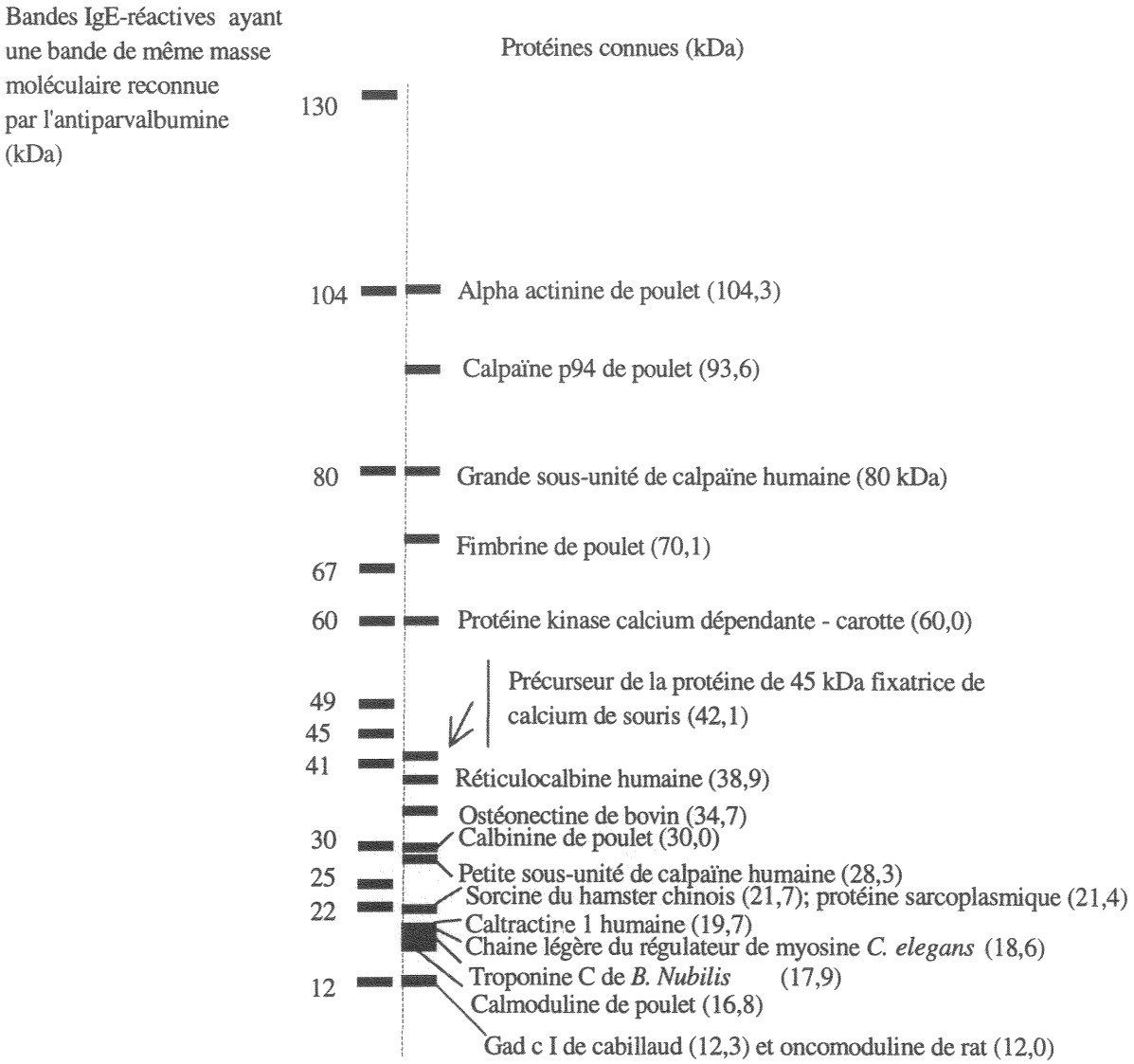
Il apparaît donc que certaines de ces bandes pourraient correspondre à des agrégats de Gad c I ; il s'agit des bandes de 25, 49, 60 et 130 kDa. Par contre les autres bandes avaient des masses moléculaires apparentes différentes des celles d'agrégats hypothétiques de Gad c I, et ne correspondaient pas à des agrégats de cet allergène. Ces constations n'excluaient nullement l'hypothèse que Gad c I se soit adsorbé à d'autres protéines, ni qu'il existerait d'autres bandes protéiques possédant un épitope correspondant au premier site de fixation du calcium sur Gad c I.

D'après la littérature les parvalbumines, et Gad c I en particulier, appartiennent à une famille de protéines ayant le site de liaison du calcium de type main EF en commun. Ce site fait partie d'un épitope reconnu par les IgE sur Gad c I (Elsayed *et* Apold, 1983). C'est pourquoi il est apparu opportun de référencer, dans la littérature, certaines bandes protéiques fixatrices du calcium, susceptibles de se trouver dans le muscle de cabillaud, et possédant le site de fixation de type main EF.

Sur la figure 21 est présenté le profil théorique obtenu avec différentes bandes fixatrices du calcium. Ce profil a été mis en parallèle avec la distribution des bandes IgE-réactives ayant des bandes de mêmes masses moléculaires apparentes reconnues par l'antiparvalbumine. Pour la plupart des bandes IgE-réactives il existait des bandes de masses moléculaires voisines possédant au moins un site de fixation du calcium de type main EF.

Ainsi la bande IgE-réactive de 12 kDa avait une masse moléculaire apparente voisine de celle de Gad c I (12,3 kDa) (Elsayed *et al*, 1975).

La bande de 22 kDa avait une masse moléculaire proche de la sorcine du hamster chinois (21,7 kDa) (Van der Brick *et al*, 1986). La sorcine, qui a une forte affinité pour le calcium, possède quatre sites de fixation du calcium du type main EF, et se situe dans le cytoplasme. Le rôle de cette protéine est inconnu.



<u>Figure 21</u> : Comparaison entre le profil des bandes IgE-réactives du cabillaud ayant des bandes de mêmes masses moléculaires apparentes reconnues par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium de Gad c I et un profil théorique de protéines possédant au moins un site de fixation du calcium de type main EF.

Une autre protéine de masse moléculaire voisine de 22 kDa a été détectée dans le sarcoplasme (SCP I) de crustacés (*Branchiostoma lanceolatum*) (21,4 kDa) (Takagi *et* Cox, 1990). Cette protéine est plus abondante dans les muscles à contraction rapide ; elle possède trois sites de liaison du calcium et un quatrième site qui a perdu son activité de liaison.

La petite sous-unité de la calpaïne humaine (Suzuki *et al*, 1986) a une masse moléculaire de 28,3 kDa. Cette masse moléculaire est voisine de celle de la bande IgE-réactive de 30 kDa. Les calpaïnes sont des protéases activées par le calcium ; la petite sous-unité, qui possède deux sites de fixation du calcium, est l'un des constituants d'un hétérodimère ; la grande sous-unité de l'hétérodimère a une masse moléculaire de 80 kDa environ.

La calbidine de poulet (Fullmer *et* Wasserman, 1987), qui est une protéine de liaison du calcium vitamine D dépendante, a une masse moléculaire de 30,0 kDa proche également de celle de la bande de IgE-réactive de 30 kDa. Elle possède quatre sites de liaison du calcium. Elle stimulerait une ATPase membranaire.

La réticulocalbine humaine (39,8 kDa) (Ozawa *et* Ozawa, 1995), qui a quatre sites de fixation du calcium, a une masse moléculaire voisine de la bande IgE-réactive de 41 kDa. Cette protéine régule les activités calcium dépendantes du réticulum endoplasmique lumen.

Par ailleurs le précurseur de la protéine de 45 kDa fixatrice du calcium de la souris (42,1 kDa) (Scherer *et al*, 1996) a également une masse moléculaire voisine de celle de la bande de 41 kDa.

Il a été trouvé chez les végétaux une protéine kinase calcium dépendante de 60 kDa (Ki-Ling Suen *et* Choi, 1991) qui jouerait un rôle dans la transduction d'un signal où le calcium est un messager secondaire. Cette protéine possède quatre sites de liaison du calcium. Il existe plusieurs isoformes de cette protéine. Bien que cette protéine n'ait pas été décrite chez les animaux il nous est apparu important de la citer ici car il a été mis en évidence une

bande IgE-réactive de 60 kDa. Compte tenu de la similitude de masse moléculaire constatée ici, cette protéine pourrait exister chez les animaux.

La fimbrine du poulet (70,1 kDa) (Arruda (de) *et al*, 1990) a une masse moléculaire proche de celle de la bande de 67 kDa. Cette protéine se lie à l'actine et possède deux sites de fixation du calcium.

La grande sous-unité de la calpaïne humaine a une masse moléculaire de 80 kDa (Imajoh *et al*, 1988). Cette protéine a deux sites de liaison du calcium. Il a été trouvé une bande IgE-réactive de masse moléculaire proche (80 kDa).

Enfin l'alpha-actinine de poulet a une masse moléculaire de 104,3 kDa (Baron *et al*, 1987). Cette protéine possède deux sites de fixation du calcium de type main EF. Cette protéine se fixe à l'actine, et servirait à ancrer l'actine à des structures intracellulaires. La taille de cette protéine est voisine de celle de la bande IgE-réactive de 104 kDa.

Il existe encore d'autres protéines possédant ce domaine de fixation du calcium main EF : calmoduline de poulet (16,8 kDa) (Stein *et al*, 1983), troponine C de balane (17,9 kDa) (Collins *et al*, 1991), chaîne légère du régulateur de la myosine de *Caenorhabditis elegans* (18,6 kDa) (Cummins *et* Anderson, 1988), caltractine humaine (19, 7 kDa) (Lee *et* Huang, 1992), osteonectine de bovin (34,7 kDa) (Bolander *et al*, 1988), calpaïne p94 (Sorimachi *et al*, 1995), ...

Il est intéressant de noter que pour les bandes IgE-réactives de 25, 49 et 130 kDa aucune bande de masse moléculaire proche n'a été retrouvée. D'après la figure 20 ces bandes pourraient correspondre respectivement à des dimères, tétramères ou undécamères de Gad c I.

Le but de cette énumération n'était pas d'attribuer à chaque bande IgE-réactive ayant une bande reconnue par l'antiparvalbumine de même taille un nom et une fonction, mais de mettre en évidence qu'il existe des protéines qui ont des sites de fixation du calcium de type main EF qui ont des tailles proches de ces bandes IgE-réactives. Ces protéines pourraient

correspondre aux protéines reconnues par les IgE, tout comme il pourrait s'agir d'autres protéines. Ceci montre que ces bandes IgE-réactives pourraient correspondre à des bandes protéiques distinctes de Gad c I, tout en possédant ce site de fixation du calcium de type main EF.

Ainsi ce site de fixation du calcium de type main EF pourrait être un déterminant allergénique commun à certaines de ces bandes. Ceci a déjà été vérifié pour les parvalbumines de différentes espèces de poisson. En effet les parvalbumines, parce qu'elles sont très conservées, entraînent des réactions d'allergies croisées entre les différentes espèces de poisson. Elsayed a montré qu'un des sites reconnus par les IgE sur les parvalbumines se situe au niveau du premier site de fixation du calcium (Elsayed *et* Apold, 1983). De plus il a montré que les IgE d'un patient dirigés contre Gad c I reconnaissait les bandes de masses moléculaires apparentes de 17, 21, 24 et 47 kDa (Hemmens *et al*, 1989). Le ou les sites reconnus par les IgE n'étaient pas connus, mais ce résultat prouvait l'existence d'un ou de plusieurs épitopes communs à Gad c I et à d'autres bandes IgE-réactives. Par ailleurs ce site de fixation du calcium a été retrouvé sur certains allergènes de pollen. L'allergène Bet v 4 (8 kDa) du pollen de bouleau possède deux sites de fixation du calcium de type main EF (Engel *et al*, 1997 ; Twardosz *et al*, 1997). De même l'allergène Cyn d 7 (12 kDa) de l'herbe des Bermudes (Smith *et al*, 1997), l'allergène Bra r 1 du pollen de colza, l'allergène Bra n 1 du pollen de navet, les allergènes Cynd B 4 et Cynd B 1 du pollen de dactyle (fougère) (Engel *et al*, 1997) possèdent ces deux sites de fixation du calcium de type main EF.

L'ensemble de ces résultats montre que le site de fixation du calcium de type main EF est retrouvé dans le règne animal et dans le règne végétal. Par ailleurs ce site est site reconnu par les IgE sur les parvalbumines ; ce site fait parti d'autres allergènes de pollen. Ainsi il est tout à fait plausible que ce site soit un site commun à de nombreuses protéines responsables d'allergies croisées entre les aliments et les pollens.

Les données récentes de la littérature concernant les allergènes de pollen possédant le site de fixation du calcium de type main EF permettent d'apporter une explication au fait que Aas ait trouvé que 6,9 % des enfants asthmatiques suivis dans son service avaient des IgE dirigés contre le poisson (Aas, 1966). Ce chiffre est élevé puisque pour l'ensemble de la population enfantine il y a moins de 10 % des enfants qui soient allergiques aux aliments. Or ici, il s'agit d'un seul aliment. En effet un épitope correspondant au site de fixation du calcium de type main EF pourrait expliquer les réactions croisées entre les allergènes de pollen et les allergènes de poisson observées par Aas.

En conclusion le site de fixation du calcium est un site retrouvé dans de nombreuses protéines. Ce site est conservé, et il a été montré que ce site était responsable des allergies croisées entre les différentes espèces poissons. Du point de vue évolution ce site est remarquablement conservé. Donc si ce site est conservé dans le règne animal et dans le règne végétal, ce site peut être conservé aussi à l'intérieur d'une même espèce, et cela dans plusieurs protéines. Ce site est reconnu par les IgE sur la parvalbumine de cabillaud Gad c I. Donc certaines bandes IgE-réactives du cabillaud pourraient posséder ce type de site de fixation du calcium.

Nous ne pourrons apporter de réponse formelle à ces hypothèses que lorsque nous aurons accès à la séquence primaire de ces bandes.

3. Influence du calcium sur la distribution relative des bandes IgE-réactives de l'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis*

Pour pouvoir étudier l'influence du calcium sur les bandes IgE-réactives reconnues par l'anticorps dirigé contre les parvalbumines, l'extrait protéique brut de cabillaud *pre rigor mortis* a été incubé durant la nuit à 4°C avec ou sans 5 mM d'EDTA. L'EDTA est un chélateur du calcium entre autres.

Les mêmes bandes IgE-réactives étaient détectées par immunoempreintes avec le mélange des douze séra de patients allergiques au cabillaud pour ces deux extraits à savoir les bandes de masses moléculaires apparentes de 12, 22, 30, 45, 60, 67, 104 et 130 kDa (figure 16 piste 1, figure 22 piste 3, figure 23). Cependant, en présence d'EDTA, l'intensité relative de la bande de 30 kDa était plus faible qu'en l'absence d'EDTA. Les intensités des bandes de 60, 104 et 130 kDa étaient augmentées en présence d'EDTA. Le fait que les intensités relatives des bandes de 30, 60, 104 et 130 kDa aient été modifiées lorsque l'extrait était incubé avec 5 mM EDTA laissait supposer que ces bandes avaient une conformation liée à la présence du calcium.

Ce résultat est à mettre en parallèle avec les résultats précédents : les bandes de 30, 60 et 104 kDa ont chacune une bande de même masse moléculaire reconnue par l'antiparvalbumine, et ont chacune une bande protéique de taille voisine possédant un site de fixation du calcium de type main EF. Ceci conforte la troisième hypothèse formulée à la suite des résultats des immunoempreintes avec l'anticorps dirigé contre les parvalbumines, à savoir l'existence d'un site commun de fixation du calcium entre ces bandes IgE-réactives. Il s'agirait donc de protéines ne correspondent pas à des agrégats de Gad c I.

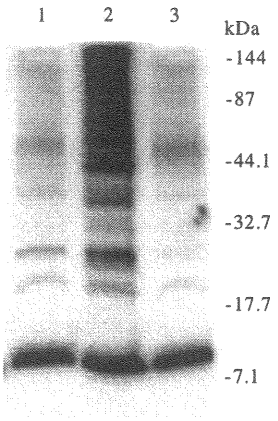


Figure 22 : Bandes protéiques de cabillaud reconnues par les IgE d'un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud dans différents extraits. Dix microgrammes de protéines ont été déposées par extrait.

Piste 1 : cabillaud *post rigor mortis* juste après la rigidité *post mortem* ; piste 2 : cabillaud acheté chez le poissonnier ; piste 3 : cabillaud *pre rigor mortis* + 5 mM EDTA.

Il n'y avait pas de différence entre le poisson *pre rigor mortis* et celui juste après la rigidité *post mortem*. Par contre les modifications ont été notoires pour l'extrait acheté dans le commerce car les intensités des bandes ont été modifiées et des bandes supplémentaires ont été détectées (pistes 1 et 2).

L'EDTA a modifié les intensités relatives des bandes de 30, 60, 104 et 130 kDa (piste 3).

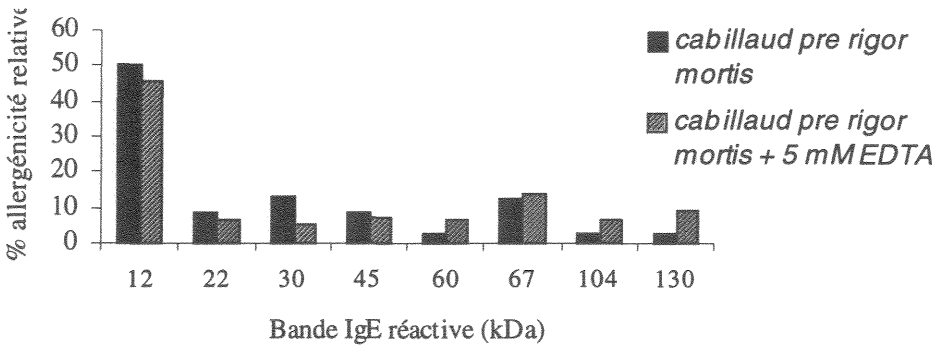


Figure 23 : Distribution relative et pourcentage d'allergénicité relative des bandes IgE-réactives de cabillaud dans deux extraits de cabillaud *pre rigor mortis* avec ou sans incubation avec 5 mM EDTA. Les bandes protéiques IgE-réactives ont été détectées par immunoempreintes en utilisant un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud.

Toutes les bandes de l'extrait incubé sans EDTA ont été retrouvées dans l'extrait incubé avec EDTA. L'intensité relative de la bande de 30 kDa a été diminuée en présence d'EDTA, et les intensités relatives des bandes de 60, 104 et 130 kDa ont été augmentées en présence d'EDTA.

B. Purification de la bande protéique IgE-réactive de 104 kDa : étude de deux voies de purification

La bande de 104 kDa était reconnue par les IgE de patients allergiques au cabillaud, ainsi que par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium des parvalbumines. La taille était différente de celles des paravalbumines. C'est pourquoi il était intéressant de la purifier. Ainsi nous pourrons avoir des éléments complémentaires concernant cette bande : nous pourrons savoir s'il s'agit ou non d'un agrégat de Gad c I, s'il s'agit de l'alpha-actinine (figure 21) ou s'il s'agit d'une autre protéine.

La purification de la bande IgE-réactive de 104 kDa a été entreprise suite aux résultats des immunoempreintes sur les fractions protéiques obtenues après chromatographie DEAE. En effet cette bande était éluée à 0,3 M NaCl dans les pics DEAE IV et V (figure 16 et tableau III) ; elle contribuerait à l'augmentation de l'allergénicité relative de ces pics. Pour la purification dix neuf milligrammes de protéines de cabillaud *pre rigor mortis* ont été injectées sur la colonne. Dans un premier temps les protéines éluées avant les pics IV et V du chromatogramme présenté sur la figure 14 ont été éluées en augmentant la concentration en NaCl jusqu'à 0.24 M. Le débit était de 1 ml/min. Puis lorsque la ligne de base s'est stabilisée le gradient a été créé continuellement entre 0,24 et 0,35 M NaCl sur trois volumes de colonne à un débit de 0,3 ml/min. Un pic a été obtenu à une concentration de 0,32 M NaCl. Ce pic, après analyse par électrophorèse PAGE-SDS, contenait la bande protéique de 104 kDa, ainsi que deux autres bandes de 41 et 46 kDa (figure 24). Donc en une seule étape de chromatographie la protéine se retrouvait partiellement purifiée. Mais la quantité de protéines obtenue était faible (100 µg) pour envisager d'autres étapes de purification. La quantité des protéines aurait pu être augmentée en multipliant le nombre de séparations ou en augmentant la capacité de la colonne.

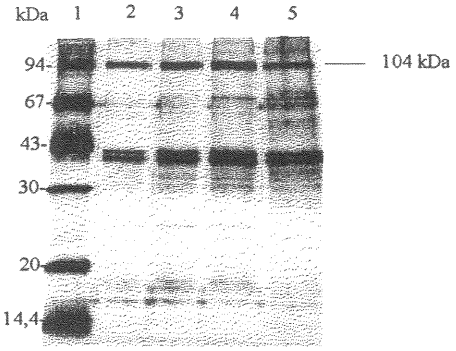


Figure 24 : Electrophorèse PAGE-SDS de fractions protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues par chromatographie DEAE.

