

**UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**U.F.R des Sciences de la Vie**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III**

***Discipline : Immunologie***

présentée et soutenue

par

Jean-Philippe BORGES

le 21 mars 2008

à la salle du Conseil de la Faculté de Pharmacie de Toulouse

**Titre :**

Caractérisation structurale et immunologique d'allergènes alimentaires:  
les protéines de transfert de lipides de fruits

---

***Directeur de thèse :***

Pr. Pierre ROUGE  
Dr. Annick BARRE

---

**JURY**

M. Pr. Moncef Guenounou,  
Mme. Pr. Denise-Anne Moneret-Vautrin,  
M. Pr. Pierre Rougé, Président  
Mme. Dr. Annick Barre,

Rapporteur, Président du jury  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Co-directrice de thèse

**UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**U.F.R des Sciences de la Vie**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III**

***Discipline : Immunologie***

présentée et soutenue

par

Jean-Philippe BORGES

le 21 mars 2008

à la salle du Conseil de la Faculté de Pharmacie de Toulouse

**Titre :**

Caractérisation structurale et immunologique d'allergènes alimentaires:  
les protéines de transfert de lipides de fruits

---

***Directeur de thèse :***

Pr. Pierre ROUGE  
Dr. Annick BARRE

---

**JURY**

M. Pr. Moncef Guenounou,  
Mme. Pr. Denise-Anne Moneret-Vautrin,  
M. Pr. Pierre Rougé, Président  
Mme. Dr. Annick Barre,

Rapporteur, Président du jury  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Co-directrice de thèse



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Denise-Anne Moneret-Vautrin et le Pr. Moncef Guenounou d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et ce, malgré leur emploi du temps bien rempli et les nombreuses charges qu'ils ont à assumer.

Je voudrais également remercier les médecins allergologues toulousains sans qui ces travaux n'auraient pu voir le jour, faute de sérums de patients allergiques aux fruits : le Pr. Alain Didier de l'Hôpital Larrey, le Dr. Fabienne Rancé du service des enfants malades de l'Hôpital Purpan et le Dr. Henry Perelroyzen de la Clinique Saint Jean Languedoc.

Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés à ceux qui m'ont accompagné au quotidien pendant mes trois années de thèse : le Pr. Pierre Rougé et le Dr. Annick Barre. Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour m'avoir si bien guidé et épaulé durant ces années de recherche et d'enseignement. Vos remarques, suggestions et surtout vos idées n'ont eu de cesse de me motiver à poursuivre encore et toujours dans la même voie. Continuez donc à faire de la « science désincarnée ».

Ces travaux n'auraient pas pu arriver à leur terme sans l'intervention, à la paillasse, de certaines personnes. La plus emblématique de toutes se reconnaîtra : merci beaucoup Raphaël pour tes conseils de manip et ta grande rigueur à la paillasse. Même si ta rigueur te fait parfois (et même souvent) passer pour un maniaque (et chez moi c'est un compliment), continue comme ça. Les stagiaires qui nous ont cotoyé ne me contrediront pas.

Merci également à toute l'équipe qui, de près ou de loin, a travaillé autour des protéines allergéniques : Camille, Sophie et Lala (les Miss « albumines 2S »), Cédric (le gersoïis rugbyman spécialiste des LTP de pomme), Géraldine (Miss Pharmacie mention « graines d'arachide »), Stéphanie, Marine, Roxane, Virginie et Sylvain (les spécialistes des allergènes des fruits et du kiwi) et enfin Guillaume et Anaïs (Miss et Mister PDT).

Je remercie également tous ceux qui m'ont permis, via des collaborations toujours fructueuses, de progresser dans de nombreux domaines de recherche. Merci donc à Gisèle, Carole et Michel pour les travaux sur la plate-forme protéomique, Alain et ses microscopes, Didier et son Gateway, Francis, Elodie, Marie-Thérèse, Christian, Jean-Jacques et Sandra pour les travaux effectués sur les cellules végétales et les plants de tabac. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Les travaux sur la caractérisation allergénique de rMald3 n'auraient pu se faire sans le concours du Pr. Hervé Benoist et toute l'équipe du Pr. Thierry Levade. Merci de m'avoir accueilli si gentiment durant l'été 2007 et de m'avoir laissé utiliser tout leur matériel de biologie cellulaire pour mes expériences sur les cellules de rat et la dégranulation de basophiles. Un grand merci à Delphine, Sandra, Bruno, Caro, Anne, Stéphane, Nicole et tou(te)s les autres pour leur chaleureux accueil.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Pr. Matthias Winterhalter et à toute son équipe de la Jacobs University de Bremen en Allemagne. Je ne pourrai oublier votre accueil si chaleureux et le temps passé à tester mes LTP sur des membranes biologiques via la technologie du BLM. Merci Mahendran d'avoir passé avec moi toutes ces longues nuits à essayer de trouer tes solides membranes avec les LTP.

Mes semaines de manips au laboratoire ont pu se dérouler à merveille grâce également au soutien de tous ceux qui partagent avec moi mes soirées et week-ends. Merci à Gilles, Pascale, Michel, Marc, Fabienne, Stéphane, Béa, Jacques, Laurence ... et tous ceux comme moi qui ressentent un manque lorsqu'un week-end s'est passé trop loin du néoprène.

Je dédie ce travail à mes parents, qui n'ont jamais cessé de me soutenir et à ma famille, si précieuse dans tous les moments de la vie.

## AVANT-PROPOS

Les allergies alimentaires posent un problème important de santé publique. Relativement peu documentées dans les années 1970-1980, elles touchent actuellement plus de 4% de la population tous âges confondus et s'accompagnent souvent de manifestations sévères (oedème oesophago-laryngé, choc anaphylactique, etc). L'histoire contemporaine des allergies alimentaires a été marquée, à partir des années 1980, par une recrudescence de l'allergie à l'arachide dont la prévalence a, en particulier aux États-Unis, doublé au cours des six dernières années. Durant ces dernières années sont également apparues des allergies liées aux fruits à coque (noix exotiques). Celles liées à d'autres allergènes végétaux (sésame, sarrasin, blé, fruits issus des Rosaceae) se sont particulièrement développées. De plus, l'apparition de manifestations cliniques graves a légitimé la création de réseaux de surveillance dont les compétences se sont progressivement étendues à l'ensemble des allergies.

Parallèlement, l'exploration des allergies alimentaires s'est enrichie de tests de diagnostic plus fiables permettant d'améliorer la prise en charge des allergies alimentaires. En effet, jusqu'à maintenant, faute de traitements préventifs régulièrement efficaces, la prévention des allergies alimentaires repose surtout sur l'éviction du (ou des) aliment(s) responsable(s). Malgré l'éviction, des réactions allergiques peuvent survenir et des traitements symptomatiques doivent alors être mis en oeuvre (antihistaminiques, corticoïdes, stylos auto-injecteurs d'adrénaline). L'avenir appartient à de nouvelles thérapeutiques comme l'immunothérapie spécifique, la modification des allergènes alimentaires, les agents bloquant la réaction allergique IgE-dépendante (les anti-IgE notamment). Les premiers résultats d'essais d'immunothérapie sublinguale sont prometteurs et l'arrivée de nouvelles approches vont sûrement permettre d'améliorer la prévention et le traitement des allergies alimentaires. Les répercussions sociales et psychologiques des allergies alimentaires restent considérables, que ce soit pour les patients (enfants ou adultes) mais aussi pour leurs familles.



# **TABLE DES MATIERES**



## **I - CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**

1 - Les allergies alimentaires	21
1.1 – Quelques données et chiffres clés	21
1.2 – Quelques pistes pour expliquer la prévalence des allergies alimentaires	23
1.3 – Prise en charge de l'allergie alimentaire	24
1.3.1 - Les symptômes et le diagnostic de l'allergie alimentaire	24
1.3.2 - Traitement des allergies: vers la désensibilisation et la vaccination	25
1.3.2.1 – Antihistaminiques et corticoïdes	25
1.3.2.2 – Les anticorps monoclonaux anti-IgE	26
1.3.2.3 - Désensibilisation et immunothérapie spécifique	27
1.3.2.4 – Application des outils de la biologie moléculaire au traitement des allergies	28
1.3.2.5 - Vers l'utilisation de vaccins	29
1.4 – La réaction allergique et les molécules impliquées	30
1.4.1 - Les réactions d'hypersensibilité et l'allergie	30
1.4.2 – Rôle de certaines cellules-clés	33
1.4.2.1 - Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)	33
1.4.2.2 - Les Immunoglobulines de type E (IgE)	33
1.4.2.3 - Les récepteurs des IgE	35
1.4.2.4 - Les cellules effectrices de la réaction allergique	36
1.4.2.4.1 - Les cellules intervenant dans la phase précoce: mastocytes et basophiles	37
1.4.2.4.2 - Les cellules intervenant dans la phase tardive de nature inflammatoire	38
1.4.3 - Balance Th1/Th2 et Lymphocytes T régulateurs	38
1.5 – Les allergènes	41
1.5.1 – Présentation générale et nomenclature	41
1.5.2 – Allergènes alimentaires de plantes et d'animaux	43
2 - Les Protéines de Transfert de Lipides des plantes (LTP)	47
2.1 - Présentation de la famille et de la structure	47
2.2 - Expression, localisation cellulaire et rôle présumé dans la défense des plantes	49
2.3 - Des protéines impliquées dans la signalisation des plantes ?	51
2.4 - Intervention dans le transport des lipides	51
2.5 - Les LTP allergènes majeurs des fruits	52
2.5.1 - Des allergènes de fruits aux panallergènes végétaux	53
2.5.2 - Caractérisation immunologique et structurale des LTP; importance de l'étude des épitopes	55

2.5.3 - La Pomme, un modèle pour l'étude des allergies	57
OBJECTIFS DE THESE	59
<b><u>II - MATERIEL ET METHODES</u></b>	
1 - Extraction et purification des LTP des fruits	67
1.1 – Extraction des protéines de la peau de fruits	67
1.2 – Purification des LTP sur colonne échangeuse de cations	67
1.2.1 - Principe	67
1.2.2 - Protocole	68
1.3 – Gel d'électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes	68
2 - Clonage des LTP	69
2.1 – Extraction des ARN	69
2.2 – Production des ADNc par RT-PCR	71
2.3 - Clonage du gène d'intérêt par la méthode Gateway	71
2.3.1 – Principe de la technologie Gateway	71
2.3.2 – Choix des différentes amorces	73
2.3.3 - Construction des adaptateurs pour le clonage avec peptide signal	73
2.3.4 - Construction des adaptateurs pour le clonage sans peptide signal	75
2.3.5 – Choix des vecteurs pour la réaction BP	77
2.3.6 – Choix des vecteurs pour la réaction LR	77
2.4 – Surexpression des LTP recombinantes	78
2.4.1 - En milieu Luria-Broth (LB)	78
2.4.2 - En milieu minimum M9 pour le marquage uniforme <sup>15</sup> N	78
2.5 – Purification des LTP recombinantes	79
3 – Caractérisation structurale des protéines allergéniques	79
3.1 – Spectrométrie de masse MALDI-TOF (mode réflectron et mode linéaire) et recherche dans les banques de données	79
3.1.1 – Principe de la spectrométrie de masse	79
3.1.2 – La spectrométrie de masse MALDI-TOF	81
3.1.3 – Expériences réalisées	85
3.2 – Spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC)	87
3.2.1 – Principe	87

3.2.2 – Utilisation de la spectroscopie de dichroïsme circulaire pour l'étude des LTP	89
3.3 – Modélisation moléculaire et prédiction des épitopes	91
3.3.1 – Recherche et alignements de séquences	91
3.3.2 – Profils HCA (Analyse des Clusters Hydrophobes)	91
3.3.3 – Modélisation moléculaire par homologie	92
3.3.4 – Prédiction des épitopes de surface	95
4 – Caractérisation immunologique des protéines allergéniques	97
4.1 – Production d'anticorps polyclonaux chez le lapin	97
4.1.1 - Anticorps obtenus à partir des protéines	97
4.1.2 – Anticorps obtenus à partir des peptides épitopiques	97
4.2 – Double diffusion en gel d'agarose (méthode Ouchterlony)	97
4.2.1 – Principe	97
4.2.2 – Réalisation	99
4.3 – Immuno-réactions (western-blots et dosages ELISA)	101
4.3.1 – Principes	101
4.3.2 - Western-blots	102
4.3.3 - Dosages ELISA	102
4.4 – Caractérisation des épitopes de surface (méthode Elispot)	103
4.4.1 – Principe	103
4.4.2 – Expériences réalisées	103
4.5 – Dégranulation de lignées de basophiles	105
4.5.1 – Principe	105
4.5.2 – Expériences réalisées	105
4.5.2.1 – Culture cellulaire	105
4.5.2.2 – Tests de dégranulation	106
4.5.2.3 – Mesure de l'activité $\beta$ -hexosaminidase	106
5 – Localisation immuno-histochimique des LTP	107
5.1 - Localisation en microscopie confocale	107
5.1.1 – Principe de la microscopie confocale à balayage laser	107
5.1.2 – Préparation des échantillons	108
5.1.3 – Expériences réalisées en microscopie confocale	108
5.2 - Localisation par microscopie électronique en transmission	109
5.2.1 – Principe de la microscopie électronique en transmission	109

5.2.2 – Expériences réalisées en microscopie électronique en transmission (marquage à l'or colloïdal)	109
5.3 – Immuno-tissu empreintes (Immuno-Tissue Printing, ITP)	110

### **III – RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>Partie 1: Analyse bioinformatique des LTP de fruits, prédiction des épitopes liant les IgE et validation biochimique</b>	113
1.1 - Etude biochimique des LTP de fruits	115
1.2 - Analyse des séquences des LTP de fruits	117
1.3 - Construction des modèles tridimensionnels	117
1.4 - Prédiction des épitopes	121
1.5 - Validation des prédictions	123
1.6 - Discussion	125
1.7 - Article « How reliable is the structural prediction of IgE-binding epitopes of allergens ? The case study of plant lipid transfer proteins » (2007) Jean-Philippe Borges, Annick Barre, Raphaël Culerrier, Nicolas Archimbaud, Alain Didier, Pierre Rougé. <i>Biochimie</i> 89(1):83-91.	127
<b>Partie 2: Etude de la carte épitopique des LTP de fruits et clonage de Mal d 3</b>	129
2.1 - Cartographie des épitopes par la technologie Spot	131
2.1.1 - Utilisation de sérums de Lapins immunisés avec les LTP	131
2.1.2 - Utilisation de sérums de patients allergiques aux LTP (allergie IgE-dépendante)	131
2.2 - Clonage de la LTP de pomme (rMal d 3)	132
2.2.1 - Clonage utilisant la technologie Gateway™	132
2.2.2 - Caractérisation structurale et immunologique	135
2.3 - Discussion	137
2.4 - Article: « Mapping and conformational analysis of the IgE-binding epitopes of lipid transfer protein allergens from Rosaceae fruits » (2007) Jean-Philippe Borges, Annick Barre, Raphaël Culerrier, Claude Granier, Alain Didier and Pierre Rougé. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> (sous presse).	140
2.5 - Article: « The lipid transfer protein allergen of apple (Mal d 3) is expressed as a correctly folded and functional recombinant protein in E. coli. » (2007) Jean-Philippe Borges, Raphaël Culerrier, Didier Aldon, Annick Barre, Hervé Benoist, Alain Didier, Pierre Rougé (soumis).	140
<b>Partie 3: Etude de la distribution et de la localisation des LTP dans les fruits</b>	141
3.1 - Dosages des LTP dans la peau et la pulpe de fruits	143
3.2 - Localisation immuno-cytochimique des LTP en microscopie confocale	

et électronique	147
3.3 - Discussion	149
3.4 - Article « The lipid transfer protein (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens » (2006) Jean-Philippe Borges, Alain Jauneau, Cédric Brulé, Raphaël Culerrier, Annick Barre, Alain Didier, Pierre Rougé. Plant Physiology and Biochemistry 44:535-542	151
<b><u>IV - CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b>	153
<b><u>V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	159

## LISTE DES FIGURES

### **I - CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**

- Figure 1 : Représentation schématique du FcεRI et de ses unités modulaires 34
- Figure 2 : Dialogue moléculaire entre TH<sub>1</sub> et TH<sub>2</sub> et implications dans la réaction allergique 39

### **II - MATERIEL ET METHODES**

- Figure 3: Clonage des LTP par la technologie Gateway™ 70
- Figure 4: Construction des adaptateurs par PCR pour le clonage Gateway™ des LTP de pêche et de pomme avec conservation du peptide signal 72
- Figure 5: Construction des adaptateurs par PCR pour le clonage Gateway™ de Mal d 3 sans conservation du peptide signal 74
- Figure 6: Carte du plasmide pDONR201 d'Invitrogen® 76
- Figure 7: Carte du plasmide de destination pDEST14 d'Invitrogen® 76
- Figure 8: Schéma simplifié d'un spectromètre de masse 80
- Figure 9: Principe général de la technique MALDI-TOF 84
- Figure 10: Origine de l'effet observé en spectroscopie de dichroïsme circulaire 86
- Figure 11: Spectres obtenus en dichroïsme circulaire associés à des éléments de structure secondaire retrouvés dans les protéines 88
- Figure 12: Principe d'obtention des profils HCA 90
- Figure 13: Double-diffusion en gel d'agarose (méthode Ouchterlony) 98
- Figure 14: Principe de la technique ELISA 100

### **III – RESULTATS ET DISCUSSION**

- Figure 15: Purification de Mal d 3, élution sur colonne échangeuse de cations et migration sur gel 114
- Figure 16: Comparaison des migrations des LTP en gel monodimensionnel 115
- Figure 17: Spectre Maldi-Tof de l'éluat n°3 de la purification de Mal d 3 114
- Figure 18: Immunoempreinte réalisée sur des LTP de fruits avec des IgE de patients allergiques aux fruits (pomme, pêche, kiwi) 116
- Figure 19: Alignement multiple de différentes LTP végétales 116
- Figure 20: Comparaison des profils HCA des LTP de fruits 118
- Figure 21: Superposition du modèle et de la structure de Pru p 3 119
- Figure 22: Modèle tridimensionnel de Pru p 3 120
- Figure 23: Alignement des LTP et mise en évidence d'un épitope consensus 123
- Figure 24: Localisation de l'épitope consensus sur différentes LTP de fruits 122
- Figure 25: Expériences d'inhibition ELISA 124
- Figure 26: Cartes épitopiques de Mal d 3 130
- Figure 27: Epitopes de LTP de fruits liant les IgG et les IgE 130
- Figure 28: Représentation des différents clones obtenus par la technologie Gateway 132
- Figure 29: Expression et purification de r Mal d 3 chez *E. coli* 133
- Figure 30: Caractérisation de la masse de r Mal d 3 par spectrométrie de masse 134
- Figure 31: Spectre <sup>1</sup>H RMN homonucléaire de r Mal d 3 134
- Figure 32: Spectres de dichroïsme circulaire de n Mal d 3 et de r Mal d 3 135
- Figure 33: Inhibition de l'interaction IgE – Mal d 3 mesurée en ELISA 136

- Figure 34: Tests de relargage d'histamine de basophiles de rat	136
- Figure 35: Caractérisation des épitopes de Mal d 3	138
- Figure 36: Double diffusion en gel (Ouchterlony)	143
- Figure 37: Immuno-empreintes tissulaires effectuées sur coupes de fruits	144
- Figure 38: Étude de la localisation des LTP dans le péricarpe de différents fruits étudiée par microscopie à champ clair et microscopie confocale à balayage laser	146
- Figure 39: Étude de la localisation des LTP dans le péricarpe de différents fruits et réalisée par microscopie électronique après marquage à l'or colloïdal	148

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **I - CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**

- Tableau 1 : Principaux aliments allergéniques classés par famille selon l'AFSSA janvier 2002 22
- Tableau 2: Les familles de PR-Protéines selon la classification de Van Loon (van Loon and van Strien, 1999), adapté de Hoffmann-Sommergruber, 2002 et Malandain H, 2004 42
- Tableau 3: Protéines PR-like ayant montré une allergénicité, adapté de Malandain H, 2004 44
- Tableau 4: Les LTP identifiées comme allergéniques dans les aliments d'origine végétale, le latex et les pollens, adapté de Salcedo et al., 2007 54

### **II - MATERIEL ET METHODES**

- Tableau 5: Matrices les plus couramment utilisées pour l'étude de biomolécules en spectrométrie de masse MALDI-TOF 82
- Tableau 6: Echelles des profils physico-chimiques utilisés pour la prédiction des épitopes 94

### **III – RESULTATS ET DISCUSSION**

- Tableau 7: Contenu en LTP (en  $\mu\text{g}$  / g de fruit) de la peau et la pulpe de fruits 145





## LISTE DES ABBREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
Asp	Acide Aspartique
BCA	Acide bicinchoninique
BSA	Albumine Sérique de Boeuf
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
DC	Dichroïsme circulaire
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléotide tri-phosphate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
Glu	Acide glutamique
H <sub>2</sub> O	Eau
IgA	Immunoglobuline de classe A
IgE	Immunoglobuline de classe E
IL	Interleukines
IPTG	Isopropyl-β-thio-galactoside
KCl	Chlorure de potassium
LB	Milieu Luria-Broth
LTP	Protéines de transfert de lipides
Lys	Lysine
Na ou Na <sup>+</sup>	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Soude
OAS	Syndrome Allergique Oral
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Saline; Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pI	Point isoélectrique
PK	Prausnitz et Küstner
PMSF	Phénylméthylsulphonate de fluor
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PVP-40	Polyvinylpyrrolidone de poids moléculaire 40 g/mol

qsp	Quantité suffisante pour
RNAse	Ribonucléase
RPE	Tampon Qiagen©
RT-PCR	Transcription reverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
RW1	Tampon Qiagen©
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TCA	Acide trichloroacétique
TE	Tris-EDTA
TFA	Acide trifluoroacétique
TLP	Thaumatococcus-like protein
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane (ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol)
v, vol.	Volume

# **CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - Les allergies alimentaires	21
1.1 – Quelques données et chiffres clés	21
1.2 – Quelques pistes pour expliquer la prévalence des allergies alimentaires	23
1.3 – Prise en charge de l'allergie alimentaire	24
1.3.1 - Les symptômes et le diagnostic de l'allergie alimentaire	24
1.3.2 - Traitement des allergies: vers la désensibilisation et la vaccination	25
1.3.2.1 – Antihistaminiques et corticoïdes	25
1.3.2.2 – Les anticorps monoclonaux anti-IgE	26
1.3.2.3 - Désensibilisation et immunothérapie spécifique	27
1.3.2.4 – Application des outils de la biologie moléculaire au traitement des allergies	28
1.3.2.5 - Vers l'utilisation de vaccins	29
1.4 – La réaction allergique et les molécules impliquées	30
1.4.1 - Les réactions d'hypersensibilité et l'allergie	30
1.4.2 – Rôle de certaines cellules-clés	33
1.4.2.1 - Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)	33
1.4.2.2 - Les Immunoglobulines de type E (IgE)	33
1.4.2.3 - Les récepteurs des IgE	35
1.4.2.4 - Les cellules effectrices de la réaction allergique	36
1.4.2.4.1 - Les cellules intervenant dans la phase précoce: mastocytes et basophiles	37
1.4.2.4.2 - Les cellules intervenant dans la phase tardive de nature inflammatoire	38
1.4.3 - Balance Th1/Th2 et Lymphocytes T régulateurs	38
1.5 – Les allergènes	41
1.5.1 – Présentation générale et nomenclature	41
1.5.2 – Allergènes alimentaires de plantes et d'animaux	43
2 - Les Protéines de Transfert de Lipides des plantes (LTP)	47
2.1 - Présentation de la famille et de la structure	47
2.2 - Expression, localisation cellulaire et rôle présumé dans la défense des plantes	49
2.3 - Des protéines impliquées dans la signalisation des plantes ?	51
2.4 - Intervention dans le transport des lipides	51
2.5 - Les LTP allergènes majeurs des fruits	52
2.5.1 - Des allergènes de fruits aux panallergènes végétaux	53
2.5.2 - Caractérisation immunologique et structurale des LTP; importance de l'étude des épitopes	55
2.5.3 - La Pomme, un modèle pour l'étude des allergies	57

## 1 - Les allergies alimentaires

### 1.1 – Quelques données et chiffres clés

Les allergies alimentaires ont doublé en quelques années et entraînent, dans les pays développés, des surcoûts médicaux de plus en plus importants (Mills et al., 2007; Sicherer and Leung, 2007). Près de 4% des adultes et 8% des enfants sont concernés. Néanmoins, l'épidémiologie de l'allergie alimentaire est moins connue que l'asthme, les rhinites allergiques ou les eczémas qui ont bénéficié d'un grand nombre d'études internationales (Papageorgiou, 2002; Rancé, 2007). Les manifestations cliniques associées à l'allergie alimentaire ne sont pas spécifiques, particulièrement celles qui touchent l'appareil digestif. En effet, certains aliments peuvent être à l'origine de plusieurs maladies, par intolérance ou par intoxication, qui présentent des manifestations cliniques très proches de celles des allergies vraies. Cependant, d'un point de vue physiopathologique, il ne s'agit pas d'un mécanisme immuno-allergique.

Une étude épidémiologique, publiée en France en 2001 (Kanny et al., 2001), a notamment montré que la prévalence des allergies alimentaires dans la population française se situait autour de 3,2%. Un questionnaire a été envoyé à 44000 personnes (33110 réponses), correspondant à un échantillon représentatif de la population française. Après recueil du questionnaire et sélection de réponses montrant une ou des allergies alimentaires (1129 personnes sur un total de 33110), les auteurs ont montré que les personnes allergiques étaient, pour 80% d'entre-elles, des citoyens. Les allergènes les plus fréquents étaient les *Rosaceae* (14%), les légumes (9%), le lait (8%), les crustacés (8%), les fruits impliqués dans des réactions croisées avec le latex (5%), les oeufs (4%), les fruits à coque (3%) et l'arachide (1%). Des sensibilisations aux pollens ont également été observées et corrélées à la présence d'asthme, de rhinite et d'allergie aux fruits. Les patients allergiques au latex avaient 4 fois plus de risque de souffrir également d'allergie alimentaire. Les manifestations cliniques observées étaient la dermatite atopique pour les patients âgés de moins de 6 ans, l'asthme de 4 à 6 ans et les chocs anaphylactiques pour les patients adultes de plus de 30 ans. Ces chocs anaphylactiques étaient corrélés à la prise de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens ou à la consommation d'alcool. Ces dernières observations ont permis aux cliniciens et aux allergologues de mettre en garde ces « populations à risque » lors de visites allergologiques. Chez les enfants, ce chiffre oscille entre 3 et 8% et a doublé en 5 ans.

<b>Groupe</b>	<b>Aliments allergéniques concernés</b>
Latex	bananes, avocats, châtaignes, kiwis
Noix	amande, noisette, noix, noix du Brésil, noix de cajou, noix de pécan, pignon, pistache
Ombellifères	aneth, carottes, céleri, fenouil, persil, graines de carvi, graines d'anis, coriandre
Rosacées	abricots, cerises, fraises, framboises, noisettes, pêches, poires, pommes, prunes
Légumineuses	arachide, soja, pois, haricots, lentille, fèves

**Tableau 1: Principaux aliments allergéniques classés par famille  
selon l'AFSSA - janvier 2002**

Contrairement à une idée reçue, les allergies alimentaires peuvent être graves, parfois mortelles. Les conséquences les plus dramatiques concernent les réactions généralisées, en particulier oesophago-laryngés. Relativement rares chez les enfants, les chocs anaphylactiques et les oedèmes sont plus fréquents à partir de l'adolescence. Leur nombre est en augmentation dans la population adulte et particulièrement chez les enfants. Enfin, la qualité de vie des malades et de leur entourage est considérablement altérée. Face à de tels risques, le meilleur traitement reste la prévention : il faut éviter tous les aliments responsables. En cas d'anaphylaxie, le traitement consiste en une injection immédiate d'adrénaline suivie d'une évaluation et surveillance en milieu hospitalier.

En janvier 2002, l'Agence Française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) dressait un état des lieux préoccupant (Dubuisson et al., 2002). Le rapport précise que « dans de nombreux pays dont la France, la plupart des allergologues recommandent aux personnes possédant des antécédents d'accidents anaphylactiques de porter sur elles des seringues d'adrénaline prêtes à l'emploi ».

Bien que peu de chiffres soient disponibles, les allergies seraient en augmentation depuis le début des années 1980 dans les pays développés : allergies alimentaires, mais également l'asthme, la dermatite atopique, la rhinite allergique, etc. Classés par groupes (tableau 1), de nombreuses sources d'allergènes sont mises en cause dans le cas des allergies alimentaires.

Le bilan de l'AFSSA rapporte qu'en France « entre les années 1982 et 1995, le nombre de formes sévères aurait été multiplié par un facteur 5 ». La dernière enquête épidémiologique à l'échelle nationale rapporte que 2,1 à 3,8 % de la population générale souffre d'allergies alimentaires. Bien que pouvant survenir à tout âge, les enfants sont les plus exposés.

## **1.2 – Quelques pistes pour expliquer la prévalence des allergies alimentaires**

Les patients souffrant d'allergies alimentaires ont souvent été sensibilisés via des allergènes polliniques. Pourtant, des cas de sensibilisation directe par les aliments en plus des réponses IgE dues aux réactions croisées avec des allergènes polliniques inhalés ont été signalés (Mills et al., 2007). Les prédispositions génétiques jouent un rôle important dans le développement actuel des allergies, mais peu de choses sont connues sur l'origine génétique des allergies alimentaires. L'augmentation croissante des cas d'asthme et d'allergies de toutes sortes peut également être due à la diminution depuis des décennies, de la présence de micro-organismes dans l'environnement proche du nouveau-né et de l'enfant. Des études sont en cours dans de nombreux pays pour prendre en compte tous ces aspects. En Europe, le projet EuroPrevall (de Blok et al., 2007) vise à



comprendre, par une approche globale, les causes et conséquences des allergies alimentaires.

L'hypothèse hygiéniste apporte aussi une autre explication. Chez le nouveau-né, le système immunitaire a une prédominance de lymphocytes Th<sub>2</sub> qui favorisent la production de molécules impliquées dans l'allergie, avant de s'orienter vers une activité adaptée à la lutte contre les infections. Mais pour que cette bascule opère, l'organisme pourrait avoir besoin dans les premiers mois de la vie de réagir à différentes infections.

## 1.3 – Prise en charge de l'allergie alimentaire

### 1.3.1 - Les symptômes et le diagnostic de l'allergie alimentaire

Le nourrisson peut se sensibiliser à l'aliment très tôt, même *in utero* pendant la grossesse. L'allergie alimentaire des nourrissons touche souvent le tube digestif (vomissements, diarrhées, douleurs abdominales) et provoque parfois une atrophie villositaire totale avec diarrhée persistante comme c'est le cas dans l'intolérance au gluten. Chez l'enfant plus grand, les symptômes sont très divers : choc anaphylactique, urticaire, oedème des lèvres et de la langue, dermatite atopique, diarrhée, vomissements, coliques, eczéma, asthme, infections ORL à répétition, etc. La part de l'allergie alimentaire dans les chocs anaphylactiques est de 3 à 15 % (Golden, 2007) et elle serait responsable de 8% des crises d'asthme. Dans les dermatites atopiques (eczémas), des chiffres de 30 à 50% ont été avancés. Plus la dermatite atopique est sévère, plus il est probable qu'une allergie alimentaire est en cause.

L'allergie au latex est à l'origine d'allergies croisées avec certains végétaux (Wagner and Breiteneder, 2002). L'allergie aux colorants et autres additifs alimentaires est souvent suspectée mais difficile à démontrer. Les principaux additifs alimentaires incriminés sont surtout des colorants azoïques de synthèse comme le bleu patenté (E131), l'érythrosine (E127), le rouge cochenille A (E124) et le jaune de tartrazine (E102). Le rôle des conservateurs chimiques est quant à lui mal connu. Les plus sensibilisants sont probablement ceux à base de métabisulfites de sodium (E222 à E227). Les sulfites sont si répandus dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique que leur mise en cause n'est pas toujours possible.

Le diagnostic d'une allergie alimentaire est souvent difficile. Il nécessite le recours à un immuno-allergologue spécialisé en allergie alimentaire qui décidera de la stratégie de prise en charge.

Une éruption urticarienne après les repas peut être par exemple un élément de présomption. Le risque d'allergie alimentaire est de 20% lorsqu'aucun des deux parents n'est allergique. Ce risque

est de 40% lorsqu'un des parents est allergique et monte à 60% lorsque les deux parents sont atopiques. La tenue d'un journal alimentaire où l'ingestion de tous les aliments est notée scrupuleusement peut aider le médecin. Les tests cutanés, le dosage des IgE spécifiques, les tests de provocation (ou les régimes d'exclusion) permettent en général de poser le diagnostic.

Le problème des allergènes "masqués" est important. Les exemples sont de plus en plus nombreux : il y a des caséinates dans le bouillon de poulet, du lysozyme de blanc d'oeuf dans certains fromages (gruyère, emmenthal) par exemple. L'huile d'arachide contenue dans certains laits diététiques a été à l'origine de dermatites atopiques. Actuellement, les laits adaptés n'en contiennent plus.

### **1.3.2 - Traitement des allergies: vers la désensibilisation et la vaccination**

Plusieurs types de traitement existent. Certains ciblent directement les molécules impliquées dans la réaction immunitaire (antihistaminiques, anticorps anti-FcεRI) alors que d'autres essaient de bloquer la réaction allergique (anticorps anti-IgE). Enfin, les dernières découvertes et expérimentations en cours permettent aux patients d'entrevoir une solution durable à leur pathologie (désensibilisation, hypoallergènes recombinants, vaccins).

#### **1.3.2.1 – Antihistaminiques et corticoïdes**

Un antihistaminique est un médicament qui sert à réduire ou à éliminer les effets de l'histamine, par action sur les récepteurs de l'histamine. Seuls les agents qui ont pour effet thérapeutique principal la modulation négative des récepteurs de l'histamine sont appelés antihistaminiques. Dans l'usage général, le terme antihistaminique désigne uniquement les antagonistes des récepteurs H1, appelés antihistaminiques H1 (Leurs et al., 2002; Simons, 2004). Utilisés depuis plus de cinquante ans dans le traitement de diverses manifestations d'origine allergique, les antihistaminiques H1, en se fixant sur les récepteurs H1 à l'histamine, inhibent d'une manière compétitive les effets de l'histamine et plus particulièrement l'effet vasodilatateur et l'augmentation de la perméabilité capillaire à l'origine des réactions œdémateuses. Ils ne s'opposent pas aux réactions antigène/anticorps, ni à la libération d'histamine. Administrés par voie orale, ils sont généralement prescrits dans le cas d'une rhinite allergique légère. Très efficaces, ils constituent le principal traitement des allergies respiratoires (avec les corticoïdes). Utilisés également dans les allergies cutanées, ces médicaments diminuent rapidement la rougeur et le gonflement de la peau. Les plus récents d'entre eux, appelés « antihistaminiques de deuxième génération », induisent de moins en moins de somnolence et d'autres effets secondaires chez les patients traités. Les plus connus et commercialisés des antihistaminiques H1 sont la cétirizine (Zyrtec<sup>®</sup>), la lévocétirizine

(Xyzall<sup>®</sup>), la loratadine (Clarityne<sup>®</sup>) et la desloratadine (Aerius<sup>®</sup>). La cétirizine, dérivé carboxylé de l'hydroxyzine utilisé comme anxiolytique (Atarax<sup>®</sup>), outre son effet antihistaminique H1, inhibe également la libération de diverses cytokines et des leucotriènes.

Les corticoïdes administrés par voie nasale sont très efficaces face à une rhinite allergique légère. Pour des symptômes plus sévères, des corticoïdes par voie générale peuvent également être prescrits. Bien que non spécifiques de l'allergie, ils apportent aussi une aide précieuse dans le traitement des allergies cutanées car ils font disparaître l'inflammation. Utilisés, aussi sous forme de crèmes, ils sont classés en différentes classes selon leur puissance d'action sur les maladies cutanées. Mais, ils possèdent de nombreux effets secondaires et doivent être administrés avec précaution.

### 1.3.2.2 – Les anticorps monoclonaux anti-IgE

Développés au cours des années 1970 (Köhler and Milstein, 1975), les anticorps monoclonaux constituent aujourd'hui un apport marquant en thérapie clinique. Visant surtout les pathologies cancéreuses, le marché des anticorps monoclonaux thérapeutiques ne cesse d'augmenter et constitue sans aucun doute une des avancées majeures des 30 dernières années en thérapie clinique. En allergologie, les thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-IgE visent à neutraliser les IgE secrétées par le patient au cours de la phase de sensibilisation, mais aussi à inhiber leur production pour atténuer les réactions d'hypersensibilité de type I (Chang et al., 2007). Cette thérapie est basée sur l'utilisation d'anticorps de souris IgG<sub>1</sub> humanisés qui se lient aux IgE libres, aux IgE fixées sur membrane des lymphocytes B, mais pas aux IgE fixées sur les récepteurs de haute ou de basse affinité des mastocytes et des basophiles. Comme une immunoglobuline IgG<sub>1</sub> humaine, les anticorps IgG<sub>1</sub> humanisés ont la particularité d'être circulants et d'avoir une durée de demi-vie assez longue (21 jours). Depuis maintenant près de 20 ans, les anti-IgE thérapeutiques ont été utilisées dans de nombreux tests cliniques de phase II et III. Après plusieurs essais avec des anticorps différents, la mise sur le marché de l'Omalizumab<sup>®</sup> (Presta et al., 1993) a permis de traiter des patients atteints d'asthme allergique modéré à sévère. Des patients atteints de rhinites allergiques ont également été traités avec succès, permettant ainsi d'envisager son utilisation dans le traitement d'allergies alimentaires (arachide), de dermatites atopiques ou d'allergies au latex (Siebenhaar et al., 2007). Il a aussi été découvert, *in vitro*, des effets modulateurs de l'Omalizumab<sup>®</sup> sur l'expression des récepteurs FcεRI. Bien dosé, l'Omalizumab<sup>®</sup> se liant aux IgE libres ferait baisser de manière conséquente leur taux et, par réaction, les cellules s'adaptent en inhibant l'expression des récepteurs FcεRI présents sur membrane des mastocytes (Gomez et al.,

2007).

Actuellement parfaitement maîtrisée, cette technologie de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-IgE fait appel à des bio-réacteurs de grande capacité (12 à 15 000 litres) permettant la culture en masse de lignées cellulaires d'ovaires de hamster chinois (cellules CHO) (Wurm, 2004). Dans un futur très proche, l'utilisation d'anticorps recombinants et non d'anticorps de souris humanisés pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de ce traitement.

### 1.3.2.3 - Désensibilisation et immunothérapie spécifique

La désensibilisation, dont le principe consiste à administrer de petites quantités de la substance allergisante dans l'organisme pour qu'il s'y habitue progressivement, offre aussi des possibilités thérapeutiques intéressantes. Dans l'allergie aux pollens, ce traitement peut d'ailleurs être désormais réalisé par voie sublinguale (Frew, 2007), une voie d'administration évidemment plus confortable pour les malades.

L'immunothérapie par voie sublinguale permet de réduire les symptômes cliniques d'allergies respiratoires, mais son efficacité dans l'allergie reste à démontrer. L'absence de protocoles standardisés et la grande variabilité des allergènes utilisés (protocoles « faits-maison ») ne permettent pas d'apprécier son efficacité. Très peu d'informations sont disponibles sur son effet protecteur en allergie alimentaire et sur sa durée (Rolinck-Werninghaus et al., 2005). Très récemment, un patient allergique au kiwi a été traité avec succès par voie sublinguale (Kerzl et al., 2007). Après un traitement de 6 ans, incluant des périodes d'arrêt, l'effet « protecteur » de l'immunothérapie a pu être prouvé grâce à des tests de provocation orale négatifs et des dosages spécifiques d'IgE en forte baisse. L'utilisation de protéines recombinantes permettrait sûrement de mieux standardiser cette technique et d'en préciser l'efficacité (Valenta, 2002b; Valenta and Kraft, 2002).

Un autre type d'immunothérapie utilisant des peptides est également utilisée. En effet, afin d'éviter les manifestations cliniques souvent observées chez de nombreux patients au cours de la désensibilisation par des extraits allergéniques, l'idée d'utiliser de petits peptides correspondant aux épitopes reconnus par les lymphocytes T a été proposée (Larché, 2007). Le principal avantage de cette approche est l'impossibilité, en théorie, d'activer la dégranulation des mastocytes et basophiles par le pontage des IgE. En effet, les peptides sont généralement choisis pour représenter un épitope majeur (ou consensus) et sa longueur est adaptée pour éviter le pontage des IgE. Des études cliniques très prometteuses ont permis l'application de cette immunothérapie à des cas d'allergies aux poils de chat (Fel d 1) (Alexander et al., 2005) et au venin d'abeille (Api m 1) (Texier et al.,

2000). Ces études ont montré par exemple que l'utilisation de peptides permettait l'induction de populations de cellules T CD4<sup>+</sup> à activité régulatrice, mais aussi la réduction des réponses IL-13 et IFN $\gamma$  et la surproduction d'IL-10 sans activation des cytokines Th<sub>2</sub> spécifiques. D'autres études seraient nécessaires pour définir les doses optimales de peptides à utiliser dans ce type d'immunothérapie, de même que l'intervalle entre deux prises et la voie d'administration

#### 1.3.2.4 – Application des outils de la biologie moléculaire au traitement des allergies

Des allergènes recombinants sont actuellement de plus en plus utilisés dans le diagnostic des allergies (Asero et al., 2007; Ballmer-Weber et al., 2007). Par exemple, une étude récente menée par une équipe française avec des allergènes recombinants de l'arachide (rAra h 1, rAra h 2 et rAra h 3) a permis de comparer la réactivité de ces allergènes recombinants dans des tests cutanés par rapport aux résultats obtenus par dosage des IgE spécifiques (Astier et al., 2006). Une très bonne corrélation a été obtenue, permettant ainsi d'envisager l'utilisation des protéines recombinantes dans des tests de diagnostic. Mais les allergènes recombinants pourraient également être utilisés en tant qu'agent thérapeutique dans des protocoles de désensibilisation et d'immunothérapie (Valenta, 2002a).

Afin d'éviter la survenue de réaction allergique lors des protocoles de désensibilisation, l'utilisation d'allergènes recombinants mutés dans les zones épitopiques permet d'éliminer l'interaction avec les IgE. Afin d'identifier les acides aminés à muter, des peptides de 10 à 15 acides aminés peuvent être synthétisés, comportant une ou plusieurs mutations ponctuelles (Cocco et al., 2007). Ces peptides immobilisés sur membrane sont testés avec des IgE de patients allergiques aux protéines d'intérêt pour déterminer les acides aminés immunodominants responsables de l'interaction (acides aminés dont la mutation supprime l'interaction avec des IgE). Après substitution par mutagenèse dirigée et production des protéines recombinantes, ces hypoallergènes recombinants peuvent alors être utilisés dans des protocoles de désensibilisation. D'autres études ont aussi utilisé les technologies de modification de gènes pour réduire l'allergénicité d'allergènes polliniques. Dans une étude récente (Vrtala et al., 2007), l'allergène Phl p 6 a été produit sous plusieurs formes tronquées (trois fragments recouvrant au total toute la protéine) et il a été démontré, par des approches biochimiques et immunologiques, que la perte d'une seule des quatre hélices  $\alpha$  de l'allergène était corrélée avec une forte diminution de l'interaction avec des IgE de patients allergiques au pollen. Cela n'a rien d'étonnant car la suppression d'un fragment aussi important qu'une hélice  $\alpha$  modifie considérablement la structure même de l'allergène.

La maîtrise des biotechnologies végétales a conduit plusieurs équipes de recherche à mettre

au point des stratégies pour réduire ou inhiber l'expression d'une protéine allergénique dans un aliment. Ainsi, des techniques faisant appel à l'ARN interférent (RNAi) ont été utilisées. Cette technique, mise au point dans les années 1990, a valu à ses inventeurs le Prix Nobel de Médecine en 2006 (Fire et al., 1998). Elle permet d'effectuer l'inactivation (« knockout » en anglais) d'un gène donné (inhibition complète de son expression) et ainsi, de générer des lignées de plantes n'exprimant pas la protéine allergénique. Des études ont ainsi permis de produire des arachides n'exprimant pas Ara h 2, l'un des allergène majeur (Dodo et al., 2007). Néanmoins, la surveillance de ces pratiques et l'étude systématique du potentiel allergénique de toute nouvelle protéine issue du génie génétique et/ou d'Organismes Génétiquement Modifiés doivent être poursuivies. Ces nouvelles technologies devraient permettre d'obtenir des hypoallergènes ou, avec les OGM de deuxième génération, des aliments comportant des améliorations nutritionnelles non négligeables sur des OGM hypoallergéniques (Moneret-Vautrin, 2006).

#### 1.3.2.5 - Vers l'utilisation de vaccins

Des travaux récents permettent d'envisager la création de vaccins pour différents types d'allergies. Par exemple, des protéines recombinantes dépourvues d'épitopes conformationnels ont été produits pour les allergènes majeurs des Fagales (Wallner et al., 2007) (allergènes du groupe Bet v 1). Les molécules ont été générées par mutagenèse aléatoire (« DNA Shuffling ») et, après tests fonctionnels, une série de protéines recombinantes a été sélectionnée. Ces protéines, induisant une activité des lymphocytes T mais n'interagissant pas avec les IgE de patients, pourraient être utilisées comme vaccins.

Une autre étude récente a permis de générer des vaccins en étudiant précisément la liaison des IgE aux récepteurs (Peng et al., 2007). Trois peptides synthétiques correspondant à la séquence entière du récepteur humain aux IgE ont été fusionnés afin de permettre l'interaction avec des IgE libres. Des tests ont été réalisés avec des IgE humaines, de rats et de souris. Des analyses effectuées chez des patients allergiques traités avec ce vaccin ont ainsi montré une diminution des taux d'IgE libres, permettant ainsi d'envisager une application de cette technologie à d'autres patients allergiques.

Enfin, des essais de vaccination sont actuellement en cours avec des allergènes génétiquement modifiés (Niederberger et al., 2007). Une vaccination a été tentée avec une forme recombinante et hypoallergénique de l'allergène majeur du bouleau Bet v 1, sur des patients présentant une allergie croisée « bouleau-fruits ». Des IgG reconnaissant Bet v 1 ont ainsi été caractérisées après la vaccination, induisant également une moins bonne interaction entre Bet v 1 et les IgE. L'étude est en cours, mais les premiers résultats obtenus sont très encourageants. L'injection

de l'hypoallergène pur a permis de réduire les symptômes des réactions allergiques chez de nombreux patients, dès le début du traitement. De plus, il est probable qu'un traitement plus long puisse être bénéfique pour un grand nombre de patients et que des protocoles adaptés à chaque patient soient à définir.

## **1.4 – La réaction allergique et les molécules impliquées**

### **1.4.1 - Les réactions d'hypersensibilité et l'allergie**

Quand un individu a été immunologiquement stimulé, un nouveau contact avec l'antigène entraîne une relance secondaire de la réponse immunitaire. Cependant, la réaction peut être excessive et conduire à des lésions tissulaires. On parle alors de « réactions d'hypersensibilité ». Les mécanismes sous-jacents à ces réactions inappropriées sont ceux normalement utilisés par le corps pour combattre les infections. Coombs et Gell ont défini quatre types d'hypersensibilité (Gell and Coombs, 1963). Les types I, II et III dépendent de l'interaction entre antigène et anticorps humoraux, alors que le type IV implique la reconnaissance de l'antigène par des cellules T.

Les réactions de type I (immédiate, à médiation IgE), se rencontrent dans le cas d'allergie des voies respiratoires supérieures (rhinite allergique), des voies respiratoires inférieures (asthme), dans l'eczéma atopique, le choc anaphylactique survenant le plus souvent avec les médicaments (curare, antibiotiques) ou les venins d'hyménoptères. On les rencontre dans la plupart des allergies provoquées par les aliments.

Les réactions de type II (cytotoxique et cytolytique), mettent en jeu des IgG spécifiques capables d'activer le complément et de provoquer une destruction des cellules sanguines en cas d'allergie médicamenteuse (cytopénies médicamenteuses). Cette hypersensibilité de type II n'intervient que de manière exceptionnelle dans les réactions immunitaires déclenchées par les aliments.

Les réactions de type III (semi-tardive, à complexes immuns), mettent en jeu des complexes immuns circulants formés par l'association d'IgG ou IgE spécifiques avec l'allergène. Ces complexes précipitent dans les vaisseaux et peuvent provoquer la maladie sérique, des pneumopathies et néphropathies immuno-allergiques. Ces réactions de type III peuvent théoriquement intervenir vis-à-vis des aliments par exemple dans les thrombopénies provoquées par les protéines du lait de vache, les agrumes ou la quinine présente dans les boissons toniques.

Les réactions de type IV (retardée, à médiation cellulaire) impliquent la présence de

lymphocytes T spécifiques qui, en présence de l'allergène, entraînent la production de cytokines inflammatoires (LT CD4+) ou activent la cytotoxicité (LT CD8+). Elles concernent les eczémas de contact, la dermatite atopique, l'allergie microbienne. L'hypersensibilité de type IV est probablement la mécanisme responsable de la maladie coeliaque et des formes entéropathiques d'intolérance aux protéines de lait de vache.

La réaction d'hypersensibilité de type I, ou « réaction d'hypersensibilité anaphylactique », est très précoce. En effet, l'anaphylaxie est définie comme une augmentation de sensibilité de l'organisme à une substance qui lui est étrangère. Ce phénomène très précoce peut être facilement reproduit chez le cobaye. Une injection unique de 1mg d'albumine d'oeuf à un cobaye n'a pas d'effets immédiats. Cependant, si l'injection est répétée 2 à 3 semaines plus tard, l'animal sensibilisé réagit très fortement et de façon dramatique. Il va rapidement présenter des symptômes d'anaphylaxie généralisée: respiration sifflante puis mort par asphyxie dans les minutes qui suivent. Cette réaction est liée à la production d'IgE par le système immunitaire.

Les raisons pour lesquelles certains individus produisent une « réponse IgE » à certains allergènes alors que d'autres produisent une « réponse IgG » ne sont pas claires. Les réactions allergiques sont dues à un nombre limité d'allergènes. Elles peuvent se décomposer en deux phases: la phase de sensibilisation et la phase de déclenchement. Déposés sur l'épithélium muqueux ou la peau, les allergènes sont ensuite internalisés et traités par des cellules de Langerhans et par d'autres cellules présentatrices d'antigène. Comme n'importe quel autre antigène, ils sont clivés par protéolyse en de petits peptides par le système du protéasome. Présentés à la surface à des cellules Th<sub>0</sub> non engagées, ces cellules se différencient alors en lymphocytes Th<sub>2</sub> et libèrent diverses cytokines jouant un rôle important dans la réaction allergique. Dans le cas d'un patient non allergique, les cellules Th<sub>0</sub> vont se différencier en lymphocytes Th<sub>1</sub>. La réaction ne sera alors pas médiée par les IgE mais les IgG (réaction immunitaire classique). Lors de la réaction allergique, les interleukines (IL) 3, 4, 5, 10 et 13 vont notamment favoriser la prolifération de cellules B et l'inhibition de l'activation des cellules Th<sub>1</sub>. En association avec les signaux délivrés par la molécule CD40 à la surface de la cellule B, une conversion isotypique va avoir lieu. Les cellules B nouvellement produites porteuses d'IgM vont convertir les chaînes lourdes  $\mu$  en chaînes lourdes  $\epsilon$ . Après expansion clonale des lymphocytes B ainsi activés, les plasmocytes vont produire des IgE. Les mastocytes et les basophiles possèdent à leur surface un récepteur de haute affinité pour le fragment Fc de la chaîne lourde  $\epsilon$  des IgE. Lorsque ces cellules se lient aux IgE, la phase de sensibilisation se termine.



Lors d'un contact ultérieur avec le même allergène, sa reconnaissance par les IgE fixées sur les mastocytes et les basophiles va entraîner l'agrégation des IgE de surface (on parle aussi de pontage). Celle-ci est rapidement suivie par la rupture du phosphatidylinositol en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) et par une augmentation du calcium libre intracytoplasmique. La cascade biochimique permet aux granulations contenues dans les mastocytes de fusionner avec la membrane plasmique et de libérer leurs médiateurs préformés. Cela entraîne aussi la synthèse de médiateurs lipidiques, dont une série de métabolites de l'acide arachidonique formés par les voies de la cyclo-oxygénase et de la lipo-oxygénase, ainsi que de diverses cytokines responsables de la phase tardive de la réaction allergique aiguë. Parmi ces médiateurs lipidiques nouvellement formés, les leucotriènes (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>), la prostaglandine (PGD<sub>2</sub>) et le facteur activant les plaquettes (PAF) sont les plus importants. Ces trois types de composés sont des bronchoconstricteurs très puissants qui augmentent aussi la perméabilité vasculaire. Ils jouent également un rôle chimiotactique pour les cellules inflammatoires.

La dégranulation des mastocytes est l'évènement majeur de la réaction allergique aiguë. Des médiateurs préformés sont libérés, avec notamment l'histamine, l'héparine, des protéases et divers facteurs chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles. L'histamine elle-même est responsable de nombreux symptômes immédiats des réactions allergiques (la bronchoconstriction, la vasodilatation, la sécrétion de mucus et l'oedème dû à la fuite de protéines plasmatiques hors des vaisseaux). Tous ces effets peuvent être visualisés dans le test cutané d'hypersensibilité immédiate, lorsque l'allergène injecté dans le derme fait apparaître une réaction papuleuse caractéristique, avec rougeur, oedème et prurit.

Les mastocytes et les basophiles sont responsables d'une production significative de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF, l'IL-1, l'IL-4 et l'IL-5. Dans les 12 heures qui suivent une réaction allergique aiguë, une réaction à phase tardive se produit, caractérisée par un infiltrat de cellules CD4<sup>+</sup>, de monocytes et d'éosinophiles. Les cellules libèrent elles-mêmes diverses cytokines de type Th<sub>2</sub>, en particulier de l'IL-4 et de l'IL-5. Elles sont responsables de la poursuite de l'inflammation au site de l'allergène. Cette réaction tardive ressemble, par conséquent, à une réaction d'hypersensibilité retardée en raison de l'infiltration des cellules T et des effets des cytokines. Cependant la présence d'éosinophiles et de cellules Th<sub>2</sub> dans la phase tardive de la réponse allergique, la distingue des réactions d'hypersensibilité retardée où ils sont absents.

## 1.4.2 – Rôle de certaines cellules-clés

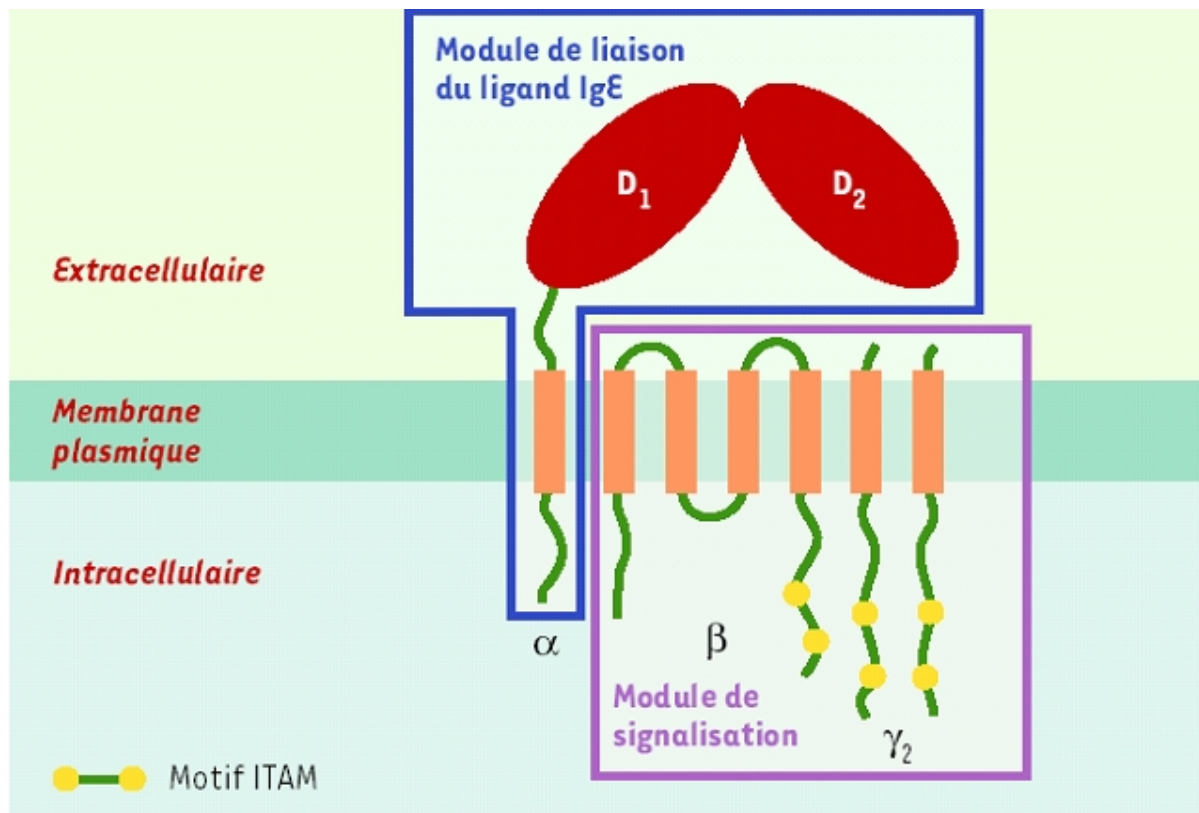
### 1.4.2.1 - Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Les CPA comprennent essentiellement les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les macrophages. Ces cellules ingèrent dans un premier temps l'antigène par un mécanisme d'endocytose, conduisant à la formation d'un endosome. Ce dernier fusionne avec les lysosomes pour former un endolysosome. L'antigène est alors fragmenté en peptides qui, associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II, seront présentés au récepteur des cellules T (TCR). Une fois activés, les macrophages libèrent des médiateurs directement et indirectement impliqués dans les réactions allergiques. La production de ces différents médiateurs est significativement plus importante chez les personnes allergiques.

### 1.4.2.2 - Les Immunoglobulines de type E (IgE)

Les IgE, dont la synthèse est contrôlée par les lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène, sont issues d'un processus de commutation isotypique d'IgD spécifiques vers les IgE. Elles sont synthétisées et excrétées par les lymphocytes B et les plasmocytes à IgE. Ces cellules possèdent des IgE sur leur membrane, ce qui permet de les identifier et de les dénombrer avec précision. Chez les individus non allergiques, le nombre des lymphocytes B et des plasmocytes à IgE est très faible dans le sang, la rate et les ganglions lymphatiques sous-cutanés (1% de la totalité des lymphocytes). Il est un peu plus élevé (4%) dans les muqueuses respiratoires et digestives et dans les ganglions lymphatiques annexés aux bronches.

