

Abréviations

Abréviations

Alum	Sel d'Aluminium
AMC	7-amino-4-méthyl coumarine
APMSF	4-Amidinophenylmethanesulfonyl fluoride Hydrochloride
<i>B. tropicalis</i> (Blo t)	<i>Blomia tropicalis</i>
BCR	Récepteur des lymphocytes B « B Cell Receptor »
Boc	tert-butoxy-carbonylamide
BSA	Albumine de sérum bovin
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
<i>D. farinae</i>	<i>Dermatophagoides farinae</i>
<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DC	Cellule dendritique « Dendritic cell »
DC-SIGN	«Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing non-Integrin»
<i>E. maynei</i> (Eur m)	<i>Euroglyphus maynei</i>
ELISA	« Enzyme-linked immunosorbent assay »
FcεRI	Récepteur de haute affinité pour les IgE
FcεRII	Récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23)
GM-CSF	« Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor »
IgE	Immunoglobuline de type E
IL	Interleukine
INFγ	Interféron γ
IUIS	« International Union of Immunological Societies »
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
LTC	Leucotriène
PAR-2	Protease Activated Receptor-2
PGD	Prostaglandine
pNA	p-nitroanilide
RAST	« Radio Allergo-Sorbent Test »
RBL	« Rat Basophil Leukemia »
RPMI	« Roswell Park Memorial Institute Medium »

Abréviations

SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis »
SEPPA	« Spatial Epitope Prediction of Protein Antigens »
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	Tris Buffer Salt
TCR	Récepteur des lymphocytes T « T Cell Receptor »
T_H1	Lymphocytes T Helper de type 1
T_H2	Lymphocytes T Helper de type 2
TMB	Tétraméthylbenzidine
WAO	« World Allergy Organization »
OMS	Organisation mondiale de la santé
WHO	« World Health Organization »

Introduction

I. L'allergie

I.1. Définition

Le terme « allergie » a été proposé par le pédiatre Von Pirquet en 1906 à partir du grec allos (autre) et ergon (réaction) c'est-à-dire étymologiquement « autre façon de répondre ». C'est une pathologie ancienne décrite depuis l'antiquité mais les premières découvertes scientifiques sur l'allergie ne sont apparues qu'au 19^{ème} siècle avec l'augmentation de sa prévalence.

L'allergie se définit cliniquement comme une maladie consécutive à l'exposition à un allergène auquel l'organisme est particulièrement sensible et qui provoque une réaction immunologique particulière avec synthèse d'anticorps, en particulier, les immunoglobulines de type E (IgE). Les réponses immunitaires allergiques sont appelées réactions d'hypersensibilité de type 1 ou réactions immédiates médiées par les IgE (Coombs and Gell, 1975).

I.2. Prévalence

Les maladies allergiques occupent une place centrale au sein des pathologies chroniques. Depuis plus de 20 ans, la fréquence des maladies allergiques n'a cessé d'augmenter. Cette pathologie est actuellement classée par l'OMS au quatrième rang des affections chroniques mondiales après le cancer, les pathologies cardiovasculaires et le SIDA. Des données récentes de l'organisation mondiale de l'allergie (WAO) montrent que cette maladie touche environ 30 à 40 % de la population mondiale. En effet, environ 400 millions de personnes souffrent de la rhinite allergique (Pawankar *et al*, 2012). Afin de mettre en évidence son épidémiologie (distribution, étiologie et prévention possible), une étude nommée ISAAC « International Study of Asthma and Allergies in Childhood » a été réalisée sur 721 601 enfants (6-7ans) et adolescents (13-14 ans) provenant de 56 pays. Cette étude démontre que la prévalence de l'allergie est particulièrement élevée dans les pays industrialisés. Une autre étude menée sur plus d'un million d'enfants d'âges divers montre que la prévalence varie considérablement d'un pays à un autre. En effet, la prévalence des maladies allergiques tend à être significativement plus élevée dans les pays riches, mais sa gravité tend à être plus importante dans les pays pauvres (Aït Khaled *et al*, 2009). L'étude ECRHS « European Community Respiratory Health Survey » s'est quant à elle intéressée à la prévalence de

Introduction

la sensibilité dirigée contre neufs allergènes (Table 1). Cette étude démontre que 36 % des individus sont sensibilisés à ces allergènes et que l'allergie aux acariens (*D. pteronyssinus*) est prédominante (21,7% de la population est sensibilisée) (Bousquet *et al.*, 2007).

Allergen	Number of centres	Median (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
<i>Dematophagoides pteronyssinus</i>	35	21.7	4.8	36.8
Grass pollen	33	16.9	4.5	29.2
Cat	35	8.8	1.2	22.4
Birch	35	6.4	0	22.4
<i>Altemaria</i>	35	3.3	0.2	14.4
Olive pollen	33	2.9	0	11.7
<i>Cladosporium</i>	35	1.7	0	11.9
<i>Parietaria</i>	33	0.9	0	6.4
<i>Common ragweed</i>	32	0.8	0	8.7
Atopy (sensitized at least to one allergen)	32	36.8	17.1	54.8

Table 1: Fréquence de sensibilisation (moyenne, minimum et maximum) à 9 aéroallergènes déterminée au moyen de tests allergiques cutanés (Bousquet *et al.*, 2007).

À ce jour, les raisons de l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques ne sont pas complètement élucidées. Certains individus, étant donné leur prédisposition génétique, seraient plus susceptibles de développer une réponse allergique (Ring *et al.*, 2001) mais d'autres facteurs comme le changement de style de vie et de l'environnement sont également incriminés (Kogevinas *et al.*, 2007; Amato *et al.*, 2008).

II. Bases moléculaires de l'allergie

II.1. Mécanismes de la réponse allergique

D'un point de vue physiopathologique, la réaction allergique est caractérisée par une hypersensibilité immune médiée par les IgE (hypersensibilité de type I selon Gell et Coombs) et se décompose en trois phases successives (**Figure 1**). La première phase est la phase de sensibilisation au cours de laquelle s'instaure la mémoire immunitaire. Au cours de cette phase, les allergènes sont pris en charge par les cellules dendritiques matures. L'allergène est alors internalisé, apprêté et les fragments antigéniques couplés au complexe d'histocompatibilité de type II (CMH de classe II) sont présentés aux

Introduction

lymphocytes T naïfs T_H0 . Cette interaction induit ainsi l'expansion clonale et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T_H2 producteurs de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. L'IL-4 et l'IL-13 sont responsables de la prolifération des lymphocytes B et de la commutation isotypique vers les IgE spécifiques des allergènes (Galli *et al*, 2008). Les IgE sécrétées sont alors distribuées dans la circulation sanguine et pénètrent dans les fluides interstitiels où elles se fixent sur leur récepteur de haute affinité.

Les deux dernières phases qui sont les phases de réaction immédiate et retardée ont lieu lors d'un contact ultérieur avec l'allergène. La seconde phase (la phase de réaction immédiate) se déroule dans les 20 minutes suivant l'exposition à l'allergène. Ce dernier, est reconnu par les IgE fixées sur leur récepteur FcεRI de haute affinité présent à la surface des mastocytes et des basophiles. Le pontage des IgE peut être réalisé par un allergène possédant au moins deux épitopes distincts. Ce dernier entraîne l'agrégation des FcεRI et provoque la phosphorylation des résidus tyrosines présents dans les motifs ITAM du récepteur. Il en résulte le recrutement d'autres effecteurs intracellulaires et la mise en place de multiples cascades de signalisation aboutissant finalement à la « dégranulation » des mastocytes et basophiles, c'est-à-dire la libération de médiateurs préformés (histamine, protéases, TNF-α) et néoformés (prostaglandine D2, leucotriène C4 et facteur d'activation des plaquettes) qui ont pour conséquence l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la sécrétion du mucus. La phase de réaction immédiate est suivie, d'une troisième phase appelée réaction retardée. Celle-ci se déclare après 6-12 heures. Elle est caractérisée par la formation d'un œdème et est liée à l'infiltration des tissus enflammés par plusieurs types cellulaires dont les éosinophiles et les lymphocytes T qui vont être réactivés localement et libérer de nombreuses cytokines (principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13), pérennisant ainsi l'inflammation. Au niveau pulmonaire, elle est caractérisée par un rétrécissement des voies respiratoires, une hypersécrétion de mucus et de l'hyperréactivité bronchique (Larché *et al*, 2006).

Introduction

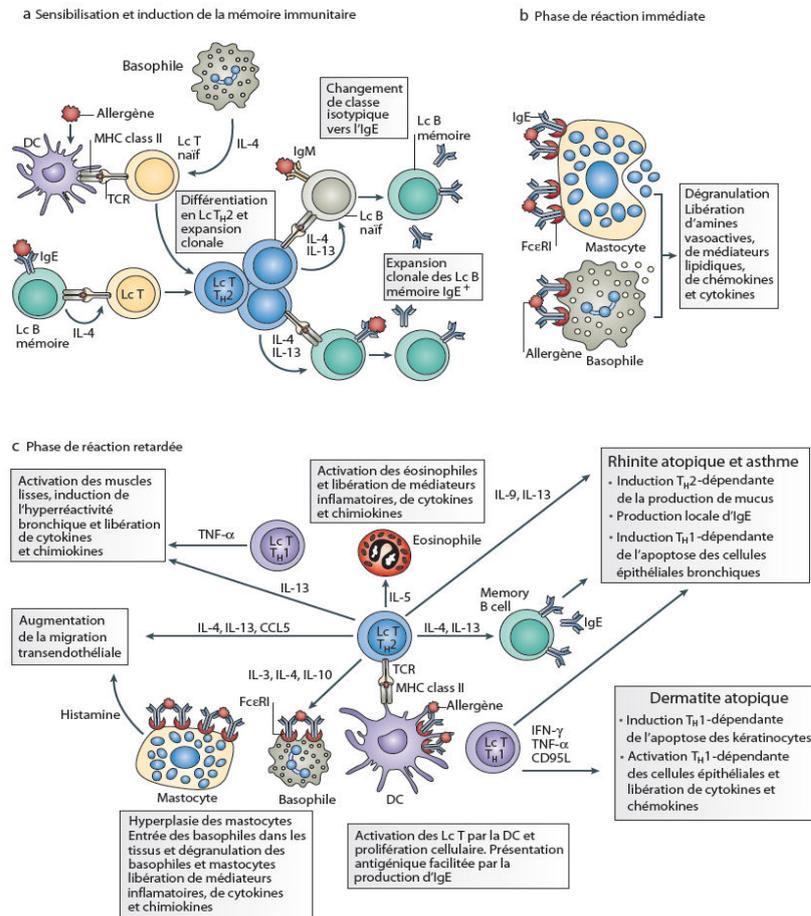


Figure 1: Mécanismes généraux de l'allergie (Larché et al, 2006).

II.2. Réponse immunitaire de type T_H1 versus T_H2

Les lymphocytes T (LT) auxiliaires (T helper ou T_H) sont des cellules effectrices qui peuvent être de type T_H1, T_H2 ou T_H17. Ces différentes sous-populations dérivent d'un même précurseur le LT naïf. Les LTs acquièrent par la suite la capacité de synthétiser des cytokines qui définissent leur profil (T_H1 ou T_H2). L'orientation vers l'un des profils est sous le contrôle de nombreux facteurs incluant les conditions d'activation (liaison au TCR, molécules de co-stimulation), la nature et dose de l'antigène, la nature de la cellule présentatrice d'antigène et l'environnement en cytokines.

Introduction

Les cellules T_H2 sont impliquées dans les réponses immunes à médiation humorale. Cette réponse se met en place envers des microorganismes extracellulaires et des allergènes et se traduit par une forte production d'anticorps de type IgG₁ et IgE, de cytokines (l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-5) et par une éosinophilie (Murray *et al*, 1998).

Les cellules T_H1 , quant à elles, sont à l'origine d'une réponse immune à médiation cellulaire. Elles sont impliquées dans des processus immunitaires déclenchés contre des agents pathogènes intracellulaires. Ces cellules induisent la production d'anticorps de type IgG_{2a} et la sécrétion d'IL-2 et d'IFN γ .

Il existe une régulation négative entre les cellules T_H1 et T_H2 . En effet, l'IFN γ inhibe la production d'IL-4 ce qui favorise l'émergence d'un profil T_H1 . En revanche, la présence précoce de l'IL-4 capable d'induire l'inhibition de l'expression de la chaîne IL-12R β 2 du récepteur de l'IL-12, favorise la différenciation T_H2 (Szabo *et al*, 1997) (**Figure 2**).

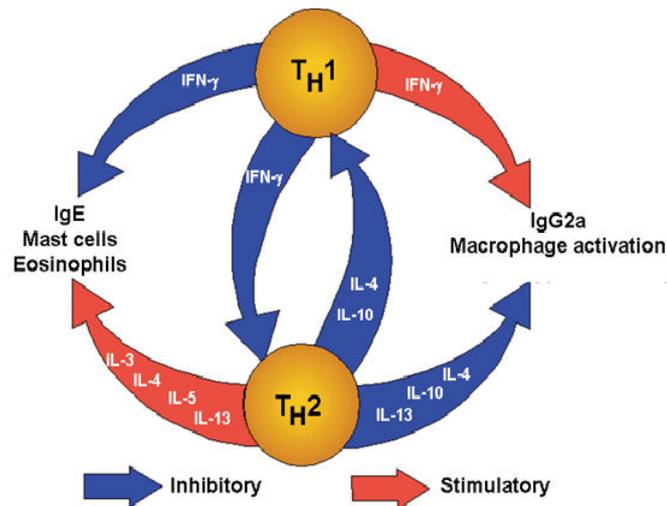


Figure 2 : Dialogue moléculaire entre T_H1 et T_H2 (Coffman *et al*, 2006).

Les réponses T_H1 et T_H2 sont antagonistes. L'inhibition de la voie T_H2 peut être considérée comme un effet protecteur et bénéfique dans l'allergie. Ainsi, l'immunothérapie utilisant des allergènes tels que des extraits de l'acarien *D. pteronyssinus* améliore la fonction pulmonaire des enfants atteints d'asthme allergique. Cette amélioration peut être attribuée à la diminution des taux sériques d'IL-4 et d'IL-13 et à l'augmentation des taux sériques d'IFN γ (Chen *et al*, 2009). L'allergie peut donc, d'un certain point de vue, être une réponse immune inappropriée liée à l'affaiblissement

Introduction

de la réponse immunitaire de type T_H1 et une dominance de la voie T_H2 . C'est le concept de la balance T_H1/T_H2 (Romagnani *et al*, 2004).

II.3. Les acteurs de l'allergie

Les principaux acteurs de la réaction allergique sont les IgE, les médiateurs libérés et secrétés suite à l'activation et la prolifération de certains acteurs cellulaires tels que les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles.

Nous allons détailler le rôle de ces différents intervenants dans la réaction allergique.

II.3.1. Les basophiles

Les basophiles appartiennent à la famille des granulocytes. Ce sont essentiellement des cellules circulantes du sang périphérique dont la durée de vie est de 2 à 3 jours (Ohnmacht *et al*, 2009). Alors qu'un sujet normal comporte moins de 1% de basophiles (Macglushan *et al*, 2013), en cas d'inflammation, les polynucléaires basophiles s'accumulent au niveau des foyers inflammatoires (Suurmond *et al*, 2013; Plager *et al*, 2006; Irani *et al*, 1998 et Macfarlane *et al*, 2000).

Les basophiles possèdent, entre autres au niveau de leur membrane cytoplasmique, le récepteur de haute affinité pour les IgE, le $Fc\epsilon RI$ (environ 100,000 récepteurs par cellule) mais également, le récepteur CD203c dont l'expression est augmentée lors de l'activation des basophiles ainsi que le CD63. Ils contiennent également des granules intra-cytoplasmiques qui renferment des enzymes telles que l'élastase ou la bêta-glucuronidase, des cytokines et du $TNF\alpha$. Ces enzymes et médiateurs sont relargués suite à différents stimuli (**Figure 3**) (Macglushan *et al*, 2013; Galli *et al*, 2000 et Stone *et al*, 2010).

Introduction

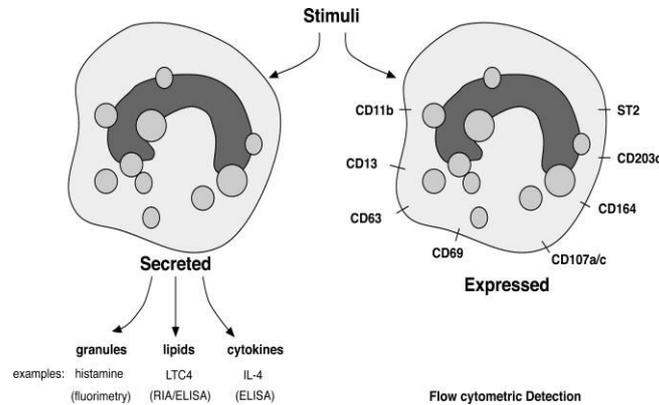


Figure 3 : Les deux méthodes d'évaluation de l'activation des basophiles : mesure du taux des médiateurs sécrétés et mesure de l'expression des récepteurs membranaires (Macglushan et al, 2013).

- **Activation et rôle dans la réaction allergique**

Les polynucléaires basophiles sont attirés par chimiotactisme au niveau du site inflammatoire grâce aux chimiokines libérées lors de la dégranulation des mastocytes et grâce à la vasodilatation qui favorise leur migration. Une fois que les récepteurs membranaires de haute affinité des IgE sont activés, les basophiles vont sécréter différentes molécules, en particulier de l'histamine. L'histamine va augmenter la perméabilité des capillaires sanguins, ouvrant ainsi la voie à la diapédèse des autres cellules de l'inflammation comme les neutrophiles ou les lymphocytes. Après avoir libéré le contenu de leurs granules, les basophiles vont sécréter de nouvelles molécules qui auront un rôle dans le maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire comme l'IL-13 et l'IL-4 (Karasuyama *et al*, 2011; Paul *et al*, 2010). Ces cytokines vont également activer la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteur d'IgE (Zhong *et al*, 2014; Suurmond *et al*, 2013; Wakahara *et al*, 2013; Siracusa *et al*, 2011 et Min et Paul, 2008).

Dans les réponses de type immédiate, l'activation des basophiles peut être analysée par respectivement l'expression ou la surexpression des marqueurs membranaires CD63 ou CD203c (Hausmann *et al*, 2009).

- a- **CD203c**

CD203c appartient à la famille des pyrophosphatase/ phosphodiesterases (E-NPP3) qui est exprimée dans le cytoplasme ainsi qu'à la surface des basophiles et

Introduction

mastocytes (Goding *et al*, 2003; Burhring *et al*, 1999, 2001). Le pontage du récepteur FcεRI à l'aide d'un anticorps anti-IgE ou d'un allergène entraîne une surexpression rapide (en moins de 5 minutes) du CD203c à la surface du basophile (Burhring *et al*, 2004; Sudher *et al*, 2005 et Hennersdorf *et al*, 2005) (**Figure 4**).

b- CD 63

Le CD63, gp63 ou lysosome-associated membrane protein LAMP, est exprimé par différents types cellulaires tels que les basophiles, mastocytes, macrophages et plaquettes (Nieuwenhuis *et al*, 1987 et Grutzkau *et al*, 2004). A l'état basal, ce récepteur, très faiblement exprimé, est ancré dans la membrane des granules intra-cytoplasmiques des basophiles. L'activation de ces basophiles conduit à la fusion des granules avec la membrane cytoplasmique qui, par conséquent à l'expression du CD63 à la surface cellulaire (Buhring *et al*, 2004; Knol *et al*, 1991 et Hennersdorf *et al*, 2005) (**Figure 4**).

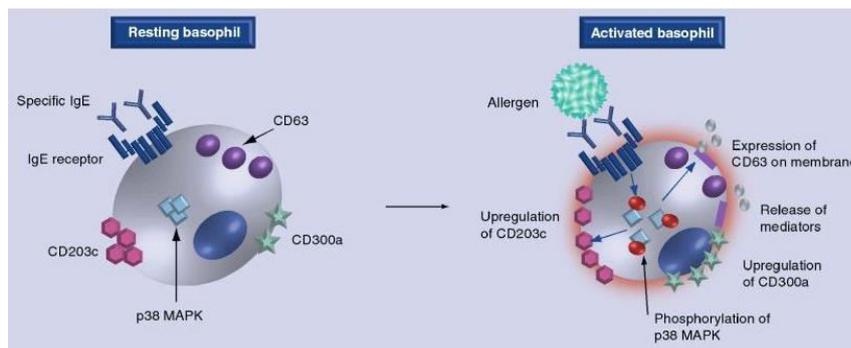


Figure 4 : Représentation schématique de certains marqueurs d'activation des basophiles
(Leysen *et al*, 2011).

II.3.2. Les éosinophiles

Les polynucléaires éosinophiles sont issus de la maturation de précurseurs myéloïdes. Ils migrent dans la circulation sanguine sous l'influence de l'IL-5, de l'IL-3 et du GM-CSF (Rosenberg *et al*, 2007). Ce sont probablement les principales cellules effectrices secondaires de l'allergie chez l'homme. A l'état normal, les éosinophiles sont présents en faible quantité dans les muqueuses respiratoires et digestives. Une hyper-éosinophilie est retrouvée dans l'épithélium et la sous-muqueuse nasale chez les sujets souffrant de rhinite allergique, de dermatite atopique et d'asthme (Wardlaw *et al*, 1994).

Introduction

Les éosinophiles sont des granulocytes à noyau bilobé qui renferment dans leur cytoplasme des granules préformés : contenant l'ECP (eosinophil cationic protein), de l'EPO (eosinophil peroxydase) et de l'EDN (eosinophil derived neutrotoxin). Les éosinophiles libèrent aussi de nombreux médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines, leucotriènes et cytokines. Selon leur état d'activation, les éosinophiles peuvent exprimer des récepteurs membranaires pour les IgE.

- **Activation et rôle dans la réaction allergique**

La maturation, la différenciation, l'activation et la survie des éosinophiles sont dépendantes des cytokines secrétées dans leur environnement. L'absence totale d'IL-5 induit spontanément leur apoptose (Chaudhari *et al*, 2006). En revanche, la présence d'IL-5, d'IL-3 et de GM-CSF prolonge leur survie (Simon *et al*, 2006, Morita *et al*, 1996). Les éosinophiles peuvent être activés par d'autres médiateurs comme les anaphylatoxines ou encore des molécules issues de la dégradation des phospholipides membranaires (leucotriènes LTB₄, PAF).

L'hyper-éosinophilie est une caractéristique principale de l'inflammation allergique. Les éosinophiles sont attirés au niveau du site inflammatoire par l'intermédiaire de cytokines (IL-5, IL-4, IL-13, éotaxine...). De nombreuses études ont montré qu'il existe une corrélation positive entre l'activation des éosinophiles et la sévérité des symptômes de l'allergie (Petsky *et al*, 2007). En effet, les protéines cationiques produites par les éosinophiles suite à leur activation contribuent à la broncho-constriction et à l'hyperréactivité bronchique (Gundel *et al*, 1991).

Une étude récente sur un modèle murin sensibilisé aux acariens montre que la contribution des éosinophiles dans la réaction allergique est limitée au développement de l'inflammation au niveau des voies respiratoires et n'ont aucun effet durant la sensibilisation. En effet, les souris rendues déficientes en éosinophiles avant leur sensibilisation aux acariens développent la même réponse humorale induite lors de la phase de sensibilisation que le groupe de souris sauvages (Jacobsen *et al*, 2014).

II.3.3 Les IgE et leurs récepteurs

Les IgE ont été découvertes à la fin des années soixante et identifiées comme le cinquième isotype des immunoglobulines (Burton *et al*, 2011). Celles-ci constituent le support immunologique de la réaction d'hypersensibilité immédiate et sont essentiellement produites au niveau des principaux sites d'infection parasitaire tels que la peau, les poumons ou l'intestin. Lors de réactions allergiques, les réactions

Introduction

secondaires dues à une surproduction d'IgE (inflammation, bronchoconstriction, sécrétion de mucus, vomissements et diarrhées) représentent les changements anatomiques et physiologiques normalement mis en œuvre pour lutter contre les parasites, rôle « normal » des IgE.

Les IgE sériques ont une demi-vie courte (2,5 jours) et sont présentes à de faibles concentrations chez l'adulte normal (<100 ng/mL). En revanche, lorsqu'elles sont fixées à leur récepteur de haute affinité (FcεRI), leur demi-vie est augmentée car cette fixation les protège des protéases sériques. Les IgE peuvent ainsi persister plusieurs mois à la surface des mastocytes (Kubo *et al*, 2003; Gould *et al*, 2003). Similairement aux différentes classes d'Immunoglobulines, les IgE (188 kDa) sont composées de 4 chaînes, dont deux chaînes lourdes (type ε) et deux chaînes légères réunies par des ponts disulfures et comportant 12 % de résidus glucidiques. Les chaînes légères contiennent un domaine constant et un domaine variable et les chaînes lourdes sont constituées de quatre domaines constants (Cε1- Cε4), et d'un domaine variable (**Figure 5**). Les parties N-terminales des chaînes légères et lourdes sont très variables et confèrent la spécificité antigénique. Les parties C-terminales constantes des chaînes lourdes forment la région Fc et contiennent le site de liaison aux récepteurs spécifiques pour les IgE.

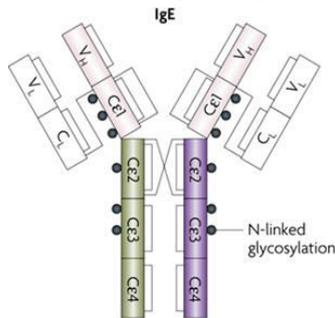


Figure 5: Représentation schématique d'une immunoglobuline E (Gould *et al*, 2008).

Les IgE sont produites par les lymphocytes B activés lors de la « commutation isotypique ». Cette dernière consiste en un changement de classe des domaines constants des chaînes lourdes sans affecter le domaine variable et donc la spécificité vis-à-vis de l'antigène (Gould and Sutton 2008).

- **La commutation isotypique vers les IgE**

Après la différenciation T_H2 induite par les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T_H2 produisant l'IL-4 et l'IL-13 interagissent avec des lymphocytes B (Galli *et al*, 2008) (**Figure 6**). La production de cytokines de type T_H2 et l'interaction

Introduction

CD40-Ligand (CD40L) (cellules T) / CD40 (cellule B) sont toutes deux indispensables à la transcription des gènes codant pour les domaines constants de type C ϵ et donc à la production d'IgE (Bacharier and Geha 2000; Galli *et al*, 2008). Outre les DC, les lymphocytes B peuvent également jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). En effet, une fois l'allergène fixé sur les IgM spécifiques présents à la surface des lymphocytes B naïfs, les complexes IgM/allergène sont internalisés. L'allergène apprêté et les fragments antigéniques couplés au CMH de classe II transitent jusqu'à la surface du lymphocyte B. Ces complexes CMH II/antigènes apprêtés sont alors reconnus par les récepteurs des lymphocytes T (TCR). A la suite de cette interaction, les lymphocytes T activés produisent de l'IL-4 et/ou de l'IL-13 et expriment le CD40L qui interagit avec le CD40 présent à la surface du lymphocyte B, permettant ainsi la production d'IgE (Bacharier and Geha 2000). Certains lymphocytes B sécrètent alors les IgE et sont appelés plasmocytes, alors que d'autres ne font que les exprimer à leur surface. Ces derniers constituent les lymphocytes B mémoire. Les IgE ainsi sécrétées se fixent notamment sur leurs récepteurs spécifiques (Larche *et al*, 2006).

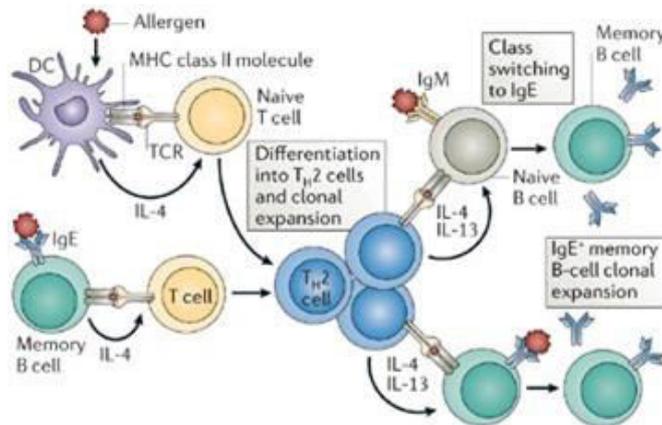


Figure 6 : Commutation isotypique vers les IgE (Larche *et al*, 2006).

Introduction

Les IgE exercent leurs actions biologiques à travers leur fixation sur 2 types de récepteurs spécifiques : Le récepteur de haute affinité (FcεRI) et le récepteur de faible affinité (FcεRII ou CD23).

- **Le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI)**

Ce récepteur est exprimé à la surface des mastocytes et des basophiles mais aussi à la surface des cellules dendritiques circulantes, les cellules de Langerhans, les plaquettes et les cellules musculaires lisses (Grayson *et al*, 2007).

Le FcεRI est un complexe membranaire tétramérique composé d'une chaîne α, d'une chaîne β et d'un dimère de chaînes γ (**Figure 7**). La chaîne α est une protéine transmembranaire formée d'une partie extracellulaire (ECα) qui contient le site de liaison de l'IgE, d'un segment transmembranaire et d'un court segment cytoplasmique. La chaîne β est une protéine très hydrophobe, traversant quatre fois la membrane, dont les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. Les chaînes γ sont des protéines transmembranaires présentant une courte partie extracellulaire et une région cytoplasmique relativement longue. Les chaînes β et γ supportent le module de signalisation. Les parties cytoplasmiques C-terminales de ces deux chaînes contiennent des motifs ITAM (de l'anglais Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) nécessaires à l'activation cellulaire. La partie cytoplasmique de la chaîne γ est essentielle à la transduction de ce signal (Repetto *et al*, 1996) tandis que la chaîne β a un rôle amplificateur de la signalisation via le FcεRI.

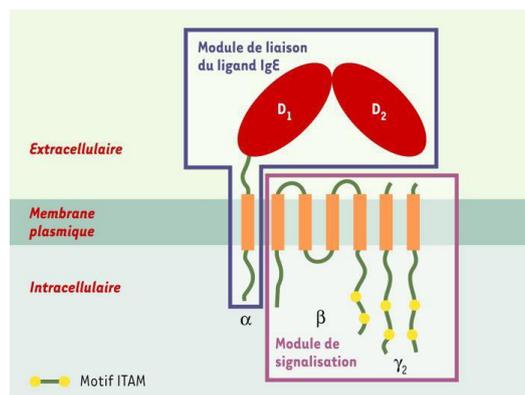


Figure 7 : Représentation schématique du FcεRI et de ses unités modulaires (Blank *et al*, 2003).

Introduction

Des études cristallographiques ont montré que la liaison de l'IgE au FcεRI implique deux sites distincts. Le premier site qui se trouve dans le domaine D2 interagit avec l'un des deux domaines Cε3 et l'une des jonctions Cε2- Cε3 de l'IgE. Le deuxième site se trouve au niveau de D2 et la jonction D1-D2, et interagit avec l'autre domaine Cε3 de l'IgE (**Figure 8**). L'implication de deux sites de liaison de l'IgE explique la forte affinité de la liaison IgE-FcεRI et rend impossible l'interaction avec un deuxième récepteur FcεRI.

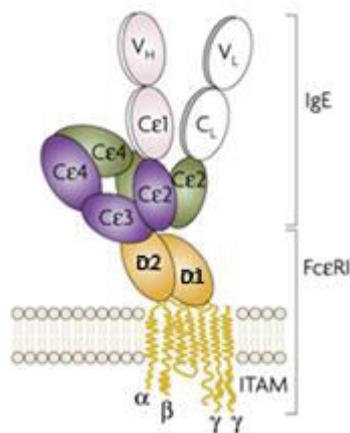


Figure 8 : Structure du complexe FcεRI-IgE (Gould *et al*, 2008).

L'expression du FcεRI à la surface des cellules est sous la dépendance des IgE (Siani *et al*, 2000). Il existe en effet une corrélation entre le taux d'IgE sériques et l'expression du FcεRI à la surface des basophiles et mastocytes aussi bien chez la souris que chez l'homme. Cette régulation positive permet une accumulation progressive des récepteurs à la surface des cellules en stoppant la dégradation de ces récepteurs tout en maintenant leur synthèse basale (Borkowski *et al*, 2001). Cette régulation positive entraîne aussi une augmentation des fonctions effectrices de certaines cellules telles que la présentation IgE-dépendante des antigènes par les cellules dendritiques et la libération des médiateurs suite à la dégranulation des basophiles et mastocytes.