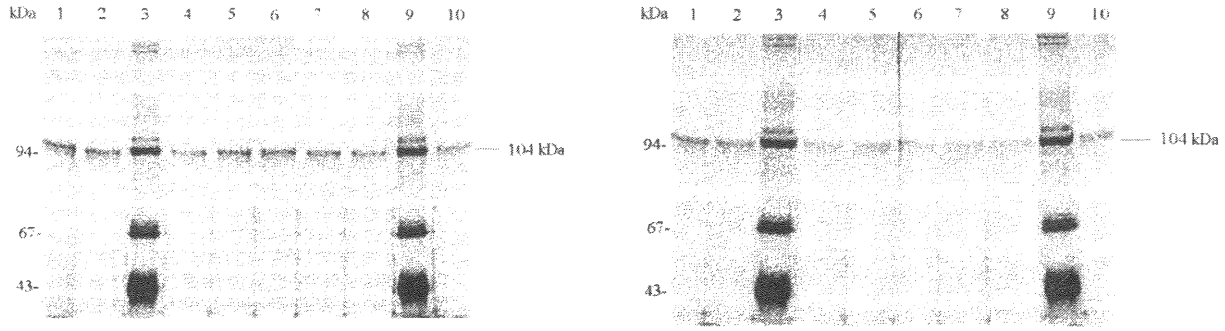
1 µg de chaque fraction ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 10 %. La séparation s'est opérée à 30 mA constant. Le gel a été coloré à l'argent.
Piste 1 : marqueur de taille ; piste 2 : fraction DEAE 34 ; piste 3 : fraction DEAE 35 ; piste 4 : fraction DEAE 36 ; piste 5 : fraction DEAE 37.

Trois bandes majoritaires ont été obtenues : 104, 41 et 46 kDa.

La faible quantité de protéines pouvait être due au fait que la bande de 104 kDa sortait dans deux pics de la chromatographie DEAE, les pics IV et V (figure 16 et tableau III).

Une autre technique de séparation des protéines, qui a fait ses preuves au laboratoire, a été utilisée pour la purification : l'électrophorèse à élution continue. Le choix de cette technique était justifié par le fait de la connaissance de la masse moléculaire apparente de cette bande protéique. De plus la purification pouvait être réalisée en une seule étape. La technique d'électrophorèse à élution continue a été utilisée en complément pour purifier cette bande à partir de l'extrait protéique brut de cabillaud *pre rigor mortis*. Trois mg d'extrait ont été dénaturés par la chaleur en présence de SDS et de DTT et ont été déposés sur le gel de polyacrylamide. La bande protéique de 104 kDa a été éluée dans les fractions 116 à 131 (figure 25). Elle était isolée dans les fractions 126 à 131. Quarante microgrammes de cette bande protéique ont été obtenus. L'étape suivante du travail est la détermination de la séquence N-terminale de cette bande protéique. Ceci permettra d'interroger des banques de données et d'obtenir une séquence utilisable en RT-PCR pour obtenir l'ADN complémentaire de cette bande.

La cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud a permis de détecter une bande IgE-réactive de 41 kDa dans la fraction DEAE VIII (tableau III). Cette bande a été purifiée (Galland *et al*, 1998). Cette protéine a été reconnue par l' anticorps antiparvalbumine. Le clonage codant pour cette bande protéique a été entamé ; cette étape du travail permettra d'avoir accès à sa structure primaire. Pour le clonage le site de fixation du calcium a été utilisé et a servi d'amorce de RT-PCR. L'autre amorce correspondait à la séquence N-terminale de cette bande protéique. Les ADN complémentaires obtenus ne correspondaient pas à cette bande protéique. Il faut donc poursuivre ce travail. Néanmoins cette bande de 41 kDa apporte certains éléments de réponses aux interrogations émises suite à l'établissement de la cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud. Cette bande n'est ni le résultat d'un



A B

Figure 25 : Fractions protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues par électrophorèse à élution continue. Gel de polyacrylamide 6 % coloré à l'argent.

Gel A : piste 1 : fraction 116 ; piste 2 : fraction 117 ; piste 3 : marqueur de taille ; piste 4 : fraction 118 ; piste 5 : fraction 119 ; piste 6 : fraction 120 ; piste 7 : fraction 121 ; piste 8 : fraction 122 ; piste 9 : marqueur de taille ; piste 10 : fraction 123. **Gel B :** piste 1 : fraction 124 ; piste 2 : fraction 125 ; piste 3 : marqueur de taille ; piste 4 : fraction 126 ; piste 5 : fraction 127 ; piste 6 : fraction 128 ; piste 7 : fraction 129 ; piste 8 : fraction 130 ; piste 9 : marqueur de taille ; piste 10 : fraction 131.

Une bande majoritaire de 104 kDa a été détectée dans les fractions 116 à 131. Elle était isolée dans les fractions 126 à 131.

agrégat de Gad c I, ni d'une adsorption de Gad c I à une bande protéique. Mais il s'agit d'une bande protéique autre que Gad c I qui est reconnue par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium sur les parvalbumines.

C. Clonage d'un ADNc de cabillaud possédant le premier site de fixation du calcium de Gad c I

1. Synthèse par RT-PCR d'un ADN complémentaire à l'aide d'une amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I

Les résultats précédents ont révélés qu'il existait des bandes de même masse moléculaire apparente que certaines bandes IgE-réactives qui étaient reconnues par un anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium sur les parvalbumines. Ce site de fixation du calcium a donc été utilisé pour obtenir un ADN complémentaire de cabillaud. En effet, un tel produit d'amplification pourrait correspondre à une protéine allergénique. De plus ce produit permettrait d'apporter certains éléments de réponse aux questions posées suite à l'élaboration de la cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud, à savoir l'existence ou non d'autres protéines de cabillaud possédant ce site de fixation du calcium.

La technique de 3'RACE a été utilisée pour obtenir un ADN complémentaire de cabillaud à l'aide d'une amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I. Cette technique a été utilisée car un seul site était connu, et nous ne pouvions pas réaliser de RT-PCR. Dans un premier temps l'ARN messager du cabillaud a été transcrit en ADN complémentaire à partir d'une amorce oligo dT complémentaire de la queue poly-A des ARN messagers (figure 8). A cette amorce oligo-dT était accrochée une séquence appelée anchor

qui était un site reconnu par amorce antisens au cours de la réaction de PCR ; l'amorce sens correspondait, dans notre étude, au premier site de fixation du calcium sur Gad c I. La séquence 50 à 61 de Gad c I correspondait à ce site de fixation du calcium (Elsayed *et al*, 1975).

Le produit d'amplification par 3'RACE correspondant à un fragment de Gad c I devait être au moins égal à 210 pb ; il était en effet difficile d'évaluer la taille attendue pour le produit d'amplification correspondant à Gad c I car la taille de la queue poly-A et la taille du fragment entre le codon stop et la queue poly-A n'étaient pas connus. Six bandes ont été obtenues avec la technique 3'RACE en utilisant l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I : une bande majoritaire de 460 paires de bases et des bandes d'intensités plus faibles de 500, 290, 250, 160 et 150 pb (figure 26 piste 1, tableau IV).

Ainsi le produit d'amplification obtenu à partir du premier site de fixation du calcium de Gad c I ne correspondait pas à une bande unique, mais était constitué de six bandes. Ceci est un élément supplémentaire en faveur de l'existence de bandes protéiques du cabillaud autres que Gad c I qui possèdent au moins un site de fixation du calcium de type main EF.

Ainsi la bande majoritaire de 460 pb pouvait correspondre à un produit d'amplification différent de Gad c I. C'est pourquoi sa purification a été entreprise. La bande de 460 pb a été récupérée à l'aide d'une aiguille, amplifiée à nouveau par PCR et purifiée après l'électrophorèse.

Une réaction de contrôle a été effectuée en amplifiant l'ADN complémentaire obtenu après l'étape de transcription reverse par PCR entre des amorces correspondant respectivement au premier et au second site du calcium de Gad c I. Un produit d'amplification unique de taille attendue pour Gad c I de 155 paires de base a été obtenu (figure 26, piste 2).

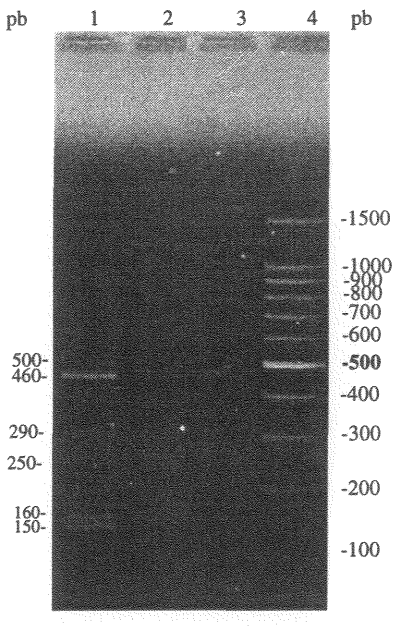


Figure 26 : Produits d'amplification de cabillaud obtenus par 3'RACE et RT-PCR.

Electrophorèse avec un gel d'agarose à 1,5 %.

Piste 1 : Produit d'amplification obtenu par la technique 3'RACE avec l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I ; piste 2 : Produit d'amplification compris entre le premier et le second site de fixation du calcium de Gad c I ; piste 3 : témoin négatif de la technique 3'RACE ; piste 4 : marqueur de taille.

Une bande majoritaire de 460 pb et cinq bandes minoritaires de 500, 290, 250, 160 et 150 pb ont été obtenues par 3'RACE avec l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I.

Tableau IV : Récapitulatif des résultats obtenus par RT-PCR ou 3'RACE

technique	matériel	Produit d'amplification
3' RACE avec l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I	ARN messagers de cabillaud	Six bandes : 150, 160, 250, 290, 460 et 500pb
RT-PCR avec le couple d'amorces correspondant aux deux sites de fixation du calcium de Gad c I	ARN messagers de cabillaud	1 bande de 155 pb correspondant à la taille attendue pour Gad c I
PCR avec le couple d'amorces universelles T7 et sp6 du plasmide pGEM-T®	Clone 460.3	1 bande de 620 pb (qui correspond à la bande de 460 pb + 160 pb correspondant à la séquence du plasmide entre le site T7et sp6)
PCR avec le couple utilisé au cours de la 3'RACE (premier site de fixation du calcium / anchor)	Clones 460.3, 460.5 et 460.8	1 seule bande de 460 pb pour chaque clone
PCR avec le couple d'amorces correspondant aux deux sites de fixation du calcium de Gad c I	Clones 460.3, 460.5 et 460.8	Aucun produit d'amplification

2. Clonage de l'ADNc de 460 pb dans un vecteur pGEM-T® (Promega, Madison, USA)

Le séquençage direct du produit d'amplification de 460 pb n'a pas abouti. En effet l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium sur Gad c I a été très dégénérée (figure 9). C'est pourquoi ce produit d'amplification de 460 pb a été inséré dans le vecteur pGEM-T®, les séquences du vecteur étant utilisées pour amorcer le séquençage.

Cinq clones positifs ont été étudiés ; les réactions de PCR ont montré que les clones appelés 460-3, 460-5 et 460-8 possédaient le produit d'amplification de 460 pb (figure 27, tableau IV). La réaction de PCR effectuée avec le couple d'amorces correspondant aux deux sites de fixation du calcium de Gad c sur les clones possédant l'insert de 460 paires de base n'a pas donné de produit d'amplification (figure 27, tableau IV). Donc ce fragment de 460 pb ne possédait pas la séquence correspondant au second site de fixation du calcium de Gad c I.

Ainsi ce fragment de 460 pb qui a été obtenu à partir de premier site de fixation du calcium de Gad c I ne correspondait pas à un fragment de Gad c I, mais devait correspondre à un fragment d'une autre protéine.

L'insert du clones 460-3 a été séquencé à partir des amorces universelles T7 et sp6 du plasmide (figure 28 A). La séquence correspondant au premier site de fixation du calcium, la séquence supplémentaire anchor apportée au cours de la réaction de transcription reverse et la queue poly-A de l'ARN messager ont été retrouvées. Sur la figure 28 A est représentée la séquence de l'ADNc cloné entre la séquence de l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium et la queue poly-A. Cette séquence était la résultante de deux séquençages avec l'amorce T7 du plasmide et de deux séquençages avec l'amorce sp6 du plasmide. La séquence a été traduite en acides aminés en se basant sur le cadre de lecture correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I (figure 28 B) (Il est à noter que les deux autres cadres de lecture ont comporté de nombreux codons stop).

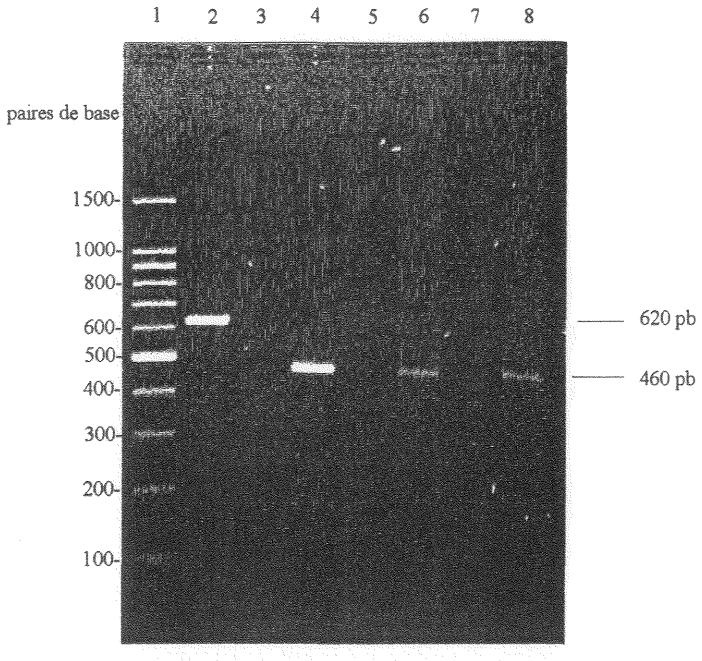


Figure 27 : PCR sur trois clones positifs : les clones 460-3, 460-5 et 460-8.

Piste 1 : marqueur de taille 100 pb de Promega ; piste 2 : PCR sur le clone 460-3 avec les amorces universelles T7 et sp6 du plasmide ; piste 3 : PCR sur le clone 460-3 avec le couple d'amorces correspondant aux deux sites de fixation du calcium de Gad c I ; piste 4 : PCR sur le clone 460-3 avec le couple d'amorces correspondant au premier site de fixation du calcium / anchor ; piste 5 : PCR sur le clone 460-5 avec le couple d'amorces correspondant aux deux sites de fixation du calcium de Gad c I ; piste 6 : PCR sur le clone 460-5 avec le couple d'amorces correspondant au premier site de fixation du calcium / anchor ; piste 7 : PCR sur le clone 460-8 avec le couple d'amorces correspondant aux deux sites de fixation du calcium de Gad c I ; piste 8 : PCR sur le clone 460-8 avec le couple d'amorces correspondant au premier site de fixation du calcium / anchor.
L'amorce anchor correspond à une séquence apportée par le poly-dT au cours de l'étape de transcription reverse.

Les trois clones (460-3, 460-5, 460-8) contenaient l'insert de 460 pb. Aucun produit d'amplification n'a été obtenu sur les clones en utilisant le couple d'amorces correspondant au premier et au second site de fixation du calcium de Gad c I.

A :

1 11 21 31 41 51
GACGACGAGG ATAAGGATGG CTTTATAGAG GAGCAACAAG GAACGACGAG GAACAACGAG

61 71 81 91 101 111
GAACNACGAG GAACAGCGAG GAGCGAGGGA AGACGAGGAG CAACGAGGAA CAACGAGGAC

121 131 141 151 161 171
CTGTGGTGAA CAACGAGGAA GAACGAGGAA CAACAAGGAG CAAGGAACAA CGAGGAAGAA

181 191 201 211 221 231
CGGGGAAGAA CGAGGAACAA CGAGGAGCAA GGAACCACGA GGAAGAACAA GGAGCAACAA

241 251 261 271 281 291
GGAACGACGA GGAACAACGA GGAAGGCCGA GGAGCATTAA GGAAGAACGA GGAAGAACGA

301 311 321 331 341 351
GGAGCCACAA GGAACGACGA GGAACAGCGA GGAAAGACGA GGAGCCACGA GGAACCACGA

361 371 381 391 401 411
GGAACAGCGA GGAGCGAGGA AAGACGAGGG GCANCGAGGA ACAATGAGGA CCTTTTGTNA

421 431
ACNATGAGGA AAAAAAAAAA

B :

1 11 21 31 41
ADEDKDGIEE QQGNDEEQRG XTRNSEERGK TRSNEEQRGP VVNNEEERGT

51 61 71 81 91
TRSKEQRGRT GKNEEQRGAR NHEEQGATRN DEEQRGRPRS IKEERGRTRS

101 111 121 131
HKERRGTARK DEEPRGTTRN SEERGKTRGX EEQ

Figure 28 : A : Séquence de l'ADN complémentaire du clone 460-3. La séquence a été déterminée par deux séquençages à partir des amorces universelles T7 et sp6 du plasmide pGEM-T®. Les séquences de l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium, le codon stop et la queue poly-A sont surlignés.

B : Séquence déduite en acides aminés.

Cette séquence correspondait à un fragment protéique de 133 acides aminés. La séquence de l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I se situait entre le résidu alanine en position 1 et le résidu glutamate en position 11. La séquence EEQ a été rencontrée à sept reprises, et la séquence EEQR a été rencontrée à quatre reprises.

La séquence de ce fragment cloné croisait avec l'allergène majeur du cabillaud Gad c I (Elsayed *et al*, 1975), la parvalbumine II de l'anguille électrique (Zhu *et al*, 1985) ou encore avec la parvalbumine du thymus de poulet (Palmisano *et* Henzl, 1991) au niveau de l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium de Gad c I (résidus 1 à 11) (figure 29). Sur le fragment cloné le résidu 6 était un aspartate alors que le résidu correspondant sur Gad c I était une glutamate. Il est à noter que les résidus 12 et 13 du fragment cloné étaient des glutamines, alors que sur la parvalbumine du thymus de poulet les résidus correspondant étaient des glutamates. Il faut être vigilant car la séquence obtenue au niveau de l'amorce correspondant au premier site de fixation du calcium a pu être imposée par la séquence de l'amorce. Il faudra confirmer cette séquence par l'obtention d'un ADN complémentaire à partir de la séquence du fragment cloné de 460 pb grâce à la technique RACE 5'.

Par ailleurs la protéine P162 de l'espèce de souris *mus musculus* (séquence non publiée dans la littérature mais soumise directement au banques de données sous le numéro d'identification gi 1205976, travaux de Fisher *et al*, 1994) possédait quatre zones d'homologie avec le fragment protéique cloné (figure 30). Cette protéine fait partie d'un complexe multi-protéique phosphoryllé par Src. La première zone d'homologie concernait les cinq résidus de la région 16 à 20 du fragment cloné. Quatre résidus étaient identiques et le cinquième résidu était homologue. La seconde zone d'homologie concernait la région 27 à 41 du fragment cloné. Onze résidus sur quinze étaient homologues et huit résidus sur quinze étaient identiques.

position 460 pb		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
séquence 460 pb		**A**	**D**	**E**	**D**	**K**	**D**	**G**	**F**	**I**	**E**	**E**	**Q**	**Q**	**G**	**N**	**D**	**E**	**E**	**Q**	**R**
Gad c I	50	**A**	**D**	**E**	**D**	**K**	**E**	**G**	**F**	**I**	**E**	**E**	60								
Parvalbumine II		51	**D**	**E**	**D**	**K**		**G**	**F**	**I**	**E**	**E**	60								
Parvalbumine du thymus de poulet		52	**D**	**Q**	**D**	**K**		**G**	**F**	**I**	**E**	**E**	**E**	**E**	63						

Figure 29 : Homologie entre le fragment cloné et certaines parvalbumines.

Les zones d'identité sont grisées et sont localisées au niveau du premier site de fixation du calcium sur les parvalbumines musculaires ou du thymus. Les chiffres indiqués avant chaque séquence correspondent à la position de la séquence sur la protéine présentant l'homologie.