Les IgE sont des immunoglobulines monomériques de poids moléculaire égal à 190 000. Elles sont constituées de 4 chaînes polypeptidiques dont deux chaînes lourdes (H) comprenant un domaine variable et quatre domaines constants (C  $\epsilon$ 1, 2, 3, 4) et de deux chaînes légères (L) de même type soit  $\kappa$  soit  $\lambda$ . Il n'existe pas de sous-classe d'IgE. Les IgE de type  $\kappa$  représentent environ les deux-tiers des molécules d'IgE. Elles sont normalement produites au niveau des principaux sites d'infection parasitaire: la peau, les poumons et l'intestin. Les réactions induites par les IgE rencontrées lors de réactions allergiques (inflammation, bronchoconstriction, sécrétion du mucus, vomissement et diarrhées) représentent en fait les changements anatomiques et physiologiques normalement mis en oeuvre pour lutter contre les parasites, rôle « normal » des IgE. Les IgE ne traversent pas le placenta et ne fixent pas le complément. Elles se retrouvent dans le sérum mais aussi dans des sécrétions telles que la salive, l'urine, les selles. Les concentrations sériques sont quasiment nulles à la naissance et augmentent progressivement jusqu'à atteindre 50 à 100UI/mL.



**Figure 1: Représentation schématique du FcεRI et de ses unités modulaires**

Le récepteur FcεRI est un tétramère composé d'une chaîne α, d'une chaîne β et d'un dimère de chaînes γ liées par un pont disulfure. La chaîne α contient, dans sa partie extracellulaire, deux domaines apparentés à la superfamille des immunoglobulines, D1 et D2, qui représentent le module de liaison pour le ligand IgE. Les chaînes β et γ constituent le module de signalisation et comportent dans leur partie cytoplasmique un motif de signalisation ITAM. La chaîne β aurait un rôle amplificateur de l'expression et de la capacité de signalisation du récepteur.

chez l'adulte. Du fait de leur niveau de synthèse faible et de leur catabolisme important (la demi-vie dans la circulation est de 2,5 jours), les IgE sériques circulantes représentent, chez les individus non allergiques, une infime proportion des anticorps circulants. Les IgE se fixent par leur fragment Fc sur la membrane des basophiles et des mastocytes, ce qui permet une prolongation de leur demi-vie (qui peut alors dépasser 3 à 4 semaines et aller jusqu'à 12 semaines). Le site de liaison des IgE à leur récepteur (FcεRI) se situe dans le domaine Cε3 et à la jonction Cε2-Cε3.

#### 1.4.2.3 - Les récepteurs des IgE

On distingue deux types de récepteurs d'IgE: les récepteurs de haute affinité FcεRI et les récepteurs de basse affinité FcεRII (CD23) (Novak et al., 2001b).

Le récepteur FcεRI, de forte affinité, est présent chez l'Homme et les rongeurs sous forme tétramérique ( $\alpha\beta\gamma\gamma$ ). C'est un complexe membranaire constitutivement exprimé sur les cellules de l'anaphylaxie: mastocytes et basophiles (50 à 100 000 par cellule). Il est composé d'une chaîne  $\alpha$ , d'une chaîne  $\beta$  et d'un dimère de chaîne  $\gamma$  (figure 1).

La chaîne  $\alpha$  est une protéine transmembranaire, formée d'une partie extracellulaire qui contient le site de liaison aux IgE (Blank et al., 1991; Hakimi et al., 1990), d'un segment transmembranaire et d'un segment cytoplasmique. La chaîne  $\beta$  est une protéine très hydrophobe qui traverse quatre fois la membrane et dont les extrémités *N* et *C* terminales sont cytoplasmiques. Les deux chaînes  $\gamma$  sont des protéines transmembranaires comptant une courte partie extracellulaire et une région cytoplasmique plus longue. Les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  portent le module de signalisation. Les régions cytoplasmiques *C*-terminales de la chaîne  $\beta$  et des deux chaînes  $\gamma$  contiennent un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif) nécessaire à l'activation cellulaire. Chez l'homme, ce récepteur peut exister aussi sous une forme trimérique ( $\alpha\gamma\gamma$ ) sans la chaîne  $\beta$ . Il est exprimé d'une façon variable sur les cellules présentatrices d'antigène telles que les monocytes, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques du sang périphérique, mais aussi sur les éosinophiles et les plaquettes. Son niveau d'expression à la surface des cellules est moins important que celui du tétramère. La comparaison des deux formes montre que la chaîne  $\beta$  a un rôle amplificateur de l'expression et de la capacité de transduction du signal.

La régulation de l'expression du FcεRI est sous la dépendance des IgE monomériques qui ont la capacité d'augmenter son expression (Saini and MacGlashan, 2002). Cet effet est dû à la

stabilité du récepteur exprimé sur la membrane. Il existe une bonne corrélation entre le niveau des récepteurs FcεRI et la concentration des IgE dans le sérum aussi bien chez la souris que chez l'Homme. Étant donné l'augmentation des IgE spécifiques au cours des allergies, la présence de récepteurs FcεRI trimériques fonctionnels sur les cellules présentatrices d'antigène, telles que les monocytes, contribuerait à l'initiation et au maintien des réponses atopiques. Les monocytes des sujets normaux et atopiques expriment des récepteurs FcεRI (αγγ) qui peuvent servir dans la présentation d'antigènes aux cellules T. Chez les donneurs normaux, l'expression des FcεRI est variable (de 2 à 40%; 11% en moyenne). Elle est rapidement perdue *in vitro* (Kato et al., 2000). Le pontage des FcεRI empêcherait l'apoptose des monocytes par induction de Bcl2 et Bcl-x1, provoquerait la libération d'IL10 et altérerait en culture la différenciation des monocytes soit en macrophages soit en cellules dendritiques (Novak et al., 2001a; Saini and MacGlashan, 2002).

Le récepteur FcεRII, de faible affinité, également connu sous le nom de CD23 chez l'Homme est une lectine de type C dépendante du calcium. Il existe sous deux formes: CD23a et CD23b. La forme CD23a est constitutivement exprimée par les cellules B. Elle est associée à l'endocytose des particules recouvertes d'IgE. L'autre forme, CD23b, est induit par l'IL-4 et est présente sur les cellules T, les cellules de Langerhans, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles. Elle entraîne la phagocytose des complexes IgE solubles. Par un processus autocatalytique dû à une métalloprotéase endogène située à la surface de la cellule, la molécule CD23 peut libérer une série de fragments solubles: les CD23s. Leur poids moléculaire est différent et ils induisent la différenciation des cellules B et des cellules T (Reljić et al., 1997). Cette molécule CD23 serait également impliquée dans la synthèse des IgE: la forme membranaire induisant une réponse plus faible d'IgE, la forme soluble induisant une production spontanée d'IgE. En fait, le rôle majeur de CD23 *in vivo* serait d'inhiber la production d'IgE dans les modèles murins d'inflammation (Riffo-Vasquez et al., 2000). CD23 est aussi présente dans les cellules épithéliales. Après avoir été identifié sur la membrane des entérocytes humains (Kaiserlian et al., 1993), son expression serait augmentée dans les allergies alimentaires et les maladies inflammatoires de l'intestin. Ce récepteur est également retrouvé sur les entérocytes des souris et de rat normaux. Chez le rat sensibilisé, ce récepteur semble jouer un rôle majeur dans l'augmentation du transport intestinal trans-épithélial de l'antigène. Par sa capacité de s'associer avec différents ligands, CD23 peut exercer une action à la fois stimulatrice et inhibitrice sur la production d'IgE et les réponses inflammatoires.

#### 1.4.2.4 - Les cellules effectrices de la réaction allergique

L'activation par un allergène des mastocytes et des basophiles, dépendante des IgE,

provoque la libération brutale de médiateurs vaso-actifs et constricteurs des fibres musculaires lisses, à l'origine des symptômes aigus. Les organes et tissus cibles de l'allergie immédiate sont également l'objet d'une réaction inflammatoire (phase tardive), entretenue et exacerbée par l'exposition aux allergènes de l'environnement. Classiquement, les principales cellules qui produisent les médiateurs de l'allergie immédiate sont les polynucléaires basophiles et les mastocytes. D'autres cellules (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages, plaquettes, cellules endothéliales, cellules des épithéliums muqueux et lymphocytes T) jouent un rôle important dans la physio-pathologie de ces réactions.

#### 1.4.2.4.1 - Les cellules intervenant dans la phase précoce: mastocytes et basophiles

Les polynucléaires basophiles et les mastocytes sont les principales cellules qui produisent les médiateurs de l'allergie immédiate. Elles contiennent des granulations (vésicules) qui sont la source principale des médiateurs chimiques de l'hypersensibilité immédiate. Elles constituent aussi la source majeure de cytokines qui régulent les fonctions des éosinophiles, cellules qui sont à la base de l'inflammation allergique et de sa persistance dans les tissus (Kung et al., 1995; Warner and Kroegel, 1994).

Les mastocytes, chez les rongeurs, sont de deux types: les mastocytes muqueux (MMC: Mucosal Mast Cells) très abondants au niveau des muqueuses respiratoires et digestives et dont le développement est thymo-dépendant, et les mastocytes du tissu conjonctif (CTMC: Connective-type Tissue Mast Cells) abondants dans le péritoine et la peau, la sous-muqueuse digestive et respiratoire, les organes lymphoïdes centraux et périphériques (Enerbäck, 1997). Chez l'Homme, les mastocytes peuvent aussi être classés en deux catégories, selon leur contenu en protéases. Les mastocytes T, qui se rapprochent des MMC murins, ne contiennent que de la tryptase et sont prédominants au niveau de la muqueuse intestinale, gastrique et nasale. Leur nombre est significativement augmenté dans la muqueuse nasale des malades atteints de rhinite allergique et dans la paroi et les sécrétions bronchiques des asthmatiques. Les mastocytes TC, dont les granulations contiennent à la fois de la tryptase et de la chymase, sont prédominants dans la peau et la sous-muqueuse intestinale. Dans la muqueuse nasale des patients allergiques aux pollens, on observe une augmentation saisonnière du nombre de mastocytes T. Par contre, le nombre de mastocytes TC ne varie pas et reste identique à celui retrouvé chez les sujets normaux. De même, les mastocytes T, qui constitue environ 1% des cellules recueillies lors d'un lavage broncho-alvéolaire chez l'individu sain, augmentant jusqu'à 5% chez l'atopique (Molina, 1995).

Les polynucléaires basophiles (PNB) sont caractérisés par l'absence de tryptase et d'héparine dans leurs granulations (Enerbäck, 1997). Ce sont des cellules essentiellement circulantes, dont la durée de vie est de 2 à 3 semaines. La formule leucocytaire d'un sujet normal comporte moins de 0,5% de basophiles. Leur augmentation significative est observée chez les individus allergiques, notamment pendant les phases d'exposition à l'allergène. Leurs granulations intra-cytoplasmiques contiennent les médiateurs préformés: histamine, ECF-A (Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis) et NCF (Neutrophil Factor of Anaphylaxis) qui seront expulsés lors de leur activation.

#### 1.4.2.4.2 - Les cellules intervenant dans la phase tardive de nature inflammatoire

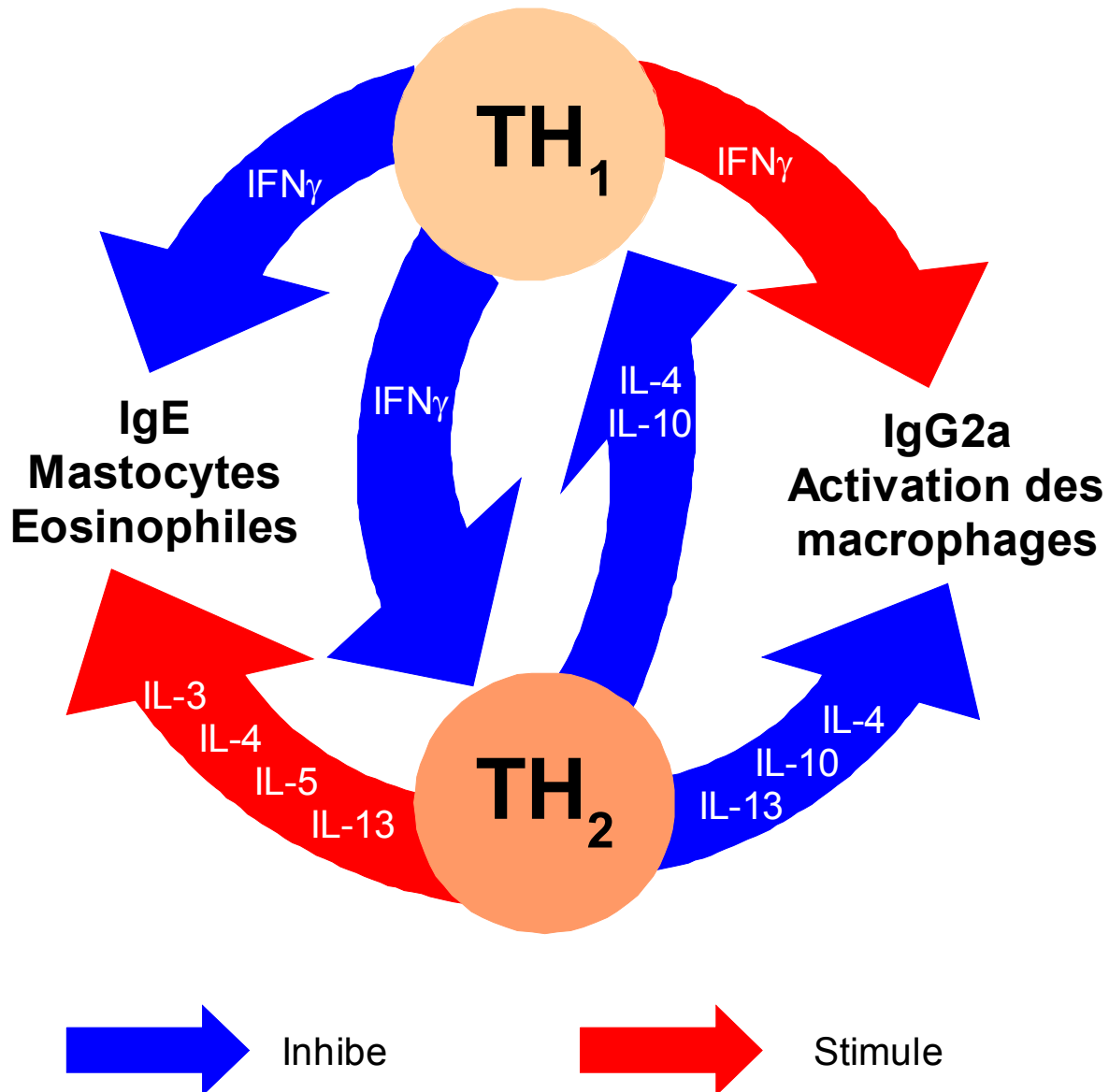
Les polynucléaires éosinophiles (PNE) sont probablement les principales cellules effectrices secondaires de l'allergie immédiate chez l'homme. Une hyper-éosinophilie est retrouvée dans l'atopie, les rhinites allergiques, la dermatite atopique et l'asthme (Wardlaw, 1994). Ce sont des cellules à localisation essentiellement tissulaire dont la prolifération est assurée par l'IL-5. Les éosinophiles contiennent un certain nombre de médiateurs préformés constitués d'enzymes qui sont libérées dans le microenvironnement et le sang par les éosinophiles activés. Il s'agit principalement de la MBP (Major Basic Protein), de l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), de l'EPO (Eosinophil Peroxydase) et de l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin). Toutes ces toxines exercent à des degrés divers, des effets cytotoxiques, pro-inflammatoires et neurotoxiques. Les éosinophiles activés libèrent également des médiateurs néoformés (notamment leucotriènes et prostaglandines). Les polynucléaires neutrophiles (PNN) produisent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et vasoactifs, ainsi que des protéases. Ils sont tous susceptibles de participer à la réaction allergique.

#### 1.4.3 - Balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> et Lymphocytes T régulateurs

Les cellules Th<sub>1</sub>, issues d'une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (de type 1), sont impliquées dans les réactions inflammatoires à médiation cellulaire comme les réactions d'hypersensibilité retardée ou l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires. Cette immunité est caractérisée par l'activation des macrophages et la production de lymphocytes T cytotoxiques (Ito et al., 1997). Les cellules Th<sub>1</sub> induisent des réponses immunitaires protectrices en favorisant la production d'anticorps dominée par l'isotype IgG<sub>2a</sub> chez la souris.

Les cellules Th<sub>2</sub> (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type 2) sont plutôt impliquées dans l'induction de réponses anticorps de type IgG<sub>1</sub> et IgE. La production d'IL-4 stimule les cellules B vers une production d'IgE et IgG<sub>1</sub> chez la souris et d'IgE et d'IgG<sub>4</sub> chez l'Homme (Murray, 1998). L'IL-5 est

pour sa part, une cytokine permettant l'activation du recrutement des éosinophiles mais également capable d'amplifier la production d'IgE. Ainsi, les cytokines de type Th<sub>2</sub> sont fréquemment retrouvées dans les processus allergiques et dans les réponses impliquant une forte sécrétion d'anticorps (Mosmann and Sad, 1996).



**Figure 2: Dialogue moléculaire entre TH<sub>1</sub> et TH<sub>2</sub> et implications dans la réaction allergique**

Les cellules Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub> peuvent interagir directement entre elles et/ou par l'intermédiaire de médiateurs. L'IL-4 et l'IFN $\gamma$  n'inhibent pas directement les cellules Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub> différenciées, respectivement. Néanmoins, ces molécules jouent un rôle inhibiteur en bloquant leur différenciation à partir de cellules T précurseurs.

Issu de Coffman, 2006



La description des sous-types 1 et 2 de lymphocytes auxiliaires chez la souris a permis de proposer chez l'Homme une explication à l'inflammation observée dans l'asthme ainsi qu'une relation avec l'atopie. Les différences fonctionnelles entre lymphocytes Th<sub>1</sub> et Th<sub>2</sub> ont également permis de proposer une explication à l'augmentation récente de la prévalence de l'asthme et des maladies allergiques. Cette approche conduirait à développer des stratégies thérapeutiques inhibant la réponse Th<sub>2</sub> associée à la production d'IgE et à l'inflammation due aux éosinophiles et à stimuler la réponse Th<sub>1</sub> associée à la défense anti-infectieuse. Des travaux récents vont cependant à l'encontre d'un tel schéma (voir fig. 2 p.39), probablement trop simpliste. Il a en effet été démontré que la réponse Th<sub>1</sub> (IFN $\gamma$ ) pouvait être augmentée dans l'asthme. Par ailleurs, la stimulation de la réponse Th<sub>1</sub> dans des modèles animaux d'hyperactivité bronchique n'améliore pas toujours les paramètres fonctionnels ou inflammatoires. Chez les asthmatiques, plusieurs études ont démontré que les traitements anti-asthmatiques permettant l'amélioration de la maladie pouvaient s'accompagner d'une augmentation de la réponse Th<sub>2</sub> (Woodfolk, 2007). Au plan épidémiologique, la théorie dite hygiéniste expliquant l'augmentation de l'atopie par la baisse des infections et une réponse Th<sub>1</sub> amoindrie, est également prise en défaut par l'augmentation simultanée dans les mêmes populations de pathologies auto-immunes caractérisées par l'exacerbation de la réponse Th<sub>1</sub>. L'ensemble de ces observations remet donc en cause le dogme Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> et suggère un schéma où les deux types de lymphocytes auxiliaires contribuent au développement de l'atopie et de l'inflammation.

Une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pourrait être impliquée dans le schéma classique « Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> ». Il a en effet été démontré récemment que des lymphocytes T dits régulateurs (T<sub>reg</sub>), producteurs d'IL-10 (Bashyam, 2007) et/ou de TGF- $\beta$  et inducteurs de tolérance étaient déficitaires chez les sujets allergiques (rhinite allergique et asthme) (Magnan and Humbert, 2005). De plus, ces lymphocytes augmentent lors de l'immunothérapie spécifique. L'IL-10 est une des rares cytokines immuno-suppressives identifiées à ce jour qui pourrait jouer un rôle majeur dans la tolérance naturelle. Le terme « T<sub>reg</sub> » regroupe en fait plusieurs sous-populations de cellules T, différentes entre-elles de par leur localisation, leur expression, la production de cytokines et les conditions de leur activation. Il semblerait même que certaines de ces cellules agissant comme des sentinelles, capables d'induire directement une réponse appropriée. Circulant dans le sang et facilement repérables en cytométrie en flux à cause d'une forte expression de CD25, les sous-populations CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> sont certainement les T<sub>reg</sub> les plus étudiés. Récemment caractérisée, cette sous-population exprime également FoxP3 (un facteur de transcription impliqué dans la régulation des T<sub>reg</sub>) et, plus faiblement, CD127. Il convient donc dorénavant de renommer cette sous-population de T<sub>reg</sub> « CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> » (Banham, 2006).

Des stratégies thérapeutiques pourraient donc être mises en oeuvre, en utilisant ou en stimulant directement les  $T_{reg}$ . Cependant, plusieurs points restent à éclaircir, notamment la spécificité de ces cellules dans le contexte allergique (Botturi et al., 2007). Dans tous les cas, la spécificité d'activation des cellules T, dans le contexte de l'allergie, est actuellement étudiée en considérant maintenant ces nouvelles sous-populations. Il existe une prédisposition globale à l'allergie chez des sujets atopiques que l'on attribue actuellement à un mauvais fonctionnement de la machinerie cellulaire des  $T_{reg}$ , permettant ainsi l'activation des cellules  $Th_2$ . Trois dimensions de l'inflammation sont donc à prendre en compte :  $Th_1$ ,  $Th_2$  et  $Treg$ ; mais il existe sûrement d'autres sous-populations de  $T_{reg}$ , car si toutes les cellules  $CD4^+ CD25^+$  ne produisent pas de l'IL-10, toutes les cellules T produisant de l'IL-10 ne sont pas  $CD4^+ CD25^+$ .

## 1.5 – Les allergènes

### 1.5.1 – Présentation générale et nomenclature

Les allergènes sont classés de différentes façons. Il existe des classements par type d'allergie, par source d'allergène, par fonction connue ou supposée de l'allergène... Depuis une vingtaine d'années, l'OMS et l'Union International des Sociétés d'Immunologie ont adopté une nomenclature commune (King et al., 1995). Le système utilise les noms abrégés de genre et d'espèce (selon Linné) ainsi qu'un nombre indiquant la chronologie de la purification de cet allergène (Chapman et al., 2007). Beaucoup d'allergènes majeurs d'acariens, animaux, pollens, insectes ou aliments ont été clonés et pas moins de 40 structures tridimensionnelles ont été déterminées et référencées dans la Protein Data Bank. Des protéines allergéniques de diverses fonctions biologiques ont donc été caractérisées: des protéases, des protéines de structure, des « pathogenesis-related proteins », des protéines de transfert de lipides, des profilines, des protéines liant le calcium... L'étude de la structure des allergènes permet souvent d'associer à la protéine étudiée, des propriétés physico-chimiques responsables de son allergénicité (résistance à la protéolyse, à la chaleur...) (Besler et al., 2001; Bredehorst and David, 2001). L'analyse de plusieurs banques de données de protéines allergéniques permet aujourd'hui de distinguer 120 familles distinctes. Un regroupement de ces familles peut se faire ainsi:

- allergènes d'intérieur: enzymes (essentiellement des protéases), protéines « ligand-binding » ou lipocalines, albumines, tropomyosines et protéines liant le calcium;
- allergènes polliniques: protéines « pathogenesis-related », protéines liant le calcium, pectates lyases,  $\beta$ -expansines, inhibiteurs de la trypsine;

Groupe	Famille de protéines	Fonction	Allergène (espèce)
PR-1			Cuc m 3 (melon)
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanases	Reconnaît et dégrade les polysaccharides de la paroi du pathogène	Ole e 9 (olivier) Hev b 2 (latex)
PR-3	Chitinases (plusieurs classes)	Dégrade la chitine	Pers a 1 (avocat) Cas s 5 (châtaigne)
PR-4	Chitinases	Activité lectine	Hev b 6 (latex)
PR-5	Protéines Thaumatin-like (TLP)	Perméabilise les membranes	Mal d 2 (pomme) Pru av 2 (cerise)
PR-6		Inhibiteur de protéases	
PR-7		Endoprotéase	
PR-8	Chitinases de classe III	Activité chitinase et/ou lysozyme	Hevamine (latex)
PR-9	Peroxydases	Synthèse de lignine	
PR-10	Homologues à Bet v 1	Transport de stérols et de cytokines	Bet v 1 (bouleau) Pru p 1 (pêche)
PR-11		Endochitinases	
PR-12	Défensines	Antimicrobiens	
PR-13	Thionines	Membranotoxines	
PR-14	Protéines de Transfert de Lipides (LTP)	Transport de lipides, défense de la membrane (cutine, subérine)	Pru p 3 (pêche) Mal d 3 (pomme) Zea m 14 (maïs)

**Tableau 2: Les familles de PR-Protéines selon la classification de Van Loon (van Loon and van Strien, 1999), adapté de Hoffmann-Sommergruber, 2002 et Malandain H, 2004**

- allergènes alimentaires de plantes et d'animaux: protéines « pathogenesis-related », protéines de transfert de lipides, profilines, protéines de stockage, tropomyosines.

### 1.5.2 – Allergènes alimentaires de plantes et d'animaux

Les allergènes alimentaires sont classés selon leur fonction biologique connue ou leur appartenance à une famille de protéines (Breiteneder and Radauer, 2004). Une étude récente a montré que toutes les séquences connues d'allergènes alimentaires d'origine végétale pouvaient être regroupées en 31 familles de la banque Pfam (Jenkins et al., 2005). Comme pour les allergènes polliniques, le nombre de familles est limité et pour une même allergie, plusieurs allergènes peuvent être impliqués (Bublin et al., 2004).

La superfamille des prolamines regroupe une grande majorité de ces allergènes végétaux (Breiteneder and Radauer, 2004). Les prolamines sont des protéines constituées d'hélices  $\alpha$  riches en proline et glutamine, avec un squelette conservé de 8 résidus cystéine. Trois groupes majeurs d'allergènes alimentaires d'origine végétale appartiennent aux prolamines: les albumines 2S (protéines de réserve trouvées dans les graines), les protéines de transfert de lipides non spécifiques (protéines de défense des plantes retrouvées notamment dans les fruits) et les inhibiteurs de trypsine et d' $\alpha$ -amylases (Breiteneder and Radauer, 2004; Kreis et al., 1985).

La deuxième superfamille d'allergènes alimentaires d'origine végétale, les cupines, sont retrouvées dans l'ensemble du règne végétal et se caractérisent par la présence d'un repliement en feuillet  $\beta$  (Dunwell et al., 2000). Cette famille des cupines comprend 2 groupes de protéines de stockage: les vicillines et les légumines. Des allergènes majeurs très étudiés en font partie: Ara h 1 de l'arachide (*Arachis hypogaea*), Jug r 2 de la noix (*Juglans regia*). Ils sont, chaque année, impliqués dans des réactions allergiques graves.

Les deux autres grandes familles d'allergènes alimentaires d'origine végétale, les profilines et les allergènes de la famille de Bet v 1, sont surtout responsables de réactions croisées associant pollinoses et allergie alimentaire au sein du syndrome allergique oral. Ces quatre grandes familles regroupent environ 65% des allergènes alimentaires d'origine végétale. Parmi les 27 autres familles, plus de 50% des allergènes sont impliqués dans des phénomènes de défense: protéases à cystéine, protéines thaumatin-like, chitinases (Breiteneder and Radauer, 2004) (tableau 2).

En effet, pour assurer leur croissance et leur reproduction, les plantes doivent s'adapter aux conditions environnementales et lutter contre leurs nombreux ennemis naturels: adaptation au froid, à la salinité du sol, à la sécheresse, résistance aux attaques des insectes, des virus, des moisissures, etc. Les plantes ont développé de très nombreuses parades au cours de leur évolution et, de tous temps, les sélectionneurs ont cherché à cumuler ces moyens défensifs naturels dans les variétés

<b>Famille de protéines</b>	<b>Mécanismes d'action de défense</b>	<b>Exemple d'allergène</b>
2S albumines	Protéine de stockage avec parfois une activité inhibitrice d'amylase/trypsine	Bra j 1 (moutarde) Ara h 2 (arachide)
Inhibiteurs d'amylase/trypsine	Inhibiteurs d'enzymes digestives d'insectes	Hor v 15 (orge)
Cyclophilines	Protection des protéines (stress abiotiques)	Bet v 7 (bouleau)
Protéases à Cystéine	Toxicité pour les insectes phytophages	Act c 1 (kiwi)
Germines	Tolérance à la sécheresse	Poivre
Protéines de choc thermique (HSP)	Protection des protéines (stress thermiques)	HSP-1 (noisette)
Inhibiteurs de protéases à sérine	Inhibiteurs de protéases de larves d'insectes	STKI (soja)
Isoflavones réductases	Synthèse de phytoalexines (résistance mécanique)	Pyr c 5 (poire)
Lectines	Liaison aux glycoprotéines du tube digestif des insectes	PNA (arachide)
Homologues à la patatine	Activité lipasique	Hev b 7 (latex)
Protéines inactivant les ribosomes (RIP)	Les RIP de type 1 inactivent les ribosomes	Sam n 1 (sureau)
Superoxyde dismutases	Detoxification des radicaux libres	Ole e 5 (olivier)

**Tableau 3: Protéines PR-like ayant montré une allergénicité,**  
adapté de Malandain H, 2004

cultivées (Malandain, Lavaud, 2004). Les plantes sont dépourvues de système immunitaire adaptatif. Dans toutes ces situations de défense, elles utilisent une machinerie biochimique et, notamment, des protéines de défense végétale. L'intérêt que porte l'allergologie à ces protéines de défense provient de leur fréquente allergénicité (Hoffmann-Sommergruber, 2002). Les raisons précises de cette allergénicité ne sont pas connues pour le moment de façon précise mais paraissent liées à leur extrême résistance à la dénaturation thermique et aux protéases. Cependant, en de nombreux points, un parallèle peut être fait entre réponse immunitaire innée des animaux supérieurs et réponse défensive des plantes (Nürnberg and Brunner, 2002).

Les protéines de défense végétales sont regroupées au sein des protéines PR (tableau 2 p. 42) pour « Pathogenesis-Related » (Hoffmann-Sommergruber, 2002; van Loon et al., 2006). Elles ont été initialement définies comme étant des protéines « inductibles » impliquées directement dans des processus de défense. Elles sont produites en réponse à l'attaque de la plante par un phytopathogène. Une dérive de cette définition a englobé des protéines « constitutives » à rôle également défensif (démonstré ou non). Le tendance générale est de revenir à la définition initiale et de ne considérer comme protéines PR que les protéines de défense inductibles. Les autres protéines, dont le rôle défensif n'est souvent pas démontré, constituent les protéines « PR-like » (tableau 3) (De Lorenzo et al., 2001). Bien qu'il est difficile de chiffrer la part des protéines de défense parmi les allergènes végétaux, on estime que 42% des quelque 440 allergènes végétaux caractérisés à ce jour appartiennent à une famille de protéines de défense végétale. On compte également 26 familles de protéines de défense végétale sur les 57 familles d'allergènes végétaux.

Certaines familles de protéines de défense végétale sont responsables de réactions allergiques fréquentes et/ou sévères. La sensibilisation à ces allergènes peut conduire à une réactivité croisée et parfois à des tableaux cliniques d'allergies associées: sensibilisation à des protéines PR-10 dans le syndrome bouleau-pomme, sensibilisation au domaine hévéine et aux chitinases de classe I dans le syndrome latex-fruits (Lavaud et al., 1997; Malandain, 2003). Dans les situations associant des réactions à un pollen et à des aliments, il est admis que l'allergie alimentaire est secondaire à une sensibilisation préalable par voie respiratoire (Vieths et al., 2002). Mais d'autres allergies associées résultent d'une sensibilisation directe par voie digestive. Les allergènes sont alors dits « complets »; c'est le cas pour les LTP (pêche et autres fruits des Rosacées) ou pour les 2S-albumines (graines de Légumineuses, moutarde, etc) (Breiteneder and Ebner, 2001). Hormis les protéines PR-10 présentes dans les pollens de Fagales et dont le modèle est Bet v 1, l'importance des autres familles de protéines de défense dans les pollinoses est moins bien connue. C'est notamment le cas pour les LTP, contenues dans les pollens d'olivier, d'armoise, de pariétaire, d'ambrosie et de noyer. C'est aussi le cas des TLP (Thaumatococcus-Like Protein). Des réactions systémiques sévères ont été notées chez des patients sensibilisés à des 2S-albumines, des LTP ou

des TLP (Vassilopoulou et al., 2007).

La plupart des allergènes alimentaires d'origine animale sont retrouvés dans le lait (Sharma et al., 2001), les oeufs et les fruits de mer et poissons. Les allergènes animaux impliqués dans des réactions au lait appartiennent à 3 familles de protéines: l' $\alpha$ -lactalbumine appartient à la famille 22 des glycosyl-hydrolases, la  $\beta$ -lactoglobuline est une lipocaline et les autres allergènes appartiennent à la famille des caséines. L'ovomucoïde, l'allergène de l'oeuf le plus important, est une protéase à sérine. Deux groupes majeurs d'allergènes sont identifiés dans les fruits de mer et les poissons: les tropomyosines de crustacés et de mollusques qui jouent un rôle clé dans la contraction musculaires et les parvalbumines des poissons qui lient le calcium au même titre que les calmodulines.

## 2 - les Protéines de Transfert de Lipides des plantes (LTP)

Dans les cellules végétales, les lipides de la membrane plasmique et des membranes des organelles sont impliqués dans différents processus (catabolisme, transport de molécules, métabolisme). Les membranes des glyoxysomes, par exemple, sont composées de phosphatidylcholine, de phosphatidylglycérol et de phosphatidyléthanolamine, alors que cet organite cellulaire ne possède pas l'arsenal enzymatique nécessaire à leur synthèse. Les glyoxysomes doivent donc importer ces lipides depuis le réticulum endoplasmique où ils ont été formés. La même situation se retrouve pour les lipides constituant les membranes des chloroplastes, des mitochondries et de la membrane plasmique (Moreau et al., 1998), où un système de transport intracellulaire des lipides constitué de transporteurs protéiques est nécessaire du fait de leur faible solubilité dans le milieu aqueux qui compose le cytoplasme des cellules.

### 2.1 - Présentation de la famille et de la structure

Les protéines de transfert de lipides (LTP) ont été découvertes en 1975 par l'équipe de Jean-Claude Kader (Kader, 1975). Elles tirent leur nom de leur aptitude à faciliter le transfert de phospholipides entre une membrane donneuse et une membrane acceptrice, *in vitro* (Kader, 1996). Les LTP sont de petites protéines, généralement divisées en 2 groupes. Les LTP du groupe 1 ont des poids moléculaires de 10kDa environ et un caractère basique. En effet, leur point isoélectrique se situe entre 9 et 10. Leur séquence comprend environ 92 acides aminés (90 à 95) et la position, très conservée, de 8 résidus cystéine caractérise cette famille de LTP<sub>1</sub>. Ces 8 cystéines forment 4 ponts disulfure, ce qui entraîne une très bonne stabilisation de la structure tertiaire (Kader, 1996). Les LTP du groupe 2 sont plus petites: leur séquence primaire comprend en général 70 acides aminés (7kDa). Par contre, ces LTP partagent les mêmes caractéristiques que les LTP du groupe 1 (pI élevé, activité de transfert de lipides, 4 ponts disulfure conservés) (Castro et al., 2003; Douliez et al., 2001; Liu et al., 2002). La structure secondaire des LTP<sub>1</sub> se compose de 4 hélices  $\alpha$  et d'une longue région C-terminale peu ou non structurée (Lee et al., 1998; Shin et al., 1995). Les LTP<sub>2</sub> présentent le même profil de structure secondaire que les LTP<sub>1</sub>, à une légère différence près: on dénombre seulement 3 hélices  $\alpha$  et une région comportant 2 hélices plus courtes. La région C-terminale ne présente aucune structuration particulière, comme dans les LTP<sub>1</sub> (Douliez et al., 2001; Samuel et al., 2002).

Les différentes structures tridimensionnelles des LTP<sub>1</sub>, obtenues par diffraction des rayons-X ou Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), ont révélé un repliement globulaire, stabilisé par



les ponts-disulfures (Lee et al., 1998; Shin et al., 1995). La principale caractéristique que les structures tridimensionnelles des LTP<sub>1</sub> ont révélé est la présence dans la région centrale de la protéine d'une cavité hydrophobe flexible ayant la forme d'un tunnel. Le caractère hydrophobe de ce tunnel dépend de la présence de plusieurs résidus à chaînes latérales hydrophobes (notamment alanine, isoleucine, leucine, proline et valine). Ce tunnel possède deux entrées: une petite et une plus large (Lee et al., 1998; Shin et al., 1995). La présence, stratégique, de deux acides aminés électropositifs (arginine et lysine) au voisinage de la plus grande entrée, leur permet d'interagir avec les parties hydrophiles des lipides. Cette interaction, ajoutée aux contacts hydrophobes mis en jeu dans le tunnel entre les chaînes d'acides gras des phospholipides et les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes permet aux LTP d'assurer leur rôle de transporteur de lipide. Grâce à ces interactions, la partie hydrophile des acides gras reste exposée au solvant. La structure tridimensionnelle des LTP<sub>2</sub> est caractérisée non pas par la présence d'une cavité hydrophobe ressemblant à un tunnel, mais plutôt à une cavité en forme de triangle, recouverte d'acides aminés à caractère hydrophobe: alanine, cystéine, isoleucine, leucine, phénylalanine et valine (Samuel et al., 2002). Des études de modélisation moléculaire ont montré que cette cavité des LTP<sub>2</sub> pourrait être plus flexible que le tunnel des LTP<sub>1</sub>. Ceci a été confirmé par l'association de certains stéroïdes avec des LTP<sub>2</sub> et non pas avec des LTP<sub>1</sub> (Buhot et al., 2001; Samuel et al., 2002). Le volume de la cavité des deux familles de LTP peut augmenter et s'adapter à différents types de phospholipides, démontrant ainsi un manque de spécificité d'interaction. C'est la raison pour laquelle les LTP sont appelées Protéines de Transfert de Lipides non-spécifiques (nsLTP) (Han et al., 2001; Samuel et al., 2002).

La diversité des LTP varie selon les espèces mais reste toujours importante: 12 LTP dans le riz *Oryza sativa* (Lee et al., 1998), 11 LTP dans le haricot mungo (mung bean) *Vigna radiata* var. radiata (Lin et al., 2005), 11 LTP<sub>1</sub> et 13 LTP<sub>2</sub> dans le mil *Sorghum vulgare* (Pelèse-Siebenbourg et al., 1994) et 11 LTP<sub>1</sub> dans le colza *Brassica napus* (Lee et al., 1998). Les acides aminés chargés, très abondants, sont très souvent conservés au sein des LTP<sub>1</sub> (Aspartate 43, Arginine 44 et Lysine 52). Sur environ 91 acides aminés, pas moins de 8 à 10 sont électropositifs, ce qui leur confère un caractère basique prononcé (Castro et al., 2003).

Les deux familles possèdent, en N-terminal, un peptide signal dont la longueur peut varier de 21 à 27 acides aminés pour les LTP<sub>1</sub> (Arondel et al., 1991; Vignols et al., 1994), et de 27 à 35 acides aminés pour les LTP<sub>2</sub> (García-Garrido et al., 1998; Kalla et al., 1994). Une fois le peptide signal excisé, la LTP mature est alors exportée vers l'apoplaste. Ainsi, les LTP<sub>1</sub> se localisent au niveau de la paroi cellulaire de différentes plantes dont l'arabette *Arabidopsis thaliana* (Thoma et al., 1993), ou le ricin *Ricinus communis* (Tsuboi et al., 1992).

## 2.2 - Expression, localisation cellulaire et rôle présumé dans la défense des plantes

Différentes fonctions ont été proposées pour les LTP végétales. La structure et l'agencement des gènes de LTP<sub>1</sub> indiquent la présence de différents gènes codant pour des LTP et possédant plusieurs mode d'expression et, probablement, plusieurs fonctions. Des études, réalisées sur le riz (*Oryza sativa*), ont ainsi démontré que plusieurs gènes codaient pour des LTP (Vignols et al., 1994). D'autres études, menées sur le mil *Sorghum vulgare* (Pelèse-Siebenbourg et al., 1994) ou l'arabette *Arabidopsis thaliana* (Arondel et al., 1991), ont en fait révélé l'existence d'une famille multigénique. L'étude de l'expression de ces différents gènes, simultanée ou non, pourrait expliquer la fonction de ces protéines (Carvalho and Gomes, 2007). Malgré tout, différents niveaux d'expression ont été retrouvés dans diverses variétés de plantes et de tissus, durant les différents stades de développement des plantes et dans diverses conditions physiologiques (Arondel et al., 1991; Soufleri et al., 1996; Vignols et al., 1997). Ainsi, des modifications dans les profils d'expression de diverses LTP ont été observées à la suite de changements environnementaux, tel que le stress salin, la réponse au froid et/ou à l'infection de la plante par des bactéries ou des champignons pathogènes (Jang et al., 2004; Jung et al., 2003). Des molécules régulatrices comme l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'éthylène ou le jasmonate semblent être impliquées dans les voies de signalisation responsables de l'expression des gènes de LTP (García-Garrido et al., 1998; Jang et al., 2004; Jung et al., 2003; Jung et al., 2005; Jung et al., 2007). Le rôle des LTP dans les processus de défense des plantes a été étudié, principalement à partir de LTP purifiées (Cammue et al., 1995; Ge et al., 2003; Molina et al., 1993; Segura et al., 1993) et à travers les modifications des profils d'expression des gènes de LTP en réponse à une infection par un phytopathogène (Jung et al., 2003; Park et al., 2002). Ainsi, l'expression d'une LTP d'orge dans des plantes transgéniques d'arabette et de tabac (*Nicotiana tabacum*) a permis d'augmenter significativement la tolérance à l'infection par un pathogène. Dans les plants transgéniques de tabac, la croissance de la bactérie *Pseudomonas syringae pv. tabaci* est retardée et le pourcentage de nécroses observées chez les plantes infectées est considérablement réduit. La même expérience a été effectuée chez *A. thaliana* avec la bactérie *P. syringae pv. tomato* et le champignon *Botrytis cinerea*, avec les mêmes effets sur les lésions provoquées (Molina and García-Olmedo, 1997). Pour les LTP, des niveaux d'expression semblables à ceux observés pour des protéines de la famille des Pathogenesis-Related 2 et 3 (PR-2, PR-3) ont été constatés, permettant ainsi d'envisager l'implication de ces protéines dans les mêmes processus de défense contre les stress biotiques et abiotiques. Ainsi, les LTP ont été regroupées au sein de la famille des PR-14, du fait de leur activité antimicrobienne, leurs similarités de séquence et leur induction suite à une infection par un phyto-pathogène. L'activité anti-microbienne des LTP

semble (pour certaines d'entre-elles) néanmoins très spécifique. Par exemple, la LTP purifiée du riz, exprimée chez *E. coli*, possède une action contre le champignon *Pyricularia oryzae*, mais est inefficace contre un autre champignon *Xanthomonas oryzae* (Ge et al., 2003).

Depuis la découverte de l'activité anti-microbienne de certaines LTP, de nombreux travaux ont été initiés pour comprendre leur mode d'action qui, *à priori*, doit permettre aux LTP d'interagir avec les membranes du pathogène pour les perméabiliser et/ou modifier leur intégrité (Kader, 1996). Ainsi, des LTP<sub>1</sub> ont été testées *in vitro* sur des membranes modèles, comme des monocouches de dipalmitoilphosphatidylglycérol (Subirade et al., 1995). D'autres expériences réalisées à l'aide de sondes fluorescentes ont permis de mettre en évidence une perméabilisation LTP-dépendante de la membrane de levures traitées avec des fractions enrichies en LTP (Diz et al., 2006). Ces différents résultats ont permis de valider les informations obtenues avec des membranes modèles, mais le mécanisme d'action et les propriétés anti-microbiennes des LTP n'ont pas encore été complètement élucidés.

La localisation extracellulaire des LTP<sub>1</sub> n'est pas une règle générale. Ainsi, chez le ricin, une isoforme de LTP a été retrouvée dans le glyoxysome. Cette localisation permettrait une activation de l'acétyl-CoA oxydase *in vitro*, suggérant une possible implication des LTP dans la  $\beta$ -oxydation et la régulation du transport et du stockage des lipides (Tsuboi et al., 1992). Dans le grain de blé, la présence d'une LTP a aussi été démontrée dans les grains d'aleurone, riches en protéines. Par contre, la présence de LTP dans les parois cellulaires des graines n'a jamais été démontrée (Dubreil et al., 1998). La présence de LTP a aussi été observée dans des vacuoles de stockage des graines de Niébé (*Vigna unguiculata*) mais le rôle physiologique lié à cette présence n'a pas encore été démontré (Carvalho and Gomes, 2007). Des LTP ont aussi été observées à la surface des feuilles. Ainsi, chez le chou rouge (*Brassica olearacea*), les LTP constituent près de 50% des protéines présentes sur la surface cireuse des jeunes feuilles. Ce taux chute à 4% pour des feuilles matures. Cette forte variation suggère une intervention des LTP dans le transport des monomères de cutine, nécessaire à la croissance des feuilles et la formation de la cutine (Pyee et al., 1994). Chez *A. thaliana*, l'expression du gène de la LTP<sub>1</sub> varie dans le temps. Ainsi, dans les tissus en cours de développement, le taux d'expression est très important alors qu'il diminue dans des tissus dont le développement ralentit ou s'arrête. Ces variations seraient également corrélées au besoin de cutine qui accompagne le développement des différents organes foliaires (Thoma et al., 1994). La démonstration d'une implication des LTP dans le transport de cutine et la formation de la membrane lipophile autour des cellules embryonnaires de carotte conforte cette hypothèse du rôle des LTP (Cheng et al., 2004; Sterk et al., 1991).

### 2.3 - Des protéines impliquées dans la signalisation des plantes ?

L'hypothèse d'une implication des LTP dans des voies de signalisation chez les plantes remonte à des travaux sur *A. thaliana* qui ont démontré le rôle joué par un gène très voisin de celui des LTP dans la transmission du signal intracellulaire (Maldonado et al., 2002). Ce gène, appelé *dir1-1*, code une protéine de 102 acides aminés capable d'interagir avec des lipides et de former ainsi un complexe impliqué dans la résistance systémique des plantes.

D'autres travaux chez le tabac ont mis en évidence *in vitro* l'interaction de la LTP de blé avec des récepteurs des élicitines (Buhot et al., 2001). Ces petites protéines d'environ 10kDa, secrétées par des Oomycètes du genre *Phytophthora* ou *Pythium*, induisent une réaction d'hypersensibilité chez le tabac (Ponchet et al., 1999). Comme les LTP, les élicitines sont de petites protéines basiques possédant des ponts disulfure et une structure secondaire constituée surtout d'hélices  $\alpha$ . Elles possèdent également une poche hydrophobe qui leur permet d'interagir avec des molécules hydrophobes, dont les stérols. Malgré toutes ces similitudes, les homologies de séquences sont faibles entre les élicitines et les LTP. Bien que certaines de leurs hélices  $\alpha$  soient superposables, des travaux plus récents suggèrent la possibilité, pour les LTP, de transporter des molécules impliquées directement dans des voies de signalisation (Blein et al., 2002; Mikes et al., 1998). Ainsi, une LTP recombinante de tabac fixe l'acide jasmonique et le complexe formé est reconnu par le récepteur des élicitines (Buhot et al., 2004). Infiltré à des plants de tabacs, le complexe formé induit une protection à longue distance contre plusieurs agents pathogènes dont *P. parasitica*. Néanmoins, aucune étude n'a permis de démontrer que le complexe constitue le signal d'activation, ou bien que la liaison au récepteur induit l'activation de la voie de signalisation.

### 2.4 - Intervention dans le transport des lipides

Les études structurales des complexes formés par des LTP et des lipides permettent de mieux comprendre les interactions mises en jeu (Gomar et al., 1998). Ainsi, la détermination de la structure du complexe formé par la LTP du maïs et l'acide palmitique (C16:0) (Shin et al., 1995) a démontré que le lipide interagit avec le tunnel constitué d'acides aminés hydrophobes. Afin de mieux caractériser l'interaction entre les lipides et la cavité des LTP<sub>1</sub>, des études ont été réalisées avec divers lipides marqués avec des sondes fluorescentes. Ainsi, il a été démontré que la LTP du blé (*Triticum aestivum*) peut interagir avec deux chaînes de 1,2-dimyristoylphosphatidylglycérol (Sodano et al., 1997). D'autres études (Guerbette et al., 1999a; Guerbette et al., 1999b) menées avec d'autres LTP (de maïs notamment), ont montré que les chaînes d'acides gras saturés dont la longueur varie de 16 à 18 atomes de carbone, interagissent de façon préférentielle avec les LTP.

Des expériences d'inhibition effectuées avec des lipides à chaînes plus courtes (10 à 12 atomes de carbone) n'ont pas permis de déplacer la liaison avec des lipides à chaînes plus longues (16 à 18 atomes de carbone). De même, des lipides à chaînes d'acides gras encore plus longues (20 à 22 atomes de carbone) ne perturbent pas l'interaction entre les LTP et les lipides à chaînes de 16 à 18 atomes de carbone, démontrant ainsi l'existence d'une longueur optimale pour l'interaction (Zachowski et al., 1998).

Cette caractéristique que possède la cavité hydrophobe de s'adapter à des molécules hydrophobes est déterminante pour l'activité de liaison et de transport des lipides. Certaines protéines, dont la structure tridimensionnelle ressemble aux LTP, sont incapables de transporter des lipides libres. C'est le cas d'une protéine de graines d'oignon (*Allium cepa*), l'Ace-AMP1, structurellement voisine des LTP<sub>1</sub>. Les éléments de structure secondaire classiques des LTP (hélices  $\alpha$ ) sont retrouvés, en dépit de légères divergences dans les séquences en acides aminés de ces protéines. Les cystéines sont également conservées, ainsi que les ponts disulfure. Malgré tout, la cavité hydrophobe de l'Ace-AMP1 est obstruée par des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) qui créent un encombrement empêchant cette protéine « LTP-like » d'interagir avec des lipides libres afin de les transporter (Cammue et al., 1995). Par contre, Ace-AMP1 peut interagir avec des lipides membranaires (Tassin et al., 1998).

En plus des cystéines, d'autres acides aminés sont conservés dans les séquences primaires des LTP<sub>1</sub>. Ces acides aminés, indispensables à l'interaction avec les molécules de lipides, sont au moins au nombre de deux. Le premier, une tyrosine (vers la position 80), est positionné près de l'entrée de la cavité hydrophobe réalisant des contacts hydrophobes avec les chaînes d'acides gras. En outre, une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de la tyrosine et un groupement carboxyle des têtes polaires des lipides, stabilise l'interaction avec des lipides possédant des chaînes d'acides gras longues de 16 à 18 atomes de carbone (Han et al., 2001). Des lipides à chaînes d'acides gras plus courtes ou plus longues sont incapables d'établir cette liaison hydrogène, expliquant ainsi la mauvaise interaction observée avec ce type de lipides. Le deuxième résidu d'intérêt est une alanine (position 66 environ). Une liaison hydrogène s'établit entre cet acide aminé et le groupement hydroxyle des acides gras, comme le ricinoléate (C18:1, 9, 12-OH). Cette liaison expliquerait le rôle des LTP dans la synthèse de la cutine, composée essentiellement d'acides gras hydroxylés et cétoxylés (Han et al., 2001; Heredia, 2003).

## 2.5 - Les LTP allergènes majeurs des fruits

Depuis leur découverte il y a 30 ans, plus d'une centaine de LTP ont été identifiées dans

plus de 50 espèces différentes mais ce n'est qu'en 1999 que leur implication dans des réactions allergiques ont été démontrées. Ce sont les LTP des fruits de Rosacées, étudiées dans l'équipe Italienne d'EA Pastorello et Espagnole de G Salcedo qui ont pour la première fois démontré leur interaction avec des IgE de patients allergiques (Pastorello et al., 1999; Sánchez-Monge et al., 1999). Les LTP de pomme (Mal d 3) et de pêche (Pru p 3) ont depuis fait l'objet de nombreux travaux. Il est devenu évident que cette famille de protéines comprenait de nombreux allergènes, qu'ils soient polliniques ou alimentaires: les LTP sont actuellement considérés comme des panallergènes en raison de leur distribution dans la plupart des espèces végétales (Breiteneder and Mills, 2005; Pastorello and Robino, 2004; Salcedo et al., 2004; van Ree, 2002).

### 2.5.1 - Des allergènes de fruits aux panallergènes végétaux

Chez les adultes, les allergies alimentaires médiées par les IgE sont principalement causées par les fruits des Rosacées (pomme et pêche) (Eriksson et al., 1982; Kanny et al., 2001; Ortolani et al., 1988). L'allergie, surtout à la pomme, a souvent été associée à l'allergie au pollen de bouleau, très fréquente dans le centre et le nord de l'Europe où les arbres de la famille des Fagales sont très abondants. Les patients présentent des symptômes au niveau de la cavité oropharyngienne et semblent avoir été sensibilisés par des allergènes polliniques; Ce syndrome, connu sous le terme de « Oral Allergy Syndrome » ou OAS a été très largement étudié (Eriksson et al., 1982; Kazemi-Shirazi et al., 2000; Ortolani et al., 1988). Les réactions allergiques dues à l'ingestion de fruits (pomme) sont souvent associées à la présence d'allergènes homologues dans les pollens et les fruits. Les membres de la famille des PR-10 comme l'allergène majeur du pollen de bouleau Bet v 1 sont impliqués, ainsi que des profilines (Bet v 2) (Ebner et al., 1995; Vieths et al., 2002).

Les patients du pourtour méditerranéen, allergiques aux fruits, sont très peu ou pas du tout exposés aux pollens de Fagales. Le profil clinique et symptomatologique est souvent très différent des patients des pays du nord de l'Europe. Des manifestations sévères sont fréquemment rencontrées et un nombre significatif de patients souffrent d'allergies alimentaires sans aucun lien avec la pollinose (Cuesta-Herranz et al., 1998; Fernández-Rivas et al., 1997; Fernández-Rivas et al., 2003). Il semblerait donc que d'autres LTP n'appartenant pas aux pollens de Fagales peuvent sensibiliser ces patients. La sensibilisation directe, *via* les LTP de fruits, n'est pas non plus à exclure. Des études ont en effet montré qu'une LTP d'armoise Art v 3 (*Artemisia vulgaris*) et une LTP de platane (*Platanus acerifolia*) Pla a 3 sont clairement impliquées dans des co-sensibilisations pollen-fruit. Ces LTP réagissent également avec des sérums de patients allergiques à Pru p 3 (Díaz-Perales et al., 2000; García-Sellés et al., 2002; Lauer et al., 2007; Lombardero et al.,

Espèce	Allergène	Référence
<b>VEGETAUX</b>		
Fruits des Rosacées		
Pêche ( <i>Prunus persica</i> )	Pru p 3	(Pastorello et al., 1999; Sánchez-Monge et al., 1999)
Pomme ( <i>Malus domestica</i> )	Mal d 3	(Pastorello and Robino, 2004; Sánchez-Monge et al., 1999)
Abricot ( <i>Prunus armeniaca</i> )	Pru ar 3	(Pastorello et al., 2000a)
Prune ( <i>Prunus domestica</i> )	Pru d 3	(Pastorello et al., 2001)
Cerise ( <i>Prunus avium</i> )	Pru av 3	(Scheurer et al., 2001)
Fraise ( <i>Fragaria ananassa</i> )	Fra a 3	(Zuidmeer et al., 2006)
Autres fruits		
Raisin ( <i>Vitis vinifera</i> )	Vit v 1	(Pastorello et al., 2003)
Orange ( <i>Citrus sinensis</i> )	Cit s 3	(Ahrazem et al., 2005)
Citron ( <i>Citrus limon</i> )	Cit l 3	(Ahrazem et al., 2005)
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Lyc e 3	(Le et al., 2006)
Légumes		
Asperge ( <i>Asparagus officinalis</i> )	Aspa o 1	(Díaz-Perales et al., 2002)
Laitue ( <i>Lactuca sativa</i> )	Lac s 1	(San Miguel-Moncín et al., 2003)
Chou ( <i>Brassica oleracea</i> )	Bra o 3	(Palacín et al., 2006)
Noix		
Noisette ( <i>Corylus avellana</i> )	Cor a 8	(Pastorello et al., 2002)
Noix ( <i>Juglans regia</i> )	Jug r 3	(Pastorello et al., 2004)
Châtaigne ( <i>Castanea sativa</i> )	Cas s 8	(Sánchez-Monge et al., 2006)
Céréales		
Maïs ( <i>Zea mays</i> )	Zea m 14	(Pastorello et al., 2000b)
<b>LATEX</b>		
Latex ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	Hev b 12	(Beezhold et al., 2003)
<b>POLLENS</b>		
Pariétaire de Judée ( <i>Parietaria judaica</i> )		
	Par j 1	(Ayuso et al., 1993)
	Par j 2	(Duro et al., 1996)
Pariétaire officinale ( <i>Parietaria officinalis</i> )	Par o 1	(Oreste et al., 1991)
Ambroise ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> )	Amb a 6	(Roebber et al., 1983)
Olivier ( <i>Olea europaea</i> )	Ole e 7	(Tejera et al., 1999)
Armoise ( <i>Artemisia vulgaris</i> )	Art v 3	(Díaz-Perales et al., 2000)
Platane ( <i>Platanus acerifolia</i> )	Pla a 3	(Lauer et al., 2007)

**Tableau 4: Les LTP identifiées comme allergéniques dans les aliments d'origine végétale, le latex et les pollens, adapté de Salcedo et al., 2007**

2004; Pastorello et al., 2002). Ces LTP ont environ 40% d'homologie de séquence avec Pru p 3. Les patients allergiques au pollen de platane mais ne présentant pas d'allergie alimentaire ne sont que pour très peu d'entre eux sensibilisés à Pla a 3. C'est le contraire pour les patients souffrant d'allergie alimentaire (Lauer et al., 2007). Cette LTP de platane semble donc jouer un rôle dans les réactions croisées observées avec la pêche. D'autres LTP de pollens, présentant moins d'homologie de séquence avec Pru p 3, peuvent être considérées comme des allergènes mineurs. C'est le cas pour Amb a 6 (ambroisie) et Ole e 7 (olivier). Avec seulement 35% d'identité de séquence avec Pru p 3, ces LTP ne semblent pas être impliquées dans des réactions croisées entre pollen et fruits (Hiller et al., 1998; Roebber et al., 1983; Tejera et al., 1999). C'est également le cas pour Par j 1 et Par j 2 (pollen de pariétaire). En plus de présenter un poids moléculaire supérieur à 9kDa (14,7 et 11,3kDa respectivement) et une identité de séquence très faible avec Pru p 3 (26-29 %), aucune réaction croisée n'a été observée avec la LTP de pêche. C'est également le cas avec d'autres LTP de pollen, comme Art v 3 (Ayuso et al., 1995; Costa et al., 1994; Duro et al., 1996; Lombardero et al., 2004).

Depuis 1999 et les premières investigations réalisées sur les LTP, de nombreuses LTP ont été découvertes dans d'autres fruits, comme l'abricot, la poire, le citron... mais aussi dans des graines et des légumes (tableau 4). Les alignements de séquence de ces différentes LTP ont permis de démontrer leur très forte identité avec Pru p 3 (de 47 % à 92 %), indiquant très probablement une très forte homologie de structure. Des réactions croisées ont été mises en évidence entre des LTP d'origines très variées (fruits, graines, légumes), démontrant ainsi que les épitopes reconnus par les IgE se retrouveraient dans toutes ces LTP (Díaz-Perales et al., 2000; Lombardero et al., 2004). Des réactions croisées ont également été observées avec des espèces non-alimentaires. Ainsi Hev b 12, une LTP du latex (65 % d'identité de séquence avec Pru p 3), est responsable d'une réaction croisée avec la pêche (Beezhold et al., 2003).