- **Le récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII)**

Egalement nommé CD23, ce récepteur de faible affinité pour les IgE appartient à la superfamille des lectines de type C. La forme fixée à la membrane contient trois

Introduction

domaines : une « tête » extracellulaire espacée de la membrane par un « pédoncule », lui-même composé de trois hélices α enroulées. La principale protéase endogène responsable du clivage du CD23 et de libération de fragments solubles est l'ADAM10 (Gould and Sutton 2008; Lemieux *et al*, 2007 et Weskamp *et al*, 2006). Le CD23 membranaire est exprimé sous deux isoformes: le CD23a et le CD23b. Le CD23a est exprimé par les cellules B activées par l'antigène avant leur différenciation en plasmocytes et joue un rôle principal dans la régulation de synthèse des IgE, alors que l'expression du CD23b est induite par l'IL-4 sur une variété de cellules incluant les macrophages, les monocytes, les éosinophiles, les cellules de Langerhans, les lymphocytes T, les cellules B et les cellules épithéliales (Acharya *et al*, 2010; Cheng *et al*, 2010). La fixation des IgE sur le CD23 est indépendante du domaine carbohydrate du CD23. Le CD23 via son domaine carbohydrate lie le CD21, exprimé sur les lymphocytes B, les lymphocytes T activés et les basophiles. Au niveau du lymphocyte B, cette fixation joue un rôle crucial dans la régulation de la synthèse des IgE (Gould and Sutton 2008). Le CD23 a une forte affinité pour le complexe immun IgE-antigène, mais une faible affinité lorsque l'IgE n'est pas liée à son antigène (**Figure 9**).

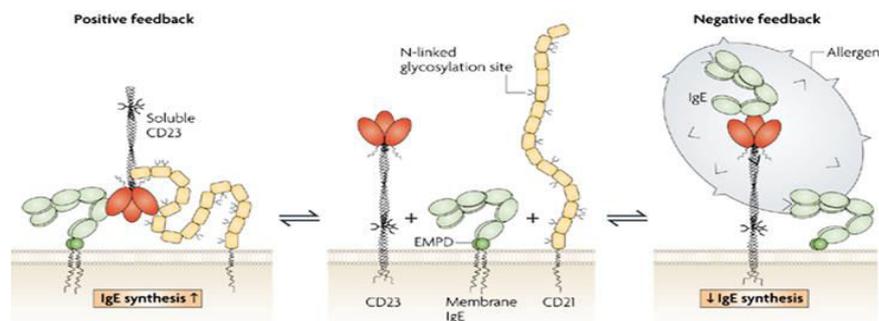


Figure 9 : Mécanisme de régulation de la synthèse des IgE par le récepteur CD 23 (Gould et al, 2008).

II.4. Les principaux médiateurs impliqués dans l'allergie

Plusieurs types cellulaires dont les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles libèrent des médiateurs préformés et néoformés durant la réaction allergique.

Introduction

II.4.1. L'histamine

Ce médiateur joue un rôle majeur durant la phase précoce de la réaction allergique immédiate. Les basophiles et les mastocytes sont les principales sources d'histamine. Suite à un stimulus, l'histamine est libérée massivement et diffuse très rapidement dans les tissus environnant exerçant ses effets pharmacologiques via des récepteurs membranaires.

II.4.2. Les médiateurs néoformés

Leur synthèse est initiée après activation des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles. Les plus importants sont les médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes, les prostaglandines qui sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique. Les leucotriènes (majoritairement le LTC₄) sont responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, et de la sécrétion de mucus (Rothenberg and Hogan 2006). La prostaglandine majoritaire, la PGD₂ a un effet broncho-constricteur et est un puissant chimio-attractant pour les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes de type T_{H2} (Hirai *et al*, 2001; Marone *et al*, 2005 et Prussinc and Metcalfe 2006). Elle est aussi impliquée dans la polarisation de la réponse immune vers un profil T_{H2} (Gosset *et al*, 2003).

II.4.3. Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines de faible masse moléculaire assurant notamment la communication et la coordination intercellulaire. Elles interviennent aussi dans la croissance, la différenciation ou encore la mort cellulaire.

La classification des cytokines a été établie sur base de la cellule productrice, de leur fonction, structure ainsi que de leur récepteur. La classification fonctionnelle divise les cytokines en deux types principaux : les cytokines « T_{H1} » impliquées dans le mécanisme de défense immune à médiation cellulaire et les cytokines « T_{H2} » impliquées dans l'inflammation et la réaction allergique.

a) Les cytokines T_{H2}

Ces cytokines, produites par les cellules de type T_{H2}, jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire allergique.

- **L'IL-4**

L'interleukine 4 est une cytokine clé impliquée dans le développement de la réaction allergique. Elle est principalement sécrétée par les lymphocytes T_{H2}, bien que

Introduction

les mastocytes et les éosinophiles soient également capables d'en produire (Lamkhioued *et al*, 1995).

L'IL-4 est nécessaire à la croissance et à la différenciation des cellules B et T (Targy *et al*, 2002; Ricci *et al*, 1997). En effet, elle augmente l'expression des molécules du CMH II à la surface des cellules B, augmentant ainsi leur capacité à présenter l'allergène aux cellules T_{H2} (Hamid and Tulic 2009). Cette cytokine augmente également la production des IgE en induisant la commutation isotypique de l'IgM vers l'IgE (Bice *et al*, 2014). D'autres études sur des souris sensibilisées et déficientes en IL-4 montrent que ces dernières ne présentent pas de profil T_{H2} (Coyle *et al*, 1995). Ceci confirme que l'IL-4 a un rôle crucial dans l'orientation et la différenciation des lymphocytes T naïfs vers le phénotype T_{H2}.

Une étude récente sur un modèle murin a montré le rôle inhibiteur de l'IL-4 sur l'orientation de la réponse immune vers la voie T_{H1}. En effet, la réactivité des cellules dendritiques, provenant des souris sensibilisées au moyen d'extraits d'acariens, vis-à-vis du LPS a été analysée en présence et en absence de l'IL-4. Ils ont montré que la production de cytokines de type T_{H1} (IL-12) par les cellules dendritiques est fortement réduite lorsque celles-ci sont traitées par l'IL-4 par rapport aux cellules non traitées (Lopez *et al*, 2013).

- **L'IL-13**

Cette cytokine est principalement produite par les lymphocytes T_{H2} (de Waal Malefyt *et al*, 1995), mais également par les basophiles (Schroder *et al*, 2009), les mastocytes (Marone *et al*, 2005) et les éosinophiles (Rothenbery *et al*, 2006).

L'IL-4 et l'IL-13 présentent des effets biologiques très similaires tels que la régulation de la prolifération et la commutation isotypique des lymphocytes B puisque ces deux cytokines partagent une même sous-unité du récepteur à l'IL-4 (Gauchat *et al*, 1997).

Récemment, une étude clinique sur des patients asthmatiques a pu démontrer la corrélation positive entre le taux des IgE spécifiques dans les sérums de patients et les taux d'IL-4 et d'IL-13 secrétées par les lymphocytes T (Van de Pol *et al*, 2012).

L'IL-13 est capable d'induire certaines caractéristiques physiopathologiques de la réaction allergique. En effet, chez les souris sensibilisées par un allergène, la neutralisation de l'IL-13 par l'administration d'une protéine de fusion IL-13R α 2Fc soluble au moment de la deuxième injection avec le même antigène réduit

Introduction

l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire allergique (Grunig *et al*, 1998).

Une autre étude sur des souris déficientes en récepteur d'IL-13 (IL-13R α 2) et sensibilisées avec des extraits d'acariens a montré que l'inflammation allergique de ce groupe de souris a été significativement atténuée par rapport aux groupes de souris sauvages (Chen *et al*, 2013).

- **L'IL-5**

L'IL-5 est produite par divers types cellulaires incluant les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T helper, les mastocytes et les éosinophiles (Hamid and Tulic 2009). Cette cytokine joue un rôle crucial dans la différenciation, la maturation, la survie et l'activation des éosinophiles (Bice *et al*, 2014, Garcia *et al*, 2013). En activant les éosinophiles, l'IL-5 induit la libération d'autres agents chimiotactiques comme l'éotaxine et les protéines basiques responsables des dommages tissulaires (Mamessier and Magnan 2006).

Une étude sur des souris déficientes en IL-5 et sensibilisées au moyen d'un aéroallergène a montré qu'il n'y a ni développement d'inflammation pulmonaire (hyper-éosinophilie, hyperréactivité bronchique) ni de dommages tissulaire (Foster *et al*, 1996). Il a été également montré que cette inhibition peut être levée par l'apport exogène de l'IL-5 (Hamelman *et al*, 2000).

- b) Les cytokines T_H1**

En présence d'un allergène, les individus allergiques développent une réponse T_H2, alors que les sujets non allergiques développent un mécanisme de défense immunitaire à médiation cellulaire. Les cytokines impliquées dans cette réponse T_H1 sont l'IL-12 et l'IFN γ .

- **L'IFN γ**

L'IFN γ est principalement produit par les lymphocytes T_H1, les lymphocytes TCD8+ cytotoxiques, les cellules dendritiques et les cellules Natural Killer (NK). Cette cytokine est indispensable à la prolifération des lymphocytes TCD4+ activés en lymphocytes T_H1.

De nombreuses études réalisées sur modèle murin ont montré le rôle inhibiteur de l'IFN γ sur la réponse immunitaire de type T_H2. En effet, l'administration de l'IFN γ par aérosol dans les voies aériennes des souris allergiques entraîne une diminution des taux

Introduction

sériques d'IgE spécifiques, une augmentation des taux sériques d'IgG_{2a} et inhibe l'hyperréactivité bronchique (Lack *et al*, 1996).

- **L'IL-12**

L'IL-12 est produite par divers types cellulaires dont les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T_{H1} (Hamid and Tulic 2009). Cette cytokine joue un rôle crucial dans la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un profil T_{H1} (Risson *et al*, 1999).

L'administration d'IL-12 à des souris qui présentent une inflammation pulmonaire allergique atténue la réaction allergique prévenant l'inflammation éosinophilique et le développement d'une hyperréactivité bronchique (Gavett *et al*. 1995). Il a été également montré chez des souris sensibilisées au moyen de l'allergène majeur de l'acarien *D. pteronyssinus*, Der p 1, que l'administration d'IL-12 par voie intra-péritonéale inhibe la production d'IgE et d'IgG₁ spécifiques alors que celle d'IgG_{2a} est augmentée (Lee *et al*, 1999).

III. L'allergie aux acariens

Plus de 50 % des manifestations allergiques sont dues aux acariens (Vrtala *et al*, 2014, Chen *et al*, 2012) et plus de 80 % des asthmatiques sont allergiques aux acariens (Gregory *et al*, 2011).

Dans la population générale, la prévalence de la sensibilisation aux acariens se situe généralement entre 9 et 16 % (Wüthrich *et al*, 1995, Squillace *et al*, 1997) et peut atteindre 26 à 43 % dans certains pays (Leung *et al*, 1994). Une enquête de la communauté européenne, réalisée sur plus de 13 000 adultes répartis dans seize pays différents a mis en évidence une prévalence de la sensibilisation à l'espèce *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) variant de 6.5 à 35 % avec une moyenne de 20.3 % (Burney *et al*, 1997). Plus récemment, en 2007 une étude qui se base sur les tests cutanés en tant qu'outil de diagnostic chez 15 000 adultes provenant de 15 pays différents a mis en évidence une sensibilité à *D. pteronyssinus* de l'ordre de 22 % (Bousquet *et al*, 2007).

1. Notions sur les acariens

Les acariens font partie de la classe des arachnides. Trois familles sont particulièrement impliquées dans les phénomènes d'allergie respiratoire : les pyroglyphidae, les acaridae et les glycyphidae. Dans la famille des pyroglyphidae, on

Introduction

retrouve les acariens des poussières de maison dont les plus répandus en Europe sont les espèces *D. pteronyssinus* et *D. farinae*.

A l'état adulte, les acariens ont un corps globuleux et possèdent quatre paires de pattes articulées, elles-mêmes composées de six articles et munies sur le dernier article de soies, de griffes ou de ventouses qui constituent un système d'accrochage aux fibres textiles. Leur taille varie entre 170 et 500 μm , les femelles ayant une taille plus importante que les mâles.

Dans les conditions idéales de température (25-30 °C) et d'humidité (70-80 %), la durée de vie des acariens pyroglyphides est en moyenne de deux à trois mois. Les acariens s'accouplent une ou deux fois dans leur vie. La femelle de *D. pteronyssinus* pond 20 à 80 œufs. A partir de l'œuf, l'ontogenèse des acariens comporte six stades : une prélarve, une larve, trois nymphes (une protonympe, une deutéronympe, une tritonympe) et un adulte ou imago. Chaque transformation donne naissance à un individu actif susceptible de déclencher des réactions allergiques. Lorsque l'humidité et la température sont trop faibles, à l'état adulte, les acariens se regroupent côte à côte pour maintenir une chaleur suffisante et faire en sorte que la perte d'humidité de l'un soit compensée par l'humidité de l'autre. Inversement, si le taux d'humidité est élevé, de l'ordre de 80 %, les acariens mangent cinq fois plus et expulsent 5 fois plus de déjections allergisantes. Ceci démontre que l'humidité est un facteur déterminant pour la production et la dissémination des allergènes (Arlian *et al*, 2002).

Les principales sources d'allergènes d'acariens sont les sécrétions salivaires, les débris de corps entier et les particules fécales. En effet, pendant la digestion, les cellules bordantes de l'intestin moyen secrètent des enzymes digestives protéolytiques nécessaires à la dégradation des squames humaines et des aliments protéiques (Van Hage *et al*, 1995). Ces enzymes, de même que les aliments partiellement digérés, se retrouvent dans les fèces des acariens. Tovey *et al* ont montré que des acariens bien nourris excrétaient entre 20 et 40 particules fécales par jour. Durant leur existence, ils produisent 200 fois le poids de leur corps en matières allergisantes. Les particules fécales s'accumulent dans la poussière domestique et sont dispersées dans l'atmosphère notamment lors des travaux ménagers. Elles ont une taille de 10 à 35 μm et elles peuvent donc pénétrer dans les voies respiratoires au cours d'une respiration buccale normale (Platts Mills *et al*, 2009). Elles sont entourées d'une membrane chitineuse péritrophique perméable à l'eau, permettant une élution rapide des allergènes qui peuvent causer des

Introduction

maladies graves comme l'asthme, les allergies et les diverses formes d'eczéma. En effet, le risque de sensibilisation aux acariens est proportionnel au taux d'acariens présents dans l'environnement domestique. Il a été démontré que la présence de 100 acariens/g de poussière de maison, soit 2 µg d'allergènes/g de poussière, suffit pour sensibiliser un individu. L'exposition des patients sensibilisés à l'acarien *D. pteronyssinus* à des concentrations de 10 µg d'allergène majeur Der p 1 par g de poussière entraîne le déclenchement des symptômes de l'allergie (Surdu *et al*, 2006).

2. Notions sur les allergènes d'acariens

Au début des années 1980, le groupe américain de Platts-Mills a isolé certains allergènes majeurs dans les déjections d'acariens. Depuis lors, la connaissance de ces allergènes s'est considérablement affinée et de nombreux allergènes ont été isolés et parfaitement caractérisés.

IUIS « International Union of Immunological Societies » a proposé d'uniformiser la nomenclature des allergènes en utilisant les trois premières lettres du genre de la source d'allergènes (*Der* pour *Dermatophagoides* par exemple) suivies de la lettre de l'espèce (*p* pour *pteronyssinus*) et un nombre reflétant l'ordre chronologique de purification de l'allergène (Chapman *et al*, 2007).

L'apport de la biologie moléculaire et de l'immunogénétique au cours de ces 25 dernières années a été capital pour la connaissance de la structure et des fonctions des allergènes d'acarien. Ces allergènes ont une masse moléculaire variant de 11 à 190 kDa. A ce jour, 24 allergènes différents, ont été identifiés chez les espèces *D. pteronyssinus* et *D. farinae* (Thomas *et al*, 2002; Hales *et al*, 2006; Weghofer *et al*, 2008 et Yong and Jeong 2009) (<http://www.allergome.org>). Cependant, une étude récente de protéomique a révélé l'existence d'au moins 30 groupes différents chez *D. farinae* (An *et al*, 2013). Les fonctions biochimiques ont été identifiées pour une vingtaine d'entre-eux. Parmi ces derniers, onze groupes sont des enzymes dont quatre sont des protéases. Un résumé de la fonction biologique de chaque groupe et de leur prévalence (% IgE) est présenté à la Table 2.

Introduction

Groupe	Fonction	MM (kDa)	Espèces	Fixation IgE (%)
1	Protéase à cystéine active	25	<i>Dp, Df</i>	70-90
2	Niemann-Pick C2 homologue	14	<i>Dp, Df</i>	60-90
3	Trypsine	25	<i>Dp, Df</i>	16-100
4	A-amylase	60	<i>Dp, Df</i>	25-46
5	Inconnue	15	<i>Dp</i>	9-70
6	Chymotrypsine	25	<i>Dp, Df</i>	30-40
7	Inconnue	24	<i>Dp, Df</i>	50-62
8	Glutathion-S-transférase	26	<i>Dp</i>	40
9	Protéase à sérine active collagénolytique	29	<i>Dp</i>	>90
10	Tropomyosine	35	<i>Dp, Df</i>	5-80
11	Paramyosine	100	<i>Dp, Df</i>	80
13	Protéine de liaison aux acides gras	15	<i>Dp, Df</i>	6
14	Vitellogénine (apolipophorin-like)	177	<i>Dp, Df</i>	30-70
15	Chitinase	63	<i>Dp, Df</i>	8-70
16	Gelsoline	55	<i>Df</i>	35-50
17	Protéine fixant le Ca ²⁺	30	<i>Df</i>	35-50
18	Chitinase	60	<i>Dp, Df</i>	54-63
20	Arginine Kinase	20	<i>Dp, Df</i>	15-44
21	Inconnue	15	<i>Dp, Df</i>	56
22	Inconnue	15	<i>Df</i>	50
23	Peritrophin-like protein	14	<i>Dp</i>	?
24	Alpha actinine	90	<i>Df</i>	85
25	Triose-phosphate Isomerase	34	<i>Df</i>	?
26	Facteur d'élongation 2	43	<i>Df</i>	?
27	Serpine	43	<i>Df</i>	?
28	Hot shock Protein 70	70	<i>Df</i>	?
29	Isomerase Cis-trans	16	<i>Df</i>	?
30	Ferritine	16	<i>Dp, Df</i>	?

Table 2 : Groupes d'allergènes identifiés chez les espèces *D. pteronyssinus* (*Dp*) et *D. farinae* (*Df*). (An et al, 2013; Thomas W et al, 2002 ; Hales et al, 2006; Weghofer et al, 2008 et Yong and Jeong 2009)

Différentes études réalisées en divers pays en et hors Europe présentent Der p 1 et Der p 2 comme étant les allergènes majeurs de *D. pteronyssinus* (Barber et al, 2012; Zheng et al, 2011; Kidon et al, 2011; Hales et al, 2006 et Pittner G et al, 2004). En revanche, la prévalence des autres allergènes (nDer p 3, rDer p 4, rDer p 5, rDer p 7, rDer p 8, rDer p 10, rDer p 13, rDer p 14, rDer p 15, rDer p 20 et rDer p 21) varie en

Introduction

fonction des études. Selon l'étude de Casset *et al*, 2012, les résultats des tests cutanés obtenus chez un même patient sont différents en fonction des extraits d'acariens utilisés. Ce serait du à la difficulté qu'éprouvent les firmes à standardiser la composition de tels extraits.

3. Protéases allergéniques

a) Der p 1

Der p 1 est une protéine de 25 kDa produite par l'acarien *D. pteronyssinus*, qui appartient à la famille C1 des protéases à cystéine active. L'analyse de son ADN complémentaire montre que cet allergène est produit sous la forme d'un précurseur immature PréProDer p 1 constitué d'un peptide signal de 18 résidus, d'un propeptide de 80 acides aminés et d'un domaine protéase de 222 acides aminés (**Figure 10**) (Chua *et al*, 1988). La proséquence de Der p 1 masque son site actif empêchant toute activité enzymatique (Meno *et al*, 2005). Ce propeptide est également impliqué dans le processus de repliement de Der p 1.

```
1 MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKA FNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN
60 GGAINHLSLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNAC SINGNAPAEIDL RQMRTV
120 TPIRMQGGCGS WAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEY
180 IQHNGVVQESYRYVAREQSCRPNARFQGISNYCQIYPPNVN KIREALAQTHSAIAVII
240 GIKDLDAFRHYDGR TIIQRDNGYQPNY AVNIVGY SNAQGV DYWIVR SWDTNWGDNGYG
300 YFAANIDLMMIEEYPYVVIL
```

Figure 10 : Séquence de préproDer p 1 (PO8176) comprenant le peptide signal surligné en noir, le propeptide surligné en gris et le domaine protéase en rouge

- **Prévalence**

L'allergène Der p 1 est considéré comme un allergène majeur de l'acarien *D. pteronyssinus* vu que cet allergène est capable de fixer 80 % des IgE spécifiques de patients allergique aux acariens (Meyer *et al*, 1994). En 2008, Weghofer *et al*, ont montré que Der p 1 était l'allergène majeur dans la plupart des populations avec des fréquences de liaison variant de 85 à 100 %. D'autres études récentes ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre les taux des IgE spécifiques de *D. pteronyssinus* et Der p 1 (Bronnert *et al*, 2012).

- **Epitopes**

Les IgE reconnaissent des sites antigéniques spécifiques appelés épitopes. Pour les pneumo-allergènes, les épitopes B sont les plus souvent des épitopes conformationnels (Pauli *et al*, 2003). Pour l'allergène Der p 1, des épitopes B ont été

Introduction

identifiés par différents groupes en se basant sur la réactivité des peptides dérivés de la séquence protéique de Der p 1. En 1992, Greene *et al*, ont identifié ces épitopes par immunoblot en utilisant des peptides non chevauchants de l'allergène Der p 1 et des sérums de patients allergiques (Greene *et al*, 1992). En 1993, un autre groupe a déterminé les épitopes B de cet allergène en se basant sur la capacité des peptides dérivés de Der p 1 à induire la libération d'histamine *in vitro* et en mesurant leur immunogénicité (Jeannin *et al*. 1992, Jeannin *et al*. 1993). En 2006, de Halleux a positionné les épitopes B de Der p 1 identifiés par ces deux groupes sur la structure tridimensionnelle de Der p 1 (de Halleux *et al*, 2006) (**Figure 11**). Dès lors, 3 épitopes B conformationnels ont été déterminés : l'épitope I (AA15-33, AA188-199), l'épitope II (AA52-56, AA60-80, AA81-94, AA101-111) et l'épitope III (AA155-175, AA176-178). Plus tard, une autre étude a pu également identifier les épitopes B conformationnels de Der p 1 par la technique phage display en utilisant un anticorps monoclonal anti-Der p 1 et les sérums de patients allergiques à Der p 1. En effet, 5 mimotopes ont été sélectionnés et leur positionnement sur la structure tridimensionnelle de Der p 1 ont permis de déterminer les épitopes B conformationnels de l'allergène Der p 1 (Szalai *et al*, 2008). Plus récemment, Zhong *et al*, 2011 ont pu également identifier trois épitopes B conformationnels pour l'allergène Der p 1 : l'épitope 1 (AA85-99), l'épitope 2 (AA106-120) et l'épitope 3 (AA190- 204).

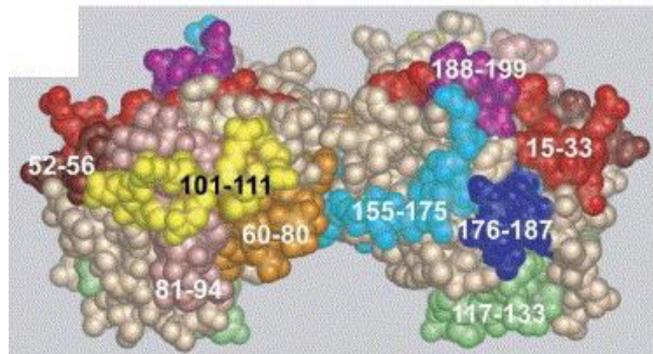


Figure 11 : Localisation des épitopes IgE sur la structure tridimensionnelle de Der p 1 (de Halleux *et al*, 2006).

- **Localisation et fonction**

L'allergène Der p 1 a été identifié à des concentrations élevées au niveau de l'épithélium de la partie postérieure de l'estomac des acariens par immuno-détection (Thomas *et al*, 1991). Cette protéase a été également mise en évidence au niveau des

Introduction

particules fécales qui représentent 50 % des protéines totales de l'acarien (Rees *et al*, 1992) et très récemment, au sein de notre laboratoire Herman *et al*, 2014 ont pu localiser Der p 1 au niveau du tube digestif dans la partie postérieure de l'intestin antérieur et dans le gros intestin (Herman *et al*, 2014). Ceci suggère que la protéase Der p 1 aurait une fonction digestive.

- **Implication de l'activité enzymatique dans la réponse allergique**

L'activité protéolytique de Der p 1 contribuerait fortement à son allergénicité et ceci en clivant plusieurs protéines clés intervenant dans la régulation de l'allergie (Takai *et al*, 2011, Jacquet *et al*, 2011, Shakib *et al*, 2008). En effet, Der p 1 est capable de cliver les jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales. Dès lors, elle induit une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale pulmonaire, favorise la traversée des allergènes et facilite leur accessibilité aux cellules dendritiques et basophiles (Takai *et al*, 2011, Wan H *et al*, 1999, Wan *et al*, 2001). Baker *et al*, ont montré également que l'activité enzymatique de Der p 1 induit l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires et stimule la production des chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules dendritiques. Cette même protéine par son activité protéolytique provoque une destruction des voies aériennes et ceci en hydrolysant l' α -antitrypsine, inhibiteur de protéases à sérine active sécrété par le poumon (Broun *et al*, 2003).

Il a été également montré que Der p 1 est capable de polariser la réponse immunitaire vers un profil T_H2 . Cette orientation est notamment induite par le clivage de certains récepteurs. En effet, le clivage du récepteur CD23 affecte les mécanismes régulateurs de la production d'IgE. Par contre, le clivage de CD25 entraîne une baisse de prolifération des lymphocytes T associée à une baisse de la production d' $IFN\gamma$ (Takai *et al*, 2005). La perte d'activation de la voie CD40-CD40L engendre une diminution de la production de l'IL-12 et par conséquent les lymphocytes T activés par les DC produisent moins d' $IFN\gamma$ et plus d'IL-4 (Shakib *et al*, 2008). Enfin la dégradation de DC-SIGN par Der p 1 empêche sa liaison à ICAM-3 présent à la surface des lymphocytes T et vu que cette liaison a un impact réel sur la production de cytokines (IL-10, TNF- α) accompagnant la présentation antigénique, ceci favoriserait la polarisation de la réponse immune vers un profil T_H2 (Furmonaviciene *et al*, 2007).

Enfin, il a été montré que l'allergène Der p 1 est capable d'induire la libération de certaines cytokines qui favorisent la différenciation des lymphocytes T en T_H2 . En effet, une étude réalisée sur un modèle murin sensibilisé au moyen de Der p 1 a montré que la

Introduction

réponse allergique observée est enclenchée par la cytokine IL-4 relarguée suite à l'activation des basophiles par la protéase (Sokol *et al*, 2009). Une autre étude a également montré que Der p 1 est capable d'activer les basophiles humains en clivant le récepteur PAR (Protease Activated Receptor) qui se trouve à leur surface et d'induire la production de l'IL-4, IL-5 et IL-13. En effet, ils ont montré que le traitement de la protéase Der p 1 par l'inhibiteur E-64 abolit complètement l'activation de ces basophiles (Siracusa *et al*, 2011).

- **Rôle du propeptide dans le masquage des épitopes**

Le propeptide du zymogène proDer p 1 exerce différentes fonctions. Il agit en tant que chaperonne intramoléculaire en assistant au repliement de Der p 1, inhibe son activité protéolytique et réduit son allergénicité en masquant un certain nombre d'épitopes B conformationnels. Meno *et al*, ont montré que le propeptide du zymogène proDer p 1 réduit l'accessibilité au solvant de la forme mature Der p 1 d'environ 13 %. Ils ont également montré que le propeptide du zymogène proDer p 1 masque au moins deux épitopes B de l'allergène (Meno *et al*, 2005). De plus, Takai *et al*, 2005 ont expliqué que la faible reconnaissance de la forme zymogène proDer p 1 par les IgE provenant de patients allergiques par rapport à la forme mature Der p 1 est due à la localisation de la majorité des épitopes B conformationnels dans les deux régions bloquées par le propeptide (Takai *et al*, 2005). Chruszcz *et al*, ont également montré que la forme zymogène proDer p 1 est moins bien reconnue par un anticorps polyclonal par rapport à Der p 1. Cette faible reconnaissance a été expliquée par un masquage de certains épitopes de l'allergène Der p 1 par son propeptide (Chruszcz *et al*, 2012).

- **Mécanisme d'activation**

L'activation du zymogène proDer p 1 correspond à la perte du propeptide et à l'apparition de l'activité protéolytique du domaine catalytique. Plusieurs études ont montré que ce processus se déroule par un mécanisme d'auto-activation en incubant proDer p 1 à pH acide (Takai *et al*, 2002; Van *et al*, 2002; Chevigne *et al*, 2007). En effet, à pH acide, le propeptide se déplie et perd sa capacité inhibitrice et le processus d'auto-activation de la forme zymogène proDer p1 a lieu.

Le processus d'activation de Der p 1 ne semble pas être impliqué dans le changement structural de l'allergène. En effet, de Halleux *et al*, ont montré que la structure de Der p 1 déterminée par cristallographie correspond exactement à la structure

Introduction

tridimensionnelle du domaine protéase du zymogène proDer p 1 (de Halleux *et al.*, 2006).

b) Der p 3

Der p 3 est une protéine de 30 kDa produite par l'acarien *D. pteronyssinus*. Le gène de l'allergène Der p 3 code pour une préprotéine de 261 acides aminés comprenant une séquence signal de 18 acides aminés nécessaire pour la sécrétion, un propeptide de 11 acides aminés et une forme mature de 232 acides aminés correspondant à une protéase à sérine active (**Figure 12**) (Smith *et al.*, 1994).

```
1  MIIYNILIVLLLAINTLANPILPASPNATIVGGKALAGECPYQISLQSSSHFCGGTIL
60  DEYWILTAACVAGQTASKLSIRYNSLKHSLGGKEISVAKIFAHEKYDSYQIDNEIALI
120  KLKSPMKLNQKNKAVGLPAKGSDVKVDQVRVSGWGYLEEGSYSLPSELRRVDIAVVS
180  RKECNELYSKANAEVTDNMICGGDVANGGKDSCQGDSGGPVVDVKNQVVGIVSWGYGC
240  ARKGYPGVYTRVGNFIDWIESKRSQ
```

Figure 12 : Séquence de préproDer p 3 (ABU50814) comprenant le peptide signal surligné en noir, le propeptide surligné en gris clair et le domaine protéase. Le site de N-glycosylation dans le propeptide (N9, numérotation de proDer p 3) ainsi que les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont soulignés et la triade catalytique (H51-D96-S196) est surlignée en rouge.

Sur base de son homologie de séquence et de la conservation des résidus catalytiques, Der p 3 fut classé dans la famille de la trypsine (Stewart *et al.*, 1992). En effet, Der p 3 présente 47 % d'identité avec la trypsine de saumon, 45 % avec la trypsine de bœuf et 44 % avec celle d'écrevisse. Les résidus de la triade catalytique (His 51-Asp 96-Ser 196), les 6 cystéines impliquées dans la formation de 3 ponts disulfures (C36-C52, C163-C180 et C192-C218) de même que l'Asp 190 de la poche de spécificité sont strictement conservés (Smith *et al.*, 1994).

Der p 3 a son homologue chez d'autres espèces d'acariens très proches de *D. pteronyssinus*. Ainsi les allergènes Der f 3, Eur m 3, Blot 3 ont été identifiés respectivement chez *D. farinae*, *E. maynei* et *B. tropicalis*. Ces protéines présentent respectivement 81 %, 80 % et 50 % d'identité avec Der p 3 (Nishiyama *et al.*, 1995).

- **Prévalence**

A l'heure actuelle, l'implication de Der p 3 en allergie est peu connue vu les faibles quantités que l'on purifie de l'allergène à partir des extraits d'acariens. Le taux de fixation des IgE provenant de patients allergiques sur cet allergène varie entre 16 et 100 %.