Gad c I = allergène majeur du cabillaud (Elsayed *et al*, 1975)

Parvalbumine II de l'anguille électrique (*Electrophorus electricus*) (Zhu *et al*, 1985)

Parvalbumine du thymus de poulet (Palmisano *et* Henzl, 1991)

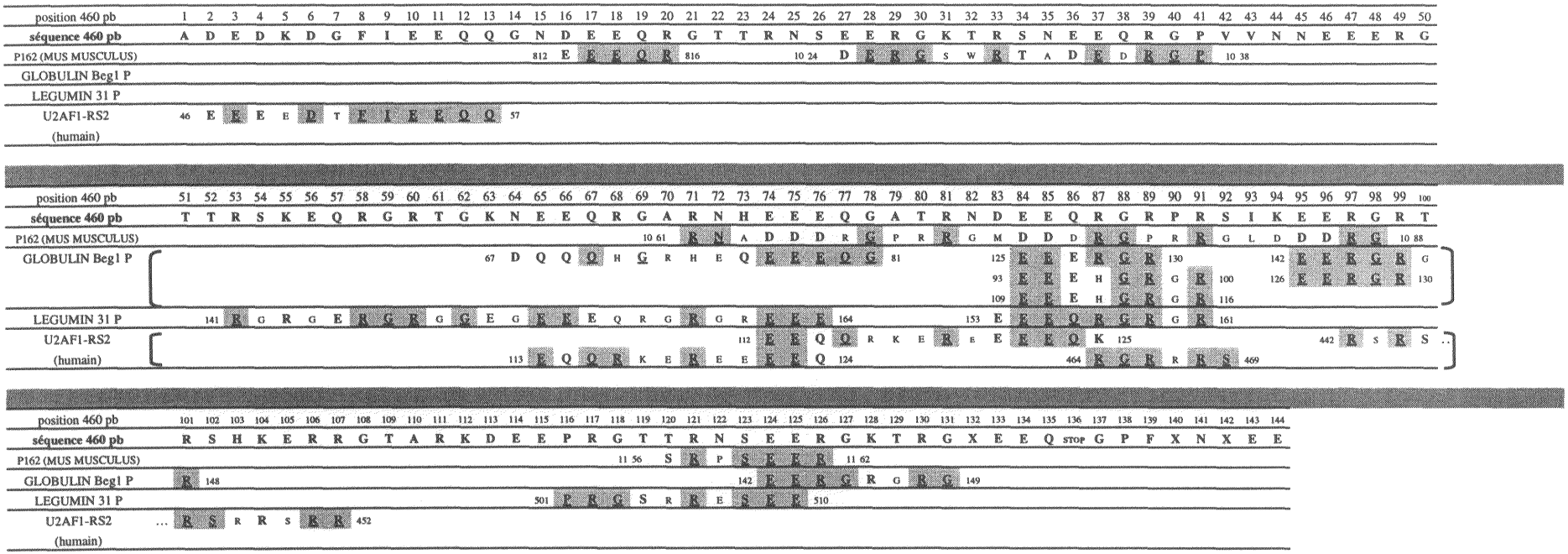


Figure 30: Homologies entre le fragment cloné et des protéines autres que les parvalbumines.

L'identité est représentée par une zone grisée. Le petit chiffre avant et après chaque séquence correspond à la position des fragments homologues sur la protéine. La protéine p162 de l'espèce de souris mus musculus possèdait quatre zones d'homologie avec le fragment cloné. Cette protéine faisait partie d'un complexe multi-protéique phosphorylé par Src (séquence non publiée dans la littérature, mais soumise directement à la banque de donnée par Fisher *et al*, 1994 (numéro d'identification : gi 1205976). Le précurseur de la globuline Beg 1 d'orge (Heck *et al*, 1993) possèdait quatre zones d'homologie avec le fragment cloné. Le précurseur de la légumine 31 de cèdre (Wind *et* Haeger, 1996) possèdait deux zones d'homologies avec le fragment cloné. La protéine humaine U2 AF1-RS2 (Kitagawa *et al*, 1995) possèdait quatre zones d'homologie avec le fragment cloné.
GLOBULIN Beg1 P = précurseur de la globuline Beg 1 d'orge. LEGUMIN 31 P = précurseur de la légumine 31 de cèdre.

La troisième zone d'homologie concernait la région 71 à 98 du fragment cloné. Seize résidus sur vingt huit étaient homologues et neuf résidus sur vingt huit étaient identiques. Enfin la quatrième zone d'homologie concernait la région 120 à 126 du fragment cloné. Six résidus sur sept étaient homologues et cinq résidus sur sept étaient identiques. Ces quatre zones d'homologies étaient courtes. Le fragment cloné ne correspondait pas à un fragment de cette protéine p162. De même le précurseur de la légumine 31 de cèdre (Wind *et* Haeger, 1996), le précurseur de la globuline Beg 1 d'orge (Heck *et al*, 1993) et la protéine humaine U2AF-RS2 (Kitagawa *et al*, 1995) possédaient des zones d'homologie avec le fragment cloné. Il existe encore d'autres protéines qui ont des zones d'homologie avec le fragment cloné (figure 31). C'était le cas du récepteur cellulaire bovin du virus de la leucémie (Ban *et al*, 1994), d'un cadre de lecture de 179 acides aminés de *E. coli* (Blattner *et al*, 1997), du cosmide C25A11.4b de *Caenorhabditis elegans* qui correspond à une séquence nucléotidique de 2,2 mégabases du chromosome III (Wilson *et al*, 1994), du cosmide F25H5.a de *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al*, 1994), d'une protéine sur le chromosome V d'*Arabidopsis thaliana* (de la bastide et al, 1997, non publié, numéro d'identification gi 2341042), d'une protéine d'*Arabidopsis thaliana* qui a des similarités avec des protéines membranaires induites par le sel (numéro d'identification gi 2191151), d'une protéine humaine p167 phosphorylée par Src (Kanner *et al*, 1990), d'une protéine 273 d'*Agrobactérium tumefaciens* (Hagiya *et al*, 1985).

Ainsi le fragment cloné obtenu à partir du premier site de fixation du calcium de Gad c I n'avait ni la même séquence que Gad c I, ni la taille attendue pour Gad c I, ni le deuxième site de fixation du calcium de Gad c I. Il existait de courtes séquences communes avec d'autres protéines de diverses origines (mammifères, poissons, bactéries, végétaux). Ce fragment cloné ne correspondait pas à une protéine connue. Il faut pousser plus loin les investigations, en appliquant notamment la technique 5' RACE, et obtenir la séquence primaire complète de la protéine.

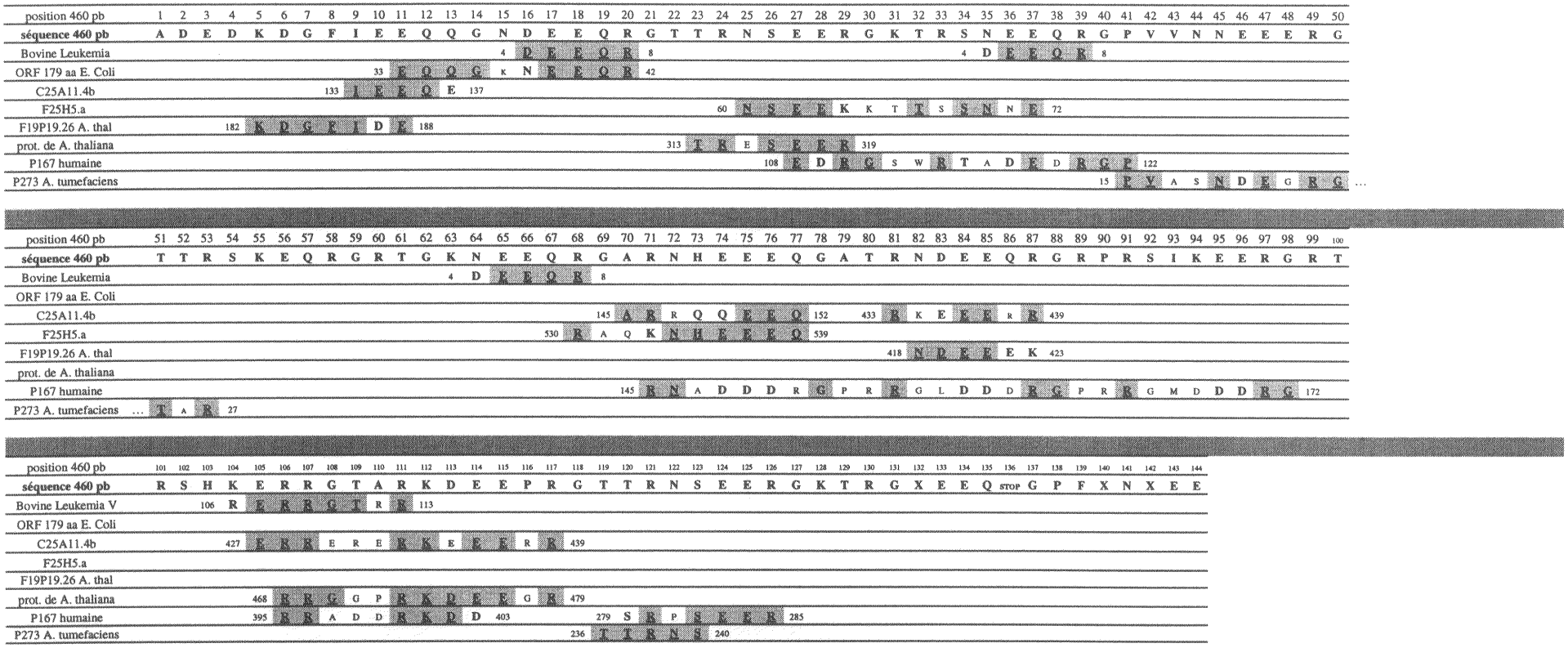


Figure 31: Homologies entre le fragment cloné et des protéines autres que des parvalbumines (suite).

L'identité est représentée par une zone grisée. Le petit chiffre avant et après chaque séquence correspond à la position sur la protéine.

Toutes les protéines suivantes possèdaient des zones d'homologie avec le fragment cloné : le récepteur cellulaire bovin du virus de la leucémie (Ban *et al*, 1994) (=Bovine Leukemia V), un cadre de lecture de 179 acides aminés de E. coli (Blattner *et al*, 1997) (=ORF 179 aa E. Coli), le cosmide C25A11.4b de *Caenorhabditis elegans* qui correspond à une séquence nucléotidique de 2,2 mégabases du chromosome III (Wilson *et al*, 1994), le cosmide F25H5.a de *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al*, 1994), une protéine sur le chromosome V d'*Arabidopsis thaliana* (de la bastide *et al*, 1997, non publié, numéro d'identification gi 2341042) (=F19P19.26 A. thal), une protéine d'*Arabidopsis thaliana* qui a des similarités avec des protéines membranaires induites par le sel (numéro d'identification gi 2191151) (=prot. de A. thaliana), une protéine humaine p167 phosphorylée par Src (Kanner *et al*, 1990) (=P167 humaine), une protéine 273 d'Agrobactérium tumefaciens (Hagiya *et al*, 1985) (=P273 A. tumefaciens).

En conclusion la technique de 3'RACE réalisée à partir du premier site de fixation du calcium de Gad c I nous a permis d'obtenir un ADNc qui ne code pas pour Gad c I et qui ne correspond pas à une protéine connue. Cette protéine non encore décrite pourrait appartenir à la famille de protéines qui possèdent le site de liaison du calcium de type main EF.

Ces résultats obtenus par biologie moléculaire confortent donc l'hypothèse émise suite aux résultats des immunoempreintes qu'il existe chez le cabillaud une famille de protéines liant le calcium qui possèdent un site retrouvé dans de nombreuses espèces animales et végétales : le site de liaison du calcium de type main EF.

D. Influence de la fraîcheur sur l'allergénicité du cabillaud : étude préliminaire

Le cabillaud possèdait déjà à l'état frais quinze bandes protéiques IgE-réactives. Des activités protéolytiques de certaines enzymes, associées à des bactéries, entraînent l'apparition de produits de dégradation. Aucune étude n'a, jusqu'à présent, porté sur l'influence de la dégradation *post mortem* du poisson sur l'allergénicité de celui-ci.

L'extrait de cabillaud *pre rigor mortis* et celui de cabillaud acheté chez le poissonnier, c'est-à-dire dont le processus de dégradation *post mortem* a débuté, ont été utilisés dans les tests d'inhibition des IgE spécifiques au cabillaud. Un microgramme de l'extrait de cabillaud *pre rigor mortis* inhibait le dosage des IgE spécifiques au cabillaud du sérum D.W. à 50 %, alors qu'il ne fallait que 10 ng de l'extrait de cabillaud acheté chez le poissonnier pour inhiber ce même dosage à 50 % (figure 32). Ceci signifie que l'extrait protéique de cabillaud acheté chez le poissonnier était plus allergénique que celui du cabillaud n'ayant pas subi la dégradation *post mortem*.

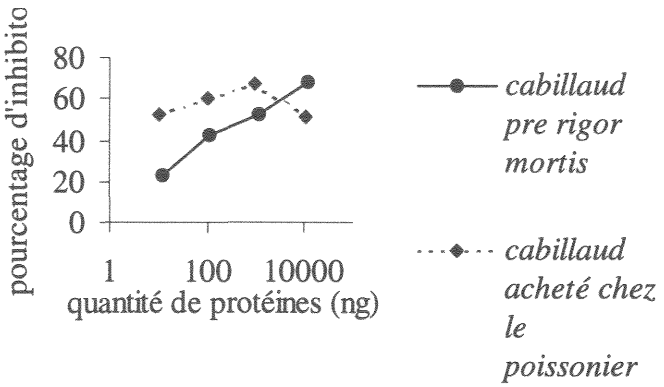


Figure 32 : Inhibition du dosage des IgE spécifiques au cabillaud du patient D.W. avec deux extraits de cabillaud : un cabillaud *pre rigor mortis* et un cabillaud acheté chez le poissonnier.

Un microgramme de l'extrait de cabillaud *pre rigor mortis* inhibait 50 % des IgE spécifiques au cabillaud du sérum DW. Dix nanogrammes, c'est-à-dire cent fois moins, de l'extrait de cabillaud acheté dans le commerce inhibaient 50 % des IgE.

La distribution relative des bandes IgE-réactives a été comparée entre les extraits de cabillaud *pre rigor mortis*, *post rigor mortis* juste après la rigidité cadavérique et acheté chez le poissonnier (figure 33). Le mélange des douze sérums de patients allergiques au cabillaud a été utilisé. Entre le poisson *pre rigor mortis* et celui juste après la rigidité *post mortem*, les intensités relatives des bandes de 12, 22, 30, 45 et 60 kDa ne variaient pas. Par contre la bande de 67 kDa a vu son intensité relative diminuée, et les bandes de 104 et 130 kDa ont vu leurs intensités relatives augmentées.

La distribution relative des bandes IgE-réactives a été considérablement modifiée dans l'extrait acheté chez le poissonnier : les intensités relatives ont été augmentées pour les bandes de 60, 104 et 130 kDa. Par contre les intensités relatives des bandes de masses moléculaires apparentes de 12, 22, 30 et 45 kDa ont été diminuées. L'intensité relative de la bande de 67 kDa restait inchangée. Enfin trois autres bandes IgE-réactives ont été détectées : 18, 41 et 80 kDa. Les bandes de 41 et 80 kDa ont été détectées dans l'extrait *pre rigor mortis* ; celle de 80 kDa a été détectée dans la fraction DEAE I, II, III, V et VIII (figure 16 et tableau III). Celle de 41 kDa a été détectée dans la fraction DEAE VIII. Par contre la bande de 18 kDa n'a pas été retrouvée dans le poisson frais.

L'allergénicité relative de la bande de 12 kDa a été considérablement réduite dans le poisson acheté chez le poissonnier. Elle ne serait pas produite au cours de la dégradation *postmortem*. Ainsi des produits de dégradation allergéniques ont été générés au cours de la phase *post mortem*. Une hypothèse de ce phénomène est que le processus de dégradation *post mortem* a rendu plus accessibles certains épitopes reconnus par les IgE.

Ce travail n'est que préliminaire car la distribution relative des bandes IgE-réactives n'est comparée qu'entre trois stades : juste avant et après la dégradation *postmortem*, ainsi qu'à un stade plus avancé de la dégradation, qui correspond à la qualité d'un poisson acheté dans le commerce.

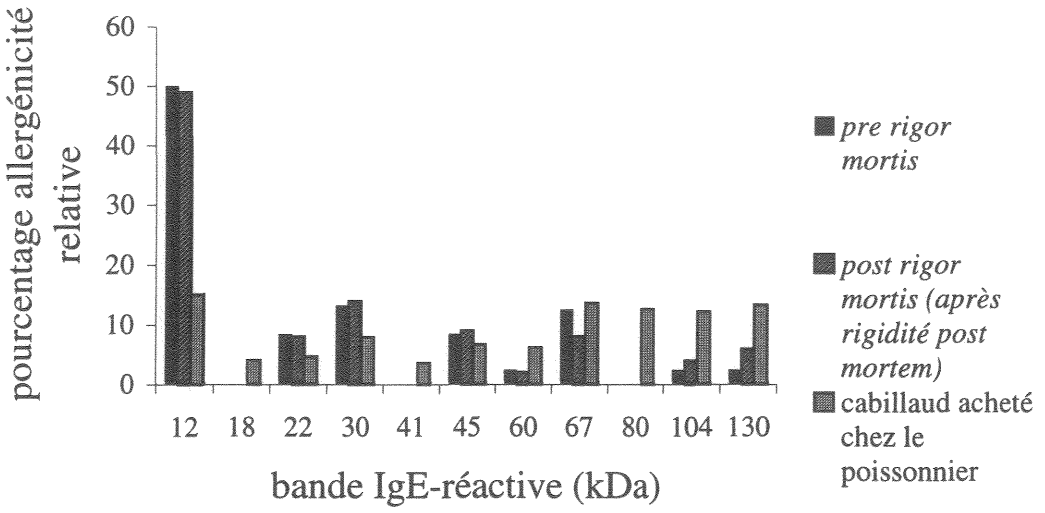


Figure 33 : Distribution relative et pourcentage d'allergénicité relative des bandes IgE-réactives de cabillaud dans différents extraits protéiques : cabillaud *pre rigor mortis*, cabillaud *post rigor mortis* juste après la rigidité *post mortem* et cabillaud du commerce. Les bandes protéiques IgE-réactives ont été détectées par immunoempreintes en utilisant un mélange de douze sérums de patients allergiques.

Entre le poisson *pre rigor mortis* et celui juste après la rigidité *post mortem*, les intensités relatives des bandes de 12, 22, 30, 45 et 60 kDa ne variaient pas. Par contre la bande de 67 kDa a vu son intensité relative diminuée, et les bandes de 104 et 130 kDa ont vu leurs intensités relatives augmentées.

La distribution relative des bandes IgE-réactives a été modifiée dans l'extrait acheté chez le poissonnier : les intensités relatives ont été augmentées pour les bandes de 60, 104 et 130 kDa. Par contre les intensités relatives des bandes de 12, 22, 30 et 45 kDa ont été diminuées. L'intensité relative de la bande de 67 kDa restait inchangée. Enfin trois autres bandes IgE-réactives ont été détectées : 18, 41 et 80 kDa.

Une cinétique de formation des bandes IgE-réactives au cours de la dégradation *post mortem* apporterait des indications plus précises concernant l'allergénicité du poisson en fonction de son état de fraîcheur. Ces données pourront être très utiles pour les professionnels de l'industrie du poisson. Cette étude pourra être réalisée en particulier lorsque des anticorps plus spécifiques dirigés contre certaines bandes IgE-réactives purifiées seront disponibles. Ces résultats peuvent également expliquer nos difficultés à détecter des bandes IgE-réactives dans le cabillaud *pre rigor mortis*, en utilisant des agents de saturation protéiques qui interagissent avec les IgE spécifiques au cabillaud. En effet cet extrait est cent fois moins allergénique que l'extrait de cabillaud acheté dans le commerce. Les autres études utilisant des western-blot ont probablement été réalisées avec un extrait de cabillaud acheté dans le commerce.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

V. Conclusion et perspectives

Quinze bandes IgE réactives du cabillaud ont été détectées au cours de cette étude. Il s'agit de la cartographie la plus précise établie sur le sujet. Douze de ces bandes avaient une bande de même taille reconnue par un anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium, de type main EF, des parvalbumines. Bien que nous pouvions pas affirmer que c'étaient les mêmes bandes qui étaient reconnues par les IgE et par l'anticorps antiparvalbumine nous avons émis une hypothèse, fondée sur des arguments de la littérature et sur des simulations de profils, que le site de fixation du calcium de type main EF se trouvait sur d'autres protéines IgE-réactives du cabillaud. Ce site est en effet rencontré dans un certain nombre de protéines chez les poissons, les mammifères, les amphibiens et les végétaux. Il est responsable des réactions d'allergies croisées entre les poisson, et serait responsable d'allergies croisées entre les poissons et les pollens. De plus ce site est reconnu par les IgE sur les parvalbumines.

Certains résultats ont permis d'étayer cette hypothèse : obtention d'un ADN complémentaire de cabillaud en se basant uniquement sur le premier site de fixation du calcium, l'EDTA modifie le profil en bandes IgE-réactives. Les autres hypothèses, que nous ne pouvons pas exclure, étaient que certaines bandes IgE-réactives correspondent à des polymères ou agrégats de parvalbumines, ou encore que les parvalbumines se soient adsorbées à d'autres protéines.

Ce site de fixation du calcium a permis de cloner un ADN complémentaire de cabillaud qui ne correspond à aucune protéine décrite jusqu'à présent dans la littérature. Ce fragment protéique croise avec certaines protéines sur de très courtes séquences. La détermination de la séquence de cette protéine présente des intérêts multiples : approfondir les connaissances concernant les protéines de cabillaud, déterminer si cette protéine présente un site de fixation du calcium du type main EF et si elle est allergénique. L'étude concernant

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

cette protéine va donc être poursuivie de manière à connaître sa séquence primaire complète et d'étudier son allergénicité après traduction *in vitro* du plasmide recombinant. Si l'allergénicité est mise en évidence nous aurons des éléments nouveaux à apporter à l'hypothèse de l'existence de déterminants allergéniques communs entre les allergènes de cabillaud, à savoir le site de fixation du calcium de type main EF. De même la structure primaire de la bande purifiée de 104 kDa permettra d'apporter de nouveaux éléments permettant de vérifier cette hypothèse. Il en sera de même pour la caractérisation de la bande de 41 kDa.

Du point de vue allergénique il sera aussi très intéressant de classer les bandes IgE-réactives en allergènes majeurs ou mineurs, et de corréler cette classification avec la présence ou non du site de fixation du calcium.