### **2.5.2 - Caractérisation immunologique et structurale des LTP; importance de l'étude des épitopes**

Les différentes caractéristiques attachées à la famille des LTP ont permis, en quelques années, d'imposer ces protéines comme des modèles pour l'étude des allergies alimentaires (Salcedo et al., 2004; van Ree, 2002). Leur résistance à la protéolyse et aux traitements par la chaleur suggèrent que les motifs épitopiques des LTP sont conservés lors de leur passage par le tractus gastro-intestinal. Ces protéines pourraient alors interagir directement avec le système immunitaire pour induire à la fois une sensibilisation et les symptômes de la réaction allergique. La résistance des différentes LTP a ainsi été étudiée, *in vitro*, dans un environnement gastrique reconstitué



(présence de pepsine et d'autres enzymes dans un milieu très acide). Ces protéines restaient intactes après 2 heures de traitement et, après 24h, seulement 40% de l'allergène Pru p 3 avait été dégradé (Asero et al., 2000; Duffort et al., 2002; Scheurer et al., 2004; Vassilopoulou et al., 2006). De même, après chauffage à des températures supérieures à 100°C, les LTP de pêche et de maïs interagissaient encore avec les IgE de patients allergiques (Brenna et al., 2000; Lindorff-Larsen and Winther, 2001; Pastorello et al., 2003). Cette extrême résistance des LTP peut expliquer les réactions allergiques observées à la suite d'ingestion de produits alimentaires industriels, comme des jus de fruits, des bières, du vin ou des confitures (Brenna et al., 2000; Duffort et al., 2002; García-Casado et al., 2001; Scheurer et al., 2004). L'importante stabilité des LTP serait un des facteurs responsable de leur implication dans les processus de sensibilisation et de déclenchement de réactions sévères observées dans les pays du pourtour méditerranéen (urticaire généralisé, asthme, choc anaphylactique).

L'interaction entre les protéines allergéniques et les cellules du système immunitaire implique la présence d'épitopes. Ces régions sont généralement classées en 2 types: les épitopes linéaires ou continus et les épitopes conformationnels ou discontinus. Cette distinction entre épitopes linéaires et épitopes conformationnels n'a aucun sens lorsqu'on s'adresse à la structure des protéines ou des peptides. Une séquence de quelques acides aminés adopte obligatoirement une conformation spatiale qui dépend de l'environnement et de l'équilibre entre les forces d'entropie et d'enthalpie qui gouvernent le repliement des peptides et des protéines. Il est tout à fait illusoire de considérer un épitope linéaire, même s'il s'agit d'un épitope T, comme une séquence de conformation parfaitement linéaire. Il faut bien comprendre qu'un épitope, quel qu'il soit, adapte sa conformation à celle du paratope (cas des épitopes B) ou de la corbeille du CMH de classe II (cas des épitopes T) pour qu'une interaction suffisamment stable puisse se produire. Les termes d'épitopes « continus » et « discontinus » traduisent beaucoup mieux cette situation et doivent être préférés à ceux de « linéaires » et « conformationnels » qui n'ont aucune signification structurale et risque de donner une image erronée de la réaction antigène-anticorps ou antigène-CMH II. Les interactions mises en jeu dans les reconnaissances anticorps – épitopes, sont en général des forces électrostatiques et des liaisons hydrogène (Sinha et al., 2002). Si des anticorps reconnaissent plusieurs allergènes d'une même famille, ce qui est couramment le cas en allergologie, c'est qu'ils interagissent avec des épitopes très similaires voire identiques. Les conformations de ces épitopes sont donc très voisines, avec des séquences en acides aminés qui peuvent légèrement varier. L'identification d'allergènes provoquant des réactions croisées est alors possible en utilisant les outils de recherche d'homologies de séquence et de structure. Regroupés au sein de la bioinformatique structurale, ces méthodes permettent de prévoir plus précisément ces réactions

croisées (Breiteneder and Mills, 2006). Les co-cristallisations allergène-IgE étant difficile à obtenir, les épitopes conformationnels sont encore difficile à localiser *in vitro*. C'est la raison pour laquelle des approches différentes ont été mises au point, comme l'introduction de mutations dans les zones de surface des allergènes accessibles aux anticorps (Ferreira et al., 1998; Holm et al., 2004), l'utilisation d'anticorps monoclonaux pouvant bloquer l'interaction entre l'allergène natif et muté avec les IgE (Wiche et al., 2005) ou encore une combinaison d'approches de modélisation moléculaire et de biologie moléculaire comme le phage display (Hantusch et al., 2004).

Ainsi, certaines substitutions sur des acides aminés présents à la surface de la protéine peuvent totalement abolir l'interaction avec les IgE. Par exemple, chez Pru av 1, un homologue de Bet v 1 trouvé chez la cerise, une seule mutation d'une sérine en proline à la surface de la protéine abolit totalement l'interaction avec des sérums de patients allergiques à la cerise (Neudecker et al., 2003). Des études concernant les épitopes des LTP ont été menées en combinant pour la plupart des approches structurales et biochimiques. Ainsi, des LTP « modèles » dont la structure est connue ont été largement utilisées: Pru p 3 de la pêche et Zea m 14 du maïs. A partir de ces structures et plus précisément des structures des complexes « LTP-lipide », l'étude de certaines boucles placées entre les hélices  $\alpha$  a permis de mettre en évidence l'importance de certains acides aminés. En effet, les chaînes latérales de ces acides aminés contribuent à la liaison avec les lipides. Ces mêmes acides aminés sont impliqués dans des interactions avec les IgE, mais ce sont alors les atomes de la chaîne principale qui sont préférentiellement exposés à la surface de la LTP (García-Casado et al., 2003). De plus, l'étude fine de la surface des LTP permet de comprendre certaines réactions croisées. Alors que la structure de la LTP<sub>1</sub> de blé est très similaire à celle de Pru p 3, la topographie de sa surface est très différente et pourrait expliquer l'absence de réaction croisée entre les LTP<sub>1</sub> de blé et de pêche (Breiteneder and Mills, 2006).

### 2.5.3 - La Pomme, un modèle pour l'étude des allergies

En 2001, un consortium européen d'équipes de recherche en allergologie moléculaire (13 laboratoire de 7 pays différents) a décidé d'utiliser la pomme comme un modèle pour l'étude des réactions allergiques médiées par les IgE chez des patients adultes souffrant d'allergie alimentaire (Hoffmann-Sommergruber, 2005). La grande quantité de données recueillies à travers toute l'Europe a notamment permis aux différents laboratoires de mieux comprendre les allergies aux pommes (« SAFE project »). Ainsi, des différences ont été observées dans les profils de sensibilisation. Ces études sont encore en cours à l'heure actuelle (Fernández-Rivas et al., 2006).

Très largement consommée à travers l'Europe, la pomme représente un aliment majeur

pour l'agriculture et l'industrie agro-alimentaire. De très nombreuses variétés sont commercialisées et quatre allergènes ont été mis en évidence: Mal d 1 (homologue à Bet v 1), Mal d 2 (Thaumatin-like protein), Mal d 3 (LTP) et Mal d 4 (profiline). Alors que Mal d 1 et Mal d 4 semblent impliqués dans des réactions croisées suite à une sensibilisation par le pollen de bouleau (Ebner et al., 1995; Vanek-Krebitz et al., 1995), ceci est beaucoup moins clair pour les deux autres. Les réactions des patients allergiques sont très diverses: elles vont de la simple rhinite allergique au très dramatique choc anaphylactique.

Les patients allergiques à la pomme ne représentant pas un groupe homogène (Fernández-Rivas et al., 2006), ce projet a notamment permis de mettre au point différentes technologies innovantes ayant pour objectif de réduire l'incidence de cette allergie aux causes souvent mal connues. Les profils symptomatologiques liés à l'allergie à la pomme sont très variés: certains patients ont également une allergie au pollen, d'autres seulement une allergie alimentaire « isolée ». Certains symptômes observés sont légers, d'autres très sévères; certaines réactions sont causées par le fruit frais alors que d'autres impliquent des aliments à base de pomme... Les stratégies pour réduire l'implication de la pomme dans les réactions allergiques sont donc nombreuses et différentes approches ont été utilisées, pour chacun des 4 allergènes étudiés. L'implication de nombreux laboratoires permet également de disposer de nombreux sérums de patients allergiques, avec un vécu clinique et une répartition géographique très différents. Près de 400 patients de 4 pays différents ont fait partie de l'étude (Espagne, Italie, Autriche, Pays-Bas). Les 4 allergènes purifiés et produits de façon recombinante ont été testés; des variétés différentes ont été utilisées afin de mieux comprendre cette allergie alimentaire (80 variétés au total). Des allergènes recombinants standardisés pouvant servir au diagnostic ont été produits, alors que des pommes hypoallergéniques ont également été obtenues, notamment par interférence d'ARN (Gilissen et al., 2005). Des modifications dans les modes de culture des pommiers et dans les protocoles de récolte et de conservation des pommes ont également été testées, afin d'évaluer leur impact sur l'allergénicité des différentes variétés de pommes. Enfin, des tests de désensibilisation sur patients allergiques au pollen de bouleau (Bet v 1) ont été effectués avec Mal d 1 avec un certain succès. Des tests de provocation orale, effectués après la fin de la période de désensibilisation, ont permis de confirmer la validité du protocole utilisé (Bolhaar et al., 2004). Ces différents résultats ont permis aux différentes équipes d'obtenir un financement pour un nouveau projet européen nommé EuroPrevall (Mills et al., 2007; de Blok et al., 2007).

# **OBJECTIFS**



## OBJECTIFS DE THESE

Les LTP représentent, avec les TLP (Protéines Thaumatin-Like) et les endo- $\beta$ 1,3-glucanases, les allergènes essentiels des fruits de Rosaceae, de pomme (Mal d 3), de pêche (Pru p 3), d'abricot (Pru ar 3), de prune (Pru d 3) ou de cerise (Pru av 3). Beaucoup d'entre elles ont été caractérisées en terme de séquence primaire, d'activité immunologique, voire de structure (Pru p 3). En fait, l'identification des épitopes liant les IgE (épitopes B) de ces allergènes reste tout à fait fragmentaire puisque seuls les épitopes B de Pru p 3 ont été identifiés.

L'objectif du présent travail était 1) d'identifier et de caractériser les régions épitopiques à la surface des LTP de pomme, d'abricot et de prune afin de définir le support moléculaire des réactions croisées que l'on observe fréquemment entre différentes LTP de fruits, 2) d'étudier la localisation tissulaire et cellulaire des LTP dans les fruits afin d'expliquer les réactions allergiques souvent sévères qu'entraînent l'ingestion ou même le simple contact avec des fruits chez les patients fortement sensibilisés et, 3) de produire des LTP recombinantes utilisables pour le diagnostic des allergies aux fruits et susceptibles d'être modifiées pour produire des hypoallergènes recombinants.

Différentes approches de Biochimie (chromatographie d'échange d'ions, électrophorèse SDS-PAGE, spectrométrie de masse, spectroscopie de dichroïsme circulaire, analyse RMN des LTP), d'Immunochimie (immuno-empreintes tissulaires, localisation en microscopie de fluorescence et en microscopie électronique à l'aide d'antiglobulines marquées, dosages ELISA), de Bioinformatique structurale (prédictions d'épitopes à l'aide de profils hydropathiques, analyse HCA des séquences, modélisation moléculaire par homologie) et de Biologie moléculaire (expression de LTP recombinantes dans *E. coli* utilisant la technologie Gateway), pour ne citer que les principales, ont été mises en oeuvre dans ce travail. Ces techniques sont exposées dans le chapitre Matériel et méthodes du mémoire de Thèse.

Les résultats obtenus, exposés dans le chapitre Résultats du présent mémoire, nous ont permis 1) de définir les régions épitopiques des LTP et de montrer l'existence d'épitopes consensuels, conservés dans de nombreuses séquences de LTP de fruits, apparemment responsables des réactions croisées observées en clinique, 2) de préciser la localisation des LTP essentiellement dans la peau des fruits et de souligner les différences importantes de teneur en LTP selon les variétés de pomme en particulier et 3) de produire des LTP recombinantes de pomme et de pêche dont le repliement semble correct et dont l'activité (reconnaissance par les IgE de patients allergiques aux fruits, dégranulation de basophiles de rat exprimant la sous-unité  $\alpha$  du récepteur Fc $\epsilon$ RI humain) s'avèrent comparables à ceux des LTP natives.



# **MATERIEL ET METHODES**



## MATERIEL ET METHODES

1 - Extraction et purification des LTP des fruits	67
1.1 – Extraction des protéines de la peau de fruits	67
1.2 – Purification des LTP sur colonne échangeuse de cations	67
1.2.1 - Principe	67
1.2.2 - Protocole	68
1.3 – Gel d'électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes	68
2 - Clonage des LTP	69
2.1 – Extraction des ARN	69
2.2 – Production des ADNc par RT-PCR	71
2.3 - Clonage du gène d'intérêt par la méthode Gateway	71
2.3.1 – Principe de la technologie Gateway	71
2.3.2 – Choix des différentes amorces	73
2.3.3 - Construction des adaptateurs pour le clonage avec peptide signal	73
2.3.4 - Construction des adaptateurs pour le clonage sans peptide signal	75
2.3.5 – Choix des vecteurs pour la réaction BP	77
2.3.6 – Choix des vecteurs pour la réaction LR	77
2.4 – Surexpression des LTP recombinantes	78
2.4.1 - En milieu Luria-Broth (LB)	78
2.4.2 - En milieu minimum M9 pour le marquage uniforme <sup>15</sup> N	78
2.5 – Purification des LTP recombinantes	79
3 – Caractérisation structurale des protéines allergéniques	79
3.1 – Spectrométrie de masse MALDI-TOF (mode réflectron et mode linéaire) et recherche dans les banques de données	79
3.1.1 – Principe de la spectrométrie de masse	79
3.1.2 – La spectrométrie de masse MALDI-TOF	81
3.1.3 – Expériences réalisées	85
3.2 – Spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC)	87
3.2.1 – Principe	87
3.2.2 – Utilisation de la spectroscopie de dichroïsme circulaire pour l'étude des LTP	89
3.3 – Modélisation moléculaire et prédiction des épitopes	91
3.3.1 – Recherche et alignements de séquences	91
3.3.2 – Profils HCA (Analyse des Clusters Hydrophobes)	91

3.3.3 – Modélisation moléculaire par homologie	92
3.3.4 – Prédiction des épitopes de surface	95
4 – Caractérisation immunologique des protéines allergéniques	97
4.1 – Production d'anticorps polyclonaux chez le lapin	97
4.1.1 - Anticorps obtenus à partir des protéines	97
4.1.2 – Anticorps obtenus à partir des peptides épitopiques	97
4.2 – Double diffusion en gel d'agarose (méthode Ouchterlony)	97
4.2.1 – Principe	97
4.2.2 – Réalisation	99
4.3 – Immuno-réactions (western-blots et dosages ELISA)	101
4.3.1 – Principes	101
4.3.2 - Western-blots	102
4.3.3 - Dosages ELISA	102
4.4 – Caractérisation des épitopes de surface (méthode Elispot)	103
4.4.1 – Principe	103
4.4.2 – Expériences réalisées	103
4.5 – Dégranulation de lignées de basophiles	105
4.5.1 – Principe	105
4.5.2 – Expériences réalisées	105
4.5.2.1 – Culture cellulaire	105
4.5.2.2 – Tests de dégranulation	106
4.5.2.3 – Mesure de l'activité $\beta$ -hexosaminidase	106
5 – Localisation immuno-histochimique des LTP	107
5.1 - Localisation en microscopie confocale	107
5.1.1 – Principe de la microscopie confocale à balayage laser	107
5.1.2 – Préparation des échantillons	108
5.1.3 – Expériences réalisées en microscopie confocale	108
5.2 - Localisation par microscopie électronique en transmission	109
5.2.1 – Principe de la microscopie électronique en transmission	109
5.2.2 – Expériences réalisées en microscopie électronique en transmission (marquage à l'or colloïdal)	109
5.3 – Immuno-tissue empreintes (Immuno-Tissue Printing, ITP)	110



## **1 - Extraction et purification des LTP des fruits**

### **1.1 – Extraction des protéines de la peau de fruits**

Les peaux de pêche pelées sont lyophilisées avant broyage dans un mortier, en présence constante d'azote liquide. La poudre fine ainsi obtenue est resuspendue dans le tampon d'extraction (20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2% m/v PVP-40) à raison de 200mL de tampon pour 40g de peau. Après agitation continue pendant une nuit à 4°C, deux étapes de centrifugation de 20 minutes à 4°C (16000g puis 30000g) permettent de clarifier l'extrait et de récupérer un surnageant limpide. Le surnageant est alors dialysé 3 jours contre de l'eau milli-Q dans un boudin de dialyse (seuil de coupure 3500Da). Après une dernière étape de centrifugation (3000g) de 20min à 4°C, le surnageant est filtré sur papier filtre. Les extraits protéiques sont alors dosés (dosage BCA) puis lyophilisés.

### **1.2 – Purification des LTP sur colonne échangeuse de cations**

#### **1.2.1 - Principe**

Le caractère basique des protéines de transfert de lipides (pI ~ 9) constitue un paramètre physico-chimique intéressant à prendre en compte pour leur purification. Les méthodes chromatographiques, notamment la chromatographie d'échange d'ions, peuvent ainsi s'avérer très intéressantes à utiliser. En effet, la chromatographie d'échange d'ions est basée sur les interactions électrostatiques entre des ions de charges opposées dont l'un est fixé de façon covalente sur un support et l'autre, libre en solution. Par traitement avec des solutions de force ionique plus élevée ou par modification de la valeur du pH, il est possible de décrocher de façon sélective les ions fixés. Dans notre cas, les colonnes utilisées sont des échangeuses de cations fortes. Elles sont constituées d'une phase stationnaire de type agarose sur laquelle des groupements sulfonate  $-(CH_2)_3-SO_3^-$  ont été fixés de manière covalente (taux de greffage de 6% pour les colonnes SP FF Amersham, avec une capacité de fixation de 70mg de Ribonucléase A / mL de gel). L'interaction entre les charges négatives de la colonne et les charges positives de la protéine permettront une bonne purification lorsque le pH de l'extrait protéique total sera inférieur au pI de la protéine. En effet, lorsqu'une protéine est

dans une solution dont le pH est égal à son pI, sa charge nette est nulle. Si le pH est inférieur au pI, la charge nette de la protéine est positive et la colonne utilisée est une échangeuse de cations. Si c'est le contraire, la charge nette est négative et la colonne est une échangeuse d'anions. Dans tous les cas, l'étape la plus importante consiste à fixer la protéine d'intérêt sur la colonne. Pour cela, un tampon de fixation dont le pH sera inférieur d'au moins 2 unités pH au pI sera utilisé. Ceci permettra une meilleure fixation de la protéine sur la colonne. Avant l'analyse, un tampon contenant une faible concentration en contre-ions  $\text{Na}^+$  est utilisé. Les résidus sulfonate greffés vont lier les ions  $\text{Na}^+$  en solution et, lors de l'introduction de la protéine à un pH inférieur à son pI, les acides aminés qui portent à cette valeur de pH une charge positive vont déplacer les ions  $\text{Na}^+$  interagissant avec la phase stationnaire et se fixer à celle-ci. De plus, l'utilisation d'un extrait protéique dilué permettra une meilleure interaction et donc une meilleure fixation de la protéine sur la colonne. Ceci évitera notamment que la protéine d'intérêt n'interagisse avec des protéines de charge nette opposée et qu'elle ne soit pas retenue sur la colonne.

### **1.2.2 - Protocole**

Le lyophilisat est repris dans le tampon de fixation contenant 50mM de phosphate de sodium à pH 7.5 au préalablement filtré ( $0.45\mu\text{m}$ ). Après lavage de la colonne avec 20 vol. de colonne (50mM tampon phosphate pH 7.5, 1M NaCl), la phase d'équilibration avec 10 vol. de tampon de fixation permet d'éliminer les sels. Les échantillons préalablement centrifugés sont injectés en tête de colonne et les LTP fixées avec un débit de 1mL/min. A la fin de l'étape de fixation, l'extrait protéique non fixé est repassé en tête de colonne. Après une dernière étape de lavage (10 vol. de tampon de fixation), les LTP sont éluées en présence de tampon de fixation additionné de 50mM NaCl. La pureté de la purification est alors vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et révélation au nitrate d'argent.

## **1.3 – Gel d'électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes**

Afin de vérifier la bonne purification des LTP de fruits, mais aussi d'effectuer des immuno-révélation (Western Blot), des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes

sont réalisés. Le maillage utilisé, de 15% d'acrylamide-bisacrylamide, permet de séparer les protéines de faible poids moléculaire comme les LTP (environ 9-10kDa). Afin de mieux séparer ces protéines, un nouveau protocole a été mis au point récemment (Tastet et al., 2003), utilisant un mélange Tris/Taurine au lieu d'un mélange Tris/Glycine couramment utilisé pour la migration. De légères modifications ont également été apportées dans les tampons de polymérisation, permettant ainsi une meilleure séparation lors de la migration. Ainsi, le tampon utilisé pour polymériser le gel de migration est un tampon 6x contenant 1.24M Tris, 0.6M HCl à pH 8.05 et pour polymériser le gel de concentration, un tampon 6x contenant 0.74M Tris, 0.6M HCl à pH 6.8. Les gels migrent pendant 2 heures à 20A par gel (ampérage constant), dans une cuve contenant un tampon 50mM Tris, 200mM Taurine additionné de 0.1% SDS. Les gels sont colorés ensuite au bleu de Coomassie, au nitrate d'argent ou bien transférés sur membrane de nitrocellulose.

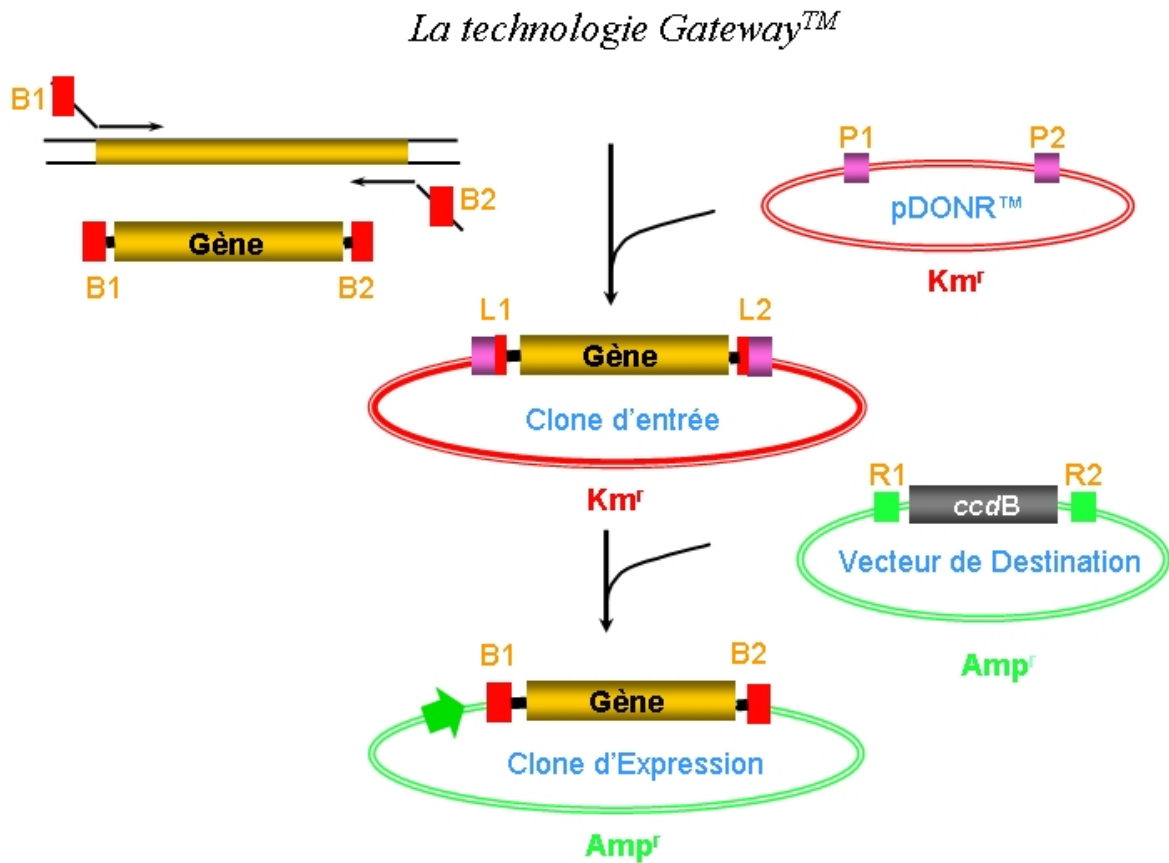
## **2 - Clonage des LTP**

### **2.1 – Extraction des ARN**

50mg de peau de pomme Golden Delicious et de pêche jaune sont réduits en poudre dans un mortier après congélation dans l'azote liquide. Après addition de 600 $\mu$ L de tampon de lyse contenant 4M d'isothiocyanate de guanidine, 0.2M d'acétate de sodium pH 5.0, 25mM EDTA, 2.5% (m/v) PVP-40 et 1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol (ajouté extemporanément), l'échantillon est agité vigoureusement. Après ajout de 2% sarkosyl et incubation à 70°C pendant 10 minutes, le lysat est déposé dans les colonnes QIAshredder (Qiagen<sup>®</sup>).

Le protocole suivi est alors celui du fournisseur (Qiagen RNeasy<sup>®</sup> plant mini-kit). Après une première centrifugation de 2 minutes à 15000g, le filtrat est repris avec 0,5 vol. d'éthanol 100%. Après transfert sur colonne et une deuxième étape de centrifugation de 15 secondes à 8000g, le filtrat est éliminé. La colonne est lavée avec 700 $\mu$ L de tampon RW1 et, après une troisième centrifugation de 15 secondes à 8000g, le filtrat est éliminé. Après action de la DNase, 500 $\mu$ L de tampon RPE est ajouté à la colonne. A la suite d'une quatrième centrifugation de 2 minutes à 8000g, les ARN sont élués de la colonne par 50 $\mu$ L d'eau après une dernière étape de centrifugation de 1 minute à 8000g.

La pureté des ARN est alors estimée par électrophorèse sur gel d'agarose et calcul du rapport des absorbances à 260nm et 280nm.



**Figure 3: Clonage des LTP par la technologie Gateway™**

Le gène est cloné en utilisant des amorces permettant d'ajouter les boîtes de recombinaison attB en 5' et en 3'. Les différents vecteurs utilisés sont obtenus ensuite par recombinaison entre attB et attP (réaction B-P) et attL et attR (réaction L-R). Cette méthode de clonage évite les digestions de vecteurs et les insertions éventuelles.

## 2.2 – Production des ADNc par RT-PCR

Le protocole suivi est celui du kit « SuperScript » (Invitrogen<sup>®</sup>). 500ng à 1µg d'ARN issus de l'extraction sont chauffés 3 minutes à 70°C à l'aide d'un thermocycleur. A 4°C, la solution de Reverse-Transcription est ajoutée, contenant 50ng d'hexamères aléatoires, 0.5mM de dNTP, 4µL de Tampon 5x [100mM Tris-HCl (pH 8.4)], 40 unités de Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 10mM de DTT, Eau qsp 20µL. Après 10 minutes à 25°C et l'ajout de 50 unités de Reverse-Transcriptase « SuperScript II RT », l'extrait est chauffé 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C. Les produits sont alors conservés sur glace pour une amplification spécifique du gène par PCR.

## 2.3 - Clonage du gène d'intérêt par la méthode Gateway

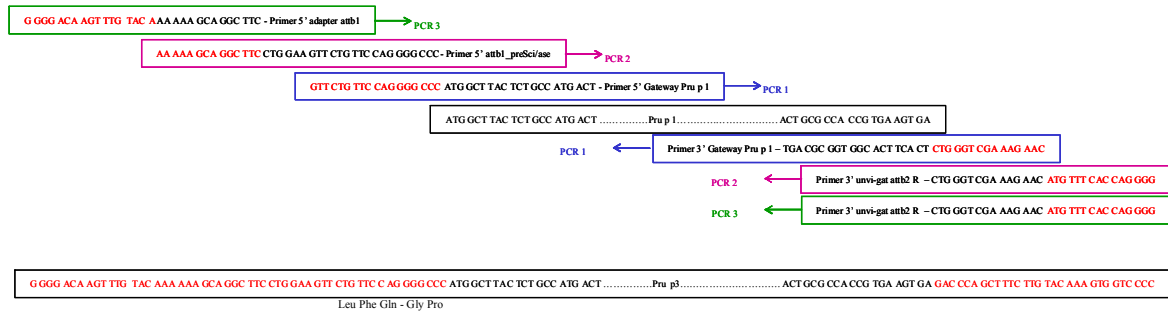
Le travail a été réalisé en collaboration étroite avec le Dr D. Aldon (SCSV UMR5546, Castanet-Tolosan).

### 2.3.1 – Principe de la technologie Gateway

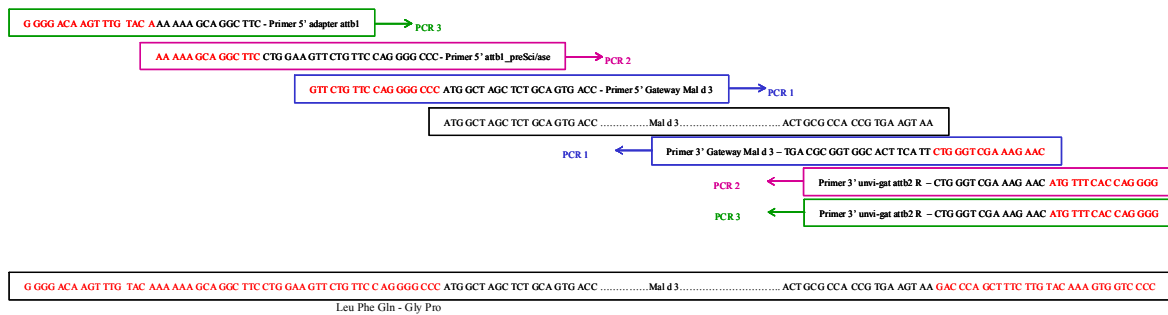
Certains inconvénients rencontrés lors de clonages « classiques » (utilisation d'enzymes de restriction, digestion de produits PCR avant clonage, mauvaises insertions de gènes dans les plasmides) ont conduit, en 2000, à la création d'une technologie de clonage directionnel appelée « technologie Gateway » (Invitrogen<sup>®</sup>) (Hartley et al., 2000). Cette technologie est une méthode de clonage par recombinaison *in vitro* qui utilise la capacité d'intégration et d'excision, site-spécifique, du bactériophage  $\lambda$  dans le génome d'*E. coli*. Ces réactions sont médiées par des enzymes « recombinases » de la famille des  $\lambda$  intégrases qui catalysent un échange réciproque d'ADN double-brin entre deux sites de séquences nucléiques spécifiques. Son principe, très simple d'utilisation, est représenté sur la figure 3. Il permet le clonage d'un insert sans aucune digestion enzymatique. De plus, un seul séquençage est nécessaire lors du clonage et les vecteurs d'expression commercialisés permettent un large choix de stratégies d'expression et de purification des protéines recombinantes (Earley et al., 2006). Des « adaptateurs » sont générés en 5' et en 3' du gène d'intérêt par PCR. Ces adaptateurs (nommés attB1 et attB2), permettront par recombinaison l'insertion du gène dans un plasmide donneur (possédant les sites attP1 et attP2). Le plasmide ainsi créé, appelé « plasmide d'entrée ou pEntry », possédera alors les sites attL1 et attL2. Ce plasmide sera ensuite recombiné avec autant de plasmides de destination contenant les sites attR1 et attR2 que de constructions désirées (production de protéine de fusion, étiquette Histidine...)



## Gateway Pru p 3



## Gateway Mal d 3



**Figure 4: Construction des adaptateurs par PCR pour le clonage Gateway<sup>TM</sup> des LTP de pêche et de pomme avec conservation du peptide signal**

Les différentes boîtes de recombinaison, ainsi que le site de coupure à la Precision Protéase, sont ajoutés par PCR successives.

(Moreland et al., 2005). Des clonages en « Gateway multisites » sont également possibles, permettant le clonage en une seule étape de plusieurs fragments d'ADN (Magnani et al., 2006). La technologie Gateway est de plus en plus utilisée, notamment depuis la mise en place de grands projets de génomique structurale dans les laboratoires (Moreland et al., 2005).

### 2.3.2 – Choix des différentes amorces

Les réactions de PCR sont réalisées avec la Pfu (*Pyrococcus furiosus*) DNA Polymérase (Promega<sup>®</sup>). Les couples d'amorces utilisés, permettant le clonage des différentes constructions de LTP, sont les suivants :

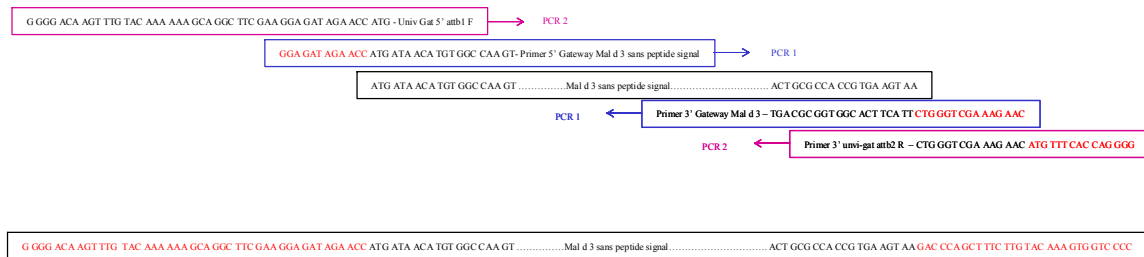
- LTP de pêche, avec peptide signal  
 amorce 5' (sens) : 5'-ATGGCTTACTCTGCCATGAC-3'  
 amorce 3' (anti-sens) : 5'-TCACTTCACGGTGGCGCAGT-3'
- LTP de pomme, avec peptide signal  
 amorce 5' (sens) : 5'-ATGGCTAGCTCTGCAGTGAC-3'  
 amorce (anti-sens) : 5'-TCACTTCACGGTGGCGCAGT-3'
- LTP de pomme, sans peptide signal  
 amorce 5' (sens) : 5'-ATGATAACATGTGGCCAAGT-3'  
 amorce 3' (anti-sens) : 5'-TCACTTCACGGTGGCGCAGT-3'

### 2.3.3 - Construction des adaptateurs pour le clonage avec peptide signal

Une première étape de PCR (PCR n°1) permet d'ajouter, en 5' des gènes clonés avec leur peptide signal, le site de coupure à la Prescission Protease (Amersham<sup>®</sup>). Des adaptateurs contenant les boîtes de recombinaison attB1 et attB2 sont ensuite ajoutés afin d'utiliser le clonage en système Gateway, respectivement en 5' et en 3' du gène cloné (PCR n°2 et n°3). Les séquences soulignées correspondent, en 5', au site de Coupure de la Prescission Protease puis à la boîte attB1 et, en 3', à la boîte attB2. Toutes ces étapes sont résumées sur la figure 4.

PCR n°1

- LTP de pêche, avec peptide signal  
 amorce 5' (sens) :  
 5'-GTTCTGTTCCAGGGGCCATGGCTTACTCTGCCATGACT-3'  
 amorce 3' (anti-sens) :  
 5'-CAAGAAAGCTGGGTCTCACTTCACGGTGGCGCAGT-3'



**Figure 5: Construction des adaptateurs par PCR pour le clonage Gateway<sup>TM</sup> de Mal d 3 sans conservation du peptide signal**

Les différentes boîtes de recombinaison sont ajoutées par PCR successives. Les amorces de la PCR n°1 sont choisies de façon à ne pas conserver les 24 premiers acides aminés de la séquence (peptide signal). La protéine recombinante possède ainsi la même séquence que la protéine native retrouvée dans les pommes.

- LTP de pomme, avec peptide signal

amorce 5' (sens) :

5'-GTTCTGTTCCAGGGGCCCATGGCTAGCTCTGCAGTGACC-3'

amorce 3' (anti-sens) :

5'-CAAGAAAGCTGGGTCTTACTTCACGGTGGCGCAGT-3'

PCR n°2

- LTP de pomme et de pêche, avec peptide signal

amorce 5' (sens) :

5'-AAAAAGCAGGCTTCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCC-3'

amorce 3' (anti-sens) : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3'

PCR n°3

- LTP de pomme et de pêche, avec peptide signal

amorce 5' (sens) : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC-3'

amorce 3' (anti-sens) : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3'

### 2.3.4 - Construction des adaptateurs pour le clonage sans peptide signal

Pour ce clonage, le site de coupure à la Precision Protéase n'a pas été rajouté (fig. 5). De plus, les nucléotides codant pour les acides aminés retrouvés dans le peptide signal n'ont pas été inclus dans le gène. Deux étapes de PCR suffisent donc pour construire les adaptateurs contenant les boîtes attB1 et attB2 permettant l'utilisation du clonage en système Gateway.

PCR n°1

- LTP de pomme, sans peptide signal

amorce 5' (sens) : 5'-GGAGATAGAACCATGATAACATGTGGCCAAGT-3'

amorce 3' (anti-sens) :

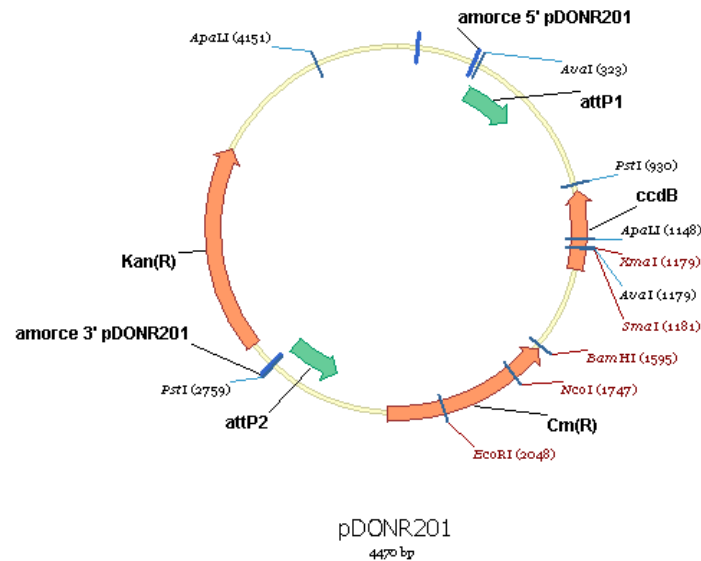
5'-CAAGAAAGCTGGGTCTTACTTCACGGTGGCGCAGT-3'

PCR n°2

- LTP de pomme, sans peptide signal

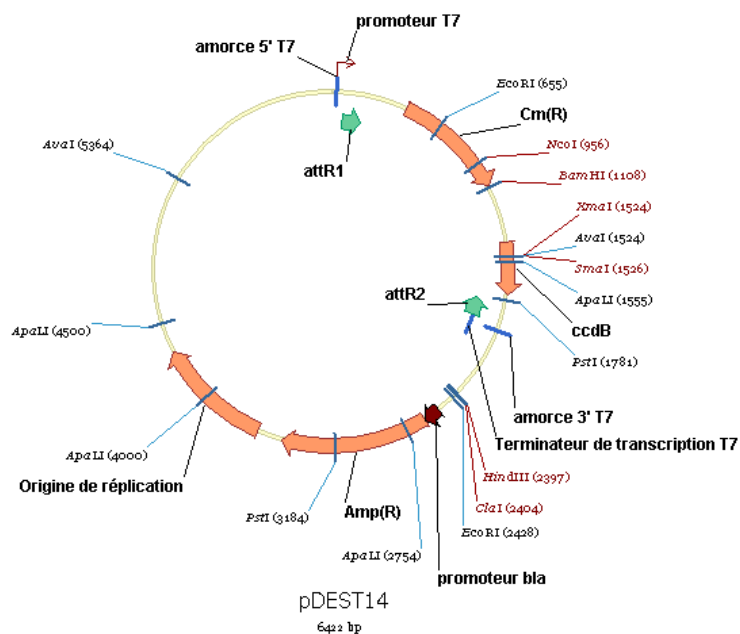
amorce 5' (sens) : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC  
TTCGAAGGAGATAGAA CCATG-3'

amorce 3' (anti-sens) : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3'



**Figure 6: Carte du plasmide pDONR201 d'Invitrogen®**

Les différents sites de coupe des enzymes de restriction sont indiqués. Les sites attP1 et attP2 permettant le clonage directionnel en système Gateway sont indiqués par des flèches vertes. Entre ces sites, la cassette ccdB, toxique pour les bactéries DH5 $\alpha$ , contient également un gène codant pour une résistance au chloramphénicol.



**Figure 7: Carte du plasmide de destination pDEST14 d'Invitrogen®**

Les différents sites de coupe des enzymes de restriction sont indiqués. Les sites attR1 et attR2 permettant le clonage directionnel en système Gateway sont indiqués par des flèches vertes. Le gène d'intérêt, inséré entre ces sites de recombinaison, est alors sous le contrôle du promoteur fort T7.

### 2.3.5 – Choix des vecteurs pour la réaction BP

Le gène d'intérêt, une fois les adaptateurs attB1 et attB2 créés, est ensuite recombiné avec le plasmide donneur pDONR201 (carte du plasmide présentée à la figure 6). La recombinaison « BP » s'effectue à température ambiante pendant la nuit, en présence de 100ng de vecteur pDONR201, 1µL de produit PCR, 2µL de tampon BP (5x), 4µL de tampon TE (10mM Tris, 1mM EDTA à pH 8) et 2µL de BP clonase (Invitrogen<sup>®</sup>). Après une nuit de recombinaison, la BP clonase est inactivée par addition de 1µL de protéinase K et la solution est incubée au moins 1 heure à 37°C au bain agitant.

Des bactéries DH5α (Invitrogen<sup>®</sup>) sont ensuite transformées avec le produit de la réaction BP et mises en culture dans des boîtes de Pétri contenant du LB-Agar additionné de 50µg/mL de kanamycine pour sélectionner les plasmides normalement recombines. Les clones positifs contiennent le plasmide nouvellement créé : le « pEntry ». Les transformants contenant le plasmide non recombine ne poussent pas du fait de la présence de la cassette toxique ccdB sur le pDONR201 codant pour une protéine qui interfère avec la DNA girase des bactéries, empêchant ainsi leur croissance. Les clones sélectionnés (résistants à la kanamycine et sensibles au chloramphénicol) sont ensuite séquencés.

### 2.3.6 – Choix des vecteurs pour la réaction LR

Lorsqu'un clone a été séquencé avec succès, la réaction LR est lancée. Le choix du plasmide de destination est alors primordial. Il est fonction du type de production souhaité. Pour une surexpression en système procaryote (promoteur fort T7 inducible à l'IPTG) d'une protéine fusionnée en N-terminal avec la Glutathion S-transférase pour faciliter sa purification, le plasmide pDEST15 (Invitrogen<sup>®</sup>) est choisi. Pour une production en système procaryote sans protéine de fusion, le choix se portera sur le pDEST14 (Invitrogen<sup>®</sup>) (fig. 7). C'est l'utilisation de ce dernier vecteur qui sera ici détaillée.

La réaction LR, au même titre que la réaction BP, se déroule sur la nuit en présence de 1µL de plasmide de destination, 1µL de pEntry, 2µL de tampon LR (5x), 4µL de TE à pH 8 et 2µL de LR clonase. Après une nuit de recombinaison, la LR clonase est inactivée par addition de 1µL de protéinase K et la solution est incubée au moins 1 heure à 37°C au bain agitant.

Des bactéries DH5α (Invitrogen<sup>®</sup>) sont ensuite transformées avec le produit de la réaction LR et mises en culture dans des boîtes de Pétri contenant du LB-Agar additionné de 50µg/mL d'ampicilline pour sélectionner les plasmides normalement recombines. Les clones

positifs sont aussi testés dans des boîtes de Pétri contenant du LB-Agar additionné de kanamycine et de chloramphénicol. Les clones sensibles à ces deux derniers antibiotiques et résistants à l'ampicilline sont alors digérés avec des enzymes de restriction afin de vérifier la présence de bandes aux tailles attendues.

Afin d'exprimer et de produire la protéine d'intérêt en système hétérologue, les plasmides d'expression sont transformés dans des bactéries compétentes adéquates (*E coli* BL21 (DE3) – don du Dr P. Demange, IPBS Toulouse).

## 2.4 – Surexpression des LTP recombinantes

### 2.4.1 - En milieu Luria-Broth (LB)

Après une nuit de pré-culture à 37°C sous agitation (220 rpm) en présence de 100µg/mL d'ampicilline et de 0,1% (m/v) de glucose, les cultures bactériennes sont diluées dans du milieu LB frais additionné d'ampicilline et de glucose afin d'obtenir une  $DO_{600nm} = 0,05$ . Après environ 2h30 de culture à 37°C, les bactéries sont en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} \sim 0,5$  à  $0,7$ ). 2mM d'IPTG sont ajoutés et l'induction est maintenue 3h30 à 37°C sous agitation. Les cultures sont alors centrifugées 15min à 4000g à 4°C et les culots ainsi obtenus sont conservés à -20°C pour une lyse ultérieure.

### 2.4.2 - En milieu minimum M9 pour le marquage uniforme $^{15}N$

Pour produire la LTP recombinante marquée uniformément à l'azote 15 ( $^{15}N$ ), un milieu minimum de culture M9 additionné de chlorure d'ammonium  $^{15}NH_4Cl$  est utilisé (Sambrook et al., 1989).

Après 24h de pré-culture à 37°C en présence de milieu M9 additionné de 100µg/mL d'ampicilline et de 0,1% (m/v) de glucose, les cultures bactériennes sont diluées pour atteindre une  $DO_{600nm} = 0,02$ . Après environ 4h de culture à 37°C, les bactéries sont en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} \sim 0,1$ ). 2mM d'IPTG sont ajoutés et l'induction est maintenue 2h à 37°C sous agitation. Les cultures sont alors centrifugées 15min à 4000g à 4°C. Les culots sont conservés à -20°C.

## **2.5 – Purification des LTP recombinantes**

Les culots sont placés 15min dans de l'azote liquide, puis 15min dans un bain thermostaté à 60°C. Ce cycle est répété 2 fois afin de permettre une bonne lyse bactérienne par destabilisation thermique des membranes.

Chaque culot (représentant 2 litres de culture bactérienne induite) est repris avec 150mL de tampon de lyse (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.3) dans un grand béccher refroidi sur glace. 0,5% Triton X-100, 1mM DTT, 0,1mM PMSF, 1µg/mL DNase, 20µg/mL lysosyme, 5mM EDTA, 1mM MgCl<sub>2</sub> sont alors ajoutés et le lysat est laissé incubé 30 minutes sur glace. Après lyse à la presse de French, les lysats bactériens sont clarifiés par centrifugation à 12000g pendant 5min à 4°C. Les surnageants sont alors dialysés contre du tampon 50mM phosphate (pH 7.3) pendant au moins 3 jours en changeant le tampon 2 à 3 fois par jour. Les extraits sont ensuite filtrés sous vide avec un filtre 0,45µm.

La LTP recombinante est ensuite purifiée sur colonne échangeuse de cations (SP FF 5mL Amersham) en fixant avec un tampon 50mM phosphate (pH 7.4) et en éluant avec un tampon 50mM phosphate, 200mM NaCl (pH 7.4).

La pureté est vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE après coloration au nitrate d'argent. Les protéines basiques de haut-poids moléculaire d'origine bactérienne sont éliminées après un passage sur Amicon 30kDa et récupération du filtrat.

Une dialyse contre de l'eau milli-Q est alors effectuée pendant au moins 7 jours avant de terminer la purification par une étape de lyophilisation.

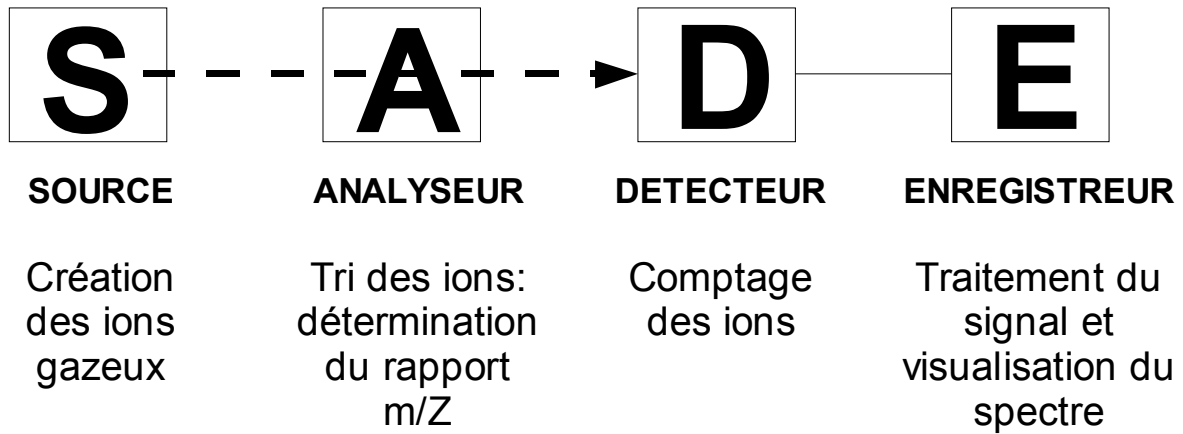
## **3 – Caractérisation structurale des protéines allergéniques**

### **3.1 – Spectrométrie de masse MALDI-TOF (mode réflectron et mode linéaire) et recherche dans les banques de données**

#### **3.1.1 – Principe de la spectrométrie de masse**

La très grande complexité structurale des différentes familles de polypeptides implique que la simple séparation et détection électrophorétique ou chromatographique de ces molécules ne suffisent généralement pas à déterminer de façon univoque leur identité. La





**Figure 8: Schéma simplifié d'un spectromètre de masse**

Tous les spectromètres de masse se composent de ces 4 éléments. En fonction du type de source et du type d'analyseur, il est possible de rechercher des molécules très différentes ainsi que de faire de la détermination de séquence (sucres, acides aminés, composés chimiques...).

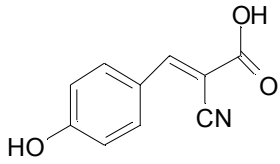
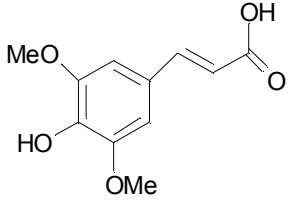
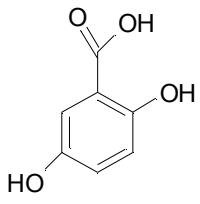
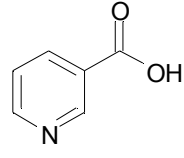
spectrométrie de masse, qui peut fournir des informations structurales sur les biomolécules, permet de caractériser dans un échantillon la présence de peptides répertoriés et d'identifier également les peptides non encore connus. Composé d'une source, d'un analyseur, d'un détecteur et d'un enregistreur, un spectromètre de masse permet l'analyse d'un grand nombre de composés différents (fig. 8).

Les premiers travaux en analyse de biomolécules par spectrométrie de masse datent des années 1960, avec l'analyse par ionisation par impact électronique (IE) de peptides modifiés chimiquement. Mais du fait de leur faible sensibilité et compatibilité avec l'analyse de biomolécules de masse supérieure à 25-30 kDa, ou avec l'analyse de mélanges complexes, il aura fallu attendre la fin des années 1980 pour utiliser cette technologie, en routine, pour l'étude des protéines. Ainsi, avec l'introduction de deux nouvelles techniques d'ionisation, la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Tanaka et al., 1988) et l'ionisation par électronébulisation ou électrospray (ESI) (Fenn et al., 1989), des nouveaux appareillages ont vu le jour, permettant d'amener des biomolécules de poids élevé en phase gazeuse, à partir d'une phase solide (MALDI) ou liquide (ESI). Ces deux types de sources d'ions ont été couplés à une large palette d'analyseurs : à temps de vol (TOF), quadripôle, secteurs magnétiques/électriques, à trappe ionique ou encore à résonance cyclotronique d'ion avec transformée de Fourier (FT-ICR).

L'impact de la mise au point de ces nouvelles technologies ont d'ailleurs permis à leurs auteurs de recevoir récemment un prix Nobel. En 2002, le prix Nobel de chimie a été attribué par l'Académie Royale des Sciences de Suède, pour moitié conjointement à l'américain John B. Fenn (Virginia Commonwealth University, Richmond, USA) et au japonais Koichi Tanaka (Shimadzu Corp., Kyoto, Japon) "pour le développement de méthodes de désorption-ionisation douces pour l'analyse par spectrométrie de masse des macromolécules biologiques" et pour l'autre moitié au suisse Kurt Wüthrich (école Polytechnique Fédérale (EPFou ETH) de Zurich, Suisse et The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) "pour le développement de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire pour l'identification de la structure tridimensionnelle des macromolécules en solution".

### **3.1.2 – La spectrométrie de masse MALDI-TOF**

Les deux techniques d'ionisation MALDI et ESI présentent des caractéristiques communes : elles génèrent toutes deux des molécules protonées ; elles permettent de déterminer précisément la masse moléculaire de biomolécules jusqu'à plusieurs centaines de kDa ; leurs limites de détection sont inférieures à la picomole et, enfin, elles permettent

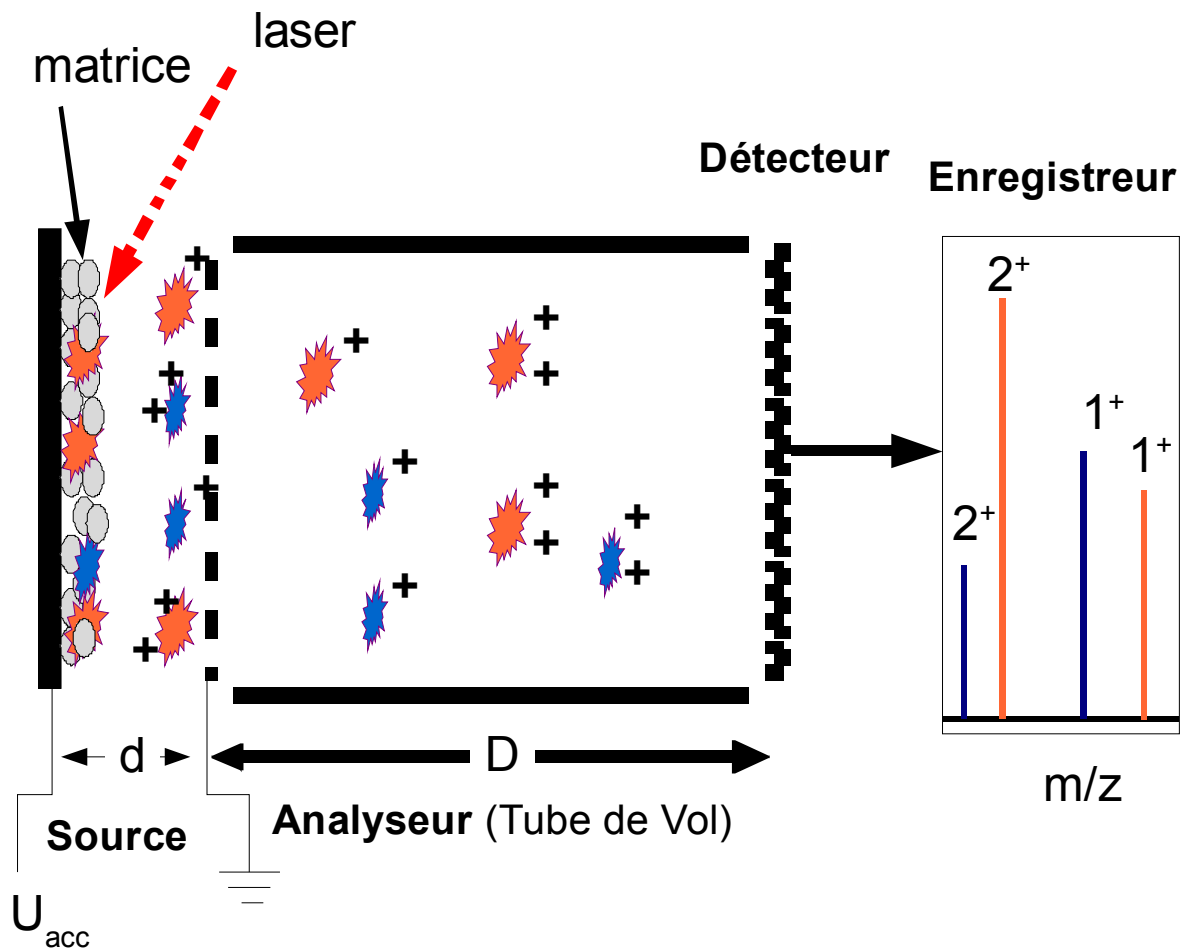
Noms	Structures	Longueurs d'ondes d'absorption	Applications courantes
Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique		266, 337 et 355nm (UV)	Peptides et protéines
Acide sinapinique		337 et 355nm (UV)	Protéines
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque		266, 337 et 355nm (UV)	Oligosaccharides , glycopeptides et glycoprotéines
Acide nicotinique		266nm (UV)	Protéines

**Tableau 5: Matrices les plus couramment utilisées pour l'étude de biomolécules en spectrométrie de masse MALDI-TOF**

d'analyser des mélanges complexes avec succès (en particulier le MALDI). La technique MALDI, généralement couplée à un analyseur à temps de vol (TOF pour Time Of Flight), est largement utilisée pour l'étude de peptides et protéines, mais aussi de polymères de sucres, d'acides nucléiques, etc. Certaines études de fragmentation peuvent aussi être réalisées en mode PSD (**P**ost **S**ource **D**ecay, une technique permettant d'effectuer une fragmentation des peptides après ionisation).

Un appareil de type MALDI-TOF permet d'obtenir une carte peptidique massique représentant la distribution des masses des fragments peptidiques obtenus par digestion trypsique d'une protéine. Ces fragments peptidiques, co-cristallisés sur un support avec des molécules de matrice, sont désorbés dans une source et accélérés avant de parcourir le tube de vol. Afin d'être accélérées, ces molécules doivent être ionisées. Après irradiation par un bref tir laser dirigé sur des cristaux formés de l'analyte et d'une matrice dont la propriété est d'absorber à la longueur d'onde du laser, un jeu de transferts d'énergie se met en place. A partir de la matrice, une cascade de désolvatations conduit à la libération d'ions quasi moléculaires désolvatés (ions en phase gazeuse). Ces étapes étant très rapides (de l'ordre de la microseconde), le processus de destruction moléculaire par pyrolyse se trouve limité dans cette période d'ionisation. Ce mode d'ionisation « douce » permet une grande sensibilité (sub femtomolaire) et une grande rapidité d'analyse (quelques secondes). Un grand nombre de composés organiques ont été testés pour assurer le rôle de matrice. Parmi tous les candidats potentiels, seul un petit nombre se sont avérés utilisables en spectrométrie de masse MALDI car ces molécules doivent répondre aux critères suivants: (i) elles doivent être solubles dans des solvants compatibles avec ceux utilisés pour solubiliser les molécules cibles; (ii) elles doivent être facilement cristallisables tout en pouvant incorporer les molécules d'échantillon de façon dispersée; (iii) elles doivent pouvoir absorber l'énergie correspondant à la longueur d'onde du laser incident et (iv) elles doivent être capables de désorber l'échantillon et de l'ioniser par transfert de protons. Les matrices les plus utilisées pour la co-cristallisation de peptides ou de protéines sont l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique), l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (alpha-cyano) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB). Elles sont présentées en détail au sein du tableau 5.