Introduction

Certaines études réalisées sur l'allergène naturel montrent que Der p 3 ne serait pas un allergène majeur. En effet, des travaux ont montré par des tests radio isotopiques (RAST) effectués sur Der f 3 naturel purifié que le taux de fixation des IgE provenant de 51 patients allergiques est de l'ordre de 16 % (Heymann *et al*, 1989). De plus, Hales *et al*, ont montré par une étude quantitative réalisée sur des patients asthmatiques que la fixation des IgE sur l'allergène Der p 3 naturel ne serait que de 2 % en comparaison à 34 % et 30 % respectivement pour les groupes 1 et 2 recombinants (Hales *et al*, 2006). Récemment, une étude s'est intéressée à la prévalence aux différents allergènes de *D. pteronyssinus* et *B. tropicalis*. Un taux de fixation des IgE provenant de 253 enfants allergiques fut déterminé à 15 % pour l'allergène Der p 3 naturel en utilisant la technique d'immunoCAP et d'immuno-dot blot (Kidon *et al*, 2011).

Par contre, il y a d'autres études qui classèrent Der p 3 parmi les allergènes majeurs. En 1992, une étude réalisée sur Der p 3 purifié par chromatographie d'affinité de type benzamidine, mit en évidence un taux de fixation des IgE provenant de 56 patients allergiques, par test RAST de 100 % (Stewart *et al*, 1992). Un taux de fixation de 70 % déterminé par test ELISA fut observé pour l'allergène naturel Der f 3 purifié (Ando *et al*, 1993). Enfin, un taux de fixation de 60 % déterminé par RAST fut observé pour l'allergène naturel Der p 3 purifié (Yasueda *et al*, 1993).

Les différences observées dans toutes ces études pourraient provenir des populations étudiées, des méthodes de mesure, des techniques de purification utilisées mais également du manque d'homogénéité des préparations d'allergènes naturels, notamment dû à leur dégradation au sein de ces préparations (Stewart *et al*, 1992; Smith *et al*, 1994). Il serait donc nécessaire de faire une étude de prévalence de l'allergène Der p 3 au moyen d'un allergène stable et homogène.

- **Localisation et fonction**

Comme Der p 1, l'allergène Der p 3 a été également identifié dans les particules fécales des acariens (Stewart *et al*, 1991). Son homologue Der f 3 a été localisé au niveau de l'intestin antérieur et postérieur et aussi dans les particules fécales excrétées par l'acarien au moyen d'un anticorps monoclonal anti-Der f 3 (Zhan *et al*, 2010). Enfin, plus récemment, au sein de notre laboratoire, l'allergène Der p 3 a été mis en évidence au niveau du gros intestin (Herman *et al*, 2014). Sur base de ces observations, il a été suggéré que Der p 3 serait une protéase impliquée dans la digestion de l'acarien. Celle-ci

Introduction

serait sécrétée de la paroi de l'intestin antérieur et incorporée ensuite aux particules fécales.

- **Implication de l'activité enzymatique dans la réponse allergique**

L'activité enzymatique de Der p 3 joue un rôle important dans le développement ainsi que dans la chronicité de l'allergie. Plusieurs études suggèrent que Der p 3 pourrait causer des dommages directs à l'épithélium respiratoire. En effet, il a été montré que cette protéase à sérine est capable d'augmenter la perméabilité de l'épithélium bronchique par rupture des jonctions serrées telles que l'occludine et la claudine en agissant sur d'autres sites de clivage que Der p 1 (Wan *et al*, 2001). De plus, l'activité protéolytique de Der p 3 est capable d'induire la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires tels que le GM-CSF, l'IL-6, l'IL-8 et l'éotaxine par activation spécifique du récepteur PAR-2 (Protease activated receptor 2) qui se trouve sur les cellules épithéliales bronchiques (Sun *et al*, 2001, Adam *et al*, 2006).

Enfin, l'allergène Der p 3 est capable de cliver les protéines C3 et C5 du complément et de générer ainsi des anaphylatoxines pro-inflammatoires C3a et C5a qui pourront induire notamment la dégranulation des mastocytes (Maruo *et al*, 1997).

- **Expression recombinante**

Les quantités d'allergène Der p 3 naturel purifiées à partir des extraits d'acariens sont très faibles, en raison de l'hydrolyse de l'allergène. De plus, Der p 3 est contaminé par la présence d'autres allergènes tels que la protéase à sérine active Der p 6 (Stewart *et al*, 1994). Dès lors, le développement d'une forme recombinante de cet allergène présentant un haut degré de pureté et possédant les caractéristiques de l'allergène naturel, que ce soit en terme d'activité enzymatique ou de reconnaissance par les IgE de patients allergiques, était une étape indispensable pour une meilleure compréhension de son rôle dans le développement de l'allergie, pour l'étude de prévalence ainsi que dans le développement de thérapies vaccinales basées sur l'administration de vaccins hypoallergéniques.

L'allergène Der p 3 a été exprimé pour la première fois de manière recombinante en *Pichia pastoris* au sein du laboratoire de macromolécules biologique (CIP/ULg) sous sa forme zymogène soluble glycosylée ou non et correctement repliée (Dumez *et al*, 2008). Après activation du zymogène proDer p 3 en forme mature Der p 3, les caractéristiques biochimiques de l'allergène Der p 3 ont été étudiées et comparées à celle de Der p 3 naturel. L'enzyme recombinant présente des caractéristiques qui sont

Introduction

identiques à celle de la forme naturelle et qui apparentent donc à celle de la trypsine (Dumez *et al*, 2008).

- **Mécanisme d'activation**

L'activation du zymogène proDer p 3 suit un mécanisme intermoléculaire impliquant la protéase à cystéine active Der p 1 (Dumez *et al*, 2008). Il a été montré que cette activation s'effectue en une seule étape. Elle correspond à la perte du propeptide avec l'apparition simultanée de l'activité enzymatique de Der p 3. Dumez *et al*, ont également montré que Der p 3 est sujette à l'autolyse lors de l'activation de proDer p 3 par Der p 1. En effet, une bande de dégradation correspondante (-A₁₁₅VGL-) a été observée. Tout comme les autres trypsines, Der p 3 possède un site d'auto-hydrolyse au niveau du motif -NAK-₁₁₄ (**Figure 13**). Ce clivage engendre l'auto-inactivation de Der p 3 et raccourci son temps de demi-vie. Cette boucle pourrait donc jouer un rôle protecteur afin d'éviter une protéolyse non contrôlée qui pourrait causer des dommages à l'acarien (Dumez *et al*, 2008).



Figure 13 : Modèle tridimensionnel de Der p 3. Le site d'auto-hydrolyse -NAK-₁₁₄ est représenté sous forme de sticks (Dumez *et al*, 2008).

Il a également été montré au sein de notre laboratoire que le zymogène proDer p 3 est incapable de s'auto-activer et que l'activation de proDer p 3 en Der p 3 nécessite un clivage spécifique du propeptide. En effet, l'incubation du zymogène proDer p 3 avec la protéase mature Der p 3 donne lieu à la forme -A₁₈LAGEC- dépourvue de toute activité enzymatique car le clivage a lieu après la Lys 17, 5 résidus en aval de l'Ile12 qui est nécessaire pour l'obtention d'une forme active de Der p 3 (Dumez *et al*, 2008).

Introduction

A l'heure actuelle aucune structure tridimensionnelle de l'allergène Der p 3 ou de proDer p 3 n'a pu être résolue par cristallographie. En 2013, Dumez *et al*, ont pu mettre en évidence par une étude des spectres de fluorescence intrinsèque des formes zymogènes et matures, un changement conformationnel de l'allergène Der p 3 lors de son activation. Cette observation a également été faite sur la trypsine. En effet, les structures du trypsinogène et de la trypsine sont à 85 % identiques et les 15 % restant correspondant à des boucles non structurées, constituent le domaine d'activation. Lors de l'activation du zymogène en trypsine, ce domaine acquiert sa structure (Bruger *et al*, 1987).

C) Der p 6

L'allergène Der p 6 est une protéase à sérine active de type chymotrypsine. Elle est synthétisée sous forme d'une préproprotéine constituée d'un peptide signal de 16 acides aminés, d'un propeptide de 32 acides aminés et d'un domaine protéique de 231 acides aminés. Le taux de fixation des IgE de patients allergiques par l'allergène naturel Der p 6 a été déterminé à 41 % et 65 %, cependant avec une intensité de signal inférieure à celle mesurée pour les allergènes Der p 1 et Der p 3 (Stewart *et al*, 1992, King *et al*, 1996).

D) Der p 9

En 1996, l'allergène Der p 9 a été purifié à partir des extraits d'acariens (King *et al*, 1996). Cette protéase a été classée dans la famille des protéases à serine active de type collagénase en raison de sa capacité à dégrader le collagène. L'allergène Der p 9 présente 76 % d'identité avec l'allergène Der p 3, ce qui pourrait expliquer la réaction croisée observée entre les deux groupes. Un taux de fixation de 92 % déterminé par la technique RAST a été observé pour l'allergène naturel Der p 9.

IV. Applications des allergènes recombinants en diagnostic et immunothérapie spécifique

En allergologie, les développements récents en biologie moléculaire ont permis la production d'allergènes recombinants. L'utilisation de ces allergènes a permis de définir les épitopes impliqués dans la reconnaissance des IgE, de préciser les mécanismes immunologiques mis en jeu contre un allergène particulier, d'améliorer le diagnostic de l'allergie et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques (Vrtala *et al*, 2014, Thomas *et al*, 2011, Valenta *et al*, 2011).

Introduction

L'utilisation des allergènes recombinants en immunothérapie spécifique peut offrir de nombreux avantages par rapport aux extraits allergéniques naturels : leur pureté s'apparente à celle de produits pharmaceutiques et leur concentration peut être déterminée de façon absolue, ce qui évite les problèmes de standardisation rencontrés avec les extraits naturels complexes.

Contrairement aux préparations d'allergènes recombinants, les extraits naturels sont très hétérogènes car leur contenu en allergènes sur un plan qualitatif et quantitatif peut différer d'un lot à un autre du fait de la variabilité des sources naturelles (Casset *et al*, 2012; Foke *et al*, 2008). En effet, ils peuvent contenir des protéines allergéniques auxquelles le patient n'est pas sensibilisé, et par conséquent, il y a risque d'une nouvelle sensibilisation (Pauli *et al*, 2008). De plus, ils peuvent contenir certains facteurs adjuvants de la réponse allergique tels que les endotoxines, les glycanes et les PALM (médiateurs lipidiques associés aux pollens) (Vrtala *et al*, 2014; Nathan *et al*, 2009; Ong and Chew 2010; Hammad *et al*, 2009; Jacquet *et al*, 2011 et Heydenreich *et al*, 2012). Les extraits naturels peuvent également être contaminés par d'autres allergènes provenant d'autres sources diminuant ainsi l'efficacité de l'immunothérapie.

Ces dernières années, des études intensives ont été effectuées pour mettre au point des protéines hypoallergéniques recombinantes qui seraient potentiellement les meilleurs candidats pour l'immunothérapie spécifique vu que ces molécules présentent une activité allergénique réduite mais gardent la capacité de stimuler les cellules T (Vrtala *et al*, 2014; Liu *et al*, 2013; Chen *et al*, 2012; Linhart *et al*, 2012; Valenta *et al*, 2011; Casale and Stokes 2011; Walgraffe *et al*, 2009 et Chen *et al*, 2008).

Pour le groupe 1, une molécule hypoallergénique a été obtenue en produisant la forme zymogène proDer p 1 en *E.coli* sous forme de corps d'inclusion où les épitopes B conformationnels ont été perdus mais la capacité de stimuler des lymphocytes T a été conservée. La vaccination des souris par cette molécule permet d'orienter la réponse immune vers un profil T_H1 (Walgraffe *et al*, 2009). Plus tard, des injections intramusculaires de l'ADN codant pour Der p 1 chez des souris allergiques ont réduit d'une manière significative l'hypersensibilité des voies aériennes et les niveaux de cytokines inflammatoires qui étaient en revanche présentes dans les poumons des souris allergiques non vaccinées (Beilvert *et al*, 2012).

La réduction de l'allergénicité de Der p 2 a également été montrée dans un modèle murin par l'utilisation de deux fragments de Der p 2, ainsi que par une molécule

Introduction

hybride contenant la totalité des épitopes T de Der p 2 (Chen *et al*, 2008). Récemment, deux molécules hybrides rDer p 2/1C et rDer p 2/1S incluant 3 fragments de Der p 1 et deux fragments de Der p 2 ont été construites. Ces deux molécules ont montré une allergénicité et une antigénicité réduite avec une immunogénicité conservée mais l'hypoallergénicité de rDer p 2/1S est plus importante par rapport à celle induite par rDer p 2/1C (Chen *et al*, 2012). Très récemment, Pulsawat *et al*, 2013 ont montré sur un modèle murin qu'une ITS au moyen de l'ADN de Der p 2 avec un tronçon du motif CpG oriente la réponse immune vers une voie T_H1 et induit une tolérance immunologique (Pulsawat *et al*, 2013). Cependant, aucune de ces molécules n'a pour l'instant fait l'objet d'un essai clinique de désensibilisation sur l'être humain qui seul pourra apporter la preuve de leur efficacité.

Les allergènes moléculaires recombinants représentent également un progrès important par rapport aux extraits allergéniques naturels pour les tests de diagnostic *in vitro* et *in vivo*. En effet, les extraits naturels posent des problèmes d'exactitude pour le diagnostic d'allergie du fait de manque de standardisation des préparations, de certains allergènes après extraction et de leurs contamination par d'autres sources naturelles (Casset *et al*, 2012; Bienboire *et al*, 2012; Reuter *et al*, 2006).

Les allergènes purifiés (naturels et recombinants) sont de plus en plus utilisés pour le dosage des IgEs spécifiques chez les patients allergiques. Sur le plan industriel, cette technologie a été fortement développée par la société Phadia sous le nom ImmunoCAP. La nouvelle technique immunoCAP ISAC utilise des biopuces à protéines qui permettent de mesurer les IgE spécifiques de 103 composants issus de 40 sources allergéniques différentes. Cette technique présente une performance comparable à celle de l'immunoCAP. Une étude comparative de cette technique avec les dosages unitaires a montré une bonne corrélation entre les deux méthodes pour certains allergènes de la phléole, du bouleau, chat, chien, moisissures... (Jahn *et al*, 2003; Melioli *et al*, 2011). En effet, ce nouveau test basé sur les allergènes recombinants marque une révolution dans le diagnostic de l'allergie et entraîne une transition progressive vers le diagnostic moléculaire (Component Resolved Diagnosis-CRD). Ce test améliore donc la prise en charge des patients polysensibilisés et ouvre la voie à une immunothérapie hautement spécifique.

Objectifs

L'allergie aux acariens est très courante et touche à peu près 20 % de la population européenne (Bousquet *et al*, 2007). Les protéines allergisantes les mieux étudiées chez *D. pteronyssinus* sont Der p 1 et Der p 2 qui sont considérées comme allergènes majeurs. L'implication de Der p 3 dans l'allergie, est quant à elle, peu connue et son taux de fixation sur les IgE de patients allergiques est controversé. Il est en effet difficile d'obtenir des quantités élevées de Der p 3 naturel en raison de son autolyse qui a lieu au sein des extraits d'acariens. De plus, il a été montré que Der p 3 naturel peut être contaminé par d'autres protéases telles que Der p 6 (Stewart *et al*, 1994).

Au sein de notre laboratoire, une forme recombinante pure, active et possédant les mêmes caractéristiques biochimiques que Der p 3 naturel a pu être obtenue. Nous avons dès lors réalisé une étude comparative de l'allergénicité des formes recombinante et naturelle de Der p 3. Nous avons également étudié l'effet de l'autolyse de Der p 3 dans sa reconnaissance par les IgE et ceci par l'utilisation de la forme Der p 3 mutée au niveau de la sérine active (Der p 3 S196A). Les allergènes Der p 1 ainsi que Der p 3 recombinants ont été produits sous forme zymogène puis activés pour disposer des formes matures. L'effet du propeptide du zymogène proDer p 3 sur son allergénicité a également été déterminé.

La structure tridimensionnelle des allergènes permet de définir leur fonction biologique, d'explorer leur implication dans la pathologie allergique et permet également d'identifier et préciser le positionnement de leurs épitopes B afin de construire des variants hypoallergéniques pour l'immunothérapie spécifique. Nous avons dès lors construit un modèle tridimensionnel de l'allergène Der p 3.

Ce travail a été subdivisé en plusieurs études

Etude 1-Validation de la forme recombinante de Der p 3

L'objectif de cette première étude est d'étudier les caractéristiques biochimiques et allergéniques de Der p 3 recombinant produit en *Pichia pastoris* afin de comparer celles-ci à celles de l'allergène naturel. Pour cela, une étude comparative du taux de fixation des IgE provenant de patients allergiques au moyen de ces deux formes protéiques a été réalisée.

Etude 2-Etude de l'influence de l'autolyse de Der p 3 sur la reconnaissance par les IgE

Dans cette seconde étude, l'autolyse de Der p 3 a été étudiée par diverses techniques dont l'ELISA en utilisant le mutant inactif Der p 3 S196A très stable comme

Objectifs

contrôle négatif. Ensuite, l'effet de cette autolyse sur la reconnaissance par les IgE provenant de patients allergiques a été mesuré.

Etude 3-Etude de l'effet de propeptide sur l'allergénicité de Der p 3

Lors de cette étude, le rôle du propeptide du zymogène proDer p 3 sur son allergénicité a été évalué dans un premier temps *in vitro* en comparant: le taux de fixation des IgE de patients allergiques à proDer p 3 et Der p 3, leur capacité à induire la dégranulation des basophiles de rats humanisés (RBL X-38) ainsi qu'à induire l'activation des basophiles humains. Enfin, le potentiel de Der p 3 et proDer p 3 à déclencher la réaction allergique *in vivo* dans un modèle murin a été évalué.

Etude 4-Détermination des épitopes B linéaires et prédiction des épitopes B conformationnels de l'allergène Der p 3

Les épitopes B linéaires de l'allergène Der p 3 ont été déterminés en mesurant la capacité des sera de patients allergiques à Der p 3 à reconnaître des peptides chevauchants qui couvrent la totalité de la séquence de Der p 3. Les acides aminés immuno-dominants qui sont impliqués dans la fixation et la reconnaissance des IgE ont également été caractérisés d'une manière fine par alanine scanning.

Un modèle structural de l'allergène Der p 3 a été construit par modélisation pour la prédiction *in silico* des épitopes B conformationnels. Enfin, un criblage des résidus des épitopes majeurs de l'allergène Der p 3 a été envisagé par une approche bioinformatique. Cette étude facilitera la validation expérimentale et l'identification des acides aminés immuno-dominants dans le but de construire des molécules hypoallergéniques qui pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques.

Matériels et Méthodes

1. Purification de Der p 3 naturel à partir d'extraits d'acariens épuisés

Les extraits de culture épuisée d'acariens ont été fournis par le Dr Anne-Catherine Mailleux (Unité d'écologie des interactions et de contrôle biologique, UCL). 1g d'extrait a été solubilisé dans 20 mL du tampon PBS pH 7.4 durant 12 heures à 4 °C et ultracentrifugé une heure à 130.000 g. L'extraction a été répétée une seconde fois. 10 mL de fraction soluble ont été dialysés contre du tampon Tris 20 mM pH 7,5 (tampon A) et soumis à une première étape de chromatographie échangeuse d'anions de type QAE HP préalablement équilibrée dans du tampon A. L'élution a été réalisée à l'aide du tampon A additionné de NaCl 1M. Les fractions ont été analysées par mesure de l'activité enzymatique des différentes protéases (Der p 1, Der p 3, Der p 6 et Der p 9) au moyen de substrats peptidiques spécifiques couplés au chromophore p-nitroanilide (pNA) (Bachem). Afin de mesurer l'activité de Der p 3, le substrat IEGR-pNA, spécifique des protéases de type trypsine a été utilisé. Les substrats AAPF-pNA, AAPL-pNA et QAR-pNA (10 mM) avec ou sans inhibiteur de trypsine (SBTI 10 µM) ont été utilisés pour mesurer respectivement les activités de Der p 6 (chmotrypsine), Der p 9 (élastase) et Der p 1 (papaïne). Les fractions qui présentaient une activité protéolytique spécifique de Der p 3 ont été regroupées et purifiées par chromatographie d'affinité de type benzamidine préalablement équilibrée avec le tampon A. L'élution a été réalisée à l'aide du tampon acétate de sodium 100 mM pH 4. Les fractions présentant une activité protéolytique spécifique de Der p 3 ont été rassemblées et dialysées contre du tampon A. Afin de séparer les protéases Der p 3 et Der p 6, ces fractions ont été purifiées par chromatographie d'affinité de type héparine préalablement équilibrée dans du tampon A. L'élution a été réalisée à l'aide du tampon A additionné de NaCl 1M. Les fractions contenant la protéase naturelle Der p 3 ont été regroupées, concentrées et conservées à -20°C.

2. Etudes structurales des formes zymogènes et matures de l'allergène Der p 3

Les deux méthodes d'analyses structurales et spectroscopiques utilisées sont le dichroïsme circulaire et la fluorescence intrinsèque des protéines.

2.1. Dichroïsme circulaire

Le signal de dichroïsme circulaire (CD) repose sur la différence d'absorption, par un milieu optiquement actif, de la lumière polarisée circulairement gauche et droite. Cette technique est utilisée pour mesurer l'activité optique de molécules asymétriques, elle donne une information sur les structures secondaires de la protéine.

Matériels et Méthodes

Les changements de conformation des différentes formes zymogènes et matures de l'allergène Der p 3 sont suivis dans l'UV lointain (195-250 nm) au spectropolarimètre JASCO J-810 (Easton, USA) à 25°C. Les spectres sont enregistrés à une vitesse de 100 nm/min (largeur de fente 1 nm et temps d'intégration 2 sec), cinq fois, moyennés et corrigés par soustraction du spectre du solvant dans les mêmes conditions. Le spectromètre CD fournit le signal correspondant à la différence d'absorption entre la lumière polarisée circulairement droite et gauche : $\Delta A = A_G - A_D$. L'ellipticité (θ en deg) est donnée $\theta = 33 \times \Delta A$

2.2. Fluorescence

Les changements de conformation des structures tertiaires sont suivis par émission de fluorescence intrinsèque des résidus aromatiques et principalement des tryptophanes. Le spectre d'émission de ces résidus est lié à la polarité de leur environnement (généralement hydrophobe) et à leur degré d'exposition au solvant. Les changements conformationnels peuvent provoquer la modification de l'exposition des Tryptophanes au solvant et donc leurs spectres d'émission (de l'intensité de fluorescence et le déplacement du maximum de fluorescence). La longueur d'onde d'excitation est de 280 nm et les spectres d'émission sont mesurés entre 300 et 480 nm.

Les expériences sont réalisées sur le spectrofluorimètre Varian Cary Eclipse (ST-Katelijne, Belgium) à 25°C. La largeur des fenêtres d'excitation et d'émission sont respectivement de 10 et 5. Les spectres sont enregistrés à une vitesse de 350 nm/min (longueur du trajet optique 1 cm), dix fois, moyennés et corrigés par soustraction du spectre du solvant dans les mêmes conditions.

3. Etude de la stabilité des différentes formes de l'allergène Der p 3 et Der p 1

Afin de mettre en évidence la stabilité des formes zymogènes et matures de l'allergène Der p 3 et Der p 1, l'autolyse de celles-ci a été évaluée en les incubant à une concentration de 4 μ M à 37 °C durant 24 heures dans le tampon PBS pH 7.4. Après différents temps d'incubation, des aliquotes ont été prélevés et analysés par SDS-PAGE ainsi que par mesure de l'activité enzymatique au moyen du substrat Boc-IEGR-AMC pour proDer p 3 et Der p 3 et Boc-QAR-AMC pour proDer p 1 et Der p 1.

3.1. Mesure de l'activité enzymatique de Der p 3

L'activité enzymatique de Der p 3 a été mesurée en suivant l'hydrolyse à 37°C, d'un substrat térapeptidique fluorescent, Boc-IEGR-AMC dans un fluorimètre Perkin Elmer 50 avec des fenêtres d'ouverture de 3,7. Der p 3 clive le substrat en aval de

Matériels et Méthodes

l'Arginine ce qui libère le groupement fluorophore AMC dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 360 et 480 nm.

Der p 3 est incubée dans un volume final de 1 mL du tampon polybuffer 50 mM pH 8,5 contenant le substrat (10 μ M). L'émission de fluorescence par l'AMC libéré est suivie pendant 200 secondes. Les mesures de fluorescence sont converties en quantité de substrat hydrolysé grâce à un étalonnage de la cuvette à l'aide des solutions standard d'AMC libre de concentrations exactement connues (0-500 nM).

3.2. Analyse de la stabilité des différentes formes de l'allergène Der p 3 et Der p 1 via un test ELISA

Afin d'étudier l'autolyse des différentes formes de l'allergène Der p 3 (nDer p 3, rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et proDer p 3 S196A) et Der p 1 (rDer p 1, rDer p 1 C34A, proDer p 1 et proDer p 1 C34A) durant un test ELISA, différentes quantités de ces allergènes (100, 200, 300, 400 et 500 ng) ont été coatées sur microplaques pendant une nuit à 4°C. Après un lavage avec du PBS 0,1 % Tween 20 (PBS/Tw), 200 μ L du PBS BSA 3 % ont été déposés dans les puits et les microplaques ont été incubées pendant une heure à 37 °C. Après lavage, elles ont ensuite été incubées avec un anticorps de lapin anti-proDer p 3 ou de souris anti-proDer p 1 à la dilution 1/2000 et 1/1000 respectivement pour l'allergène Der p 3 et Der p 1. Enfin, un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à la phosphatase alcaline est ajouté et la révélation a été réalisée en mesurant l'hydrolyse du para-nitrophényl phosphate à 405 nm.

4. Caractérisation immunologique *in vitro* et *in vivo* des différentes formes de l'allergène Der p 3

4.1. Etude *in vitro*

a) Dosage ELISA indirect

500 ng de l'allergène ont été immobilisés sur microplaques pendant une nuit à 4 °C. Après un lavage avec du PBS 0,1 % Tween 20 (PBS/Tw), 200 μ L du PBS BSA 3 % ont été déposés dans les puits et les microplaques ont été incubées pendant une heure à 37 °C. Les microplaques ont été rincées par du PBS/Tw et 100 μ L du sérum de patients allergiques aux acariens *D. pteronyssinus* dilués 5 fois dans du PBS BSA 3 % ont été déposés dans les puits. Les microplaques ont été ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C. La fixation des IgE a été mise en évidence au moyen d'un anticorps secondaire anti-IgE humain couplé à la phosphatase alcaline. 100 μ L d'une solution de para-nitrophényl phosphate (2 mg/mL) ont été ajoutés. La réaction colorée se développe en 2

Matériels et Méthodes

heures à température ambiante. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 μL de NaOH 3N et la densité optique à 405 nm a été mesurée par un lecteur de microplaques (Bio-Rad Novapath). Le seuil de positivité a été établi à partir des sera de sujets non allergiques. En effet, le test a été considéré positif si l'absorbance obtenue est supérieure à la moyenne du témoin négatif additionné de trois fois l'écart type.

b) ELISA inhibition compétitive

Ces tests ont été réalisés en pré-incubant les sera de patients allergiques dilués 5 fois avec nDer p 3, rDer p 3, rDer p 3S196A, proDer p 3 avec des concentrations croissantes (0-50 $\mu\text{g/mL}$) pendant 16 heures à 4°C. Les tests ELISA ont été ensuite réalisés comme décrits précédemment. Les taux d'inhibitions sont calculés (l'absorbance en absence d'allergène correspond à 0 % d'inhibition) et reportés sur un graphe en fonction de la concentration en allergène.

c) ELISA sandwich

500 ng d'anti-IgE humain ont été immobilisés sur microplaques pendant une nuit à 4 °C. Après un lavage avec du TBS 0.1 % Tween 80 (TBS/Tw), 200 μL de TBS BSA 3 % ont été déposés dans les puits et les microplaques ont été incubées pendant une heure à 37 °C. Les microplaques ont été rincées par du TBS/Tw et 100 μL du sera de patients allergiques aux acariens *D. pteronyssinus* dilués 5 fois dans du TBS BSA 1 % ont été déposés dans les puits. Les microplaques ont été ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C. Cinq lavages successifs ont été effectués avec du TBS/Tw avant le dépôt de l'anticorps polyclonal anti-proDer p 3 à une dilution 1/2000. Les microplaques ont été ensuite incubées pendant 1 heure à 37 °C. Après 5 lavages avec du TBS/Tw, 100 μL de l'anticorps anti-lapin IgG₁ (BD Biosciences) ont été ajoutés. Après 1 heure d'incubation à 37°C le taux de fixation des IgE a été mis en évidence au moyen d'une streptavidine peroxydase Sigma (E-2886). Les microplaques ont été incubées pendant 30 minutes à 37 °C. Après lavage le TMB a été ajouté, la réaction colorée se développe en 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ajout de H₂SO₄ 2N permet de stopper la réaction. L'absorbance à 450 nm a été mesurée par un lecteur de microplaques (Bio-Rad Novapath). Des témoins négatifs ont été inclus dans chaque plaque afin de contrôler la spécificité et la sensibilité de chaque mesure. Le seuil de positivité est fixé à 3 fois la valeur moyenne obtenue avec les sera des sujets non allergiques additionné de trois fois l'écart type.

Matériels et Méthodes

d) Dégranulation des basophiles RBL-SX-38

La lignée RBL-SX-38 (Rat basophil leukemia cell subline) exprimant le FcεRI humain (fournie par le Dr. E. Adam, ULB) a été utilisée afin de comparer le pouvoir allergénique de nDer p 3, rDer p 3, rDer p 3S196A, proDer p 3 et proDer p 3S196A. L'allergène Der p 1 a été pris comme référence.

Le test de dégranulation se déroule en 4 étapes : l'ensemencement, la sensibilisation, l'activation et le dosage d'un des médiateurs libérés, marqueur de la dégranulation. Ces étapes sont schématisées dans la **figure 14**.

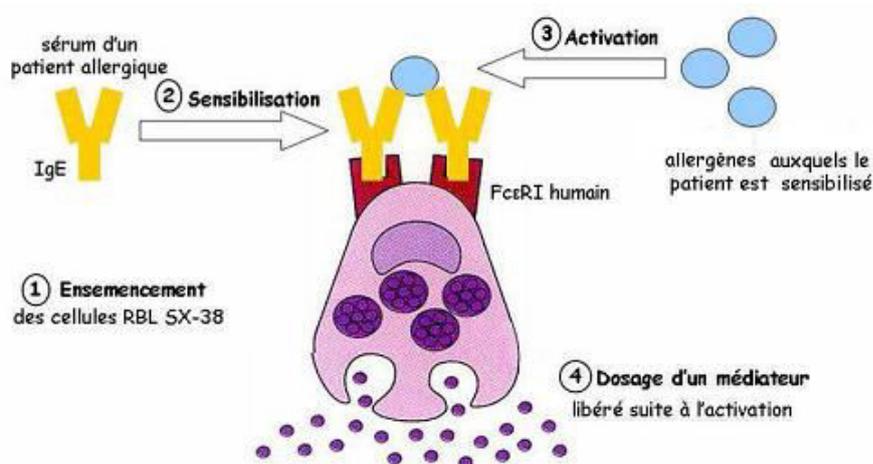


Figure 14: Principe du test cellulaire de dégranulation des RBL.