Ce présent travail a mis en évidence que la dégradation *post mortem* du poisson entraînait une augmentation de l'allergénicité de celui-ci, et cette augmentation était due à une augmentation de l'intensité relative de certaines bandes IgE-réactives. Ce travail préliminaire présente un intérêt particulier pour l'industrie de la pêche, pour qui la qualité de la matière première est un critère important. Il faut maintenant dater plus précisément l'augmentation de l'allergénicité. De plus le travail que nous avons réalisé pourrait avoir des applications supplémentaires. En effet nous avons réalisé des profils protéiques du cabillaud et des profils obtenus par immunoempreintes. Des sondes ADNc du cabillaud ont été, ou vont être, synthétisées. Tous ces outils pourront être utiles pour déterminer l'origine et l'authenticité du poisson.

SCD-UHP - NANCY
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

BIBLIOGRAPHIE

Aas K.
Studies of hypersensitivity to fish. A clinical study
Int. Arch. Allergy, 1966a, 29, 346-63

Aas K.
Studies of hypersensitivity to fish. Prepararion and characterization of extracts from cod and salmon
Int. Arch. Allergy, 1966b, 29, 453-69

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, 1966c, 30, 1-14

Aas K.
Studies of hypersensitivity to fish. Allergological and serological differentiation between various species of fish
Int. Arch. Allergy, 1966d, 30, 257-67

Aas K.
Studies of hypersensitivity to fish. Studies of different fractions of extracts from cod muscle tissue
Int. Arch. Allergy, 1967, 31, 239-60

Aas K., Jebsen J.W.
Studies of hypersensitivity to fish. Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod
Int. Arch. Allergy, 1967, 32, 1-20

Aas K., Lundkvist U.
The radioallergosorbent test with a purified allergen from codfish
Clin. Allergy, 1973, 3, 255-61

Apold J., Elsayed S.
The immunochemical reactivity of regions encompassing Tyr-30 and Arg-75 of allergen M from cod
Mol. Immun., 1980, 17, 291-6

Apold J., Elsayed S., Aukrust L., Bennish H.
The allergenic structure of allergen M from cod. Studies on the antigenicity of long-seqence Peptides.
Int. Arch. Allergy appl. Immun., 1979, 58, 337-43

Arruda (de) M.V., Watson S., Lin C.S., Leavitt J., Matsudaira P.
Fimbrin is homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and gelatin proteins
J. Cell. Biol., 1990, 111, 1069-79

Ban J., Truong A.T., Horion B., Altaner C., Burny A., Portetelle D., Kettmann R.
Isolation of the missing 5' End of the encoding region of the bovine leukemia virus cell receptor gene
Arch. Virol., 1994, 138, 379-83

Baron M.D., Davison M.D., Jones P., Critchley D.R.
The sequence of chick α-actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin
J. Biol. Chem., 1987, 262, 17623-9

Berchtold M.W., Epstein P., Beaudet A.L., Payne M.E., Heizmann C.W., Means A.R.
Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene
J. Biol. Chem., 1987, 262, 8696-701

Berchtold M.W., Wilson K.J., Heizmann C.W.
Isolation of neuronal parvalbumin by high-performance liquid chromatography. Characterization and comparison with muscle parvalbumin
Biochem., 1982, 21, 6552-7

Bernhisel-Broadbent J., Scanlon S.M., Sampson H.A.
Fish hypersensitivity. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients
J. Allergy Clin. Immunol., 1992a, 89,730-37

Bernhisel-Broadbent J., Stause D., Sampson H.A.
Fish hypersensitivity. Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods
J. Allergy Clin. Immunol., 1992b, 90, 622-29

Blattner F.R., Plunkett III G., Bloch G.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rhode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Wayne Davis N., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y.
The complete genome sequence of Escherichia coli K-12
Science, 1997, 277, 1453-62

Blum H.E., Lehky P., Kohler L., Stein E.A., Fischer E.H.
Comparative properties of vertebrate parvalbumins
J. Biol. Chem., 1977, 252, 2834-8

Bock S.A.
Propective apparaisal of complaints of adverse reaction to foods in children during the first 3 years of life
Pediatrics, 1987, 79, 683-8

Bolander M.E., Young M.F., Fischer L.W., Yamada Y., Termine J.D.
Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinasw inhibitor (ovomucoid)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 2919-23

Bradford M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem., 1976, 72, 248-54

Brostoff J.
Food allergy and intolerance
Clin. Exp. Allergy, 1991,21, 325-29

Capony J.P., Ryden L., Demaille J., Pechère J.F.
The primary structure of the major parvalbumin from hake muscle. Overlapping peptides obtained with chemical and enzymatic methods. The complete amino-acid sequence
Eur. J. Biochem., 1973, 32, 97-108

Carter C.
Dietary treatment of food allergy and intolerance
Clin. Exp. Allergy, 1995, 25, suppl. 1, 34-42

Celio M.R., Baier W., Schärer L., De Viragh P.A., Gerday C.
Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein paravalbumin
Cell Calcium, 1988, 9,81-6

Celio M.R., Heizmann C.W.
Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres
Nature, 1982, 297, 504-6

Coffee C.J., Bradshaw R.A.
Carp muscle calcium-binding protein. Characterization of the tryptic peptides and the complete amino acid sequence of component B.
J. Biol. Chem., 1973, 248, 3305-12

Collins J.H., Theibert J.L., Francois J.M., Ashley C.C., Potter J.D.
Amino-acid sequences and Ca(2+)-binding properties of two isoforms of barnacle troponin C
Biochem., 1991, 30, 702-7

Conlon J.M., O'Harte F., Smith D.D., Balment R.J., Hazon N.
Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish)
Neuroendocrinology, 1992, 55, 230-5

Cox J.A., Winge D.R., Stein E.A.
Calcium, magnesium and the conformation of parvalbumin during muscular activity
Biochimie, 1979, 61, 601-5

Cummins C., Anderson P.
Regulatory myosin light-chain genes of *Caenorhabditis elegans*
Mol. Cell. Biol., 1988, 8, 5339-49

Dannaeus A., Inganas M.
A follow-up study of children with food allergy : clinical course in relation to serum IgE and IgG antibody to milk, egg and fish
Clin. Allergy, 1981, 11, 533-9

Donato H., Martin R.B.
Conformation of carp muscle calcium binding parvalbumin
Biochem., 1974, 13, 4575-9

Elsayed S.M., Aas K.
Characterization of a major allergen (cod). Chemical composition and immunological properties
Int. Arch. Allergy, 1970, 38, 536-48

Elsayed S., Aas K.
Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing
Int. Arch. Allergy, 1971a, 40, 428-38

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

Elsayed S., Aas K., Christensen T.
Partial characterization of homogeneous allergens (cod)
Int. Arch. Allergy, 1971, 40, 439-47

Elsayed S., Aas K., Sletten K., Johansson S.G.O.
Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments
Immunochemistry, 1972, 9,647-61

Elsayed S., Apold J.
Allergenic structure of allergen M from cod. Allergenicity of the limited tryptic hydrolysis peptides of fragment TM 2
Int. Arch. Allergy appl. Immun., 1977, 54, 171-75

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, 449-59

Elsayed S., Apold J., Aas K., Bennich H .
The allergenic structure of allergen M from cod. Tryptic peptides of fragment TM 1
Int. Arch. Allergy appl. Immun., 1976, 52, 59-63

Elsayed S., Bennich H.
The primary structure of allergen M from cod
Scand. J. Immunol., 1975, 4, 203-8

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

Elsayed S., Sletten K., Aas K.
The primary structure of a major allergen (cod) : NH_2-terminal amino acid sequence of fragment TM 2
Immunochemistry, 1973, 10, 701-5

Elsayed S., Sornes S., Apold J., Vik H., 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, 77-82

Eslayed S., Titlestad K., Apold J., Aas K.
A synthetic hexadecapeptide derived from allergen M imposing allergenic and antigenic reactivity
Scand. J. Immunol., 1980, 12, 171-5

Elsayed S., Von Bahr-Lindstom H., Bennich H.
The primary structure of fragment TM 2 of allergen M from cod
Scand. J. Immunol., 1974, 3, 683-86

Engel E., Richter K., Obermeyer G., Briza P., Kungl A.J., Simon B., Auer M., Ebner C., Rheinberger H.J., Breitenbach M., 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, 28630-7

Fisher R, Fillmore H., Reynolds A.B.
Molecular cloning and characterization of the 162 kDa component of a multi-protein complex phosphorylated by Src
Soumission directe aux banques de donnés , 1994, numéro d'accession gi 1205975

Fullmer C.S., Wasserman R.H.
Chicken intestinal 28-kilodalton calbindin-D complete amino-acid sequence and structural considerations
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 4772-6

Galland A.V., Dory D., Pons L.,Chopin C., Rabesona H., Guéant J.L., Fleurence J.
Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein
J. Chrom. B, 1998, 706, 63-71

Gazzaz S.S., Rasco B.A.
Paravalbumins in fish and their role as food allergens : a review
Rev. Fish. Sci., 1993, 1, 1-26

Gerday C., Joris B., Gerardin-Otthirs N., Collin S., Hamoir G.
Parvalbumins from the lungfish (*Protopterus dolloi*)
Biochimie, 1979, 61, 589-99

Gerday C., Gillis J.M.
The possible role of parvalbumins in the control of contraction
J. Physiol., 1976, 258, 96-7*P*

Hagiya M., Close T.J., Tait R.C., Kado C.I.
Identification of pTic 58 plasmid-encoded proteins for virulence in *Agrobacterium tumefaciens*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2669-73

Haiech J., Derancourt J., Pechère J.F., Demaille J.G.
Magnesium and calcium binding to parvalbumins : evidence for differences between parvalbumins and an explanation of their relaxing function
Biochem., 1979a, 18, 2752-8

Haiech J., Derancourt J., Pechère J.F., Demaille J.G.
A new large-scale purification procedure for muscular parvalbumin
Biochimie, 1979b, 61,583-7

Hansen T.K., Bindslev-Jensen C., Skov P.S., Poulsen L.K.
Codfish allergy in adults : IgE cross-reactivity among fish species
Ann. Allergy Asthma Immunol., 1997, 78, 187-94

Heck G.R., Chamberlain A.K., Ho T.D.H.
Barley embryo globulin 1 gene, Beg 1 : characterization of cDNA, chromosome mapping and regulation of expression
Mol. Gen. Genet., 1993, 239, 209-18

Heizmann C.W.
Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein ; distribution, properties and possible roles in mammalian cells
Experientia, 1984, 40, 910-21

Helbling A., Lopez M., Lehrer S.B.
Fish allergy : is it a real problem with surimi-based products ?
Arch. Allergy Immunol., 1992, 99, 452-5

Helbling A., McCants M.L., Musmand J.J., Schwartz H.J., Lehrer S.B.
Immunopathogenesis of fish allergy : identification of fish allergic adults by skin test and radioallergosorbent test
Ann. Allergy Asthma Immunol., 1996, 77, 48-54

Hemmens V.J., Baldo B.A., Underwood P.A., Holen E., Elsayaed S.
Common antigenic and allergenic determinants on codfish proteins detected with mouse monoclonal IgG and human IgE antibodies
Mol. Immunol., 1989, 26, 477-84

Huss H.H.
Post mortem changes in fish. In « Quality and quality changes in fresh fish » edited by Huss H.H., Food and Agriculture organization of the United Nations
1995, pp 35-51

Imajoh S., Aoki K., Ohno S., Emori Y., Kawasaki H., Sugihara H., Suzuki K.
Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca2+-activated neutral protease
Biochem., 1988, 27, 8122-8

James J.M., Burks A.W.
Food hypersensitivity in children
Curr. Opin. Pediatr., 1994, 6, 661-7

James J.M., Helm R.M., Burks A.W., Lehrer S.B.
Comparison of pediatric and adult IgE antibody binding to fish proteins
Ann. Allergy Asthma Immunol., 1997, 79, 131-7

Jauregui-Adell J., Pechère J.F.
Parvalbumins from cœlacanth muscle. I. General survey
Biochim. Biophys. Acta, 1978a, 536, 263-8

Jauregui-Adell J., Pechère J.F.
Parvalbumins from cœlacanth muscle. III. Amino acid sequence of the major component
Biochim. Biophys. Acta, 1978b, 536, 275-82

Kanner S.B., Reynolds A.B., Vines R.R., Parsons J.T.
Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 3328-32

Ki-Ling suen J.H., Choi J.H.
Isolation and sequence of a cDNA clone for a carrot calcium-dependent protein kinase : homology to calcium/calmodulin-dependent protein kinases and to calmodulin
Plant Mol. Biol., 1991, 17, 581-90

Kitagawa K., Wang X., Hatada I., Yamoaka T., Nojima H., Inagawa J., Ase T., Mitsuya K., Oshimura M., Murata A., Monden M., Mukai T.
Isolation and mapping of human homologues of an imprinted mouse gene U2af1-rs1
Genomics, 1995, 30, 257-63

Kretsinger R.H.
Gene triplication deduced from the tertiary structure of a muscle calcium binding protein
Nature New Biol., 1972, 240, 85-8

Kretsinger R.H., Nockolds C.E.
Carp muscle calcium-binding protein. Structure determination and general description
J. Biol. Chem., 1973, 248, 3313-26

Lee V.D., Huang B.
Molecular cloning and centrozomal localization of human caltractin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 11039-43

Lindstrøm C.D-V., Van Dô T., Hordvik I., Endresen C., Elsayed S.
Cloning of two distinct cDNAs encoding paravalbumin, the major allergen of atlantic salmon (salmo salar)
Scand. J. Immunol., 1996, 44, 335-44

McLachlan A.D.
Gene duplication in carp muscle calcium binding protein
Nature New Biol., 1972, 240, 83-5

Malencik D.A., Heizmann C.W., Fischer E.H.
Structural proteins of dogfish skeletal muscle
Biochem., 1975, 14, 715-21

Martino (de) M., Novembre E., Galli L., de Marco A., Botarelli P., Marano E., Vierucci A.
Allergy to different fish species in cod-allergic children : in vivo and in vitro studies
J. Allergy Clin. Immunol., 1990, 86, 909-14

Martino (de) M., Peruzzi M., de Luca M., Amato A.G., Galli L., Lega L., Azzari C.,Vierucci A.
Fish allergy in children
Ann. of Allergy, 1993, 71, 159-65

Mata E., Favier C., Moneret-Vautrin D.A., Nicolas J.P., Han Ching L., Guéant J.L.
Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63-kDa protein
Allergy, 1994, 49, 442-7

Maximov E.E., Mitin Y.V.
Binding of calcium by fragment 38-108 of pike parvalbumin
Biochimie, 1979, 61, 751-4

Moneret-Vautrin D.A.
Food antigens and additives
J. Allergy Clin. Immunol., 1986, 78, 1039-46

Moutété F., Olszewski A., Gastin I., Namour F., Moneret-Vautrin D.A., Guéant J.L.
Purification of allergenic proteins from peanut for preparation of the reactive solid phase of a specific IgE radioimmunoassay
J. Chrom., 1994, 664, 211-7

Musmand J.J., Helbling A., Lehrer S.B.
Surimi : Something fishy
J. Allergy Clin. Immunol., 1996, 98, 697-9

Niestijl Jansen J.J., Kardinaal A.F.M., Huijbers G., Vlieg-Boerstra B.J., Martens B.P.M., Ockhuizen T.
Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population
J. Allergy Clin. Immunol., 1994, 93, 446-56

Nordlee J.A., Taylor S.L.
Immunological analysis of food allergens and other food proteins. Immunoassays for food proteins have great potential for a variety of uses, but considerable research will be necessary for their commercialization
Food Technol., 1995, 49, 129-32

Ozawa M., Ozawa M.
Cloning of a human homologue of mouse reticulocalbin reveals conservation of structural domains in the novel endoplasmic reticulum resident Ca2+-binding protein with multiple EF-hand motifs
J. Biochem :, 1995, 117, 1113-9

Palmisano W.A., Henzl M.T.
Molecular cloning of the thymus-specific parvalbumin known as avian thymic hormone : isolation of a full length cDNA and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*
Arch. Biochem. Biophys., 1991, 285, 211-20

Pauls T.L., Cox J.A., Berchtold M.W.
The Ca^{2+}-binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes : new structural and functional findings
Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1306, 39-54

Pechère J.F., Capony J.P., Ryden L.
The primary structure of the major parvalbumin from hake muscle. Isolation and general properties of the protein
Eur. J. Biochem., 1971, 23, 421-8

Pechère J.F., Focant B.
Carp myogens of white and red muscles. Gross isolation on sephadex columns of the low-molecular-weight components and examination of their participation in anaerobic glycogenolysis
Biochem. J., 1965, 96, 113-8

Pechère J.F., Rochat H., Ferraz C.
Parvalbumins from cœlacanth muscle. II. Amino acid sequence of the two less acidic components
Biochim. Biophys. Acta, 1978, 536, 269-74

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.
Extraction, purification and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells
Dans Molecular cloning, a laboratory manual, second edition, Nolan C. (Ed), 1989a, pp 7.3-7.5

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.
Commonly used techniques in molecular cloning
Dans Molecular cloning, a laboratory manual, second edition, Nolan C. (Ed), 1989b, pp E.5

Sampson H.A.
Food allergy
J. Allergy Clin. Immunol., 1989, 84, 1062-7

Schaefer Brian C.
Revolutions in rapid amplification of cDNA ends : New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-lenght cDNA ends
Anal. Biochem., 1995, 227, 255-73

Scherer Pe :, Lederkremer G.Z., Williams S., Frogliano M., Baldini G., Lodish H.F.
Cab45, a novel Ca(2+)-binding protein localized to the golgi lumen
J. Cell. Biol., 1996, 133, 257-68

Smith P.M., Xu H., Swoboda I., Singh M.B.
Identification of a Ca^{2+} binding protein as a new bermuda grass pollen allergen Cyn d 7 : IgE cross-reactivity with oilseed rape pollen allergen Bra r 1
Int. Arch. Allergy Immunol., 1997, 114, 265-71

Sorimachi H., Kinbara K., Kimura S., Tokahashi M., Ishiura S., Sasagawa N., Sorimachi N., Shinanda H., Tagawa K., Maruyama K.
Muscle-specifc calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associated with connectin through IS2, a p94-specific sequence
J. Biol. Chem., 1995, 270, 31158-62

Stein J.P., Munjaal R.P., Lagace L., Lai E.C., O'Malley B.W., Means A.R.
Tissue-specific expression of a chicken calmodulin pseudogene lacking intervening sequences
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 6485-9

Suzuki K., Emori Y., Ohno S., Imahori S., Kawasaki H., Mijake S.
Structure and function of the small (30 K) subunit of calcium-activated neutral protease (CANP)
Biomed. Biochim. Acta, 1986, 45, 1487-91

Tagaki T, Cox J.A.
Amino acid sequences of four isoforms of amphioxus sarcoplasmic calcium-binding proteins
Eur. J. Biochem., 1990, 192, 387-99

Taylor Steve L.
Food allergies
Food Technol., 1985, 98-105

Taylor S.L., Stratton J.E., Nordlees J.A.
Histamine poisoning (scombroid fish poisoning) : an allergy-like intoxication
Clin. Toxicol., 1989, 27, 225-40

Thatcher D.R., Pechère J.F.
The amino-acid sequence of the major parvalbumin from thornback-ray muscle
Eur. J. Biochem., 1977, 75, 121-32

Tinner R., Oertle M., Heizmann C.W., Bosshard H.R.
Ca^{2+}-binding site of carp paravalbumin recognized by monoclonal antibody
Cell Calcium, 1990, 11,19-23

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Twardosz A., Hayek B., Seiberler S., Vangelista L., Elfman L., Gronlund H., Kraft D., 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, 197-204

Van der Blieck A.M., Meyers M.B., Biedler J.L., Hes E., Borst P.
A 22-kd protein (sorcin/V19) encoded by an amplified gene en multidrug-resistant cells, is homologous to calcium-binding light chain of calpain
EMBO J., 1986, 5, 3201-8

Vieths S., Jankiewicz A., Schöning B., Aulepp H.
Apple allergy : The IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen
Allergy, 1994, 49, 262-71

Wind C., Haeger K.P.
Legumin encoding sequences from the redwood familly (Taxidiacese) reveal precursors lacking the conserved Asn-Gly processing site
FEBS Lett., 1996, 383, 46-50

Young E., Stoneham M.D., Petruckevitch A., Barton J., Rona R.
A population study of food intolerance
Lancet, 1994, 343, 1127-30

Zhu D., Maeda N., Fitch W.M.
Amino-acid sequences of two parvalbumins from electric eel (*Electrophorus electricus)*
Sci. Sin. B, 1985, 28, 926-41

Zot A.S., Potter J.D., Strauss W.L.
Isolation and sequence of cDNA clone for rabbit fast skeletal muscle troponin C
J. Biol. Chem.,1987, 262, 15418-21

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Liste des figures

Figure 1 : Purification de l'allergène Gad c I de cabillaud. Ce schéma reprend l'ensemble des travaux de Aas et de son équipe entre 1966 et 1973. 10 bis

Figure 2 : Séquence primaire de l'allergène Gad c I (d'après Elsayed *et al*, 1975) 11 bis

Figure 3 : Représentation schématique de l'allergène Gad c I (d'après Elsayed *et* Apold, 1983) 11 bis

Figure 4 : Comparaison de la structure des gènes de parvalbumines de l'homme, du rat et de la souris (d'après Pauls *et al*, 1996). 16 bis

Figure 5 : structure tridimenssionnelle de la parvalbumine B de carpe. Détermination par diffraction aux rayons X (Kretsinger *et* Nockolds, 1973) 17 bis