Les ions ainsi générés sont accélérés par un champ électrique uniforme. Ils vont alors traverser une région libre de champ (le tube de vol) avec une vitesse inversement proportionnelle à leur rapport  $m/z$  (masse / charge): plus l'ion porte de charges, plus sa vitesse sera grande, mais plus sa masse est importante, plus sa vitesse sera réduite. Le temps de vol



**Figure 9: Principe général de la technique MALDI-TOF**

Au niveau de la source, les molécules sont volatilisées et ionisées après l'impact laser sur les co-cristaux de matrice de l'analyte. Les ions sont accélérés par un champ électrique uniforme ( $U_{acc}$ ) sur une distance  $d$  puis traversent une région libre de champ, le tube de vol de longueur  $D$ , avec une vitesse constante qui sera inversement proportionnelle au rapport  $m/z$ . Ainsi, les ions les plus chargés et les plus légers vont atteindre le détecteur les premiers.

des ions est alors mesuré et converti en  $m/z$  (fig. 9).

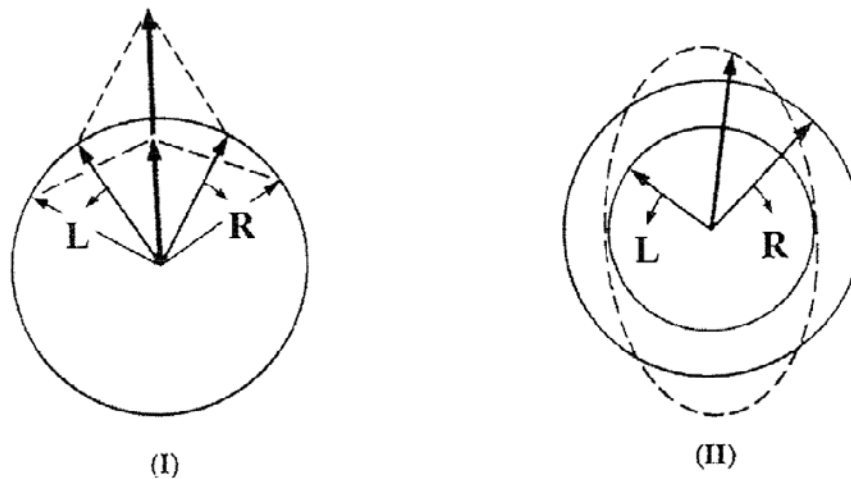
### 3.1.3 – Expériences réalisées

Afin d'identifier les protéines purifiées, les spots colorés au bleu de Coomassie sont découpés et digérés à la trypsine afin de produire des peptides identifiables en spectrométrie de masse (méthode « peptide mass mapping »).

Après découpe sur gel, les spots sont décolorés par 2 additions successives de 100 $\mu$ L d'un mélange acétonitrile / bicarbonate d'ammonium 25mM 1:1 (v/v) séparés par une agitation vigoureuse à température ambiante pendant 10min. Après élimination des surnageants, les spots sont séchés pendant 20 minutes à l'évaporateur rotatif à 45°C. 10 $\mu$ L de solution de trypsine (solution stock à 50ng/ $\mu$ L diluée au 1/5 dans du bicarbonate d'ammonium 25mM) sont ajoutés à chaque spot déshydraté. L'incubation dure 1 nuit à 37°C. 0,5 $\mu$ L de surnageant de digestion est alors déposé sur plaque MALDI pour permettre l'identification en mode MS. Pour cela, la matrice utilisée (0,5 $\mu$ L d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique saturée à 5mg/mL dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile/TFA 50/50/0,1 (v/v/v), Sigma-Aldrich) est co-cristallisée avec l'échantillon directement sur la plaque MALDI. La calibration externe est réalisée à l'aide d'un mélange de peptides de masses connues déposés sur la plaque (Calibration Mixture 1 + 2, Applied Biosystems®).

Afin de connaître précisément la masse des différentes LTP purifiées, 0,75 $\mu$ L de solution de LTP (à 0,5mg/mL dans du tampon Tris 20mM, pH 7.5) est co-cristallisée sur la plaque MALDI avec 0,75 $\mu$ L de matrice acide sinapinique (0,6mM d'acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamique dilué dans le mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile/TFA 50/50/0,1 (v/v/v)). La calibration externe est réalisée à l'aide d'un mélange de 3 protéines aux masses moyennes connues (Calibration Mixture 3, Applied Biosystems®): l'insuline bovine (5734,59 Da), la thioredoxine d'*E. coli* (11674,4 Da) et l'apomyoglobine de cheval (16952,5 Da).

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager-DE<sup>TM</sup> STR, Perspective Biosystems®) est utilisé en mode réflectron positif pour l'identification des digestats tryptiques et en mode linéaire pour déterminer précisément les masses des différentes LTP. Pour cela, la tension d'accélération appliquée après l'impact laser sur la plaque MALDI est respectivement de 20 et 25kV. Les plages de masse  $m/z$  visualisées vont de 800 à 3000 pour le mode réflectron positif et de 3000 à 25000 pour le mode linéaire. Afin d'identifier précisément les différents peptides tryptiques, l'interrogation des bases de données protéiques (base non redondante du NCBI, Swissprot) est effectuée à l'aide des logiciels Mascot® et Protein Prospector®.



**Figure 10: Origine de l'effet observé en spectroscopie de dichroïsme circulaire**

La lumière polarisée circulaire gauche (L) et droite (R) composent la lumière polarisée linéaire. Ces deux composantes ne se superposent pas.

(I): les deux composantes ont la même amplitude

(II): les deux composantes n'ont pas la même amplitude et la résultante (ligne pointillée) est un ellipse polarisée. C'est le cas lorsque la lumière traverse un échantillon pourvu d'une activité optique, comme les solutions de protéines.

Adapté de Kelly *et al.*, 2005

### 3.2 – Spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC)

Avant d'envisager l'étude immunologique des allergènes naturels et recombinants, il est nécessaire de connaître leur conformation structurale en solution. En effet, il convient de s'assurer de leur repliement correct pour pouvoir les confronter à des IgE de patients dans différents tests immunologiques. Une des méthodes de choix qui a été utilisée est le dichroïsme circulaire.

#### 3.2.1 – Principe

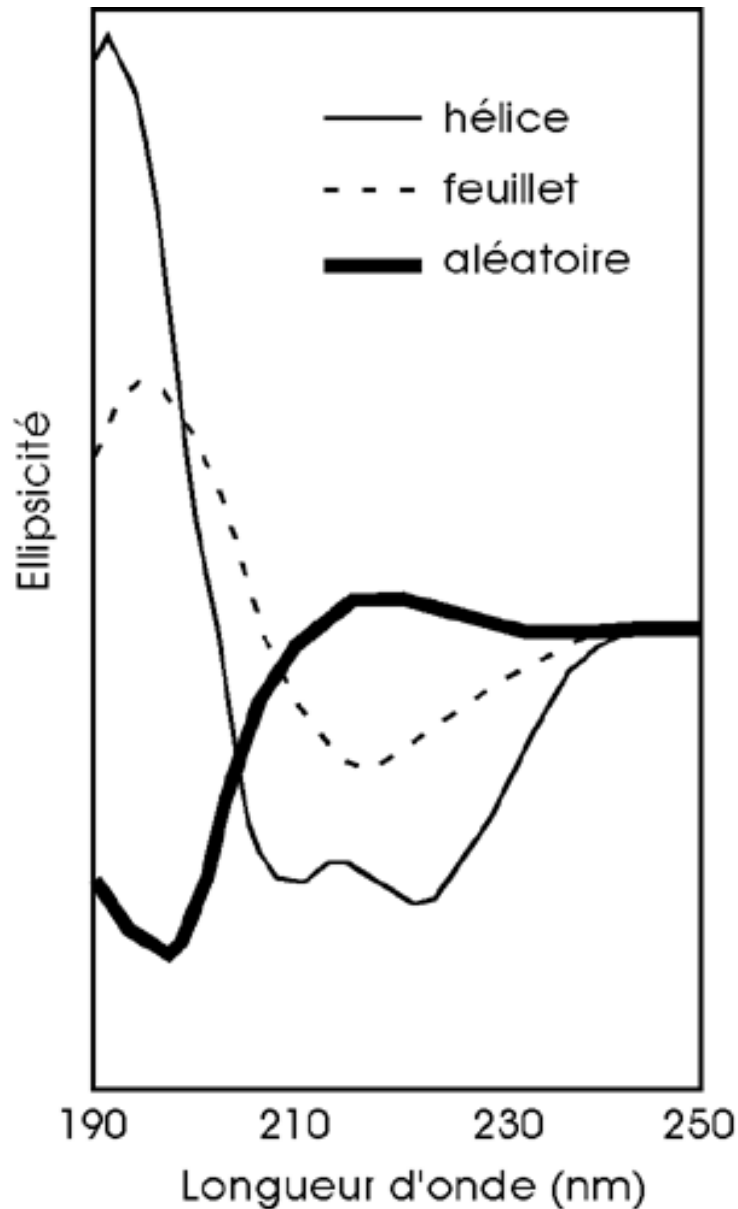
La lumière polarisée linéaire peut être décomposée en deux composantes circulaires gauche ( $\epsilon_L$ ) et droite ( $\epsilon_R$ ) de même amplitude et de même intensité. Ces deux composantes ne se superposent pas, elles sont donc chirales. Lorsque la lumière polarisée linéaire passe au travers d'un échantillon pourvu d'une activité optique, les deux composantes  $\epsilon_L$  et  $\epsilon_R$  ne sont pas absorbées de la même manière par l'échantillon. Ainsi, la résultante de ces deux composantes ne s'inscrit plus dans le plan défini par la lumière polarisée linéaire mais dans une ellipse autour de ce plan (fig. 10). Les protéines sont optiquement actives car elles sont constituées d'acides aminés chiraux. La mesure de la différence d'absorption des deux composantes gauche et droite de la lumière polarisée linéaire permettra donc d'obtenir des informations sur la conformation des différents chromophores (Woody, 1995), (Kelly et al., 2005).

Dans les protéines, les chromophores d'intérêt pour la technique de dichroïsme circulaire sont de trois types: les ponts disulphure (absorption autour de 260nm), les liaisons peptidiques et les chaînes latérales des acides aminés aromatiques.

Les liaisons peptidiques absorbent la lumière jusqu'à 240nm. Ceci est notamment dû à une transition  $n \rightarrow \pi^*$  autour de 220nm et une transition plus intense  $\pi \rightarrow \pi^*$  vers 190nm. Malheureusement, les appareils de dichroïsme circulaire disponibles dans de nombreux laboratoires ne permettent pas d'observer avec une précision suffisante cette dernière transition vers 190nm. De nouvelles méthodes, disponibles notamment avec les technologies développées autour des synchrotrons (Wallace and Janes, 2001), améliorent considérablement la résolution et permettent une meilleure couverture des longueurs d'onde observées (ramenant ainsi la limite basse d'observation du signal de 190 à 160nm).

L'absorption des chaînes latérales des acides aminés aromatiques s'observe entre 260nm et 320nm. Chaque acide aminé aromatique semble avoir une longueur d'onde d'absorption caractéristique. Le tryptophane (Trp) absorbe de 290nm à 305nm (avec un





**Figure 11: Spectres obtenus en dichroïsme circulaire associés à des éléments de structure secondaire retrouvés dans les protéines**

Le spectre d'un polypeptide replié essentiellement en hélice  $\alpha$  présente trois bandes caractéristiques (positive à 190nm, négative à 208nm et à 222nm).

Le spectre d'un polypeptide replié essentiellement en feuillet  $\beta$  présente deux bandes caractéristiques (positive à 195nm, négative à 218nm).

Le spectre d'un polypeptide non structuré («random coil» ou aléatoire) présente deux bandes caractéristiques (négative à 200nm et positive à 215nm).

Adapté de Kelly *et al.*, 2005

maximum autour de 293nm), la tyrosine (Tyr) de 275nm à 282nm, la phénylalanine (Phe) de 255nm à 270nm. Ces différences d'absorption des noyaux aromatiques est due à des transitions vibrationnelles dans lesquelles différents niveaux vibrationnels des états excités sont mis en jeu. L'impact de ces transitions sur le signal DC dans la région comprise entre 260nm à 320nm dépend du nombre et du type de chaque acide aminé aromatique présent, de leur conformation spatiale, de leur mobilité et de la nature de leur environnement proche (implication dans des liaisons hydrogène, proximité de groupements polaires). Ainsi, selon le repliement en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$  des protéines, la géométrie de l'empilement des différents chromophores ne sera pas le même, modifiant ainsi considérablement le signal DC observé (fig. 11).

Le spectre d'un polypeptide replié essentiellement en hélice  $\alpha$  présente trois bandes caractéristiques: une bande positive de forte intensité à 190nm et deux bandes négatives à 208nm et 222nm. Le spectre obtenu avec un polypeptide replié en feuillet  $\beta$  possède une bande positive à 195nm et une bande négative à 218nm. A concentration en protéine égale, l'intensité de ces bandes est souvent moindre par rapport à celles des hélices  $\alpha$ . La nature des chaînes latérales et le type de feuillets  $\beta$  (parallèles, antiparallèles...) peuvent modifier légèrement l'amplitude et la position des bandes observées. Le spectre obtenu avec un polypeptide non structuré (« random coil » ou aléatoire) montre une bande négative caractéristique aux alentours de 200nm et un épaulement positif vers 215nm. En se référant à des spectres de protéines de structures connues, il est possible d'estimer les pourcentages respectifs des structures secondaires présentes dans les protéines à partir de leurs spectres de DC.

### **3.2.2 – Utilisation de la spectroscopie de dichroïsme circulaire pour l'étude des LTP**

Les LTP, solubilisées dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7.5), ont été analysées sur un spectrophotomètre de dichroïsme circulaire Jobin & Yvon CD6 (Division instrumentations S.A.). Les concentrations des LTP ont été calculées pour que la densité optique à 280nm de la solution soit inférieure à 0,8 afin d'éviter que l'intensité du signal ne sature le détecteur. La cuve en quartz utilisée possède un trajet optique de 0,1cm et les spectres ont été mesurés entre 190nm et 300nm. La contribution du tampon a été soustraite de tous les spectres.

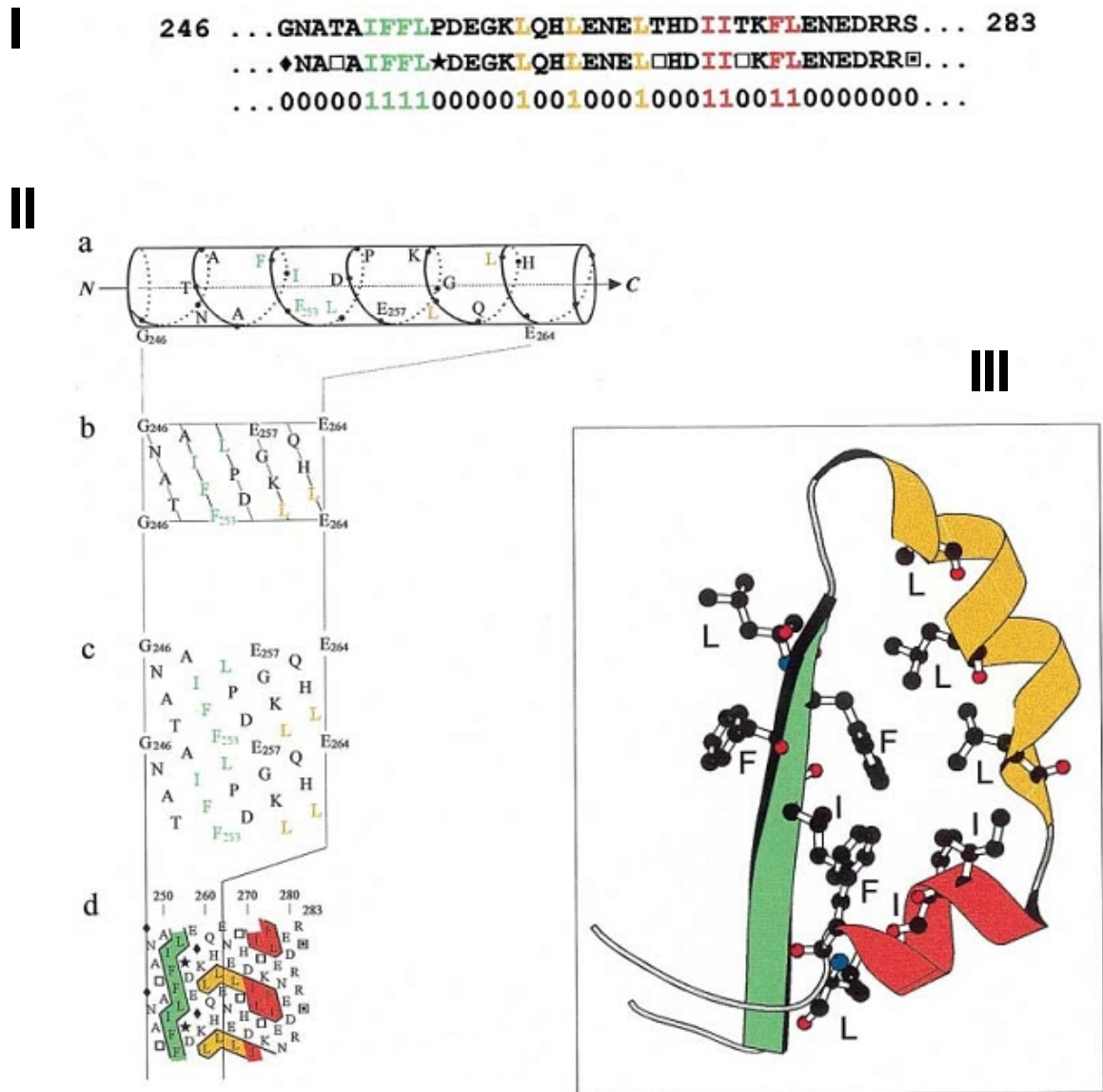


Figure 12: Principe d'obtention des profils HCA

I: La séquence primaire des protéines est représentée en utilisant un code couleur (pour les acides aminés hydrophobes) et symbolique (Glycine, Proline, Throénine, Sérine).

II: La séquence est positionnée sur un cylindre mimant une hélice  $\alpha$  (a) puis le cylindre est découpé selon une génératrice, étalé (b) et dupliqué (c). Les acides aminés hydrophobes sont ensuite regroupés en clusters (d).

III: Représentation tridimensionnelle des éléments de structure secondaire prédits au vu de la représentation bi-dimensionnelle (II d)

Adapté de Callebaut *et al.*, 1997

### 3.3 – Modélisation moléculaire et prédiction des épitopes

#### 3.3.1 – Recherche et alignements de séquences

Les recherches de séquences des différentes protéines de transfert de lipides ont été effectuées avec le programme Blast (Altschul et al., 1990) sur des banques de séquences protéiques et nucléiques (NCBI, Genbank, Swiss-Prot, TrEMBL).

L'alignement de séquence des protéines de transfert de lipides a été réalisé à partir du programme Clustal-X (Thompson et al., 1997) utilisant les matrices de Risler (Risler et al., 1988) et la matrice BLOSUM 62 (Henikoff and Henikoff, 1996). Les matrices BLOSUM (BLOCKS Substitution Matrix), comme les matrices PAM (Dayhoff et al., 1983) souvent utilisées, sont liées à l'évolution. Les matrices BLOSUM sont déduites des segments locaux obtenus dans la base BLOCKS regroupés par famille jusqu'à un certain seuil. Elles sont basées sur des alignements locaux interdisant les gaps de régions hautement conservées, alors que les matrices PAM incluent des régions plus divergentes. La matrice de Risler est une matrice basée sur les homologues structurales des chaînes latérales des acides aminés.

#### 3.3.2 – Profils HCA (Analyse des Clusters Hydrophobes)

Les acides aminés hydrophobes gouvernent le repliement des protéines. Cette méthode (Gaboriaud et al., 1987), développée dans le laboratoire de Jean-Paul Mornon en 1987, est basée sur une représentation bi-dimensionnelle des séquences protéiques (fig. 12) (Callebaut et al., 1997). Elle vise à regrouper, au sein de « clusters », les acides aminés hydrophobes contigus. En fonction de la taille et principalement de la forme de ces clusters, il est possible de prédire l'emplacement des principaux éléments de structure secondaire: hélice  $\alpha$  (orientation horizontale des clusters ou clusters globulaires) et feuillet  $\beta$  (orientation verticale des clusters) (Lemesle-Varloot et al., 1990). Les coudes et les boucles correspondent à des zones où prédominent les acides aminés hydrophiles et flexibles. Lors de la comparaison de deux séquences protéiques, cette méthode permet de reconnaître et de délimiter les régions structurellement conservées (RSCs) correspondant essentiellement aux motifs de structure secondaire. Ces RSCs seront utilisées ultérieurement pour la modélisation moléculaire. Cette méthode permet également d'aligner des séquences de protéines possédant de très faibles pourcentages d'identité (en dessous de 25-30%). Pour ces séquences, les méthodes classiques d'alignement basées uniquement sur la maximalisation de scores

d'identité ou de similitude sont souvent peu efficaces. Dans une famille de protéines très divergentes, il est ainsi possible de mettre en évidence les repliements essentiels à la structure et à la fonction des protéines. Les profils ont été générés en utilisant un serveur dédié (<http://www.lmcp.jussieu.fr>) et le programme Drawhca développé par Luc Canard (Callebaut et al., 1997).

### 3.3.3 – Modélisation moléculaire par homologie

La modélisation moléculaire par homologie de séquences a été réalisée sur une station graphique Silicon O2 en utilisant les programmes InsightII, Homology et Discover (Accelrys, San Diego, USA).

A partir de l'alignement réalisé entre la séquence de la protéine à modéliser et la (ou les) séquences d'une protéine homologue de structure tridimensionnelle connue (LTP de maïs *Zea m 14* dans notre cas (Shin et al., 1995)), les RSCs (hélices  $\alpha$  dans notre cas) définies à partir des profils HCA sont repérées. Par la suite, les coordonnées cristallographiques de la protéine modèle sont assignées à la protéine à modéliser en respectant les homologies entre les RSCs. Ainsi, la structure tridimensionnelle de la protéine à modéliser est construite de proche en proche. Il n'a pas été nécessaire de créer des boucles pour les différentes modélisations effectuées au sein de la famille très conservée des LTP. En effet, toutes les régions des protéines à modéliser avaient une équivalence dans la protéine modèle.

A ce stade, la protéine modélisée possède, aux remplacements de résidus près, les mêmes coordonnées que celles des carbones  $\alpha$  de la protéine modèle. Cette protéine modélisée présente quelques imperfections (valeur non canonique des longueurs de certaines liaisons ou de certains angles dièdres, encombrements stériques de certains atomes non liés, sorties de plan, etc...). Il est nécessaire de procéder, avant une minimisation d'énergie globale, à une minimisation d'énergie locale pour corriger sélectivement ces imperfections afin d'obtenir une structure géométriquement correcte et thermodynamiquement stable. Les encombrements stériques sont corrigés grâce à une étape de recherche des meilleurs rotamères pour chaque acide aminé dont les distances entre atomes non liés est inférieure à 0,9Å. Pour les recherches de rotamères, l'algorithme (Mas et al., 1992) implémenté dans le module Homology utilise une librairie spécifique (Ponder and Richards, 1987).

Les minimisations d'énergie utilisent le champ de force CVFF du module Discover et les algorithmes classiques de mécanique moléculaire (steepest descent et gradient conjugué). La méthode « steepest descent » ou « méthode de la plus grande pente », calcule l'énergie initiale  $E_0$  à l'aide du champ de force. Après une légère modification de la géométrie de la

molécule, un deuxième calcul d'énergie est effectué. En calculant à chaque fois la dérivée de la fonction énergie, cette méthode va déterminer et suivre la direction de la plus grande pente au cours de laquelle l'énergie décroît le plus rapidement. Cette méthode s'avère être rapide au cours des premiers cycles mais converge très lentement en fin de cycle. La méthode du « gradient conjugué » est une amélioration de la méthode « steepest descent ». Un calcul supplémentaire permet, à chaque cycle, d'ajuster le pas et ainsi d'obtenir la meilleure diminution de la valeur d'énergie. D'autres méthodes existent, comme celle de « Newton Raphson ». Elle est basée sur le calcul de la dérivée seconde de la fonction énergie potentielle et demande des temps de calcul souvent prohibitifs. C'est la raison pour laquelle elle est très peu utilisée pour des modélisations par homologie au sein de familles protéiques très conservées.

La validité des modèles tridimensionnels ainsi obtenus est appréciée en construisant le diagramme de Ramachandran. Cet outil permet de représenter les résidus en fonction de la valeur des angles dièdres  $\Phi$  et  $\Psi$ . Des régions correspondant aux valeurs admises pour les angles  $\Phi$  et  $\Psi$  des résidus impliqués dans les différentes structures secondaires (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ ) sont définies et il est alors possible d'obtenir une évaluation fiable de la géométrie correcte du modèle tridimensionnel en fonction de l'absence de valeurs en dehors des régions permises. Les diagrammes ont été générés par un ensemble de logiciels, dont PROCHECK et What if (Vaguine et al., 1999) à partir du fichier PDB élaboré par InsightII.

Les modèles tridimensionnels de LTP de pomme, de prune et d'abricot ont été construits à partir des coordonnées cristallographiques de la LTP de maïs Zea m 14 (code PDB 1MZL) (Shin et al., 1995) et de celles de la LTP de pêche Pru p 3 (code PDB 2B5S) (Pasquato et al., 2006).

Les surfaces moléculaires et les potentiels de surface des LTP modélisées ont été calculés à l'aide du programme GRASP (Petrey and Honig, 2003) en utilisant les valeurs classiques des principaux paramètres: 1,4Å pour le rayon de la sphère d'eau, 2Å pour la couche de Stern afin d'exclure les ions de la surface moléculaire, 4 et 80 pour les constantes diélectriques interne et externe, une concentration saline correspondant à 0,145M de NaCl. Les régions électropositives (résidus de lysine et arginine) sont figurées en bleu et les régions électronégatives sont figurées en rouge. Les valeurs des potentiels électronégatifs et électropositifs sont fixées respectivement à -5 kT (1 kT = 0,6 kcal) et 5 kT. Les régions neutres sont figurées en blanc.

Acide aminé	Hydrophobie de Kyte et Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982)	Exposition au solvant de Lee (Lee and Richards, 1971)	Flexibilité de Karplus (Karplus, 1984)			Hydrophilie de Hoop et Woods (Hopp and Woods, 1981)
			0 voisin rigide	1 voisin rigide	2 voisins rigides	
A	1,8	0,49	1,041	0,946	0,892	-0,5
C	2,5	0,26	0,960	0,878	0,925	-1,0
D	-3,5	0,80	1,033	1,089	0,932	3,0
E	-3,5	0,84	1,094	1,036	0,933	3,0
F	2,8	0,42	0,930	0,912	0,914	-2,5
G	-0,4	0,48	1,142	1,042	0,923	0,0
H	-3,2	0,66	0,982	0,952	0,894	-0,5
I	4,5	0,34	1,002	0,892	0,872	-1,8
K	-3,9	0,97	1,093	1,082	1,057	3,0
L	3,8	0,40	0,967	0,961	0,921	-1,8
M	1,9	0,48	0,947	0,862	0,804	-1,3
N	-3,5	0,80	1,117	1,006	0,930	0,2
P	-1,6	0,75	1,055	1,085	0,932	0,0
Q	-3,5	0,84	1,165	1,028	0,885	0,2
R	-4,5	0,95	1,038	1,028	0,901	3,0
S	-0,8	0,65	1,169	1,048	0,923	0,3
T	-0,7	0,70	1,073	1,051	0,934	-0,4
V	4,2	0,36	0,982	0,927	0,913	-1,5
W	-0,9	0,51	0,925	0,917	0,803	-3,4
Y	-1,3	0,76	0,961	0,930	0,837	-2,3

Le code utilisé pour les acides aminés est le code international à un caractère: A=Alanine, C=Cystéine, D=Aspartate, E=Glutamate, F=Phénylalanine, G=Clycine, H=Histidine, I=Isoleucine, K=Lysine, L=Leucine, M=Méthionine, N=Asparagine, P=Proline, Q=Glutamine, R=Arginine, S=Sérine, T=Thréonine, V=Valine, W=Tryptophane, Y=Tyrosine

**Tableau 6: Echelles des profils physico-chimiques utilisés pour la prédiction des épitopes**

### 3.3.4 – Prédiction des épitopes de surface

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 échelles de valeurs pour chacun de ces trois paramètres. En examinant la séquence primaire en acides aminés et en affectant à chaque résidu une certaine valeur, chaque résultat obtenu pour chaque échelle utilisée sera compilé et des régions regroupant les plus forts scores seront retenues.

La première échelle utilisée est l'échelle d'hydrophilie de Kyte et Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982). La notion d'hydrophobie dans les protéines a pour origine la succession des acides aminés ayant une chaîne latérale hydrophobe dans la séquence. Ceci crée localement une région hydrophobe instable dont la protéine (placée dans l'eau) va s'accommoder thermodynamiquement en se repliant selon les degrés de liberté à sa disposition de façon à enfouir au coeur de la molécule les résidus hydrophobes. Il s'agit d'une des forces qui gouvernent le repliement des protéines. Il faut noter que tous les acides aminés sont solubles dans l'eau (à des degrés variables) alors que certains peptides trop courts pour se replier comme une protéine deviendront insolubles dans l'eau. Beaucoup d'échelles d'hydrophobie existent, mais celle présentée ici est une des plus utilisées. Les auteurs ont élaboré une échelle d'hydrophobie (tableau 6) qui associe un score à chaque acide aminé en fonction de son caractère hydrophobe. Ainsi, les résidus hydrophiles ont un score  $<0$  (Arg -4,5; Asn -3,5; Asp -3,5; Gln -3,5; Glu -3,5; Gly -0,4; His -3,2; Lys -3,9; Pro -1,6; Ser -0,8; Thr -0,7; Trp -0,9; Tyr -1,3). Les résidus hydrophobes ont un score  $>0$  (Ala +1,8; Cys +2,5; Ile +4,5; Leu +3,8; Met +1,9; Phe +2,8; Val +4,2). Il est alors possible de tracer le profil d'hydrophobie d'une protéine en associant chaque résidu de la séquence au score correspondant dans l'échelle. Le profil est ensuite lissé en calculant le score moyen sur une fenêtre de résidus de taille variable, glissant le long de la séquence. Les positions ayant un score faible correspondent à des positions très hydrophiles. Elles vont correspondre à des régions potentiellement intéressantes à prendre en compte pour la prédiction des épitopes. Cette méthode, en considérant les scores forts (régions hydrophobes), a été souvent utilisée pour prédire l'emplacement des régions transmembranaires (plusieurs positions très hydrophobes consécutives).

La deuxième échelle utilisée est l'échelle d'exposition au solvant (Lee and Richards, 1971). Les profils de surface accessible au solvant ont été initialement développés par des immunologistes afin de pouvoir prédire les épitopes des protéines reconnus par les anticorps.



Même si l'hypothèse de départ n'était pas tout à fait fondée (certains auteurs utilisaient cette technique, pensant que les épitopes étaient séquentiels et non conformationnels), la prédiction des régions accessibles au solvant doit pouvoir permettre de rationaliser l'approche épitopique. A partir des fichiers de coordonnées atomiques des protéines, il est possible de calculer la contribution de tous les atomes de chaque acide aminé à la surface de contact d'une sphère d'un rayon donné (correspondant à une molécule d'eau). Dès lors, pour chaque résidu, la fraction accessible peut être calculée (surface de contact  $> 20\text{\AA}^2$ ). Elle varie de 0,26 (Cys) à 0,97 (Lys) et sont résumées dans le tableau 6. Les algorithmes utilisés, multiplicatifs avec une fenêtre de calcul égale à 6 résidus, permettent de tracer des profils d'accessibilité.

La troisième échelle utilisée est l'échelle de flexibilité (Karplus, 1984). Ce profil a été largement utilisé avec les mêmes objectifs que l'accessibilité au solvant. Il se base sur le fait qu'une région flexible est plus antigénique qu'une région rigide dans la mesure où une certaine adaptabilité est nécessaire pour une bonne reconnaissance antigène-anticorps. Afin de prédire les régions flexibles, les auteurs ont utilisé les mesures d'agitation thermique (facteur B de température) issues des diagrammes de diffraction aux rayons X. Trois types de résidus ont été ainsi distingués: ceux qui sont en moyenne flexibles (F), ceux qui sont rigides (R) et ceux qui sont intermédiaires (I). Trois échelles ont ainsi été construites, avec pour but de prendre en compte différemment l'environnement séquentiel (tableau 6). Ainsi, pour chaque acide aminé  $i$ , le choix de l'échelle se fait en examinant ses deux voisins  $i-1$  et  $i+1$ . Des profils de flexibilité peuvent ainsi être construits.

Enfin, une méthode mise au point par Hopp et Woods (Hopp and Woods, 1981) permet de prédire, grâce à une combinaison des différentes échelles vues précédemment, les déterminants antigéniques des protéines. Cette méthode repère les zones riches en acides aminés hydrophiles, chargés et éloignés des régions hydrophobes. Ainsi, en combinant des échelles de Chou et Fasman (Chou and Fasman, 1978), d'accessibilité au solvant de Levitt (Levitt, 1976) et d'hydrophobicité de Nozaki et Tanford (Nozaki and Tanford, 1971), des moyennes portant sur une fenêtre de 6 résidus successifs (qui correspondait à la taille moyenne admise pour un épitope continu) sont réalisées sur toute la séquence et les régions ayant un score significativement supérieur à la moyenne sont repérées.

La prédiction des régions épitopiques que nous avons réalisée consiste à ne retenir que les régions consensus qui présentent simultanément les valeurs les plus élevées d'hydrophilie, d'accessibilité au solvant et de flexibilité. En outre, ces régions ne sont prises en compte que si elles renferment des résidus chargés électronégatifs (Asp, Glu) et/ou électropositifs (Arg, Lys). L'expérience montre que la plupart des régions épitopiques sont

chargées à la surface des allergènes.

## **4 – Caractérisation immunologique des protéines allergéniques**

### **4.1 – Production d'anticorps polyclonaux chez le lapin**

#### **4.1.1 - Anticorps obtenus à partir des protéines**

Les anticorps polyclonaux reconnaissant les LTP de pêche et de pomme ont été obtenus après injections répétées chez des lapins. 100µg de protéine dissoute dans 400µL de sérum physiologique (NaCl 9<sup>0</sup>/<sub>00</sub>) ont été émulsionnées avec 400µL d'adjuvant de Freund complet (Calbiochem). Les injections ont été répétées tous les 10 jours pendant 4 mois. Toutes les 3 semaines un prélèvement de sang a été effectué, permettant la récupération du sérum afin de vérifier la production d'IgG contre les LTP par dosage ELISA et double diffusion en gel d'agarose (méthode d'Ouchterlony).

#### **4.1.2 – Anticorps obtenus à partir des peptides épitopiques**

Les anticorps polyclonaux reconnaissant les peptides épitopiques prédits pour Pru p 3 et Mal d 3 ont été obtenus après couplage des peptides synthétiques à la thyroglobuline et injections à des lapins en suivant le même protocole d'immunisation. Une série de 12 injections intradermiques effectuées sur une période de 6 mois, contenant chacune 250µg de peptide émulsionné avec de l'adjuvant de Freund complet, ont été nécessaires pour obtenir un taux d'IgG suffisamment élevé pour effectuer des dosages immunochimiques. Les sérums récupérés ont été filtrés sur un filtre de 0,2µm puis stockés à -80°C.

## **4.2 – Double diffusion en gel d'agarose (méthode Ouchterlony)**

### **4.2.1 – Principe**

Afin de visualiser, au fur et à mesure des injections, la production d'IgG de lapin reconnaissant les LTP purifiées et les épitopes synthétiques, la méthode de double-diffusion en gel d'agarose (méthode dite « d'Ouchterlony ») a été couramment utilisée (Ouchterlony,



**Figure 13: Double-diffusion en gel d'agarose (méthode Ouchterlony)**

Lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison antigène-anticorps conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone de rencontre. Le précipité se forme dans la zone où les concentrations des deux solutions sont optimales pour que la quantité d'anticorps sature les sites antigéniques, c'est à dire la zone d'équivalence. Les précipités se présentent sous la forme d'un arc blanchâtre visible à l'œil nu.

Puits central: sérum de lapin immunisé avec de l'albumine sérique de boeuf (BSA)

puits 1: sérum de cheval

puits 2: sérum de chèvre

puits 3: sérum de porc

puits 4: sérum de boeuf

puits 5: sérum de lapin

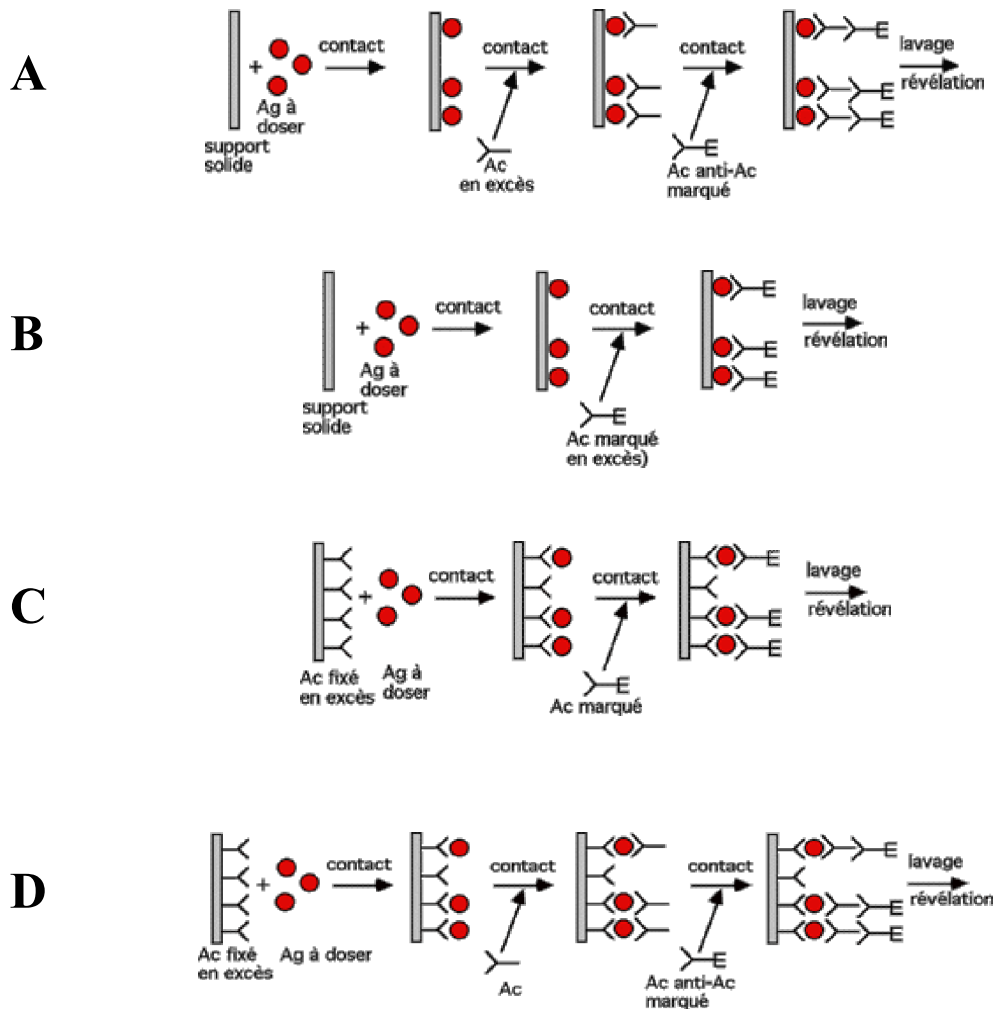
puits 6: albumine sérique de boeuf (BSA)

1958). Cette méthode d'immunoprécipitation est fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide (en général un gel d'agarose) à partir de puits placés en vis-à-vis. Lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison antigène-anticorps conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone de rencontre si l'anticorps reconnaît l'antigène. Le précipité se forme dans la zone où les concentrations des deux solutions sont optimales pour que la quantité d'anticorps sature les sites antigéniques, c'est à dire la zone d'équivalence. Les précipités se présentent sous la forme d'un arc blanchâtre visible à l'œil nu. La méthode d'Ouchterlony peut être utilisée notamment pour détecter la présence d'anticorps spécifiques dans un sérum, pour mettre en évidence un antigène donné dans un liquide biologique, pour déterminer la zone d'équivalence ou pour évaluer le degré d'identité (nul, total ou partiel) entre différents antigènes (figure 13). En cas de réaction positive, d'autres techniques d'évaluation du taux d'IgE ont été mises en oeuvre: immuno-empreintes (Western blots) et dosage ELISA.

#### 4.2.2 – Réalisation

Des lames porte-objet sont nettoyées soigneusement avec un solution éthanol / acide acétique et séchées. Une solution à 1% agarose (m/v) dans un tampon Tris 20mM, 150mM NaCl (pH 7.5) est chauffée jusqu'à dissolution de l'agarose puis filtrée sur coton hydrophile. L'agarose est alors distribué sur les lames à raison de 4mL par lame en veillant bien à la parfaite horizontalité du plan de travail. Après 10min de refroidissement à température ambiante, des puits sont percés avec un emporte-pièce. Les différentes solutions d'anticorps et d'antigènes sont distribuées dans les puits par capillarité en utilisant des pipettes pasteur à bout effilé.

Les lames sont incubées à température ambiante dans une enceinte humidifiée par du papier filtre imprégné d'eau additionnée de nitrate de sodium durant 24h. Les lames sont ensuite lavées abondamment pendant 3 jours avec du sérum physiologique (NaCl 9‰), en changeant le bain 2 fois par jour. Au bout des 3 jours, les bains sont remplacés par de l'eau UHQ changée plusieurs fois durant 72h. Les gels sont alors séchés à 37°C pendant 12 à 24 h à l'aide d'un papier 3M appliqué délicatement à la surface des gels. Les gels d'agarose sont ensuite colorés 30 min dans une solution de noir amido (0,5% amido black, 7% TCA) et décolorés par 3 lavages avec une solution de 0,3% TCA. Les gels sont ensuite scannés et peuvent être conservés, sur lame, dans une boîte à température ambiante et à l'abri de la lumière pour éviter leur décoloration.



**Figure 14: Principe de la technique ELISA**

La technique ELISA permet de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Celle-ci peut être directe (A, B), en sandwich (C) ou en double sandwich (D).

### 4.3 – Immuno-réactions (western-blot et dosages ELISA)

#### 4.3.1 – Principes

La méthode fut mise au point dans le laboratoire de George Stark à Stanford. Le nom du Western blot, donné à la technique par W. Neal Burnette (Burnette, 1981), est un jeu de mot à partir de la technique du Southern blot, technique de détection d'ADN nommée d'après son inventeur, Edwin Southern et non d'après le point cardinal. La détection d'ARN est appelée Northern blot. Le nom de ces techniques provient de l'étape de transfert sur membrane, comparée à une empreinte sur buvard (blot en anglais). La technique Western blot utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (typiquement en nitrocellulose), où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. La détection est effectuée à l'aide d'un anticorps (antiglobuline) couplée à une enzyme (péroxydase ou phosphatase alcaline) en présence d'un substrat qui génère une réaction colorée directement sur la membrane. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille et sa concentration.

La technique ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) correspond à un dosage immuno-enzymatique sur support solide. Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (enzyme immunoassays), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie (par opposition aux RIA (Radio ImmunoAssays) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément et dont le dosage mesure un nombre de désintégrations par seconde). L'ELISA est une technique biochimique, principalement utilisée en immunologie, mais pas uniquement, afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un (test de Coons direct) ou deux anticorps (test de Coons indirect) et peut être soit « directe », soit « en sandwich », soit en « double sandwich », soit « en compétition » (fig. 14 A à D). Le premier anticorps utilisé est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre reconnaît les fragments constants du premier anticorps et est couplé à une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase). La fixation de l'anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, déclenche une réaction colorée après addition d'un substrat chromogène ou fluorogène dont l'intensité est mesurée par colorimétrie ou fluorimétrie. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil

efficace très utilisé. Par exemple, il permet de déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV où on dose la concentration en anticorps anti-VIH dans le sérum sanguin), mais il permet aussi de détecter la présence d'un antigène (comme dans l'industrie alimentaire où il est utilisé afin de détecter des allergènes alimentaires, comme le lait, les cacahuètes, les noix et les œufs). C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux.

### 4.3.2 - Western-blots

Les différents échantillons à tester sont séparés sur un gel SDS-PAGE mono ou bidimensionnel. Les protéines sont électrotransférées sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF) en mode semi-sec dans un tampon de transfert constitué de Tris 48mM, glycine 39mM, méthanol 20% (v/v) à 20 Volts pendant 45min. La membrane est ensuite colorée dans une solution contenant 0,2 % de Rouge Ponceau (m/v) et 0,3 % TCA (v/v) afin de vérifier la présence de protéines sur la membrane. Après décoloration dans une solution contenant 0,3 % TCA (v/v), la membrane est saturée une nuit dans du tampon PBS 1x, 0,1% Tween-20 (v/v) contenant 5% (m/v) lait écrémé à 4°C, sous légère agitation.

L'anticorps primaire (sérum de patient dilué au dixième dans le tampon de saturation) est déposé sur la membrane pendant 2h en chambre humide à température ambiante. La membrane est ensuite lavée dans le tampon de saturation puis incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (dilué au 5000ème dans la solution de saturation). Après trois lavages dans une solution de PBS contenant 0.1% Tween-20 (v/v), les membranes sont incubées avec les substrats contenus dans le kit ECL Plus (Amersham) et les films révélés après 3 minutes d'exposition dans une cassette.

### 4.3.3 - Dosages ELISA

Les différentes dilutions de protéines ou d'extraits à tester sont fixés sur une plaque ELISA à fond plat (50µl par puits) pendant une nuit à 4°C. Les puits sont lavés trois fois avec du PBS 1x puis saturés avec une solution PBS/Tween-20/BSA (1x/0.1%/1%) (100µl par puits) pendant une heure à température ambiante. Les puits sont lavés puis incubés avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation (50µl par puits) durant 2h à température ambiante. L'anticorps primaire a été mis en contact, pour les expériences d'inhibition, avec la ou les protéines inhibitrices pendant les 30 dernières minutes de la phase de saturation. Après trois lavages avec la solution de saturation, l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/2000 dans la solution de saturation (50µl par puits) est

ajouté pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages, 100µL d'une solution de para-nitrophényl phosphate sont ajoutés. Après 45 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la réaction est stoppée par l'ajout de 50µL de NaOH 3N et la densité optique lue à 405nm avec un lecteur de plaques Titertek Multiscan II.

#### **4.4 – Caractérisation des épitopes de surface (méthode Elispot)**

Les expériences ont été réalisées sur des peptides synthétiques immobilisés sur membrane préparés par le Dr. Claude Granier au laboratoire CNRS FRE 3009 Bio-Rad de Montpellier.

##### **4.4.1 – Principe**

La méthode Spot (Frank, 2002), mise au point au début des années 1990, est couramment utilisée pour cartographier les sites d'interaction entre une protéine et son ligand. Ainsi, les interactions entre endonucléases et oligonucléotides (Reuter et al., 1999), peptides et métaux, cytokines et récepteurs (Reineke et al., 1998) ont pu par exemple être mises en évidence. Mais la plus célèbre application de cette technique correspond à la cartographie des épitopes réagissant avec des antigènes (« antigenic epitope mapping ») le long des séquences protéiques. Des épitopes IgE-réactifs ont ainsi été déterminés pour plusieurs allergènes. Des membranes de cellulose « spottées » avec des peptides synthétisés chimiquement et fixés de façon covalente permettent, après contact avec des anticorps, une identification rapide des sites responsables de l'interaction (Lajoix et al., 2004). Les peptides correspondant à la séquence entière de la protéine à cartographier sont synthétisés sous la forme de décapeptides chevauchants (les tailles peuvent varier de 10 à 15 mer, avec un recouvrement tous les 3 à 4 acides aminés). Après incubation des membranes spottées avec des anticorps à tester, les spots réactifs sont visualisés comme dans une expérience de Western-blot à l'aide d'un deuxième anticorps couplé à une enzyme donnant une réaction colorée en présence du substrat chromogène correspondant. Il est également possible de régénérer les membranes, permettant ainsi de tester différents types d'anticorps et de mieux caractériser les zones épitopiques (anticorps de patients allergiques, anticorps polyclonaux anti-protéine entière, anticorps anti-peptides, ...).

##### **4.4.2 – Expériences réalisées**

Des peptides de 15-mer, chevauchant par 3 résidus et correspondant à la séquence



entière des LTP de pomme (Mal d 3), de pêche (Pru p 3), de prune (Pru d 3) et d'abricot (Pru ar 3) ont été immobilisés sur membrane de cellulose en utilisant la technique Spot (Frank, 2002). Le protocole de synthèse Fmoc (Laune et al., 2002) utilise un synthétiseur « Multipép automatic Spot » (Intavis). Les peptides sont assemblés sur une membrane de cellulose portant des groupements amino polyéthylène glycol. Le résidu positionné en C-terminal de chaque peptide a été couplé à la membrane activée. Après déprotection, les acides aminés ont été séquentiellement ajoutés. A la fin de la synthèse, les groupes protégeant les chaînes latérales des acides aminés ont été retirés par un traitement à l'acide trifluoroacétique et la liaison à la membrane maintenue.

La membrane, saturée pendant 1 nuit dans 20mL de tampon Tris salin contenant 2mL de tampon de saturation (Roche) et 1g de saccharose (pH 7.0), a été lavée avec du tampon Tris salin contenant 0,1% (v/v) de Tween-20. Un pool de sérums de patients allergiques dilué au 1/10 est ajouté en présence d'un cocktail d'anti-protéases (Roche) et on laisse incubé pendant 2h dans une chambre humide à température ambiante. Après trois nouveaux lavages, la membrane est incubée 1h à température ambiante sous agitation avec un anticorps secondaire (monoclonal de souris anti-IgE humaines couplé à la phosphatase alcaline, dilué 1/4000 dans la solution de lavage). Après deux nouveaux lavages puis deux lavages avec une solution contenant 10mM d'acide citrique, 137mM NaCl et 3mM KCl (tampon CBS), les spots réactifs sont révélés après coloration pendant 30min avec une solution de **Bromo-Chloryl-Indolo-Phosphate (BCIP)** dilué dans le tampon CBS additionné de 5mM MgCl<sub>2</sub> et 0,7mM de bleu de bromure de thiazolyl tétrazolium. Après 3 lavages à l'eau UHQ, la membrane est scannée.

Le protocole de décoloration/régénération des membranes permet d'effectuer plusieurs tests avec des anticorps différents. Après un à trois lavages de 10 minutes dans une solution de diméthylformamide, trois lavages à l'eau UHQ et trois incubations dans une solution d'urée 8M contenant 1% (m/v) SDS et 1% (m/v) β-mercaptoéthanol, la membrane est stockée après une dernière incubation dans un mélange éthanol/eau/acide acétique (50:40:10) (v/v/v). Pour une conservation prolongée à -20°C, une dernière étape de lavage dans du méthanol pur est effectuée.

## 4.5 – Dégranulation de lignées de basophiles

### 4.5.1 – Principe

Depuis le début des années 1990, des outils cellulaires permettent de tester le potentiel allergénique des protéines. En effet, grâce à des lignées cellulaires telles que les RBL-2H3 transfectées avec le récepteur aux IgE humaines (FcεRI), il est possible de quantifier l'interaction entre des allergènes et des IgE de patients sensibilisés. A cause des difficultés à obtenir et à entretenir des mastocytes et basophiles humains de patients allergiques, une équipe française (Taudou et al., 1993) a obtenu, après transfection stable, une lignée cellulaire de basophiles de rats exprimant en surface la chaîne α du récepteur FcεRI humain (récepteur de haute affinité pour les IgE). Dénommée RBL-2H3 pour « **R**at **B**asophil **L**eukemia », cette lignée est couramment utilisée pour des tests d'allergénicité. Après une étape de culture en présence puis en absence d'antibiotique, les cellules peuvent être sensibilisées avec des IgE de patients allergiques. Après cette étape qui dure en général 24 à 48h, les lignées sont incubées en présence des allergènes à tester. Suite à l'interaction des protéines allergéniques avec les IgE fixées sur les basophiles, la dégranulation des cellules libère une grande quantité de médiateurs. Parmi ceux-ci, l'activité d'une enzyme (la β-hexosaminidase) peut être facilement mesurée et quantifiée. Il est donc possible, en combinant une culture de lignées cellulaires et un simple test biochimique, de vérifier le caractère allergénique d'une protéine donnée. D'autres équipes ont également obtenu de tels outils, en transfectant par exemple l'ensemble des différentes chaînes qui composent le récepteur FcεRI (Vogel et al., 2005).

### 4.5.2 – Expériences réalisées

L'expérimentation sur cellules a été réalisée à l'Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil (I2MR) de l'Unité 858 de l'INSERM, en collaboration avec le Pr. Hervé Benoist (équipe du Pr. Thierry Levade).

#### 4.5.2.1 – Culture cellulaire

La lignée RBL-2H3 (fournie par le Dr. Mécheri de l'Institut Pasteur de Paris), transfectée avec la sous-unité α du récepteur humain FcεRI (RBL-2H3 E5.D12.8) est maintenue en adhérence à 37°C dans un milieu DMEM-Glutamax (Gibco BRL)

contenant 10% de sérum de veau foetal, 100U/mL de pénicilline, 100U/mL de streptomycine, 1mg/mL de G-418 (Gibco) et 20mM Hepes (pH 7.3). Le milieu est changé 2 fois par semaine. Les cellules adhérentes sont lavées à deux reprises avec du milieu sans sérum et trypsinisées (trypsine-EDTA – Gibco) pendant 5 minutes à 37°C dans un incubateur humidifié (95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>). Les cellules remises en suspension sont alors collectées, lavées, comptées en cellule de Malassez puis remises en culture.

#### 4.5.2.2 – Tests de dégranulation

Après 72 heures de culture sans G-418, les cellules sont récupérées, comptées et centrifugées. Le sérum à tester, dilué au 1/200, est alors ajouté au milieu de culture ne contenant pas de G-418 et les cellules sont réparties dans des plaques 96 puits (50 000 cellules par puits). Après 48 heures d'incubation à 37°C dans un incubateur humidifié (95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>), le surnageant de culture est éliminé. Les cellules adhérentes sensibilisées sont alors lavées une fois avec du milieu sans G-418 puis avec du tampon Tyrode (100µL à chaque fois). Après élimination, 100µL de mélange Tyrode/D<sub>2</sub>O 1:1 (Sigma) contenant la protéine à tester (0 à 1000 ng/mL) sont distribués dans chaque puits. Tous les tests sont effectués en triplicats. Les plaques sont incubées 45 minutes à 37°C et centrifugées 5 minutes à 150g. 50 µL de surnageant est récupéré pour une mesure immédiate de l'activité β-hexosaminidase. Pour mesurer le relarguage spontané de β-hexosaminidase, des puits sont incubés avec du tampon Tyrode/D<sub>2</sub>O sans sérum de patient. Pour mesurer l'activité maximale (100% d'activité), des échantillons incubés sans sérum de patient sont traités après centrifugation avec 3µL de 10% Triton X-100 pendant 3 minutes puis le milieu est homogénéisé à la pipette plusieurs fois.

#### 4.5.2.3 – Mesure de l'activité β-hexosaminidase

50µL de chaque échantillon (test, relarguage spontané, relarguage total) sont distribués dans une plaque 96 puits et incubés 90 minutes à 37°C en présence de 50µL de para-nitrophényl-*N*-acétyl β-D-glucosaminide (1,3mg/mL dans un tampon citrate 0,05M à pH 4.5). La réaction enzymatique est stoppée par addition de 150µL de tampon glycine 0,2 M (pH 10.7) et l'absorbance est alors mesurée à 410nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité  $\beta$ -hexosaminidase totale après correction dû au relargage spontané de cellules non stimulées.

## **5 – Localisation immuno-histochimique des LTP**

### **5.1 - Localisation en microscopie confocale**

Les différentes expériences réalisées en microscopie ont été effectuées au sein de la Plate-Forme d'Imagerie Cellulaire de l'IFR 40, sous la responsabilité du Dr. Alain Jauneau.

#### **5.1.1 – Principe de la microscopie confocale à balayage laser**

Le Microscope Confocal à Balayage Laser — MCBL (en anglais CLSM pour Confocal Laser Scanning Microscope) est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 600nm) appelées « sections optiques » (Schatten and Pawley, 1988; Hale and Matsumoto, 1993). En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur.

En microscopie optique classique, pour qu'une image soit nette, l'objet doit se trouver dans le plan focal du système optique. Lorsqu'un objet est épais, présente un relief important, ou bien lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image. Pour résoudre ce problème, la surface est non pas éclairée par un faisceau de lumière blanche, mais par un rayon laser, concentré par une lentille, qui balaie la surface en positionnant une sténopée (pinhole en anglais) devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent la sténopée et participent à la formation de l'image, d'où le nom « confocal » (synonyme de monofocal). Le balayage par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Les détecteurs utilisés sont des tubes photo-multiplieurs (PMT), l'intensité lumineuse est mesurée et numérisée en fonction de la position du laser dans l'échantillon : on obtient directement des images numériques.

L'emploi d'une source lumineuse cohérente (laser) ainsi que la taille réduite du champ éclairé permettent d'obtenir une résolution latérale légèrement meilleure (180-160nm)

à celle attendue pour un microscope optique conventionnel (200nm). La résolution en Z (profondeur) est de l'ordre de 600nm en microscopie confocale.

Les lasers utilisés le plus fréquemment sont les suivants :

- argon-ion (longueurs d'onde : 457nm, 488nm, 514nm)
- hélium-néon (543nm)
- hélium-néon (633nm)

Le positionnement de l'image dans la profondeur de l'échantillon est généralement obtenue en déplaçant en Z l'objectif à l'aide d'un quartz piezo-électrique par pas successifs de 200 à 300nm.

### 5.1.2 – Préparation des échantillons

Des échantillons de pomme, de pêche et de prune, incluant le péricarpe (1 à 2mm<sup>3</sup>) ont été fixés à 4°C pendant 48 heures dans une solution tampon de cacodylate de sodium 0,05M (pH 7.2) contenant 2.5% (v/v) de glutaraldéhyde. Ils sont ensuite déshydratés par des solutions d'éthanol (20, 40, 60, 75, 80, 95% d'éthanol pendant 2 fois 30min et 2 bains d'éthanol absolu de 60min). Les échantillons sont infiltrés progressivement par de la résine LRWhite (London Resin White) en solution alcoolique (proportion 1/2, 1/1 et 2/1 de résine, chaque solution à 4°C pendant 24 heures avec un renouvellement) puis deux bains de résine pure. Ils sont placés dans des capsules de gélatine et mis au four à 70°C pendant 12 heures pour polymérisation.