Après culture, les cellules ont été récupérées, comptées et centrifugées. Ces derniers ont été réparties dans des plaques 96 puits (50000 cellules par puits) et les sera à tester, dilué au 1/5, ont été alors ajoutés au milieu de culture. Après 24 heures d'incubation à 37°C dans un incubateur humidifié (95 % d'air et 5 % de CO₂), le surnageant de culture a été éliminé. Les cellules adhérentes sensibilisées ont été lavées une fois avec du milieu RPMI (100 µL à chaque fois). Par la suite, 100 µL de milieu RPMI contenant la protéine à tester (0 à 1000 ng/mL) ont été distribués dans chaque puits. Tous les tests ont été répétés trois fois. Les plaques ont été incubées 30 minutes à 37°C. Pour mesurer le relargage spontané de β-hexosaminidase, des puits ont été incubés avec du tampon PBS sans sera de patient. Pour mesurer l'activité maximale (100 % d'activité), des échantillons ont été incubés sans sera de patient ont été traités après

Matériels et Méthodes

centrifugation avec 3 μ L de 10 % Triton X-100. Pour mesurer l'activité β -hexosaminidase 50 μ L de chaque échantillon (test, relarguage spontané, relarguage total) ont été distribués dans une plaque 96 puits et incubés 90 minutes à 37°C en présence de 50 μ l de para-nitrophényl-*N*-acétyl b-D-glucosaminide (1,3 mg/mL dans un tampon citrate 0,05 M à pH 4.5). La réaction enzymatique a été stoppée par addition de 150 μ L de tampon glycine 0,2 M (pH 10.7) et l'absorbance a été alors mesurée à 410 nm.

e) Test d'activation des basophiles humains par cytométrie de flux

A partir du sang total, le pourcentage de basophiles activés a été déterminé par cytométrie de flux (CMF), après marquage des basophiles à l'aide des anticorps couplés à un fluorochrome en utilisant le Kit d'allergénicité (Bekman coulter) (**Figure 15**). Brièvement, 100 μ L du sang total ont été incubé avec 20 μ L d'allergène à différentes concentrations (0.0001-10 μ g/mL), 20 μ L d'un mélange des anticorps monoclonaux (CRTH₂-FITC, CD203c-PE, CD3-PC7) et 100 μ L de solution d'activation. Après 15 min d'incubation à 37°C, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 μ L de la solution stop. Par la suite, 2 mL de la solution fixe & lyse a été ajoutée afin de lyser les globules rouges et de figer les globules blancs pour l'analyse. Après la dernière étape de lavage avec 3 mL du tampon PBS, le culot cellulaire a été récupéré par centrifugation et a été resuspendu dans 500 μ L du PBS, 0.1 % formaldéhyde. Enfin, le pourcentage de granulocytes basophiles activés a été déterminé par cytométrie en flux jusqu'à obtenir une population de 750 basophiles.

Pour chaque échantillon testé, en plus du test d'activation avec les différents allergènes (nDer p 3, rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3, proDer p 3 S196A, rDer p 1) à différentes concentrations, des contrôles négatifs avec le tampon PBS pour déterminer l'expression basale du marqueur et positifs avec l'anti-IgE humain pour déterminer l'expression maximale du marqueur et vérifier la viabilité des cellules ont été réalisés.

Deux échantillons de sang de patients non allergiques aux acariens a été également testé avec les différents allergènes afin de confirmer qu'il n'y a pas de contaminants dans nos échantillons qui induisent l'activation des basophiles d'une manière IgE indépendante.

A partir du contrôle négatif, le seuil de positivité a été fixé juste au-dessus de la zone correspondante aux basophiles non activés. Le résultat a été considéré positif si 25 % du total des basophiles étaient activés (c'est-à-dire 5 fois plus que le contrôle négatif).

Matériels et Méthodes

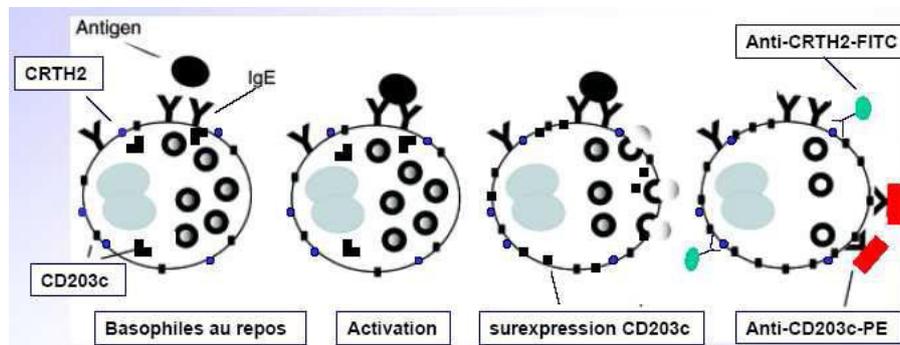


Figure 15 : Principe d'activation des basophiles avec surexpression du CD203c.

4.2. Etude *in vivo* du potentiel de déclenchement de la réaction allergique avec Der p 3 et proDer p 3 chez les souris Balb/c

Pour comparer les pouvoirs allergéniques de Der p 3 avec proDer p 3 et Der p 1, six groupes de souris femelles Balb/C (âgées de 6 semaines) (Harlan, Horst, the Netherlands) ont été sensibilisés avec Der p 3, Der p 3 S196A, proDer p 3 et Der p 1 par voie intra-péritonéale (3 injections à 2 semaines d'intervalle, 10 µg d'allergène formulé dans l'alum, ratio allergène/adjuvant : 1/200). L'inflammation pulmonaire a été ensuite induite au 42^{ème} jour en injectant par voie intra-nasale (100 µg/20 µL/souris) des extraits d'acarien de *D. pteronyssinus* (Geer, Lenoir, USA) pendant 3 jours successifs (**Figure 16**). En parallèle, deux groupes de souris n'ont pas été sensibilisés, un groupe « Naïve » et un groupe « IN ». Le groupe « IN » a uniquement reçu les injections intranasales. Des prélèvements sanguins ont été effectués à J₁, J₂₈, J₄₂ et J₄₇ dans le but de suivre la réponse humorale chez les souris sensibilisées en mesurant le taux des IgE, IgG₁ et IgG_{2a} spécifiques. Après avoir mesuré la réactivité bronchique, les souris ont été sacrifiées à J₄₇. Leurs rates ont été prélevées afin d'évaluer la réponse cellulaire. Des marqueurs de la réaction allergique tel que les taux d'éosinophiles et de basophiles dans les lavages broncho-alvéolaires ont été dosés après 24 heures du dernier test de provocation intranasal.

Matériels et Méthodes

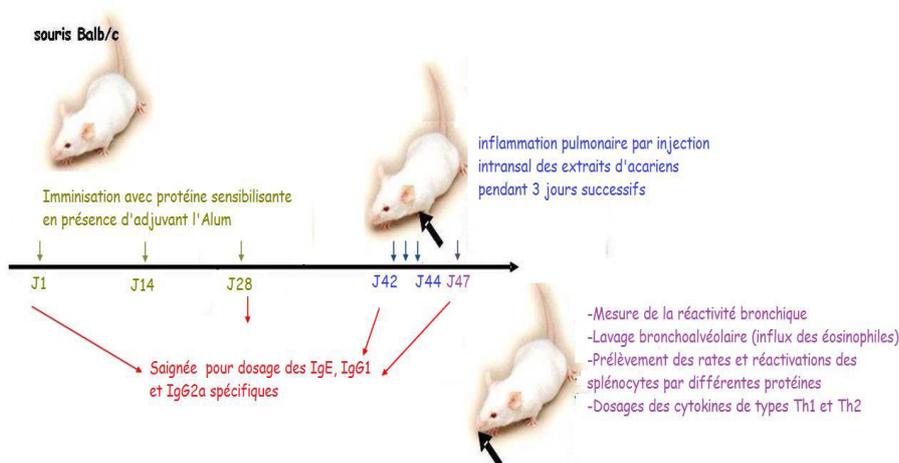


Figure 16 : Principe de l'étude du déclenchement de la réaction allergique chez la souris Balb/c.

a) Mesure de l'hyperréactivité bronchique

La mesure de l'hyperréactivité bronchique est l'un des outils de diagnostic de l'existence d'asthme. En effet, la sensibilité des bronches des souris suite à une stimulation par un agent bronchoconstricteur la méthacholine a été analysée en utilisant la pléthysmographie barométrique (Buxco Europe Ltd.) afin de mesurer le Penh moyen (enhanced Pause). Ce paramètre reflète l'écoulement d'air pulmonaire chez les souris. Il est obtenu à partir de la courbe de pression inspiratoire et expiratoire et son calcul est basé sur le temps de pause (un paramètre tenant compte de la durée du signal expiratoire). Le Penh est corrélé à la résistance des voies aériennes chez la souris Balb/C. Pour effectuer cette mesure, l'animal a été placé dans une chambre au sein de laquelle il est libre de ses mouvements pour minimiser l'influence du stress lié aux manipulations. Après son acclimatation, des mesures de référence ont été enregistrées durant 3 minutes. Ensuite, une solution saline (PBS) et des doses progressivement croissantes de méthacholine (3 à 50 mg/mL) ont été nébulisées dans la chambre pendant 30 secondes. Deux minutes après chaque nébulisation, les différentes valeurs de la variation de pression au sein de la chambre ont été enregistrées pendant 3 minutes sous forme d'un tracé graphique oscillant de part et d'autre de la valeur zéro et leurs moyennes ont été calculées. La réactivité bronchique a été exprimée en Penh moyen; le Penh moyen

Matériels et Méthodes

obtenu pour chaque concentration de méthacholine étant comparé au Penh moyen obtenu après la nébulisation avec du PBS seul.

b) Analyse de l'influx cellulaire dans les lavages bronchoalvéolaires

Au jour 47, des lavages bronchoalvéolaires (LBA) ont été effectués sur chacune des souris. La technique utilisée consistait à ouvrir la cage thoracique des animaux et à pratiquer une incision dans la trachée. Un cathéter a été ensuite inséré dans la trachée par cette même incision. Deux lavages successifs des poumons ont été alors réalisés par injection et récupérations lentes de 0,8 mL du PBS. La suspension cellulaire recueillie, a été centrifugée pendant 10 minutes et le culot cellulaire obtenu a été resuspendu dans 300 μ L du tampon HBSS 2 % sérum (Hank's balanced salt solution). Des comptes cellulaires ont ensuite été effectués sur un hémocytomètre (cellule de Malassez), en mélangeant un volume précis de la suspension cellulaire avec le même volume de cristal violet, une substance qui colore les cellules. 100 μ L d'une suspension cellulaire 3.10^4 ont été centrifugées sur lame (cytospin 10 min, 2000 g), fixées puis colorées. Les lames ont été ensuite analysées au microscope à immersion. Les neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages ont été identifiés individuellement sur critères morphologiques. Au total, pour chaque LBA (et donc pour chaque souris), 200 cellules ont été analysées et comptées.

c) Analyse de production IgG₁ et IgG_{2a} spécifique

100 μ L du tampon phosphate contenant 500 μ g/mL de Der p 3 S196A ont été immobilisés sur microplaques pendant une nuit à 4 °C. Après trois lavages avec du TBS 0,1 % Tween 80 (TBS/Tw), 150 μ L du TBS BSA 1 % ont été déposés dans les puits et les microplaques ont été incubées pendant une heure à 37 °C. Les microplaques ont été rincées par du TBS/Tw et 100 μ L du sera aux dilutions désirées ont été déposés dans les puits. Les microplaques ont été ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C. Cinq lavages ont été effectués avec du TBS/Tw avant le dépôt de l'anticorps monoclonal biotinylé anti-IgG₁ (Biosource, #AMI2319) ou anti-IgG_{2a} (Biosource, #AMI2329). Après 1 heure d'incubation à 37°C et 5 lavages, 100 μ L de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline ont été ajoutés dans chaque puits. La révélation a été réalisée par l'ajout de 150 μ L d'une solution de para-nitrophényl phosphate. La réaction est stoppée après 30 minutes par l'ajout de 50 μ L de NaOH 3N et la densité optique à 410 nm a été mesurée par un lecteur de microplaques (Bio-Rad Novapath).

Matériels et Méthodes

d) Mise en culture et stimulation des splénocytes

Au J₄₇, les souris ont été sacrifiées, leurs rates ont été prélevées puis ont été écrasées. Les cellules ont été resuspendues en RPMI 1640 complété par du SVF (10 %), 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (milieu complet). Après une première centrifugation des splénocytes (400 g, 10 min, 4°C), les érythrocytes ont été lysés par incubation du culot cellulaire dans le tampon de lyse. Après centrifugation, le culot cellulaire a été finalement repris dans 10 mL de milieu complet.

Après prélèvement de la suspension cellulaire, une numération au bleu trypan a été effectuée, permettant de vérifier que la viabilité cellulaire est supérieure à 95 %. Les suspensions cellulaires ont été alors ajustées à 3.10^5 cellules par puits, puis distribuées à raison de 100 µL/puits en plaque de culture 96 puits. Les allergènes (rDer p 3, rDer p 3 S196A et proDer p 3) ont été ensuite ajoutés en triplicat, à des doses croissantes (0; 1,25; 5; 20 µg/mL).

La thymidine tritiée a été ajoutée 48 heures après mise en culture des cellules et stimulation cellulaire. Après 16 heures d'incubation, les taux d'incorporation de thymidine ont été mesurés par dosage de la radioactivité (récolte au Cell Harvester et lecture au compteur beta, PerkinElmer) afin d'évaluer le taux de prolifération cellulaire. Les surnageants de cultures ont été récoltés 72 heures après mise en culture et stimulation des cellules avec les différents allergènes (20 µg/mL) pour doser les cytokines relarguées. Il est ainsi possible de définir le type de la réponse cellulaire induite par les différents variants de Der p 3. Ces surnageants ont été stockés à -80°C.

e) Analyse de production de l'INFγ et de l'IL-5

Les dosages des cytokines de type T_H1 et T_H2 ont été réalisés par test ELISA. 50 µL d'une solution tampon d'anticorps anti-IFNγ murin ou anti-IL-5 (BD Biosciences) à une concentration de 1,5 µg/mL en tampon carbonate ont été immobilisés sur microplaques pendant une nuit à 4 °C. Après trois lavages avec du PBS 0.05 % Tween 20 (PBS/Tw), 150 µL du PBS, BSA 1 % ont été déposés dans les puits et les microplaques ont été incubées pendant une heure à température ambiante. Les microplaques ont été rincées par du PBS/Tw et 50 µL des surnageants récoltés après stimulation des cellules par les allergènes ont été déposés dans les puits aux dilutions désirées. En parallèle, 7 dilutions sérielles (1 /2) ont été réalisées à partir d'une solution standard d'INFγ (4,5 ng/mL) ou d'IL-5 (2 ng/mL). Les microplaques ont été ensuite

Matériels et Méthodes

incubées pendant 2 heures à température ambiante. Après 5 lavages avec le tampon PBS/Tw, 50 µL du mélange d'anticorps de détection formé par l'anticorps monoclonal biotinylé anti-INF γ ou anti-IL-5 et la streptavidine HRP (1 /250) ont été ajoutés pour chaque puits. Les microplaques ont alors été incubées une heure à température ambiante. La révélation a été réalisée à l'aide de TMB.

5. Détermination des épitopes linéaires de l'allergène Der p 3

56 peptides biotinylés de 15 mers chevauchants avec un recouvrement tous les 5 acides aminés et couvrant la séquence entière de l'allergène Der p 3 ont été synthétisés par la firme JPT (Peptide Technologie GmbH, Berlin Germany) (**Table 3**). Ces peptides ont été biotinylés à leur extrémité N-terminal et immobilisés sur une microplaque couplée à la streptavidine. Après une heure d'incubation à 37°C, 3 lavages avec du tampon PBS/Tween ont été réalisés. Par la suite, les microplaques ont été incubées avec 100 µL du sera de 10 patients allergiques à Der p 3 à une dilution de 1/8 pendant 24 heures à 4°C. La fixation des IgE sur les différents peptides a été mise en évidence au moyen d'un anticorps anti-IgE humain couplé à la HRP à une dilution 1/3000. Après une heure d'incubation à 37°C, 3 lavages ont été réalisés et le TMB a été ajouté, la réaction colorée se développe en 30 minutes à température ambiante. L'ajout de H₂SO₄ 2N permet de stopper la réaction. L'absorbance à 450 nm a été mesurée par un lecteur de microplaques (Bio-Rad Novapath). Des sera de 10 patients non allergiques pour l'allergène Der p 3 ont été inclus dans cette étude afin de déterminer avec spécificité les épitopes B linéaires de l'allergène Der p 3. Le seuil de positivité pour chaque peptide est déterminé par la moyenne de l'absorbance à 405 nm pour les 10 patients non allergiques à Der p 3 + 3 fois l'écart type.

Un épitope est considéré comme majeur lorsqu'il est reconnu par 70 % des patients allergiques à l'allergène Der p 3.

Matériels et Méthodes

N° du peptide	Séquence	Position dans Der p 3
P1	IVGGEKALAGECPYQ	Ile ¹ -Gln ¹⁵
P2	EKALAGECPYQISLQ	Glu ⁵ -Gln ¹⁹
P3	AGECPYQISLQSSSH	Ala ⁹ -His ²³
P4	PYQISLQSSSHFCGG	Pro ¹³ -Gly ²⁷
P5	SLQSSSHFCGGTILD	Ser ¹⁷ -Asp ³¹
P6	SSHFCGGTILDEYWI	Ser ²¹ -Ile ³⁵
P7	CGGTILDEYWILTAA	Cys ²⁵ -Ala ³⁹
P8	ILDEYWILTAHCVA	Ile ²⁹ -Ala ⁴³
P9	YWILTAHCVAGQTA	Tyr ³³ -Ala ⁴⁷
P10	TAAHCVAGQTASKLS	Thr ³⁷ -Ser ⁵¹
P11	CVAGQTASKLSIRYN	Cys ⁴¹ -Asn ⁵⁵
P12	QTASKLSIRYNSLKH	Gln ⁴⁵ -His ⁵⁹
P13	KLSIRYNSLKHSLGG	Lys ⁴⁹ -Gly ⁶³
P14	RYNSLKHSLGG EKIS	Arg ⁵³ -Ser ⁶⁷
P15	LKHLGGEKISVAKI	Leu ⁵⁷ -Ile ⁷¹
P16	LGGEKISVAKIFAHE	Leu ⁶¹ -Glu ⁷⁵
P17	KISVAKIFAHEKYDS	Lys ⁶⁵ -Ser ⁷⁹
P18	AKIFAHEKYDSYQID	Ala ⁶⁹ -Asp ⁸³
P19	AHEKYDSYQIDNDIA	Ala ⁷³ -Ala ⁸⁷
P20	YDSYQIDNDIALIKL	Tyr ⁷⁷ -Leu ⁹¹
P21	QIDNDIALIKLKSPM	Gln ⁸¹ -Met ⁹⁵
P22	DIALIKLKSPMKLNQ	Asp ⁸⁵ -Gln ⁹⁹
P23	IKLKSPMKLNQKNAK	Ile ⁸⁹ -Lys ¹⁰³
P24	SPMKLNQKNAKAVGL	Ser ⁹³ -Leu ¹⁰⁷
P25	LNQKNAKAVGLPAKG	Leu ⁹⁷ -Gly ¹¹¹
P26	NAKAVGLPAKGSVDK	Asn ¹⁰¹ -Lys ¹¹⁵
P27	VGLPAKGSVDKVG DQ	Val ¹⁰⁵ -Gln ¹¹⁹
P28	AKGSVDKVG DQVRVS	Ala ¹⁰⁹ -Ser ¹²³
P29	DVKVG DQVRVSGWGY	Asp ¹¹³ -Tyr ¹²⁷
P30	GDQVRVSGWGYLEEG	Gly ¹¹⁷ -Gly ¹³¹
P31	RVSGWGYLEEGSYSL	Arg ¹²¹ -Leu ¹³⁵
P32	WGYLEEGSYSLPSEL	Trp ¹²⁵ -Leu ¹³⁹
P33	EEGSYSLPSELRRVD	Glu ¹²⁹ -Asp ¹⁴³
P34	YSLPSELRRVDIAVV	Tyr ¹³³ -Val ¹⁴⁷
P35	SELRRVDIAVVS RKE	Ser ¹³⁷ -Glu ¹⁵¹
P36	RVDIAVVS RKECNEL	Arg ¹⁴¹ -Leu ¹⁵⁵
P37	AVVS RKECNELYSKA	Ala ¹⁴⁵ -Ala ¹⁵⁹
P38	RKECNELYSKANAEV	Arg ¹⁴⁹ -Val ¹⁶³
P39	NELYSKANAEVTDNM	Asn ¹⁵³ -Met ¹⁶⁷
P40	SKANAEVTDN MICGG	Ser ¹⁵⁷ -Gly ¹⁷¹
P41	AEVTDN MICGGDVAN	Ala ¹⁶¹ -Asn ¹⁷⁵
P42	DN MICGGDVANGGKD	Asp ¹⁶⁵ -Asp ¹⁷⁹
P43	CGGDVAN GGK DSCQG	Cys ¹⁶⁹ -Gly ¹⁸³
P44	VANGGK DSCQGD SGG	Val ¹⁷³ -Gly ¹⁸⁷
P45	GK DSCQGD SGGPVVD	Gly ¹⁷⁷ -Asp ¹⁹¹
P46	CQGD SGGPVVDVKNN	Cys ¹⁸¹ -Asn ¹⁹⁵
P47	SGGPVVDVKNNQVVG	Ser ¹⁸⁵ -Gly ¹⁹⁹
P48	VVDVKNNQVVGIVSW	Val ¹⁸⁹ -Trp ²⁰³
P49	KNNQVVGIVSWG YGC	Lys ¹⁹³ -Cys ²⁰⁷

Matériels et Méthodes

P50	VVGIVSWGYGCAKRG	Val ¹⁹⁷ -Gly ²¹¹
P51	VSWGYGCAKRGYPGV	Val ²⁰¹ -Val ²¹⁵
P52	YGCARKGYPGVYTRV	Tyr ²⁰⁵ -Val ²¹⁹
P53	RKGYPGVYTRVGNFI	Arg ²⁰⁹ -Ile ²²³
P54	PGVYTRVGNFIDWIE	Pro ²¹³ -Glu ²²⁷
P55	TRVGNFIDWIESKRS	Thr ²¹⁷ -Ser ²³¹
P56	RVGNFIDWIESKRSQ	Arg ²¹⁸ -Gln ²³²

Table 3 : Les différents peptides qui couvrent la séquence entière de l'allergène Der p 3

6. Identification des acides aminés immunodominants des épitopes B linéaires de l'allergène Der p 3

L'importance des acides aminés de l'épitope B linéaire de Der p 3 dans la fixation des IgE a été étudiée en les substituant un par un par une alanine (simple alanine scanning). 20 peptides biotinylés ont été également synthétisés par la firme JPT (Peptide Technologie GmbH, Berlin Germany) et des tests ELISA ont été réalisés comme décrit précédemment avec un pool de 10 sera de patients allergiques à Der p 3. Pour identifier les acides aminés immunodominants qui sont impliqués dans la reconnaissance et la fixation des IgE, nous avons comparé le taux de fixation des IgE sur les différents peptides. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du signal obtenu avec le peptide WT.

7. Modélisation moléculaire et prédiction des épitopes B conformationnels de l'allergène Der p 3

• Modélisation comparative

Le but de la modélisation comparative est de déterminer la structure tridimensionnelle de Der p 3 (la cible) à partir de l'alignement de sa séquence avec celle d'une ou plusieurs protéines de structure 3 D connues (les templates).

La modélisation comparative se déroule en cinq étapes successives : recherche et choix des templates, alignements des séquences, construction des structures tridimensionnelles et enfin l'évaluation de la qualité des modèles construits (**Figure 17**).

La modélisation comparative débute par la recherche des templates dont la structure tridimensionnelle est déjà déterminée par rayon X ou RMN dans les banques de données en utilisant la séquence de la protéine cible Der p 3. Pour ce faire l'algorithme de comparaison des séquences BLAST (Altschul *et al*, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a été utilisé. Cet algorithme permet d'interroger les banques de données comme la PDB et d'identifier des séquences de protéines qui sont similaires à celle de la protéine cible. Les protéines de structure tridimensionnelle

Matériels et Méthodes

connue et possédant l'identité et la similarité de séquence la plus importante ont été sélectionnées comme template pour prédire la structure tridimensionnelle de Der p 3. D'autres critères ont été également utilisés pour affiner le choix des modèles par exemple : la fonction biologique, la résolution de la structure tridimensionnelle ainsi que la présence ou non d'inhibiteur.

L'étape suivante est l'alignement des séquences, c'est une étape cruciale pour la modélisation comparative. En effet, un mauvais alignement entraîne systématiquement un modèle 3 D erroné pour la cible. Dans cette étude, le logiciel Clustalw (Thompson *et al.*, 1994 ; [http:// www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) a été utilisé pour réaliser l'alignement multiple. Ce logiciel réalise l'alignement multiple de séquence en commençant par les paires les plus identiques.

Une fois l'étape d'alignement de séquence effectuée, la construction du modèle a été réalisée en utilisant le programme Modeller (Sali & Blundell 1993). La modélisation avec Modeller comporte trois étapes : l'alignement de la séquence cible avec celle des templates sélectionnés, la génération des fichiers de contraintes et enfin le calcul sous contraintes du modèle tridimensionnel de la cible par des méthodes de minimisation énergétique.

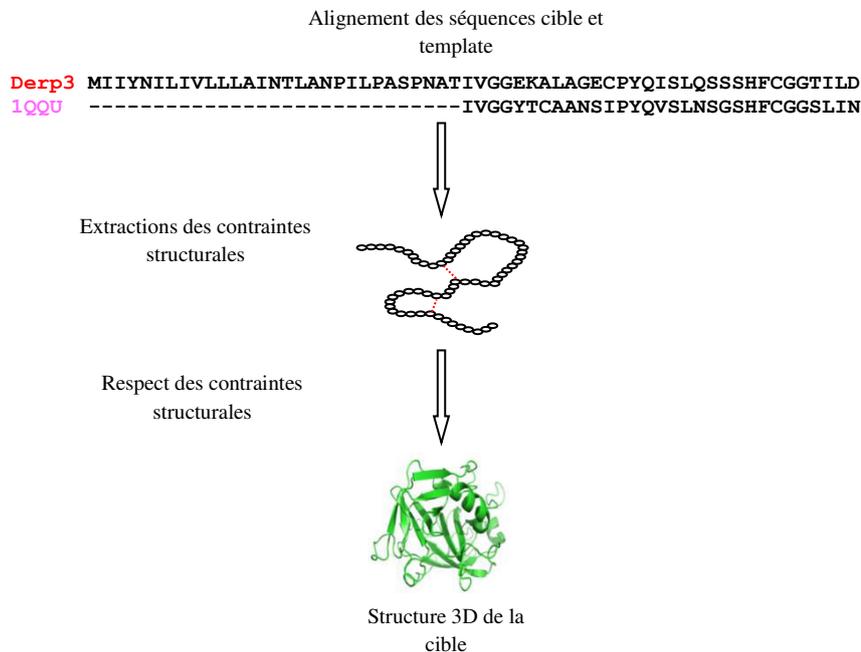


Figure 17: Principe de fonctionnement du logiciel Modeller.

Matériels et Méthodes

Après avoir construit les modèles tridimensionnels de Der p 3, nous avons également évalué la qualité de leurs repliements. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur le calcul du Z-score. Nous avons défini le meilleur modèle comme étant celui qui a le plus petit Z-score. Ainsi, les 10 meilleurs modèles ayant le Z-score le plus faible et inférieur à -0.5 ont été sélectionnés pour réaliser la prédiction des épitopes B.

- **Prédiction des épitopes B conformationnels**

Les épitopes de surface, correspondant à des régions de la structure tridimensionnelle de la protéine qui vont être reconnues par les IgE, sont généralement constitués des régions les plus hydrophiles, accessibles au solvant et flexibles. Pour les prédire, il est nécessaire de se référer à des programmes qui se basent sur des échelles de valeur pour ces paramètres. En effet, deux approches algorithmiques ont été utilisées durant cette étude pour la prédiction des épitopes B conformationnels pour l'allergène Der p 3 qui sont Discotope (Haste *et al.* 2006) et SEPPA (Sun J *et al.* 2009).

- **8. Analyse statistique**

Les données sont exprimées en moyenne \pm déviation standard (SD). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test t de Student pour mettre en valeur des différences significatives entre certains groupes. Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$.

Résultats

Etude 1 : Validation de l'allergène Der p 3 recombinant

Avant d'utiliser l'allergène Der p 3 recombinant produit en *P.pastoris* pour les tests de diagnostic, nous devons comparer ces propriétés allergéniques avec Der p 3 naturel.

1. Purification de Der p 3 naturel

Les extraits de culture épuisée d'acariens ont été fournis par le Dr Anne-Catherine Mailleux (Unité d'écologie des interactions et de contrôle biologique, UCL). 1g d'extrait a été solubilisé dans 20 mL du PBS pH 7.4 durant 12 heures à 4 °C et ultracentrifugé. L'extraction a été répétée une seconde fois. 10 mL de fraction soluble ont été dialysés contre du tampon Tris 20 mM pH 7.5 (tampon A) et soumis à une première étape de chromatographie échangeuse d'anions de type QAE HP préalablement équilibrée dans du tampon A. L'élution a été réalisée à l'aide du tampon A additionné de NaCl 1M. Les fractions ont été analysées au moyen de substrats spécifiques des protéases Der p 1, Der p 3, Der p 6 et Der p 9 présentes dans les cultures d'acariens et par SDS-PAGE (Figure 18).

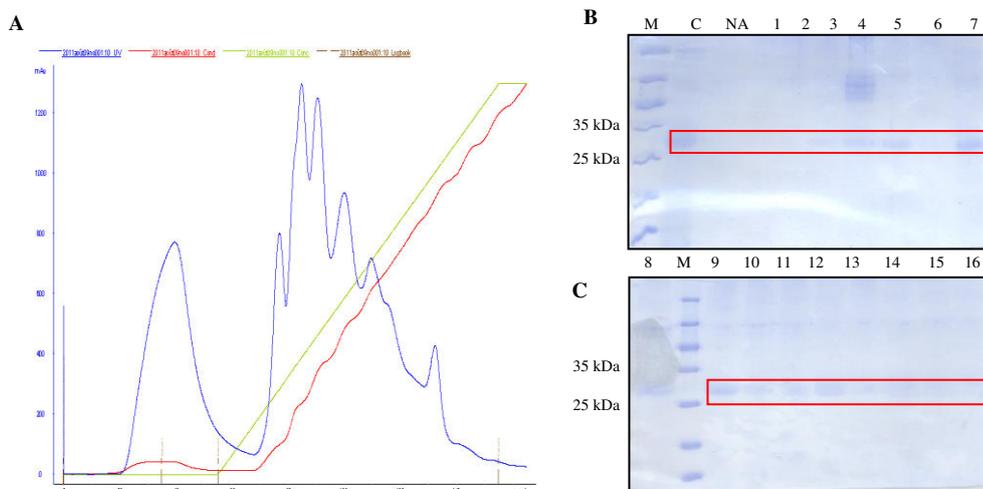


Figure 18: Chromatogramme d'élution (A) et analyse SDS-PAGE 15 % (B et C) présentant la purification de Der p 3 naturel sur l'échangeuse d'anions de type Q-Sépharose HP. M : marqueur de taille des protéines, C : Charge et NA : non accroché.

Les fractions qui présentaient une activité protéolytique spécifique de Der p 3 ont été regroupées et purifiées par chromatographie d'affinité de type benzamidine préalablement équilibrée avec le tampon A. L'élution a été réalisée à l'aide du tampon

Résultats

acétate de sodium 100 mM pH 4. Les fractions qui présentaient une activité protéolytique spécifique de Der p 3 ont été rassemblées et dialysées contre du tampon A (**Figure 19**).

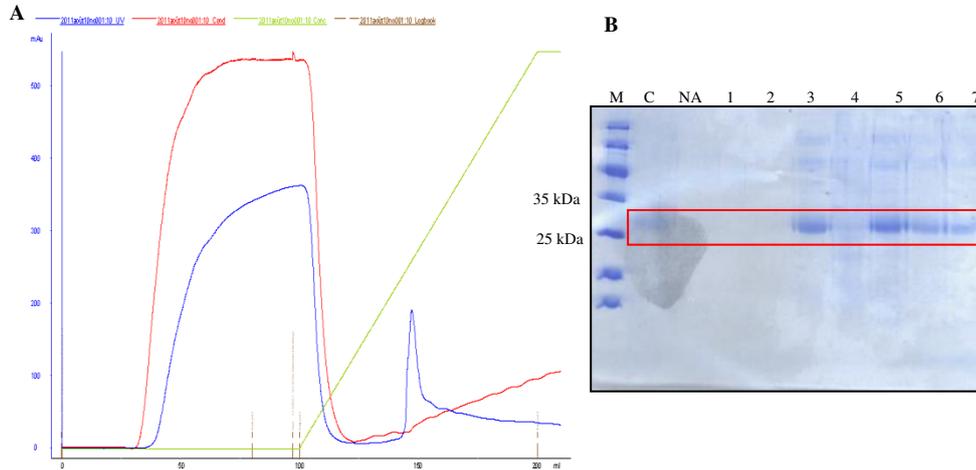


Figure 19: Chromatogramme d'élution (A) et analyse SDS-PAGE 15 % (B) de la purification de Der p 3 naturel sur la matrice d'affinité de type benzamidine. M : marqueur de taille des protéines, C : charge et NA : non accroché.