Figure 6 : Représentation symbolique des domaines CD et EF des parvalbumines (D'après Kretsinger *et* Nockolds, 1973). 18 bis

Figure 7 : Rôle présumé des parvalbumines dans le muscle d'après Heizmann (1984) 19 bis

Figure 8 : Principe de la technique 3' RACE (d'après Schaefer *et al*, 1995) 33 bis

Figure 9 : Séquences des sites de fixation du calcium de Gad c I et séquence de l'ADN complémentaire correspondant. Ces séquences ont permis de synthétiser les amorces Gad c I 50 S et Gad c I 92 AS. 34 bis

Figure 10 : La carte du vecteur pGEM®-T 37 bis

Figure 11 : Inhibition du dosage RIA des IgE spécifiques des protéines de cabillaud après incubation du sérum du patient CJ avec des concentrations croissantes de protéines de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues dans deux conditions différentes : extraction dans un tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 et dans un tampon phosphate 0,07 M pH 7,0 contenant 0,6 M NaCl. 42 bis

Figure 12 : Pourcentage de fixation de l'anti-IgE marqué à l'iode 125 sur les disques de nitrocellulose (cabillaud) en fonction de la concentration de l'agent bloquant incubé avec le sérum du patient CJ avant d'être mis en présence avec les disques. Trois agents bloquant ont été étudiés : la gélatine, le lait en poudre et la BSA 42 ter

Figure 13 : Immunoemreinte réalisée avec le sérum CJ et les protéines de l'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis*. Le tween 20 était l'agent bloquant. Dix microgrammes de protéines ont été déposées. 43 bis

Figure 14 : Séparation des protéines de cabillaud *pre rigor mortis* par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-sepharose et allergénicité relative des fractions obtenues. 43 ter

Figure 15 : Electrophorèse PAGE-SDS des fractions protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues par chromatographie DEAE. Gel de polyacrylamide10 – 20 % coloré à l'argent 44 bis

Figure 16 : Bandes protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* reconnues par les IgE d'un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud dans l'extrait brut et dans les pics protéiques obtenues par chromatographie DEAE 44 ter

Figure 17 : Comparaison entre les distributions des bandes IgE-réactives du cabillaud réalisées dans différentes études 44 quinter

Figure 18 : Bandes protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* reconnues par un anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium sur les parvalbumines. Les protéines des neuf pics DEAE et de l'extrait brut sont analysées. Dix microgrammes de protéines sont séparées par électrophorèse PAGE-SDS sur gel de polyacrylamide 10 - 20 % 46 bis

Figure 19 : Bandes IgE-réactives du cabillaud et bandes reconnues par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium des parvalbumines 46 ter

Figure 20 : Comparaison entre la distribution des bandes IgE-réactives du cabillaud ayant une bande de même masse moléculaire apparente reconnue par l'antiparvalbumine et la distribution théorique des polymères ou agrégats de l'allergène majeur du cabillaud Gad c I. 47 bis

Figure 21 : Comparaison entre le profil des bandes IgE-réactives du cabillaud ayant des bandes de mêmes masses moléculaires apparentes reconnues par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium de Gad c I et un profil théorique de protéines possédant au moins un site de fixation du calcium de type main EF 48 bis

Figure 22 : Bandes protéiques de cabillaud reconnues par les IgE d'un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud dans différents extraits de cabillaud. Dix microgrammes de protéines ont été déposées par extrait. 53 bis

Figure 23 : Distribution relative et pourcentage d'allergénicité relative des bandes IgE-réactives de cabillaud dans deux extraits de cabillaud *pre rigor mortis* avec ou sans incubation avec 5 mM EDTA. Les bandes protéiques IgE-réactives ont été détectées par immunoempreintes en utilisant un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud. 53 ter

Figure 24 : Electrophorèse PAGE-SDS de fractions protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues par chromatographie DEAE. 54 bis

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Figure 25 : Fractions protéiques de cabillaud *pre rigor mortis* obtenues par électrophorèse à élution continue. Gel de polyacrylamide 6 % coloré à l'argent 55 bis

Figure 26 : Produits d'amplification de cabillaud obtenus par 3' RACE et RT-PCR 57 bis

Figure 27 : PCR sur trois clones posistfs : les clones 460-3, 460-5 et 460-8. 58 bis

Figure 28 : A : Séquence de l'ADN complémentaire du clone 460-3. La séquence a été déterminée par deux séquençages à partir des amorces universelles T7 et sp6 du plasmide pGEM-T®. B : Séquence en acides aminés déduite. 58 ter

Figure 29 : Homologie entre le fragment cloné et certaines parvalbumines 59 bis

Figure 30: Homologies entre le fragment cloné et des protéines autres que les parvalbumines 59 ter

Figure 31: Homologies entre le fragment cloné et des protéines autres que des parvalbumines (suite) 60 bis

Figure 32 : Inhibition du dosage des IgE spécifiques au cabillaud du patient D.W. avec deux extraits de cabillaud : un cabillaud *pre rigor mortis* et un cabillaud acheté chez le poissonnier. 61 bis

Figure 33 : Distribution relative et pourcentage d'allergénicité relative des bandes IgE-réactives de cabillaud dans différents extraits protéiques : cabillaud *pre rigor mortis*, cabillaud *post rigor mortis* juste après la rigidité *post mortem* et cabillaud du commerce. Les bandes protéiques IgE-réactives ont été détectées par immunoempreintes en utilisant un mélange de douze sérums de patients allergiques 62 bis

Liste des tableaux

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Tableau I : Bandes protéiques du pic semi-purifié D de Gad c I séparées par électrophorèse PAGE-SDS. Analyse du pic D par immunoempreintes avec des anticorps monoclonaux dirigés contre Gad c I ou avec des séras de patients allergiques au cabillaud (d'après Hemmens *et al*, 1989). 13 bis

Tableau II : Résultats des dosages des IgE spécifiques de patients allergiques au cabillaud par CAP-RAST (f3) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) et par RIA avec des disques de nitrocellulose où sont adsorbées des protéines de cabillaud *pre rigor mortis*. Les disques ont été préparés par Allerbio (Varennes-en-Argonne, France) 41 bis

Tableau III : Distribution des bandes protéiques détectées par les IgE d'un mélange de douze sérums de patients allergiques au cabillaud ainsi que par l'anticorps dirigé contre le premier site de fixation du calcium des parvalbumines dans les différentes fraction obtenues par chromatographie DEAE et dans l'extrait brut de cabillaud *pre rigor mortis*. 44 quater

Tableau IV : Récapitulatif des résultats obtenus par RT-PCR ou 3'RACE 57 ter

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Annexes

Abréviations utilisées pour désigner les acides aminés

Acide aminé	Abréviations à 3 lettres	Abréviations à 1 lettre
Glycine	gly	G
Alanine	ala	A
Valine	val	V
Isoleucine	ile	I
Leucine	leu	L
Sérine	ser	S
Thréonine	thr	T
Cystéine	cys	C
Méthionine	met	M
Acide aspartique	asp	D
Asparagine	asn	N
Glutamate	glu	E
Glutamine	gln	Q
Arginine	arg	R
Lysine	lys	K
Histidine	his	H
Phénylalanine	phe	F
Tyrosine	tyr	Y
Tryptophane	trp	W
Proline	pro	P

Allergy 1998: 53: 42–50
Printed in UK – all rights reserved

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Copyright © Munksgaard 1998
ALLERGY
ISSN 0105-4538

Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract

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

D. Dory[1,2], C. Chopin[2], I. Aimone-Gastin[1], J. L. Gueant[1], L. Guerin[3], J. Sainte-Laudy[4], D. A. Moneret-Vautrin[5], J. Fleurence[2]

[1]Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EP CNRS 616, Faculté de Médecine de Nancy, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre Cedex; [2]Laboratoire de Qualité et Physico-Chimie, IFREMER, rue de l'Ile d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03; [3]Société Allerbio, 8 rue porte aux champs, 55270 Varennes-en-Argonne; [4]CERBA, rue de l'Equerre, 95310 Saint Ouen L'Aumone; [5]Service d'Allergologie et Immunologie Clinique, CHU Nancy, Hôpital Central, 29 avenue du Maréchal De Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France

Allergy to fish is one of the most common food allergies. Gad c 1 is the only fish allergen which has been purified and characterized. Other allergens have been detected by Western blot in cod extracts. We have now improved the Western-blot procedure in order to characterize fish IgE-reactive proteins from extracts prepared under different conditions: pre-rigor mortis and post-rigor mortis, EDTA addition or not, and DEAE ion-exchange chromatography. Several IgE-reactive protein bands have been identified over a wide molecular-weight range. In particular, the 104- and 130-kDa IgE-reactive protein bands were detected. These new bands may correspond to aggregates, as EDTA increased the relative amount of the 60-, 67-, 104-, and 130-kDa IgE-reactive protein bands in Western blot. All these bands were also detected by an antiparvalbumin monoclonal antibody, specific to the first calcium-binding site. The longer period of storage increased the relative amounts of the 41-, 80-, 104-, and 130-kDa IgE-reactive protein bands. The 18-kDa band was detected only in fish stored for several days. In conclusion, we have described IgE-reactive protein bands over a wide molecular-weight range (12–130 kDa) in Western blot of cod extract, and shown that EDTA and storage conditions may influence the relative distribution of IgE-reactive protein bands.

Key words: calcium-binding site; cod IgE-reactive protein bands; fish allergy; hypersensitivity; ion exchange chromatography; Western blotting.

C. Chopin
Laboratoire de Qualité et Physico-Chimie, IFREMER
Rue de l'Ile d'Yeu
BP 21105
44311 Nantes Cedex 03
France

Accepted for publication 23 July 1997

Food allergy affects 1–5% of the population (1–5). Children are especially affected, as 1–10% of them are food sensitive (4, 6, 7). These percentages increase in the case of certain diseases (e.g., atopic dermatitis [1, 8–10], urticaria [11, 12], asthma [12], and pollen allergy [13]). Severe and even fatal anaphylactic shocks have been reported in the literature (14–16).

Fish is one of the most commonly allergenic foods (1, 12, 17–22). Aas has shown that 88% of children hypersensitive to fish have specific IgE against cod (12). Other studies have shown that cod often causes allergy (21, 22).

Until now, only the major cod allergen, Gad c 1, has been purified and characterized. Aas separated the cod proteins by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose (23), gel filtration (24), and isoelectrofocalization (25). Gad c 1 is a 12.3-kDa parvalbumin (26) with an isoelectric point of 4.75 (25). Five allergenic sequences have been described (27–31). Other cod allergens were shown in extracts from the post-rigor mortis state by Western blotting with sera of patients allergic to salmon (21) or cod (32). Our group also found a 63-kDa allergen in cod-surimi (33). None of these allergens had been purified. In addition, the effects of fish storage conditions on allergenicity have not been studied until now, particularly as far as the consequences of postmortem degradation of the fish is concerned; e.g., the pre-rigor mortis and post-rigor mortis states.

Therefore, the present study aimed to characterize cod IgE-reactive protein bands by Western blotting of crude extract, in the pre-rigor mortis state, of semipurified fractions collected from ion-exchange chromatography, and to evaluate the effect of postmortem degradation on the allergenic proteins.

Material and methods

Sera

The patients involved in this study had had an immediate adverse reaction to cod. Three patients were followed up in the allergology medical unit of the Nancy university hospital center and had clinical symptoms of cod allergy and positive prick tests. Nine other patients had had an immediate adverse reaction to cod and were investigated for the detection of specific IgE against cod in a medical laboratory specialized in allergy (CERBA Laboratory, Paris, France). Of the 12 patients included in this study, 11 had positive cod (f3) CAP-RAST (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The blood was collected in dry tubes and centrifuged at 1000 *g* for 5 min. The serum was aliquoted and kept at −80°C.

Nine control sera were collected from healthy subjects without fish allergy, with a total IgE serum level lower than 30 kUI/l.

Preparation of cod extracts

Three cod extracts were prepared for this study:

1) Pre-rigor mortis cod: a fillet was cut before the postmortem rigidity and immediately placed in liquid nitrogen.
2) Post-rigor mortis cod was obtained by a standardized procedure: the fillet was cut just after postmortem rigidity and placed in liquid nitrogen. These fillets were provided by IFREMER, the French Marine Research Institute.
3) Commercial cod: a fresh fillet kept at 4°C was bought in a fish shop; proteins were extracted less than 1 h after the fillet was bought.

Cod muscles were crushed and homogenized in phosphate buffer 0.07 M, pH 7.0, or phosphate buffer 0.07 M, pH 7.0, 0.6 M NaCl at 4°C in a 2-ml solution per gram of tissue. The mixture was centrifuged at 20000 *g* for 20 min at 4°C. The supernatants were lyophilized and stored at 4°C. Less than 1 month later, the pre-rigor mortis cod extract was used for the DEAE chromatography, and less than 4 months later for the other experiments. Only soluble proteins, mainly sarcoplasmic proteins, were extracted at low ionic strength. Myofibrillar proteins, such as actin and myosin complex, were also solubilized in 0.6 M NaCl.

Protein concentration

The protein concentrations of the extracts and of the fractions (the latter obtained by ion-exchange chromatography) were determined by the Bradford method (34), the Coomassie®Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) being used according to the manufacturer's instructions. Bovine serum albumin (BSA) was used as a protein standard.

IgE radioimmunoassay (RIA)

The pre-rigor mortis cod proteins were coupled to nitrocellulose disks by ALLERBIO (Varennesen-Argonne, France). The IgE radioimmunoassay was performed as follows (33, 35–37). A volume of 50 µl of serum was incubated with a cod nitrocellulose disk for 3 h at 20°C in duplicate. The nitrocellulose disk was washed three times with 2.0 ml of 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.02% (w/v) BSA, and 0.5 M NaCl. The disk was incubated overnight at 20°C with 50 µl of ^{125}I-labeled antihuman IgE (Immunotech, Marseille, France) (30000 cpm). The excess of labeled anti-IgE was eliminated by washing as described above. The gamma-radioactivity was counted. The results were expressed as a mean percentage of gamma-radioactivity bound onto the cod disk, and as the ratio of the mean percentage of total gamma-radioactivity bound to the cod disk for the patient to the mean percentage of radioactivity bound for nonatopic subjects: a ratio>3 indicates the presence of specific IgE (35, 37).

Inhibition of the IgE-RIA was performed by the same protocol except that the patient's serum was incubated in duplicate for 1 h at 20°C with 50 µl of cod protein solution (33, 36, 37) before incubation with the reactive phase. The inhibition percentage (IP) was estimated from gamma-counting of the solid phase with or without preincubation of the patient's serum with the protein solution:

$$IP = [(cpm_i - cpm_0)/cpm_0] \times 100$$

where cpm_0 represented the radioactivity adsorbed to the solid phase without incubation with the cod protein solution, and cpm_i represented the radioactivity adsorbed with incubation with the cod protein solution.

DEAE chromatography

The cod proteins were separated by ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose® CL-6B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using a two-pump gradient system P-50 (Pharmacia). The column was 16 mm across and 200 mm high. An amount of 40 mg of cod extract was applied to the column. The proteins were eluted with a NaCl gradient of 0.07 M phosphate buffer, pH 7.0, as buffer A and 0.07 M phosphate buffer, pH 7.0, and 1 M NaCl as buffer B. The flow rate was constant: 1.0 ml/min. The elution of the proteins was analyzed by absorbance measurement at 280 nm. The proteins were collected in 5-ml fractions. The fractions were dialyzed against

distilled water. These fractions were studied by dot-blotting and Western blotting. The relative allergenicity for each collected fraction was determined by the dot-blotting analysis with a pool of the 12 cod-allergic sera and was estimated as the ratio of the radioactivity bound in the protein fraction to the radioactivity bound in the crude extract.

SDS–PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of cod proteins (pre-rigor mortis with or without incubation with 5 mM EDTA, post-rigor mortis, DEAE protein fractions, commercial cod) and in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) was performed with a 10–20% polyacrylamide gel gradient in 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.18 M glycine, and 0.1% SDS, using a vertical Mini Protean® II apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). A buffer containing 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM EDTA, 3% SDS, 120 mM DTT, 30% glycerol, and 0.05% bromophenol blue was used for the preparation of samples submitted to electrophoresis. The mixture was heated at 100°C for 3 min before loading. An amount of 2 μg of proteins was loaded and separated for 90 min at 200 V when the gel was silver stained. An amount of 10 μg of proteins was loaded for the Western blot. Two molecular mass markers were used. The first one was provided by Pharmacia (Uppsala, Sweden): phosphorylase b (94 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsine inhibitor (20.1 kDa), and lactalbumin (14.4 kDa). The second was provided by Bio-Rad (Richmond, CA, USA): myosin (208 kDa), β-galactosidase (144 kDa), BSA (87 kDa), carbonic anhydrase (44.1 kDa), soybean trypsin inhibitor (32.7 kDa), lysozyme (17.7 kDa), and aprotinin (7.1 kDa).

Silver staining of the gel

The proteins were fixed for 1 h in 40% methanol and 10% acetic acid. The gel was washed three times in 30% ethanol and incubated in 0.02% sodium thiosulfate for 1 min. The gel was washed three times in deionized water and incubated for 20 min in 0.2% silver nitrate and 0.02% formaldehyde. The gel was again washed three times in deionized water and incubated in 3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde, and 0.0005% sodium thiosulfate until the protein bands were sufficiently stained. The gel was washed with deionized water.

Western blotting

After separation by electrophoresis, the proteins were transferred for 16 h at 20 V onto a nitrocellulose membrane (0.2 μm Trans-Blot® Transfert Medium, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) with a Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). The following buffer was used for the transfer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, and 20% methanol.

Detection of the blotted proteins with a pool of cod-allergic sera. The membrane was blocked and incubated with the allergic sera as described by Moutété et al. (37), except that gelatin was replaced by Tween 20 (38). 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 washing three times with 0.05% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.15 M NaCl, the nitrocellulose was incubated for 3 h with 1 ml of a pool of 12 sera with specific IgE against cod IgE-reactive protein bands per protein extract tested (the pool of sera was diluted 1:10 in 0.1% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.15 M NaCl) for 3 h at room temperature. The nitrocellulose was washed three times and incubated overnight with 1 ml of ^{125}I-labeled anti-IgE (diluted 1:10 in 0.3% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.15 M NaCl) (60 000 cpm). IgE binding was detected by exposure on a Phosphor screen (PhosphorImager, Molecular Dynamics). The screen was scanned with the PhosphorImager 445 SI apparatus. Relative allergencity was determined for each IgE-reactive protein band in each cod extract. For each cod extract, the intensity of each IgE-reactive protein band was added. The relative allergenicity was expressed as the ratio of the band intensity to the sum of the band intensities × 100.

Detection of the blotted proteins with antiparvalbumin (Sigma, St Louis, MO, USA). The membrane was blocked as described above. It was incubated with monoclonal antiparvalbumin (39) (clone PA-235, Sigma) 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. The membrane was washed three times and was incubated with anti-mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate (Sigma) diluted 1:10 000 in 0.3% (v/v) Tween 20, 20 mM Tris HCl, pH 7.4, and NaCl 0.15 M for 3 h. The membrane was again washed three times and incubated with alkaline phosphatase substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, and nitroblue tetrazolium, the BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet (Sigma) being used. The nitrocellulose membrane was removed when sufficient color had developed and was then rinsed with distilled water.

Table 1. Cod (f3) CAP-RAST results and adsorption to cod nitrocellulose disk of serum IgE from patients who had allergic reaction to cod

Patient	Age (years)	f3 (cod) CAP-RAST RIA results (Pharmacia)		Adsorption of cod nitrocellulose disks	
		Specific IgE level (kUI/l)	Class	% Radioactivity bound	Ratio patient/control
C.J.	13	5.3	3	42	18.3
M.M.	5	8.3	3	63	27.4
D.W.	55	92.9	4	52	22.6
C.J.2	13	3.3	2	37	16.1
D.M.	4	3.7	3	36	15.6
S.S.	44	1.9	2	8	3.5
R.Y.	18	63.2	4	73	31.7
L.D.	17	Not determined		11	4.8
S.C.	5	3.9	3	35	15.2
B.J.	1	9.8	3	45	19.6
B.M.	13	4.4	3	37	16.1
E.C.	7	4.3	3	44	19.1
Nine negative control sera					
Minimum				1.2	
Maximum				3.1	
Mean value				2.3 ± 0.7	

Dot-blotting

An amount of 10 μg of each DEAE protein fraction or crude pre-rigor mortis cod extract was applied to a nitrocellulose membrane (0.2 μm Trans-Blot® Transfert Medium, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) with the Bio-Dot® Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). The nitrocellulose membrane was blocked and incubated with a pool of the 12 sera with specific IgE against cod diluted 10 times, as described for the Western-blotting protocol, except that only 250 μl of diluted sera was used per cod extract tested.

Relative allergenicity was determined for each DEAE protein fraction. An amount of 10 μg of the crude pre-rigor mortis cod extract served as the allergenicity reference. The relative allergenicity for each DEAE fraction was estimated as the ratio of the fraction allergenicity to the crude extract allergenicity.

Results

The IgE radioimmunoassay (RIA) was performed with 12 cod-allergic sera, cod protein nitrocellulose disks prepared by Allerbio (Varennes-en-Argonne, France) being used with our cod pre-rigor mortis protein extract. The 12 sera had a ratio of the percentage of ^{125}I-labeled anti-human IgE bound to the percentage of radioactivity bound in the case of nonatopic subjects higher than 3 (Table 1). This indicated the presence of specific IgE against cod proteins. The ratios were between 3.5 and 31.7. The mean value of the nine negative sera was 2.3±0.7%.