### 5.1.3 – Expériences réalisées en microscopie confocale

Des coupes de 2µm d'épaisseur ont été réalisées au couteau de diamant à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert Ultra-cutE). Elles sont placées sur des lames de verre couvertes d'une couche de téflon présentant des puits de 7mm de diamètre. Plusieurs lames sont colorées avec du bleu de toluidine pour une observation en microscopie à fond clair.

Les coupes sont saturées pendant 2 heures à température ambiante par une solution de PBS 20mM, NaCl 0,14M, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM (pH 7.2) contenant 1% Tween-20 (v/v) et 1% de BSA (m/v). Elles sont ensuite incubées une nuit à 4°C en chambre humide avec l'anticorps primaire de lapin anti-LTP dilué au 1/50 dans la solution de saturation. Elles sont lavées avec cette même solution de saturation puis traitées par une solution d'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la sonde fluorescente Alexa 633, Molecular Probes) dilués au 1/1000 dans la solution de saturation, pendant 2 heures à température ambiante. Elles sont ensuite lavées à l'eau distillée, puis

séchées.

Les coupes ont été observées avec un microscope équipé d'une tête confocale spectrale (Leica SP2). Les observations ont été réalisées avec un objectif 40x (PL APO, AN 1.25) en utilisant la raie à 488nm d'un laser argon et la raie 633 nm d'un laser Helium-Néon. La première bande spectrale permet de collecter l'autofluorescence des tissus, la seconde la fluorescence émise par la sonde Alexa 633. Les paramètres d'acquisition (puissance des raies lasers, gain des photomultiplicateurs) déterminés sur les échantillons contrôles sont restés inchangés pour les coupes marquées avec les anticorps primaires. Des séries d'images de 10-15 plans focaux (séries en Z avec un incrément de 0,5µm entre chaque plan focal) ont été réalisées. La superposition des deux canaux de fluorescence (overlay) est obtenue après projection des plans focaux sur un plan xy par projection maximale.

## **5.2 - Localisation par microscopie électronique en transmission**

### **5.2.1 – Principe de la microscopie électronique en transmission**

La Microscopie Électronique en Transmission (MET ou TEM en anglais pour **T**ransmission **E**lectron **M**icroscopy) est une technique de microscopie basée sur le principe de diffraction des électrons et pouvant atteindre un grossissement de x 5.000.000. Le principe du microscope électronique en transmission a été mis au point en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. Il consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons utilisé en faisceau cohérent, et de visualiser soit l'hologramme obtenu qui est la figure de diffraction dans le plan focal de l'objectif, soit d'utiliser une autre lentille pour obtenir la figure transformée de Fourier de la figure de diffraction observable par l'impact des électrons sur un écran fluorescent ou de l'enregistrer sur une plaque photo.

La limite de résolution dépend de la longueur d'onde des électrons, donc de leur tension d'accélération, elle serait donc de l'ordre de grandeur du picomètre dans un cas idéal. Mais en raison des fortes aberrations elle n'est en réalité que de quelques Ångströms.

### **5.2.2 – Expériences réalisées en microscopie électronique en transmission (marquage à l'or colloïdal)**

Des coupes de 80nm d'épaisseur ont été réalisées au couteau de diamant à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert Ultra-cutE). Elles sont placées sur des grilles d'or. Le

protocole est le même que pour la microscopie confocale, sauf pour l'incubation avec l'anticorps secondaire. L'anticorps utilisé est un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à des particules d'or de 10nm de diamètre, dilué au 1/50 dans la solution de saturation (Amersham, RPN422 Auro-Probe EMGAR G10). Après lavage, les coupes sont colorées avec une solution aqueuse d'uranyl acétate (5%, m/v), rincées avec de l'eau et séchées.

Les observations ont été effectuées avec un microscope électronique en transmission Hitachi-H600 (Japon) utilisant un voltage de 100kV et les micrographies obtenues avec des films Kodak-Electron (Kodak France).

### **5.3 – Immuno-tissue empreintes (Immuno-Tissue Printing, ITP)**

Afin d'obtenir rapidement des informations sur la localisation des LTP et leur répartition entre peau et pulpe, sans observation au microscope et sans quantification par dosage ELISA, des immuno-empreintes tissulaires ont été effectuées. Basée sur le principe du Western blot, cette technique est rapide et simple à mettre en oeuvre.

Des coupes de fruits frais (pommes, pêches, abricots et prunes) d'environ 2mm d'épaisseur sont réalisées et lavées avec de l'eau distillée. Afin de permettre le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose 0,2 $\mu$ m (Schleicher and Schuel), les coupes et les membranes (préalablement lavées avec une solution d'acide ascorbique 100mM) sont déposées entre deux papiers filtres (BioRad) et une légère pression est appliquée pendant quelques minutes. Les membranes sont ensuite séchées pendant une nuit à température ambiante et le transfert des protéines est vérifié par une coloration rapide de la membrane dans une solution de 0,2% de Rouge Ponceau contenant 0,3% d'acide trifluoroacétique. Une saturation de ces membranes par un mélange PBS/Tween-20/lait écrémé (1x/0,1%/5%) est effectuée durant 2 heures à température ambiante. Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps primaire (sérum de lapin immunisé contre Mal d 3) dilué au 1/1000 dans le tampon de saturation durant deux heures à température ambiante, en chambre humide. Après trois lavages avec le tampon de saturation, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-IgG de lapins couplé à la peroxydase de Raifort) dilué au 1/2000 dans le tampon de saturation pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages dans une solution de PBS contenant 0,1% Tween-20 (v/v), les membranes sont incubées avec les substrats contenus dans le kit ECL Plus (Amersham) et les films révélés après 3 minutes d'exposition dans une cassette

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

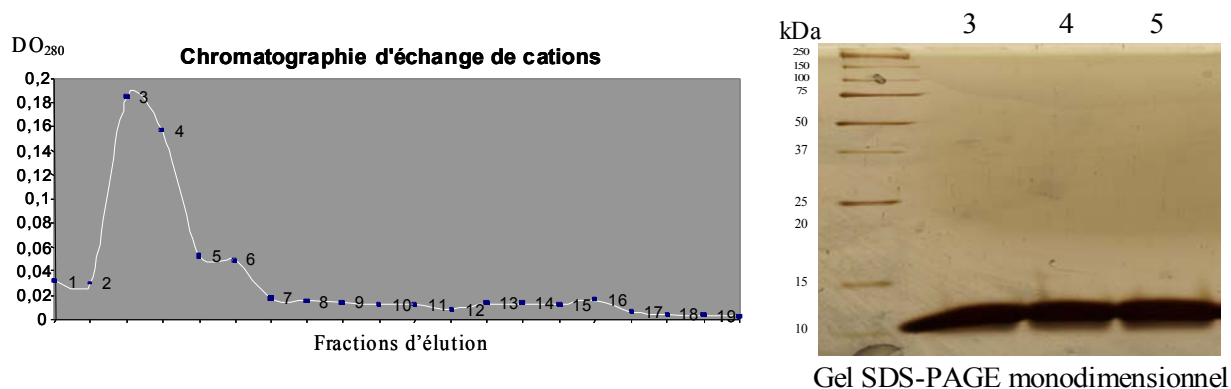


## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>Partie 1: Analyse bioinformatique des LTP de fruits, prédiction des épitopes liant les IgE et validation biochimique</b>	113
1.1 - Etude biochimique des LTP de fruits	115
1.2 - Analyse des séquences des LTP de fruits	117
1.3 - Construction des modèles tridimensionnels	117
1.4 - Prédiction des épitopes	121
1.5 - Validation des prédictions	123
1.6 - Discussion	125
1.7 - Article « How reliable is the structural prediction of IgE-binding epitopes of allergens ? The case study of plant lipid transfer proteins » (2007) Jean-Philippe Borges, Annick Barre, Raphaël Culerrier, Nicolas Archimbaud, Alain Didier, Pierre Rougé. <i>Biochimie</i> 89(1):83-91.	127
<b>Partie 2: Etude de la carte épitopique des LTP de fruits et clonage de Mal d 3</b>	129
2.1 - Cartographie des épitopes par la technologie Spot	131
2.1.1 - Utilisation de sérums de Lapins immunisés avec les LTP	131
2.1.2 - Utilisation de sérums de patients allergiques aux LTP (allergie IgE-dépendante)	131
2.2 - Clonage de la LTP de pomme (rMal d 3)	132
2.2.1 - Clonage utilisant la technologie Gateway™	132
2.2.2 - Caractérisation structurale et immunologique	135
2.3 - Discussion	137
2.4 - Article: « Mapping and conformational analysis of the IgE-binding epitopes of lipid transfer protein allergens from Rosaceae fruits » (2007) Jean-Philippe Borges, Annick Barre, Raphaël Culerrier, Claude Granier, Alain Didier and Pierre Rougé. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> (sous presse).	140
2.5 - Article: « The lipid transfer protein allergen of apple (Mal d 3) is expressed as a correctly folded and functional recombinant protein in E. coli. » (2007) Jean-Philippe Borges, Raphaël Culerrier, Didier Aldon, Annick Barre, Hervé Benoist, Alain Didier, Pierre Rougé (soumis).	140
<b>Partie 3: Etude de la distribution et de la localisation des LTP dans les fruits</b>	141
3.1 - Dosages des LTP dans la peau et la pulpe de fruits	143
3.2 - Localisation immuno-cytochimique des LTP en microscopie confocale et électronique	147
3.3 - Discussion	149
3.4 - Article « The lipid transfer protein (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens » (2006) Jean-Philippe Borges, Alain Jauneau, Cédric Brulé, Raphaël Culerrier, Annick Barre, Alain Didier, Pierre Rougé. <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> 44:535-542	151

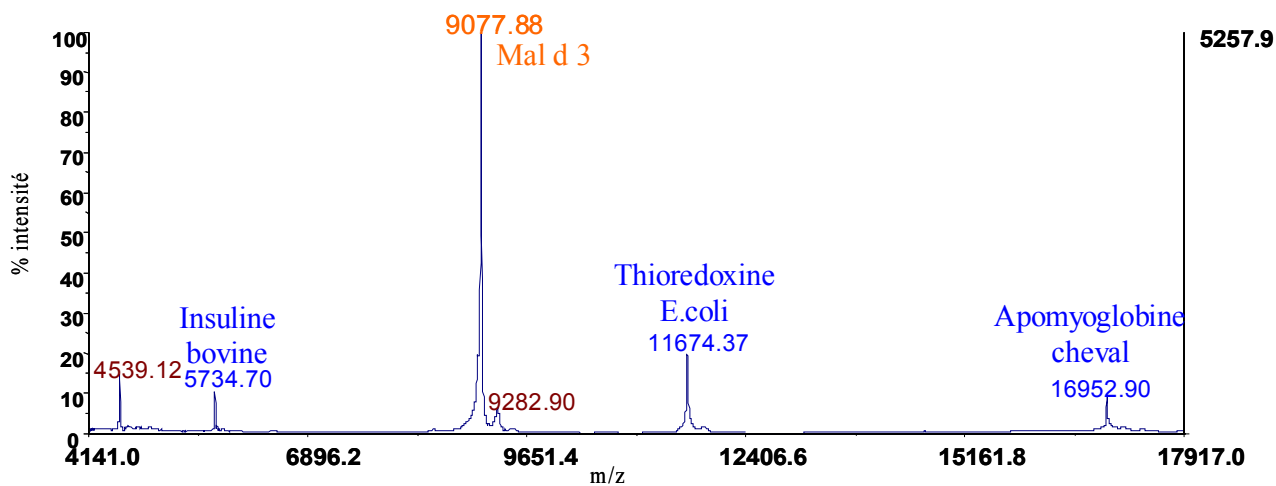
## **Partie 1**

# **Analyse bioinformatique des LTP de fruits, prédiction des épitopes liant les IgE et validation biochimique**



**Figure 15: Purification de Mal d 3**  
**Elution sur colonne échangeuse de cations et migration sur gel**

Le gel monodimensionnel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent permet de confirmer la présence d'une seule protéine (aux environs de 10 kDa) dans les premières fractions d'élué.



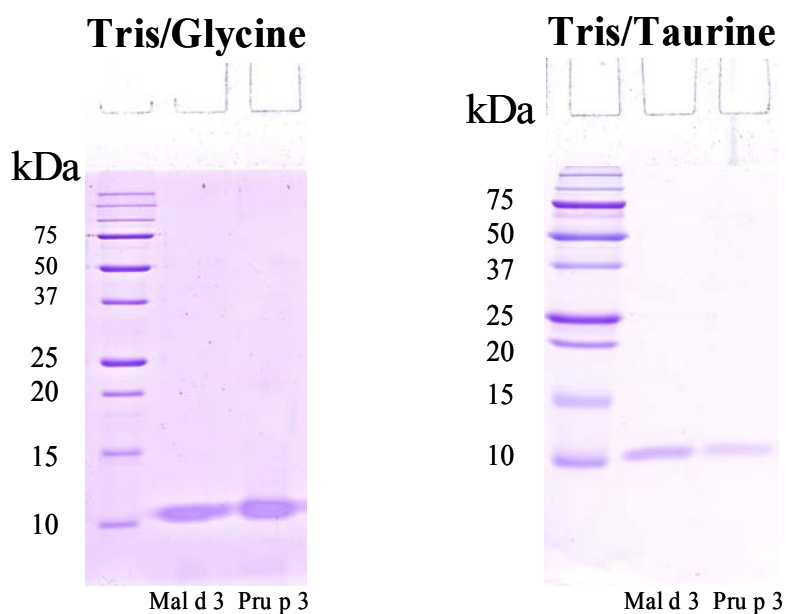
**Figure 17: Spectre MALDI-ToF de l'éluat n°3 de la purification de Mal d 3**

La masse du pic majoritaire permet de confirmer la présence de la LTP de Pomme dans les premiers élués de la colonne d'échange de cations. Une forme minoritaire (décalage de masse de 205 Da) n'a pour l'instant pas été caractérisée. L'insuline bovine, la thioredoxine *d'E. coli* et l'apomyoglobine de cheval sont utilisés comme calibrant interne de l'appareil.

## Partie 1: Analyse bioinformatique des LTP de fruits, prédiction des épitopes liant les IgE et validation biochimique

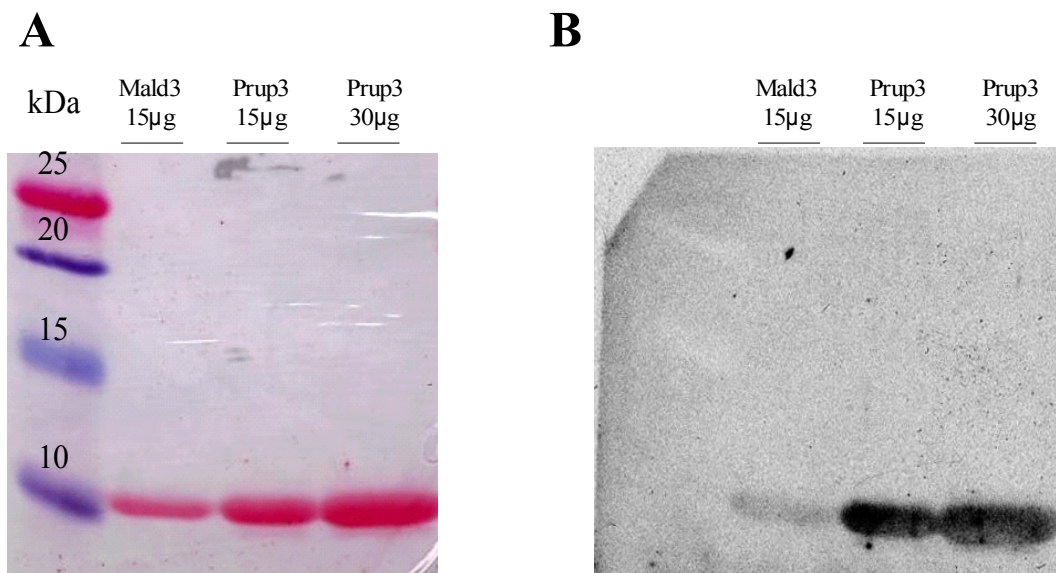
### 1.1 - Etude biochimique des LTP de fruits

Les LTP de pomme (Mal d 3) et de pêche (Pru p 3) ont été purifiées à partir de peaux de fruits commercialisés (pommes « variété Pink Lady » et pêches jaunes). Après extraction et purification sur colonne échangeuse de cations, les différentes courbes d'éluion montrent que la majorité des LTP sont éluées dans les premières fractions (figure 15 pour Mal d 3). Le rendement des purifications des LTP de fruits est d'environ 15mg de protéine purifiée à partir de 300g de matériel végétal frais (peau de fruits). L'électrophorèse monodimensionnelle de ces différentes fractions révèle la présence d'une seule bande migrant aux alentours de 10kDa (taille attendue pour les LTP). Afin d'améliorer la migration des protéines de bas poids moléculaire, un tampon Tris/Taurine a été utilisé en électrophorèse monodimensionnelle. Ce changement permet d'améliorer la séparation des LTP dans un extrait total de protéines de fruits. La figure 16 montre la différence de migration pour Mal d 3, avec un tampon classique Tris/Glycine et avec un tampon Tris/Taurine.



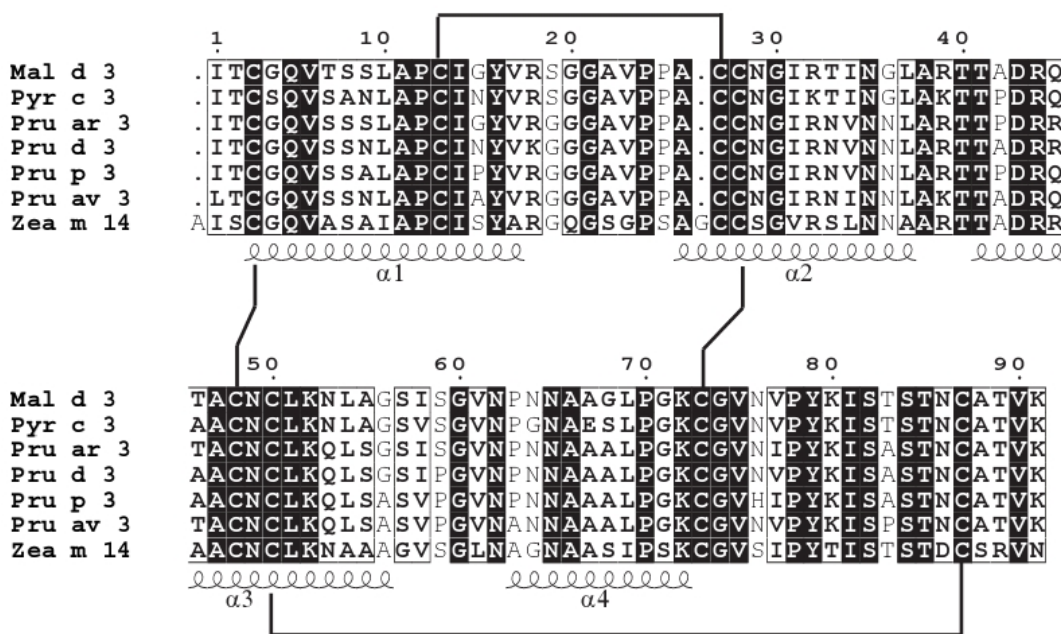
**Figure 16: Comparaison des migrations des LTP en gel monodimensionnel**

Les 2 types de tampon de migration utilisés (Tris/Glycine et Tris/taurine) ont des résolutions différentes. Les ions Taurine permettent de mieux séparer les protéines de bas poids moléculaire.



**Figure 18: Immunoempreinte réalisée sur des LTP de fruits avec des IgE de patients allergiques aux fruits (pomme, pêche, kiwi)**

La coloration au rouge Ponceau de la membrane de nitrocellulose (A) permet de mettre en évidence la présence des LTP de pomme et de pêche. La révélation du film photographique (B) après interaction avec des IgE de patients et incubation avec un anticorps de lapin anti-IgE couplé à la peroxydase de Raifort permet de vérifier l'allergénicité des LTP purifiées.



**Figure 19: Alignement multiple de différentes LTP végétales**

L'alignement multiple des LTP de pomme (Mal d 3), poire (Pyr c 3), abricot (Pru ar 3), prune (Pru d 3), pêche (Pru p 3), cerise (Pru av 3) est ici comparé avec la séquence de la LTP de maïs (Zea m 14) de structure connue. Les 4 hélices  $\alpha$  présentes dans la structure tertiaire de Zea m 14 sont indiquées sur l'alignement généré par Clustal-X (Thompson *et al.*, 1997). Les acides aminés identiques sont indiqués par des lettres blanches sur fond noir; les acides aminés homologues par des lettres noires sur fond blanc.

Les analyses effectuées en spectrométrie de masse Maldi-Tof confirment la pureté des différentes LTP purifiées. Ainsi, pour Mal d 3 (fig. 17), un pic majoritaire de masse égale à 9077.88 Da est observé sur les spectres en mode linéaire. Cette valeur correspond à la masse attendue pour la LTP de pomme. De plus, la présence d'un pic minoritaire de masse 9282.9 Da permet d'émettre l'hypothèse de la présence d'au moins deux isoformes de la protéine. Cette seconde isoforme, présente en moins grande quantité, pourrait avoir subi des modifications post-traductionnelles conduisant à ce décalage de masse. Différents tests effectués en spectrométrie de masse afin de séquencer la partie de la LTP impliquée dans ce changement de masse n'ont pas permis de valider cette hypothèse.

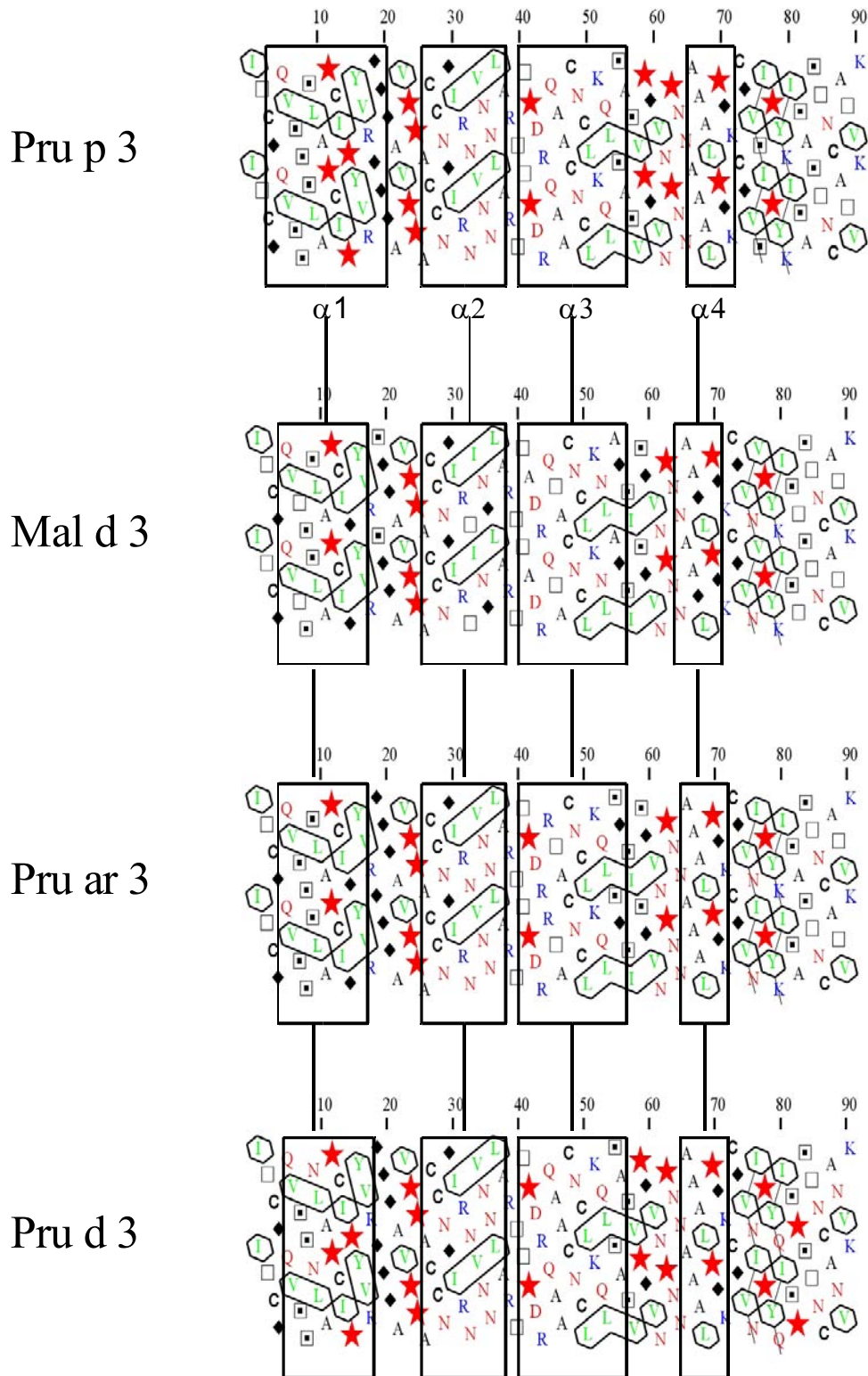
L'allergénicité des LTP purifiées ont été vérifiées par immuno-empreinte contre des sérums de patients allergiques aux fruits (pomme, pêche et kiwi pour la plupart). La révélation du film photographique permet de valider la présence, aux tailles correspondant aux LTP, de protéines reconnues par les IgE de patients (figure 18). Cette expérience, réalisée également avec un seul sérum de patient allergique à la pêche, abouti au même résultat. Ce résultat démontre l'existence d'une réactivité croisée entre la LTP de pomme et la LTP de pêche.

## 1.2 - Analyse des séquences des LTP de fruits

Les LTP des fruits des Rosaceae (pêche, abricot, pomme, prune) constituent un groupe très homogène de petites protéines qui possèdent des séquences d'acides aminés très voisines (fig. 19). Les différents pourcentages d'identité et de similitude des séquences primaires (calculés en utilisant la matrice d'homologie structurale de Risler *et al.* (Ponder and Richards, 1987)) sont respectivement d'environ 70% et 90%. Huit résidus de cystéine, très conservés, forment quatre ponts disulfure. Ils entraînent un repliement très conservé de la chaîne polypeptidique, souvent qualifié de « saxophone-like », et jouent un rôle très important dans la stabilité de la protéine. Ainsi, les LTP se caractérisent par une extrême stabilité thermique et protéolytique (Asero *et al.*, 2000), ce qui leur permet de ne pas être dénaturées par les différents processus mis en place dans les protocoles de conservation et de transformation des produits agro-alimentaires (Scheurer *et al.*, 2004).

## 1.3 - Construction des modèles tridimensionnels

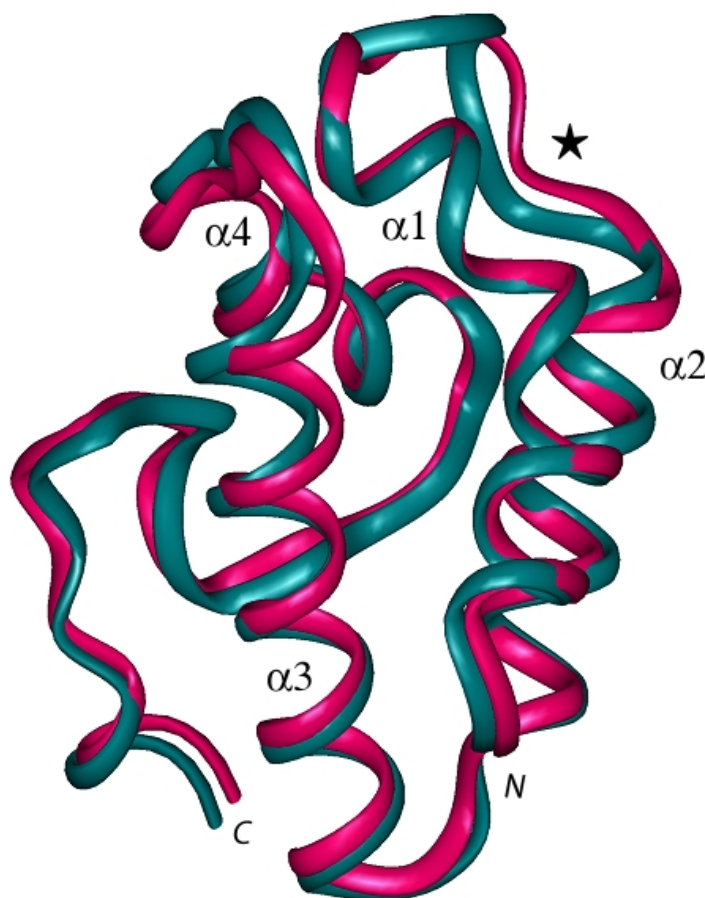
Le taux élevé d'identité entre les séquences d'acides aminés des LTP ainsi que la très bonne



**Figure 20: Comparaison des profils HCA des LTP de fruits**

Les 4 hélices  $\alpha$  présentes dans Pru p 3 (code PDB 2ALG) sont délimitées sur les profils HCA des autres LTP homologues. La structure secondaire est parfaitement conservée.

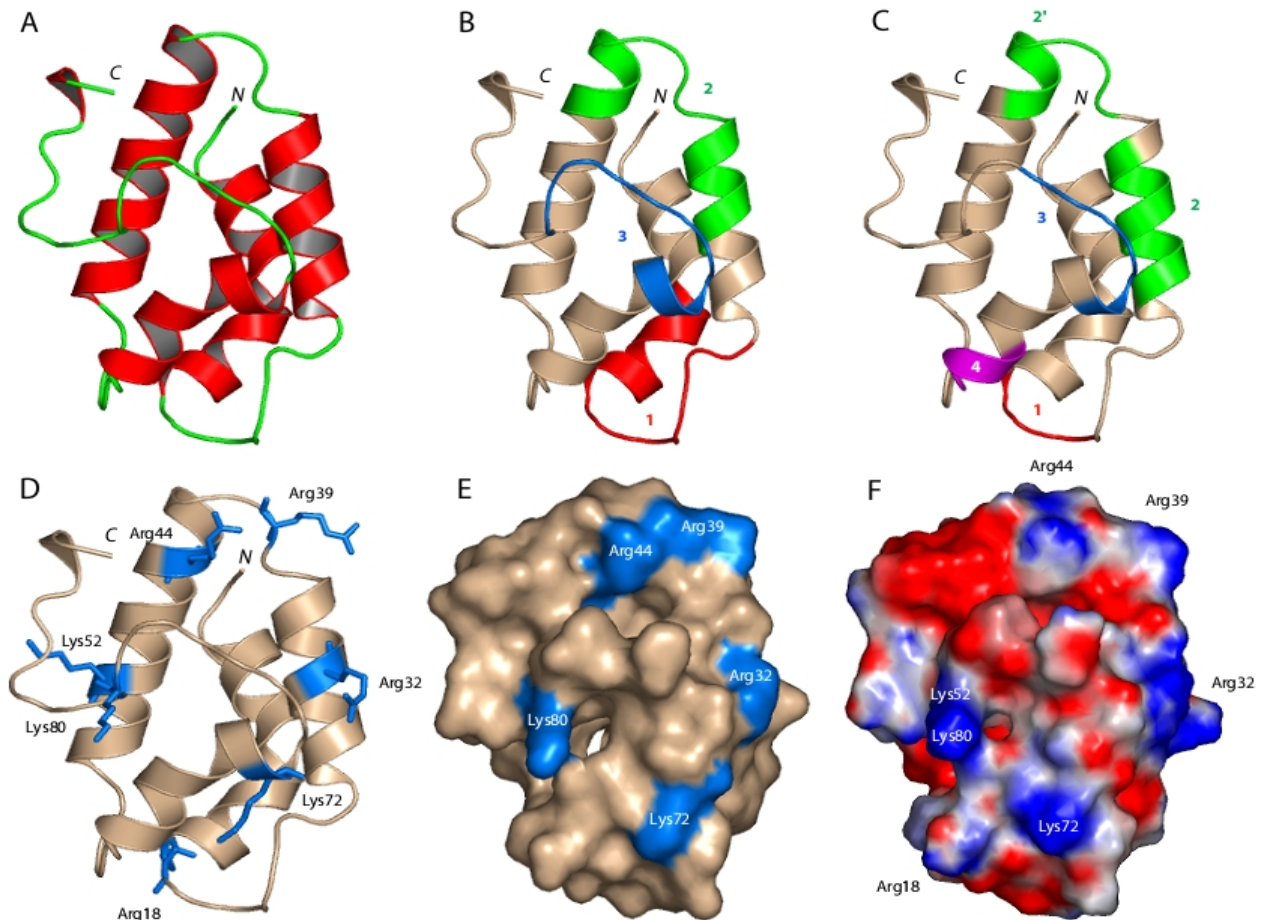
conservation de leurs éléments de structure secondaire (hélices  $\alpha$ ) prédits par les profils HCA (fig. 20), autorise une approche de modélisation moléculaire par homologie pour construire le modèle tridimensionnel de Pru p 3 à partir des coordonnées cristallographiques de Zea m 14 (LTP du maïs). Ce modèle présente le repliement classique de type « saxophone-like » observé chez les LTP végétales (Gincel et al., 1994) constitué de quatre hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$ ) connectées par des boucles. La région C-terminale de la chaîne polypeptidique ne présente pas de structuration apparente. Quatre ponts disulfure formés entre les huit résidus conservés de cystéine assurent la stabilité de cette structure. La validité de notre modèle a été testée en lui superposant la structure obtenue récemment par cristallographie de diffraction des rayons-X de Pru p 3 (code PDB 2ALG). La superposition des carbones  $\alpha$  des 91 résidus a permis d'obtenir une déviation de l'écart quadratique moyen (rmsd) de 1,31 Å, ce qui valide le modèle construit par modélisation moléculaire par homologie. En fait, toutes les hélices  $\alpha$  ont été correctement délimitées, avec une légère variation essentiellement au niveau de la boucle connectant les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (fig. 21).



**Figure 21: Superposition du modèle et de la structure de Pru p 3**

La représentation en ruban montre la superposition des carbones  $\alpha$  de la structure de Pru p 3 résolue par diffraction des rayons-X (rose) et du modèle construit par homologie avec la LTP de maïs (bleu-vert). *N* et *C* correspondent aux extrémités *N* et *C*-terminales de la protéine, respectivement. L'étoile (\*) indique la situation de la boucle connectant les hélices 3 et 4 où le plus grand écart de superposition est observé entre la structure et le modèle.





**Figure 22: Modèle tridimensionnel de Pru p 3**

A: Représentation en ruban du modèle de Pru p 3 montrant les 4 hélices (rouge) connectées par des coudes et des boucles (vert). *N* et *C* correspondent à l'extrémité *N* et *C*-terminale de la protéine, respectivement.

B: Localisation des épitopes liant les IgE (épitope #1 en rouge, épitope #2 en vert et épitope #3 en bleu).

C: Localisation des épitopes prédits pour lier les IgE (épitope #1 en rouge, épitopes #2-2' en vert, épitope #3 en bleu et épitope #4 en magenta).

D: Exposition des acides aminés électropositifs (Lysine et Arginine)

E: Exposition de ces mêmes acides aminés à la surface du modèle

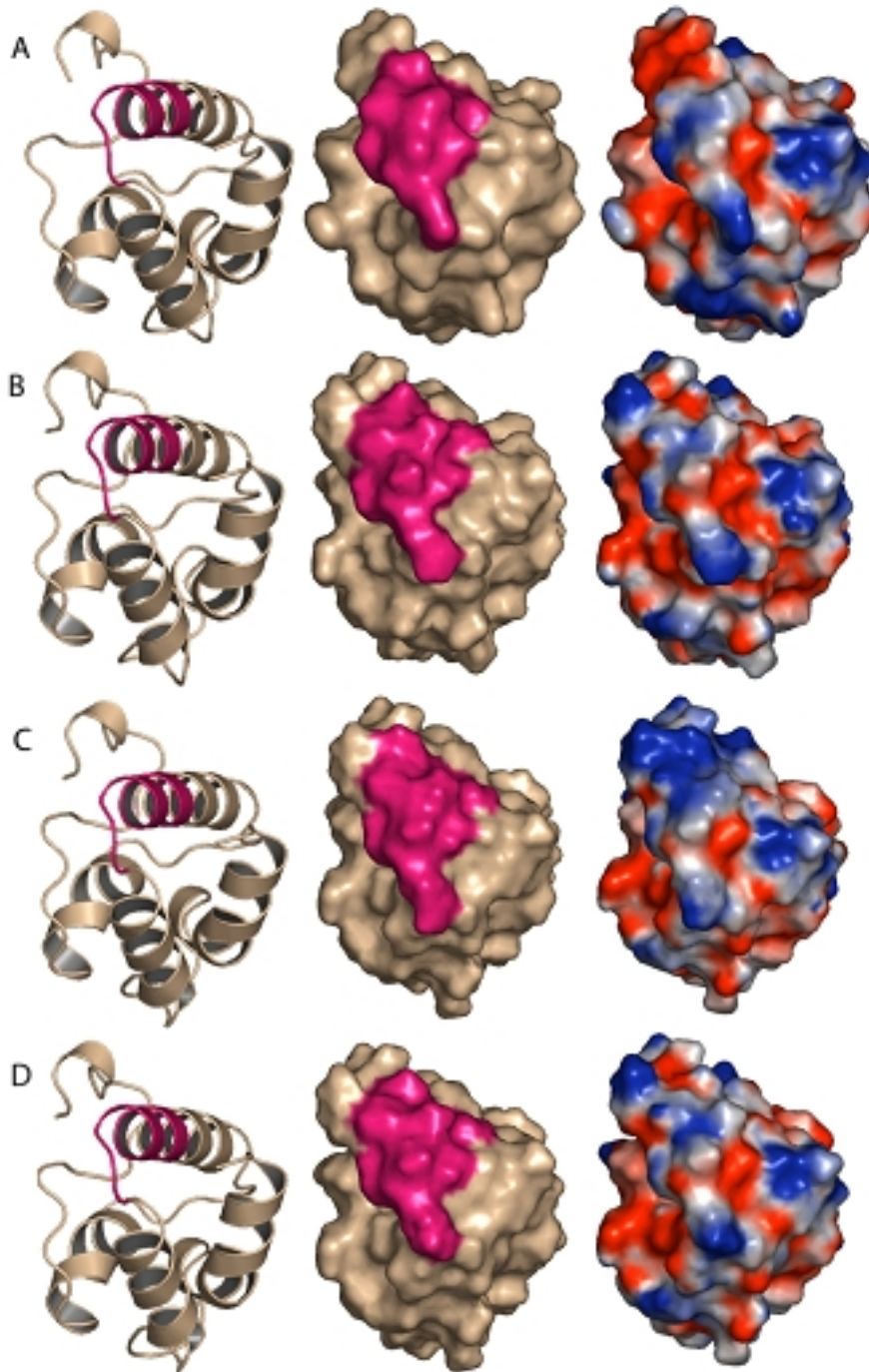
F: Carte des potentiels électrostatiques présents sur la surface moléculaire de Pru p 3. Les zones électropositives et électro négatives sont colorées en bleu et rouge, respectivement.

Tous les modèles ont la même orientation. Les différentes représentations ont été générées avec le logiciel PyMOL.

Des modèles très similaires ont été obtenus par la même approche pour d'autres LTP de fruits. Ainsi, les modèles tridimensionnels des LTP de pomme (Mal d 3), de prune (Pru d 3), de cerise (Pru av 3), de poire (Pyr c 3) et d'abricot (Pru ar 3) ont ensuite pu être utilisés pour étudier les réactions croisées entre les LTP des fruits de Rosaceae.

#### 1.4 - Prédiction des épitopes

Quatre épitopes linéaires liant les IgE contenant des résidus chargés ont été prédits en analysant la séquence d'acides aminés de Pru p 3 avec les différentes échelles d'hydrophilicité, de flexibilité et d'exposition au solvant. Les profils HCA ont également été utilisés. Les épitopes prédits correspondent aux séquences en acides aminés suivantes: <sup>18</sup>RGGG<sup>21</sup> (épitope #1), <sup>29</sup>NGIRNVNN<sup>36</sup> (épitope #2), <sup>39</sup>RTTPDRQA<sup>46</sup> (épitope #2') et <sup>72</sup>KCGVHIPYKI<sup>81</sup> (épitope 3) (fig. 22C). Ces différentes régions correspondent sur les modèles tridimensionnels à des zones exposées au solvant et riches en résidus chargés électropositivement (fig. 22D,E). Beaucoup de ces résidus chargés se trouvent dans des zones exposées au solvant à la surface des LTP, ce qui confère à ces régions des potentiels très électropositifs (fig. 22F). Ces différentes séquences issues de la prédiction correspondent pour certaines d'entre elles (acides aminés soulignés) aux trois épitopes linéaires <sup>11</sup>APCIPYVRGGGAVPP<sup>25</sup> (épitope #1), <sup>30</sup>GIRNVNNLARTTPDRQ<sup>45</sup> (épitope #2) et <sup>70</sup>PGKCGVHIPYK<sup>80</sup> (épitope #3) précédemment reconnus par des IgE de patients allergiques et obtenus en utilisant des peptides chevauchants synthétisés recouvrant la séquence entière de Pru p 3 (Shevchenko et al., 1996) (fig. 22B). En fait, une autre séquence d'acides aminés <sup>61</sup>VNPNN<sup>65</sup>, prédite précédemment comme un épitope potentiel liant les IgE du fait de son hydrophilie, de sa flexibilité et de son accessibilité et indiqué en tant qu'épitope #4 (fig. 22C), a été ensuite éliminée du fait qu'elle ne contient aucun acide aminé chargé. Apparemment, cette dernière séquence ne correspond à aucun des épitopes de Pru p 3 précédemment caractérisés expérimentalement.



**Figure 24: Localisation de l'épitope consensus sur différentes LTP de fruits**

L'épitope consensus prédit pour lier les IgE est représenté en rose sur la colonne de gauche (représentation en ruban) et la colonne centrale (surface des modèles). La dernière colonne montre les zones électropositives (bleu) et électronégatives (rouge) des modèles de Pru p 3 (A), Pru d 3 (B), Pru ar 3 (C) et Pru av 3 (D).



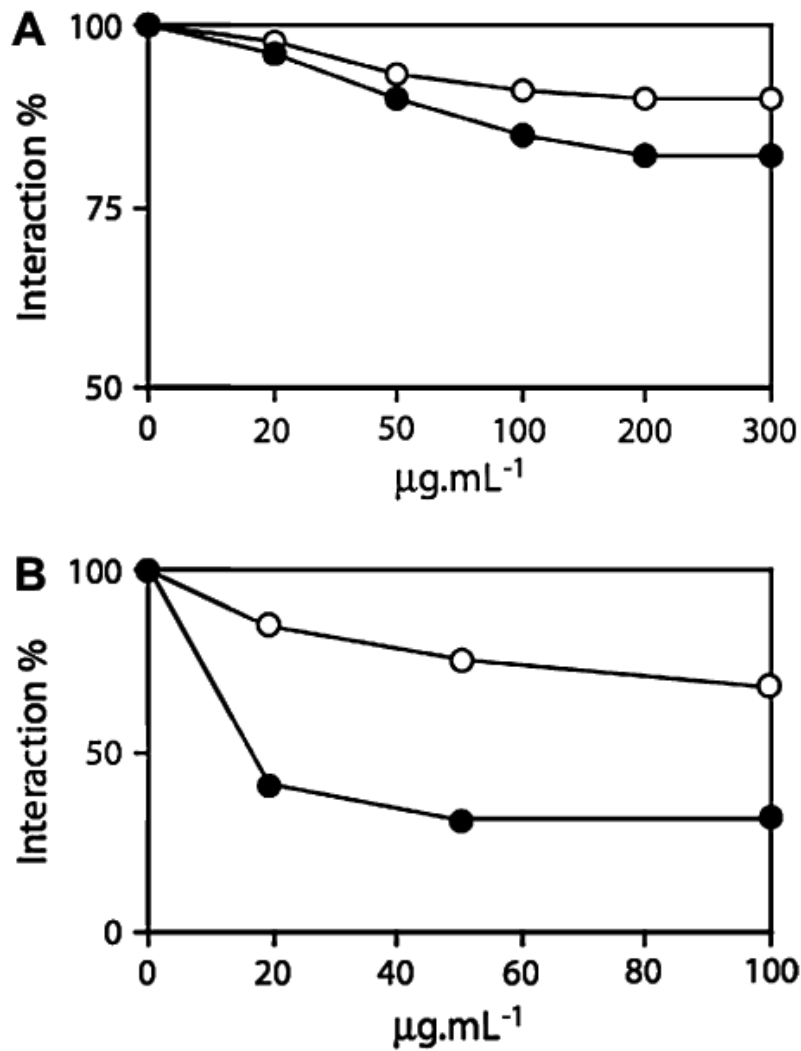
Figure 23: Aligment des LTP et mise en évidence d'un épitope consensus

L'alignement multiple a été obtenu avec différentes LTP végétales. La séquence de l'épitope consensus prédit pour lier les IgE (correspondant à l'épitope #2' pour Pru p 3) est surlignée en gris. En dehors des LTP de fruits, les autres LTP de plantes sont désignées par les noms communs des plantes dont elles sont issues.

Les quatre épitopes de Pru p 3 prédits pour lier les IgE correspondent à des séquences d'acides aminés très conservées chez les autres LTP de fruits. Ainsi, cette prédiction peut également s'appliquer à cette famille d'allergènes de fruits. L'épitope #2' <sup>39</sup>RTTPDRQA<sup>46</sup> de Pru p 3, qui correspond à une zone regroupant la boucle reliant les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  et le début de l'hélice  $\alpha 3$ , a aussi été prédit comme épitope B dans les autres LTP de fruits (fig. 23). Cette séquence d'acides aminés très conservés se présente sous une conformation très similaire dans les autres LTP de Rosaceae modélisées dont Mal d 3 (pomme), Pru ar 3 (abricot) et Pru av 3 (cerise) (fig. 24). Les déviations des écarts quadratiques moyens (rmsd) mesurés sur les superpositions spatiales de l'épitope de Pru p 3 par rapport à Mal d 3, donne des valeurs  $\leq 0,1 \text{ \AA}$ . Les calculs des surfaces accessibles au solvant donnent des valeurs très similaires:  $1177 \text{ \AA}^2$  pour Mal d 3,  $1190 \text{ \AA}^2$  pour Pru ar 3 et  $1136 \text{ \AA}^2$  pour Pru p 3. Ces valeurs indiquent également que l'épitope consensus prédit possède une structure locale très similaire et occupe une zone comparable à la surface de ces allergènes. De plus, les résidus chargés sont distribués de manière comparable dans cette région tel que le montre la cartographie des potentiels électrostatiques des surfaces moléculaires. D'autres structures de LTP, résolues par diffraction des rayons-X ou résonance magnétique nucléaire, possèdent une conformation très voisine dans cette zone. Cette région, dont la séquence et la structure sont très conservées, correspond très probablement à un épitope B consensus responsable de réactions croisées impliquant les IgE chez des patients sensibilisés.

### 1.5 - Validation des prédictions

Le caractère consensuel de la région épitopique précédemment prédite a pu être confirmé



**Figure 25: Expériences d'inhibition ELISA**

Inhibition, par des concentrations croissantes (exprimées en µg/mL) de l'épitope consensus synthétisé (<sup>39</sup>RTTADRQTA<sup>47</sup> de Mal d 3), de l'interaction des anticorps avec Pru p 3 (○) et Mal d 3 (●).

A: anticorps polyclonaux (IgG) de Lapin immunisé contre l'épitope synthétisé

B: sérum (IgE) de patients allergiques.

Chaque valeur est une moyenne de deux dosages ELISA séparés.

par des dosages ELISA. Des anticorps de Lapins immunisés avec l'épitope #2' de Pru p 3 réagissent de manière croisée avec Mal d 3. La réaction croisée inverse a aussi été observée: des anticorps de Lapins immunisés avec l'épitope #2' de Mal d 3 interagissent de façon similaire avec Pru p 3. De plus, les peptides synthétisés correspondant à l'épitope #2' de Pru p 3 (<sup>39</sup>RTTPDRQAA<sup>46</sup>) et de Mal d 3 (<sup>39</sup>RTTADRQTA<sup>46</sup>) inhibent les interactions LTP – anticorps (fig. 25A). Des expériences d'inhibition ont également été réalisées avec des sérums de patients contenant des IgE reconnaissant les LTP de fruits (fig. 25B), avec des résultats identiques.

## 1.6 - Discussion

L'approche bioinformatique que nous avons utilisée pour prédire les épitopes B des LTP repose sur une combinaison de différents paramètres: 1) l'existence de résidus électropositifs (Arg, Lys) et/ou électronégatifs (Asp, Glu) dans les régions prédites comme étant 2) les plus hydrophiles, 3) les plus flexibles et 4) les plus exposées au solvant, 5) l'évaluation de l'index antigénique et 6) l'étude des clusters hydrophobes (HCA), nous a permis de prédire correctement les épitopes linéaires liant les IgE à la surface des LTP de fruits. Le but de notre approche n'est pas de prédire correctement tous les épitopes mais de localiser avec une précision satisfaisante, les épitopes les plus importants et les plus représentatifs. La délimitation des régions épitopiques est finalement réalisée sur la surface moléculaire des structures ou modèles tridimensionnels disponibles. Cette étape est d'une importance cruciale pour valider le caractère exposé et chargé des zones préalablement prédites. Les modèles tridimensionnels construits à partir de la LTP de maïs nous ont permis de localiser les régions fortement électropositives et électronégatives présentes à la surface des allergènes et potentiellement impliquées dans les réactions allergiques.

Les résidus Arg39, Thr40, Arg44, Lys80 et Lys91 de Pru p 3 ont été précédemment prédits comme pouvant préférentiellement être reconnus par des IgE de patients allergiques en raison de leur exposition au solvant et de leurs propriétés électrostatiques (Asero et al., 2000). A l'exception de la lysine 91, tous les autres acides aminés se retrouvent dans nos épitopes prédits. L'implication de ces acides aminés dans des réactions allergiques a en effet été démontrée *via* la construction d'un triple mutant Pru p 3 « Asp39Ala/Thr40Ala/Arg44Ala ». Cette protéine recombinante interagit 5 fois moins que la protéine naturelle avec des IgE de patients allergiques. Ces résidus sont localisés dans une petite boucle (Arg39, Thr40) reliant les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ , ainsi qu'au début de l'hélice  $\alpha 3$  (Arg44). Ces résidus sont très conservés dans les autres LTP de fruits mais également dans d'autres LTP de plantes. L'épitope #3, qui contient les trois acides aminés conservés Arg, Thr et Arg, est systématiquement prédit comme une région potentiellement impliquée dans des interactions avec

les IgE dans les autres LTP. Cette épitope pourrait donc correspondre à un épitope « consensus » responsable de réactions croisées observées entre les LTP de plantes (Pastorello et al., 2000; van Ree, 2002). Ainsi, l'approche prédictive que nous avons développée s'avère particulièrement appropriée à l'identification d'épitopes consensuels conservés au sein de familles de protéines allergéniques.

Si cette approche permet de prédire correctement les épitopes liant les IgE pour les LTP de plantes, son application à d'autres LTP légèrement différentes, comme les LTP plus longues de pariétaire (Par j 1 de *Parietaria judaica*) ou les profilines (Hel t 2 du topinambour *Helianthus tuberosus* et Bet v 2 du bouleau *Betula verrucosa*) s'avère plus délicate. La plupart des épitopes IgE caractérisés expérimentalement pour Bet v 2 (Asturias et al., 2003) et Par j 1 (Asturias et al., 2002) ont été correctement prédits, ceux d'Hel t 2 (Fedorov et al., 1997) donnent des résultats différents. Bien que les profils Bet v 2 et Hel t 2 présentent de grandes similarités de structure, les épitopes liant les IgE (caractérisés expérimentalement ou prédits) sont différents. Quelques changements d'acides aminés dans les séquences de ces allergènes sont apparemment responsables des différences observées.

Lorsque la méthode de prédiction est utilisée pour des allergènes possédant des séquences d'acides aminés beaucoup plus longues, comme Ara h 1 de l'arachide (*Arachis hypogaea*), notre approche prédictive ne permet pas de prédire correctement les neuf épitopes linéaires liant les IgE précédemment caractérisés dans la région N-terminale de la protéine (Shin et al., 1998). Cette région N-terminale est en effet prédite comme un seul et unique épitope. Ceci est sans doute dû au nombre considérable de résidus chargés et hydrophiles distribués tout au long de la séquence N-terminale de cet allergène. Dans ce cas de figure, les différents outils utilisés (profils hydrophatiques, présence de résidus chargés) ne permettent pas de discriminer précisément les épitopes caractérisés expérimentalement. En outre, aucune information structurale n'étant actuellement disponible sur cette région N-terminale d'Ara h 1, il n'est pas possible de préciser l'exposition au solvant et la distribution des différents résidus chargés à la surface de la protéine. Des résultats plus intéressants ont par contre pu être obtenus pour la région C-terminale dont la structure est connue. Ainsi, une bonne corrélation a pu être trouvée entre certains des épitopes précédemment caractérisés et les prédictions issues de l'approche bioinformatique (Barre et al., 2005b). Toutefois, cette approche basée sur la reconnaissance des régions épitopiques exposées à la surface des modèles tridimensionnels construits par modélisation par homologie permet, dans certains cas, de distinguer les zones pouvant lier les IgE d'autres zones, prédites comme épitopiques en raison de leurs caractéristiques, mais en réalité très faiblement ou pas exposées. C'est le cas pour

certaines épitopes prédits pour Ara h 1 (épitopes #17 RRYTARLKEG et #18 ELHLLGFGIN), dont l'exposition au solvant est très faible voire quasi nulle. On peut supposer que seulement quelques-uns des acides aminés suffisamment exposés pourraient participer à l'interaction avec les IgE, mais ceci ne peut se vérifier que lorsque le modèle tridimensionnel ou la structure sont disponibles. Ainsi, la vérification de l'exposition et de la conformation des épitopes liant les IgE sur la surface moléculaire des allergènes apparaît comme une étape indispensable pour confirmer le caractère épitopique d'une séquence préalablement prédite comme telle. De même, l'analyse fine de la surface des allergènes aide considérablement à la reconnaissance des épitopes discontinus plus complexes résultant d'un rapprochement de plusieurs épitopes linéaires à la surface des allergènes.

## 1.7 – Article

« How reliable is the structural prediction of IgE-binding epitopes of allergens ? The case study of plant lipid transfer proteins » (2007)

Jean-Philippe Borges, Annick Barre, Raphaël Culerrier, Nicolas Archimbaud, Alain Didier, Pierre Rougé. *Biochimie* 89(1):83-91.







## How reliable is the structural prediction of IgE-binding epitopes of allergens? The case study of plant lipid transfer proteins

Jean-Philippe Borges<sup>a</sup>, Annick Barre<sup>a</sup>, Raphaël Culerrier<sup>a</sup>, Nicolas Archimbaud<sup>a</sup>,  
Alain Didier<sup>b</sup>, Pierre Rougé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR-CNRS 5546, Pôle de Biotechnologie végétale, 24 Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>b</sup> Clinique des Voies Respiratoires, Centre Hospitalier Universitaire Larrey, 24 Chemin de Pouvoirville,  
31059 Toulouse Cedex 9, France

Received 27 February 2006; accepted 15 September 2006

Available online 11 October 2006

### Abstract

The linear IgE-binding epitopes of non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) from plants were predicted using a combination of predictive tools including (1) the hydrophobic profiles based on different scales of hydrophilicity, flexibility and exposure to the solvent, (2) the hydrophobic cluster analysis plots, (3) the occurrence of charged residues in the predicted amino acid sequence stretches and, (4) the exposition of the predicted linear IgE-binding epitopes checked on the three-dimensional models built for the nsLTP. A reliable prediction was obtained for nsLTP as compared with the previously characterized IgE-binding epitopes of various proteins. A consensual IgE-binding epitope occurring in other plant nsLTP and responsible for some IgE-binding cross-reactivity among fruit nsLTP has been identified and characterized. Despite some discrepancies, a fairly good prediction resulted in applying our combination of predictive methods to longer nsLTP or plant profilins.  
© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Allergy; Lipid transfer protein; Pru p 3; Mal d 3; IgE-binding epitope; IgE-binding cross-reactivity

### 1. Introduction

Until now only a few plant dietary allergens have been characterized. However, the increasing amount of information

obtained from both the genome and transcriptome sequencing programs of different plants and the proteomic approaches that are developing for the identification of allergens in fruits and other plant products are still waiting to be assessed in term of allergenicity potency. The suspected allergenicity of plant proteins has to be characterized at the molecular level by the identification of their IgE-binding epitopes that account for their reactivity towards cell-bound IgE. Epitope mapping based on the ELISA inhibition of IgE-binding to a protein allergen by a series or a library of overlapping synthetic oligopeptides covering its entire amino acid sequence (e.g. PEPSCAN) is time consuming and could be greatly accelerated by using the only amino acid sequence stretches that have been accurately predicted to act as linear IgE-binding epitopes. The search for simple predictive methods allowing a reliable identification of the linear IgE-binding epitopes along the amino acid sequences of allergens, yet remains a goal that deserves much attention with respect to the

**Abbreviations:** Ab, polyclonal antibodies; Ara h 1, vicilin allergen from peanut (*Arachis hypogaea*); Bet v 2, profilin from *Betula verrucosa* (birch); HCA, hydrophobic cluster analysis; Hel t 2, profilin from *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke); LTP, lipid transfer protein; Mal d 3, *Malus domestica* (apple) allergen 3; nsLTP, non-specific lipid transfer protein; PBS, phosphate buffered saline (pH 7.5); PBSTB, 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.5) containing 0.2% Tween-20 (v/v) and 3% BSA (w/v); Par j 1, lipid transfer protein from *Parietaria judica* (pellitory-of-the-wall); Pru ar 3, *Prunus armeniaca* (apricot) allergen 3; Pru av 3, *Prunus avium* (cherry) allergen 3; Pru d 3, *Prunus domestica* (plum) allergen 3; Pru p 3, *Prunus persica* (peach) allergen 3; Pyr e 3, *Pyrus communis* (pear) allergen 3; TBS, 20 mM Tris-buffered saline (pH 7.5); Zea m 14, *Zea mays* (maize) allergen 14.

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 62 19 35 58; fax: +33 5 62 19 35 02.

E-mail address: [rouge@scsv.ups-tlse.fr](mailto:rouge@scsv.ups-tlse.fr) (P. Rougé).

characterization of the increasing number of allergens identified so far. Hydrophobic profiles based on different propensity scales of both hydrophilicity, flexibility and exposition to the solvent [1–3] are usually used to delineate the linear IgE-binding epitopes or B-cell epitopes that correspond to the most hydrophilic/flexible/accessible regions occurring along the amino acid sequence of protein allergens. These predicted regions often coincide with turns/loops [4] or well-exposed regions protruding out of the molecular surface of the proteins [5]. However, many predicted IgE-binding regions poorly match the experimentally characterized IgE-binding epitopes, as reviewed recently [6]. Obviously, the single use of hydrophobic profiles based on a very few properties of the amino acid residues are a too crude predictive tool to reliably predict the location of the IgE-binding regions of the molecular surface of the proteins. Additional structural information [7,8] dealing with the orientation (rotamers, bulky or tiny character, flexibility of the side chain), the properties (net charge) of the surface exposed amino acid residues and their location on the protein surface have to be carefully considered for a more accurate prediction of the amino acid sequence stretches susceptible to act as IgE-binding epitopes. In this respect, all of the linear IgE-binding epitopes that have been characterized so far along the amino acid sequence of plant allergens contain either electropositive, or electronegative residues, or both (Table 1).