Afin de séparer les protéases Der p 3 et Der p 6, ces fractions ont été purifiées par chromatographie d'affinité de type héparine préalablement équilibrée dans du tampon A. L'élution a été réalisée à l'aide du tampon A additionné de NaCl 1M (**Figure 20**).

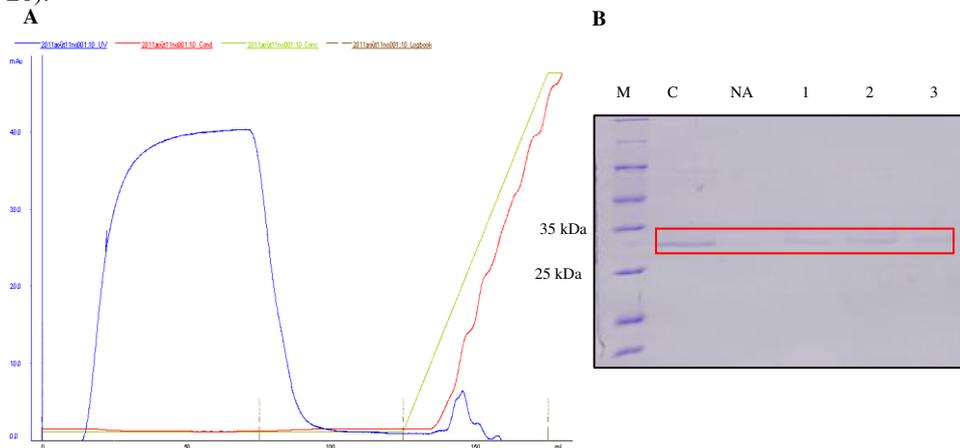


Figure 20: Chromatogramme d'élution (A) et analyse SDS-PAGE 15 % (B) de la purification de Der p 3 naturel sur la matrice d'affinité de type héparine. M : marqueur des protéines, C : charge et NA : non accroché.

Résultats

Les fractions contenant la protéase naturelle Der p 3 ont été regroupées et concentrées. Cette solution a été dosé au moyen du kit « BCATM Protein Assay Kit » (Pierce) et stockée à -20°C. La concentration obtenue est d'environ 10 µg/mL.

2. Comparaison de l'immunogénéicité de Der p 3 naturel et recombinant

22 sera de patients allergiques aux acariens (IgE spécifiques > 1.14 kUI/L) et 8 non allergiques ont été gracieusement donnés par le Professeur F. Hengtes (Laboratoire d'Immunogénétique et d'Allergologie, CRP-Santé, Luxembourg) ainsi que par le Professeur R. Louis (Service de Pneumologie-Allergologie, CHU, Liège).

500 ng de rDer p 3, nDer p 3 ont été immobilisés sur microplaque une nuit à 4 °C. Les 22 sera de patients allergiques, de même que les sera de patients non allergiques ont été utilisés à une dilution 1/5 et la fixation des IgE a été mise en évidence au moyen d'un anticorps secondaire anti-IgE humain couplé à la phosphatase alcaline. Les taux de fixation des IgE provenant de patients non allergiques étaient de l'ordre des contrôles négatifs (utilisation du tampon PBS pH 7.4, à la place des sera).

La figure 21A montre que la reconnaissance de la forme naturelle et recombinante de l'allergène Der p 3 par les IgE de patients allergiques sont similaires attestant ainsi l'immunogénéicité et donc de la qualité de Der p 3 recombinant. Ces résultats ont été confirmés par test d'inhibition compétitive. En effet, l'inhibition de la reconnaissance de rDer p 3 S196A (forme muté au niveau de la sérine active n'est pas sujette à l'autolyse) par les IgE de patients allergiques est similaire lorsqu'on incube préalablement les sera avec la forme recombinante ou naturelle de Der p 3 (**Figure 21B**). Ces résultats montrent que Der p 3 recombinant produit en *P.pastoris* est correctement replié et présente les mêmes propriétés allergéniques que Der p 3 naturel. Dès lors, cette forme pourrait être utilisée pour le diagnostic de l'allergie aux acariens.

Résultats

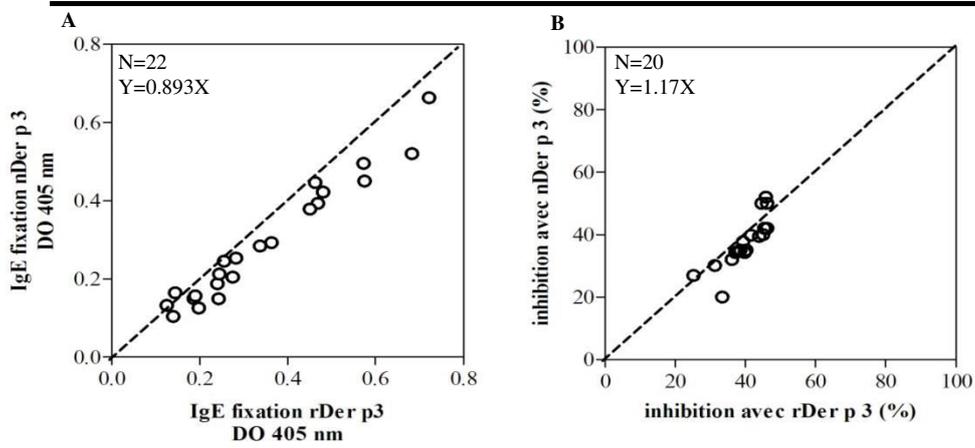


Figure 21 : (A) Comparaison du taux de reconnaissance de rDer p 3, nDer p 3 par les IgE provenant des sera (dilution 1:5) de patients allergiques (n=22). (B) comparaison des taux d'inhibition de nDer p 3 et rDer p 3.

Résultats

Etude 2: Etude de l'autolyse de l'allergène Der p 3 et son implication sur la reconnaissance par les IgE

1. Etude de la stabilité des différentes formes zymogènes et matures de l'allergène Der p 3 et Der p 1

Afin de mettre en évidence la stabilité des formes zymogènes et matures de l'allergène Der p 3 et Der p 1, l'autolyse de celles-ci a été évaluée en les incubant à une concentration de 4 μ M à 37 °C durant 24 heures. Après différents temps d'incubation, des aliquotes ont été prélevés et analysés par SDS-PAGE ainsi que par mesure de l'activité enzymatique au moyen du substrat Boc-IEGR-AMC pour proDer p 3 et rDer p 3 et Boc-QAR-AMC pour proDer p1 et rDer p 1.

L'analyse SDS-PAGE indique qu'il n'y a pas d'autolyse des zymogènes (proDer p 1, proDer p 1 C34A, proDer p 3 et proDer p 3 S196A) endéans les 24 heures (résultat non représenté). Un profil similaire a pu être mis en évidence pour les formes matures mutées au niveau de leur site actif (rDer p 3 S196 A (**Figure 22B**) et rDer p 1 C34A) ainsi que pour rDer p1 active. Par contre, pour rDer p 3 l'intensité de la bande commence à diminuer après 4 heures d'incubation à 37°C et disparaît presque totalement après 24 heures (**Figure 22A**) démontrant que cette protéase est sujette à l'autolyse.

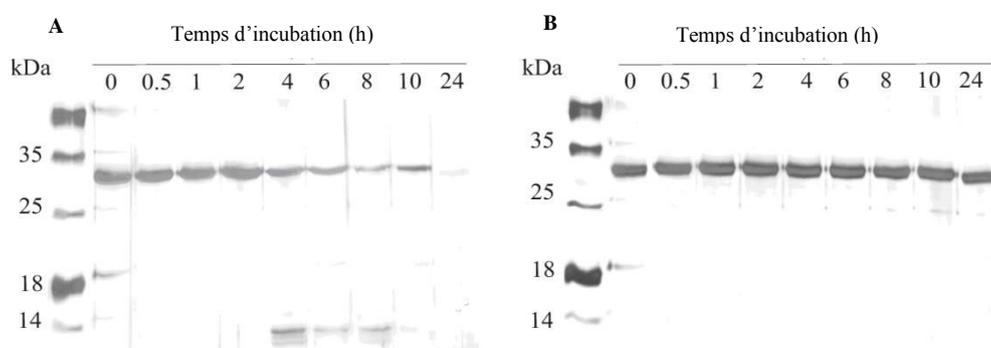


Figure 22 : Analyse SDS-PAGE 15 % présentant la stabilité de rDer p 3 (A) et de rDer p 3 S196A (B) après différents temps d'incubation à 37°C.

Ces observations ont pu être confirmées par la mesure de l'activité enzymatique des différentes protéines (**Figure 23**). Comme attendu, l'activité des zymogènes est nettement inférieure à celle des formes matures. En effet, au temps 0, l'activité de proDer p 3 est de 8 % par rapport à celle de Der p 3 (**Figure 23A**) et celle de proDer p 1 est de 4 % par rapport à Der p 1 (**Figure 23B**). Les zymogènes proDer p 1 et proDer p 3

Résultats

conservent une activité constante durant l'incubation à 37 °C et Der p 1 ne montre qu'une baisse légère d'activité, par contre Der p 3 a perdu 80 % d'activité après 24 heures (**Figure 23A**). Ceci est probablement dû à sa dégradation par son activité protéolytique.

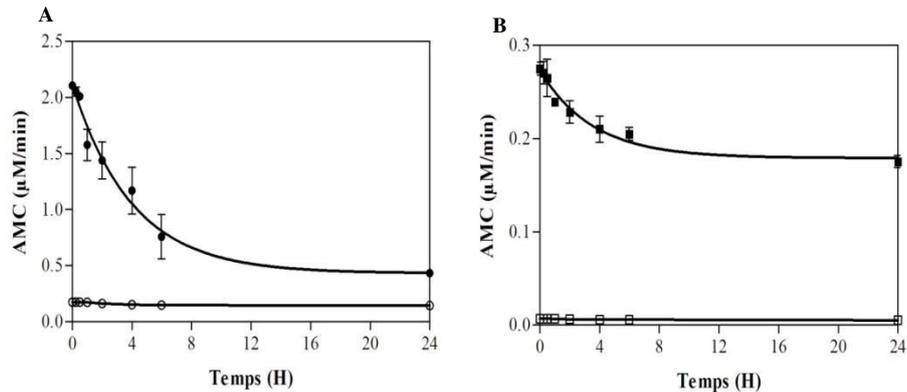


Figure 23: Mesure de l'activité enzymatique (A) de rDer p 3 (●) et proDer p3 (○) et (B) de rDer p 1 (■) et proDer p 1 (□), après différents temps d'incubation à 37°C.

2. Etude de l'autolyse de Der p 3 durant un test ELISA

Durant cette partie, nous avons étudié l'autolyse de l'allergène Der p 3 et Der p 1 durant un test ELISA. Nous voulons aussi savoir si cette auto-dégradation pouvait affecter les épitopes B et par conséquent le taux de reconnaissance des IgE provenant de patients allergiques. Pour cela, différentes quantités des formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 3 et Der p 1 (100, 200, 300, 400 et 500 ng) ont été immobilisées sur microplaque. Ces derniers ont ensuite été incubés avec un anticorps de lapin anti-proDer p 3 et de souris anti-proDer p 1 pour l'allergène Der p 3 et Der p 1 respectivement et enfin avec un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à la phosphatase alcaline. La révélation a été réalisée en mesurant l'hydrolyse du para-nitrophényl phosphate à 405 nm. Les taux de fixation de proDer p 3, proDer p 3 S196A, rDer p 3 S196A et rDer p 3 préalablement incubé avec l'inhibiteur de la trypsine APMSF sont similaires, ceux de rDer p 3 et nDer p 3 sont 4 fois inférieurs (**Figure 24A**). Cette différence est plus marquée pour les hautes concentrations en allergène, confirmant la sensibilité de la protéase Der p 3 à l'autolyse durant le test ELISA. Par contre, pour les différentes formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 1, les taux de fixation mesurés sont similaires confirmant la stabilité de l'allergène Der p 1 (**Figure 24B**).

Résultats

Sur base de ces résultats, il est semblait intéressant de savoir si l'autolyse de la forme active de l'allergène Der p 3 sous-estime le taux de reconnaissance des IgE provenant de patients allergiques.

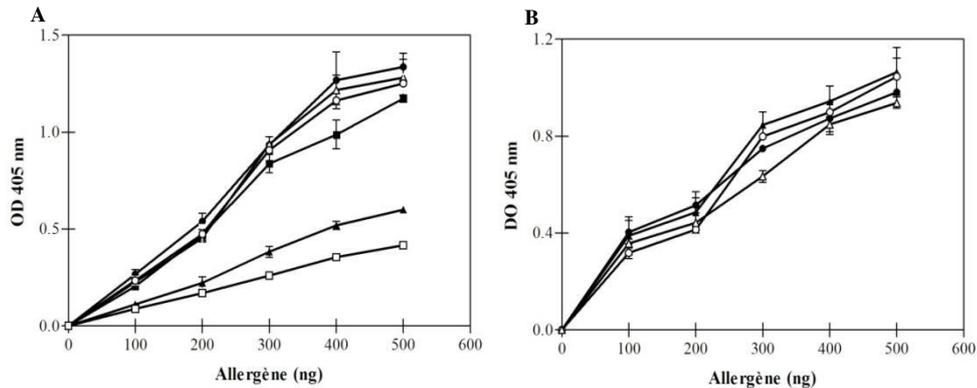


Figure 24: Comparaison du taux de fixation des différentes formes (A) rDer p 3 (▲), nDer p 3 (□), rDer p 3 S196A (■), rDer p 3+ APMSF (⊙) proDer p 3 (△) proDer p 3 S196A (●) et (B) proDer p 1 (●), proDer p 1 C34A (⊙), rDer p 1 (▲), rDer p 1 C34A (△) par test ELISA.

3. Effet de l'autolyse de Der p 3 sur la reconnaissance par les IgE de patients allergiques

La comparaison du taux de fixation des IgE avec les différentes formes de l'allergène Der p 3 (rDer p 3, nDer p 3 et rDer p 3 S196A) montre que le taux mesuré avec la forme inactive est 2 fois supérieur par rapport aux deux formes actives (**Figure 25**), ce qui est probablement dû à sa résistance à la dégradation durant le test ELISA. Donc on peut conclure que l'autolyse de Der p 3 durant ce test de diagnostic affecte ces épitopes B conformationnels.

La comparaison du taux de fixation des IgE de l'allergène Der p 3 avec l'allergène majeur Der p 1 montre également que ce taux n'est que de deux fois inférieur lorsque on utilise la forme rDer p 3 S196A pour le diagnostic (**Figure 25**). Sur base de ces résultats, il est vraisemblable que le taux de reconnaissance de Der p 3 par les IgE provenant des sera de patients allergiques mesuré jusqu'à alors au moyen de Der p 3 naturel très sensible à la dégradation ait été sous-estimé. Dès lors, Der p 3 S196A serait le meilleur outil de diagnostic de l'allergie.

Résultats

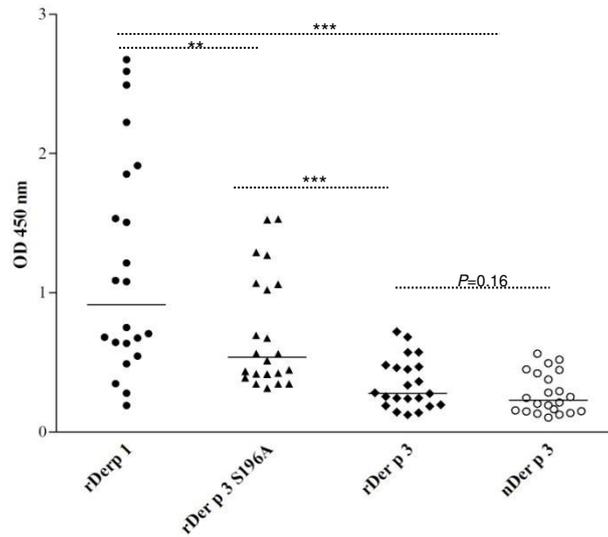


Figure 25 : Comparaison du taux de reconnaissance de rDer p 3, rDer p 3 S196A, nDer p 3 et rDer p 1 par les IgE provenant des sera (dilution 1:5) de patients allergiques (n=22). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

Résultats

Etude 3: Etude du propeptide de proDer p 3

1. Etude structurale de la forme zymogène et mature de l'allergène Der p 3

Les spectres de fluorescence intrinsèque et de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain ont été mesurés pour les deux formes zymogènes (proDer p 3 et proDer p 3 S196A) et les deux formes matures (rDer p 3 et rDer p 3 S196A), afin de savoir s'il y a des différences au niveau de structures secondaires et /ou tertiaires pour ces différentes protéines. L'intensité de fluorescence a été reportée en fonction de la longueur d'onde, de même que l'ellipticité pour les différentes protéines.

La figure 26 A montre que les spectres de dichroïsme circulaire présentent un minimum à 208 nm caractéristique de protéines riches en hélices α . L'allure similaire obtenue pour les différentes formes zymogènes et matures signifie que ni le propeptide ni la mutation au niveau du site actif n'affecte la structure secondaire de l'allergène Der p 3. Les spectres de fluorescence intrinsèque (Figure 26 B) indiquent que le maximum de fluorescence est respectivement de 335 nm et 350 nm pour les deux formes zymogènes et matures. Cependant, ce shift observé montre que les structures tertiaires des formes matures et zymogènes sont différentes puisqu'il y a des résidus aromatiques qui sont devenus plus accessibles dans les deux formes matures. Sur base de ces résultats, nous pouvons conclure qu'il y a un changement conformationnel de l'allergène Der p 3 qui a été induit au moment de son activation.

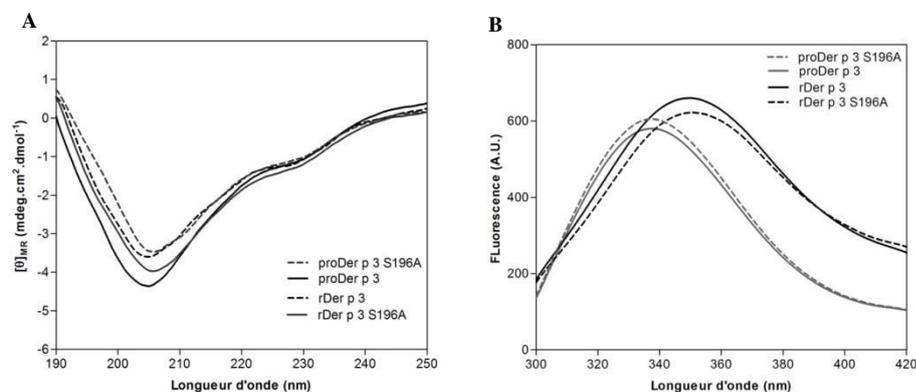


Figure 26 : Spectres de dichroïsme circulaire (A) et de fluorescence intrinsèque (B) des formes zymogènes (proDer p 3, proDer p 3 S196A) et matures (rDer p 3, rDer p 3 S196A).

Résultats

2. Etude *in vitro* de l'effet du propeptide sur l'allergénicité de Der p 3

2.1. Dosage des IgE spécifiques par test ELISA

Afin de mettre en évidence l'effet du propeptide de Der p 3 sur son allergénicité, des tests ELISA indirect, sandwich et d'inhibition compétitive ont été réalisés au moyen de rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et proDer p 3 S196A.

En ELISA indirect, aucun effet du propeptide sur la fixation des IgE n'a pu être mis en évidence. En effet, les deux formes zymogènes proDer p 3 et proDer p 3 S196A présentent un taux de fixation sur IgE de patients allergiques équivalent et similaire à celui de la forme stable rDer p 3 S196A (**Figure 27**).

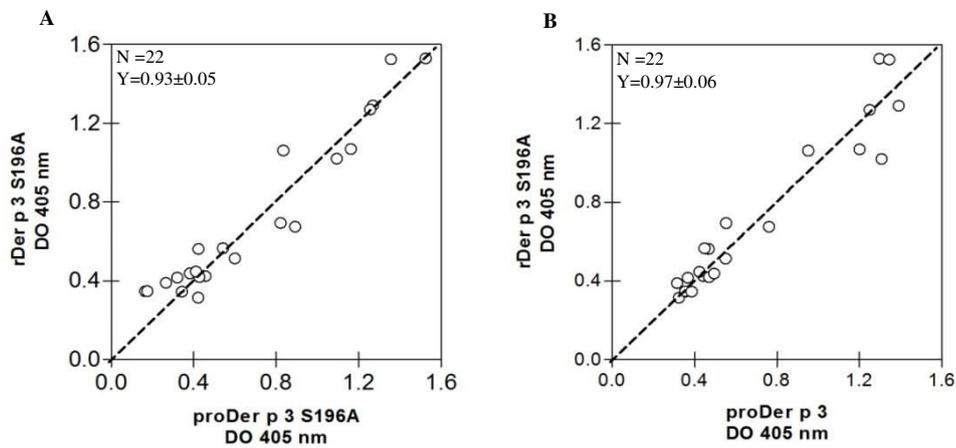


Figure 27: Comparaison du taux de fixation des IgE sur (A) proDer p 3 S196A et rDer p 3 S196A (B) proDer p 3 et rDer p 3 S196A en ELISA indirect.

Par contre, en ELISA sandwich au cours duquel l'allergène se trouve en solution, la reconnaissance de la forme zymogène par les IgE est inférieure à celle de la forme mature (**Figure 28**). Une hypothèse serait que, libre en solution, le propeptide de proDer p 3 participe au masquage d'épitope B de Der p 3 (que ce soit par interaction directe ou par induction de changement dans la conformation de l'allergène).

Résultats

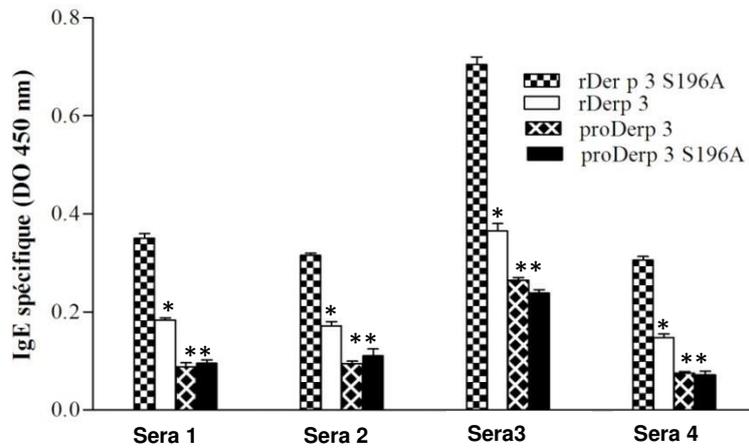


Figure 28: Comparaison du taux de reconnaissance de rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et proDer p 3 S196A par les IgE provenant des sera (dilution 1:5) de patients allergiques (n=4) en ELISA sandwich. * $P < 0.05$ comparaison entre rDer p 3 et rDer p 3 S196A, ** $P < 0.01$ comparaison entre rDer p 3 S196A et proDer p 3/proDer p 3 S196A.

2.2. Test de compétition de proDer p 3 et Der p 3 S196A en capture d'IgE

Par test d'inhibition compétitive, nous avons également montré que la forme zymogène de l'allergène Der p 3 est moins bien reconnue par les IgE de patients allergiques que la forme mature rDer p 3 S196A (**Figure 29**). En effet, six sera provenant de patients allergiques ont été incubés préalablement avec différentes concentrations (0-50 $\mu\text{g/mL}$) en proDer p 3 ou rDer p 3 S196A durant 12 heures à 4°C. Ensuite, ces sera ont été incubés sur microplaque sur laquelle rDer p 3 S196A a été immobilisé préalablement. La figure 29A montre que le taux d'inhibition de proDer p 3 est inférieur à celui de rDer p 3 S196A. À la concentration la plus inhibitrice soit 50 $\mu\text{g/mL}$, le pouvoir inhibiteur de rDer p 3 S196A et proDer p 3 pour la forme inactive ont été comparés pour 20 sera de patients allergiques (**Figure 29B**). Ces résultats, montrent bien que le propeptide jouerait un rôle dans la reconnaissance de l'allergène par les IgE de patients allergiques.

Résultats

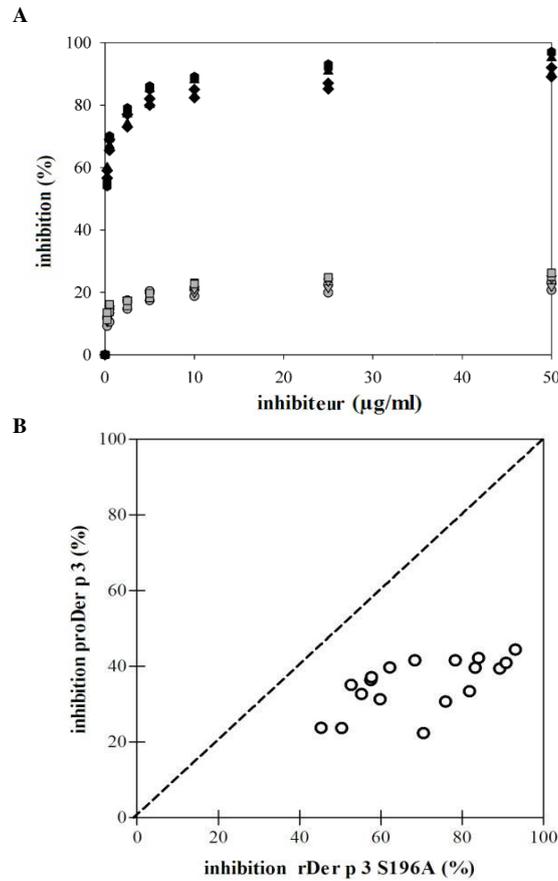


Figure 29: (A) Comparaison des taux d'inhibition de rDer p 3 S196A (symbole en noir), et proDer p 3 (symbole en gris) pour rDer p 3 S196A à différentes concentrations (0-50 µg/mL) préalablement incubés avec 6 sera de patients allergiques. (B) Comparaison des taux d'inhibition de proDer p 3 et rDer p 3 S196A pour rDer p 3 S196A à une concentration de 50 µg/mL sur 20 sera de patients allergiques.

2.3. Effet du propeptide du zymogène proDer p 3 sur la dégranulation des RBL X-38

Les basophiles sont largement utilisés afin de mettre en évidence la capacité des allergènes à se fixer sur les IgE provenant des sera de patients allergiques immobilisés sur leur récepteur de haute affinité FcεRI présent à la surface de ces cellules. Afin de comparer le pouvoir allergénique des différentes formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 3 sur la dégranulation des basophiles, la lignée RBL-SX-38 (Rat basophil leukemia cell subline) exprimant le FcεRI humain a été préalablement incubée avec 5 sera de patients allergiques. La dégranulation a été induite par incubation de cette lignée avec les allergènes rDer p1, nDer p 3, rDer p 3, rDer p3 S196A, proDer p 3 et

Résultats

proDer p 3 S196A. Un contrôle négatif (sans allergène) a été réalisé pour mesurer la dégranulation spontanée des basophiles. L'activité de la β -hexosaminidase relarguée a été mesurée en suivant l'hydrolyse du p-nitrophényl-N-acetyl- β -D-glucosaminide à 405 nm. **La figure 30** montre que le taux du β -hexosaminidase qui est relargué par les RBL stimulés avec proDer p 3 ou proDer p 3 S196A est significativement plus faible que celui mesuré lors d'une stimulation avec les formes matures de l'allergène Der p 3 (nDer p 3, rDer p 3, rDer p 3 S196A) pour tous les patients. Ce résultat confirme que les formes zymogènes sont nettement moins bien reconnues par les IgE de patients allergiques (**Figure 30**).

De plus, avec ce test cellulaire nous avons montré qu'il n'y a pas de différence significative entre le pouvoir allergénique de nDer p 3, rDer p 3 avec rDer p 3 S196A. Ces résultats confirment ce que nous avons constaté lors de dosage des IgE spécifiques à savoir que la différence entre le taux de fixation des IgE sur nDer p 3, rDer p 3 et rDer p 3 S196A est dû uniquement à l'autolyse de Der p 3. En effet, pendant ce test, Der p 3 n'est pas sujette à l'autolyse vu que l'étape d'activation ne dure que 15 min à 37°C. De plus, lorsque Der p 3 n'est pas sujette à l'autolyse, nous avons constaté que son pouvoir allergénique est comparable à celui de l'allergène majeur Der p 1 (**Figure 30**).

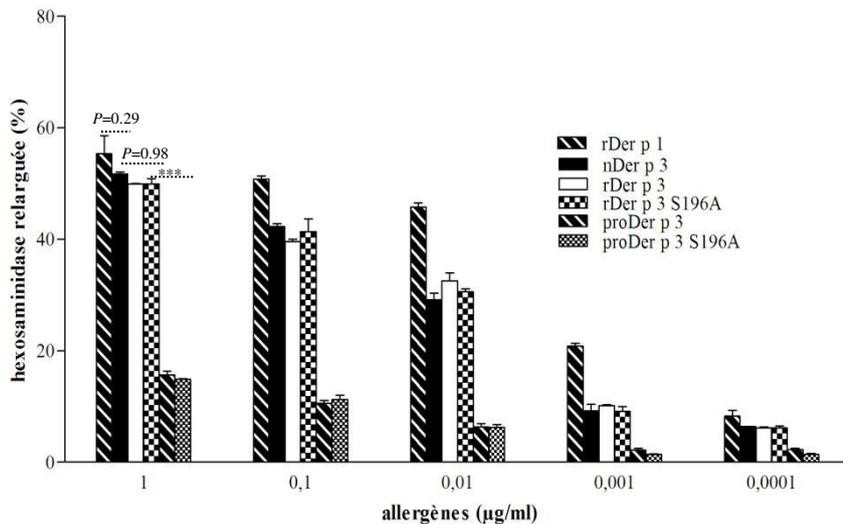


Figure 30 : Taux du β hexosaminidase moyen relargué par des basophiles de rat (lignée RBL-SX-38) préalablement incubés avec 5 sera de patients allergiques et mis en présence de rDer p 1, nDer p 3, rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et proDer p 3 S196A. * $P < 0.001$ comparaison entre les formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 3.**

Résultats

2.4. Effet du propeptide du zymogène proDer p 3 sur l'activation des basophiles humains

Afin de comparer le pouvoir allergénique des formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 3 chez l'homme, des tests de dégranulation des basophiles humains provenant de 8 échantillons de sang de patients allergiques aux acariens ont été réalisés en utilisant « l'Allergenicity Kit ». Ce test permet de détecter la surexpression du récepteur membranaire CD203c à l'aide d'un anticorps CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC, suite au pontage du récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) à l'aide des différentes formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 3 à des concentrations allant de 0.0001 à 10 µg/mL. Durant ce test nous avons également utilisé l'allergène Der p 1 comme référence. La surexpression du récepteur CD203c suite à une stimulation avec les deux formes zymogènes proDer p 3 et proDer p 3 S196A est très faible pour les différentes concentrations et aux alentours du contrôle négatif pour tous les patients testés. Par contre le taux d'expression est significativement plus important suite à une stimulation avec les formes matures (nDer p 3, rDer p 3 et rDer p 3 S196A) et similaire au contrôle positif (anti-IgE) (**Figure 31**). Ces résultats confirment à nouveau que les formes zymogènes de l'allergène Der p 3 sont nettement moins bien reconnues par les IgE de patients allergiques par rapport aux formes matures. Avec ce test, nous avons également montré pour la majorité des patients allergiques testés, la surexpression de ce récepteur est similaire suite à une stimulation avec Der p 3 ou Der p 1. Ces résultats confirment une fois de plus que lorsque l'allergène Der p 3 n'est pas sujet à l'autolyse, son pouvoir allergénique est comparable à celui de l'allergène majeur Der p 1 (**Figure 31**).