Pre-rigor mortis cod proteins were extracted in 0.07 M phosphate buffer, pH 7.0, with or without 0.6 M NaCl. The two extracts were analyzed by IgE-RIA inhibition using C.J.'s serum. The proteins obtained by both extraction conditions gave typical inhibition curves (data not shown). The curves were closely related. The dose that inhibited 50% RAST was 1 mg/l in both cases. The subsequent fractionation of protein in DEAE chromatography was performed only with the NaCl-free protein extract.

In preliminary studies, different Western-blot protocols were tested in which the blocking agent was different: gelatin, milk, BSA, and Tween 20. No allergen was detected with C.J.'s serum when gelatin, milk, or BSA was used. IgE-RIA inhibition to cod proteins was observed with gelatin, milk, and BSA, showing the presence of nonspecific interaction between the IgE against cod proteins and these blocking agents (data not shown). When Tween 20 was used as a saturating agent of the Western blot, six IgE-reactive protein bands were found (data not shown): 12.5, 19, 29, 39, 62, and 104 kDa, with C.J.'s serum. The highest band intensity for this patient was the 104-kDa IgE-reactive band.

Separation of the cod proteins by DEAE chromatography and study of their allergenicity

The soluble pre-rigor mortis cod proteins were separated onto DEAE sepharose® CL-6B (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The best separation was obtained with the NaCl gradient shown in Fig. 1.

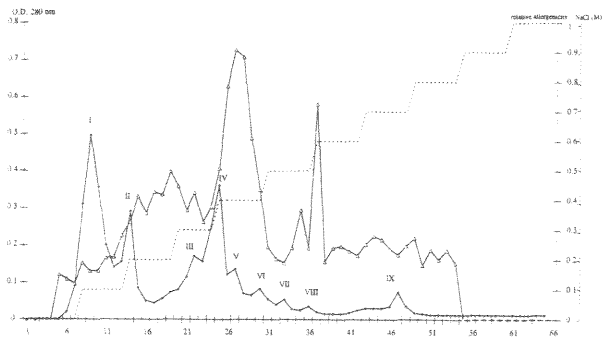


Fig. 1. DEAE chromatography and relative allergenicity of pre-rigor mortis cod proteins. Elution was performed in 0.07 M phosphate buffer, pH 7.0, with NaCl gradient and flow rate of 1 ml/min. Elution of proteins was analyzed by absorbance measurement at 280 nm. Relative allergenicity was determined in dot-blot analysis. ◆ profile elution, △ relative allergenicity, ... : NaCl concentration.

Three main peaks were cleaved (I, II, and IV) concurrently with six minor peaks. The peaks were analyzed by SDS–PAGE (Fig. 2). Each collected fraction was analyzed by dot-blot with 250 µl of a 10-fold diluted pool of the 12 sera indicated in Table 1 with specific IgE against cod. The highest positivity of dot-blot was observed at retention times of 90, 130, and 185 min, corresponding, respectively, to peaks III, V, and VIII (Fig. 1).

Western blotting was performed with samples corresponding to the peaks eluted from DEAE chromatography and also with the crude extracts. The same pool of the 12 sera with specific IgE against cod as for the dot-blot was used (1 ml of 10-fold diluted sera per extract). The results are presented in Fig. 3. The distribution of the IgE-reactive protein bands is also given in Table 2, taking into account that 16 molecular sizes ranging from 12 to 130 kDa were observed in the Western blot. The crude extract was composed of eight IgE-reactive protein bands: 12, 22, 30, 45, 60, 67, 104, and 130 kDa. The 12-, 30-, and 67-kDa bands gave the most intensive radioactivity bands. The 12-kDa IgE-reactive protein band was found in the nine analyzed fractions. The 130- and the 104-kDa bands were more intensively observed in eluted fractions IV and V than in the crude extract. Bands of 13, 23, 25, 41, 49, 55 and 80 kDa were observed only in the DEAE fractions.

Detection of a common epitope to parvalbumins

The blotted proteins were detected by antiparvalbumin (Sigma, clone PA-235) (Fig. 4, Table 2). This antibody is directed against an epitope in the first parvalbumin Ca^{2+}-binding site and specifically stains the Ca^{2+}-bound parvalbumin form (39). All the IgE-reactive protein bands in the crude extract were recognized by antiparvalbumins. The 25-, 50-, and 80-kDa IgE-reactive protein bands which were found only in the DEAE peaks were also recognized by antiparvalbumins in Western blot.

To study the influence of Ca^{2+}, we incubated the pre-rigor mortis cod extract with and without 5 mM EDTA overnight. The extract was analyzed by Western blot with the same pool of the 12 cod-allergic sera as for the dot-blot and Western blot described above. The same IgE-reactive protein bands were detected in both experiments, but the 30-kDa band relative amount was lower, and the 60-, 67-, 104-, and 130-kDa band relative amount was increased, in the presence of EDTA (Figs. 3 and 5).

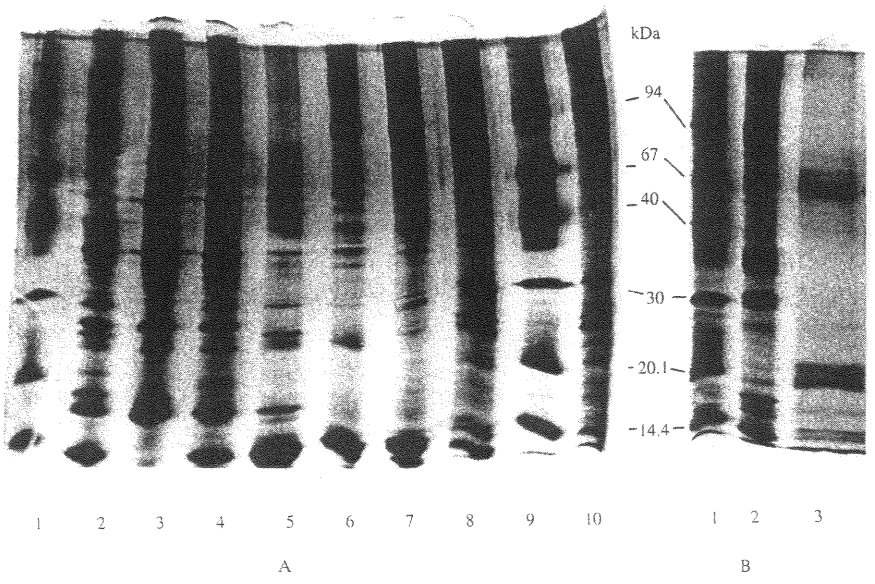


Fig. 2. SDS–PAGE of pre-rigor mortis cod DEAE peaks. Proteins were separated on polyacrylamide gel gradients of 10–20%. Amount of 2 µg of each protein fraction was applied and separated for 90 min (200 V). Proteins were silver-stained. A) Lane 1: molecular weight markers; lane 2: total pre-rigor mortis cod extract; lane 3: DEAE peak I; lane 4: DEAE peak II; lane 5: DEAE peak III; lane 6: DEAE peak IV; lane 7: DEAE peak V; lane 8: DEAE peak VI; lane 9: molecular weight markers; lane 10: DEAE peak VII. B) Lane 1: molecular weight markers; lane 2: DEAE peak VIII; lane 3: DEAE peak IX.

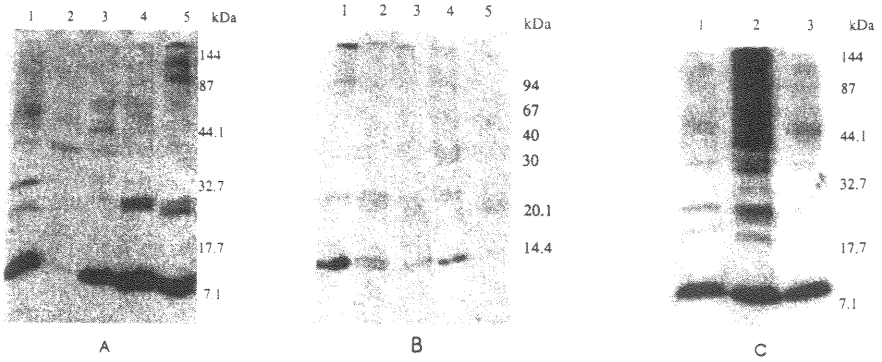


Fig. 3. Western blot of pre-rigor mortis cod DEAE peaks with pool of 12 cod-allergic sera. SDS–PAGE was performed on 10–20% polyacrylamide gel. Amount of 10 μg of each protein fraction was separated (90 min at 200 V). Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. Membrane A) Lane 1: crude pre-rigor mortis cod extract without EDTA; lane 2: DEAE peak I; lane 3: DEAE peak II; lane 4: DEAE peak III; lane 5: DEAE peak IV. Membrane B) Lane 1: DEAE peak V; lane 2: DEAE peak VI; lane 3: DEAE peak VII; lane 4: DEAE peak VIII; lane 5: DEAE peak IX. Membrane C) Lane 1: post-rigor mortis cod obtained just after postmortem rigidity; lane 2: post-rigor mortis cod bought in fish shop; lane 3: pre-rigor mortis cod proteins incubated with 5 mM EDTA overnight.

Influence of freshness on allergen distribution

Two post-rigor mortis cod extracts were used: the first was obtained by a standardized procedure, i.e., just after postmortem rigidity, and the second was bought in a fish shop. Western blot using the same pool of 12 sera from allergic patients with specific IgE as the pool used above showed a different IgE-reactive protein band relative distribution with the commercial fillet from the crude pre-rigor mortis cod extract (Figs. 3 and 5). All the IgE-reactive protein bands found in the crude pre-rigor mortis extract (Fig. 3, Table 2) were found in the commercial fillet. A longer period of storage might have increased the relative amounts of these bands and also of the additional 18-, 41-, and 80-kDa IgE-reactive protein bands in the commercial fish extract. A 41-kDa IgE-reactive protein band was detected in the DEAE peak VIII, and an 80-kDa IgE-reactive protein band was detected in the DEAE peaks I and III. The 18-kDa IgE-reactive protein band was not detected elsewhere. The cod protein extract prepared just after postmortem rigidity did not affect the relative distribution of IgE-reactive protein bands, compared to the pre-rigor mortis one (Figs. 3 and 5). An amount of 1 μg of pre-rigor mortis cod extract inhibited 50% of D.W.'s serum IgE-RIA, whereas only 10 ng of commercial cod extract could inhibit this IgE-RIA at the same level (Fig. 6).

Table 2. Distribution of proteins detected by specific IgE and antiparvalblumins in different pre-rigor mortis cod DEAE peaks and in crude extract

Protein (kDa)	Crude	DEAE I	DEAE II	DEAE III	DEAE IV	DEAE V	DEAE VI	DEAE VII	DEAE VIII	DEAE IX
160	■				■			■		
150	■									
130	■				■	■		■	■	
104	■				■	■	■			
97	■									
92	■	■	■	■	■					
87				■						
80	■	■	■	■		■			■	
72	■									
67	■	■	■	■					■	
60	■	■	■	■						
57	■				■					
55			■							
49			■					■	■	■
45	■	■	■		■					
41	■			■		■			■	
35	■									
30	■		■	■	■					
25			■	■	■	■		■	■	
23				■	■		■	■	■	
22	■			■	■	■	■	■	■	■
13							■			
12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ Protein detected by antiparvalbumin

■ IgE-reactive protein band

Discussion

The RIA of the specific IgE against pre-rigor mortis cod proteins was positive for all the patients included in this study (Table 1). The IgE-RIA inhibition test of pre-rigor mortis cod proteins, the Western blot (Fig. 4), and the dot-blot showed the presence of IgE-reactive protein bands in the pre-rigor mortis cod soluble proteins. These results agree with the results obtained by Aas (23).

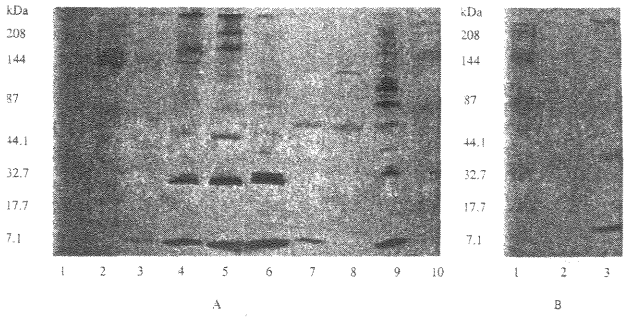


Fig. 4. Western blot of pre-rigor mortis cod DEAE peaks with antiparvalbumin. SDS–PAGE was performed on 10–20% polyacrylamide gel. Amount of 10 μg of each protein fraction was separated (90 min at 200 V). Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. Membrane A) Lane 1: molecular weight markers; lane 2: crude pre-rigor mortis cod extract; lane 3: DEAE peak I; lane 4: DEAE peak II; lane 5: DEAE peak III; lane 6: DEAE peak IV; lane 7: DEAE peak V; lane 8: DEAE peak VI; lane 9: molecular weight markers; lane 10: DEAE peak VII. Membrane B) Lane 1: molecular weight markers; lane 2: DEAE peak VIII; lane 3: DEAE peak IX.

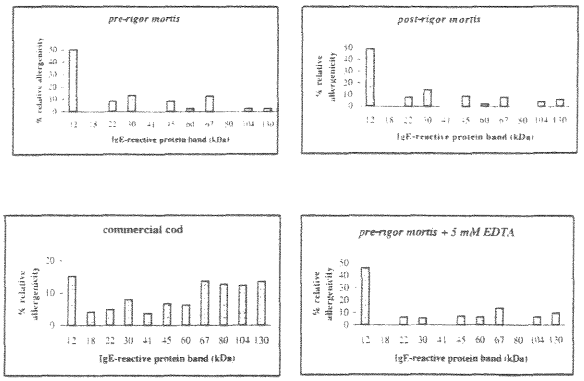


Fig. 5. Distribution and percentage of relative radioactivity of cod IgE-reactive protein bands in different cod extracts. IgE-reactive protein bands were detected by Western blot with pool of 12 cod-allergic sera.

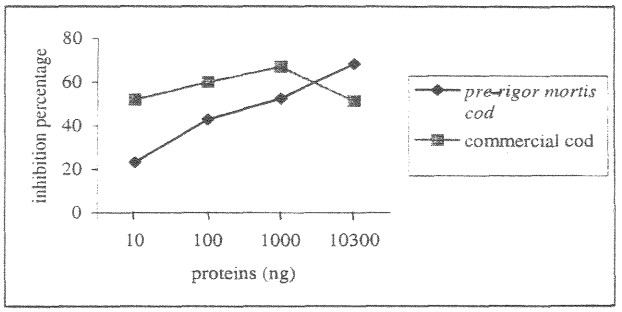


Fig. 6. Inhibition of D.W.'s serum IgE-RIA by pre-rigor mortis and commercial cod extract.

Optimization of the Western-blotting technique for the detection of interaction between cod IgE-reactive protein bands and IgE from cod-allergic sera was carried out. This optimization was obtained by limiting nonspecific interaction between specific IgE against cod IgE-reactive protein bands and the Western-blotting saturating agent. It allowed us to identify new IgE-reactive protein bands in crude cod extract and in DEAE cod protein fractions. These new bands may correspond to protein aggregates as well as new allergens. The pre-rigor mortis crude extract contained eight IgE-reactive protein bands of 12, 22, 30, 45, 60, 67, 104, and 130 kDa (Fig. 3 and Table 2). They were detected by Western blot using a pool of 12 cod-allergic sera at our disposal with Tween 20 as the saturating agent. This detergent was much more efficient than other proteins in avoiding nonspecific adsorption of IgE to the nitrocellulose membrane. It was hypothesized that hydrophobic interaction between IgE and the blocking agent of the membrane was better eliminated with Tween 20 than with other hydrophobic proteins such as gelatin, milk proteins, and BSA. Hydrophobic interaction between IgE and its target was a phenomenon already observed in drug allergy by our group (35).

The 12-kDa IgE-reactive protein band, which corresponds to the major cod allergen Gad c 1 described in the literature (26), was the major band in Western blot (50% of total radioactivity bound in the crude extract, Figs. 3 and 5). The 30- and 67-kDa IgE-reactive protein bands also showed great activity. Hemmens et al. (32) showed by Western blot with three cod-allergic sera that the semipurified DS22 fraction, which contains Gad c 1 (25), contained six allergenic components. Bernhisel-Broadbent et al. (21) showed, with sera from salmon-allergic patients, that seven cod proteins were recognized by the IgE. The 63-kDa allergen was the only allergen found in cod-surimi (33) by our group. Finally, our study describes the presence of high-molecular-mass IgE-reactive protein bands in Western blot of cod extract, with respective M_r of 104 and 130 kDa. These bands may correspond to protein aggregates rather than to new allergens, as their relative distribution in Western blot is influenced by adding EDTA to the protein sample run in SDS–PAGE.

The pre-rigor mortis cod proteins were separated by DEAE chromatography (Fig. 1). Nine peaks with an allergenic activity detected by dot-blot in a pool of 12 cod-allergic sera were obtained. All the peaks were analyzed by Western blot using the same pool of sera (Fig. 3, Table 2). Eight additional IgE-reactive protein bands were found, compared to the crude extract, at 13, 23, 25, 41, 49, 55, and 80 kDa. In the eluted peaks, these proteins may be more concentrated than in the crude extract; this explains why they were detected only after DEAE-chromatography. Gad c 1 is found in all of the peaks. It is the major allergenic component in

peaks II–VIII (Fig. 3). In peaks IV and V, the 104- and 130-kDa IgE-reactive protein bands were detected: the high allergenic activity of peaks IV and V shown in the dot-blot experiment may be explained by the high concentration of these proteins. The 23- and 25-kDa IgE-reactive protein bands may have contributed to the high allergenic activity in peak III.

All the IgE-reactive protein bands in the crude extract were recognized by antiparvalbumins, which are directed against an epitope in the first calcium-binding site of the parvalbumin (39) (Fig. 4, Table 2). This was also the case with the 50- and 80-kDa IgE-reactive protein bands found in the DEAE chromatography. One hypothesis to explain this immunoreactivity is that certain IgE-reactive protein bands are polymers or aggregates of the 12-kDa IgE-reactive protein band. The relative distribution of IgE-reactive protein bands is influenced by adding EDTA to the protein sample run in SDS–PAGE. A second hypothesis is that Gad c 1 is adsorbed to other proteins (26). A third hypothesis is that there is a common antigenic site corresponding to the first calcium-binding site. This last hypothesis is reinforced for the 60-, 67-, 104-, and 130-kDa IgE-reactive protein bands, as their relative amount detected with ^{125}I-labeled anti-IgE was higher when the protein extract was prepared with 5 mM EDTA than when it was not incubated with EDTA. These differences were detected by Western blot using a pool of 12 cod-allergic sera (Figs. 3 and 5). It has already been shown that there is a 30% decrease of the radioactivity bound when Gad c 1 is preincubated with EDTA compared to Gad c 1 without preincubation (40).

This study also aimed to compare the IgE-reactive protein band distribution of pre-rigor mortis with post-rigor mortis cod by Western blot. A pool of 12 cod-allergic sera was used for this study. No differences in band distribution between pre-rigor mortis and post-rigor mortis cod were detected just after postmortem rigidity. Moreover, when the fish had been dead for several days, there were three additional IgE-reactive protein bands, compared to the crude pre-rigor mortis cod extract: bands of 18, 41, and 80 kDa (Fig. 3, Table 2). The 41- and 80-kDa IgE-reactive protein bands were also found in DEAE fractions of the pre-rigor mortis cod proteins (Fig. 3, Table 2). The 18-kDa IgE-reactive protein band was not detected elsewhere. In addition, 10 ng of commercial cod protein extract inhibited 50% of DW serum IgE-RIA. In comparison, 1 μg of pre-rigor mortis cod protein extract was needed to inhibit this IgE-RIA at the same level (Fig. 6). Hence, the commercial cod extract was more allergenic than the pre-rigor mortis cod extract.

In conclusion, the Western blots of the cod extracts performed in this study showed IgE-reactive protein bands over a wide molecular-weight range: in particular, the 104- and 130-kDa IgE-reactive protein bands were detected. The IgE-reactive protein bands detected in the crude pre-rigor mortis extract with a pool of 12 cod-allergic sera were detected by antiparvalbumins directed against a calcium-binding epitope. In addition, the relative amount of IgE-reactive protein bands varied when EDTA was added to the cod extract. Freshness played a part in IgE-reactive protein band distribution and in IgE binding, as the relative content in IgE-reactive protein bands was greater after storing the fish for several days.

Acknowledgments

Some experiments were performed in the INSERM U.211 research unit (Nantes, France). We thank Dr Bonneville for enabling us to work in his radioactivity laboratory. Dr Faivre placed the PhosphorImager 445 SI apparatus at our disposal. An institutional grant was obtained from the "Aliment demand" program of the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France).