Here we report on the use of a combination of different predictive methods including hydrophobic profiles, hydrophobic cluster analysis (HCA), molecular modelling and protein surface analysis for the prediction of the linear IgE-binding epitopes of the plant lipid transfer protein allergens from fruits and other plant organs. These non-specific lipid transfer proteins (nsLTP), which belong to the PR 14 family of pathogenesis-related proteins (PR-proteins) [9,10], have been recognized as major food allergens responsible for both the sensitization and allergenic responses of susceptible individuals [11–13]. A conserved consensus IgE-binding epitope common to nsLTP has been identified and characterized on the molecular surface of the allergens.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Molecular modelling and IgE-binding epitope prediction

Multiple amino acid sequence alignments were carried out with CLUSTAL-X [14] and displayed with ESPript [15].

The HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) [16] was performed to delineate the conserved secondary structural features (stretches of  $\alpha$ -helix) along the amino acid sequence of Pru p 3 and other fruit LTP by comparison with the maize (*Zea mays*) LTP [17] used as a model. Once the assigned secondary structures have been delineated along the HCA plot of the template protein, the corresponding secondary structure stretches are precisely delineated along the HCA plot of the target protein according to their cluster shape and size similarities. HCA plots were generated using the HCA server (<http://smi.snv.jussieu.fr/hca/hca-form.html>).

Molecular modelling of Pru p 3 was carried out on a Silicon Graphics O2 R10000 workstation, using the programs InsightII, Homology and Discover3 (Accelrys, San Diego, CA, USA). The atomic coordinates of the maize LTP *Zea m 14* [17] (RCSB Protein Data Bank code 1MZL) were used to build the three-dimensional model of the allergen. The percentages of both identity ( $\sim 35\%$ ) and homology calculated with the structural homology matrix of Risler et al. [18] ( $\sim 75\%$ ) *Zea m 14* shares with Pru p 3 (Fig. 1) allowed us to build rather accurate three-dimensional model using the X-ray coordinates of the maize LTP as a template. Steric conflicts were corrected during the model-building procedure using the rotamer library [19] and the search algorithm implemented in the Homology program [20] to maintain proper side-chain orientation. The geometry of loop regions was corrected using the refine option of TurboFrodo [21]. An energy minimization of the final models was carried out by 50 cycles of steepest descent using Discover3. The program TurboFrodo was run to draw the Ramachandran plot and to perform the superposition of the model with the template protein. PROCHECK [22] was used to assess the geometric

Table 1

List of the IgE-binding epitopes mapped along the amino acid sequences of plant allergens containing either electropositive residues (K/R), or electronegative residues (D/E), or both (K/R · D/E) (epitopes taken from the SDAP database available at [http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap\\_1st.html](http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_1st.html))

Allergen	No. of IgE-binding epitopes identified	No. of IgE-binding epitopes containing K/R	No. of IgE-binding epitopes containing D/E	No. of IgE-binding epitopes containing K/R · D/E
Ara h1 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	21	1	2	18
Ara h2 ( <i>A. hypogaea</i> )	10	1	1	8
Ara h3 ( <i>A. hypogaea</i> )	4			2
Hev b1 ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	8	2	2	4
Hev b3 ( <i>H. brasiliensis</i> )	11	4		7
Hev b5 ( <i>H. brasiliensis</i> )	11		3	8
Jug r1 ( <i>Juglans regia</i> )	1			1
Jun a1 ( <i>Juniperus ashei</i> )	4	3		1
Jun a3 ( <i>J. ashei</i> )	5	1		4
Par j1 ( <i>Parietaria judaica</i> )	5	1		4
Par j2 ( <i>P. judaica</i> )	8	3		5
Pru p3 ( <i>Prunus persica</i> )	3	2		1
Total	91	18	10	63

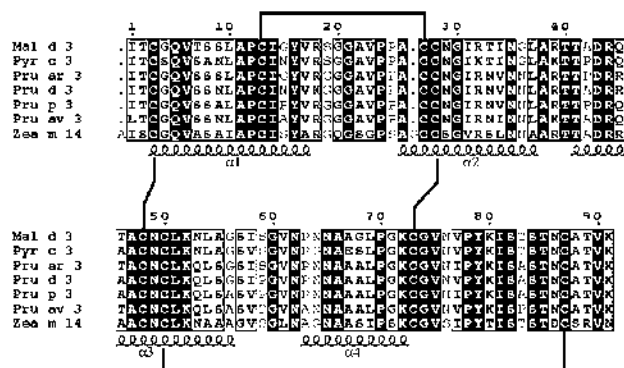


Fig. 1. Multiple alignment of fruit LTP from apple (Mal d 3), pear (Pyr c 3), apricot (Pru ar 3), plum (Pru d 3), peach (Pru p 3) and cherry (Pru av 3) with LTP of maize seedlings (Zea m 14). Identical and homologous residues are black boxed and open boxed, respectively. The four disulfide bridges linking the conserved Cys residues are indicated. Alignment performed with CLUSTAL-X [14] and displayed with ESPript [15].

quality of the three-dimensional models. All the residues of Pru p 3 were correctly assigned on the best allowed regions of the Ramachandran plot with the exception of residues Pro26 and Ala40 which are located in the generously allowed regions of the plot (result not shown). Using ANOLEA [23] to evaluate the models, only a few residues (2, 4 and 6 over 91 for the cherry, apricot and apple LTP, respectively versus 6 over 93 for the maize LTP (1MZL code) used as a template) exhibited energy over the threshold value. Cartoons were drawn with PyMOL (W.L. DeLano (<http://pymol.sourceforge.net>)). nsLTP from other fruit, e.g. from cherry (Pru av 3), apple (Mal d 3) and pear (Pyr c 3), were similarly modelled from the atomic coordinates of Zea m 14.

Electrostatic potentials were calculated and displayed with GRASP using the parse3 parameters [24]. The solvent probe radius used for molecular surfaces was 1.4 Å and a standard 2.0 Å Stern layer was used to exclude ions from the molecular surface [25]. The inner and outer dielectric constants applied to the protein and the solvent were respectively fixed to 4.0 and 80.0 and the calculations were performed keeping a salt concentration of 0.145 M.

Linear B-cell epitopes were predicted from the hydrophobic profiles as being the most hydrophilic, flexible and surface exposed regions. Different scales of hydrophilicity [26], flexibility [27], exposition to the solvent [28] and antigenicity [29], were used to build the hydrophobic profiles with the MacVector (Kodak) software. The most hydrophilic/flexible/accessible amino acid sequence stretches were finally retained as putative IgE-binding epitopes providing they contain either acidic (Asp, Glu) or basic (Arg, Lys). Other predicted hydrophilic/flexible/accessible amino acid sequence stretches devoid of charged residues were discarded.

The surface occupied by the previously characterized [30] or predicted sequential B-cell epitopes along the amino acid sequence of Pru p 3 was calculated and displayed on the molecular surface of the proteins with PyMOL. The overall conformation of the sequential B-cell epitopes on the molecular surface was displayed with PyMOL.

## 2.2. Isolation of nsLTP

nsLTP were purified from the pulp of mature peach and apple fruits. Usually, 200 g of pulp previously frozen in liquid nitrogen were finely ground in mortar and pestle and suspended in 1 L of 20 mM Tris-buffered saline (TBS) containing 2 mM EDTA and 3% (w/v) insoluble PVP (Polyclar AT, Sigma) (pH 7.5). The slurry was stirred overnight at 4 °C and then centrifuged 20 min at 16,000 × g and 20 min at 30,000 × g. The clear supernatant was poured in SpectraPor dialysis tubing (mol. wt. cut-off 3500 Da) and dialyzed against distilled water for 72 h at 4 °C. After centrifugation at 30,000 × g for 20 min at 4 °C, the supernatant was lyophilized and stored at –80 °C until used. Lyophilized protein samples were dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) and loaded onto a 5 ml HiTrap SP FF column (Amersham) previously equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.5). The retained LTP were eluted with 50 mM phosphate buffer, 50 mM NaCl (pH 7.5) and checked for purity. Purified Pru p 3 and Mal d 3 were dialysed against bi-distilled water, lyophilized and stored at –80 °C until used.

## 2.3. Analytical methods

Nonapeptides corresponding to the predicted epitope #2 of Pru p 3 (39RTTPDRQAA 47) and Mal d 3 (39RTTADRQTA47) were synthesized using Fmoc chemistry and coupled to thyroglobulin used as a carrier protein with glutaraldehyde.

The purity of the nsLTP preparations was checked by SDS–PAGE in 15% polyacrylamide gels using Tris–taurine as trailing ion [31] and staining with silver nitrate [32]. Coomassie blue stained bands were digested with trypsin in the gel and mass mapped by MALDI–TOF analysis as previously described [32]. The software Protein Prospector was used for the identification of the protein using the NCBI non-redundant database. For MALDI–TOF–MS analysis, nsLTP samples of 0.75 µl of a 0.5 mg ml<sup>-1</sup> protein solution in 50 mM phosphate buffer, 50 mM NaCl (pH 7.5) were co-crystallized on the MALDI plate with 0.75 µl of 0.6 mM of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid (sinapinic acid) in 50% (w/v) of azido nitrile used as a matrix solution. Desorption and ionization of crystallized samples were carried out on a Voyager-DE™ STR (Perspective Biosystems, USA) mass spectrometer in positive linear mode using an accelerating voltage of 25 kV, a grid voltage of 93% and an extraction delay time of 800 ns. Acquisition mass was performed between 3000 and 25,000 Da using a mixture of three proteins of known mass molecular weight (insulin: 5734 Da; thioredoxin: 11,674 Da; apomyoglobin: 16,952 Da) for the internal calibration.

The protein content of the nsLTP samples was estimated using the bicinchoninic acid kit reagent (Pierce) [33] with bovine serum albumin as a standard.

## 2.4. Immunochemical methods

Polyclonal antibodies against peach and apple nsLTP were raised in rabbits in the presence of Freund's complete adjuvant (Calbiochem). The allergens (100 µg) freshly dissolved in

saline (400  $\mu$ l) and emulsified with adjuvant (400  $\mu$ l) were repeatedly injected subcutaneously (200  $\mu$ l) at 10-day intervals during a period of 4 months. Every 3 weeks, blood was collected and checked for polyclonal antibodies by ELISA. After blood clotting at room temperature and at 4 °C for 4 h and 12 h, respectively, the immune sera were collected by centrifugation, filtered through a 0.2  $\mu$ m membrane and stored at –80 °C until used.

Polyclonal antibodies against synthetic epitope #2 of Pru p 3 (39RTTPDRQAA47) and Mal d 3 (39RTTADRQTA47) coupled to thyroglobulin were raised in rabbits following a similar immunization schedule. A series of 12 intradermal injections of 250  $\mu$ g of conjugates emulsified in Freund's complete adjuvant were performed over a 6-month period before bleeding and collection of the immune sera. Anti-peptide sera were filtered through a 0.2  $\mu$ m membrane and stored at –80 °C until used.

IgE-containing sera from patients allergic to fruit nsLTP were used in Western blots and ELISA measurements as probes for Pru p 3 and Mal d 3. Following 1D SDS–PAGE, proteins were transferred onto a Protran nitrocellulose 0.2  $\mu$ m membrane (Schleicher and Schuell) at 20 V for 45 min using a 48 mM Tris/39 mM glycine/20% (v/v) methanol mixture. After an overnight incubation in 10 mM PBS (pH 7.4) containing 0.2% (v/v) Tween and 5% (v/v) skimmed milk, the membrane was soaked in the patient IgE-containing sera diluted 1:10 in the same buffer and incubated for 2 h in a moist chamber. After three washings of 10 min each with the same buffer, the membrane was soaked in rabbit HRP-labelled anti-human IgE diluted 1/5000 in the buffer and incubated for 1 h under gentle stirring. Following three washings of 10 min each with buffer, the immunolabelled spots were detected using the ECL Plus detection (Amersham) after 3 min exposure in cassette. All the handling were carried out at room temperature.

ELISA measurements were performed on standard 96-well microtitration plates (Limbro) using whether polyclonal antibodies (Ab) against Mal d 3 or Pru p 3 or polyclonal antibodies raised against synthetic epitopes. Routinely, the wells were loaded with 50  $\mu$ l of 10 mM PBS (pH 7.5) containing 40 ng of Pru p 3/Mal d 3. The plates were incubated overnight at 4 °C and washed 3 times with PBS (pH 7.5). 100  $\mu$ l of PBS (pH 7.5) containing 0.2% Tween 20 (v/v) and 3% BSA (w/v) (PBSTB) were added to each well and the plates were incubated at room temperature for 2 h. 50  $\mu$ l of tenfold-diluted Ab in PBSTB (pH 7.5) were added and the plates were incubated for 1 h 30 min at room temperature under constant stirring. After 3 washes with PBSTB, 50  $\mu$ l of either 1/2000 (v/v) diluted sheep anti-rabbit IgG coupled to alkaline phosphatase (Dako) or 1/300 (v/v) diluted mouse monoclonal anti-human IgE coupled to alkaline phosphatase (Sigma) were added and, after incubation at room temperature for 45 min, 3 washes were performed with PBSTB. 100  $\mu$ l of alkaline phosphatase substrate (Sigma) were added and after incubation for 45 min in the dark, 50  $\mu$ l of 3 M NaOH were added to stop the colour reaction. The absorbance at 405 nm was recorded on a Titertek Multiscan spectrophotometer. Each value is the

mean of three separate experiments. Appropriate blank and substrate controls were performed under the same conditions.

Increasing concentrations of synthetic peptides ranging from 20 up to 300  $\mu$ g ml<sup>–1</sup> were pre-incubated for 1 h with the anti-epitope Ab or an IgE-containing serum from an allergic patient to inhibit the Pru p 3/Mal d 3–Ab interaction measured by ELISA.

### 3. Results

nsLTP from edible fruit, e.g. peach, apricot or plum, constitute a very homogeneous group of closely related small proteins that share very similar amino acid sequences (Fig. 1). The overall percentages of identity and similarity (calculated using the structural homology matrix of Risler et al. [19]) among their amino acid sequences amount 70% and 90%, respectively. Eight conserved Cys residues forming four disulfide bridges play an important role in stabilizing the whole molecule. Accordingly, LTP exhibit an extreme stability to heat denaturation or proteolytic attack [34] and thus can escape the thermal denaturation process involved in food processing [35].

Consistent with the high percentage of amino acid sequence identity and the HCA plot similarity (result not shown), a homology modelling approach was performed to build an accurate three-dimensional model of the fruit nsLTP. As an example, the three-dimensional model of Pru p 3 built from the X-ray coordinates of Zea m 14 exhibits the classical plant nsLTP fold [36] which consists of four  $\alpha$ -helices  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4, connected by loops (Fig. 2A). The extended C-terminus of the polypeptide chain has no apparent secondary structure. The accuracy of our model building approach was checked by superposing the three-dimensional model to the recently X-ray solved structure of Pru p 3 (PDB code 2ALG). The superposition of the  $\alpha$ -carbons of both 91 residue structures yielded a rmsd of 1.31 Å. Moreover, all the  $\alpha$ -helices were correctly delineated but the main discrepancy concerns the shape of the extended loop connecting  $\alpha$ 1 to  $\alpha$ 2 helices (Fig. 3). Very similar models were accurately built for other fruit nsLTP including Mal d 3 from apple, Pru av 3 from cherry and Pyr c 3 from pear.

Four linear IgE-binding epitopes containing charged residues were predicted to occur along the amino acid sequence of Pru p 3 using both hydrophobic profiles based on different scales of hydrophilicity, flexibility and exposition to the solvent and HCA plots. They correspond to the amino acid sequence stretches 18RGGG21 (epitope #1), 29NGIRNVNN36 (epitope #2), 39RTTPDRQA46 (epitope #2') and 72KCGVHIPYK181 (epitope #3), respectively (Fig. 2C). These predicted linear epitopes correspond to exposed regions of the molecule containing well exposed electropositively charged residues (Fig. 2D,E). Most of these charged residues occur in the surface exposed areas possessing the higher electropositive potentials (Fig. 2F). These sequence stretches nicely match (underlined residues) the three linear epitope sequences 11APCIPYVRGGGAVPP25 (epitope #1), 30GIRNVNNLARTTPDRQ45 (epitope #2) and 70PGKCGVHIPYK80 (epitope #3) previously recognized

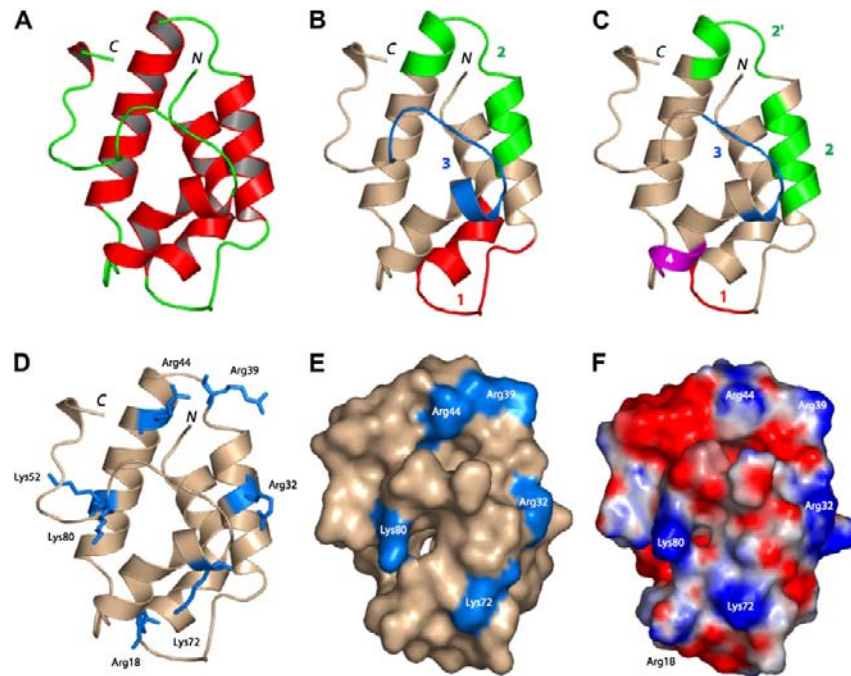


Fig. 2. (A) Ribbon diagram of the modelled Pru p 3 showing the three  $\alpha$ -helices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  (red) connected by turns and loops (green). *N* and *C* correspond to the N- and C-termini of the polypeptide chain, respectively. (B) Location of the characterized IgE-binding epitopes 1 (red), 2 (green) and 3 (blue) on the ribbon diagram of Pru p 3. (C) Location of the predicted IgE-binding epitopes 1 (red), 2' (green), 3 (blue) and 4 (magenta) on the ribbon diagram of Pru p 3. Epitope 4, which does not contain charged residues, was omitted. (D) Exposition of the electropositively charged residues Lys and Arg on the ribbon diagram of Pru p 3. (E) Exposition of electropositively charged residues on the molecular surface of Pru p 3. (F) Mapping of the electrostatic potentials on the molecular surface of Pru p 3. Electropositive and electronegative areas are coloured blue and red, respectively. All the models are similarly oriented. All the cartoons were drawn with PyMOL.

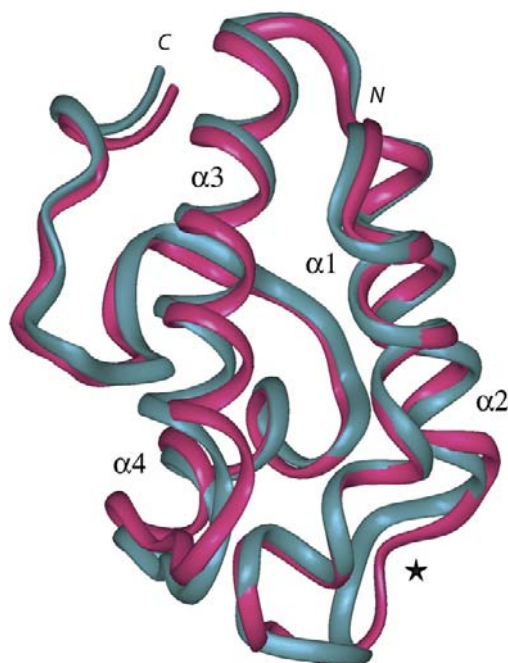


Fig. 3. Ribbon diagram showing the superimposition of the  $\alpha$ -carbon tracings from the X-ray solved Pru p 3 (pink ribbon) and the homology modelled Pru p 3 (blue-green ribbon). *N* and *C* correspond to the N- and C-termini of the polypeptide chain, respectively. The star ( $\star$ ) indicates the extended loop connecting  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  helices were the most important discrepancy between the structure and the model occurs. Molecules are similarly oriented as in Fig. 2.

from the IgE-mapping of Pru p 3 using overlapping synthesized oligopeptides covering the entire amino acid sequence [32] (Fig. 2B). In fact, another amino acid sequence stretch, 61VNPNN65, previously predicted as an IgE-binding epitope according to its hydrophilicity, flexibility and accessibility, and referred as epitope #4 (see Fig. 2C), was further discarded since it does not contain any charged residue. Apparently, this sequence stretch does not correspond to an experimentally defined epitope on the peach LTP.

The four putative IgE-binding epitopes predicted on Pru p 3, which correspond to rather conserved amino acid sequence stretches, were also predicted to occur in other fruit nsLTP. Besides fruit nsLTP, the predicted epitope #2' of Pru p 3, which roughly overlaps the loop connecting  $\alpha 2$  to  $\alpha 3$  helices and the beginning of helix  $\alpha 3$ , was also predicted as a putative B-cell epitope in all other plant nsLTP (Fig. 4). This conserved amino acid sequence stretch exhibits a very similar overall conformation in other modelled nsLTP from Rosaceae fruits including Mal d 3 from apple, Pru ar 3 from apricot or Pru av 3 from cherry (Fig. 5). In this respect, the rmsd measured for pairwise superimposed epitopes, e.g. epitope of Pru p 3 vs. epitope of Mal d 3, gave values  $<0.1$  Å. The calculated accessible surface area gave very similar values of e.g.  $1177$  Å<sup>2</sup> for Mal d 3,  $1190$  Å<sup>2</sup> for Pru ar 3 and  $1136$  Å<sup>2</sup> for Pru p 3. These values indicate, indeed, that the predicted consensus epitope exhibits a similar local structure and occupy a comparable area at the surface of the allergens. In addition, charged

Mal d 3	---ITCGQVTSLLAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRTIINGLAKTTADRQTAACNC-LKMLAGSI-SGVNPNNAAGLPKCGVNVVYKISTSTNCATVK-
Pyr o 3	---ITCGQVTSLLAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRTIINGLAKTTADRQTAACNC-LKMLAGSV-SGVNPNNAAGLPKCGVNVVYKISTSTNCATVK-
Pru p 3	---ITCGQVSSALAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRVNVNLAARTTPDRQAACNC-LKQLSASV-PGVNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCATVK-
almond	---ITCGQVSSALAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRVNVNLAARTTPDRQAACNC-LKQLSASV-PGVNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCATVK-
Pru av 3	---ITCGQVSSALAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRVNVNLAARTTPDRQTAACNC-LKQLSASV-PGVNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCATVK-
Pru ar 3	---ITCGQVSSALAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRVNVNLAARTTPDRQTAACNC-LKQLSASV-PGVNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCATVK-
Pru d 3	---ITCGQVSSALAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRVNVNLAARTTPDRQAACNC-LKQLSASV-PGVNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCATVK-
cabbage	NRALTCGTVNSHVAPCIYITQGG-TLFGACCTGVSKLNSMARTTPDRQAACRC-LETAARALGPLNAGRAAGIIPKACGVSVVPPPISTNTNCNVK-
rape	--ALSQGTVSGYVAPCIYLAQNPALFRACCSGVTSLNLAARTTPDRQAACRC-LVQAANAL-PTINAARAAGLEPKACGVNIYPIKISTSTNCNVK-
arabidopsis	--ATSCGTVAGSLAPCIYVRSYG--LVFPSCCAGVTLNSMARTTPDRQAACRC-IQSTAKSI-SGLNPSLASEGLPKCGVSIYPIKISTSTNCNVK-
hazel nut	--SLTNPQIKGMLTPCVLILKNG--VLFPSCCGVAVNDASRTTSDRQAACNC-LKDTARGI-AGLNPPLAAGLPKCGVNIYPIKISTSTNCNVK-
soya	---ITCGQVSSALAPCIYVRSYG--AVFPACNGIRVNVNLAARTTPDRQAACNC-LKQAAGV-SGLNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCNVK-
chickpea	--AITGRVDLALAPCLVLYQGP-GPSAQCQGVRLNSAARTTPDRQAACNC-LKSAAGSI-SRLNPNNAALPGKCGVNIYPIKISTSTNCATIRV
barley	---LNCQVDSRMKFLVYVQG-GPGPSGECGVRDLNQAQSSGDRQTAACNC-LKGIARGI-HNLNNAASIPSKCNVVPYPISTSTDCSRIV-
wheat	---IDCGHVDLVRPCLVYVQG-GPGPSGECGVRDLNQAQSSGDRQTAACNC-LKGIARGI-HNLNNAASIPSKCNVVPYPISTSTDCSRIV-
maize	--AISCQVSAIAPCIYVRSYG--GPGPSGECGVRDLNQAQSSGDRQTAACNC-LKQAAGV-SGLNPNNAALPGKCGVSIYPIKISTSTDCSRV-
sorghum	--AISCQVSAIAPCIYVRSYG--GPGPSGECGVRDLNQAQSSGDRQTAACNC-LKQAAGV-SGLNPNNAALPGKCGVSIYPIKISTSTDCSRV-
rice	--AISCQVSAIAPCIYVRSYG--GPGPSGECGVRDLNQAQSSGDRQTAACNC-LKQAAGV-SGLNPNNAALPGKCGVSIYPIKISTSTDCSRV-
millet	--AISCQVSAIAPCIYVRSYG--GPGPSGECGVRDLNQAQSSGDRQTAACNC-LKQAAGV-SGLNPNNAALPGKCGVSIYPIKISTSTDCSRV-

Fig. 4. Multiple alignment of plant LTP from different organs (mainly seeds or seedlings). The more or less extended predicted consensual IgE-binding epitope (corresponding to epitope 2' of Pru p 3) is boxed grey. Except for fruit LTP allergens, other plant LTP are labelled by the common names of the corresponding plants.

residues are similarly distributed within this region as shown from the mapping of the electrostatic potentials on the molecular surfaces. Other X-ray or RMN solved nsLTP also exhibit a very conserved overall conformation in this region (result not shown). This both sequentially and conformationally

conserved region of nsLTP most probably represents a consensus B-cell epitope responsible for IgE-binding cross-reactions in sensitized individuals. The consensual character of this epitopic region was further confirmed by ELISA experiments showing that rabbit antibodies raised against the Pru p 3 epitope cross-reacted with Mal d 3. Antibodies raised against the Mal d 3 epitope similarly cross-reacted with Pru p 3. In addition, the synthetic peptides from Pru p 3 (39KTTTPDRQAA) and Mal d 3 (39KTTADRQIA46) both inhibited the Ab-nsLTP interactions (Fig. 6A). Inhibition experiments were similarly performed with IgE-containing sera from allergic patients (Fig. 6B).

4. Discussion

Taking into account the occurrence of electropositively (Arg, Lys) and electronegatively (Asp, Glu) charged residues

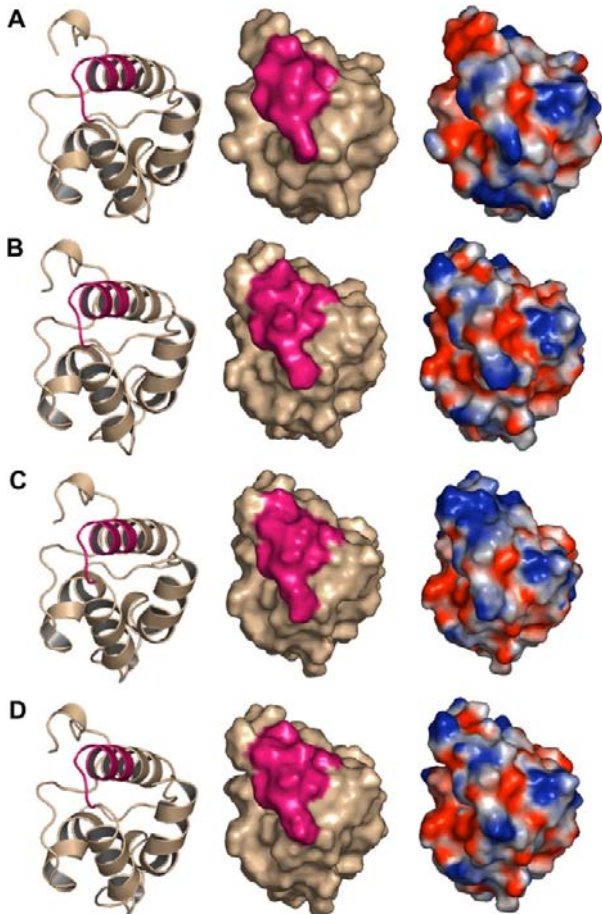


Fig. 5. Ribbon diagram (left), overall conformation of the consensus IgE-binding epitope #3 (middle), and mapping of the electrostatic potentials (left) on the molecular surface of the three-dimensional models of Pru p 3 (A), Pru d 3 (B), Pru ar 3 (C) and Pru av 3 (D). The consensus epitope is coloured pink, and positive and negative electrostatic potentials are coloured blue and red, respectively.

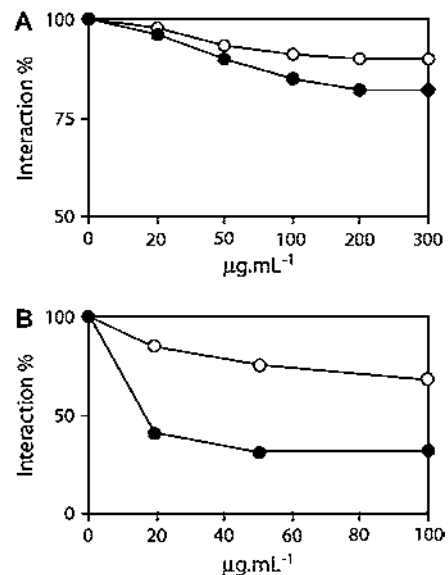


Fig. 6. Inhibition by increasing concentrations (in µg mL<sup>-1</sup>) of the synthetic epitope 39KTTADRQTA47 from Mal d 3 of the interaction of Pru p 3 (C) and Mal d 3 (●) with polyclonal rabbit antibodies raised against the synthetic epitope (A) and an IgE-containing serum from an allergic patient (B). Each value is the mean of two separate ELISA measurements.

in the regions that have been predicted to be the more hydrophilic, flexible and exposed to the solvent, both the hydrophobic profiles and HCA plots allowed a rather accurate prediction of the linear IgE-binding epitopes on the surface of fruit nsLTP. Obviously, the aim of our predictive approach is not to correctly predict all the IgE-binding epitopes but to locate with a fairly good accuracy some of these epitopes on the surface of the allergens. When available, the three-dimensional structure of a closely related protein is of paramount importance to build a three-dimensional model that allows great improvement in the prediction of the exposed charged residues on the molecular surface of the allergens. This is the case for the fruit nsLTP that have been easily modelled from the X-ray coordinates of the maize LTP (RCSB PDB code 1MZL), thus allowing a more

accurate localization of the exposed electronegative and electropositive residues protruding out of the protein surface and the mapping of the electrostatic potentials on the protein surface.

Residues Arg39, Thr40, Arg44, Lys80 and Lys91 of Pru p 3 have been previously predicted as potential IgE recognition sites according to both their surface exposition and electrostatic properties [34]. Except for Lys91, all other residues are included in our predicted linear B-cell epitopes. In agreement with the involvement of residues Arg39, Thr40 and Arg44 in a major IgE-binding determinant of Pru p 3, a substantial 5-fold decrease of the IgE binding activity was reported for the triple mutant Arg39Ala/Thr40Ala/Arg44Ala of recombinant Pru p 3. These residues are located in the short

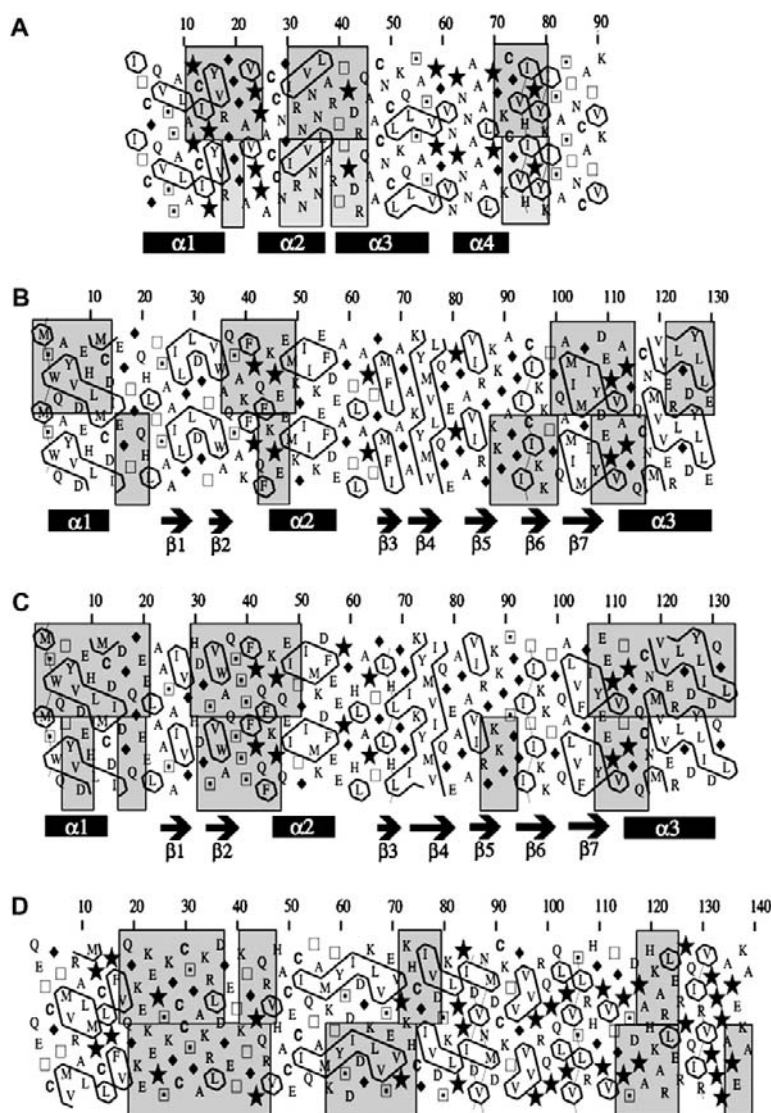


Fig. 7. HCA plots of Pru p 3 (peach LTP) (A), Hel t 2 (profilin from *Helianthus tuberosus*) (B), Bet v 2 (profilin from *Beta vulgaris*) (C) and Pari j 1 (long LTP from *Parietaria judifera*) (D), showing the delineation of experimentally characterized (upper grey boxes) or predicted (lower grey boxes) linear IgE-binding epitopes. When available, the X-ray- or NMR-assigned  $\beta$ -sheet ( $\beta$ ) and  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ ) secondary structural features are indicated. Clusters of hydrophobic residues (L, I, M, V, F, Y, W) are circled in black and special symbols are used for Gly ( $\blacklozenge$ ), Ser ( $\square$ ), Thr (E), Pro ( $\star$ ) and Cys (C).



loop (Arg39, Thr40) connecting the  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  helices and at the beginning of helix  $\alpha 3$  (Arg 44). They are fully conserved in other fruit LTP (see Fig. 1) but also occur in most of the plant nsLTP of different origins. Interestingly, the well-characterized linear B-cell epitope #3 that contains the three Arg, Thr and Arg residues is systematically predicted as a putative IgE-binding region in all other nsLTP. It could thus correspond to a consensus epitope perhaps responsible for the IgE-binding cross-reactivity commonly observed among the plant nsLTP [13,37]. In this respect, our predictive approach can be of valuable help for the identification of consensual IgE-binding epitopes in conserved families of protein allergens.

Although our predictive approach allowed to rather accurately predict the location of linear IgE-binding epitopes along the amino acid sequence of plant nsLTP, some discrepancies were observed when applied to other plant allergens including other longer nsLTP (Par j 1 from *Parietaria judaica*) or profilins (Hel t 2 from *Helianthus tuberosus* and Bet v 2 from *Betula verrucosa*) (Fig. 7). Obviously, most of the experimentally characterized IgE-binding epitopes of Bet v 2 [38] and Par j 1 [39] were correctly predicted whereas the prediction is less reliable for Hel t 2 [40], even though a seven-residue epitopic region predicted near position 90 of Bet v 2 sequence received no experimental evidence. Although the profilins Hel t 2 and Bet v 2 share very similar three-dimensional conformations as checked from their HCA plots, both their experimentally characterized or predicted linear IgE-binding epitopes are rather different. A few amino acid changes occurring along the amino acid sequences of the allergens are apparently responsible for these discrepancies.

When applied to allergens of longer amino acid sequences, e.g. to the major allergen Ara h 1 of peanut (*Arachis hypogaea*), our predictive approach failed to correctly predict the nine linear IgE-binding epitopes previously characterized along the N-terminus of the protein [41]. Almost the entire N-terminal end of the allergen was thus incorrectly predicted as a single epitope. Due to the widespread distribution of hydrophilic and charged residues along this sequence stretch, our combination of predictive tools was unable to discriminate among the nine discrete IgE-binding epitopes that have been previously shown to occur in this protein region. In addition, no structural information is available on this N-terminal region that prevents to check the exposition of the predicted regions on the protein surface. More consistent results were obtained with the C-terminal region of known structure where most of the remaining characterized B-epitopes were correctly predicted [42]. However, a remark has to be made on the accuracy of delineating linear IgE-binding epitopes from IgE-mapping experiments since over the 23 characterized epitopes of Ara h 1 a few of them, e.g. epitopes #17 (RRYTARLKEG) and #18 (ELHLLGFGIN), are poorly exposed on the surface of the modelled monomer (result not shown). Most probably, a very few residues of such amino acid sequence stretches are sufficiently exposed to actually participate in IgE-binding epitopes while the remainder are too buried to be accessible to the IgE antibodies. In this respect, checking the exposure and conformation of the IgE-binding epitopes on the molecular

surface of the allergens appears as an indispensable step to confirm the epitopic character of an amino acid sequence stretch. In addition, surface analysis of the allergens is of great value to recognize more complex conformational epitopes resulting from the coalescence of several discrete linear IgE-binding epitopes on the molecular surface.

## Acknowledgements

The financial support of CNRS is gratefully acknowledged.

## References

- [1] S. Fraga. Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Can. J. Chem.* 60 (1982) 2606–2610.
- [2] B.A. Jameson, H. Wolf. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4 (1988) 181–186.
- [3] J.L. Pellequer, E. Westhof, M.H. Van Regenmortel. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Methods. Enzymol.* 203 (1991) 176–201.
- [4] J.L. Pellequer, E. Westhof, M.H. Van Regenmortel. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunol. Lett.* 36 (1993) 83–99.
- [5] J.M. Thornton, M.S. Edwards, W.R. Taylor, D.J. Barlow. Location of continuous antigenic determinants in the protruding regions of proteins. *EMBO J.* 5 (1986) 409–413.
- [6] M.J. Blythe, D.R. Flower. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. *Protein Sci.* 14 (2005) 246–248.
- [7] M.H. Van Regenmortel, J.L. Pellequer. Predicting antigenic determinants in proteins: looking for unidimensional solutions to a three-dimensional problem. *Pept. Res.* 7 (1994) 224–228.
- [8] D.R. Flower. Towards *in silico* prediction of immunogenic epitopes. *Trends Immunol.* 24 (2003) 667–674.
- [9] T. Midoro-Horiuti, E.G. Brooks, R.M. Goldblum. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 87 (2001) 261–271.
- [10] H. Breiteneder, C. Radauer. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 821–830.
- [11] R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, D. Barber, G. Sacedo. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 514–519.
- [12] E.A. Pastorello, C. Pompei, V. Pravettoni, O. Brenna, L. Farioli, C. Trambaioli, A. Conti. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy* 56 (2001) 45–47.
- [13] R. van Ree. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 910–913.
- [14] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 15 (1997) 4876–4882.
- [15] P. Gouet, E. Courcelle, D.J. Stuart, F. Metz, ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15 (1999) 305–308.
- [16] C. Gaboriaud, V. Bissery, T. Benchetrit, J.P. Morion. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* 224 (1987) 149–155.
- [17] D.H. Shin, J.Y. Lee, K.Y. Hwang, K.K. Kim, S.W. Suh. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* 3 (1995) 189–199.
- [18] J.-L. Risler, M.O. Delorme, H. Delacroix, A. Henaut. Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new efficient scoring matrix. *J. Mol. Biol.* 204 (1998) 1019–1029.

- [19] J.W. Ponder, F.M. Richards, Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 775–791.
- [20] M.T. Mas, K.C. Smith, D.L. Yarnush, K. Aisaka, R.M. Fine, Modeling the anti-CEA antibody combining site by homology and conformational search, *Proteins Struct. Func. Genet.* 14 (1992) 483–498.
- [21] Roussel, A., Cambillau, C., in: Turbo-Frodo, Silicon Graphics Geometry Partners Directory, Silicon Graphics, Mountain View, CA.
- [22] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemistry of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [23] F. Melo, E. Feytmans, Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy, *J. Mol. Biol.* 277 (1998) 1141–1152.
- [24] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins Struct. Func. Genet.* 11 (1991) 281–296.
- [25] M.K. Gilson, B.H. Honig, Calculation of electrostatic potential in an enzyme active site, *Nature* 330 (1987) 84–86.
- [26] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132.
- [27] P.A. Karplus, G.E. Schulz, Prediction of chain flexibility in proteins, *Naturwissenschaften* 72 (1985) 212–213.
- [28] B. Lee, F.M. Richards, The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379–400.
- [29] T.P. Hopp, K.R. Woods, Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3824–3828.
- [30] G. Garcia-Casado, L.F. Pacios, A. Diaz-Perales, R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, F. Polo, D. Barber, G. Salcedo, Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) 599–605.
- [31] C. Tastet, P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer, T. Rabilloud, A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins, *Electrophoresis* 24 (2003) 1787–1794.
- [32] A. Shevchenko, Wilm, M. Wilm, O. Vorm, O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, G. Neubauer, A. Shevchenko, P. Mortensen, M. Mann, A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (1996) 893–896.
- [33] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1987) 76–85.
- [34] R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S.C. de Vries, M.F. Gautier, C.L. Ciurana, E. Berbeck, T. Mohammadi, V. Knul-Bretlova, J.H. Akkerdaas, I. Bulder, R.C. Aalberse, R. van Ree, Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124 (2001) 67–69.
- [35] S. Scheurer, I. Lauer, K. Foetisch, M.S. Moncin, M. Retzek, C. Hartz, E. Enrique, J. Lidholm, A. Cistero-Bahima, S. Vieths, Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 900–907.
- [36] E. Ginecl, J.P. Simorre, A. Caille, D. Marion, M. Ptak, F. Vovelle, Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 413–422.
- [37] E.A. Pastorello, F.P. D'Ambrosio, V. Pravettoni, L. Farioli, G. Giuffrida, M. Monza, R. Ansaloni, D. Fortunato, E. Scibola, F. Rivolta, C. Incorvaia, A. Bengtsson, A. Conti, C. Ortolani, Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000) 371–377.
- [38] J.A. Asturias, N. Gómez-Bayón, J.L. Esequerri, A. Martínez, Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes, *Clin. Exp. Allergy* 33 (2003) 518–524.
- [39] J.A. Asturias, N. Gómez-Bayón, M.C. Arilla, L. Sánchez-Pulido, A. Valencia, A. Martínez, Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies, *Int. Immunol.* 14 (2002) 993–1001.
- [40] A.A. Fedorov, T. Ball, N.M. Mahoney, R. Valenta, S.C. Almo, The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin, *Structure* 5 (1997) 33–45.
- [41] D.S. Shin, C.M. Compadre, S.J. Maleki, R.A. Kopper, H. Sampson, S.K. Huang, A.W. Burks, G.A. Bannon, Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13753–13759.
- [42] A. Barre, J.-P. Borges, P. Rougé, Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity, *Biochimie* 87 (2005) 499–506.

## **Partie 2**

# **Etude de la carte épitopique des LTP de fruits et clonage de Mal d 3**

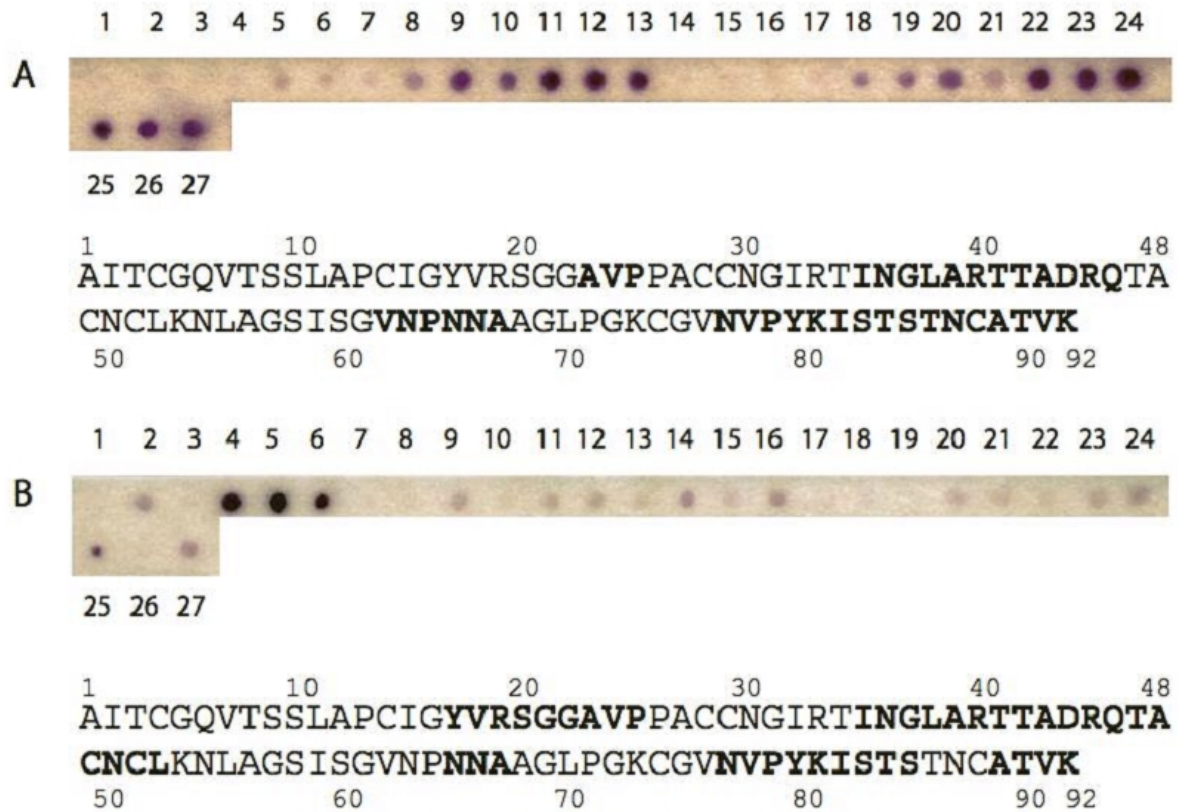


Figure 26: Cartes épitopiques de Mal d 3

A: partie supérieure, peptides interagissant avec les IgG anti-Mal d 3 (spots foncés) révélés sur la membrane Spot et, partie inférieure, localisation des régions réactives sur la séquence de Mal d 3 (acides aminés en gras).

B: partie supérieure, peptides interagissant avec les IgE de patients (spots foncés) révélés sur la membrane Spot et, partie inférieure, localisation des régions réactives sur la séquences de Mal d 3 (acides aminés en gras).



Figure 27: Epitopes de LTP de fruits liant les IgG et les IgE

Comparaison des épitopes liant les IgG (ligne supérieure) et les épitopes liant les IgE (ligne inférieure) caractérisés avec la technique Spot. Les séquences correspondent à Mal d 3 (A,B), Pru p 3 (C,D), Pru d 3 (E,F) et Pru ar 3 (G,H). Les épitopes sont indiqués par des lettres blanches sur fond noir.

## **Partie 2: Etude de la carte épitopique des LTP de fruits et clonage de Mal d 3**

### **2.1 - Cartographie des épitopes par la technologie Spot**

#### **2.1.1 - Utilisation de sérums de Lapins immunisés avec les LTP**

L'utilisation d'IgG polyclonales de Lapin anti-Mal d 3 a permis de mettre en évidence quatre séquences d'acides aminés de Mal d 3 interagissant avec ces anticorps (fig. 26A). Ces épitopes, répartis sur l'ensemble de la séquence de l'allergène, correspondent aux séquences <sup>22</sup>AVP<sup>24</sup> (épitope #1), <sup>35</sup>INGLARTTADRQ<sup>46</sup> (épitope #2), <sup>62</sup>VNPNNNA<sup>67</sup> (épitope #3) et <sup>77</sup>NVPYKISTSTNCATVK<sup>92</sup> (épitope #4). Excepté pour l'épitope 3, tous contiennent des acides aminés électropositifs (Arg et Lys). L'ensemble des épitopes caractérisés couvrent une large zone de la surface accessible (2550Å<sup>2</sup>), représentant environ 50% de la totalité de la surface de Mal d 3 (5108Å<sup>2</sup>). Les autres cartes épitopiques réalisées pour d'autres LTP de fruits (Pru p 3 de la Pêche, Pru d 3 de la Prune et Pru ar 3 de l'Abricot) ont permis de mettre en évidence les mêmes zones épitopiques, correspondant également à environ 50% de la surface accessible totale.

#### **2.1.2 - Utilisation de sérums de patients allergiques aux LTP (allergie IgE-dépendante)**

Les cartes épitopiques réalisées avec un pool d'IgE de patients sensibilisés aux fruits de Rosaceae ont permis de caractériser, à quelques rares différences de longueur près, les quatre mêmes zones de la surface des allergènes (fig. 26B). Les différences observées avec la révélation effectuée à l'aide d'IgG de Lapin concernent essentiellement la longueur des épitopes et leur réactivité vis-à-vis des différents anticorps (IgG et IgE). Ainsi, comme le montre la figure 26, l'épitope #1 de Mal d 3 (<sup>16</sup>YVRS GGAVP<sup>24</sup>) réagit très fortement avec les IgE humaines, alors que le même épitope (<sup>22</sup>AVP<sup>24</sup>) réagit beaucoup moins avec les IgG de Lapin. Inversement, l'épitope #2 (<sup>35</sup>INGLARTTADRQ<sup>46</sup>) interagit fortement avec les IgG polyclonales de Lapin alors qu'une séquence plus longue <sup>35</sup>INGLARTTADRQTACNCL<sup>52</sup> mais localisée dans la même région n'interagit que plus faiblement avec les IgE de patients. Au total, ce sont pratiquement les mêmes régions qui interagissent avec les IgE et avec les IgG pour l'ensemble des LTP de fruits étudiées (fig. 27). Les épitopes interagissant avec les IgE recouvrent une surface accessible de 2700Å<sup>2</sup>, qui

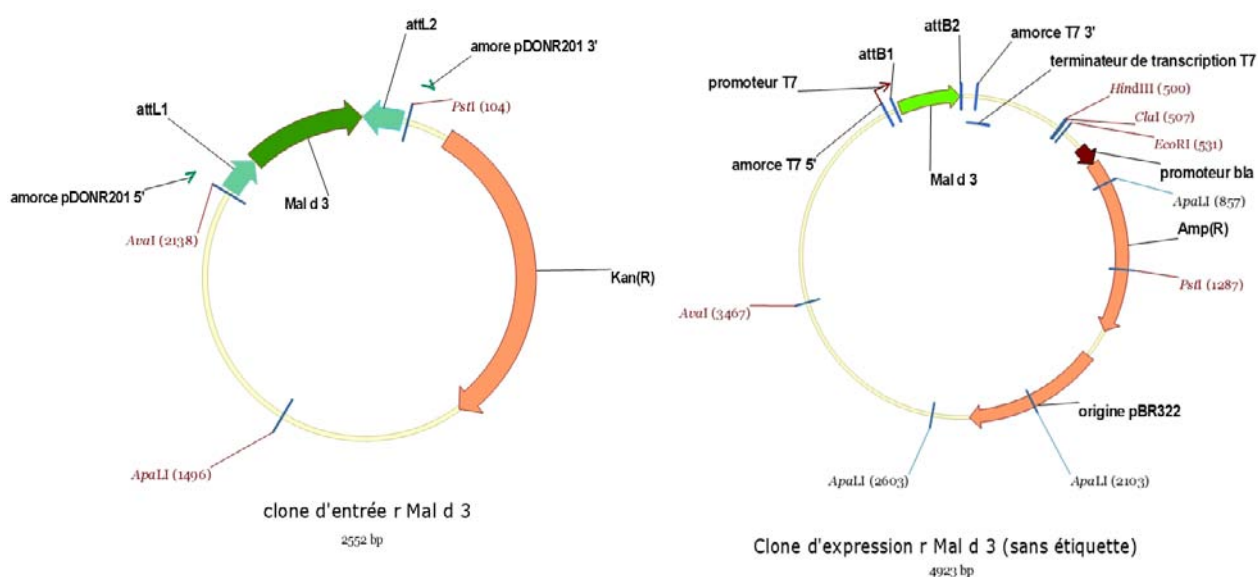
correspond à 53% de la surface de Mal d 3. A quelques exceptions près, ils correspondent essentiellement à des régions où prédominent les charges électropositives (dues aux acides aminés basiques Arg et Lys fortement exposés).

Un des résultats les plus intéressants obtenu avec cette étude concerne la disposition des surfaces exposées correspondant aux épitopes révélés le long de la séquence primaire. Ainsi, pour Mal d 3, les épitopes #1 et #3 se retrouvent très proches à la surface de la protéine modélisée et sont ainsi susceptibles de créer une région épitopique plus étendue potentiellement impliquée dans des interactions fortes et spécifiques avec les IgE. Cette zone, qui recouvre 38% de la surface totale de Mal d 3, n'aurait pas pu être identifiée à partir de la délimitation des épitopes le long de la séquence primaire. Une autre zone de coalescence a également été identifiée entre les épitopes #2 et #4.

## 2.2 - Clonage de la LTP de pomme (rMal d 3)

### 2.2.1 - Clonage utilisant la technologie Gateway™

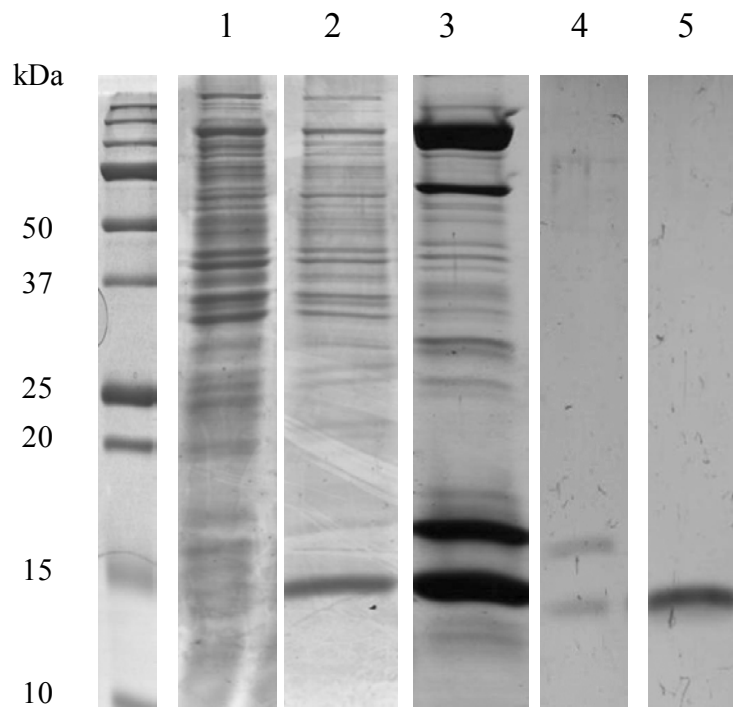
L'expression de la LTP de Pomme recombinante (rMal d 3) a été réalisée en utilisant la technologie Gateway™. Les différents clones obtenus (clone « d'entrée » et clone « d'expression ») ont permis un clonage rapide de la LTP de Pomme (fig. 28).



**Figure 28: Représentation des différents clones obtenus par la technologie Gateway**

La première recombinaison entre le gène et le vecteur donneur permet d'obtenir le vecteur d'entrée. La deuxième recombinaison entre le vecteur d'entrée et un vecteur de destination permet d'obtenir le vecteur d'expression.

Les différents modes de sélection sur boîtes de Pétri nous ont permis de sélectionner 10 clones positifs aux différents tests pour, après séquençage complet du gène d'intérêt, récupérer 3 clones de Mal d 3 non mutés dans la partie codante. Ainsi, la transformation de bactéries *E.coli* BL21-DE3 a pu être réalisée. Ces bactéries permettent la surexpression de la T7 RNA-polymérase sous le contrôle du promoteur Lac. L'ajout d'IPTG permet ainsi la surexpression du gène de Mal d 3, placé sous le contrôle du promoteur T7 (promoteur fort). Les différentes étapes de production, surexpression et purification sont résumées sur la figure 29. Le taux de production chez *E. coli* est relativement modeste (3 mg de protéine pure par litre de milieu Luria-Broth). Néanmoins, la majorité de la protéine est produite sous forme soluble. Ceci permet d'obtenir une protéine parfaitement repliée, ce qui ne serait pas le cas si la protéine se retrouvait majoritairement dans les corps d'inclusion qui exigerait une étape de solubilisation et de renaturation au résultat souvent incertain. Plusieurs tests de production ont été réalisés, à des températures différentes (28°C et 37°C) et à des temps d'induction à l'IPTG différents (de 2 à 12 heures). Le meilleur rapport « rMal d 3 soluble / protéines totales » a été obtenu pour 3 heures 30 d'induction à 37°C en présence de 2mM d'IPTG.



**Figure 29: Expression et purification de r Mal d 3 chez *E. coli***

La purification de la protéine recombinante surexprimée dans *E. coli* permet, en quelques étapes, d'obtenir une protéine purifiée.