Résultats

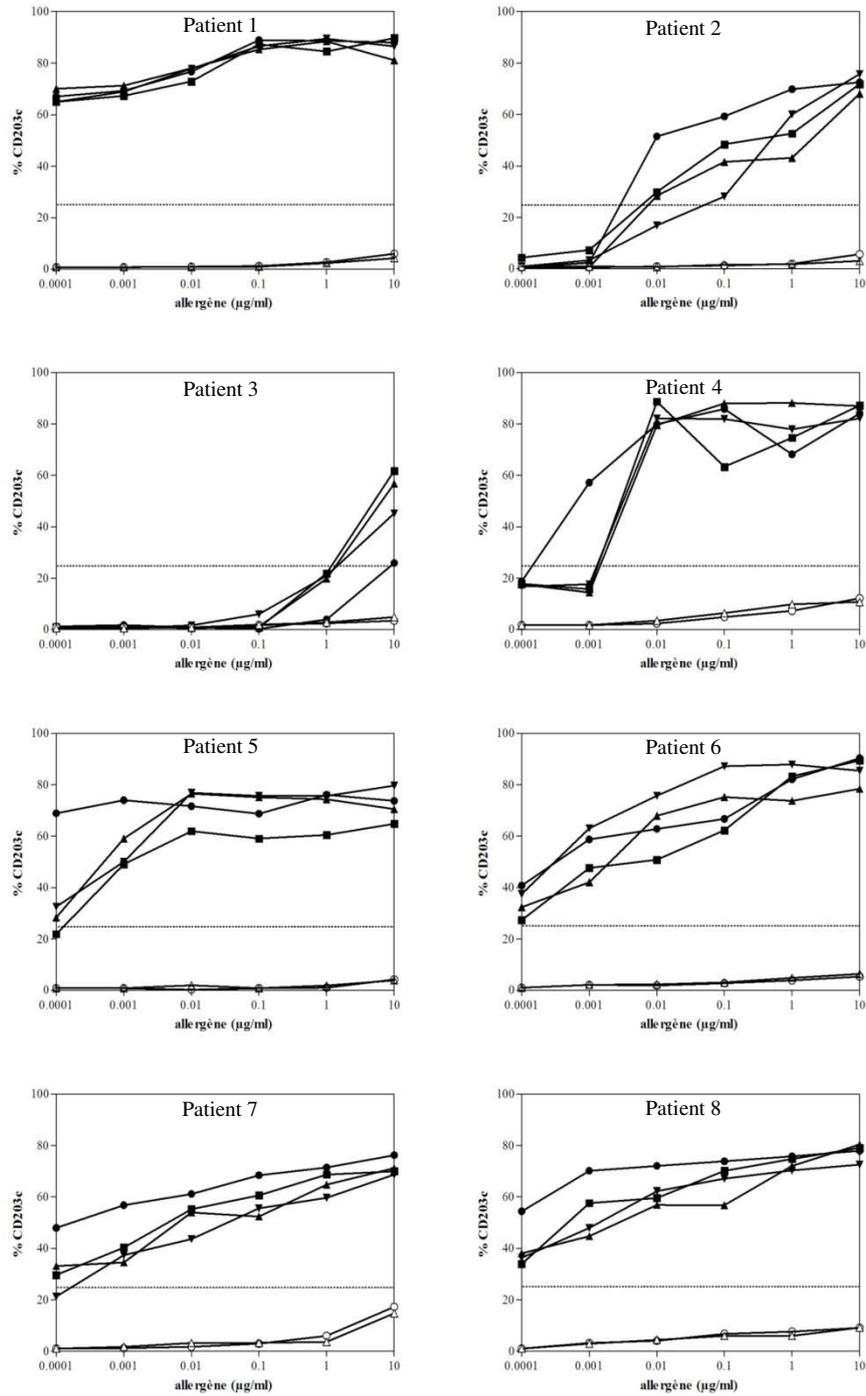


Figure 31 : Le taux de surexpression du récepteur CD203c après activation avec nDer p 3 (■), rDerp3 (♥), rDer p 3 S196A (▲), proDer p 3 (○), proDer p 3 S196A (△) et rDer p 1 (●).

Résultats

3. Etude *in vivo* de l'effet du propeptide sur l'allergénicité de Der p 3

La capacité de déclenchement de la réaction allergique a été évaluée *in vivo* sur un modèle de souris Balb/c. Le but de cette étude est de comparer dans un premier temps le pouvoir allergénique des formes matures et zymogènes de l'allergène Der p 3 et dans un deuxième temps celui de l'allergène Der p 3 avec Der p 1.

3.1. Dosages des IgE, IgG₁ et IgG_{2a} spécifiques

L'évaluation du taux de production des IgE, IgG₁ et IgG_{2a} a été évalué à différents moments de la sensibilisation suite à des différents prélèvements sanguins effectué au J₁ (saignée 1), J₂₈ (saignée 2), J₄₂ (saignée 3) et J₄₇ (saignée 4). Le dosage de ces anticorps spécifiques permet de confirmer la sensibilisation des souris et également d'identifier le type de la réponse T_H1 ou T_H2 induite par l'allergène. En effet, la production de ces différents types d'anticorps spécifiques de l'allergène Der p 3 et Der p 1 a été évaluée par ELISA sandwich sur des plaques revêtues par rDer p 3 S196A et rDer p 1 C34A respectivement.

La figure 32 montre que les souris sensibilisées avec la forme zymogène proDer p 3 présente une nette baisse de la production d'IgE spécifique anti-Der p 3 S196A par rapport au groupe de souris sensibilisées avec les deux formes matures rDer p 3 et rDer p 3 S196A. Ces résultats confirment une nouvelle fois que la forme zymogène est moins allergénique que la forme mature. Des IgE spécifiques de rDer p 3 S196A ont été induites de façon équivalente chez les souris sensibilisées avec rDer p 3 et rDer p 3 S196A. Enfin, la comparaison du taux de production des IgE spécifiques anti-Der p 3 S196A et anti-Der p 1 C34A chez les souris sensibilisées avec rDer p 3 et rDer p 1 respectivement montre que Der p 3 présente le même pouvoir allergénique que l'allergène majeur Der p 1.

Résultats

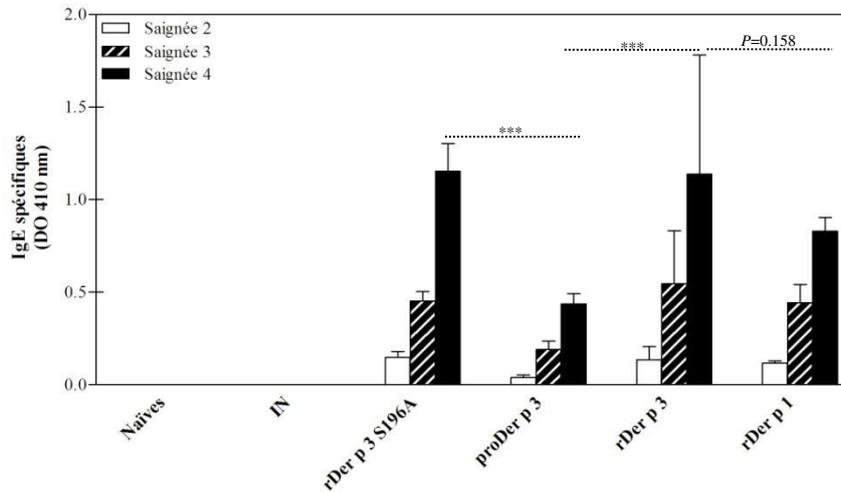


Figure 32: Comparaison du taux moyen d'IgE spécifiques mesuré dans les sera de souris au 28, 42, 47^{ème} jour de leur sensibilisation par rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 ou rDer p 1. IN : souris ont uniquement reçu des injections intra-nasales d'extraits d'acariens. Naïve : souris non sensibilisées et non soumises à l'injection intra-nasale.

Des IgG₁ Der p 3 S196A spécifiques ont également été fortement et faiblement induites chez les souris sensibilisées respectivement avec les deux formes matures (rDer p 3, rDer p 3 S196A) et la forme zymogène proDer p 3 (**Figure 33A**). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le taux des IgG₁ spécifiques de Der p 3 S196A et de Der p 1 C34A induites chez les souris sensibilisées avec rDer p 3 et rDer p 1. Sur base de ces résultats, nous pouvons conclure que rDer p 3 et rDer p 3 S196A comme rDer p 1 induisent une réponse immune de type T_{H2} et que la forme zymogène proDer p 3 est moins allergénique que les deux formes matures.

Des IgG_{2a} spécifiques de rDer p 3 S196A ont été également détectés. Cependant, leur production est uniquement induite chez les souris sensibilisées avec proDer p 3 malgré que la sensibilisation a été réalisée avec l'Alum (adjuvant de type T_{H2}) (**Figure 33B**). Cette production des IgG_{2a} reflète la réorientation de la réponse immune vers un profil T_{H1}.

Résultats

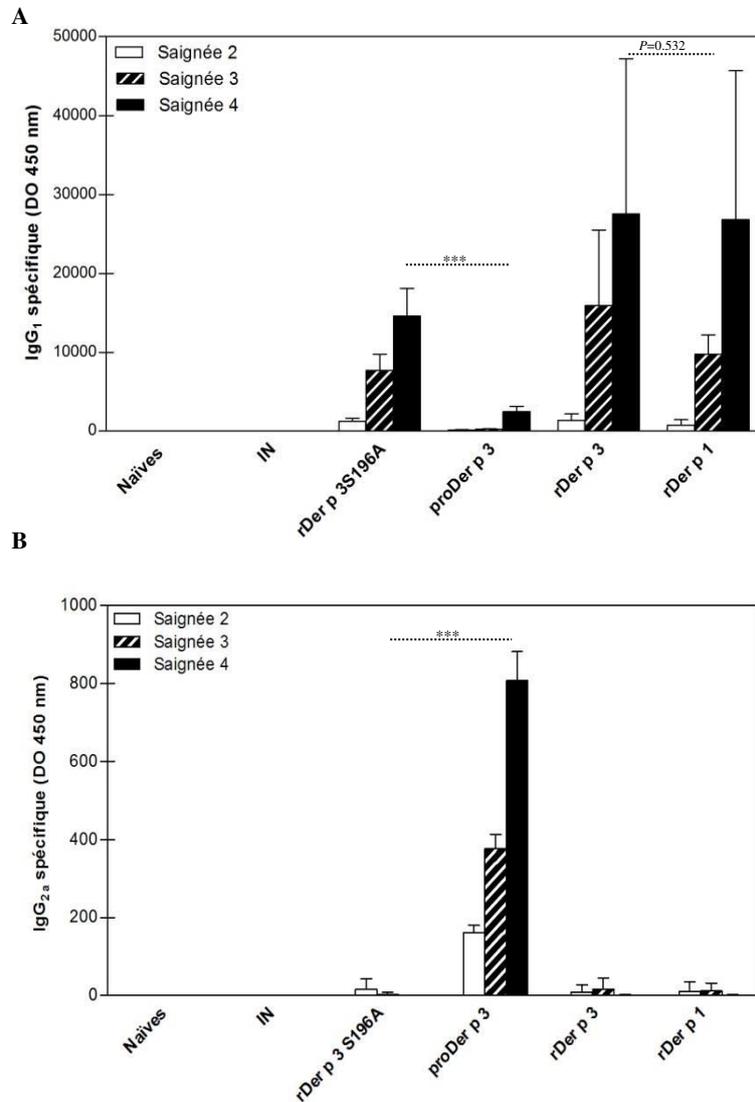


Figure 33: Comparaison du taux moyen d'IgG₁ spécifiques (A) et IgG_{2a} spécifiques (B) mesuré dans les sera de souris au 28, 42, 47^{ème} jour de leur sensibilisation par rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 ou rDer p 1 et les souris non sensibilisées (Naïves) ou ont reçu uniquement des injections intra-nasales d'extraits d'acariens (IN).

3.2. Prolifération des splénocytes

Au 47^{ème} jour, les splénocytes isolés à partir des rates ont été stimulés par rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et rDer p 1. La prolifération des splénocytes a été exprimée en stimulus index. Dans un premier temps, nous avons pu montrer que les

Résultats

splénocytes des souris sensibilisées avec les différentes formes de l'allergène Der p 3 sont incapables de proliférer lorsqu'ils sont stimulés avec l'allergène Der p 1 et vice versa (**Figure 34**). Nous avons également montré que les souris sensibilisées avec la forme zymogène proDer p 3 sont capables de proliférer après leur stimulation avec les deux formes matures rDer p 3 et rDer p 3 S196A et vice versa (**Figure 34**). En plus, il n'y a pas de différence significative observée au niveau du taux de prolifération des splénocytes des souris sensibilisées avec les différentes formes de l'allergènes Der p 3 et stimulés par rDer p 3, rDer p 3 S196A et proDer p 3 pour les différentes concentrations testées (1.25; 5; 20 $\mu\text{g/mL}$). Ces résultats indiquent que les épitopes T de l'allergène Der p 3 sont conservés chez la forme zymogène.

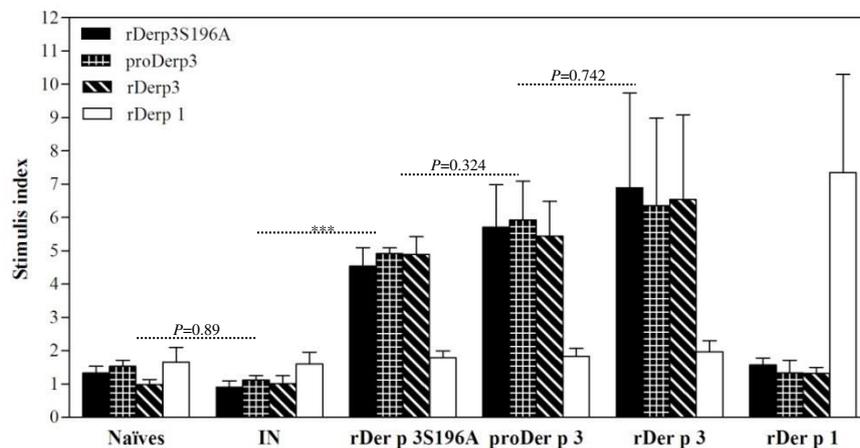


Figure 34: Profils de prolifération des splénocytes isolés de 5 souris sensibilisées avec rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3, rDer p 1 ou non sensibilisées (Naïves) ont uniquement reçu des injections intra-nasales d'extraits d'acariens (IN). La prolifération des splénocytes a été stimulée par différents allergènes (rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3, rDer p 1).

3.3. Dosages des cytokines T_H1/T_H2

Le type de la réponse immunitaire induite par rDer p 3, rDer p 3S196A, proDer p 3 et rDer p 1 chez les différents groupes de souris a été également évalué en mesurant la réponse cellulaire spécifique par dosage des cytokines produites par les splénocytes des groupes de souris sensibilisées par les différentes formes de l'allergène Der p 3 et Der p 1 et restimulées par proDer p 3 ou Der p 1. Ce dosage de cytokines de type T_H1 et T_H2 nous indique vers quel profil la réponse immunitaire induite par l'allergène a été orientée (T_H1 ou T_H2).

Résultats

La figure 35 montre que la re-stimulation des splénocytes des souris sensibilisées avec les deux formes matures de l'allergène Der p 3 induit une forte sécrétion de l'IL-5 (cytokine de type T_H2) et une absence de production de l'IFN γ (cytokine de type T_H1). A l'opposé la re-stimulation des splénocytes des souris sensibilisées avec la forme zymogène proDer p 3 induit une très faible production de l'IL-5 et une forte production de l'IFN γ . Ces résultats confirment que la forme zymogène proDer p 3 oriente la réponse immune vers un profil T_H1, par contre les deux formes matures de l'allergène Der p 3 comme Der p 1 induisent une réponse de type T_H2. De plus, aucune différence significative n'est observée au niveau du taux de sécrétion des cytokines de type T_H2 par les splénocytes réactivés des souris sensibilisées avec rDer p 3 ou rDer p 1, confirmant que Der p 3 présente un pouvoir allergénique similaire à celui de Der p 1.

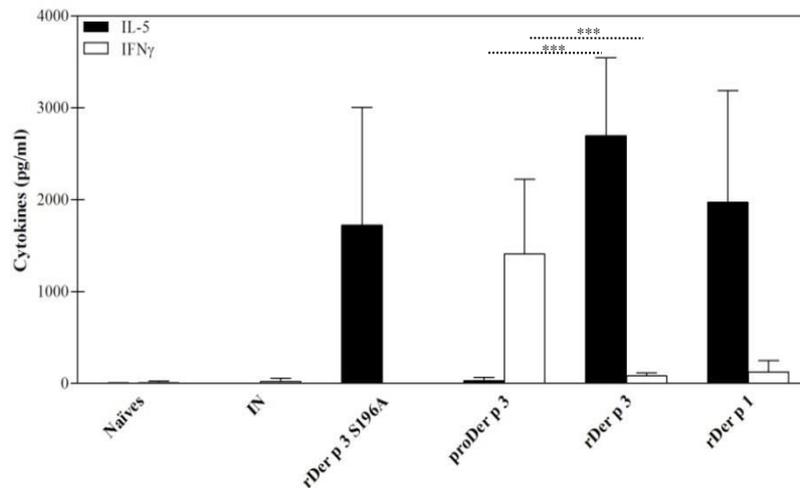


Figure 35: Dosage des cytokines T_H1/T_H2 dans les surnageants des splénocytes réactivés des souris sensibilisées par rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et rDer p 1 ou non sensibilisées (Naïves) ou ont reçu uniquement des injections intra-nasales d'extraits d'acariens (IN).

3.4. Analyse des marqueurs de la réaction allergique

• Mesure de l'influx d'éosinophiles

Nous avons analysé l'infiltration d'éosinophiles dans le LBA collectées 24 heures après la dernière injection intra-nasale d'extraits d'acariens. Cette infiltration caractérise la réaction allergique.

Une infiltration d'éosinophiles significative est observé chez les souris sensibilisées avec rDer p 3 et rDer p 3 S196A tandis qu'aucune infiltration d'éosinophiles n'est détectée chez les souris sensibilisées avec proDer p 3, confirmant

Résultats

que la forme zymogène proDer p 3 est moins allergénique que les deux formes mature rDer p 3 et rDer p 3 S196A (**Figure 36**). L'infiltration d'éosinophiles des souris sensibilisées avec rDer p 3 est plus importante que celui observé chez les souris sensibilisées avec la forme mature inactive. Cette différence pourrait être due à l'activité enzymatique de l'allergène Der p 3. Nous avons également montré que l'infiltration d'éosinophiles des souris sensibilisées avec rDer p 3 est comparable à celui détecté dans les LBA des souris sensibilisées avec rDer p 1 confirmant une fois de plus que Der p 3 présente un pouvoir allergénique équivalent à celui de Der p 1 (**Figure 36**).

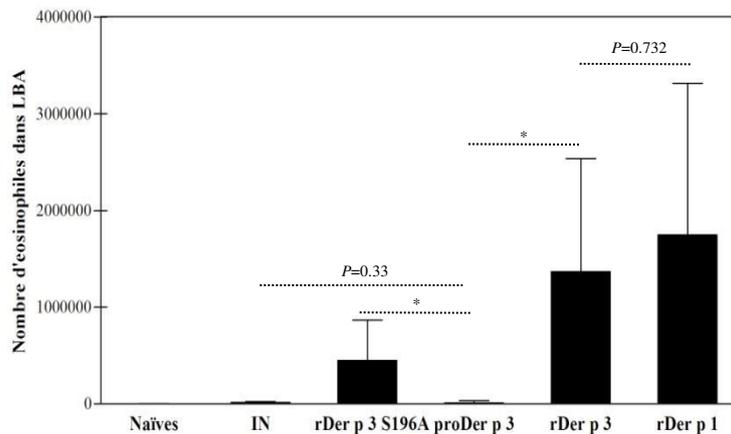


Figure 36: Nombre d'éosinophiles dans les LBA des souris sensibilisées avec rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et rDer p 1 ou non sensibilisées (Naïves) ou ont reçu uniquement des injections intra-nasales d'extraits d'acariens (IN).

- **Mesure de la réactivité bronchique**

L'inflammation pulmonaire a été également analysée par mesure de la réactivité bronchique en inhalant aux différents groupes de souris des concentrations progressivement croissantes de l'agent broncho-constricteur la méthacholine (0-50 mg/mL). Ce test nous a permis d'évaluer le degré de l'obstruction bronchique suite à la provocation intranasale par les extraits d'acariens et ceci en mesurant le paramètre « PenHAvg ». Il correspond à la variation de la pression au sein de l'enceinte dépendant de la variation du volume inspiré et expiré par les souris. Pour les concentrations en méthacholine inférieures à 10 mg/mL aucune hyperréactivité bronchique significative n'a été observée pour les différents groupes de souris sensibilisées avec rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et rDer p 1 par rapport aux groupes de souris naïves ce qui traduit que les bronches ont réagi facilement à la méthacholine. Pour les concentrations

Résultats

supérieures à 10 mg/mL seuls les deux groupes de souris sensibilisés avec l'allergène rDer p 3 active et rDer p 1 ont développé une hyperréactivité bronchique significative qui est due à la sensibilité et l'inflammation de leurs voies respiratoires. Par contre, aucune hyperréactivité bronchique significative n'a pu être observée chez les souris sensibilisées avec la forme rDer p 3 S196A et proDer p 3 par rapport au groupe naïve même pour la concentration 50 mg/mL (**Figure 37**). L'absence d'hyperréactivité bronchique chez le groupe de souris sensibilisé avec rDer p 3S196A s'explique par l'absence de l'activité trypsine de l'allergène Der p 3. En effet, cette activité protéolytique semble promouvoir l'obstruction bronchique et l'inflammation pulmonaire par la protéolyse des récepteurs PAR-2 qui se trouvent à la surface des cellules épithéliales bronchiques. Ces résultats confirment une fois encore que la forme zymogène est moins allergénique que la forme Der p 3 et que l'allergène Der p 3 présente le même pouvoir allergénique que l'allergène majeur Der p 1.

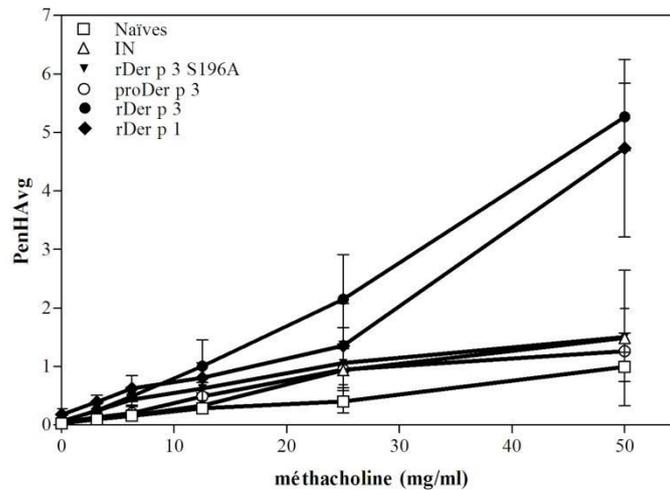


Figure 37: Comparaison de l'hyperréactivité bronchique chez les souris sensibilisées avec rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3, rDer p 1 et non sensibilisées après provocation par les extraits d'acariens.

Résultats

Etude 4: Détermination des épitopes B linéaires et Prédiction des épitopes B conformationnels de l'allergène Der p 3

1. Identification des épitopes B linéaires de l'allergène Der p 3

Pour identifier le ou les épitopes B linéaires de l'allergène Der p 3, 56 peptides chevauchants qui couvrent la totalité de la séquence de Der p 3 ont été synthétisés. Par test ELISA, nous avons comparé le taux de fixation des IgE provenant de 10 patients allergiques et non allergiques à Der p 3 sur les 56 peptides. Dans ce test, le seuil de positivité a été fixé pour chaque peptide à sa moyenne pour les 10 témoins négatifs additionnés de 3 fois l'écart type. **La figure 38** montre que les peptides 12 et 13 sont reconnus par plus de 70 % des sera de patients allergiques à Der p 3 (**Figure 38**). Sur base de ces résultats, nous avons pu conclure que la séquence en acides aminés Gln⁴⁵-Gly⁶³ pourrait être considérée comme un épitope linéaire pour l'allergène Der p 3.

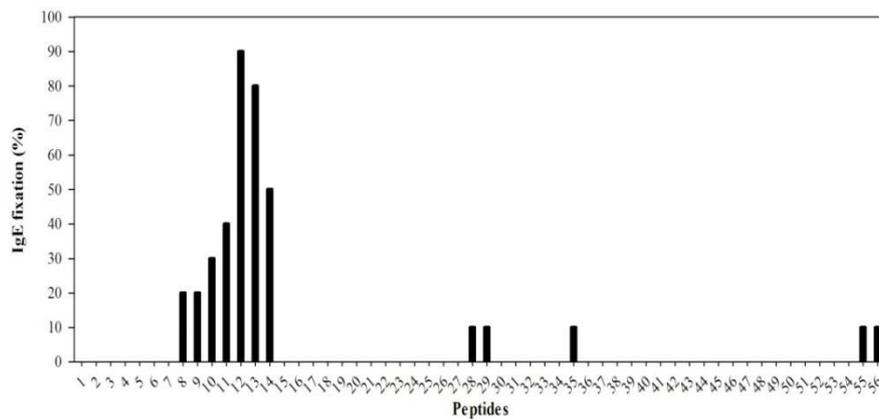


Figure 38 : Comparaison du taux de fixation des IgE provenant de 10 patients allergiques à Der p 3 sur les 56 peptides qui couvrent la totalité de la séquence de Der p 3.

Pour confirmer ces résultats et caractériser d'une manière plus fine les acides aminés immunodominants qui sont impliqués dans la fixation et la reconnaissance des IgE, une « alanine scanning » a été effectuée sur la séquence couvrant les peptides 12 et 13. Pour cela, 20 peptides biotinylés ont été synthétisés et au moyen de test ELISA à l'aide d'un pool de sera de patients allergiques à Der p 3 nous avons comparé le taux de fixation des IgE sur ces différents peptides. **La figure 39** montre que les résidus Tyr⁵⁴, Asn⁵⁵, Ser⁵⁶ et leu⁵⁷ sont impliqués dans la reconnaissance des IgE vu que leurs

Résultats

mutations par une alanine diminuent de manière significative la fixation des IgE (**Figure 39**).

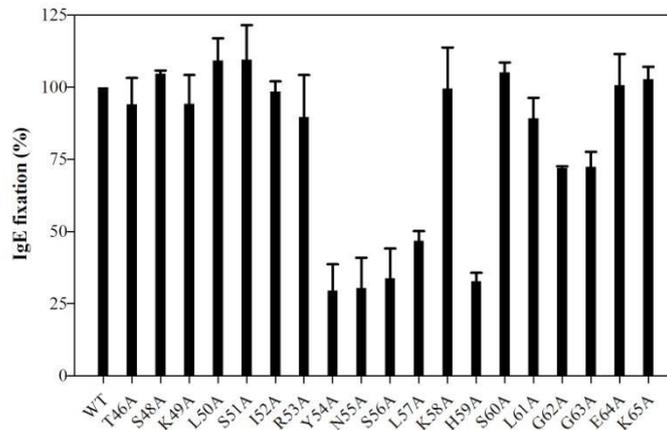


Figure 39 : Alanine scan de la séquence qui couvre les peptides 12 et 13. L'absorbance à 450 nm mesurée par ELISA a été convertie en pourcentage par rapport au signal obtenu avec le peptide wild-type (WT).

2. Construction des modèles tridimensionnels pour l'allergène Der p 3

La structure de Der p 3 n'a pas été résolue par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire. Une approche bioinformatique par modélisation comparative a été envisagée pour construire un modèle tridimensionnel pour cet allergène.

La modélisation par homologie comprend 4 étapes : la première c'est la recherche dans les banques de données les protéines qui sont similaires à la protéine cible dont leurs structures tridimensionnelles ont été résolues par approche expérimentale, la deuxième c'est l'alignement entre les séquences de la protéine à modéliser avec les protéines qui ont été sélectionnées puis la construction du modèle tridimensionnel et enfin l'évaluation de la qualité globale du modèle construit.

Avec le serveur BLAST nous avons pu identifier 125 protéines dont la structure tridimensionnelle a été résolue par RMN ou par rayon X et qui présentent un pourcentage d'identité d'environ 40 % avec Der p 3. Parmi ces protéines, deux templates ont été sélectionnés : la trypsine de *Fusarium Oxysporum* (code pdb 1XVO) et la trypsine porcine (code pdb 1QQU). Ces deux protéines n'ont pas été co-cristallisées avec

Résultats

un inhibiteur ou un ligand et ont également un taux d'identité avec Der p 3 respectivement de 41 % et 45 %.

L'étape cruciale de la modélisation par homologie consiste en l'alignement des séquences des protéines cibles avec la protéine à modéliser. Les résultats de l'alignement avec « Clustalw » montrent que les deux protéines 1XVO et 1 QQU ont de nombreux résidus qui sont conservés chez Der p 3 tout le long de leurs séquences (**Figure 40**).

Derp3	IVGGEKALAGECPYQISLQ-SSSHFCGGTILDEYWILTAACHCVAGQTASKLSIRYNSLKH	59
1QQU	IVGGYTCAANSIPYQVSLN-SGSHFCGGLINSQWVVSAAHCYKSRIQVRLGEHNIDVLE	59
1XVO	IVGGTSASAGDFPFIVSISRNGGPWCGGSLNANTVLTAAHCVSGYAQSGFQIRAGSLSR	60
	**** .. *.. *: :*:.. ... :*:*:::: :*:**** . : : : .	
Derp3	SLGGEK-ISVAKIFAHEKYDSYQIDNDIALIKLKSPMKLNQKNAKAVGLPAKGSQVVKVD	118
1QQU	--GNEQFINAAKIIITHPNFNGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR-VATVSLPR--SCAAAGT	114
1XVO	TSGGIT-SSLSSVRVHPSYSGN--NNDLAILKLTSTSIPISSGN-IGYARLAASGSDPVAGS	116
	. . :: .* :*:.. :*: :*:.. . . . * . * . *	
Derp3	QVRVSGWGYLEEGSYSLPSELRRVDIAVVSRRKECNELYSKANAQVTDNMIICGGDVANGGK	178
1QQU	ECLISGWGNTKSSGSSYPSLLQCLKAPVLSNSSCKSSYP--GQITGNMICVG-FLQGGK	170
1XVO	SATVAGWGATSEGGSSTPVNLKVTVPVSRATCRAQYG--TSAITNQMFCAQ-VSSGGK	173
	. :*:**** .. . * * * : :*:.* . * . :*:*:.* * . :*:****	
Derp3	DSCQGDSSGGPVVDVKNQVVGIVSWGYGCAKRGYPGVYTRVGNFIDWIESKRSQ-	232
1QQU	DSCQGDSSGGPVV--CNGQLQGIIVSWGYGCAQKNKPGVYTKVCNYVNIQQTIAAN	223
1XVO	DSCQGDSSGGPIVD-SSNTLIGAVSWGNGCARPNYSGVYASVGLALRSFIDTYA---	224
	*****:* .. : * **** **: . . **: * . :*:	

Figure 40: Alignement de Der p 3 avec 1QQU et 1XVO via Clustalw.

Le taux élevé d'identité entre les séquences d'acides aminés de Der p 3 et les deux templates 1XVO et 1QQU autorise une approche de modélisation moléculaire par homologie pour construire à partir de leurs coordonnées cristallographiques des modèles tridimensionnels pour l'allergène Der p 3. Le programme utilisé pour effectuer la modélisation est « Modeller ». Il emploie une approche automatisée pour prédire les structures des protéines à modéliser avec satisfaction des contraintes spatiales calculées sur la ou les structure « support » fournies dans l'alignement (longueur des liaisons, angle de valences,...).

La dernière étape, consiste en l'évaluation de la qualité des modèles générés. Parmi les 100 modèles construits, seulement 10 ont été retenus en se basant sur la minimisation d'énergie. Celle-ci a pour but de ramener la fonction énergétique globale à un minimum que l'on espère le plus proche de l'énergie de la structure native.

Les modèles qui ont été obtenus sont constitués de 13 feuillets β et de 3 hélices α connectées par des boucles. La validité de ces modèles a été testée en les superposant à leurs templates (1XVO et 1QQU). En effet, la superposition des carbones α des 232

Résultats

résidus a permis d'obtenir une déviation de l'écart quadratique moyen (rmsd) de 0.259 Å et de 0.164 Å entre les modèles de Der p 3 et leurs templates 1QQU et 1XVO, respectivement.

Les différents modèles de Der p 3 ont été correctement délimités, avec une légère variation essentiellement au niveau de l'orientation des boucles, la longueur des feuillettes β et des hélices α (**Figure 41**).