References

1. Eigenmann PA, Sampson HA. An update of food hypersensitivity. Fundam Clin Immunol 1994;2:121-33.
2. James JM, Wesley Burks A. Food hypersensitivity in children. Curr Opin Pediatr 1994;6:661-7.
3. Niestjil Jansen JJ, Kardinaal AFM, Huijbers G, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BPM, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the Dutch population. J Allergy Clin Immunol 1994;93:446-56.
4. Moneret-Vautrin DA. Food antigens and additives. J Allergy Clin Immunol 1986;78:1039-46.
5. Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. Lancet 1994;343:1127-30.
6. Sampson HA. Food allergy. J Allergy Clin Immunol 1989;84:1062-5.
7. Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. Pediatrics 1987;79:683-8.
8. Steinman HA, Potter PC. The precipitation of symptoms by common foods in children with atopic dermatitis. Allergy Proc 1994;15:203-10.
9. Sampson HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. J Pediatr 1985;107:669-75.
10. Sampson HA, Albergo R. Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1984;74:26-33.
11. Kaeser P, Revelly KP, Frei PC. Prevalence of IgE antibodies specific for food allergens in patients with chronic urticaria of unexplained etiology. Allergy 1994;49:626-9.
12. Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. A clinical study. Int Arch Allergy 1966;29:346-63.
13. Bircher AJ, van Melle G, Haller E, Curty B, Frei C. IgE to

food allergens are highly prevalent in patients to pollens, with and without symptoms of food allergy. Clin Exp Allergy 1994;24:367-74.
14. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. N Engl J Med 1992;327:380-4.
15. Yunginger JW, Sweeney KG, Sturner WQ, et al. Fatal food-induced anaphylaxis. JAMA 1988;260:1450-2.
16. André F, André C, Colin L, Cacaraci F, Cavagna S. Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. Toxicology 1994;93:77-83.
17. Bock SA. The natural history of food sensitivity. J Allergy Clin Immunol 1982;69:173-7.
18. Minford AMB, Macdonald A, Littlewood JM. Food intolerance and food allergy: a review of 68 cases. Arch Dis Child 1982;57:742-7.
19. de Martino M, Peruzzi M, de Luca M, et al. Fish allergy in children. Ann Allergy 1993;71:159-65.
20. O'Neil C, Helbling AA, Lehrer SB. Allergic reactions to fish. Clin Rev Allergy 1993;11:183-200.
21. 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;89:730-7.
22. 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 1989;86:909-14.
23. Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Studies of different fractions of extracts from cod muscle tissue. Int Arch Allergy 1967;31:239-60.
24. Aas K, Jebsen JW. Studies of hypersensitivity to fish. Partial purification and crystallization of a major allergenic component from cod. Int Arch Allergy 1967;32:1-20.
25. Elsayed S, Aas K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. Int Arch Allergy 1971;40:428-38.
26. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. Scand J Immunol 1975;4:203-8.
27. Apold J, Elsayed S, Aukrust L, Bennich H. The allergenic structure of allergen M from cod. III. Studies on the antigenicity of long-sequence peptides. Int Arch Allergy Appl Immunol 1979;58:337-43.
28. Elsayed S, Ragnarsson U, Apold J, Florvaag E, Vik H. Allergenic synthetic peptide corresponding to the second calcium-binding loop of cod allergen M. Scand J Immunol 1981;14:207-11.
29. Elsayed S, Sørnes S, Apold J, Vik H, 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;16:77-82.
30. Apold J, Elsayed S. The immunochemical reactivity of regions encompassing tyr-30 and arg-75 of allergen M from cod. Mol Immunol 1980;17:291-6.
31. 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;38:449-59.
32. Hemmens VJ, Baldo BA, Underwood PA, Holen E, Elsayed S. Common antigenic and allergenic determinants on codfish proteins detected with mouse monoclonal IgG and human IgE antibodies. Mol Immunol 1989;26:477-84.
33. Mata E, Favier C, Moneret-Vautrin DA, Nicolas JP, Han Ching L, Guéant JL. Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63-kDa protein. Allergy 1994;49:442-7.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
35. Guéant JL, Mata E, Masson C, et al. Non-specific cross-reactivity of hydrophobic serum IgE to hydrophobic drugs. Mol Immunol 1995;32:259-66.
36. 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; 46:452-8.
37. Moutété HF, Olszewski A, Gastin I, Namour F, Moneret-Vautrin DA, Guéant JL. Purification of allergenic proteins from peanut for preparation of the reactive solid phase of a specific IgE radioimmunoassay. J Chromatogr B Biomed Appl 1995;664:211-17.
38. Vieths S, Jankiewicz A, Schöning B, Aulepp H. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. Allergy 1994;49:262-71.
39. Tinner R, Oertle M, Heizmann CW, Bosshard HR. Ca^{2+}-binding site of carp parvalbumin recognized by monoclonal antibody. Cell Calcium 1990;11:19-23.
40. Apold J, Elsayed S. The effect of amino acid modification and polymerization on the immunochemical reactivity of cod allergen M. Mol Immunol 1979;16:559-64.

ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 706 (1998) 63–71

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B

Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein

A.V. Galland[a,b], D. Dory[a,b], L. Pons[a], C. Chopin[b], H. Rabesona[c], J.L. Guéant[a], J. Fleurence[b,*]

[a]*Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EP CNRS 0616, Faculté de Médecine, BP 184-54505, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

[b]*IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu, BP 1105-44311, Nantes Cedex 03, France*

[c]*Laboratoire d'Etudes des Interactions des Molécules Alimentaires, Inra, BP 71627-44316, Nantes Cedex 03, France*

Abstract

Cod fish is one of the foods most frequently involved in allergy. Only the cod allergen Gad c I, a 12.3 kDa parvalbumin, has been purified and characterized. Recently, we have detected allergen bands which have not previously been described, in particular a 41 kDa protein, by Western-blot. In the present work, this protein has been purified from a crude cod extract by ammonium sulfate fractionation, hydroxyapatite chromatography and preparative electrophoresis; a single band with an M_r of 41×10^3 was found in silver-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acid composition and the isoelectric point of the protein were determined. The purified protein (p41) was shown to bind specifically to reaginic IgE from sera of cod-allergic individuals and to a monoclonal anti-parvalbumin which recognizes specifically the first calcium binding site of parvalbumins. p41 may therefore contain a calcium binding site corresponding to an IgE-epitope similar to that of Gad c I. © 1998 Elsevier Science B.V.

Keywords: IgE reactive protein bands; Cod allergy; Hydroxyapatite chromatography; Proteins

1. Introduction

Fish is one of the most common food allergens of the pediatric population [1–10]. A broad panel of symptoms are reported such as urticaria, asthma or vomiting [1,4,6,8–11]. Fish ingestion may also cause fatal anaphylactic reactions [12,13]. Cod is often responsible for fish allergy [1,2,7,11].

The major cod allergen Gad c I has been extensively studied. This allergen has been purified by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose [14], gel permeation on Sephadex G-75 [15] and isoelectrofocusing [16]. Gad c I is a 12.3 kDa parvalbumin [17] with an isoelectric point of 4.75 [16]. Five allergenic sequences were obtained, in particular two located on the calcium binding sites of Gad c I [18–22].

Cod fish also contains other intermediate or minor allergens of total or semi-purified cod proteins as demonstrated by Western-blot with salmon or cod allergic sera [2,23]. Our group has shown that cod-surimi contains a single 63 kDa allergenic protein [24]. In a previous study, we have adapted a Western-blot procedure in order to improve the immunodetection of allergens from cod extracts. Allergen bands which had not previously been described were detected, in particular one band at 41

*Corresponding author.

0378-4347/98/$19.00 © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII S0378-4347(97)00457-X

kDa. So far, none of these allergens has been purified [25].

In this paper, we report the purification and characterization of the 41 kDa allergen from a crude cod extract. The protein was purified by ammonium sulfate fractionation, hydroxyapatite chromatography and preparative electrophoresis. Allergenicity and calcium-binding sites were tested by immunodetection with cod allergic sera and with an anti-parvalbumin monoclonal antibody, respectively. The isoelectric point and amino acid composition of the protein were determined.

2. Experimental

2.1. Materials

2.1.1. Cod fillets

Cod was sampled by IFREMER at the time of an oceanographic drive off Britain. The *pre rigor mortis* cod corresponded to cod fillets which were cut and placed immediately into liquid nitrogen before being stored at −80°C.

2.1.2. Cod allergic sera

Patients involved in this study had undergone an adverse reaction against cod. Blood samples were collected in dry tubes and centrifuged at 1000 *g* for 5 min. Sera were aliquoted and stored at −80°C. Patients had a positive IgE-RIA to cod with our crude cod protein extract [25].

2.2. Purification

All procedures were carried out at 4°C or below.

2.2.1. Preparation of crude cod extract [25]

Cod muscles (100 g fresh weight) were ground in a blender and homogenized with an UltraTurax in 200 ml of 0.07 *M* phosphate buffer (pH 7.0) for 3×20 s. The homogenate was clarified by centrifugation at 20 000 *g* for 20 min. The resulting supernatant was filtered through a 0.45-μm membrane filter (Sartorius, Göttingen, Germany) and subjected to ammonium sulfate fractionation.

2.2.2. Ammonium sulfate fractionation

The crude cod extract was brought to 80% $(NH_4)_2SO_4$ saturation and left under agitation for 30 min. The mixture was centrifuged at 20 000 *g* for 20 min. The supernatant was carefully removed and dialyzed overnight against a 375-fold volume of 0.01 *M* phosphate buffer (pH 7.0). The dialysate was concentrated in an Amicon ultrafiltration apparatus using a 10 kDa cut-off filter (Amicon, Beverly, MA, USA) and filtered.

2.2.3. Hydroxyapatite chromatography [26]

The proteins of the dialysate were separated by hydroxyapatite chromatography (Ultragel HA, Sepracor, Marlborough, MA, USA) using a two-pump gradient system (Gilson, Middleton, WI, USA). The column (20×1.6 cm I.D.) was eluted with a linear gradient (0.01 *M*–0.5 *M*; 200 ml total phosphate buffer, pH 7.0) at a constant flow-rate of 1.0 ml/min. The amount of loaded proteins was 5 mg per run. Fractions were collected in 5-ml aliquots. Protein elution was detected by measuring the absorbance at 280 nm. Fractions corresponding to the first peak were pooled, dialyzed as described above and lyophilized.

2.2.4. Preparative electrophoresis

The first peak obtained after hydroxyapatite chromatography was subjected to preparative electrophoresis. Preparative electrophoresis was performed using a Prep Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with a stacking gel of 4% and a separating gel of 12% acrylamide. The sample (1.5 mg, 500 μl) contained 10 m*M* Tris–HCl (pH 8.0), 1 m*M* EDTA, 1% SDS, 40 m*M* DTT, 10% glycerol, 0.015% bromophenol blue and was heated at 100°C for 3 min before loading. The column (7×2.8 cm I.D) was eluted with 25 m*M* Tris–HCl buffer (pH 8.3), 0.18 *M* glycine, 0.1% SDS at a constant flow-rate of 0.4 ml/min. The separation was done under 30 mA for 20 h. Fractions were collected in 2-ml aliquots. Protein elution was detected by measuring the absorbance at 280 nm. Fractions corresponding to the first peak (retention time of 560–620 min) were pooled and dialyzed as described above.

2.3. Protein determination

Protein concentrations were determined with the bicinchoninic acid (BCA) protein reagent assay (Pierce, Rockford, Il, USA) according to the manufacturer's instructions [27]. Bovine serum albumin (BSA) was used as protein standard.

2.4. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using a Mini-protean II electrophoresis unit (Bio-Rad) with stacking gel of 4% and separating gel of 12% acrylamide in 25 m*M* Tris–HCl (pH 8.3), 0.18 *M* glycine, 0.1% SDS. Each sample contained 10 m*M* Tris–HCl (pH 8.0), 1 m*M* EDTA, 1% SDS, 40 m*M* DTT, 10% glycerol, 0.015% bromophenol blue and was heated at 100°C for 3 min before loading. The separation was carried out under 30 mA for 1 h. The following polypeptides were used as molecular mass markers: 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) (LMW Calibration Kit Proteins, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Protein bands were detected by silver staining.

2.4.1. Silver staining

Proteins were fixed with 40% methanol, 10% acetic acid for 1 h. The gel was then washed with 50% ethanol for 3×20 min. Proteins were reduced with 0.02% sodium thiosulfate for 1 min, washed with ultrapure water for 3×20 s, stained with 0.2% silver nitrate, 0.02% formaldehyde for 20 min. The gel was washed and developed with 3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde, 0.0005% sodium thiosulfate for 3–5 min. Coloration was stopped with 5% glycine for 5 min and the gel was washed with ultrapure water for 2×30 min.

2.5. Western-blot [25]

Samples were run on 12% SDS-PAGE as described above, except that the following polypeptides were used as molecular mass markers: myosin (208 kDa), β-galactosidase (144 kDa), albumin (87 kDa), carbonic anhydrase (44.1), soybean trypsin inhibitor (32.7 kDa), lysozyme (17.7 kDa), aprotinin (7.1 kDa) (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad). The proteins were transferred onto nitrocellulose (0.2-μm Trans-blot transfer medium, Bio-Rad) by blotting using a Trans-blot cell (Bio-Rad). The transfer was done for 15 h with 20 V in 25 m*M* Tris HCl (pH 8.3), 192 m*M* glycine, 20% methanol. Unoccupied protein-binding sites of the nitrocellulose sheet were blocked by incubating it for 1 h with 0.3% Tween 20 in 20 m*M* Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.15 *M* NaCl (TBS). The nitrocellulose was washed three times with 0.05% Tween 20 in TBS and incubating with sera from cod-allergic patients (diluted 1:10 with 0.1% Tween 20 in TBS) for 3 h, washed and incubated for an additional 3 h with ^{125}I-anti-IgE (Immunotech, Marseille, France) (diluted 1:10 with 0.3% Tween 20 in TBS). Incubations were performed under gentle rocking. IgE binding was detected by exposure for 72 h on a phosphor screen (Phosphor Imager, Molecular dynamics). The screen was scanned with the PhosphorImager 445 SI apparatus. The nitrocellulose was also incubated with a monoclonal anti-parvalbumin (clone PA-235; Sigma, St. Louis, MO, USA) (diluted 1:1000 with 0.1% Tween 20 in TBS) for 3 h, washed, incubated for an additional 3 h with anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) (diluted 1:10 000 with 0.3% Tween 20), washed and revealed for 5 min with the alkaline phosphatase substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate–nitro blue tetrazolium (BCIP–NBT buffered substrate tablet; Sigma).

2.6. Slot-blot

Proteins (0, 1, 2 and 5 μg) were applied onto nitrocellulose (0.2-μm Trans-blot transfer medium, Bio-Rad) using the Bio-Slot microfiltration apparatus (Bio-Rad). The nitrocellulose was blocked and incubated as described in the Western-blot protocol, except that for incubation with a cod allergic serum (dilution 1:10, 1:5 and 1:2) IgE binding was detected by autoradiography on Kodak X-Omat film (Sigma) (exposure at −80°C for 5 days).

2.7. Isoelectrofocusing

Isoelectrofocusing was performed using the automated Phast-System (Pharmacia) with a PhastGel Dry IEF pH 3–10 according to the manufacturer's instructions (Pharmacia). The following polypeptides were used as isoelectric point markers: amyloglucosidase 3.5, methyl red 3.75, trypsin inhibitor 4.55, β-lactoglobulin A 5.20, carbonic anhydrase B 5.85 and 6.55, myoglobin 6.85 and 7.35, lentil lectin 8.15, 8.45 and 8.65, trypsinogen 9.30 (isoelectric focusing calibration kit, Pharmacia). Protein bands were detected by silver staining.

2.8. Amino acid analysis

Samples containing approx. 20 μg of purified cod protein were hydrolyzed in gas phase under 1% phenol–6 *M* HCl as 150°C vapors for 1 h. Amino acid analysis was performed in an Applied Biosystem analyzer (Foster City, CA, USA) equipped with a C_{18} reversed-phase column (220 mm×2.1 mm I.D.; Brownlee PTC type).

3. Results

3.1. Purification

The protein content of the cod muscle was estimated at 19 mg/g. Eighty percent ammonium sulfate saturation was needed to obtain a fractionation of the crude cod extract proteins (Fig. 2). SDS-PAGE analysis showed eighteen proteins in the crude cod extract with M_r values ranging from 13×10^3 to 130×10^3. Only the protein with M_r 41×10^3 and four minor bands with M_r 13, 28, 39 and 49×10^3 were found in the ammonium sulfate fractionation supernatant. The supernatant aliquots gave three peaks in hydroxyapatite chromatography (Fig. 1). The protein with M_r 41×10^3 was identified mainly in the first peak, with a contaminant protein with M_r 66×10^3, but it was also present in the second peak and slightly detectable in the third one (Fig. 2). A protein with M_r 13×10^3 and three proteins with M_r 28×10^3, 45×10^3 and 49×10^3 were also detected in the second and third peak, respectively. Purification of

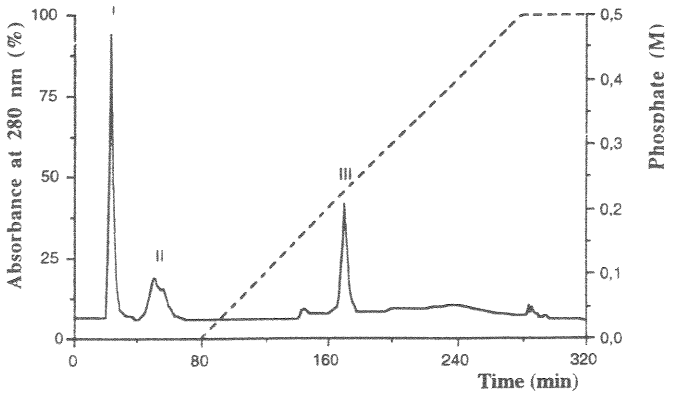


Fig. 1. Elution profile of cod proteins of the ammonium sulfate fractionation supernatant on hydroxyapatite chromatography (Ultragel HA). The column (20×1.6 cm I.D.) was eluted with a linear gradient (0.01–0.5 *M*; 200 ml total phosphate buffer, pH 7.0) at a flow-rate of 1 ml/min. The amount of proteins was 5 mg. Fractions were collected in 5-ml aliquots. Protein elution was detected by measuring the absorbance at 280 nm. Three peaks were observed; the 41 kDa protein was found in peak I (see Fig. 2).

the protein with M_r 41×10^3 was completed by preparative electrophoresis. The purified 41 kDa protein (p41) was eluted at a retention time of 560–620 min. A single protein with a M_r of 41×10^3 was found in silver stained SDS-PAGE (Fig. 2). This purification procedure yielded a total of 200 μg of pure p41 from 1100 μg of crude cod extract proteins.

3.2. Biochemical characterization

The protein fractions of the different purification steps were analyzed by Western-blot (Fig. 3). Western-blot was performed with a pool of sera from cod-allergic patients (Fig. 3a). It showed six allergenic bands in the crude cod extract, with M_r values of 13×10^3, 22×10^3, 28×10^3, 41×10^3, 49×10^3 and 60×10^3, respectively. Western-blot was also performed with a monoclonal anti-parvalbumin (Fig. 3b). Four proteins were detected in the supernatant with M_r values of 13×10^3, 28×10^3, 41×10^3 and 49×10^3, respectively. In immuno-blot, the purified p41 protein was shown to bind specifically to reaginic IgE from sera of cod allergic individuals (Fig. 3a and Fig. 4) and to a monoclonal anti-parvalbumin (Fig. 3b and Fig. 5). Isoelectric point (p*I*) of the purified allergen p41 was estimated to pH 5.8. The amino acid composition of the purified p41 is listed in Table 1. It was characterized by a high

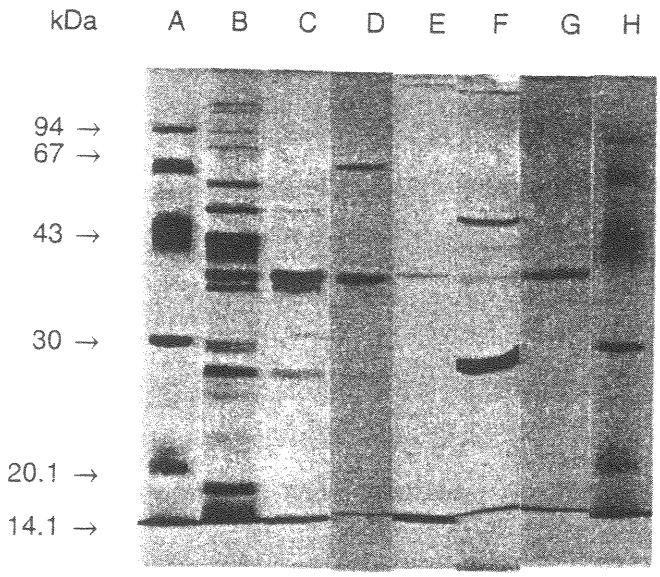


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of samples from the different purification steps. Electrophoresis was run in a 12% acrylamide gel (30 mA per gel) and protein bands were detected by silver staining. Lane A: standard proteins (phosphorylase b 94; albumin 67; ovalbumin 43; carbonic anhydrase 30, soybean trypsin inhibitor 20.1, lactalbumin 14.4), lane B: crude cod extract (2.5 μg), lane C: supernatant from 80% ammonium sulfate fractionation (2 μg), lane D: peak I of hydroxyapatite chromatography (see Fig. 1) (0.5 μg). Two protein bands were observed, with respective M_r at 41 and 66 kDa, lane E: peak II of hydroxyapatite chromatography (0.5 μg). A main protein band was obtained, with M_r estimated at 13 kDa, lane F: peak III of hydroxyapatite chromatography (0.5 μg). A main protein band was observed, with M_r estimated at 28 kDa, lane G: purified p41 obtained after preparative electrophoresis (0.3 μg), lane H: standard proteins.

relative content of valine and alanine, and was also rich in isoleucine, leucine, glutamate and glutamine and poor in tyrosine and lysine. The N-terminal amino acid of the p41 protein, determined by Edman degradation, was aspartate.