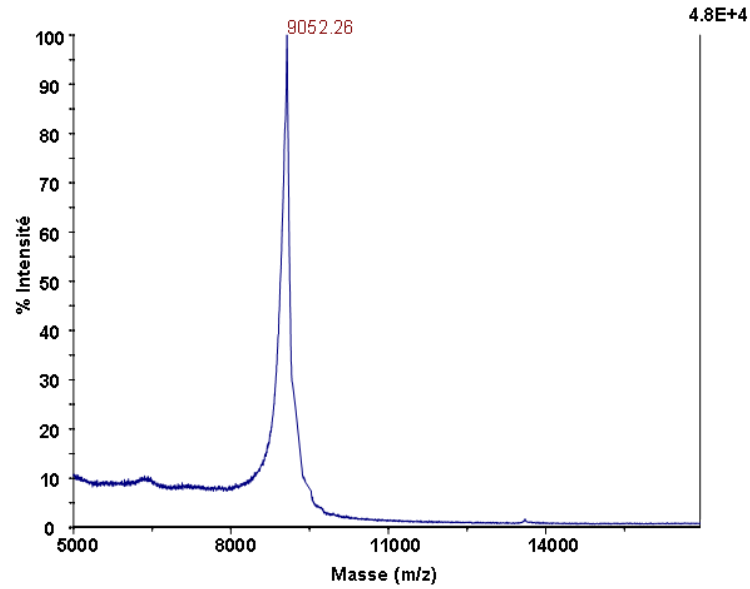
piste 1: culot de bactéries non induites

piste 2: lysat bactérien induit

piste 3: purification après un premier passage sur colonne échangeuse de cations

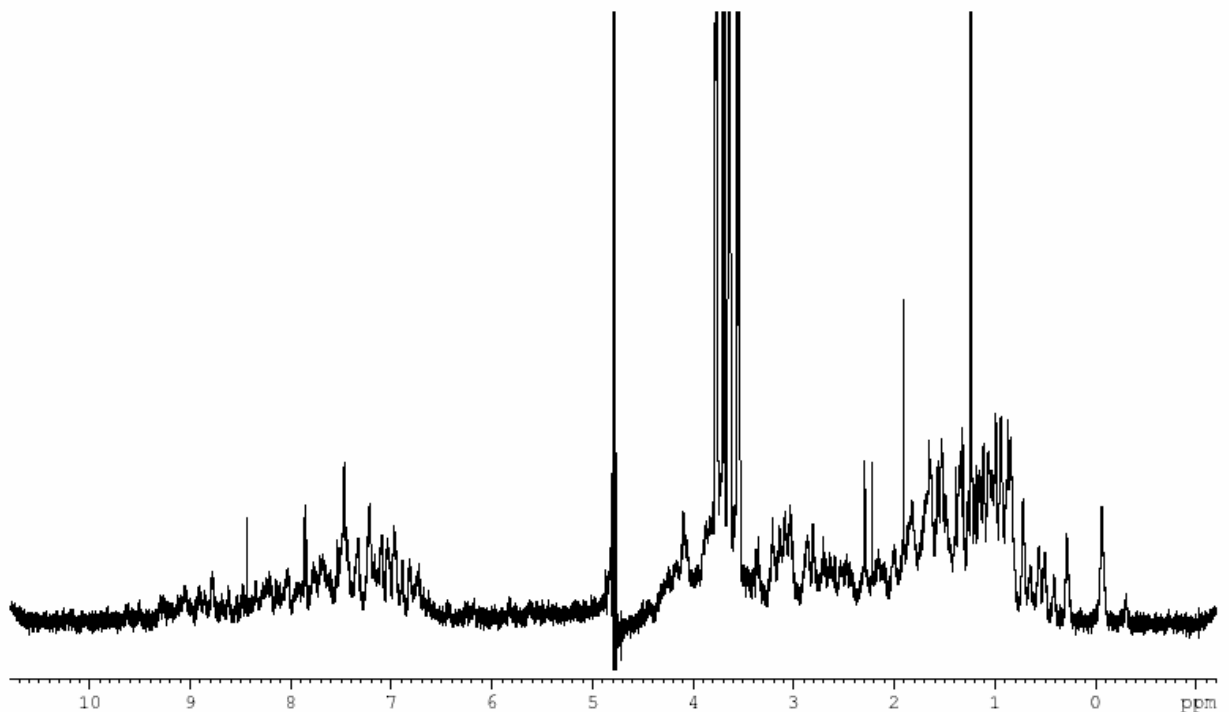
piste 4: purification après un deuxième passage sur colonne échangeuse de cations

piste 5: purification après centrifugation sur Amicon (seuil de coupure 30kDa)



**Figure 30: Caractérisation de la masse de r Mal d 3 par spectrométrie de masse**

La masse déterminée (9052.26 Da) correspond à la masse attendue pour Mal d 3 mature (n Mal d 3: 9049 Da).



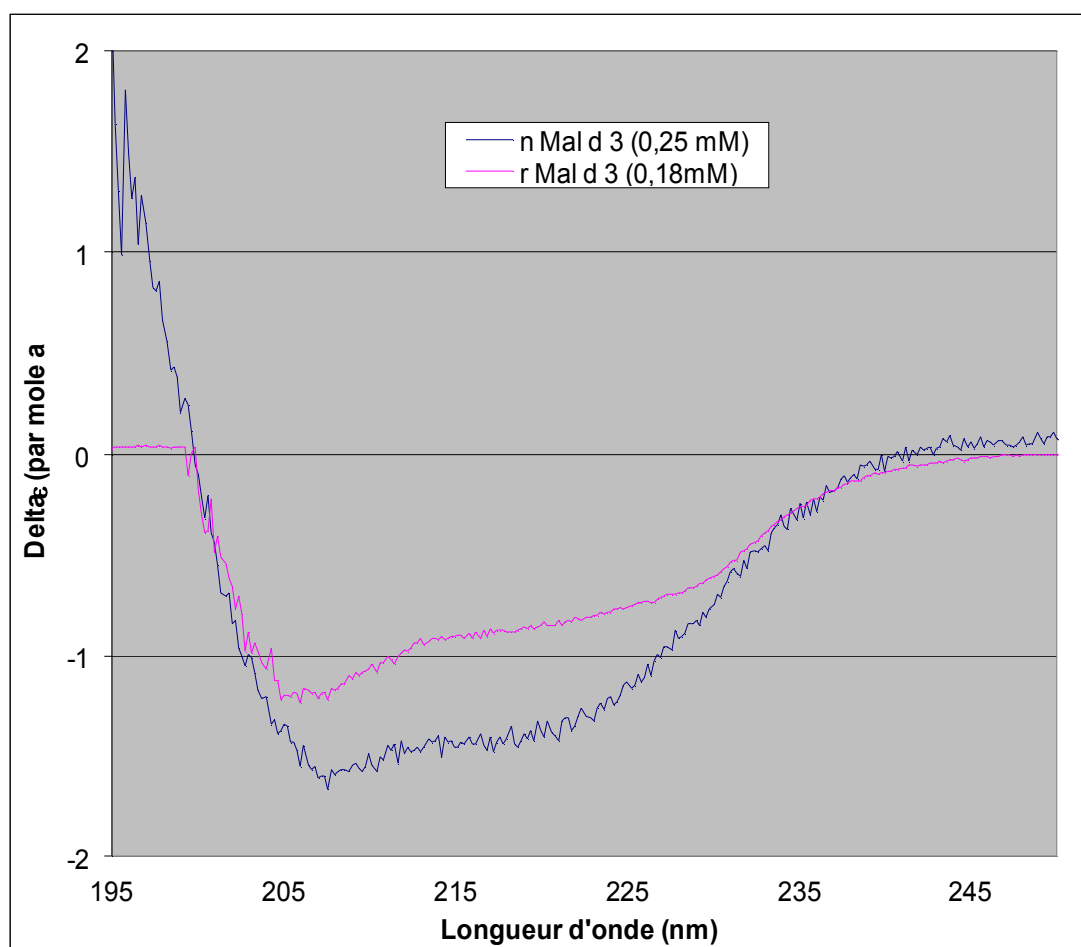
**Figure 31: Spectre  $^1\text{H}$  RMN homonucléaire de r Mal d 3**

L'étalement des signaux de 6 à 9 ppm suggère que la protéine recombinante est correctement repliée et non dénaturée.



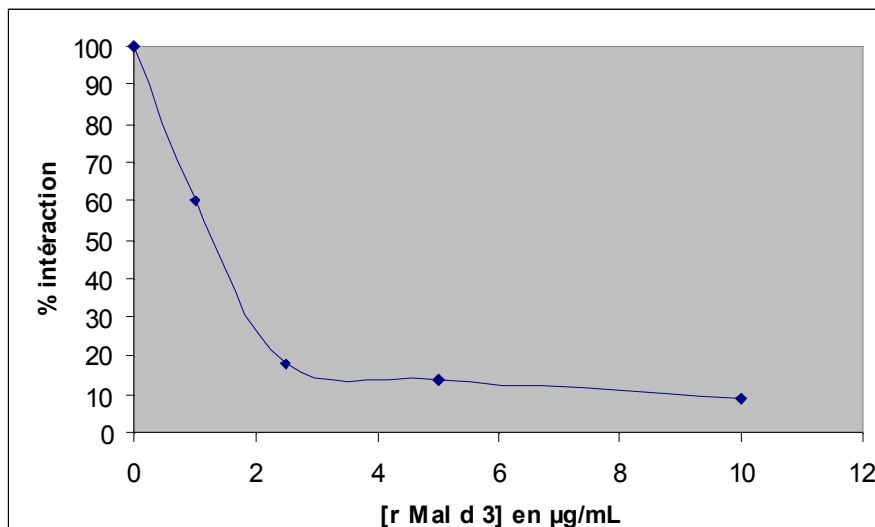
### 2.2.2 - Caractérisation structurale et immunologique

La pureté de rMal d 3 a été vérifiée par spectrométrie de masse Maldi-Tof (fig. 30). La masse trouvée (9052Da) correspond à la masse attendue pour Mal d 3 mature (nMal d 3: 9049Da). Les premiers tests en RMN homonucléaire proton, réalisés en collaboration avec la plate-forme RMN de l'IPBS de Toulouse (collaboration avec le Pr. Alain Milon et le Dr. Olivier Saurel), ont permis de montrer que la protéine recombinante était repliée (fig. 31). En raison de la faible solubilité de l'allergène recombinant rMal d 3 à forte concentration, les essais de détermination structurale n'ont malheureusement pas pu être menés à terme et la structure de la LTP de Pomme n'a pas pu être obtenue par cette technique. Malgré tout, des spectres de dichroïsme circulaire (CD) ont démontré une structuration correcte de la protéine recombinante. Ainsi, les spectres CD de nMal d 3 et de rMal d 3 se superposent parfaitement (fig. 32). L'analyse des spectres obtenus avec nMal d 3 et rMal d 3 indique une prédominance d'hélices  $\alpha$ , ce qui est une des caractéristiques structurales majeures des LTP.



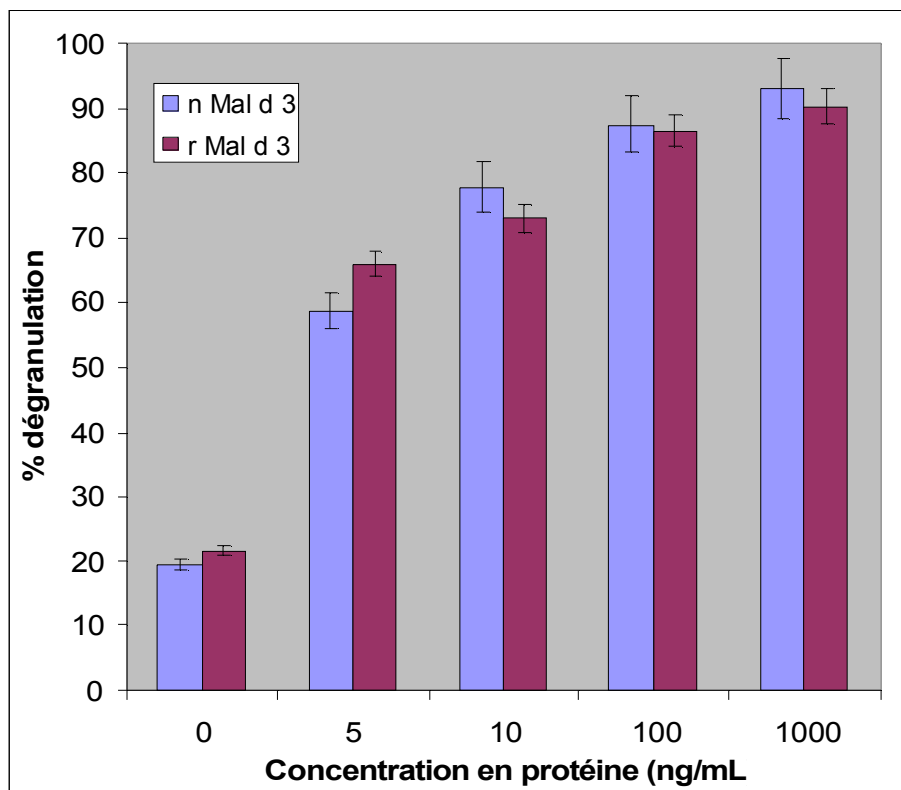
**Figure 32: Spectres de dichroïsme circulaire de n Mal d 3 et de r Mal d 3**

La superposition des deux spectres montre une composition identique en hélices  $\alpha$  des deux formes (native et recombinante) de la protéine. Dans les zones où prédominent les informations structurales importantes (205 à 225nm), les deux courbes présentent un tracé similaire.



**Figure 33: Inhibition de l'interaction IgE – Mal d 3 mesurée en ELISA**

La pré-incubation des IgE de patients avec la forme recombinante de Mal d 3 (r Mal d 3) permet d'inhiber l'interaction entre ces IgE de patients allergiques et la forme naturelle (n Mal d 3) de Mal d 3. La réactivité immunologique des 2 formes de Mal d 3 est donc tout à fait comparable.



**Figure 34: Tests de relargage d'histamine de basophiles de rat**

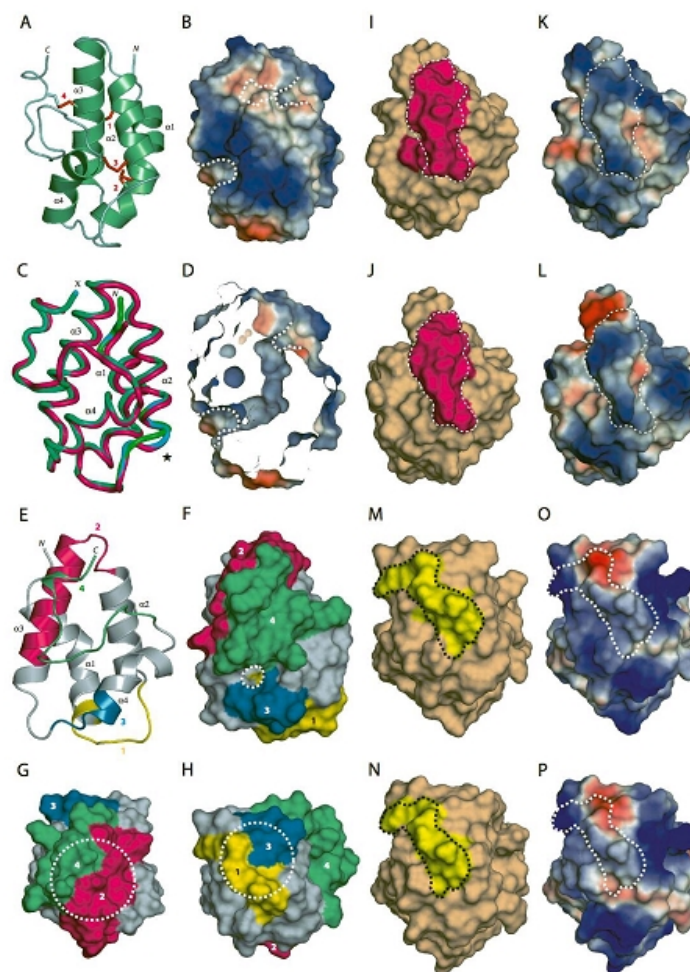
La dégranulation des cellules RBL-2H3 par les formes naturelle (n Mal d 3) et recombinante (r Mal d 3) de Mal d 3 s'avère comparable. r Mal d 3 a apparemment les mêmes propriétés allergiques que n Mal d 3.

Des immuno-empreintes réalisées avec des sérums de patients allergiques ont permis de démontrer l'interaction de l'allergène recombinant avec les IgE de patients. Cette réactivité a été également démontrée à l'aide des tests d'inhibition ELISA (fig. 33). A partir de 2µg/mL de rMal d 3 pré-incubée avec les IgE, l'interaction de nMal d 3 avec les IgE est presque totalement abolie. Cette inhibition quasi complète démontre bien l'existence à la surface de la protéine recombinante, des mêmes épitopes que ceux présents à la surface de l'allergène natif. Des expériences de relargage d'histamine ont été réalisées sur des cellules basophiles de rat (RBL-2H3) transfectées de façon stable avec le fragment liant les IgE du récepteur humain de haute affinité FcεRI. Ces cellules sont actuellement très utilisées pour déterminer l'allergénicité des protéines. Les expériences, réalisées en parallèle avec la forme naturelle nMal d 3 et la forme recombinante rMal d 3, sont présentées dans la figure 34. Les résultats démontrent le caractère allergénique très semblable des deux formes de LTP. Ainsi, le pourcentage de dégranulation des basophiles croît avec la quantité d'allergène testé. Dès la concentration de 1µg/mL d'allergène natif ou recombinant, la dégranulation est presque totale (~90% de dégranulation).

### 2.3 - Discussion

Les deux types d'approches utilisant la technique Spot avec les IgE de patients et les IgG polyclonales de Lapin anti-Mal d 3 nous ont permis d'identifier quatre épitopes à la surface des LTP de fruits. La plupart de ces épitopes contiennent des acides aminés chargés positivement (Arg et Lys) et, dans une moindre mesure, des acides aminés chargés négativement (Asp et Glu). Les acides aminés électropositifs sont particulièrement exposés à la surface des allergènes, créant des régions de potentiel électropositif qui coïncident avec l'emplacement des épitopes. Les épitopes caractérisés avec la technologie Spot correspondent, à quelques légères différences près, aux épitopes caractérisés précédemment (García-Casado et al., 2003) ou prédits (Borges et al., 2007) pour la LTP de Pêche Pru p 3. Les différences observées, notamment au niveau des épitopes 3 et 4, sont probablement dues à la taille différente des peptides synthétisés (pentadécapeptides au lieu de décapeptides) greffés sur la membrane de cellulose que nous avons utilisée et à la différence d'immunoréactivité des sérums de patients utilisés. Des expériences réalisées avec des peptides mutés de façon aléatoire devraient permettre de caractériser encore plus finement les acides aminés immunodominants plus particulièrement impliqués dans l'interaction avec les IgE.

Comme nous l'avons montré dans la première partie des résultats pour Pru p 3 et Mal d 3 à partir de dosages ELISA utilisant des peptides synthétiques comme inhibiteurs de l'interaction allergène-IgE (Borges et al., 2007), l'épitope #2 correspond à un épitope consensus très conservé



**Figure 35: Caractérisation des épitopes de Mal d 3**

A: diagramme en ruban du modèle de Mal d 3.

B: carte des potentiels électrostatiques de surface (orientation différente). Les zones électropositives sont figurées en bleu, les zones électronégatives en rouge.

C: superposition de Mal d 3 (vert), Pru p 3 (rose) et Pru ar 3 (bleu-pâle).

D: Coupe montrant le tunnel hydrophobe liant les lipides (ses deux extrémités sont indiquées par des lignes blanches pointillé).

E,F: localisation des épitopes liant les IgE (#1 en jaune, #2 en rose, #3 en bleu et #4 en vert) sur la représentation en ruban (E) et sur la surface moléculaire de Mal d 3 (F). Une des ouvertures du tunnel est indiquée par une ligne blanche pointillé.

G: Coalescence (cercle blanc) des épitopes #2-#4 et #1-#3 liant les IgE susceptibles de former une zone d'interaction plus importante.

I,J,K,L: Conformation de l'épitope consensus #2 (rose) liant les IgE, caractérisé sur les surfaces moléculaires de Mal d 3 (I,K) et Pru p 3 (J,L).

M,N,O,P: Conformation de l'épitope consensus #1 (jaune) liant les IgE, caractérisé sur les surfaces moléculaires de Mal d 3 (M,O) et Pru p 3 (N,P).

chez les LTP de Rosaceae. Sa séquence et sa structure tridimensionnelle, sont très similaires dans toutes les LTP étudiées (fig. 35I,J,K,L). Ces résultats suggèrent que cet épitope intervient de façon prépondérante dans les réactions croisées entre différents fruits de Rosaceae observées chez des patients sensibilisés. De même, l'épitope #1 (<sup>16</sup>YVRSGGAVP<sup>24</sup> pour Mal d 3), très conservé dans les LTP de Rosaceae, présente une conformation très similaire chez toutes les LTP étudiées (fig. 35M,N,O,P) et correspond très vraisemblablement à un autre épitope consensus. Ainsi, ce sont les peptides synthétiques correspondant à l'épitope #1 qui fournissent le signal le plus intense dans l'interaction avec les IgE de patients (fig. 26B). La caractérisation des épitopes consensus et des réactions croisées qu'ils induisent doit cependant être confrontée aux observations cliniques afin de préciser leur signification clinique. D'autres facteurs multiples, comme le polymorphisme des récepteurs aux IgE ou la balance entre cellules T régulatrices, doivent également être pris en considération (Bousquet et al., 2006). Ils expliquent l'absence de signification clinique de certaines réactions croisées pourtant parfaitement objectivée par des tests ou des dosages effectués *in vitro*.

Néanmoins, la visualisation des séquences correspondant aux épitopes caractérisés sur la surface des allergènes permet de mettre en évidence des régions plus étendues impliquées dans l'interaction avec les IgE de patients. Ainsi, certains épitopes sont très proches dans l'espace et leur juxtaposition peut créer des épitopes de surface plus importante. Les LTP diffèrent ici d'autres allergènes précédemment étudiés, comme les vicillines de fruits à coques. Ces allergènes présentent des épitopes continus moins longs mais plus nombreux à leur surface (Barre et al., 2005a). A la surface de ces allergènes, les zones où plusieurs épitopes continus se juxtaposent pour créer des épitopes plus étendus sont beaucoup plus rares. La surface occupée par les épitopes continus sur les modèles tridimensionnels revêt donc une grande importance pour définir les régions les plus susceptibles d'être impliquées dans les réactions allergiques. Cette analyse de surface des allergènes peut également permettre de mieux comprendre les réactions croisées entre allergènes d'une même famille de protéines ou de familles de protéines différentes.

La production d'un allergène recombinant constitue actuellement une étape souvent incontournable à la fois dans l'étude des propriétés moléculaires des allergènes et dans l'utilisation des allergènes à des fins thérapeutiques (Ballmer-Weber et al., 2007; Valenta, 2002; Valenta and Niederberger, 2007). Ainsi, en mutant spécifiquement certains des acides aminés identifiés comme immunodominants par des expériences Spot, on peut envisager de produire des hypoallergènes recombinants chez *E. coli*. Ces allergènes modifiés pourraient être utilisés à la place d'allergènes natifs ou d'allergènes recombinants non modifiés dans des protocoles de désensibilisation de patients allergiques. Des approches comparables, basées sur des modifications induites par

mutagénèse aléatoire (DNA-Shuffling), sont menées actuellement et rencontrent un certain succès (Wallner et al., 2007). Elles permettent en théorie d'obtenir des allergènes dont on a supprimé la réactivité B mais qui conservent leurs épitopes T. Néanmoins, un contrôle rigoureux de la perte d'allergénicité de la protéine recombinante modifiée ainsi produite doit toujours être réalisé à l'aide de méthodes immunologiques appropriées (tests d'inhibition de dosages ELISA, tests de dégranulation de basophiles, prick-tests ou tests de provocation orale, etc) avant de pouvoir envisager leur utilisation en clinique. De même, la structuration tertiaire de la forme recombinante modifiée doit être analysée et comparée aux données existantes pour la forme naturelle afin de s'assurer de son repliement correct. Ce n'est qu'après avoir subi tous ces tests avec succès que ces allergènes recombinants modifiés ou non pourront être utilisés dans des protocoles de diagnostic d'allergie ou de désensibilisation des patients allergiques.

#### 2.4 – Article

« Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity » (2008)

Jean-Philippe Borges, Annick Barre, Raphaël Culerrier, Claude Granier, Alain Didier and Pierre Rougé. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365; 685-690

#### 2.5 – Article

« The lipid transfer protein allergen of apple (Mal d 3) is expressed as a correctly folded and functional recombinant protein in *E. coli*. » (2008)

Jean-Philippe Borges, Raphaël Culerrier, Didier Aldon, Annick Barre, Hervé Benoist, Alain Didier, Pierre Rougé (soumis).



## Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity

Jean-Philippe Borges<sup>a</sup>, Annick Barre<sup>a</sup>, Raphaël Culerrier<sup>a</sup>,  
Claude Granier<sup>b</sup>, Alain Didier<sup>c</sup>, Pierre Rougé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, UMR Université Paul Sabatier-CNRS 5546, 24 Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet Tolosan, France*

<sup>b</sup> *CNRS FRE 3009 Bio-Rad, Cusp DehalParc Euromédecine, 1682 rue de la Valsière, CS 61003, 34184 Montpellier Cedex 4, France*

<sup>c</sup> *Clinique des Voies Respiratoires, Centre Hospitalier Universitaire Larrey, 24 Chemin de Pourcourville, 31059 Toulouse Cedex 9, France*

Received 18 October 2007

Available online 26 November 2007

### Abstract

Four IgE-binding epitopes have been characterized that cover a large area ( $\geq 40\%$ ) of the molecular surface of lipid transfer protein allergens of Rosaceae (apple, peach, apricot, and plum). They mainly correspond to electropositively charged regions protruding on the molecular surface of the modeled apple (Mal d 3), apricot (Pru ar 3), and plum (Pru d 3) allergens. Two of these epitopes consist of consensus epitopes structurally conserved among the lipid transfer protein allergens from the Rosaceae. Their occurrence in different lipid transfer protein allergens presumably accounts for the IgE-binding cross-reactivity often observed among different Rosaceae fruits. In this respect, LTP consist of phylogenetically- and structurally-related pan allergens. However, the IgE-binding cross-reactivity due to fruit lipid transfer protein has varying degrees of clinical relevance and this cross-reactivity is not necessarily accompanied by a cross-allergenicity to the corresponding fruits.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Lipid transfer proteins; Allergen; IgE-binding epitopes; Epitope mapping; Rosaceae fruit allergy

Non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) have been recently characterized as major allergens of fruits and, especially, of Rosaceae fruits (apple, apricot, peach, and plum) [1–5]. Plant LTP allergens belong to the LTP1 group of family 14 of pathogenesis-related (PR-14) proteins [6]. They consist of small-sized basic proteins of 9 kDa (91 amino acid residues,  $pI \geq 9$ ) built up from a core of four  $\alpha$ -helices stabilized by four conserved disulfide bridges and a loosely coiled C-terminal tail [7,8] that confers a

“saxophone-like” fold to the protein. This tightly packed three-dimensional structure most probably accounts for the high resistance to thermal denaturation and proteolysis previously reported for these plant allergens [9]. In Northern European countries, LTP from Rosaceae fruits trigger hypersensitive reactions, essentially contact dermatitis, in individuals previously cross-sensitized by pollen LTP [10]. With the exception of the plum fruits, the skin of other Rosaceae fruits usually contains the higher amounts of LTP [11,12], thus making the allergen directly available to trigger contact dermatitis in sensitized people. However, they are also capable to achieve the sensitization of susceptible individuals *via* a stimulation of the lymph nodes of the gastro-intestinal tract immune system, especially in people from Mediterranean countries [13,14]. The often reported IgE-binding cross-reactivity towards different Rosaceae fruits obviously depends on the conserved three-dimen-

*Abbreviations:* IgG, immunoglobulin G; IgE, immunoglobulin E; Mal d 3, *Malus domestica* (apple) LTP allergen; nsLTP, non-specific lipid transfer protein; OAS, oral allergy syndrome; Pru ar 3, *Prunus armeniaca* (apricot) LTP allergen; Pru d 3, *Prunus domestica* (plum) LTP allergen; Pru p 3, *Prunus persica* (peach) LTP allergen; TBS, tris buffered saline (pH 7.0); TBSTw, TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (pH 7.0)

\* Corresponding author. Fax: +33 05 62 19 35 02

E-mail address: [rouge@scsv.ups-tlse.fr](mailto:rouge@scsv.ups-tlse.fr) (P. Rougé)

sional structure of LTP allergens, that presumably share common IgE-binding epitopes [15]. Except for Pru p 3 [16], the peach LTP allergen, the IgE-binding epitopes of other fruit LTP have not been characterized to date. Here we present a structural analysis of the IgE-binding epitopes on the molecular surface of LTP allergens from apple (Mal d 3), apricot (Pru ar 3), peach (Pru p 3), and plum (Pru d 3) showing the occurrence of a consensual IgE-binding epitope that most probably accounts for the currently observed IgE-binding cross-reactivity among Rosaceae fruits.

## Materials and methods

**IgE and IgG antibodies.** Polyclonal IgG antibodies against Mal d 3 and Pru p 3 were raised in rabbit as previously described [17]. Blood samples were drawn after informed consent of five patients allergic to Rosaceae fruits (as checked by skin prick testing using peach extract as allergen source and specific IgE measurement to peach  $\geq 3.0$  UI) and pooled sera were used for both Western blotting and SPOT assay experiments.

**Peptide synthesis and SPOT assays for the determination of overlapping IgG- and IgE-binding peptides.** Overlapping 15-mer peptides, frameshifted by three residues, corresponding to the entire amino acid sequences of Mal d 3, Pru ar 3, Pru d 3, and Pru p 3, respectively, were prepared by using the SPOT technique [18]. The protocol previously described in detail [19] was followed, with the exception of the utilization of the Multiprep automatic SPOT synthesizer (Intavis). Briefly, peptides were assembled using the Fmoc chemistry on a cellulose membrane harboring an amino polyethylene glycol moiety. The C-terminal residue of each peptide was coupled to the activated membrane. After Fmoc deprotection, the following amino acids were sequentially added. At the end of the synthesis, side-chain protecting groups were removed by a trifluoroacetic acid treatment while the linkage of the peptides to the membrane was maintained.

The membrane was soaked overnight into 20 mL of Tris-buffered saline (TBS) containing 2 mL blocking buffer (Roche) and 1 g sucrose (pH 7.0), and then washed with TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBSTw). A 1:10 (v/v) diluted pool of patient sera was added in the presence of an anti-protease cocktail (Roche) and the membrane was incubated in a moist chamber for 2 h. After three washes with TBSTw (pH 7.0) the membrane was stirred in a 1:4000 dilution of mouse monoclonal anti-human IgE labeled with alkaline phosphatase (Sigma) for 1 h. After two washes with TBSTw (pH 7.0) and two washes with 10 mM citric acid containing 137 mM NaCl and 3 mM KCl (pH 7.0) (CBS buffer), the interacting peptide spots were colored for 30 min by adding the bromochlorolindolophosphate (BCIP) substrate for alkaline phosphate (Promega) in CBS buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.7 mM thiazolyl blue tetrazolium bromide. The membrane was washed three times with deionized water and dried for scanning. The membrane can be used repeatedly after a regeneration step consisting in one wash in dimethylformamide for 1 min, three washes in deionized water, three washes in 8 M urea containing 1% (w/v) SDS and 1% (w/v)  $\beta$ -mercaptoethanol and three subsequent washes in a mixture of ethanol CH<sub>3</sub>COOH H<sub>2</sub>O (50:10:40, v/v/v).

**Molecular modeling and mapping of IgG- and IgE-binding epitopes on the molecular surface.** Molecular modeling of Mal d 3 and other LTP was carried out on a Silicon Graphics O2 R10000 workstation, using the programs InsightII, Homology and Discover3 (Accelrys, San Diego, CA, USA). The atomic coordinates of the maize LTP Zea m 14 [20] (RCSB Protein Data Bank code 1MZL) and Pru p 3 (PDB code 2ALG) [16] were used to build the three-dimensional model of the allergens. The percentages of both identity (~35%) and homology (~75%) Zea m 14 shares with other LTP allowed us to build accurate three-dimensional models using the X-ray coordinates of the maize and peach LTP as templates. Steric conflicts were corrected during the model building procedure using the rotamer library [21] and the search algorithm implemented in the

homology [22] to maintain proper side-chain orientation. An energy minimization of the final models was carried out by 50–100 cycles of steepest descent using Discover3. PROCHECK [23] was used to assess the geometric quality of the three-dimensional models. As an example, all the residues of Mal d 3 were correctly assigned on the best allowed regions of the Ramachandran plot with the exception of residues Ser19 and Pro25 which are located in the generously allowed regions of the plot (result not shown). Cartoons were drawn with PyMOL (W.L. DeLano, <http://pymol.sourceforge.net>). Electrostatic potentials were calculated and displayed with GRASP [24] as previously described [17]. A clip of 8–16 Å slab across the molecular surface of the modeled allergens was used to display the overall shape and size of the fatty acid harboring tunnel-like cavity of LTP.

The surface occupied by the previously characterized or predicted sequential IgG- and IgE-binding epitopes of LTP allergens was calculated with GRASP and displayed on the molecular surface of the proteins with PyMOL. Their overall conformation on the molecular surface was displayed with PyMOL.

## Results

All the modeled LTP allergens share a very conserved three-dimensional structure built up from four  $\alpha$ -helical segments ( $\alpha$ 1– $\alpha$ 4) that adopt a saxophone-like fold with an extended C-terminal tail (Fig. 1A). Eight conserved Cys residues participate in four disulfide bridges which contribute to stabilize the overall fold. According to their basic character (net charge of 7–8), they all exhibit a predominantly electropositively charged surface (Fig. 1B). They contain a cranked tunnel-like cavity that has been shown to unspecifically accommodate different fatty acid chains and fatty acid derivatives (Fig. 1D). Mal d 3, Pru p 3, and Pru ar 3 nicely superimpose with a rms value of 0.48 Å for 91 superimposed  $\alpha$ -carbons (Fig. 1C). Obviously, the best superimposition was obtained for  $\alpha$ -helices except for helix  $\alpha$ 1 which displays some discrepancy among the three allergens.

Epitope mapping using rabbit polyclonal anti-Mal d 3 IgG revealed four IgG-binding amino acid sequence stretches distributed along the polypeptide chain of Mal d 3 (Fig. 2A). They correspond to stretches 22AVP24 (epitope #1), 35INGLARTTADRQ46 (epitope #2), 62VNPNA67 (epitope #3), and 77NVPYKISTSTN-CATVK92 (epitope #4), respectively. Except for the IgG-binding epitope 3, they contain electropositively charged (Arg and Lys) residues. Both IgG-binding epitopes cover a large part of the accessible surface (2550 Å<sup>2</sup>) that represents ~50% of the total accessible surface (5108 Å<sup>2</sup>) of Mal d 3. Other nsLTP allergens yielded an identical distribution for epitopes 2 and 3 whereas epitope 1 constantly corresponds to a shorter but still charged stretch of amino acid residues (Fig. 3). However, the accessible surface occupied by the three IgG-binding epitopes still amounts for almost 50% of the total accessible surface in Pru p 3, Pru ar 3, and Pru d 3.

Epitope mapping performed with different IgE-containing sera from patients allergic to Rosaceae fruits instead of using rabbit polyclonal IgG, revealed a closely similar distribution of four IgE-binding epitopes along the amino



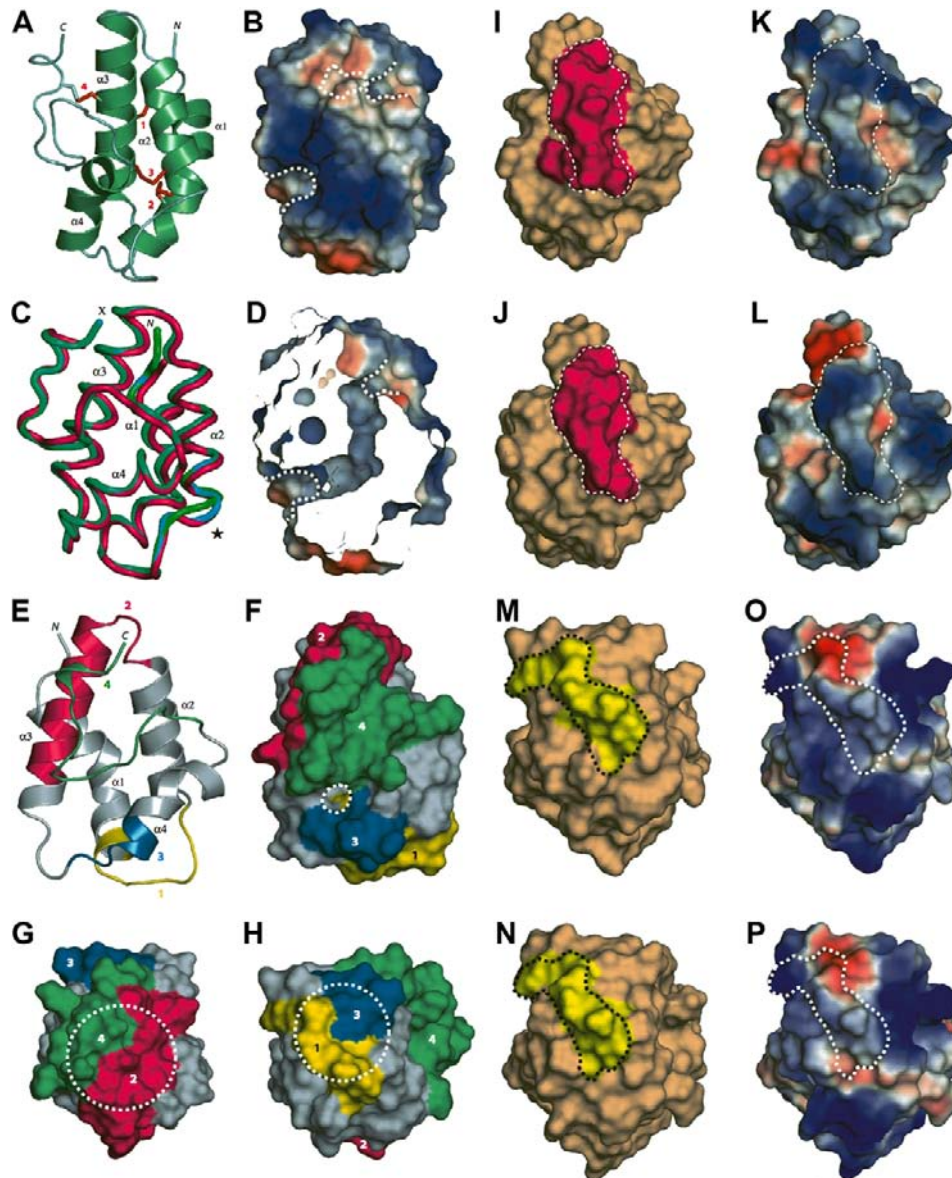


Fig. 1. (A) Ribbon diagram showing the overall three-dimensional fold of Mal d 3. The four  $\alpha$ -helices ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$ ) and the four conserved disulphide bridges are labeled 1, 2, 3, and 4, respectively. N and C correspond to the N- and C-termini of the polypeptide chain. (B) Mapping of the electrostatic potentials on the molecular surface of Mal d 3 shown in a different orientation to reveal both extremities (dashed white lines) of the tunnel-like cavity. Electropositively- and electronegatively-charged regions are colored blue and red, respectively. Neutral regions are colored white. (C) Superimposition of Mal d 3 (green), Pru p 3 (pink), and Pru ar 3 (cyan). The major fold discrepancy occurring at the beginning of helix  $\alpha 1$  is indicated by a star (\*). (D) Clip view showing the overall cranked shape of the tunnel-like cavity. Both extremities of the tunnel are indicated by dashed white lines. (E and F) Localization of the IgE-binding epitopes #1 (1, yellow), #2 (2, pink), #3 (3, blue), and #4 (4, green) on the ribbon diagram (E) and the molecular surface (F) of Mal d 3. One aperture of the tunnel-like cavity is indicated by a dashed white circle on the molecular surface (B and F). (G and H) Coalescence (open dashed white circle) of IgE-binding epitopes #2–#4 (G) and #1–#3 (H) susceptible to create more extended epitopic areas on the molecular surface of Mal d 3. (I–L) Conformation of the consensual IgE-binding epitope #2 (pink surface) characterized on the molecular surfaces of Mal d 3 (I) and Pru ar 3 (J). This epitope corresponds to a preferentially electropositively-charged area as shown upon mapping of electrostatic potentials on the molecular surfaces of Mal d 3 (K) and Pru ar 3 (L). All nsLTP allergens are similarly oriented and the common epitope core is delineated by a dashed white line. (M–P) Conformation of the consensual IgE-binding epitope #1 (yellow surface) characterized on the molecular surface of Mal d 3 (M) and Pru p 3 (N). This epitope corresponds to a rather charged area as shown upon mapping of electrostatic potentials on the molecular surfaces of Mal d 3 (O) and Pru p 3 (P). All allergens are similarly oriented and the common epitope core is delineated by a dashed black or white line. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

acid sequences (Fig. 2B) and on the molecular surface of the assayed LTP allergens (Fig. 1E and F). However, some discrepancies were observed that mainly concern both the

length of the identified epitopic stretches and their reactivity towards the corresponding antibodies. As exemplified in Fig. 2, the strongly reactive IgE-binding epitope #1

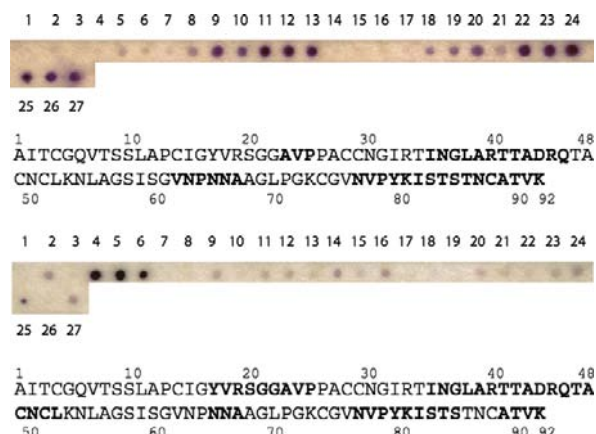


Fig. 2. (A) upper: IgG-binding peptides (dark spots) revealed on the SPOT membrane and, lower: mapping of the corresponding continuous IgG-binding epitopes (bold letters) along the amino acid sequence of Mal d 3. (B) upper: IgE-binding peptides (dark spots) revealed on the SPOT membrane and, lower: mapping of the corresponding continuous IgE-binding epitopes (bold letters) along the amino acid sequence of Mal d 3.

16YVRS GGAVP24 corresponds to the weakly reactive shorter IgG-binding epitope #1 22AVP24 in Mal d 3. Conversely, epitope #2 35INGLARTTADRQ46 strongly interacts with polyclonal rabbit IgG whereas its longer IgE-binding counterpart 35INGLARTTADRQTACNCL52 is much more less immunoreactive. Despite these discrepancies, a fairly good overlap occurs between IgG- and IgE-binding epitopic stretches characterized along the amino acid sequences of LTP allergens (see Fig. 3). The IgE-binding epitopes similarly cover a large surface ( $2700 \text{ \AA}^2$ ) that amounts about 53% of the molecular surface in Mal d 3. With a few exceptions, they still correspond to predominantly electropositively charged areas. This overlapping suggests a closely-related similarity and specificity of the human IgE- and rabbit IgG-epitopic regions in spite of a very different source for these immunoglobulins.

## Discussion

Both polyclonal rabbit IgG and IgE-containing sera from allergic patients allowed us to identify four IgG/IgE-binding epitopes along the polypeptide chain of fruit LTP allergens using the SPOT technique. Most of these

epitopes contain electropositive (Arg, Lys) and, to a lesser extent, electronegative (Asp, Glu) residues due to the highly basic character ( $pI \geq 9$ ) of LTP of plant origin. These charged residues are classically exposed on the molecular surface of allergens. However, the characterized IgE-binding epitopes moderately overlap on those previously characterized [16] or predicted [17] along the amino acid sequence of Pru p 3 except for the strongly charged exposed core of epitopes #1, #2, and #3. Such a discrepancy most probably depends on both the size (pentadecapeptides instead of decapeptides) of the synthetic peptides used in the SPOT technique to characterize the IgE-binding epitopes and the slightly different immunoreactivity of the IgE-containing sera of allergic patients used as probes.

As previously shown from ELISA measurements performed on Mal d 3 and Pru p 3 [17], our results confirm that IgE-binding epitope #2 corresponds to a consensual epitope conserved among the Rosaceae LTP allergens. Despite some discrepancy concerning the extent of the epitope on the molecular surface, its core structure exhibits a very similar conformation in other Rosaceae LTP (Fig. II–L). According to this structural conservation among the Rosaceae LTP, this epitope should be responsible for some IgE-binding cross-reactivity in the presence of IgE-containing sera from patients allergic to Rosaceae fruits. IgE-binding epitope #1 (16YVRS GGAVP24 in Mal d 3), which is strictly conserved in other Rosaceae LTP allergens, similarly exhibits a very similar conformation in Pru av 3, Pru d 3, and Pru p 3 (Fig. IM–P) that suggests it should also correspond to another consensual epitope presumably responsible for some additional IgE-binding cross-reactivity among the fruit LTP. Moreover, the synthetic peptides corresponding to this (major) IgE-binding epitope #1 gave the strongest staining signal in our SPOT experiments (see Fig. 2B). In spite of some amino acid conservation, the two IgE-binding epitopes characterized on the surface of fruit LTP allergens exhibit rather different conformations from one allergen to another which most probably depends on changes in the rotamers of the amino acid residues in relation with their local environment.

As structurally- and phylogenetically-related proteins, plant LTP consist of pan allergens like profilins or Bet v 1 homologs, susceptible to cross-react in IgE-binding experiments [25]. The occurrence of closely-related LTP



Fig. 3. Overlap of the IgG-binding epitopes (upper line) and the IgE-binding epitopes (lower line) characterized with the SPOT technique along the amino acid sequences of Mal d 3 (A and B), Pru p 3 (C and D), Pru d 3 (E and F) and Pru ar 3 (G and H). Epitopic stretches are in black boxed white letters

in vegetable foods and pollens might account for the rather high frequency of individuals sensitized to Rosaceae fruits, especially in the Mediterranean countries [25]. However, the discrepancy often observed between cross-reactivity and cross-allergenicity that separates asymptomatic subjects from allergic patients exhibiting systemic symptoms, urticaria or anaphylaxis, most likely depends on multiple factors including e.g. the level and polyclonality of the synthesized IgE, the polymorphism of the FcεRI receptors, the balance of T regulatory cells and Th1/Th2 cells, etc. [26].

One of the most striking results dealing with the topography of the IgE-binding epitopes consists in the large surface area they cover on the accessible surface of LTP allergens. In Mal d 3, the four identified IgE-binding epitopes cover about 50% of the total accessible surface. In addition, the close vicinity of epitopes #1 and #3 on the molecular surface, creates an extremely extended epitopic area that amounts for 38% of the total accessible surface in e.g. Mal d 3. In this respect, LTP readily differ from other plant allergens, e.g. the legumin and vicilin allergens from peanut or tree nuts, which exhibit less extended and more scattered IgE-binding epitopes over their molecular surface [27]. The coalescence of the two distantly arrayed epitopes #1 and #3 or #2 and #4 along the amino acid sequence is of paramount importance since it can contribute to build up new extended conformational epitopes that share amino acid residues from both linear epitopes. These structurally-related IgE-binding epitopes might possibly account for the strong allergenic propensity of the Rosaceae LTP, especially in Mediterranean countries [25].

Finally, the characterization of IgE-binding epitopes on the molecular surface of LTP open the way to the tailoring of recombinant hypoallergenic proteins by site directed mutagenesis with the goal of producing allergens that retain the T-cell propensity but are devoid of any consistent IgE-binding activity. Eventually, these hypoallergens should consist of useful tools for the immunotherapy of the LTP-mediated allergies to Rosaceae fruits.

#### Acknowledgments

The financial support of CNRS is gratefully acknowledged (J.-P.B., R.C., A.B., and P.R.). The authors thank the Société Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique for its financial help (A.B., P.R.). We thank C. Nguyen for expert technical assistance in SPOT synthesis.

#### References

- [1] R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, D. Barber, G. Salcedo, Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 514–519.
- [2] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, C. Ortolani, M. Ispano, M. Monza, C. Baroglio, E. Scibola, R. Ansaloni, C. Incorvaia, A. Conti, The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 520–526.
- [3] E.A. Pastorello, V. Pravettoni, L. Farioli, M. Ispano, D. Fortunato, M. Monza, M.G. Giuffrida, F. Rivolta, E. Scibola, R. Ansaloni, C. Incorvaia, A. Conti, C. Ortolani, Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 1099–1106.
- [4] R. van Ree, Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 910–913.
- [5] H. Breiteneder, C. Mills, Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5 (2005) 275–279.
- [6] K. Hoffmann-Sommergruber, Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 930–935.
- [7] E. Ginceel, J.P. Smorre, A. Caille, D. Marion, M. Ptak, F. Vovelle, Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional <sup>1</sup>H NMR data. A new folding for lipid carriers, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 413–422.
- [8] N. Pasquato, R. Berni, C. Folli, M. Cianci, S. Pantano, J.R. Helliwell, G. Zanotti, Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 684–694.
- [9] A.I. Sancho, N.M. Rigby, L. Zuidmeer, R. Asero, G. Mistrello, S. Amato, E. González-Mancebo, M. Fernández-Rivas, R. van Ree, E.N.C. Mills, The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, *Mal d 3, Allergy* 60 (2005) 1262–1268.
- [10] M. Fernández-Rivas, D. Bolhaar, E. González-Mancebo, R. Asero, A. Van Leeuwen, B. Bohle, Y. Ma, C. Ebner, N. Rigby, A.I. Sancho, S. Miles, L. Zuidmeer, A. Knulst, H. Breiteneder, C. Mills, K. Hoffmann-Sommergruber, R. van Ree, Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods, *J. Allergy Clin. Immunol.* 118 (2006) 481–488.
- [11] J. Carnes, E. Fernandez-Caldas, M.T. Gallego, A. Ferrer, J. Cuesta-Herranz, Pru p 3 (LTP) content in peach extracts, *Allergy* 57 (2002) 1071–1075.
- [12] J.P. Borges, A. Jauneau, C. Brulé, R. Culierrier, A. Barre, A. Didier, P. Rougé, The lipid transfer protein (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as a cell-surface exposed allergen, *Plant Physiol. Biochem.* 44 (2006) 535–542.
- [13] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, A.M. Robino, J. Scibilia, D. Fortunato, A. Conti, L. Borgonovo, A. Bengtsson, C. Ortolani, Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 908–914.
- [14] E.A. Pastorello, A.M. Robino, Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy, *Mol. Nutr. Food Res.* 48 (2004) 356–362.
- [15] L. Zuidmeer, R. van Ree, Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7 (2007) 269–273.
- [16] G. Garcia-Casado, L.F. Pacios, A. Diaz-Perales, R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, F. Polo, D. Barber, G. Salcedo, Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) 599–605.
- [17] J.-P. Borges, A. Barre, R. Culierrier, N. Archimbaud, A. Didier, P. Rougé, How reliable is the structural prediction of IgE-binding epitopes of allergens: the case study of plant lipid transfer proteins, *Biochimie* 89 (2007) 83–91.
- [18] R. Frank, Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable parallel chemical synthesis on a membrane support, *Tetrahedron* 48 (1992) 9217–9232.
- [19] D. Laune, F. Molina, G. Ferrieres, S. Villard, C. Bes, F. Ricquier, T. Chardes, C. Granier, Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding, *J. Immunol. Methods* 267 (2002) 53–70.

- [20] D.H. Shin, J.Y. Lee, K.Y. Hwang, K.K. Kim, S.W. Suh, High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings, *Structure* 3 (1995) 189–199.
- [21] J.W. Ponder, F.M. Richards, Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 775–791.
- [22] M.T. Mas, K.C. Smith, D.L. Yarmush, K. Aisaka, R.M. Fine, Modeling the anti-CEA antibody combining site by homology and conformational search, *Proteins Struct. Func. Genet.* 14 (1992) 483–498.
- [23] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemistry of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [24] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins Struct. Func. Genet.* 11 (1991) 281–296.
- [25] M. Fernández-Rivas, Cross-reactivity between fruit and vegetables, *Allergol. Immunopathol. (Madr)* 31 (2003) 141–146.
- [26] J. Bousquet, J.M. Anto, C. Bachert, P.J. Bousquet, P. Colombo, R. Cramer, M. Daéron, W. Fokkens, B. Leynaert, C. Lahoz, M. Maurer, G. Passalacqua, R. Valenta, M. van Hage, R. Van Ree, Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens, A GA<sup>2</sup> I.F.N. project, *Allergy* 61 (2006) 671–680.
- [27] A. Barre, J.-P. Borges, P. Rougé, Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity, *Biochimie* 87 (2005) 499–506.

## **Partie 3**

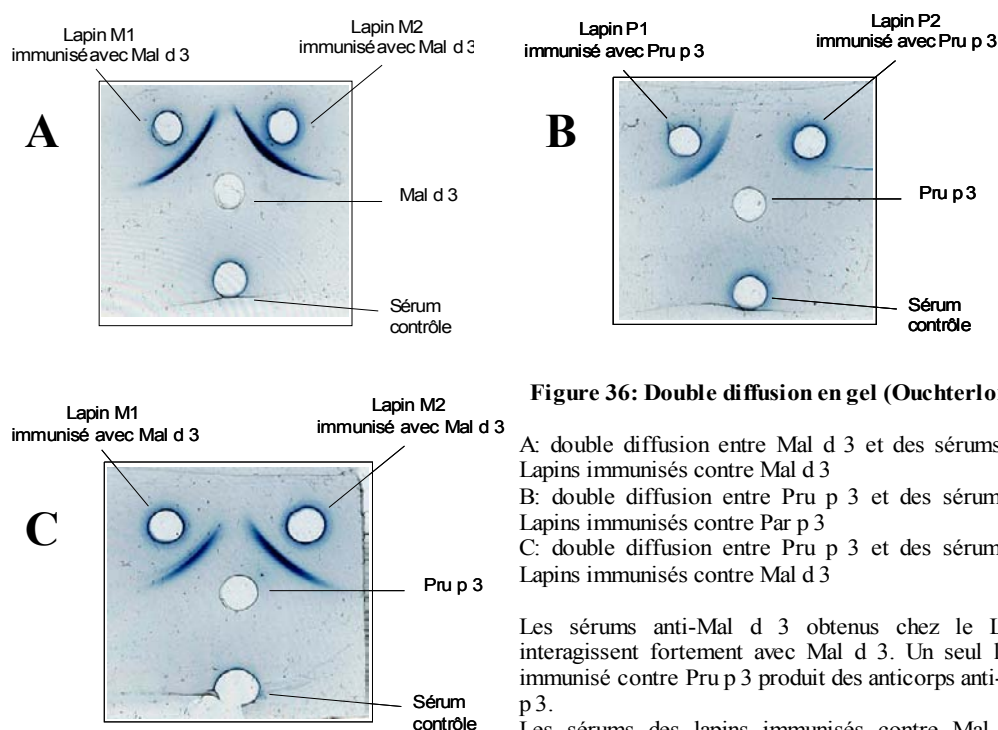
# **Etude de la distribution et de la localisation des LTP dans les fruits**



## Partie 3: Etude de la distribution et de la localisation des LTP dans les fruits

### 3.1 - Dosages des LTP dans la peau et la pulpe de fruits

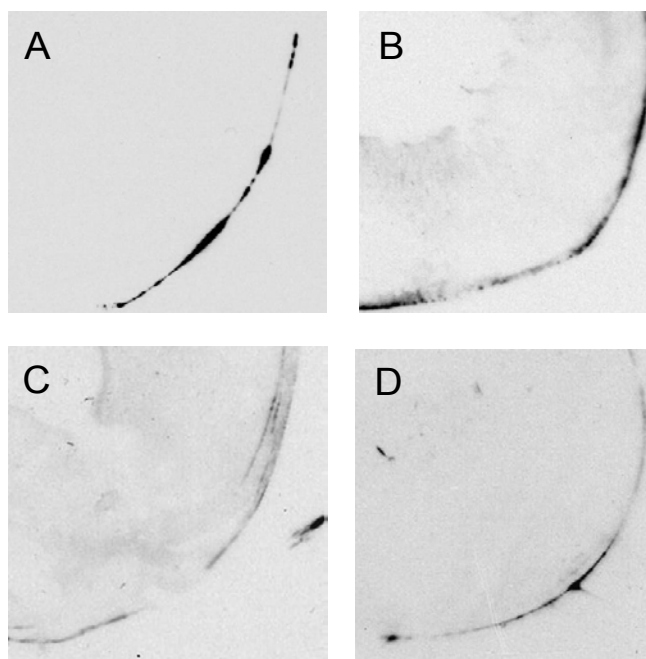
Afin d'effectuer les dosages et les expériences de localisation des LTP dans la peau et la pulpe des fruits, des anticorps polyclonaux anti-LTP ont été préparés chez le Lapin. Leur spécificité a été vérifiée par différents tests, notamment le test de double diffusion en gel d'Ouchterlony. Ce test permet de visualiser un arc de précipitation entre Mal d 3 et les anti-sérums des deux Lapins immunisés contre Mal d 3 (fig. 36A). Le même résultat est obtenu pour Pru p 3, mais seulement avec un seul des deux Lapins immunisés contre la LTP de Pêche (fig. 36B). De plus, des arcs de précipitations sont observés entre les sérums de Lapins immunisés avec Mal d 3 et la LTP de Pêche Pru p 3 (fig. 36C). Les anticorps anti-Mal d 3 reconnaissent donc au moins deux membres de la famille des LTP de fruits. Ces résultats indiquent également que les titres en anticorps polyclonaux des différents sérums de Lapins sont suffisamment élevés pour les utiliser afin de préciser la localisation des LTP dans les fruits et pour les doser par des tests ELISA. De plus, une expérience d'immuno-empreinte a été réalisée sur un extrait protéique total de Pomme afin de vérifier la spécificité d'un sérum de Lapin envers Mal d 3. Une seule bande d'environ 10kDa, correspondant à Mal d 3, est révélée. Ce résultat démontre l'excellente spécificité des différents anticorps de Lapins obtenus.



**Figure 36: Double diffusion en gel (Ouchterlony)**

A: double diffusion entre Mal d 3 et des sérums de Lapins immunisés contre Mal d 3  
 B: double diffusion entre Pru p 3 et des sérums de Lapins immunisés contre Par p 3  
 C: double diffusion entre Pru p 3 et des sérums de Lapins immunisés contre Mal d 3

Les sérums anti-Mal d 3 obtenus chez le Lapin interagissent fortement avec Mal d 3. Un seul lapin immunisé contre Pru p 3 produit des anticorps anti-Pru p 3. Les sérums des lapins immunisés contre Mal d 3 interagissent également avec Pru p 3.



**Figure 37: Immuno-empreintes tissulaires effectuées sur coupes de fruits**

Immuno-empreintes tissulaires réalisées sur des coupes de pomme (A), pêche (B), prune jaune (C) et prune rouge (D). Les LTP se concentrent surtout dans la peau de la Pomme et de la Pêche, alors que leur distribution est légèrement différente dans les prunes (peau et pulpe).