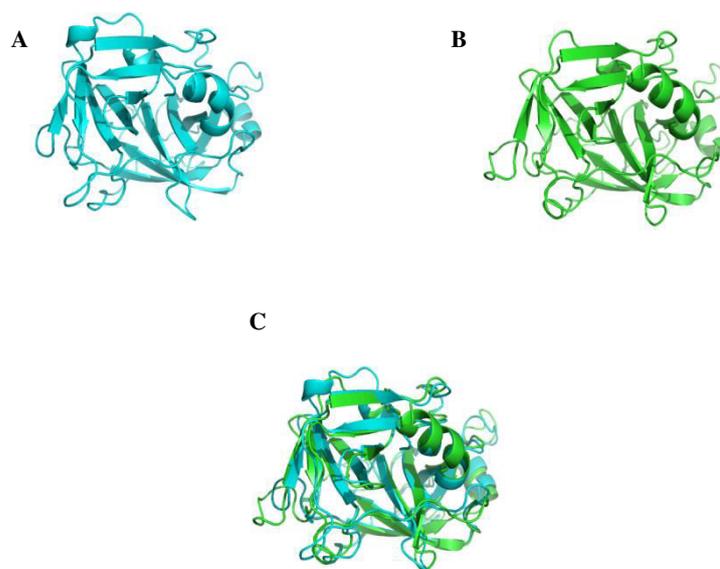


Figure 41: Représentation en cartoon des modèles de Der p 3. (A) Modèle issu du template 1XVO, (B) modèle issu du template 1QQU, (C) superposition entre les deux modèles de Der p 3.

3. Prédiction des épitopes B conformationnels

À ce jour, aucun épitope B linéaire ou conformationnel n'a été identifié pour les allergènes de groupe 3 chez les acariens. Cependant, des approches bioinformatiques capables de simuler les épitopes B conformationnels peuvent être appliquées pour prédire ces derniers. En effet, il existe plusieurs programmes pour la prédiction mais dans cette étude nous avons choisi que les deux algorithmes SEPPA et Discotope. D'après Xiao Lian *et al.* 2010, ces deux derniers sont les plus performants pour la prédiction des épitopes B conformationnels. Le principe de ces deux approches repose sur le calcul des surfaces accessibles au solvant pour chaque résidu tout le long de la protéine.

Résultats

En raison de la légère différence entre les modèles issus du template 1XVO et 1QQU (rmsd de 1.19 Å), nous avons utilisé les 20 modèles qui ont été sélectionnés pour prédire les épitopes B conformationnels. Seuls les acides aminés qui ont été prédits comme épitopes dans plus de 70 % des modèles avec les deux algorithmes SEPPA et Discotope ont été retenus. En effet, 3 épitopes conformationnels ont été prédits chez Der p 3. Ces derniers correspondent aux séquences en acides aminés suivantes : $^{56}\text{SLKHSLG}^{62} + ^{96}\text{KLNQK}^{100}$ (épitope#1), $^{78}\text{DSYQ}^{81} + ^{157}\text{SKANAEV}^{163}$ (épitope#2) et $^{131}\text{GS}^{132} + ^{174}\text{ANGGK}^{178} + ^{204}\text{GYGCARKGY}^{212}$ (épitope#3).

La vérification de l'exposition et de la conformation des régions épitopiques a été réalisée par PyMOL sur la surface moléculaire des modèles prédits, cette étape est d'une importance cruciale car elle permet de valider le caractère épitopique des séquences préalablement prédites (**Figure 42**).

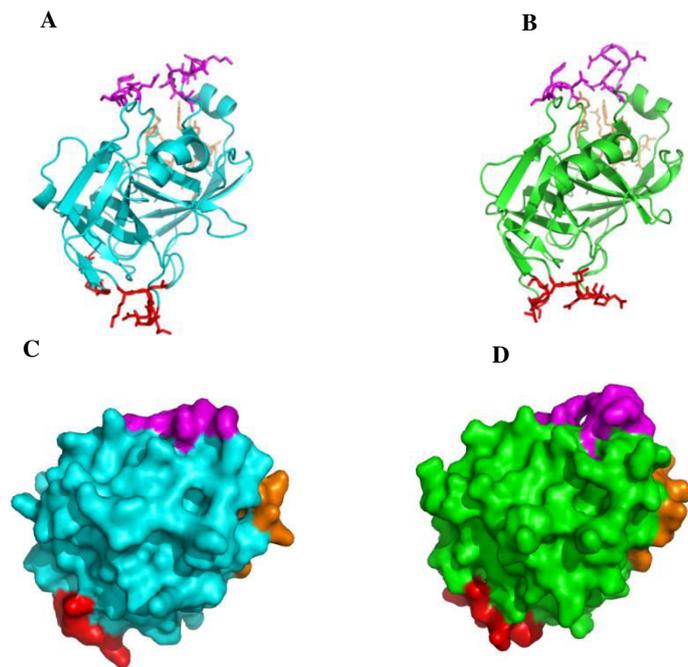


Figure 42: Localisation des épitopes B sur les modèles : épitope 1 en rouge, l'épitope 2 en magenta et l'épitope 3 en orange. (A) et (B) Présentation en cartoon des modèles issus du template 1XVO et de 1QQU respectivement. Les résidus des épitopes B sont représentés sous forme de sticks. (C) et (D) Exposition des épitopes à la surface des modèles issus du template 1XVO et de 1QQU respectivement.

Résultats

4. Criblage des résidus épitopes majeurs de l'allergène Der p 3 pour la validation expérimentale

Le but de cette étude n'est pas de prédire seulement les épitopes B conformationnels mais également de prédire au sein de chaque épitope les résidus immuno-dominants impliqués dans l'interaction avec les IgE. En effet, la sélection de ces résidus s'est portée sur leurs natures en choisissant les acides aminés chargés (K, R, D, E) et polaires (N, Q, S). Dans un premier temps, nous avons estimé par le programme PoPMuSiC la stabilité thermodynamique des mutants de Der p 3 afin de ne choisir que les mutations qui ne déstabilisent pas la structure native de cet allergène. En effet, ce programme calcule la valeur de la différence d'énergie libre ($\Delta\Delta G$) entre la protéine sauvage et la protéine mutée. Plus la valeur de $\Delta\Delta G$ est négative plus la mutation est considérée comme stabilisante dans cette position. Nous avons calculé la valeur de la différence d'énergie libre ($\Delta\Delta G$) au niveau des résidus épitopes sélectionnés. Nous avons retenu que les mutations qui présentent un $\Delta\Delta G$ inférieur à 0.5 kcal/mol. Dans un deuxième temps, après avoir introduit les mutations sélectionnées par PyMOL, nous avons re-prédit par SEPPA et Discotope si les mutants sélectionnés pourraient diminuer et même abolir l'interaction des épitopes B de Der p 3 avec les IgE. Les différents mutants que nous avons sélectionnés ainsi que le nombre de résidus prédits comme épitope avant et après mutation sont repris dans la **Table 4**

Résultats

		SEPPA		Discotope	
Epitopes	Résidus mutés	Modèle 1XVO	Modèle 1QQU	Modèle 1XVO	Modèle 1QQU
Epitope I	WT	S56-G62; K96-K100 (12 R)	S56-G62; K96-K100 (12 R)	S56-G62; K96-K100 (12R)	S56-G62; K96-K100 (12R)
	K96A	S56-G62; N98 (8 R)	S56-G62; N98 (8 R)	S56-K58, S60, L61; N98, Q99 (7 R)	S60-G62; K96-K100 (12 R)
	K100A	S56-G62; A100 (8 R)	S56-G62; A100 (8 R)	S60-G62; Q99 (4 R)	S56-G62; Q99 (8 R)
	G62A	S56-S60; K96-K100 (10 R)	S56-A62 (7 R)	S56-S60, Q99 (6 R)	K96-K100 (5 R)
Epitope II	WT	D78-Y80 ; S157-V163 (10 R)	D78-Y80 ; S157-V163 (10 R)	D78-Y80 ; S157-V163 (10 R)	D78-Y80 ; S157-V163 (10 R)
	Q81A	Y80 ; S157-V163 (8 R)	S157-V163 (7 R)	Y80 ; S157-V163 (8 R)	Y80 ; S157-V163 (8 R)
Epitope III	WT	G131-Y133 ; A174-K178, G204-Y212 (17 R)	G131-Y133 ; A174-K178, G204-Y212 (17 R)	G131-Y133 ; A174-K178, G204-Y212 (17 R)	G131-Y133 ; A174-K178, G204-Y212 (17 R)
	R209A	G131-Y133; A174-K178; G204, G206-G211 (15 R)	G131-Y133; A174-K178, G204-G211 (16 R)	G131-Y133; A174-K178; G207-A208 (10 R)	S132, Y133, A174-K178, A208-K210 (11 R)
	K210A	G131-Y133; A174-G177; G204, G206-G211 (14 R)	G131-Y133; A174-K178, G204-Y212 (17 R)	G131-Y133; N175-K178; G207-A208 (9 R)	S132, Y133, A174-K178, A208-K210 (10 R)
	R209AR210 A	Y133; A174-G177; G204, R209, K210 (8 R)	Y133; N175; G204, G206-K210 (8 R)	G131-Y133; N175-K178; G207-A208 (9 R)	S132-Y133; A174-K178; A208-K210 (9 R)

Table 4 : les différents mutants prédits par PoPMuSiC, SEPPA et Discotope.

Résultats

Nos analyses in silico prédisent que les résidus G62, K96, K100, R209 et K210 sont préférentiellement reconnus par les IgE. De plus, le double mutant R209A K210A au niveau de l'épitope 3 réduirait d'autant plus l'interaction avec les IgE que les simples mutants. Ces résultats devront être validés par une approche expérimentale pour confirmer l'implication de ces acides aminés dans la réaction allergique.

Discussion

Les études faites sur l'allergie aux acariens montrent que Der p 1 et Der p 2 sont les deux principaux allergènes de *D. pteronyssinus* vu qu'ils sont reconnus par 70 à 100 % des IgE de patients allergiques (Hales *et al*, 2006; Weghofer *et al*, 2008; Asturias *et al*, 2009 et Bronnert *et al*, 2012). L'étude de la prévalence de ces deux allergènes ainsi que leur implications dans l'allergie ont été étudiées au moyen des formes naturelles et recombinantes (Kidon *et al*, 2011; Hales *et al*, 2006; Pittner *et al*, 2004). Par contre, peu d'études ont été réalisées sur l'allergène Der p 3 et son implication dans l'allergie est peu connue. Ce manque de données est lié à ses faibles quantités que l'on purifie à partir des extraits d'acariens en raison de sa forte dégradation. Celle-ci est due à son activité protéolytique mais peut être due également à d'autres protéases (Der p 1, Der p 6 et Der p 9) (Stewart *et al*, 1994). Sa prévalence, très controversée, a été déterminé au moyen de Der p 3 naturel. Dans ces études, le taux de fixation de nDer p 3 aux IgE provenant de patients allergiques varie entre 16 et 100 % (Heymann *et al*, 1989; Stewart *et al*, 1992; Ando *et al*, 1993 et Yasueda *et al*, 1993).

Au sein de notre laboratoire, pour la première fois une forme recombinante de Der p 3 produite en *P.pastoris* pure, active et possédant les mêmes propriétés biochimiques que nDer p 3 a été obtenue (Dumez *et al*, 2008). Nous avons pu montrer que rDer p 3 présentait les mêmes propriétés allergéniques que nDer p 3. En effet, les résultats obtenus par test ELISA et inhibition compétitive montrent que rDer p 3 est correctement replié et présente les mêmes épitopes B conformationnels que nDer p 3. De plus, le taux de β -hexosaminidase relarguée par les RBL X-38 ainsi que le taux de surexpression du récepteur CD203c des basophiles humains stimulés par nDer p 3 et rDer p 3 sont comparables attestant de l'immunogénicité et de la qualité de rDer p 3 produit en *P.pastoris*. Dès lors, cette forme recombinante pourrait être utilisée pour les tests de diagnostic et pour étudier l'implication de l'allergène Der p 3 dans la phase de déclenchement de la réponse allergique.

Comme la trypsine, l'allergène Der p 3 possède une boucle d'autolyse en surface représentée par la séquence -NAK₁₁₄- dont le clivage diminue son temps de demi-vie. Dans l'étude 2, la sensibilité de Der p 3 à l'autolyse a été étudiée. Pour évaluer l'impact de l'activité enzymatique de l'allergène Der p 3 sur son autolyse, le mutant inactif Der p 3 S196A a été construit. Nous avons tout d'abord pu montrer que la mutation au niveau du site actif n'affectait ni la structure secondaire ni la structure tertiaire de l'allergène Der p 3. En effet, les spectres de fluorescence intrinsèque et de dichroïsme circulaire de

Discussion

rDer p 3 et rDer p 3S196A sont similaires. Ces informations indiquent que la mutation au niveau du site actif n'affecte pas le folding de la protéine et par conséquent ne modifie pas les épitopes B conformationnels de l'allergène Der p 3. L'analyse de stabilité des différentes formes de l'allergène Der p 3 (proDer p 3 S196A, proDer p 3, rDer p 3 S196A et rDer p 3) mais également de Der p 1 (proDer p 1 C34A, proDer p 1, rDer p 1 C34A et rDer p 1) montre que contrairement à l'allergène Der p 1 et aux formes zymogènes et inactives de l'allergène Der p 3, la forme active rDer p 3 est très sujette à l'autolyse. Ces résultats suggèrent que la sensibilité de l'allergène Der p 3 à l'autolyse pourrait être une des raisons de sa présence en faibles quantités dans les extraits d'acariens. Une étude de quantification de certains allergènes d'acariens dans différents extraits commerciaux a montré que seulement les deux allergènes Der p 1 et Der p 2 sont présents dans les différents extraits (Casset *et al.*2012). Par contre les autres allergènes (Der p 4, 5, 7, 8, 10, 14, 20 et 21) sont absents dans la plupart des extraits. Ceci pourrait être dû à la dégradation de ces allergènes fragiles par des protéases présentes dans les extraits ou par les procédures d'extraction et de stockage (Casset *et al.* 2012). L'absence de certains allergènes ayant une importance clinique dans les extraits pourrait donc fausser les résultats de diagnostic et de prévalence. Dès lors, l'utilisation des allergènes recombinants et stables serait donc nécessaire pour le diagnostic de l'allergie.

La sensibilité de l'allergène Der p 3 à l'autolyse a également été évaluée durant un test ELISA classique en utilisant l'anticorps polyclonal anti-proDer p 3. En comparant le taux de fixation de l'anticorps polyclonal anti-proDer p 3 sur les différentes formes de l'allergène Der p 3, nous avons montré que les formes actives nDer p 3 et rDer p 3 sont très sujettes à l'autolyse durant un test ELISA qui dure environ 4 heures à 37 °C. Suite à ces observations, il semblait intéressant de savoir si l'autolyse de l'allergène Der p 3 a un effet sur le taux de reconnaissance des IgE provenant des sera de patients allergiques.

Cette étude a montré que le taux de reconnaissance des IgE mesuré avec la forme inactive de Der p 3 est deux fois supérieur à celui de la forme active et nous avons pu également montrer que cette différence ne pouvait être due qu'à l'autolyse de Der p 3 et non pas à la dégradation des IgE par l'activité enzymatique de l'allergène Der p 3. En effet, par western blot et au moyen d'un anticorps anti-IgE humain, nous avons pu montrer qu'il n'y avait pas de dégradation des IgE lorsque les sera ont été incubés à 37 °C et à 4 °C avec ou sans Der p 3 (résultats non représentés). De plus, les tests de

Discussion

dégranulation des RBL X-38 et d'activation des basophiles humains (où l'étape d'activation avec l'allergène ne dure que 15 min à 37 °C) ont montré que les pouvoirs allergéniques de nDer p 3, rDer p 3 et rDer p 3 S196A sont similaires.

En se référant à l'étude de Thomas *et al.* 2010 qui définit le seuil positif d'une réponse allergique envers Der p1, nous avons montré que 10 % et 25 % des sera de patients allergiques à *D. pteronyssinus* sont positifs lorsque on utilise les deux formes actives nDer p 3 et rDer p 3. Par contre, si l'on considère le mutant inactif Der p 3S196A, environ 50 % des sera de patients allergiques sont positifs pour l'allergène Der p 3 (**Figure 43**). La prévalence de l'allergène Der p 3 mesurée jusqu'alors a probablement été sous-estimée. L'autolyse de cette protéine pourrait expliquer la variation de sa prévalence de 16-100 % dans les études antérieures réalisées au moyen de Der p 3 naturel. Toutes ces informations indiquent que la forme inactive Der p 3 S196A serait un excellent outil de diagnostic de l'allergie et pourrait être utilisé pour l'étude de prévalence de l'allergène Der p 3.

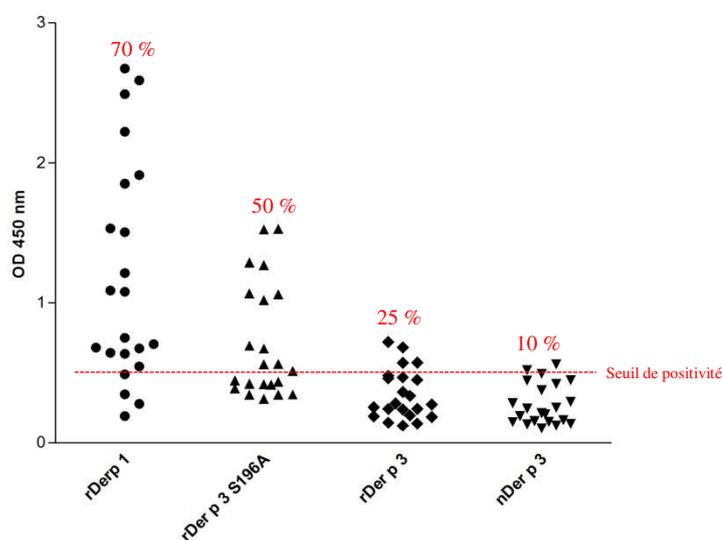


Figure 43 : Comparaison du taux de reconnaissance de rDer p 3, rDer p 3S196A, nDer p 3 et rDer p 1 par les IgE provenant des sera de patients allergiques en fixant le même seuil de positivité que l'étude de Thomas *et al.*, 2010.

Discussion

Nos études montrent que le zymogène proDer p 3 possède un contenu en structures secondaires, mesuré par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, identique à celui de l'allergène Der p 3, par contre leurs structures tertiaires, analysées par fluorescence intrinsèque sont différentes. En effet, les spectres de fluorescence intrinsèque de la forme zymogène et mature montrent un maximum de fluorescence à 335 nm et 350 nm respectivement. Ce déplacement explique que la structure tridimensionnelle de la forme zymogène est différente de la forme mature. Des résultats similaires ont été observés pour le trypsinogène et la trypsine. Cet effet bathochromique a été attribué à l'augmentation de l'accessibilité du tryptophane 215 au solvant après le processus d'activation (Reshetniak *et al*, 1997; Reshetnyak *et al*, 2001). Ce même résidu est aussi présent chez Der p 3. Les structures du trypsinogène et de la trypsine bovine sont à 85 % identiques, les 15 % restant sont non structurés dans le trypsinogène. Ces 15 % acquièrent leur structure après la formation d'un pont salin entre l'Ile 16 et l'Asp 194 qu'est indispensable pour que la transition du trypsinogène en trypsine active puisse avoir lieu (Brunger *et al*, 1987). De même, il a été montré au sein de notre laboratoire que le mécanisme d'activation de proDer p 3 en Der p 3 nécessite le clivage spécifique après la thréonine C-terminale du propeptide et la libération de la fonction α -aminée de l'Ile 12. Cette fonction formerait un pont salin avec la chaîne latérale de l'Asp 195 assurant l'obtention d'une forme active de Der p 3 (Dumez *et al*, 2013). Etant donné que plus de 90 % des épitopes B sont des épitopes discontinus (Irving *et al*, 1986; Regenmortel *et al*, 2001), il était intéressant de déterminer si ce changement conformationnel induit par l'activation affecte les épitopes B conformationnels de l'allergène Der p 3.

L'implication du propeptide du zymogène proDer p 3 sur l'allergénicité de Der p 3 a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* a pu montrer que la forme zymogène proDer p 3 est moins allergénique que la forme mature Der p 3. En effet, au moyen de tests ELISA sandwich, d'inhibition compétitive et également par des tests de dégranulation des basophiles de rat RBL X-38 et d'activation des basophiles humains lors desquels l'allergène se trouve libre en solution, nous avons prouvé que la reconnaissance de proDer p 3 par les IgE de patients allergiques est plus faible que celle de Der p 3. Ces résultats suggèrent que certains épitopes B immuno-dominants de l'allergène Der p 3 pourraient être masqués dans la forme zymogène. Deux hypothèses peuvent être envisagées: soit le propeptide, malgré sa faible taille, masquerait un épitope

Discussion

B immuno-dominant de l'allergène Der p 3, soit les épitopes B de cet allergène seraient enfuis dans la forme zymogène et seraient accessibles dans la forme mature suite au changement conformationnel induit par l'activation. Par contre, en ELISA direct où l'allergène est immobilisé sur microplaque l'effet du propeptide n'est plus observé. Dans des travaux antérieurs sur l'étude de l'allergénicité de Der p 1 et proDer p 1, des résultats similaires ont été obtenus (Takai T *et al.* 2005). Comme cela a été suggéré dans cette étude pour le zymogène proDer p 1, une fois proDer p 3 immobilisé sur microplaque sa structure pourrait être modifiée et les épitopes B masqués deviendraient accessibles. Au sein de notre laboratoire, une autre étude sur l'allergénicité de Der p 6 a été réalisée par Julie Herman montrant qu'en test ELISA indirect, la reconnaissance de la forme zymogène et mature de l'allergène Der p 6 par les IgE de patients allergiques est similaire. Par contre, en test d'activation de basophiles humains l'effet hypoallergénique de proDer p 6 a été observé. Comme proDer p 3, l'adsorption de proDer p 6 sur microplaque pourrait probablement modifier sa structure.

Lors de nos études *in vivo*, nous avons entrepris de sensibiliser les souris Balb/c avec rDer p 3, rDer p 3 S196A, proDer p 3 et rDer p 1. Nous avons pu montrer que les groupes de souris sensibilisés avec les deux formes matures de l'allergène Der p 3 ont développé une réponse immune de type T_H2 similaire à celle induite par l'allergène majeur Der p 1. Cette réponse est caractérisée par une forte production d'IgE et IgG₁ spécifiques. À l'opposé, les souris sensibilisées avec proDer p 3 ont généré une réponse de type T_H1 caractérisée par une faible production d'IgE et IgG₁ spécifiques ainsi que par une production significative d'IgG_{2a} spécifiques. Ce dernier est connu pour orienter la réponse immune vers la voie T_H2. L'exposition des épitopes conformationnels et le repliement correct de l'allergène Der p 3 est donc nécessaire pour induire une réponse immune de type T_H2.

Les cytokines IL-5 et IFN γ ont été choisies pour le suivi de la réponse immune cellulaire vu leur rôle central dans l'immunité de type T_H2 et T_H1. Dans cette étude, la production intense d'IL-5 observée chez les souris sensibilisées avec la forme mature rDer p 3 était en corrélation avec l'éosinophilie pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique. Dans les études antérieures, il a été montré que l'éosinophilie pulmonaire est une caractéristique importante de l'asthme allergique et que l'infiltration d'éosinophiles au niveau des voies respiratoires est proportionnelle à la sévérité de l'allergie démontrant ainsi le rôle de ces cellules dans le maintien de l'inflammation pulmonaire et donc dans

Discussion

l'allergie respiratoire (Louis *et al*, 2000). Dès lors, cette forte production d'IL-5 et l'éosinophilie pulmonaire chez le groupe de souris sensibilisées par rDer p 3 pourraient être considéré comme de bons marqueurs de l'asthme allergique. A contrario, l'infiltration d'éosinophiles et donc l'inflammation pulmonaire chez les souris sensibilisées par rDer p 3 S196A étaient plus faibles. Cette différence pourrait être due à l'activité enzymatique de l'allergène. De plus, l'hyperréactivité bronchique a été observée uniquement chez le groupe de souris sensibilisées avec la forme mature et active de Der p 3 confirmant que l'activité trypsine de l'allergène Der p 3 pourrait être responsable de l'altération des voies respiratoires. En effet, il est connu que l'activité protéolytique de l'allergène Der p 3 est capable de cliver les jonctions serrées telles que l'occludine et la claudine au niveau des cellules épithéliales. Ce phénomène conduit à une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale pulmonaire et facilitant par conséquent la pénétration des allergènes (Wan *et al*, 2001). De plus, ils ont également montré que l'activité protéolytique de Der p 3 est capable d'induire la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires par activation spécifique du récepteur PAR-2 (Protease activated receptor 2) qui se trouve sur les cellules épithéliales bronchiques (Sun *et al*, 2001, Adam *et al*, 2006). Une étude sur un modèle murin illustre bien l'effet de l'activation des récepteurs PAR-2 sur l'amplification de l'inflammation pulmonaire. En effet, chez les souris sauvages, une hyperréactivité significative des voies aériennes à la méthacholine a été observée par rapport aux souris dont les récepteurs PAR-2 ont été abolis (Schmidlin *et al*, 2002). Récemment, une autre étude sur un modèle murin allergique aux acariens a montré que l'absence de l'activation des récepteurs PAR-2 provoque une diminution des manifestations de la maladie allergique y compris l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation des voies aériennes après une provocation allergique (Davidson *et al*, 2013).

La faible immunogénicité de proDer p 3 a été également mise en évidence au niveau de la réponse cellulaire. En effet, aucune production de cytokine de type T_H2 n'a pu être détectée dans le surnageant des splénocytes des souris sensibilisées avec cette forme. Aucune réaction allergique au niveau des voies respiratoires n'a pu être détectée chez ce groupe de souris après le test de provocation intranasal.

Pour les différents groupes de souris une corrélation entre les réponses humorale et cellulaire a été observée. En effet, la sensibilisation avec la forme mature et zymogène induit une réponse immune de type T_H2 et T_H1. En supposant que l'induction d'une

Discussion

réponse T_H1 soit capable de contrebalancer l'émergence d'une réponse T_H2 (concept de balance T_H1-T_H2), on peut considérer que la réponse T_H1 a potentiellement une action anti-allergique. Cette hypothèse est attestée par de nombreuses études montrant que les réponses T_H1 et T_H2 sont mutuellement antagonistes (Rommagnani *et al*, 1996). En effet, les cytokines T_H1 (IL-12, IL-18 et $IFN\gamma$) favorisent le développement de la réponse T_H1 et inhibent le développement de la réponse T_H2 .

Les hypoallergènes utilisés en immunothérapie doivent conserver les épitopes T spécifiques afin de pouvoir induire une réponse immunitaire protectrice. Afin de s'assurer que proDer p 3 conserve les épitopes T spécifiques de Der p 3, les splénocytes provenant des souris sensibilisées au moyen des différentes formes de Der p 3 ont été stimulés au moyen de la forme zymogène. Ces cellules ont été capables de proliférer suite à une stimulation induite par proDer p 3 mais également par rDer p 3, rDer p 3 S196A ou proDer p 3. De plus, le stimulus index était similaire à celui des splénocytes des souris sensibilisées avec les deux formes matures rDer p 3 et rDer p 3 S196A et stimulés avec ces deux protéines.

L'ensemble de nos expériences a pu montrer que proDer p 3 présentait une allergénicité et une antigénicité réduites avec une immunogénicité conservée. Dès lors, le zymogène proDer p 3 pourrait être considéré comme une molécule hypoallergénique et constitue un candidat pour l'immunothérapie spécifique.

Par ailleurs, nous observons que la réponse humorale et cellulaire induites chez les souris sensibilisées par l'allergène Der p 3 et Der p 1 ainsi que l'intensité de dégranulation des RBLX-38 et la surexpression du récepteur CD203c des basophiles humains induits par ces deux allergènes sont comparables.

La connaissance de la structure tridimensionnelle de Der p 3 peut nous informer sur la fonction biologique mais permet également de localiser le positionnement des épitopes B conformationnels. Dans notre dernière étude, nous avons pu construire par approche bioinformatique deux modèles tridimensionnels de l'allergène Der p 3 en utilisant les deux templates 1XVO et 1QQU qui présentent un pourcentage d'identité de 41 % et 45 % avec Der p 3 respectivement afin de prédire les épitopes B conformationnels de l'allergène.

L'identification des épitopes revêt une grande importance car elle assurerait l'amélioration des outils de diagnostic, de vaccination ou d'immunothérapie (Ivring *et al*, 2001; Gershoni *et al*, 2007; Chen *et al*, 2012). En effet, l'étude des épitopes permet

Discussion

de voir quelles sont les structures moléculaires qui stimulent le système immunitaire, activent les cellules clés de l'allergie et conduisent à l'apparition des symptômes allergiques. Une meilleure connaissance de ces mécanismes moléculaires peut conduire à des stratégies permettant de limiter les risques de développer des allergies. Les méthodes les plus fiables pour l'identification des épitopes B sont la détermination de la structure du complexe antigène-anticorps par cristallographie aux rayons X et RMN. Nos tentatives de cristallisation de différentes formes de Der p3 n'ont pas été concluantes. Dès lors, nous avons opté pour la prédiction des épitopes B *in silico*, via l'utilisation d'outils bioinformatiques. En effet, cette voie est extrêmement prometteuse, vu qu'elle guide et limite drastiquement les tests expérimentaux sur les animaux ce qui entraîne des gains importants en temps et en coûts.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'identification des épitopes B linéaires et également à la prédiction des épitopes B conformationnels. Par la technique du peptide array, nous avons pu identifier le déterminant antigénique linéaire de Der p 3 qui correspond à la séquence suivante : ⁴⁵Q-⁶³G. La majorité des résidus de cet épitope sont des acides aminés polaires chargés et non chargés, comme cela a déjà été discuté dans la littérature. En effet, certaines études ont montré que la plupart des épitopes sont appauvris en acides aminés hydrophobes et aliphatiques et enrichis en acides aminés chargés et polaires en raison de leur capacité à former de multiples interactions entre l'antigène et les anticorps (Kringelum *et al*, 2013, Rubinstein *et al*, 2008). Pour l'identification des acides aminés immuno-dominants qui sont impliqués dans la liaison aux IgE, un alanine scanning a été utilisé. Les acides aminés du peptide correspondant à l'épitope ont été substitués par une alanine vu que cet acide aminé est neutre et ne modifie pas de façon significative la charge et la solubilité des peptides. Cette approche a été utilisée avec succès pour plusieurs allergènes (Cong *et al*, 2013; Elsayed *et al*, 2004; Cocco *et al*, 2003 et Robotham *et al*, 2002). Pour l'allergène Der p 3, nous avons pu montrer que les résidus Y54, N55, L57 et H59 de l'épitope B linéaire sont impliqués dans la reconnaissance et la fixation des IgE provenant de patients allergiques. En effet, la mutation de ces résidus par une alanine réduit d'une manière significative la fixation des IgE par rapport au peptide sauvage. Ces résultats suggèrent que ces acides aminés pourraient jouer un rôle crucial dans la réaction allergique. Durant cette étude, nous avons prédit la présence des épitopes B conformationnels par l'utilisation des programmes SEPPA et Discotope. En effet, trois épitopes conformationnels ont été

Discussion

prédits pour Der p 3 et la majorité des résidus de ces épitopes sont des acides aminés chargés. L'analyse du modèle structurale de Der p 3 montre que ces résidus sont exposés à la surface de la protéine et localisés dans des régions flexibles. Il reste à valider ces épitopes par mutagenèse dirigée. Dans cette étude, nous avons également prédit les résidus immunodominants au sein de chaque épitope afin de construire des molécules hypoallergéniques. Tout d'abord, en utilisant le programme PoPMuSiC, la stabilité thermodynamique des mutants alanines pour tous les résidus faisant partie des épitopes prédit par SEPPA et Discotope a été évaluée afin de sélectionner uniquement les résidus dont la mutation en alanine ne déstabilise pas la structure native de cet allergène. Les résultats obtenus suggèrent que les résidus G62, K76, Q81, K96, K100, S132, R209, K210 pourraient être immuno-dominants et avoir un rôle important dans le déclenchement de la réaction allergique car leurs mutations en alanine, sur base de l'analyse SEPPA et Discotope, affecteraient l'allergénicité de Der p 3. L'emplacement de ces résidus sur les deux modèles sélectionnés de Der p 3 montre que ces derniers sont localisés au niveau des boucles et exposés à la surface. L'implication de ces acides aminés dans la réaction allergique devrait être validée via la construction des simples et des doubles mutants choisis dans la table 4 pour chaque épitope. La production de ces mutants vise à la fois la validation des épitopes B conformationnels prédits et la production des molécules hypoallergéniques qui pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques.