4. Discussion

We report here the method used to purify the 41 kDa allergen from a crude cod extract. The ammonium sulfate fractionation was found to be an efficient step for increasing the relative content of p41 in the extract. The supernatant of the 80% ammonium sulfate fractionation contained only five proteins, including the 41 kDa allergen, compared to the eighteen proteins detected in the crude extract (Fig. 2). The mixture of partially purified proteins was used for the hydroxyapatite chromatography. Hydroxyapatite is a weak ion-exchanger recommended for difficult separation [28]. This technique was chosen as the protocol was rapid and required a single chromatographic step. In addition, hydroxyapatite gels can be used in batch which could be interesting for the purification of our protein on a large scale [29]. As hydroxyapatite chromatography is based on several interaction mechanisms, the 41 kDa protein may be recovered in different peaks. The number of contaminant proteins was efficiently reduced to only one 66 kDa protein in peak I (Fig. 2). This 66 kDa contaminating band was not identified in the starting material. This protein may be more concentrated in the eluted peak I than in the crude extract, explaining why it was only detected after hydroxyapatite chromatography. Preparative electrophoresis with separating gel of 12% acrylamide was chosen to remove the 66 kDa contaminating protein as the 41 kDa and 66 kDa proteins were well separated on 12% acrylamide mini-gel. Preparative electrophoresis gave a good resolution for the 41 kDa protein purification. The homogeneity of the purified product was first assessed by the presence of a single band in silver-stained SDS-PAGE and a single isoprotein in IEF (Fig. 2). The homogeneity of the purified protein was verified by the determination of a single N-terminal amino acid. As the 41 kDa protein has been purified and characterized under reducing conditions and in presence of SDS, we cannot exclude the possibility that it corresponded to a subunit of a higher M_r protein complex.

A 13 kDa protein was the major cod allergen (crude cod extract and supernatant) in Western-blot with cod-allergic sera (Fig. 3a) and may correspond to the major cod allergen Gad c I described in the literature [16]. This allergen was separated from the 41 kDa allergen by hydroxyapatite chromatography and it was eluted in the second peak. The effect of denaturating agents (reduction and alkylation) on Gad c I showed that allergenic activity was shared by a sequential rather than by a conformational epitope [30]. The 41 kDa protein obtained through purification was still allergenic as shown by Western-blot with cod-allergic sera (Fig. 3a, Fig. 4).

Following Western-blot analysis Gad c I, the 41 kDa allergen and two proteins of M_r 28 000 and 49 000 were detected with a pool of sera from cod

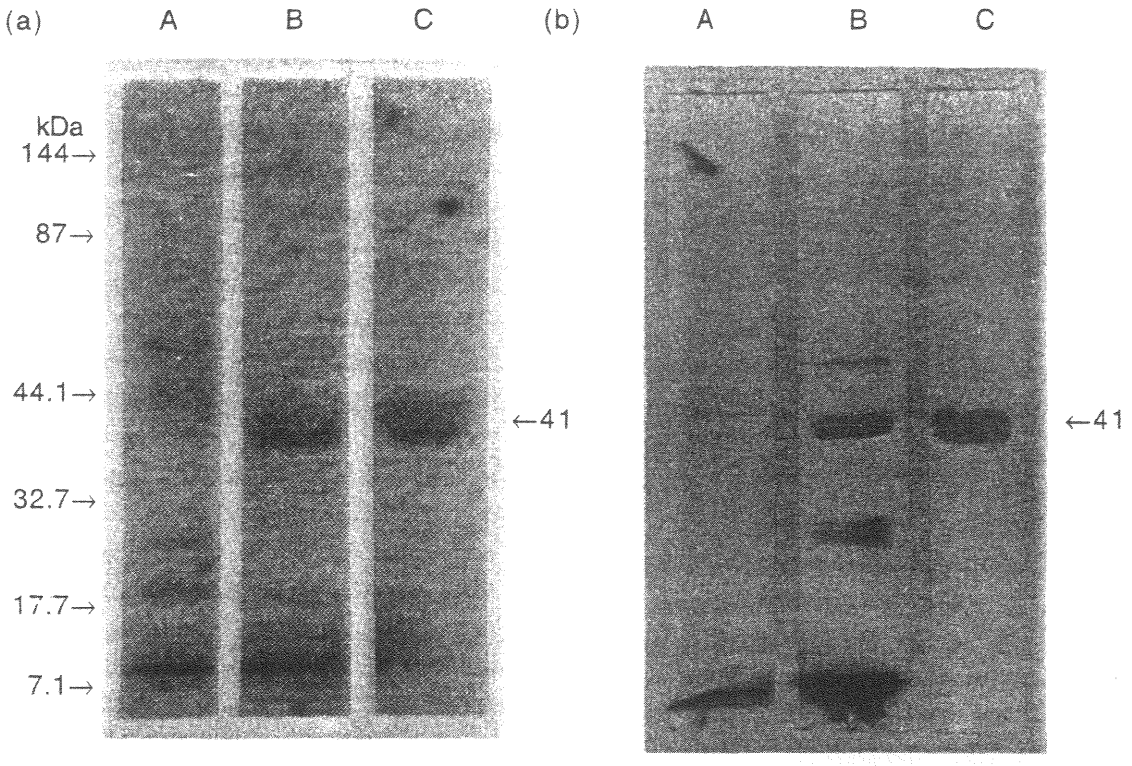


Fig. 3. Western-blot analysis of samples from different purification steps. Samples were run on 12% SDS-PAGE as described above. Proteins were transferred onto nitrocellulose. The membrane was blocked with 0.3% Tween 20 in 20 m*M* Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.15 *M* NaCl (TBS). (a) Incubation with cod allergic-sera. The membrane was incubated successively with sera from cod-allergenic individuals (diluted 1:10 with 0.1% Tween 20 in TBS) and with ^{125}I anti-IgE (diluted 1:10 with 0.3% Tween 20 in TBS). IgE binding was detected by exposure for 72 h on a phosphor screen. Lane A: crude cod extract (10 μg), lane B: supernatant (10 μg), lane C: p41 (10 μg). (b) Incubation with a monoclonal anti-parvalbumin. The membrane was incubated successively with a monoclonal anti-parvalbumin (diluted 1:1000 with 0.1% Tween 20 in TBS) and with anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (diluted 1:10 000 with 0.3% Tween 20 in TBS) and revealed for 5 min with the alkaline phosphatase substrate (BCIP/NBT). p41 was detected by both cod allergic-sera and monoclonal anti-parvalbumin.

allergic patients and with an anti-parvalbumin monoclonal antibody (Fig. 3b, Fig. 5). The monoclonal antibody stained specifically the calcium bound form of parvalbumin and was directed against an epitope located in the first calcium binding site [31,32]. This epitope corresponded to the same region that an IgE-epitope of Gad c I located in the first calcium binding loop (sequence 49–64) [33,21,22]. We previously showed that most of the IgE-reactive cod protein bands were recognized by anti-parvalbumins [25]. Three hypothesis could explain this immunoreactivity. First, some IgE-reactive protein bands may correspond to polymers or aggregates of the 12 kDa IgE-reactive band (Gad c I). Second, Gad c I is

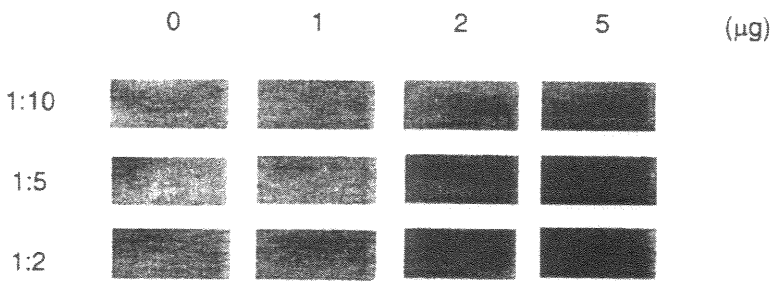


Fig. 4. Slot-blot analysis of the purified p41 protein with a cod allergic serum. p41 (0, 1, 2 and 5 μg) was applied to nitrocellulose. Incubation with serum of a patient allergic to cod fish (diluted 1:10, 1:5 and 1:2) was done as described above. IgE binding was detected by autoradiography on Kodak X-Omat film (exposure at −80°C for 5 days). A dose dependent binding of reaginic IgE to p41 was observed.

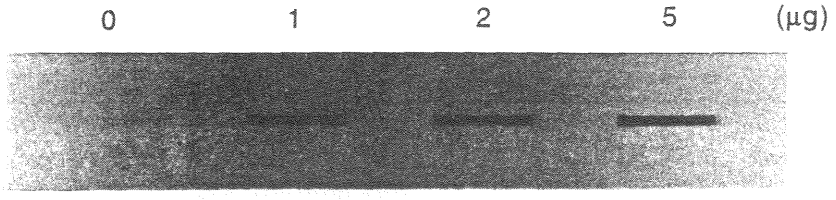


Fig. 5. Slot-blot analysis of the purified p41 allergen with a monoclonal anti-parvalbumin 0, 1, 2 and 5 μg of p41 were applied to nitrocellulose. Incubation with the monoclonal anti-parvalbumin was done as described above. p41 recognized specifically an anti-parvalbumin monoclonal antibody.

adsorbed to other proteins. Third, there is a common antigenic site corresponding to the first calcium binding site. The 41 kDa allergen may therefore contain a similar IgE epitope which corresponds to a calcium binding site homologous to that of Gad c I.

Correlation between the amino acid composition of the 41 kDa allergen and that of different cod proteins is reported in Table 2. No correlation was found between the 41 kDa allergen and the cod proteins already described in the literature. The amino acid composition of the 41 kDa allergen (Table 1) differed from that of Gad c I [34,35,17], principally by a higher percentages of the sulfur-containing amino acids, threonine and valine, and a lower percentage of lysine. The high relative content of dicarboxylic amino acids may explain the acidic nature of the 41 kDa allergen (p*I* 5.8). However, these amino acids were in a lower proportion than those observed in Gad c I. Gad c I has also a lower p*I* (p*I* 4.75) than p41. The hydrophobic amino acids were in a higher proportion in the 41 kDa protein (59%) than in Gad c I (45%). Hydrophobic domains may be present on the 41 kDa allergen and interact with reaginic IgE of cod allergic sera.

Table 1
Amino acid composition of the purified p41 allergen

Amino acid	Composition (%)
Asx	6.2
Glx	8.4
Ser	4.2
Gly	ND
His	4.3
Arg	3.9
Thr	6.2
Ala	10.6
Pro	6.6
Tyr	1.4
Val	11.4
Lys	4.8
Ile	8.8
Leu	8.1
Phe	6.0
Cys	2.9
Met[b]	6.2
Trp	ND
Total	100

[a] Measured as cysteic acid.
[b] Measured as methionic sulfone.
ND=Not determined.

Considering the biochemical characteristics of the p41 and Gad c I allergens one may wonder about the elution behavior of these proteins on hydroxyapatite. p41 and Gad c I were eluted in the first and second peaks, respectively. Three hypotheses may explain this elution order:

(a) Calcium binding protein affinity for calcium ions of the solid-phase [39]. Potential interactions may occur between Ca^{2+} ions on hydroxyapatite ($(Ca_3(PO_4)_2)_3Ca(OH)_2$) and calcium binding sites of Gad c I and p41. Gad c I may have a higher affinity Ca^{2+} binding than p41, due to particular configurational requirement of binding groups.

(b) Ionic interactions [26,40]: both Gad c I (p*I* 4.75) and p41 (p*I* 5.8) were anionic at the elution pH of 7.0. Ion-exchange interactions may occur between negative groups of the proteins and Ca^{2+} ions of the solid-phase. Gad c I, which has a lower p*I*, may therefore be bound more strongly to the solid phase.

(c) Protein hydrophobicity: p41 is potentially more hydrophobic than Gad c I and has potentially a lower adsorption capacity to hydrated hydroxyapatite.

In conclusion, the purification of a 41 kDa protein from cod fish has been achieved after hydroxyapatite chromatography, with an additional step of preparative electrophoresis. This purified protein is an allergen as it was detected in Western-blot using a pool of sera from patients allergic to cod fish. It

Table 2
Correlation between amino acid composition of the 41 kDa allergen and that of different cod proteins

		a	b	c	d	e	f	g	h
p41	a	1	0.34	0.67	0.55	0.44	0.65	0.65	0.61
Allergen Gad c I	b	0.34	1	0.60	0.40	0.35	0.38	0.41	0.38
Alcohol dehydrogenase	c	0.67	0.60	1	0.44	0.25	0.34	0.78	0.75
Cytochrome *b*	d	0.55	0.40	0.44	1	0.78	0.92	0.52	0.38
NADH ubiquinone Oxidoreductase chain 2	e	0.44	0.35	0.25	0.78	1	0.84	0.43	0.33
Cytochrome *c* oxidase polypeptide I	f	0.65	0.38	0.34	0.92	0.84	1	0.44	0.33
Chymotrypsin A precursor	g	0.65	0.41	0.78	0.52	0.43	0.44	1	0.94
Chymotrypsin B	h	0.61	0.38	0.75	0.38	0.33	0.33	0.94	1

[a] This study.
[b] Elsayed et al. [17,34,35].
[c] Danielsson et al. [36].
[d–f] Johansen et al. [37].
[g,h] Leth-Larsen et al. [38].

remains to determine the frequency of anti-p41 IgE in allergic patients.

Acknowledgements

We are grateful to the Fondation Dufrenoy, the Académie d'Agriculture de France, the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and to the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (programme Aliment Demain) for financial support. The authors would like to thank Dr. Bonneville and Dr. Faivre (INSERM U. 211, Nantes, France) for the use of the PhosphorImager Apparatus.

References

[1] K. Aas, Int. Arch. Allergy 29 (1966) 346.
[2] J. Bernhisel-Broadbent, S.M. Scanlon, H.A. Sampson, J. Allergy Clin. Immunol. 89 (1992) 730.
[3] S.A. Bock, J. Allergy Clin. Immunol. 69 (1982) 173.
[4] P.A. Eigenmann, H.A. Sampson, FCI Fundam. Clin. Immunol. 2 (1994) 121.
[5] S.S. Gazzaz, B.A. Rasco, Rev. Fish. Sci. 1 (1993) 1.
[6] A. Helbling, M.L. Mc Cants, J.J. Musmand, H.J. Schwartz, S.B. Lehrer, Ann. Allergy Asthma Immunol. 77 (1996) 48.
[7] M. de Martino, M. Peruzzi, M. de Luca, A.G. Amato, L. Galli, L. Lega, C. Azzari, A. Vierucci, Ann. Allergy 71 (1993) 159.
[8] D.A. Moneret-Vautrin, J. Allergy Clin. Immunol. 78 (1986) 1039.
[9] C. O'Neil, A.A. Helbling, S. Lehrer, Clin. Rev. Allergy 11 (1993) 183.
[10] C.E. O'Neil, S.B. Lehrer, Food Technol. 49 (1995) 103.
[11] M. de Martino, E. Novembre, L. Galli, A. de Marco, P. Botarelli, E. Marano, A. Vierucci, J. Allergy Clin. Immunol. 86 (1990) 909.
[12] H.A. Sampson, L. Mendelson, J.P. Rosen, New Engl. J. Med. 327 (1992) 380.
[13] J.W. Yunginger, K.G. Sweeney, W.Q. Sturner, L.A. Giannandrea, J.D. Teigland, M. Bray, P.A. Benson, J.A. York, L. Biedrzycki, D.L. Squillace, R.M. Helm, J. Am. Med. Assoc. 260 (1988) 1450.
[14] K. Aas, Int. Arch. Allergy 31 (1967) 239.
[15] K. Aas, J.W. Jebsen, Int. Arch. Allergy 32 (1967) 1.
[16] S. Elsayed, K. Aas, Int. Arch. Allergy 40 (1971) 428.
[17] S. Elsayed, H. Bennich, Scand. J. Immunol. 4 (1975) 203.
[18] J. Apold, S. Elsayed, L. Aukrust, H. Bennich, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 58 (1979) 337.
[19] J. Apold, S. Elsayed, Mol. Immunol. 17 (1980) 291.
[20] S. Elsayed, U. Ragnarsson, J. Apold, E. Florvaag, H. Vik, Scand. J. Immunol. 14 (1981) 207.
[21] S. Elsayed, S. Sornes, J. Apold, H. Vik, E. Florvaag, Scand. J. Immunol. 16 (1982) 77.
[22] S. Elsayed, J. Apold, Allergy 38 (1983) 449.
[23] V.J. Hemmens, B.A. Baldo, P.A. Underwood, E. Holen, S. Elsayed, Mol. Immunol. 26 (1989) 477.
[24] E. Mata, C. Favier, D.A. Moneret-Vautrin, J.P. Nicolas, L. Han Ching, J.L. Guéant, Allergy 49 (1994) 442.
[25] D. Dory, C. Chopin, I. Aimone-Gastin, J.L. Guéant, L. Guérin, J. Sainte-Laudy, D.A. Moneret-Vautrin, J. Fleurence, Allergy, 1997, in press.
[26] G. Bernardi, Methods Enzymol. 22 (1971) 325.

[27] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, D.C. Klenk, Anal. Biochem. 150 (1985) 76.
[28] G. Bernardi, M.G. Giro, C. Gaillard, Biochim. Biophys. Acta 278 (1972) 409.
[29] K.R. Scopes, in: C.R. Cantor (Editor), Protein purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1994, Ch. 6.3, p. 172.
[30] S. Elsayed, K. Aas, J. Allergy 47 (1971) 283.
[31] M.R. Celio, W. Baier, L. Schärer, P.A. de Viragh, C. Gerday, Cell Calcium 9 (1988) 81.
[32] R. Tinner, M. Oertle, C.W. Heizmann, H.R. Bosshard, Cell Calcium 11 (1990) 19.
[33] S. Elsayed, K. Titlestad, J. Apold, K. Aas, Scand. J. Immunol. 12 (1980) 171.
[34] S. Elsayed, K. Aas, Int. Arch. Allergy 38 (1970) 536.
[35] S. Elsayed, K. Aas, T. Christensen, Int. Arch. Allergy 40 (1971) 439.
[36] O. Danielsson, H. Eklund, H. Jornvall, Biochemistry 31 (1992) 3751.
[37] S. Johansen, T. Johansen, Biochem. Biophys. Acta 1218 (1994) 213.
[38] R. Leth-Larsen, B. Asgeirsson, M. Thorolfsson, M. Norregaard-Madsen, P. Hojrup, Biochem. Biophys. Acta 1297 (1996) 49.
[39] M.J. Gorbunoff, Anal. Biochem. 136 (1984) 425.
[40] M.J. Gorbunoff, S.N. Timasheff, Anal. Biochem. 136 (1984) 433.

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

Université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

Nom : **DORY**
Prénom : **Daniel**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE ET SANTÉ**

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE, MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 22 MAI 1998 n° 27.

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 ★ LE PRÉSIDENT

J.P. FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex · Tél. 03 83 85 48 00 · Fax 03 83 85 48 48

Cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud. Etude de la présence d'un épitope de l'allergène Gad c I et étude préliminaire de l'influence de l'état de fraîcheur sur l'allergénicité

Résumé

Le poisson est l'un des aliments les plus fréquemment incriminés dans les allergies alimentaires. Hormis Gad c I, l'allergène majeur du cabillaud, peu d'informations étaient connues concernant les protéines de poisson responsables d'allergie. L'objectif de ce présent travail était de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les allergènes protéiques du cabillaud, et d'évaluer l'influence de l'état de fraîcheur du poisson sur le développement du risque allergique. Une cartographie des bandes IgE-réactives du cabillaud *pre rigor mortis* a été réalisée après avoir séparé ses protéines par chromatographie DEAE. Au total quinze bandes IgE-réactives ont été détectées. Les tailles variaient entre 12 et 130 kDa. Douze bandes de mêmes masses moléculaires apparentes que des bandes IgE-réactives ont été reconnues par un anticorps dirigé contre les parvalbumines. Une hypothèse a été émise suite à ces résultats : le site reconnu par l'anticorps dirigé contre les parvalbumines, qui est un site de fixation du calcium du type main EF, pourrait être présent sur d'autres bandes IgE-réactives du cabillaud. Des données de la littérature ont appuyé cette hypothèse. De plus un ADN complémentaire de cabillaud, ne correspondant pas à Gad c I, a été synthétisé en se basant uniquement sur ce site de fixation du calcium. L'EDTA a modifié l'intensité relative de certaines bandes IgE-réactives. Tous ces résultats sont des arguments en faveur de cette hypothèse.

Deux voies de purification de la bande de 104 kDa ont été étudiées, dont l'une qui faisait appel à l'électrophorèse à élution continue, a donné des résultats satisfaisant.

Enfin il a été montré que la dégradation *post mortem* du cabillaud entraînait une augmentation de l'allergénicité, due à la formation de bandes IgE-réactives.

Mots clés : bandes IgE-réactives, cabillaud, parvalbumine, site de fixation du calcium de type main EF

Daniel DORY
Laboratoire de pathologie cellulaire et moléculaire en nutrition, EP CNRS 616
Faculté de médecine de Nancy
Avenue de la forêt de Haye
BP 84
54505 VANDOEUVRE CEDEX
France
Tel. 03 83 59 27 39
Fax. 03 83 59 27 98