Conclusions et Perspectives

A l'heure actuelle, le taux de fixation de Der p 3 aux IgE provenant de patients allergiques est controversé. En effet, ces résultats ont été obtenus au moyen de l'allergène Der p 3 naturel très sujet à l'autolyse. Durant cette étude, nous avons pu produire une forme recombinante mutée au niveau de la sérine active, correctement repliée et qui n'est pas sujette à l'autolyse. Nous avons également montré que cette forme pourrait être un meilleur outil pour diagnostiquer spécifiquement l'allergie à Der p 3. Il serait donc très intéressant de confirmer le caractère majeur de l'allergène Der p 3 en utilisant la forme Der p 3 S196A pour un nombre plus importants de patients allergiques aux acariens provenant de différentes populations Européennes et hors Europe. Il serait également intéressant de fixer l'allergène Der p 3 S196A sur des immunoCAP Phadia afin de quantifier les IgE dirigées contre l'allergène Der p 3 (kU/mL) et de comparer cela avec l'allergène majeur Der p 1.

Durant cette thèse, nous avons montré que le propeptide du zymogène proDer p 3 affecte l'allergénicité de Der p 3. Afin de confirmer le caractère hypoallergénique de proDer p 3, nous pensons compléter notre étude sur un modèle murin en faisant des essais thérapeutiques. Pour cela, le zymogène proDer p 3 serait utilisé pour vacciner les souris avant de les sensibiliser avec Der p 3 et enfin les exposer avec des extraits d'acariens. Cette démarche expérimentale nous permettrait pour évaluer l'efficacité du vaccin. L'évolution de la réponse immune serait suivie au cours de ce traitement afin de vérifier l'orientation de la réponse immune de type T_H2 vers une réponse de type T_H1 .

Des expériences d'activation des basophiles humains provenant de 8 patients allergiques aux acariens avec les différentes formes zymogènes (proDer p 3, proDer p 3 S196A) et matures (nDer p 3, rDer p 3 et rDer p 3S196A) ont été réalisées et ont confirmé le caractère hypoallergénique des deux formes zymogènes. Il serait donc également intéressant de confirmer ce caractère hypoallergénique chez l'être humain. La conservation des épitopes T de la forme zymogène de Der p 3 chez l'être humain pourrait être vérifiée en comparant la prolifération des PBMC (cellules mononucléaires du sang périphériques) des patients allergiques aux acariens suite à une stimulation au moyen des formes matures et zymogènes.

A l'heure actuelle, aucune information structurale de l'allergène Der p 3 n'est disponible. Durant cette étude, nous avons étudié les épitopes B linéaires de l'allergène Der p 3 par la technique du peptide array. Un épitope linéaire a été identifié et les acides aminés immuno-dominants qui pourraient jouer un rôle important dans la réaction

Conclusions et Perspectives

allergique ont été également identifiés en mutant tous les résidus au sein de cet épitope par une alanine. Ces résidus sont Y54, N55, L57 et H59.

Nous avons ensuite construit par modélisation moléculaire deux modèles tridimensionnels de l'allergène Der p 3. Sur base de ces derniers, nous avons prédit les épitopes B par deux algorithmes SEPPA et Discotope et les avons localisés à la surface de Der p 3. Il serait intéressant de tenter de cristalliser l'allergène Der p 3 sous sa forme mature et zymogène afin de confirmer la structure de Der p 3 prédite par bioinformatique. De plus, la détermination de la structure de proDer p 3 permettrait également de localiser la position du propeptide que nous n'avons pas pu faire par approche bioinformatique et de montrer son effet sur le masquage ou l'altération de la conformation des épitopes B. Enfin, la comparaison des structures de proDer p 3 et de Der p 3 permettrait de confirmer les changements structuraux induits lors de l'activation.

Afin de confirmer les épitopes B prédits par bioinformatique, les mutations prédites devraient être réalisées par mutagenèse dirigée pour identifier avec précision les épitopes B les plus importants et représentatifs de l'allergène Der p 3. Ensuite, le caractère hypoallergénique de ces mutants pourrait être mesuré *in vitro* et *in vivo* afin de les utiliser dans le cadre d'une immunothérapie spécifique.

Références Bibliographiques

- Acharya, M.**, et al. (2010). "CD23/FcepsilonRII: molecular multi-tasking." Clin Exp Immunol **162**(1): 12-23.
- Adam, E.**, et al. (2006). "The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism." J Biol Chem **281**(11): 6910-6923.
- Aït Khaled, N.**, et al (2009). "Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three." Allergy **64**:123-148.
- Altschul, S. F.**, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- Ando, T.**, et al. (1993). "Trypsin-like protease of mites: purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides farinae*. Relationship between trypsin-like protease and Der f III." Clinical & Experimental Allergy **23**(9): 777-784.
- Arlian, L. G.**, et al. (2002). "Dust mite allergens: ecology and distribution." Curr Allergy Asthma Rep **2**(5): 401-411.
- Asturias, J. A.**, et al. (2009). "Engineering of major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy." Clinical & Experimental Allergy **39**(7): 1088-1098.
- An S.**, et al. (2013). "*Dermatophagoides farinae* allergens diversity identification by proteomics." Mol Cell Proteomics (7):1818-28.
- Bacharier, L. B.** and R. S. Geha (2000). "Molecular mechanisms of IgE regulation." J Allergy Clin Immunol **105**(2 Pt 2): S547-558.
- Baker, S. F.**, et al. (2003). "Peptidase allergen Der p 1 initiates apoptosis of epithelial cells independently of tight junction proteolysis." Mol Membr Biol **20**(1): 71-81.
- Barber, D.**, et al. (2012). "Analysis of mite allergic patients in a diverse territory by improved diagnostic tools." Clin Exp Allergy **42**(7): 1129-1138.
- Beilvert, F.**, et al. (2012). "DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres reduce asthmatic response in a mouse model of allergic asthma." Hum Gene Ther **23** (6):597-608.
- Bienboire-Frosini, C.**, et al. (2012). "Variable content of Fel d 1 variants in house dust and cat extracts may have an impact on allergen measurement." J Investig Allergol Clin Immunol **22**(4): 270-279.
- Blank, U.**, et al. (2003). "[The high-affinity IgE receptor: lessons from structural analysis]." Med Sci (Paris) **19**(1): 63-69.
- Borkowski, T. A.**, et al. (2001). "Minimal requirements for IgE-mediated regulation of surface Fc epsilon RI." J Immunol **167**(3): 1290-1296.
- Bousquet, P. J.**, et al. (2007). "Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I." Allergy **62**(3): 301-309.
- Bice, J. B.**, et al. (2014). "Biologic target therapy in allergic asthma." Ann Allergy Asthma Immunol. **112** (2):108-15.

Références Bibliographiques

- Bronnert, M.**, et al. (2012). "Component-resolved diagnosis with commercially available *D. pteronyssinus* Der p 1, Der p 2 and Der p 10: relevant markers for house dust mite allergy." Clin Exp Allergy **42**(9): 1406-1415).
- Brown, A.**, et al. (2003). "House Dust Mite Der p 1 Downregulates Defenses of the Lung by Inactivating Elastase Inhibitors." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **29**(3): 381-389.
- Brunger, A. T.**, et al. (1987). "Trypsinogen-trypsin transition: a molecular dynamics study of induced conformational change in the activation domain." Biochemistry **26**(16): 5153-5162.
- Buhring, H. J.**, et al. (2001). "The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3." Blood **97**(10): 3303-3305.
- Buhring, H. J.**, et al. (1999). "The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors." Blood **94**(7): 2343-2356.
- Buhring, H. J.**, et al. (2004). "The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis." Int Arch Allergy Immunol **133**(4): 317-329.
- Burney, P.**, et al. (1997). "The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey." J Allergy Clin Immunol **99**(3): 314-322.
- Burton, O. T.** and H. C. Oettgen (2011). "Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases." Immunol Rev **242**(1): 128-143.
- Casale, T. B.** and J. R. Stokes (2011). "Future forms of immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **127**(1): 8-15; quiz 16-17.
- Casset, A.**, et al. (2012). "Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts." Int Arch Allergy Immunol **159**(3): 253-262.
- Coombs, R.R.A.** and P.G.H. Gell (1975). "Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease". Clinical aspects of immunology. R. R. C. a. P. J.L.P.Gell.Oxford, UK: Blackwell Scientific: 761.
- Cong, Y.**, et al. (2013). "Identification of critical amino acid residues of immunoglobulin E and Immunoglobulin G epitopes on α s1-casein by alanine scanning analysis." J Dairy Sci **96**(11):6870-6.
- Chapman, M. D.**, et al. (2007). "Nomenclature and structural biology of allergens." Journal of Allergy and Clinical Immunology **119**(2): 414-420.
- Chaudhari, B.**, et al. (2006). "Following the TRAIL to apoptosis." Immunologic Research **35**(3): 249-262.
- Chen, K.W.**, et al. (2008). "Reduction of the in vivo allergenicity of Der p 2, the major house-dust mite allergen, by genetic engineering." Molecular Immunology **45**(9): 2486-2498.

Références Bibliographiques

- Chen, K. W.**, et al. (2012). "Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy." J Allergy Clin Immunol **130**(2): 435-443 e434.
- Chen, W.**, et al. (2013). "IL-13 receptor $\alpha 2$ contributes to development of experimental allergic asthma." J Allergy Clin Immunol **132**(4):951-8
- Chen, Z. G.**, et al. (2009). "[Effects of Dermatophagoides pteronyssinus allergen-specific immunotherapy on the prognosis of asthmatic children]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **29**(6): 1179-1181.
- Cheng, L. E.**, et al. (2010). "Murine B cells regulate serum IgE levels in a CD23-dependent manner." J Immunol **185**(9): 5040-5047.
- Chevigne, A.**, et al. (2007). "Relationship between propeptide pH unfolding and inhibitory ability during ProDer p 1 activation mechanism." J Mol Biol **374**(1): 170-185.
- Chruszcz, M.**, et al. (2012). "Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens." J Biol Chem **287**(10): 7388-7398.
- Chua, K. Y.**, et al. (1988). "Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases." J Exp Med **167**(1): 175-182.
- Coffman, R. L.** (2006). "Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective." Nat Immunol **7**(6): 539-541.
- Coyle, A. J.**, et al. (1995). "Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity." Am J Respir Cell Mol Biol **13**(1): 54-59.
- Cocco, R.**, et al. (2003). "Mutational analysis of major sequential IgE-binding epitopes in alpha casein, a major cow's milk allergen." J Allergy Clin Immunol **112**(2):433-7.
- D'Amato, G.** and L. Cecchi. (2008). "Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic diseases." Clin Exp Allergy **38** (8):1264-74.
- Davidson, C.E.**, et al. (2013). "Proteinase-activated receptor-2 activation participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model." Clin Exp Allergy **43** (11):1274-85.
- de Halleux, S.**, et al. (2006). "Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen." J Allergy Clin Immunol **117**(3): 571-576.
- de Waal Malefyt, R.**, et al. (1995). "Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells." Int Immunol **7**(9): 1405-1416.
- Dumez, M. E.**, et al. (2008). "Activation mechanism of recombinant Der p 3 allergen zymogen: contribution of cysteine protease Der p 1 and effect of propeptide glycosylation." J Biol Chem **283**(45): 30606-30617.
- Dumez, M. E.**, et al. (2013). "The proline-rich motif of the proDer p 3 allergen propeptide is crucial for protease-protease interaction." PLoS One **8** (9): e68014.
- Elsayed, S.**, et al. (2004). "Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alphas1-casein using extensively purified synthetic peptide." Scand J Immunol **60** (5):486-93.
- Focke, M.**, et al. (2008). "Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts." Clin Exp Allergy **38**(8): 1400-1408.

Références Bibliographiques

- Foster, P. S.**, et al. (1996). "Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model." J Exp Med **183**(1): 195-201.
- Furmonaviciene, R.**, et al. (2007). "The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR: experimental analysis of in silico substrate identification and implications in allergic responses." Clin Exp Allergy **37**(2): 231-242.
- Galli, S. J.** (2000). "Mast cells and basophils." Curr Opin Hematol **7**(1): 32-39.
- Galli, S. J.**, et al. (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**(7203): 445-454.
- Garcia, G.**, et al. (2013). "Anti interleukin-5 therapy in severe asthma." Eur Respir Rev **22**(129):251-7.
- Gauchat, J. F.**, et al. (1997). "A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T, and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/interleukin-13 receptor." Eur J Immunol **27**(4): 971-978.
- Gavett, S. H.**, et al. (1995). "Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice." J Exp Med **182**(5): 1527-1536.
- Gershoni, J.M.**, et al. (2007). "Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines." BioDrugs **21**(3):145-56.
- Goding, J. W.**, et al. (2003). "Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family." Biochim Biophys Acta **1638**(1): 1-19.
- Gosset, P.**, et al. (2003). "Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells." J Immunol **170**(10): 4943-4952.
- Gough, L.**, et al. (2001). "The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 enhances the IgE antibody response to a bystander antigen." Clin Exp Allergy **31**(10): 1594-1598.
- Gould, H. J.** and B. J. Sutton (2008). "IgE in allergy and asthma today." Nat Rev Immunol **8**(3): 205-217.
- Gould, H. J.**, et al. (2003). "The biology of IGE and the basis of allergic disease." Annu Rev Immunol **21**: 579-628.
- Grayson, M. H.**, et al. (2007). "Induction of high-affinity IgE receptor on lung dendritic cells during viral infection leads to mucous cell metaplasia." J Exp Med **204**(11): 2759-2769.
- Greene, W and Thomas, W.** (1992). "IgE binding structures of the major house dust mite allergen Der p 1." Mol Immunol **29**:257-262.
- Gregory, L. G.** and C. M. Lloyd (2011). "Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung." Trends Immunol **32**(9): 402-411.
- Grunig, G.**, et al. (1998). "Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma." Science **282**(5397): 2261-2263.

Références Bibliographiques

- Grutzkau, A.**, et al. (2004). "LAMP-1 and LAMP-2, but not LAMP-3, are reliable markers for activation-induced secretion of human mast cells." Cytometry A **61**(1): 62-68.
- Gundel, R. H.**, et al. (1991). "Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates." J Clin Invest **87**(4): 1470-1473.
- Hales, B. J.**, et al. (2007). "Distinctive immunoglobulin E anti-house dust allergen-binding specificities in a tropical Australian Aboriginal community." Clinical & Experimental Allergy **37**(9): 1357-1363.
- Hales, B. J.**, et al. (2006). "IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease." Journal of Allergy and Clinical Immunology **118**(2): 361-367.
- Hamelmann, E.**, et al. (2000). "Interleukin (IL)-5 but not immunoglobulin E reconstitutes airway inflammation and airway hyperresponsiveness in IL-4-deficient mice." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(3): 327-334.
- Hamid, Q.** and M. Tulic (2009). "Immunobiology of asthma." Annu Rev Physiol **71**: 489-507.
- Hammad, H.**, et al. (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." Nat Med **15**(4): 410-416.
- Haste Andersen, P.**, et al. (2006). "Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures." Protein Sci **15**(11): 2558-2567.
- Hausmann, O. V.**, et al. (2009). "The basophil activation test in immediate-type drug allergy." Immunol Allergy Clin North Am **29**(3): 555-566.
- Herrman, J.**, et al. (2014). "Der p 1 is the primary activator of Der p 3, Der p 6 and Der p 9 the proteolytic allergens produced by the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*" Biochimica et Biophysica Acta **1840**: 1117-1124.
- Hennersdorf, F.**, et al. (2005). "Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation." Cell Res **15**(5): 325-335.
- Heydenreich, B.**, et al. (2012). "Gram-positive bacteria on grass pollen exhibit adjuvant activity inducing inflammatory T cell responses." Clin Exp Allergy **42**(1): 76-84.
- Heymann, P. W.**, et al. (1989). "Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp)." Journal of Allergy and Clinical Immunology **83**(6): 1055-1067.
- Hirai, H.**, et al. (2001). "Prostaglandin D2 Selectively Induces Chemotaxis in T Helper Type 2 Cells, Eosinophils, and Basophils via Seven-Transmembrane Receptor Crth2." The Journal of Experimental Medicine **193**(2): 255-262.
- Irani, A. M.**, et al. (1998). "Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions." J Allergy Clin Immunol **101**(3): 354-362.
- Irving, M.B.**, et al. (2001). "Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics." Curr Opin Chem Biol **5**(3):314-24.
- Jacobsen, E. A.**, (2014). "Eosinophil activities modulate the immune/inflammatory character of allergic respiratory responses in mice." Allergy **69** (3):315-27

Références Bibliographiques

- Jacquet, A.** (2011). "The role of the house dust mite-induced innate immunity in development of allergic response." *Int Arch Allergy Immunol* **155**(2): 95-105.
- Jahn-Schmid, B.**, et al. (2003). "Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E." *Clin Exp Allergy* **33**(10): 1443-1449.
- Jeannin, D.**, et al. (1992). "specific histamine release capacity of peptides selected from the modeled Der p 1 protein a major of Dermatophagoides pteronyssinus." *Mol Immunol* **29** 739-749.
- Jeannin, D.**, et al. (1993). "Immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides derived from the mite allergen Der p 1." *Mol Immunol* **30**:1511-1518.
- Karasuyama, H.**, et al. (2011). "Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity." *Allergy* **66**(9): 1133-1141.
- Kidon, M. I.**, et al. (2011). "Mite component-specific IgE repertoire and phenotypes of allergic disease in childhood: the tropical perspective." *Pediatr Allergy Immunol* **22**(2): 202-210.
- King, C.**, et al. (1996). "The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the dust mite Dermatophagoides pteronyssinus." *J Allergy Clin Immunol* **98**(4): 739-747.
- Knol, E. F.**, et al. (1991). "Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435." *J Allergy Clin Immunol* **88**(3 Pt 1): 328-338.
- Kringelum, J.V.**, et al. (2013). "Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes." *Mol Immunol* **53** (1-2):24-34.
- Kogevinas, M.**, et al. (2007). "Exposure to substances in the workplace and new-onset asthma: an international prospective population-based study (ECRHS-II)." *Lancet* **370**(9584): 336-341.
- Kubo, S.**, et al. (2003). "Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE." *J Immunol* **170**(2): 775-780.
- Lack, G.**, et al. (1996). "Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice." *J Immunol* **157**(4): 1432-1439.
- Lamkhioued, B.**, et al. (1995). "Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation." *Int Arch Allergy Immunol* **107**(1-3): 122-123.
- Larche, M.**, et al. (2006). "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **6**(10): 761-771.
- Lee, Y.**, et al. (1999). "Administration of interleukin-12 exerts a therapeutic instead of a long-term preventive effect on mite Der p I allergen-induced animal model of airway inflammation." *Immunology* **97**(2): 232-240.
- Lemieux, G. A.**, et al. (2007). "The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10." *J Biol Chem* **282**(20): 14836-14844.
- Leung, R.** and M. Jenkins (1994). "Asthma, allergy and atopy in southern Chinese school students." *Clinical & Experimental Allergy* **24**(4): 353-358.
- Leysen, J.**, et al. (2011). "The basophil activation test in the diagnosis of immediate drug hypersensitivity." *Expert Rev Clin Immunol* **7**(3): 349-355.

Références Bibliographiques

- Lopez, B. M.**, et al. (2013). "IL-4 blocks TH-1 polarizing inflammatory cytokine gene expression during monocyte derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation." J Allergy Clin Immunol **132**(6):1409-19.
- Luo, R.**, et al. (2000). "The relationship between airways inflammation and asthma severity." Am J Respir Crit Care Med **161**(1):9-16
- Linhart, B.**, and R. Valenta (2012). "Vaccines for allergy." Curr Opin Immunol **24**(3): 354-360.
- Liu, Y.**, et al. (2013). "Blockade of peanut allergy with a novel Ara h 2-Fc γ fusion protein in mice." J Allergy Clin Immunol **131**(1): 213-221 e211-215.
- Macfarlane, A. J.**, et al. (2000). "Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin." J Allergy Clin Immunol **105**(1 Pt 1): 99-107.
- MacGlashan, DW** (2013). "Basophil activation testing." J Allergy Clin Immunol **132** (4): 777-87.
- Magi, M.**, et al. (2004). "Heat denaturation affects the ProDer p 1 IgE reactivity and downregulates the development of the specific allergic response." J Allergy Clin Immunol **114**(3): 545-552.
- Mamessier, E.** and A. Magnan (2006). "Cytokines in atopic diseases: revisiting the Th2 dogma." Eur J Dermatol **16**(2): 103-113.
- Marone, G.**, et al. (2005). "Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma?" Trends Immunol **26**(1): 25-31.
- Maruo, K.**, et al. (1997). "Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease." J Allergy Clin Immunol **100**(2): 253-260.
- Melioli, G.**, et al. (2011). "The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms." Clin Biochem **44**(12): 1005-1011.
- Meno, K.**, et al. (2005). "The Crystal Structure of Recombinant proDer p 1, a Major House Dust Mite Proteolytic Allergen." The Journal of Immunology **175**(6): 3835-3845.
- Meyer, C. H.**, et al. (1994). "Comparison of the levels of the major allergens Der p I and Der p II in standardized extracts of the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus." Clin Exp Allergy **24**(11): 1041-1048.
- Min, B.** and W. E. Paul (2008). "Basophils: in the spotlight at last." Nat Immunol **9**(3): 223-225.
- Morita, M.**, et al. (1996). "Induction by interferons of human eosinophil apoptosis and regulation by interleukin-3, granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-5." Eur Cytokine Netw **7**(4): 725-732.
- Murray, J. S.** (1998). "How the MHC selects Th1/Th2 immunity." Immunology Today **19**(4): 157-162.
- Nathan, A. T.**, et al. (2009). "Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways." J Allergy Clin Immunol **123**(3): 612-618.
- Nieuwenhuis, H. K.**, et al. (1987). "Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like

Références Bibliographiques

- granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation." Blood **70**(3): 838-845.
- Nishiyama, C.**, et al. (1995). "Cloning and expression in Escherichia coli of cDNA encoding house dust mite allergen Der f 3, serine protease from Dermatophagoides farinae." FEBS Letters **377**(1): 62-66.
- Ohnmacht, C. and D. Voehringer** (2009). " Basophil effector function and homeostasis during helminth infection." Blood (12): 2816-25.
- Ong, S. and F. Chew** (2010). "Reconstructing the Repertoire of Mite Allergens by Recombinant DNA Technology. Allergy Frontiers: Future Perspectives. R. Pawankar, S. Holgate and L. Rosenwasser, Springer Japan. **6**: 49-64.
- Paul, W. E.** and J. Zhu (2010). "How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?" Nat Rev Immunol **10**(4): 225-235.
- Pauli, G.**, et al. (2008). "Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch allergic rhinoconjunctivitis." J Allergy Clin Immunol **122**(5):951-60.
- Pauli, G.** and J. C. Bessot (2003). "[Respiratory allergies: current data]." Rev Pneumol Clin **59**(2 Pt 1): 89-99.
- Petsky, H. L.**, et al. (2007). "Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults." Cochrane Database Syst Rev(2): CD005603.
- Pawankar, R.**, et al. (2012). "Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma in Asia a Pacific and the ARIA update 2008." World Allergy Organ J (suppl 3): S212-7.
- Pittner, G.**, et al. (2004). "Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens." Clinical & Experimental Allergy **34**(4): 597-603.
- Plager, D. A.**, et al. (2006). "Identification of basophils by a mAb directed against pro-major basic protein 1." J Allergy Clin Immunol **117**(3): 626-634.
- Platts-Mills, T. A.**, et al. (2009). "Pro: The evidence for a causal role of dust mites in asthma." Am J Respir Crit Care Med **180**(2): 109-113; discussion 120-101.
- Potter, P. C.**, et al. (2009). "Recommendations for competency in allergy training for undergraduates qualifying as medical practitioners: a position paper of the world allergy organization." World Allergy Organ J **2**(8): 150-154.
- Prussin, C.** and D. D. Metcalfe (2006). "5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S450-456.
- Pulsawat, P.**, et al. (2013). "Optimization of a Der p 2 based prophylactic DNA vaccine against house dust mite allergy." Immunol Lett **151**(1-2):13-30.
- Pulsawat, P.**, et al. (2010). "Production and immunogenicity of hypoallergenic codon-optimized DNA vaccine encoding mature Der p 1 allergen." J Investig Allergol Clin Immunol **20**(7): 582-590.
- Ress, J.**, et al. (1992). "Localisation of the major house dust mite allergen Der p I in the body of Dermatophagoides by ImmuStain." Clin Exp Allergy **22**(6):640-641.
- Repetto, B.**, et al. (1996). "Functional contributions of the FcepsilonRIalpha and FcepsilonRIgamma subunit domains in FcepsilonRI-mediated signaling in mast cells." The Journal of Immunology **156**(12): 4876-4883.

Références Bibliographiques

- Reshetniak Ia, K.** and E. A. Burshtein (1997). "[Assignment of a component of serine proteinase fluorescence spectrum to a cluster of tryptophan residues]." Biofizika **42**(4): 785-795.
- Reshetnyak, Y. K.**, et al. (2001). "Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues." Biophys J **81**(3): 1735-1758.
- Reuter, A.**, et al. (2006). "A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe." Clin Exp Allergy **36**(6): 815-823.
- Ricci, M.**, et al. (1997). "Source of IL-4 able to induce the development of TH2-like cells." Clin Exp Allergy **27**(5): 488-500.
- Ring, J.**, et al. (2001). "Why are allergies increasing?" Curr Opin Immunol **13**(6): 701-708.
- Robotham, J. M.**, et al. (2002). "Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen Jugr 1. J Allergy Clin Immunol **109**(1):143-9.
- Romagnani, S.**(1996). "Th1 and Th2 in human diseases." Clin Immunopathol **80**(3pt1):225-35.
- Romagnani, S.** (2004). "The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?" Immunology **112**(3): 352-363.
- Rosenberg, H. F.**, et al. (2007). "Eosinophil trafficking in allergy and asthma." J Allergy Clin Immunol **119**(6): 1303-1310; quiz 1311-1302.
- Rothenberg, M. E.** and S. P. Hogan (2006). "The eosinophil." Annu Rev Immunol **24**: 147-174.
- Rubinstein, N. D.**, et al. (2008). "Computational characterization of B-cell epitopes." Mol Immunol **45** (12):3477-89.
- Sali, A. and Blundell, T.** (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234** (3):779-815.
- Schroeder, J. T.** (2009). "Basophils beyond effector cells of allergic inflammation." Adv Immunol **101**: 123-161.
- Shakib, F.**, et al. (2008). "The molecular basis of allergenicity." Trends Immunol **29**(12): 633-642.
- Shimizu, H.**, et al. (2013). "Critical role of interleukin-5 in the development of a mite antigen induced chronic bronchial asthma model." Inflamm Res **62**(10):911-7.
- Shmidlin, F.**, et al (2002). "Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway." J Immunol **169**(9):5315-2
- Siracusa, M. C.**, (2011). "New insights into basophil biology initiators, regulators and effectors of type 2 inflammation." Ann N Y Acad Sci **1217**:166-77.
- Simon, H. U.** (2006). "Molecules involved in the regulation of eosinophil apoptosis." Chem Immunol Allergy **91**: 49-58.

Références Bibliographiques

- Smith, W. A.**, et al. (1994). "Cloning and sequencing of the Dermatophagoides pteronyssinus group III allergen, Der p III." Clinical & Experimental Allergy **24**(3): 220-228.
- Sokol, C.**, et al. (2009). "Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response." Nat Immunol **10**(7):713-720.
- Squillace, S. P.**, et al. (1997). "Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study." Am J Respir Crit Care Med **156**(6): 1760-1764.
- Stewart, G. A.**, et al. (1994). "A comparative study of three serine proteases from Dermatophagoides pteronyssinus and D. farinae." Allergy **49**(7): 553-560.
- Stewart, G. A.**, et al. (1991). "Faecally derived hydrolytic enzymes from Dermatophagoides pteronyssinus: physicochemical characterisation of potential allergens." Int Arch Allergy Appl Immunol **95**(2-3): 248-256.
- Stewart, G. A.**, et al. (1992). "The group III allergen from the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus is a trypsin-like enzyme." Immunology **75**(1): 29-35.
- Stone, K. D.**, et al. (2010). "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S73-80.
- Sudheer, P. S.**, et al. (2005). "Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c." Anaesthesia **60**(3): 251-256.
- Sun, G.**, et al. (2001). "Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells." J Immunol **167**(2): 1014-1021.
- Sun, J.**, et al. (2009). "SEPPA: a computational server for spatial epitope prediction of protein antigens." Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W612-616.
- Surdu, S.**, et al. (2006). "Childhood asthma and indoor allergens in Native Americans in New York." Environ Health **5**:22.
- Suurmond, J.**; et al. (2014). "Activation of human basophils by combined toll-like receptor and FcεRI triggering can promote Th2 skewing of naïve T helper cells." Eur J Immunol **44** (2):386-96.
- Szabo, S. J.**, et al. (1997). "Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells." J Exp Med **185**(5): 817-824.
- Szalai, K.**, et al. (2008). "Mimotopes identify conformational B-cell epitopes on the two major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2." Mol Immunol **45**(5): 1308-1317.
- Takai, T.**, et al. (2011). "Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases." Allergol Int **60**(1):25-35
- Takai, T.**, et al. (2005). "Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25 and alpha1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice." Int Arch Allergy Immunol **137**(3): 194-200.
- Takai, T.**, et al. (2002). "Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p 1 and Der f 1, and its implication in the blockade of proteolytic activity." FEBS Lett **531**(2): 265-272.
- Thomas, B.**, et al. (1991). "Ultrastructural localization of the allergen Der p I in the gut of the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus." Int Arch Allergy Appl Immunol **94**(1-4): 365-367.

Références Bibliographiques

- Thomas, W. R.** (2011). "The advent of recombinant allergens and allergen cloning." J Allergy Clin Immunol **127**(4): 855-859.
- Thomas, W. R.**, et al. (2002). "Characterization and immunobiology of house dust mite allergens." Int Arch Allergy Immunol **129**(1): 1-18.
- Thompson, J. D.**, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- Valenta, R.**, et al. (2011). "Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens." Allergy **66**(6): 775-783.
- Van de Pol, M. A.**, et al. (2012). "Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics." Allergy **67**(1):67-73.
- Van Hage-Hamsten, M.**, et al. (1995). "Localization of major allergens in the dust mite *Lepidoglyphus destructor* with confocal laser scanning microscopy." Clin Exp Allergy **25**(6): 536-542.
- van Oort, E.**, et al. (2002). "Maturation of *Pichia pastoris*-derived recombinant pro-Der p 1 induced by deglycosylation and by the natural cysteine protease Der p 1 from house dust mite." Eur J Biochem **269**(2): 671-679.
- Vrtala, S.**, et al. (2014). "Recombinant house dust mite allergens." Methods **66**(1):67-74.
- Voorhorst, R.**, et al. (1964). "IS A MITE (DERMATOPHAGOIDES SP.) THE PRODUCER OF THE HOUSE-DUST ALLERGEN?" Allerg Asthma (Leipz) **10**: 329-334.
- Wakahara, K.**, et al. (2013). "Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans." Allergy **68** (2):180-9.
- Walgraffe, D.**, et al. (2009). "A hypoallergenic variant of Der p 1 as a candidate for mite allergy vaccines." Journal of Allergy and Clinical Immunology **123**(5): 1150-1156.
- Wan, H.**, et al. (2001). "The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*." Clin Exp Allergy **31**(2): 279-294.
- Wan, H.**, et al. (1999). "Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions." J Clin Invest **104**(1): 123-133.
- Wardlaw, A. J.** (1994). "Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease." Postgrad Med J **70**(826): 536-552.
- Weghofer, M.**, et al. (2008). "Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients." Eur J Clin Invest **38**(12): 959-965.
- Weskamp, G.**, et al. (2006). "ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23." Nat Immunol **7**(12): 1293-1298.
- Xu, X.**, et al. (2010). "Evaluation of spatial epitope computational tools based on experimentally-confirmed dataset for protein antigens." Chinese Science Bulletin **55**(20): 2169-2174.

Références Bibliographiques

- Wuthrich, B.**, et al. (1995). "Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults." Int Arch Allergy Immunol **106**(2): 149-156.
- Yasueda, H.**, et al. (1993). "Allergens from Dermatophagoides mites with chymotryptic activity." Clin Exp Allergy **23**(5): 384-390.
- Yong, T. S.** and K. Y. Jeong (2009). "Household arthropod allergens in Korea." Korean J Parasitol **47 Suppl**: S143-153.
- Zhan, Z. K.**, et al. (2010). "Monoclonal antibodies against recombinant Der f 3 reveal localization of Der f 3 in the gut and faecal pellets of Dermatophagoides farinae." Exp Appl Acarol **52**(1): 63-71.
- Zhong, W;** et al. (2014). "Basophils as a primary inducer of the T helper type 2 immunity in a albumin induced allergic airway inflammation." Immunology **142** (2): 202-15.
- Zhong, Z. M.**, et al. (2011). "[Identification of the IgE-binding epitopes in main dust mite allergen Der p 1]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **31**(7): 1183-1186.