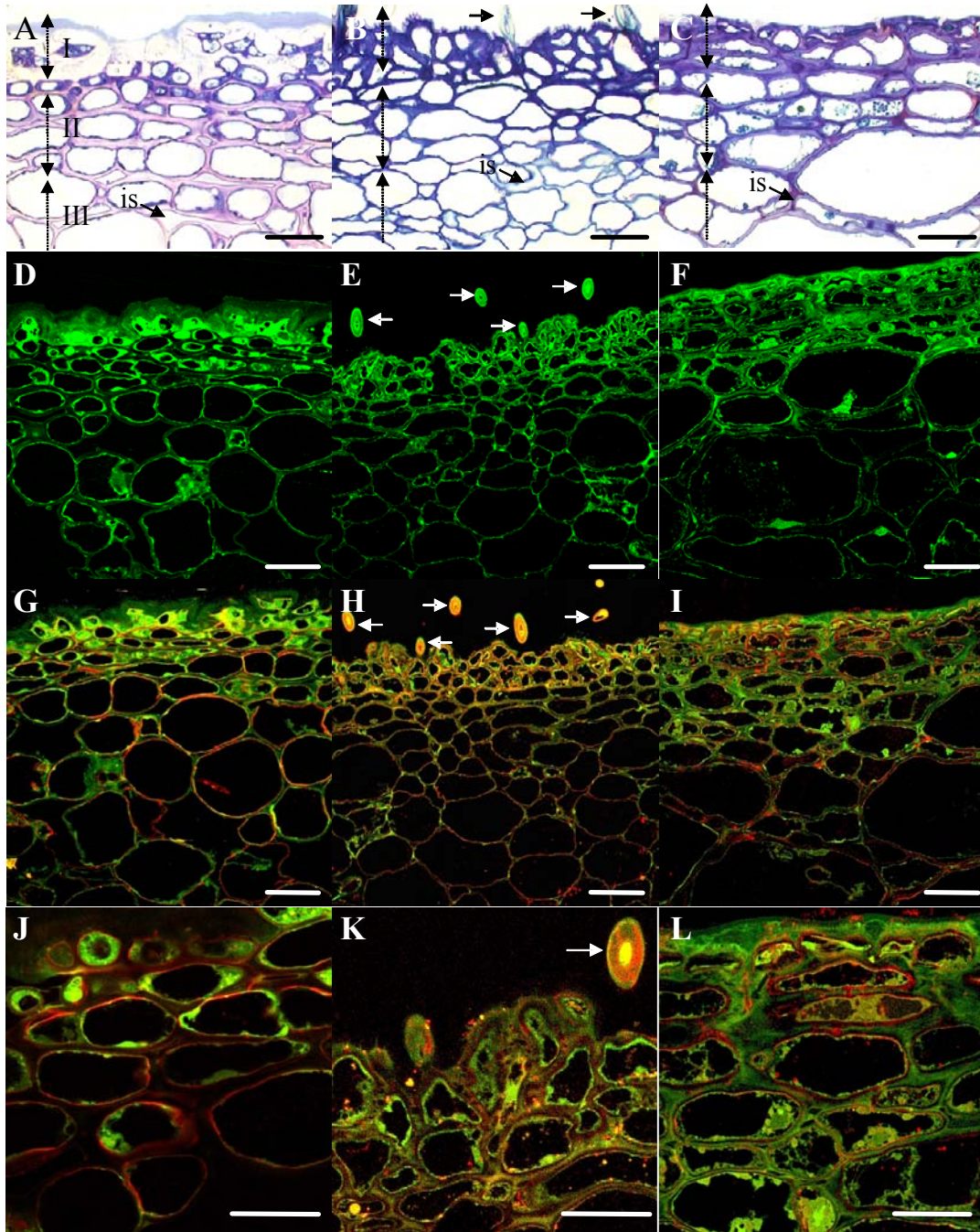


Les résultats des immuno-empreintes tissulaires (ITP pour **I**mmuno-**T**issue **P**rinting) indiquent que les LTP de fruits sont essentiellement concentrées dans la peau des pommes et des pêches, alors que cet allergène semble avoir une distribution équivalente dans la peau et la pulpe des abricots et des prunes (fig. 37). Les dosages ELISA confirment que la peau de Pêche et de Pomme contiennent les plus grandes quantités de LTP, mais des variations importantes apparaissent en fonction de la variété étudiée (Tableau 7).

Fruit	LTP dans la peau (en $\mu\text{g} / \text{g}$ de tissu)	LTP dans la pulpe (en $\mu\text{g} / \text{g}$ de tissu)	Ratio peau / pulpe
Pomme var. Royal Gala	3,3	1,2	2,8
Pomme var. Bertanne	2	0,6	3,3
Pomme var. Pink Lady	7,9	1,1	7,1
Pomme var. Granny Smith	17,3	0,5	34,6
Pomme var. Chanteclerc	12,4	1,2	10,3
Pomme var. Golden Delicious	12,0	0,9	13,3
Pomme var. Fuji	9	1,1	8,2
Pomme var. Red Chief	3,4	1,8	1,9
Pomme var. Reinette du Canada	2	0,5	4
Abricot	1,8	1,6	1,1
Pêche jaune *	8,4	3,4	2,5
Pêche jaune **	5,2	3,2	1,6
Prune jaune	1,5	1,7	0,9
Prune rouge	1,5	1,7	0,9

Les dosages de contenu en LTP de pêche ont été réalisés sur des pêches non lavées (\*) et lavées (\*\*).

**Tableau 7: Contenu en LTP (en  $\mu\text{g} / \text{g}$  de fruit) de la peau et la pulpe de fruits**



**Figure 38: Étude de la localisation des LTP dans le péricarpe de différents fruits étudiée par microscopie à champ clair et microscopie confocale à balayage laser**

1ère colonne: pomme var. Golden Delicious; 2ème colonne: pêche jaune; 3e colonne: prune

A-C: microscopie à champ clair de sections colorées au bleu de toluidine montrant les assises cellulaires formant l'épiderme (I), l'hypoderme (II) et le parenchyme (III).

D-L: microscopie confocale à balayage laser montrant le marquage (rouge) dû aux LTP. Toutes les images correspondent à la projection maximale de 10-15 plans confocaux. D, E et F correspondent aux contrôles réalisés en l'absence d'anticorps primaire.

Les flèches indiquent les zones correspondant aux poils formant le revêtement duveteux de la Pêche.

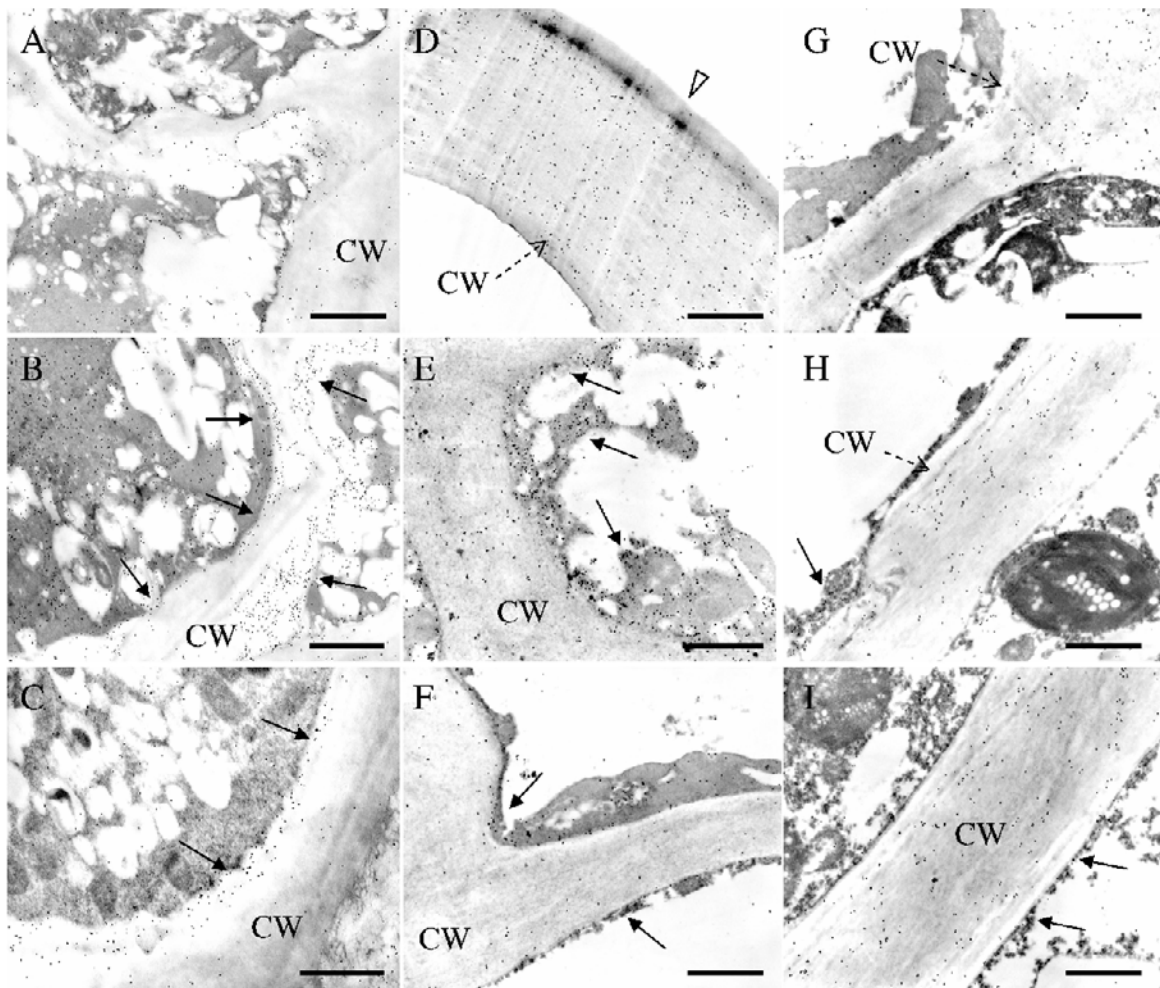
Barre d'échelle: 50µm

Plus spécialement dans la Pêche, le duvet de poils recouvrant le fruit semble extrêmement riche en LTP comme l'indique la localisation immuno-cytochimique de l'allergène (fig. 38H,K,D). En fait, la quantité de LTP présente dans la peau est sous-estimée lorsque les fruits sont lavés avant de commencer l'extraction des protéines. Ce lavage préalable des fruits a pour effet d'éliminer le duvet de poils où se concentre essentiellement Pru p 3. Ainsi, la concentration de Pru p 3 dans la peau mesurée sur des fruits non lavés s'avère plus importante (8,4µg/g de fruit) que celle mesurée sur des fruits lavés (5,2 µg/g de fruit). Le ratio correspondant au rapport entre la quantité de LTP mesurée dans la peau et la quantité de LTP mesurée dans la pulpe, passe ainsi de 2,5 pour des fruits non lavés à 1,6 pour des fruits lavés. Des résultats similaires ont également été publiés récemment pour d'autres variétés de pêches (Carnés et al., 2002). En outre, ce ratio montre des variations importantes dans différentes variétés de pommes. Ainsi, la peau de certaines variétés (Chanteclerc, Golden Delicious, Granny Smith) de pommes renferme des concentrations en LTP 10 à 30 fois supérieures à celles mesurées dans la pulpe. Pour d'autres variétés, ce ratio varie de 2 à 4. La totalité des résultats est regroupée dans le tableau 7 p. 145.

### **3.2 - Localisation immuno-cytochimique des LTP en microscopie confocale et électronique**

La localisation immuno-cytochimique des LTP dans différents tissus (épiderme, hypoderme, parenchyme) du péricarpe de différents fruits a été réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux de Lapins immunisés avec Mal d 3 ou Pru p 3. Les observations effectuées avec un microscope confocal à balayage laser sur des échantillons de Pomme montrent que le marquage des LTP est essentiellement concentré dans le cytoplasme en contact avec la paroi des cellules (fig. 38G,J). De plus, le marquage diminue fortement depuis le péricarpe et, surtout, depuis les cellules hypodermiques vers les cellules parenchymateuses du mésocarpe. Un marquage plus hétérogène et irrégulier a été observé sur les échantillons de Pêche et de Prune, avec une fluorescence distribuée dans le cytoplasme et la partie intérieure de la paroi cellulaire (fig 38H,L). Un marquage très important est associé aux parois des poils qui constituent le duvet recouvrant l'épiderme des pêches (fig. 38H,K).

Une étude plus fine de la localisation subcellulaire des LTP de fruits a été réalisée en microscopie électronique après marquage par des antiglobulines couplées à l'or colloïdal. Des variations ont été observées sur les différents fruits étudiés. Néanmoins, les particules d'or sont toujours associées à la partie interne de la paroi cellulaire, en contact avec le plasmalemme mais s'observent également au sein même de la paroi des différentes assises cellulaires du péricarpe.



**Figure 39: Étude de la localisation des LTP dans le péricarpe de différents fruits et réalisée par microscopie électronique après marquage à l'or colloïdal**

Ultrastructure et localisation des LTP dans le péricarpe de pomme (A-C), de pêche (D-F) et de prune (G-I). La localisation est détectée par marquage des anticorps de Lapin anti-LTP par des anticorps de chèvre anti-IgG de Lapin couplés à des billes d'or dans les cellules de l'épiderme (A, D, G), de l'hypoderme (B, E, H) et du parenchyme (C, F, I).

Un marquage très dense est observé (flèches noires) dans les régions de la paroi cellulaire en contact avec le plasmalemme (pomme) et dans la paroi des poils constituant le duvet présent à la surface du fruit.

CW: paroi cellulaire

Barre d'échelle: 1  $\mu$ m

Dans les pommes, seulement quelques particules d'or ont été détectées dans la fine paroi des cellules épidermiques, suggérant une plus faible accumulation des LTP dans ces cellules (fig 39A). Un marquage plus dense a été observé dans le cytoplasme et la partie intérieure de la paroi des cellules de l'hypoderme (fig 39B). Des particules d'or ont été observées, de façon très similaire, à la fois dans le cytoplasme et la partie interne des parois des cellules parenchymateuses (fig 39C) tandis qu'un marquage moins dense s'observe dans la partie externe de la paroi, en contact avec les espaces intercellulaires (fig 39C). Un marquage très différent a été observé dans les échantillons de péricarpe de pêches. En total accord avec les observations effectuées en microscopie confocale, le marquage le plus important est localisé au niveau des parois des poils constituant le revêtement duveteux des fruits (fig 39D), suggérant une concentration élevée en LTP de ces poils. Dans les cellules de l'hypoderme, le marquage apparaît à la fois dans la paroi et le cytoplasme (fig 39E), tandis que les particules semblent localisées dans la partie du cytoplasme en contact avec la paroi des cellules et, plus rarement, dans la paroi cellulaire des grandes cellules parenchymateuses (fig. 39F). Dans les prunes, les particules d'or se localisent de façon plus homogène dans les parois cellulaires des cellules de l'épiderme, de l'hypoderme et du parenchyme (fig 39G,I).

### 3.3 - Discussion

Excepté pour les prunes et les abricots, les autres fruits étudiés et plus particulièrement les pommes, concentrent les LTP essentiellement dans la peau. Des différences importantes ont cependant été observées en fonction de la variété. Ainsi, plusieurs variétés de pommes comme la Granny Smith, la Golden Delicious ou la Chanteclerc contiennent de 10 à 30 fois plus de LTP dans la peau que dans la pulpe. Dans les autres variétés de pommes, un ratio plus modeste de concentration en LTP de 2 à 4 est souvent retrouvé, mais toujours en faveur de la peau. Des résultats analogues ont également été rapportés par d'autres auteurs, que ce soit pour différentes variétés de pêches (Carnés et al., 2002) et de pommes (Marzban et al., 2005).

Les observations effectuées ayant montré une localisation pariétale des LTP de Rosaceae suggèrent qu'une fois synthétisées, ces protéines très basiques ( $pI_{\text{calculé}} > 9$  pour Mal d 3, Pru p 3, Pru d 3 et Pru ar 3) sont excrétées depuis le cytosol vers l'interface paroi-plasmalemme pour être ensuite associées avec la matrice pectinique acide de la paroi cellulaire et devenir ainsi, des allergènes de surface. La cartographie des potentiels électrostatiques réalisée sur des modèles des LTP a ainsi montré une prédominance de charges électropositives à la surface de la protéine, permettant ainsi d'interagir avec les contre-ions électronégatifs. Des observations similaires ont été publiées sur l'excrétion et la localisation pariétale des LTP (Kader, 1996), quelles soient ou non

impliquées dans des réactions allergiques. De plus, la petite taille des LTP doit très certainement favoriser leur migration vers la paroi des cellules une fois secrétées. Leur résistance aux enzymes protéolytiques leur permet également de ne pas être dégradées (Asero et al., 2000; Scheurer et al., 2004). Elles préservent ainsi tout leur caractère allergénique.

La localisation sub-cellulaire des LTP des fruits de Rosaceae permet de mieux comprendre les réactions provoquées lors de l'ingestion de tels fruits par des patients sensibilisés. Ainsi, la présence des LTP comme constituants des parois cellulaires assure une exposition de ces protéines à la surface des fruits. Elles peuvent être à l'origine de réactions d'hypersensibilité en interagissant directement avec les systèmes immunitaires de la peau ou la muqueuse buccale. La réponse allergique peut alors être très rapide. Ainsi, les auteurs espagnols rapportent des chocs anaphylactiques et des urticaires de contact observés chez des patients sensibilisés après un simple contact avec des pêches. Ceci est très certainement dû à la présence d'une concentration importante en LTP dans la peau des fruits, principalement du duvet de poils recouvrant la peau des pêches (Fernández-Rivas et al., 2003). Des résultats récents suggèrent également l'implication de ce duvet des pêches dans la sensibilisation des patients dans les pays du pourtour Méditerranéen (Asero et al., 2006). En conséquence, la consommation de pêches et de pommes préalablement pelées doit être recommandée aux patients sensibilisés afin de réduire le plus possible le risque de déclenchement d'une réaction allergique sévère. La présence de LTP comme protéines de surface a également été publiée pour des parties de la plante autres que les fruits. Ainsi, les LTP représentent la majorité des protéines retrouvées dans le revêtement cireux qui recouvre les feuilles de choux (*Brassica oleracea*) (Pyee et al., 1994).

Les expériences (dosages ELISA et localisation immunocytochimique) ont été réalisées sur plusieurs variétés de fruits de provenance commerciale. Le degré et le mode (naturel ou artificiel) de maturation des fruits ne sont pas connus, alors qu'il a été publié que le contenu en LTP dépendait du degré de mûrissement des pêches (Brenna et al., 2004). Des variations de la teneur en LTP des fruits commercialisés sont à prévoir en fonction des processus de maturation et de conservation mis en oeuvre avant leur commercialisation. De la même façon, les pratiques culturales pourraient influencer sur la teneur en LTP des fruits comestibles. En effet, des études préliminaires menées au laboratoire ont permis d'observer des concentrations différentes en LTP pour des pommes issues de l'agriculture biologique par rapport à des pommes de variétés identiques mais issues de l'agriculture conventionnelle.

### 3.4 – Article

« The lipid transfer protein (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens » (2006)

Jean-Philippe Borges, Alain Jauneau, Cédric Brulé, Raphaël Culerrier, Annick Barre, Alain Didier, Pierre Rougé. *Plant Physiology and Biochemistry* 44:535-542





Research paper

## The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens

J.-P. Borges<sup>a</sup>, A. Jauneau<sup>a</sup>, C. Brulé<sup>a</sup>, R. Culerrier<sup>a</sup>, A. Barre<sup>a</sup>, A. Didier<sup>b</sup>, P. Rougé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Surfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux. UMR U/PS-CNRS 5546. 24, chemin de Borde-Rouge. 31326 Castanet-Tolosan. France*

<sup>b</sup>*Clinique des voies respiratoires. Centre Hospitalier Universitaire Larrey. 24, chemin de Pourvoirville. 31059 Toulouse cedex 09. France*

Received 12 July 2006; accepted 25 September 2006

Available online 10 October 2006

### Abstract

The localization and distribution of non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) allergens in the skin and pulp of Rosaceae fruits (apple, peach, apricot, plum) has been investigated. nsLTP essentially concentrate in the pericarp of the fruits whereas the pulp contains lower amounts of allergens. Immunolocalization showed they are primarily located in the cytosol but are subsequently excreted and finally accumulate at the plasmalemma–cell wall interface and in the cell wall. However, high discrepancies were observed in the content of allergens among, e.g. different cultivars of apple. As a consequence, the consumption of peeled-off fruits is recommended to reduce the risk of severe allergic reactions (anaphylactic shock) in individuals sensitized to Rosaceae fruits.

© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Mal d 3; Pru p 3; Pru d 3; Pru ar 3; Allergen; Lipid transfer protein; Rosaceae fruit

### 1. Introduction

Non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) have been recently introduced as major allergens in food allergy, especially in allergies to the Rosaceae (apple, apricot, peach, plum) fruits [1–8]. Plant nsLTP consist of small-sized basic proteins ( $pI \geq 9$ ) of either 91 (LTP2 group) or fewer (LTP1 group) amino acid residues that belong to family 14 of pathogenesis-related (PR-14) proteins [9]. nsLTP allergens, which essentially occur in LTP2 group, consist of a core made of four  $\alpha$ -helices stabilized by four conserved disulfide bridges and a loosely coiled C-terminal tail [10–18]. This tightly packed three-dimensional structure accounts for the

extreme resistance of nsLTP to both thermal denaturation and proteolysis [19–22]. Accordingly, nsLTP from food products trigger hypersensitive reactions, e.g. contact dermatitis, in individuals previously sensitized by pollen nsLTP but are also capable to achieve the sensitization of susceptible individuals via a stimulation of the lymph nodes of the gastro-intestinal tract immune system [23,24]. The eventual occurrence of allergens at the cell surface is of particular importance to promote contact dermatitis reactions in individuals sensitized to fruit allergens [25]. Previous measurements have pointed out some discrepancies among the amount of nsLTP in the skin and pulp of apple fruit depending on the apple varieties [26]. In most of the varieties, the skin of apple fruits exhibited the higher content in nsLTP. In the present work, we completed these previous informations by focusing our attention on the content of LTP in different Rosaceae fruits (apple, peach, apricot, plum) and, especially, on the localization of nsLTP at the cell surface. With the exception of the plum fruits, the skin of other Rosaceae fruits usually contains the higher amounts of nsLTP and, more interestingly, most of the allergen occurs at the cell surface and is therefore directly available to trigger contact dermatitis in sensitized people. Such a particular localization accounts for the unexpected quick allergenic response of sub-

*Abbreviations:* Ab, antibodies; ELISA, enzyme linked immuno-sorbent assay; LTP, lipid transfer protein; nsLTP, non-specific lipid transfer protein; Mal d 3, *Malus domestica* (apple) allergen 3; PBSTM, 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.2% (v/v) Tween 20 and 5% (v/v) defatted milk; Pru ar 3, *Prunus armeniaca* (apricot) allergen 1; Pru d 3, *Prunus domestica* (plum) allergen 1; Pru p 3, *Prunus persica* (peach) allergen 3; PVP, polyvinyl pyrrolidone; TBS, 20 mM Tris buffered saline (pH 7.5).

\* Corresponding author. Fax: +33 5 62 19 35 02.

E-mail address: [rouge@scsv.ups-tlse.fr](mailto:rouge@scsv.ups-tlse.fr) (P. Rougé).

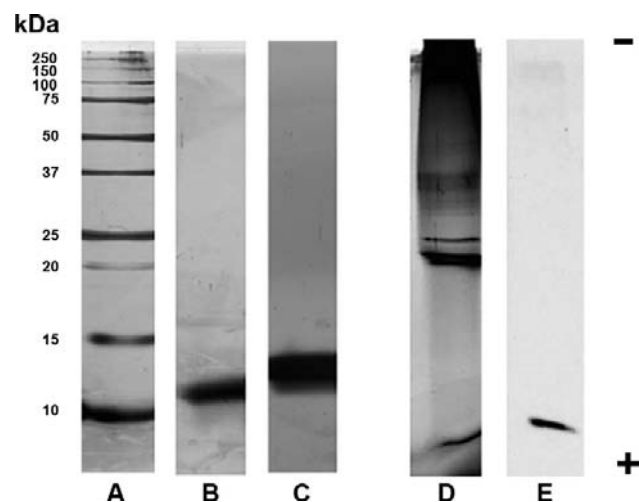


Fig. 1. Silver nitrate-stained SDS-PAGE analysis of purified Pru p 3 (B), Mal d 3 (C), soluble proteins of peach (D), and molecular weight markers (A). Immunoblot analysis of total soluble proteins from peach (E) showing that the rabbit anti-Pru p 3 polyclonal antibodies recognize a single band and does not react with any other protein fraction.

jects previously sensitized to peach upon a simple skin contact with the fruit.

## 2. Results

As shown from immuno-tissue-prints (ITP) experiments, nsLTP are essentially concentrated in the skin of apple and peach fruits whereas this allergen seems to be similarly distributed in both the skin and pulp of apricot and plum fruits (Fig. 2). Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) measurements confirm that the skin of peach and apple contains the higher amounts of nsLTP but discrepancies occur between different fruit varieties (Table 1). Especially in peach, the downy skin of the fruit consists of short hairs extremely rich in LTP as shown from immuno-cytochemical observations (Figs. 3H, K and 4D). In fact, the LTP amount of the skin is underestimated since the fruits were carefully washed before preparing the protein extracts that should eliminate most of the LTP-rich downy cover of the fruits. Accordingly, the LTP content of the skin measured on unwashed peach fruits was definitely higher ( $\sim 8.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) than that measured for washed skin ( $\sim 5.2 \mu\text{g g}^{-1}$ ). The ratio of the nsLTP content in the skin and pulp thus reaches 2.5 instead of 1.6. Very similar results were reported for other peach varieties [25]. The discrepancies observed between different varieties of apple are extremely important. Compared to a few varieties (Chanteclere, Golden delicious, Granny Smith) where the content of nsLTP of the skin amounts from 10- up to 30-times that measured in the pulp, the ratio of the nsLTP content in the skin and pulp of other apple varieties varies from 2 to 4 (Table 1).

The immuno-cytochemical localization of nsLTP in the different parts (epidermis, hypodermis, parenchyma) of the fruit pericarp has been documented using polyclonal rabbit antibodies (Ab) specifically directed against Pru p 3 and Mal d 3

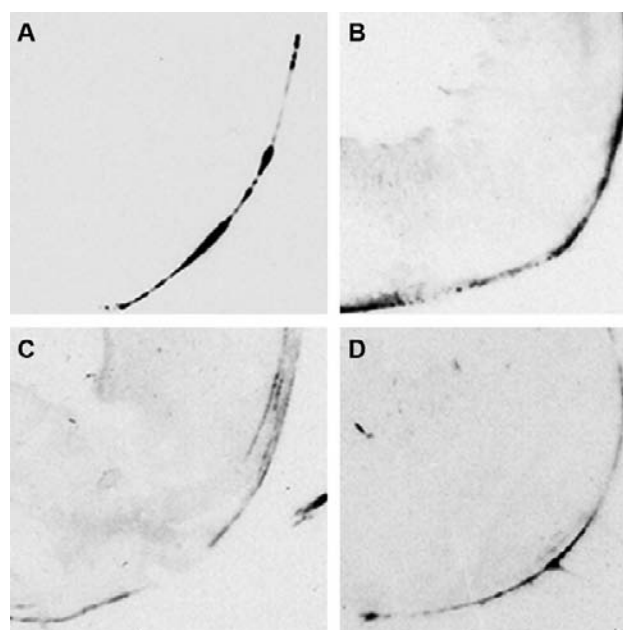


Fig. 2. ITP performed on apple (Golden delicious) (A), peach (B), yellow plum (C) and red plum (D).

Table 1  
LTP content (expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  tissue) in the skin and pulp of fruits

Fruit	LTP content of skin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ tissue)	LTP content of pulp ( $\mu\text{g g}^{-1}$ tissue)	Ratio skin/pulp
Royal Gala	3.3	1.2	2.8
Berlann	2	0.6	3.3
Pink Lady	7.9	1.1	7.1
Granny Smith	17.3	0.5	34.6
Chanteclere	12.4	1.2	10.3
Golden delicious	12.0	0.9	13.3
Fuji	9	1.1	8.2
Red Chief	3.4	1.8	1.9
Reinette Canada	2	0.5	4
Apricot	1.8	1.6	1.1
Peach*	8.4	3.4	2.5
Peach**	5.2	3.2	1.6
Yellow plum	1.5	1.7	0.9
Red plum	1.5	1.7	0.9

Measurements performed on unwashed (\*) and washed (\*\*) peach skin.

(Fig. 1). Confocal laser scanning microscopy observations of apple samples showed that nsLTP labeling essentially occurred in the cytoplasm in contact with the cell wall (Fig. 3G, J). In addition, the labeling strongly decreased from the pericarp and, especially, from the hypodermal cells to the parenchyma cells of the mesocarp. A rather heterogeneous and irregular labeling was observed in peach and plum samples, with spots of fluorescence distributed within the cytoplasm and the inner part of the cell wall (Fig. 3H–L). Especially in peach, a very strong labeling was associated to the thick wall of the downy hairs covering the epidermal cell layer (Fig. 3H, K).

A more detailed subcellular localization of nsLTP in fruit was carried out by electron microscopy using immuno-gold labeling. Although some discrepancies occurred among the dif-

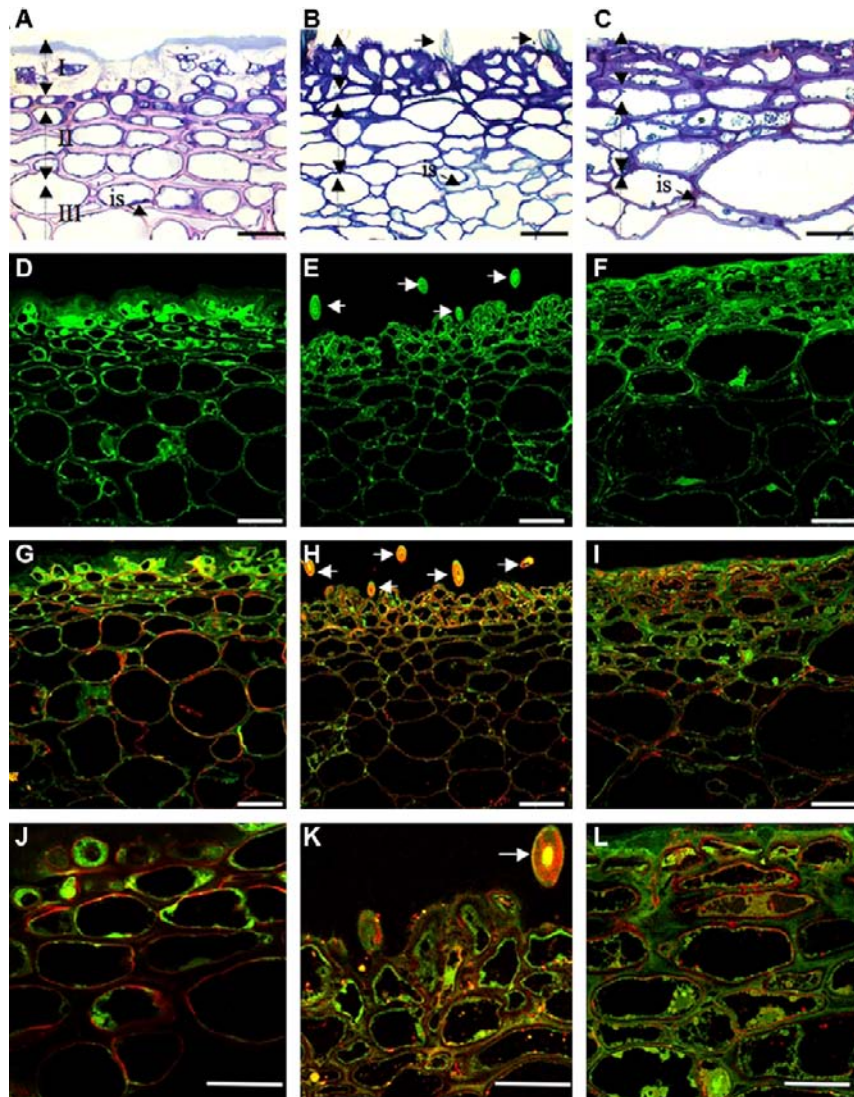


Fig. 3. A–C: Bright field microscopy of semi-thin sections stained with toluidine blue showing the cell layers forming the epidermis (II), hypodermis (III) and parenchyma (III) of the pericarp of apple (A), peach (B) and plum (C). Intercellular spaces (is) are indicated. The arrows in B indicate the hairy epidermal cells of peach fruit.

D–L: Confocal laser scanning microscopy showing the immunofluorescence labeling (red) of nsLTP in apple (D, G, J), peach (E, H, K) and plum (F, I, L). All images correspond to the maximal projection of 10–15 confocal planes. In control samples (D, E and F) lacking the primary antibody, only the green autofluorescence is visible. Arrows in E, H and K indicate sections of hairy epidermal cells of peach. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

ferent fruits, gold particles were mainly associated to the inner part of the cell wall in contact with the plasmalemma and to the cell wall itself in the different cell layers of the pericarp. In apple, only a few gold particles were detected within the thick cell wall of epidermal cells suggesting a rather low accumulation of nsLTP in this cell layer (Fig. 4A). A much more dense labeling occurred in the cytoplasm and the inner part of the cell wall of hypodermal cells (Fig. 4B). Gold particles were similarly distributed within the cytoplasm and inner part of the cell wall of parenchyma cells (Fig. 4C) while the outer part of the cell wall in contact with intercellular spaces exhibited a faint labeling (Fig. 4C). A rather different labeling was

observed in peach pericarp samples. In full agreement with previous confocal microscopy observations, the most striking feature concerns the strong labeling of the hairy cell walls (Fig. 4D) that suggests a high concentration of nsLTP in the downy hairs covering the fruit epidermis. In hypodermal cells, labeling occurred in both the cell wall and the cytoplasm (Fig. 4E) whereas gold particles were mainly located in the cytoplasm in contact with the cell wall, and, more scarcely, within the cell wall of the large parenchyma cells (Fig. 4F). In plum, gold particles appeared as mainly associated to the cell wall of both the epidermal, hypodermal and parenchyma cells (Fig. 4G–I).

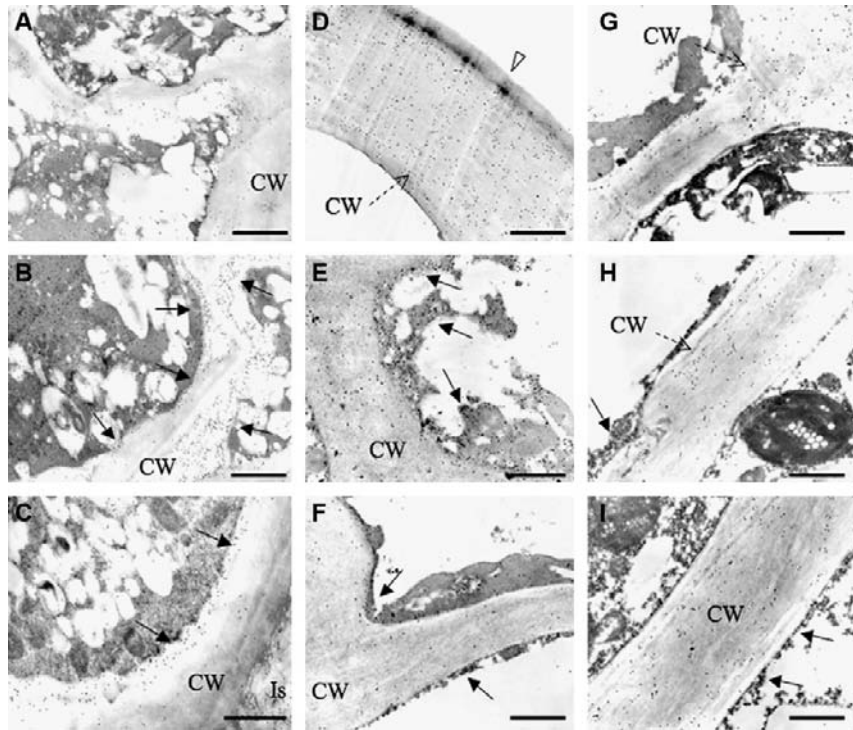


Fig. 4. Ultrastructure and location of nsLTP in the pericarp of apple (A–C), peach (D–F) and plum (G–I) fruits. Localization of nsLTP was detected by immuno-gold labeling in epidermal (A, D, G), hypodermal (B, E, H) and parenchyma (C, F, I) cells of fruit pericarp. Note the dense labeling (black arrows) revealed by gold particles (10 nm) of the inner part of the cell wall (CW) in contact to the plasmalemma (apple) and of the thick wall of hairy epidermal cells of peach. Is, Intercellular space. Scale bar = 1  $\mu$ m.

### 3. Discussion

Except for plum and apricot, other Rosaceae fruits and especially apple, concentrate the nsLTP in the skin. However, discrepancies were observed among the different commercially available apple varieties. In this respect, a few apple varieties like Granny Smith, Golden delicious or Chanteclere, definitely differ from other by an extremely high content of nsLTP in the skin, which can amount from 10 up to 30-times (Granny Smith) that measured in the pulp (Table 1). In other apple varieties, a moderate ratio between the nsLTP content of the skin and the pulp remains in the range of 2 to 4. Similar discrepancies were observed among the fruits from different peach [25] and apple [26] varieties.

Such a cell wall localization of nsLTP observed in Rosaceae fruits suggests that once synthesized, the strongly basic nsLTP (calculated  $pI$  of 9.14 for Mal d 3 and Pru p 3, 9.33 for Pru d 3, and 9.36 for Pru ar 3) excreted from the cytosol at the wall-plasmalemma interface should be further entrapped within the acidic pectin matrix of the cell wall to behave as surface exposed allergens. Mapping of electrostatic potentials on the molecular surface of the modeled nsLTP from fruits revealed a predominantly electropositively charged surface susceptible to readily interact with electronegative counter-parts (Fig. 5). A similar excretion of a nsLTP previously synthesized in cytosol and further localized in the cell wall was reported for other nsLTP [27] and, especially, for Par j 1, another major nsLTP

allergen of the pollen grains from the Pellitory-of-the-wall *Parietaria judaica* [28]. Obviously, the small size of nsLTP should favor their migration to the cell wall once they have been excreted from the cells. In addition, their reported resistance to proteolytic enzymes [19,22] should prevent their degradation and preserve their allergenic potency.

The subcellular localization of nsLTP in Rosaceae fruits shed new lights on the availability of these allergens for triggering an anaphylactic response in susceptible individuals. The localization of secreted nsLTP as components of the cell wall of epidermal/hypodermal cells ensures the exposition of these allergens at the surface of the Rosaceae fruits. Accordingly, they are susceptible to directly interact with the skin or the buccal mucosae of the sensitized individuals to trigger a quick hypersensitive response. In this respect, anaphylactic responses such as contact urticaria and oral allergy syndrome have been observed in sensitized Spanish patients just after a skin contact with peach fruits in relation, most probably, with the high nsLTP content of the downy hairs covering the fruits [29]. Recent results suggest that the fuzzy hairy cover of peach might account for the high prevalence of sensitization to peach in people from Mediterranean countries [30]. As a practical consequence, both the handling and consumption of previously peeled-off peach or apple fruits should be recommended to weakly sensitized people to significantly reduce the risk of a severe allergic disease.

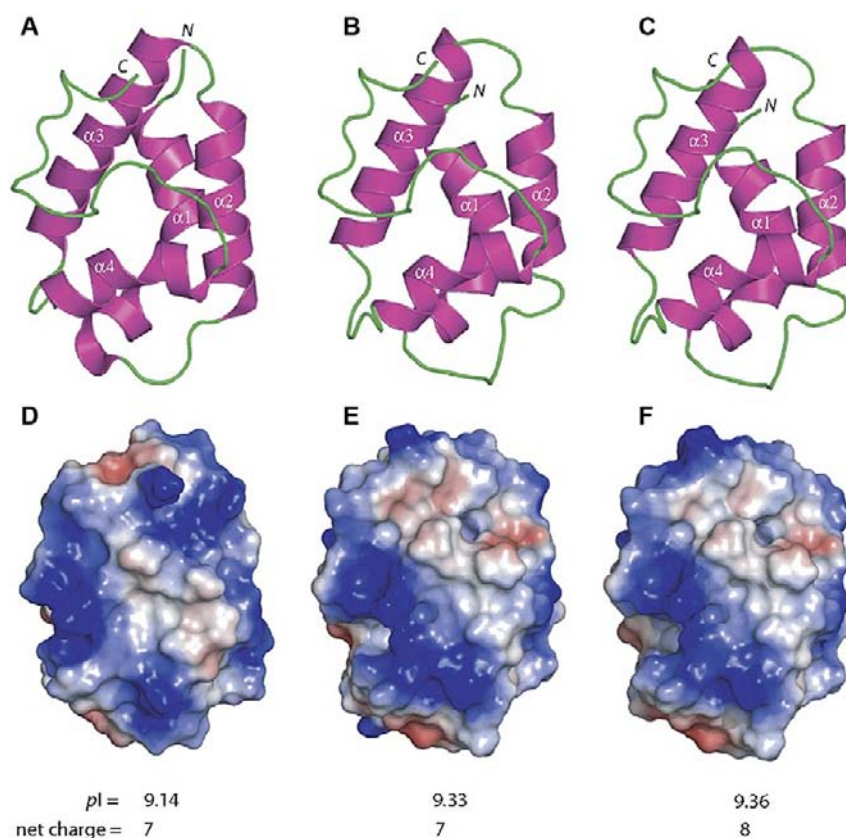


Fig. 5. Ribbon diagrams of the three-dimensional structure of Pru p 3 (PBD code 2ALG) [18], (A) and three-dimensional models built for Mal d 3 (B) and Pru ar 3 (C). Mapping of electrostatic potentials on the molecular surface of Pru p 3 (D), Mal d 3 (E) and Pru ar 3 (F). N and C indicate the N- and C-terminus of the polypeptide chains, respectively. Alpha-helices are numbered  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  according to their occurrence from the N-terminus of the polypeptide chains. Calculated values for the  $pI$  and net charge are indicated under the electrostatic potential maps.

The occurrence of nsLTP as a surface exposed protein has been also reported for other vegetative organs of plants. In this respect, nsLTP consists of the major protein of the waxy covering of the broccoli (*Brassica oleracea*) leaves [31,32].

In the present work, the ELISA measurements and immunocytochemical localization of nsLTP were performed on ripe fruits of different commercially available fruit varieties but the nsLTP content of peach was recently reported to highly depend on the degree of fruit ripening [33]. Moreover, a few preliminary results obtained on apple varieties issued from biological agriculture suggested some interesting discrepancies that deserve more deeply investigations. This task is now in progress in our laboratory.

#### 4. Materials and methods

##### 4.1. Isolation of LTP

nsLTP were purified from the skin and pulp of apple, peach, apricot and plum fruits. Usually, 200 g of skin/pulp previously frozen in liquid nitrogen were finely ground in mortar and pestle and suspended in 1 l of 20 mM Tris buffered saline (TBS) containing 2 mM EDTA and 3% (w/v) insoluble polyvinyl pyr-

rolidone (PVP) (Polyclar AT, Sigma) (pH 7.5). The slurry was stirred overnight at 4 °C and then centrifuged 20 min at 12,000  $\times g$  and 20 min at 27,000  $\times g$ . The clear supernatant was poured in SpectraPor dialysis tubing (molecular weight cut-off 3500 Da) and dialyzed against dist. wt for 72 h at 4 °C. After centrifugation at 27,000  $\times g$  for 20 min at 4 °C, the supernatant was lyophilized and stored at -80 °C until used.

##### 4.2. Analytical methods

nsLTP were separated by SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels using Tris-aurine as trailing ion [34] and stained with silver nitrate [35] (Fig. 1). Coomassie blue stained bands were digested with trypsin in the gel and mass mapped by MALDI-TOF analysis as previously described [36]. The software Protein Prospector was used for the identification of the protein using the NCBI non-redundant database.

For MALDI-TOF-MS analysis, nsLTP samples of 0.75  $\mu$ l of a 0.5 mg ml<sup>-1</sup> protein solution in 50 mM Tris buffer (pH 7.5) were co-crystallized on the MALDI plate with 0.75  $\mu$ l of 0.6 mM of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid (sinapinic acid) in 50% (w/v) of acetonitrile containing 0.1% (w/v) trifluoroacetic acid used as a matrix solution. Desorption and

ionization of crystallized samples were carried out on a Voyager-DE™ STR (Perspective Biosystems, USA) mass spectrometer in positive linear mode using an accelerating voltage of 25 kV, a grid voltage of 90% and an extraction delay time of 300 ns. Acquisition mass was performed between 3000 and 25,000 Da using a mixture of three proteins of known mass molecular weight (insulin: 5734 Da, thioredoxin: 11,674 Da and apomyoglobin: 16,952 Da) for the internal calibration.

Far-UV circular dichroism (CD) spectra nsLTP were measured at room temperature on a spectrophotometer Jobin and Yvon CD6 to assess the correct folding of the purified protein samples. The light path for all measurements was 1 mm and concentrations of lectins ranged from 100 up to 300 mg ml<sup>-1</sup> in 20 mM phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 7.4). The proportion of  $\beta$ -strand and  $\alpha$ -helical structures was estimated from the CD spectra [37]. According to the absence of  $\beta$ -sheet structures in the nsLTP [10–18] all of the CD spectra showed the occurrence of  $\alpha$ -helices and coil structures in fruit nsLTP (result not shown).

The protein content of the nsLTP samples was estimated using the bicinchoninic acid kit reagent (Pierce) [38] with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

#### 4.3. Molecular modeling

Molecular modeling of Mal d 3 and Pru ar 3 was carried out on a Silicon Graphics O2 R10000 workstation, using the programs InsightII, Homology and Discover3 (Accelrys, San Diego, CA, USA). The atomic coordinates of the maize LTP Zca m 14 [39] (RCSB Protein Data Bank code 1MZL) were used to build the three-dimensional model of the allergen. The percentages of both identity (~35%) and homology (~75%) Zca m 14 shares with fruit nsLTP allowed us to build rather accurate three-dimensional model using the X-ray coordinates of the maize LTP as a template. Steric conflicts were corrected during the model building procedure using the rotamer library [40] and the search algorithm implemented in the Homology program [41] to maintain proper side-chain orientation. The geometry of loop regions was corrected using the refine option of TurboFrodo [42]. An energy minimization of the final models was carried out by 50 cycles of steepest descent using Discover3. The program TurboFrodo was run to draw the Ramachandran plot and to perform the superposition of the model with the template protein. PROCHECK [43] was used to assess the geometric quality of the three-dimensional models. Cartoons were drawn with PyMOL (W.L. DeLano (<http://www.pymol.org>)).

Electrostatic potentials were calculated using the parse3 parameters [44]. The solvent probe radius used for molecular surfaces was 1.4 Å and a standard 2.0 Å-Stem layer was used to exclude ions from the molecular surface [45]. The inner and outer dielectric constants applied to the protein and the solvent were, respectively, fixed at 4.0 and 80.0 and the calculations were performed keeping a salt concentration of 0.145 M.

#### 4.4. Immune sera

Polyclonal antibodies against apple and peach LTPs were raised in rabbits in the presence of Freund's complete adjuvant (Calbiochem). The allergens (100 µg) freshly dissolved in saline (400 µl) and emulsified with adjuvant (400 µl) were repeatedly injected subcutaneously (200 µl) at 10-day intervals during 4 months. Every 3 weeks, blood was collected and checked for polyclonal antibodies by ELISA. After blood clotting at room temperature and at 4 °C for 4 and 12 h, respectively, the immune sera were collected by centrifugation, filtered through a 0.2 µm membrane and stored at -80 °C until used.

The specificity of polyclonal antibodies was checked by Western immunoblotting on nitrocellulose membrane (Fig. 1). They only revealed a single protein band corresponding to the nsLTP but not reacted with other protein fractions from the fruit extracts. No binding occurred with the rabbit preimmune sera used as a negative control.

#### 4.5. Immuno-tissue-printing

ITP were performed to roughly localize LTP in apple, peach, apricot and plum fruits. Slices (~2 mm in thickness) of fresh ripe fruits thoroughly washed in deionized water were wrapped in filter paper (BioRad) and gently pressed on a 0.2 µm nitrocellulose membrane (Scheicher and Schuel) previously washed with 100 mM ascorbic acid. The membrane was air-dried at room temperature overnight and protein transfer was checked by quick staining of the membrane with 0.2% (w/v) Ponceau red in 0.3% (w/v) TCA. The membrane is overflowed in 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (v/v) defatted milk (PBSTM) during 2 h. After incubation in the presence of polyclonal rabbit immune serum diluted 1:1000 (v/v) in PBSTM during 2 h in a moist chamber, the membrane was washed three-times with PBSTM and finally incubated at room temperature in PBSTM containing the 1:2000 (v/v) diluted goat anti-rabbit IgG immune serum labeled with HRP during 1 h under constant stirring. After three washes with 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% (v/v) Tween 20, the membrane is revealed using the ECL Plus detection kit (Amersham) after 3 min exposure in cassette.

#### 4.6. Immunolocalization

Small pieces of pericarp (1–2 mm<sup>3</sup>) were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 48 h at 4 °C, and then washed in cacodylate buffer before dehydrated in an alcohol series. The dehydrated samples were infiltrated with graded mixtures of LR White acrylic resin in ethanol (1:2, 1:1, and 2:1) and finally embedded in pure resin. Polymerization was performed overnight at 70 °C. Semi-thin (2 µm in thickness) or ultra-thin (80 nm) sections were prepared using a Reichert ultraCutE microtome. Semi-thin sections were mounted on glass slides for bright field and laser scanning confocal microscopy. Ultra-thin sections were mounted on gold

grids for transmission electron microscopy. Some sections were stained with toluidine blue for bright field microscopy.

Sections were first blocked for 2 h at room temperature in PBST buffer (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 7.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 plus 1% de Tween 20) containing 1% of BSA. They were incubated overnight at 4 °C with the rabbit antiserum against LTP diluted 1:50 in PBST buffer plus BSA, and then washed in the same buffer. For immunofluorescence labeling, sections were incubated 2 h at room temperature with goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa 633 (Molecular Probes) diluted 1:1000 in PBST plus BSA. Sections were then washed and dried. For transmission electron microscopy, goat anti-rabbit IgG coupled to 10 nm gold particles diluted 1:50 in PBST buffer plus BSA (Amersham, RPN422 Auro-Probe EMGAR G10) were used as secondary antibodies. Sections were washed, stained with an aqueous solution of uranyl acetate (5%, w/v), rinsed in water and dried. Primary antibody was omitted in control samples.

Confocal images were acquired with a SP2 confocal laser scanning system equipped with an upright microscope (Leica, Germany) and a 40× (PL APO, N.A. 1.25) oil immersion objective. The 488 nm ray line of an argon laser was used to depict the general feature of the tissue under observation. The emitted autofluorescence of the tissue was collected in the range between 500 and 540 nm. The distribution of the probe Alexa 633 was observed using the 633 nm ray line of a HeNe laser, the emitted fluorescence being collected in the range 645 and 730 nm. The laser line intensities and the PMT settings were kept constant for the control and the labeled samples. No fluorescence was detected between 640 and 700 nm indicating that both the level of autofluorescence and non-specific adsorption of Alexa 633-labeled secondary antibodies are low in this wavelength range. Pictures were computed by projection of 10–15 plan-confocal images acquired in z dimension with 0.5 µm increment between two focal planes. Micrographs were performed using a Hitachi-H600 (Japan) transmission electron microscope operating at 100 kV and taken on Kodak-Electron films (Kodak France).

#### 4.7. ELISA measurements

ELISA measurements were performed on standard 96-wells microtitration plates (Limbro) using rabbit polyclonal antibodies against Mal d 3 or Pru p 3. Briefly, the wells were loaded with 50 µl of peel or pulp extracts in 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) used at various protein concentrations ranging from 0.4 up to 2.0 µg ml<sup>-1</sup>. The plates were incubated overnight at 4 °C and washed three-times with PBS (pH 7.5). One hundred microliters of PBS (pH 7.5) containing 0.2% Tween 20 (v/v) and 3% BSA (w/v) (PBSTB) were added to each well and the plates were incubated at room temperature for 2 h. Fifty microliters of 10-fold diluted Ab in PBSTB (pH 7.5) were added and the plates were incubated at room temperature under constant stirring. After three washes with PBSTB, 50 µl of 1:2000 (v/v) diluted sheep anti-rabbit IgG coupled alkaline phosphatase (Dako) were added and, after

incubation at room temperature for 45 min, three washes were performed with PBSTB. One hundred microliters of alkaline phosphatase substrate (Sigma) were added and after incubation for 45 min in the dark, 50 µl of 3 M NaOH were added to stop the color reaction. The 405 nm was recorded on a Titer-tek Multiscan spectrophotometer. Each value is the mean of three separate experiments. Appropriate blank and substrate controls were performed under the same conditions.

#### Acknowledgements

The financial support of CNRS is gratefully acknowledged (J.P.B., C.B., R.C., A.B., P.R.). Microscopy facilities of the Rio Imaging technical platform (IFR 40, Castanet Tolosan, France) were used for the confocal laser scanning microscopy and electron microscopy observations (A.J.).

#### References

- [1] R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, D. Barber, G. Salcedo, Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 514–519.
- [2] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, C. Ortolani, M. Ispano, M. Monza, C. Baroglio, E. Scibola, R. Ansaloni, C. Incorvaia, A. Conti, The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 520–526.
- [3] E.A. Pastorello, V. Pravettoni, L. Farioli, M. Ispano, D. Fortunato, M. Monza, M.G. Giuffrida, F. Rivolta, E. Scibola, R. Ansaloni, C. Incorvaia, A. Conti, C. Ortolani, Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 1099–1106.
- [4] E.A. Pastorello, F.P. D'Ambrosio, V. Pravettoni, L. Farioli, G. Giuffrida, M. Monza, R. Ansaloni, D. Fortunato, E. Scibola, F. Rivolta, C. Incorvaia, A. Bengtsson, A. Conti, C. Ortolani, Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000) 371–377.
- [5] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, M.G. Giuffrida, C. Ortolani, D. Fortunato, C. Trambaioli, E. Scibola, A.M. Calamari, A.M. Robino, A. Conti, Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 756 (2001) 95–103.
- [6] B.K. Balfmer-Weber, Lipid transfer protein as a potential panallergen, *Allergy* 57 (2002) 873–875.
- [7] R. van Ree, Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 910–913.
- [8] G. Salcedo, R. Sanchez-Monge, A. Diaz-Perales, G. Garcia-Casado, D. Barber, Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens, *Clin. Exp. Allergy* 34 (2004) 1336–1341.
- [9] K. Hoffmann-Sommergruber, Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 930–935.
- [10] E. Gincel, J.P. Simorre, A. Caille, D. Marion, M. Ptak, F. Vovelle, Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 413–422.
- [11] J. Gomar, M.C. Petit, P. Sodano, D. Sy, D. Marion, J.C. Kader, F. Vovelle, M. Ptak, Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds, *Protein Sci.* 5 (1996) 567–577.
- [12] S. Tassin-Moindrot, A. Caille, J.M. Douliet, D. Marion, F. Vovelle, The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1117–1124.
- [13] D. Samuel, Y.J. Liu, C.S. Cheng, P.C. Iyu, Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 35267–35273.

- [14] J.L. Pons, F. de Lamotte, M.F. Gautier, M.A. Delsuc, Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14249–14256.
- [15] P. Da Silva, C. Landon, B. Industri, A. Marais, D. Marion, M. Ponchet, F. Vovelle, Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features, *Proteins* 59 (2005) 356–367.
- [16] F. Hoh, J.L. Pons, M.F. Gautier, F. de Lamotte, C. Dumas, Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding, *Acta Crystallogr. D61* (2005) 397–406.
- [17] K.F. Lin, Y.N. Liu, S.T. Hsu, D. Samuel, C.S. Cheng, A.M. Bonvin, P.C. Iyu, Characterization and structural analyses of nonspecific transfer protein 1 from mung bean, *Biochemistry* 44 (2005) 5703–5712.
- [18] N. Pasquato, R. Berni, C. Folli, M. Cianci, S. Pantano, J.R. Helliwell, G. Zanotti, Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 684–694.
- [19] R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S.C. de Vries, M.F. Gautier, C.L. Ciurana, E. Verbeck, T. Mohammadi, V. Knul-Bretlova, J.H. Akkerdaas, I. Bulder, R.C. Aalberse, R. van Ree, Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124 (2001) 67–69.
- [20] R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S. Amato, P. Falagiani, Analysis of the heat stability of lipid transfer protein from apple, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) 1009–1011.
- [21] A.I. Sancho, N.M. Rigby, L. Zuidmeer, R. Asero, G. Mistrello, S. Amato, E. González-Mancebo, M. Fernández-Rivas, R. van Ree, E.N.C. Mills, The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, *Mol. Cell. Allergy* 60 (2005) 1262–1268.
- [22] S. Scheurer, J. Lauer, K. Foetisch, M. San Miguel Moncin, M. Retzek, C. Hartz, E. Enrique, J. Lidholm, A. Cistero-Bahima, S. Vieths, Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 900–907.
- [23] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, A.M. Robino, J. Scibilia, D. Fortunato, A. Conti, L. Borgonovo, A. Bengtsson, C. Ortolani, Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 908–914.
- [24] E.A. Pastorello, A.M. Robino, Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy, *Mol. Nutr. Food Res.* 48 (2004) 356–362.
- [25] J. Carnes, E. Fernandez-Caldas, M.T. Gallego, A. Ferrer, J. Cuesta-Herranz, Pru p 3 (LTP) content in peach extracts, *Allergy* 57 (2002) 1071–1075.
- [26] G. Marzban, H. Puchinger, R. Dey, S. Brynda, Y. Ma, A. Martinelli, M. Zaccarini, E. van der Weg, Z. Housley, D. Kolarich, F. Altmann, M. Laimer, Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits, *Plant Sci.* 169 (2005) 387–394.
- [27] J.C. Kader, Lipid-transfer proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 627–654.
- [28] A.M. Vega-Maray, D. Fernandez-Gonzalez, R. Valencia-Barrera, F. Polo, J.A. Seoane-Camba, M. Sudrez-Cervera, Lipid transfer proteins in *Parietaria judaica* L. pollen grains: immunocytochemical localization and function, *Eur. J. Cell Biol.* 83 (2004) 493–497.
- [29] M. Fernández-Rivas, E. González-Mancebo, R. Rodríguez-Pérez, C. Benito, R. Sánchez-Monge, G. Salcedo, M.D. Alonso, A. Rosado, M.A. Tejedor, C. Vila, M.L. Casas, Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) 789–795.
- [30] R. Asero, G. Mistrello, S. Amato, D. Roncarolo, A. Martinelli, M. Zaccarini, Peach fuzz contains large amounts of lipid transfer protein: is this the cause of the high prevalence of sensitization to LTP in Mediterranean countries, *Allerg. Immunol. (Paris)* 38 (2006) 118–121.
- [31] J. Pyce, H. Yu, P.L. Kolattukudy, Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves, *Arch. Biochem. Biophys.* 311 (1994) 460–468.
- [32] J. Pyce, P.L. Kolattukudy, The gene of the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns, *Plant J.* 7 (1995) 49–59.
- [33] O.V. Brema, E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, C. Pompei, Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7997–8000.
- [34] C. Tastet, P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer, T. Rabiloud, A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins, *Electrophoresis* 24 (2003) 1787–1794.
- [35] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, G. Neubauer, A. Shevchenko, P. Mortensen, M. Mann, A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (1996) 893–896.
- [36] G. Borderies, E. Jamet, C. Lafitte, M. Rossignol, A. JaunEAU, G. Boudart, B. Monsarrat, M.-T. Esquerré-Tugayé, A. Boudet, R. Pont-Lezica, Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis, *Electrophoresis* 24 (2003) 3421–3432.
- [37] N. Sreeram, S.Y. Vennyaminov, R.W. Woody, Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy, *Protein Sci.* 8 (1999) 370–380.
- [38] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, F.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1987) 76–85.
- [39] D.H. Shin, J.Y. Lee, K.Y. Hwang, K.K. Kim, S.W. Suh, High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings, *Structure* 3 (1995) 189–199.
- [40] J.W. Ponder, F.M. Richards, Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 775–791.
- [41] M.T. Mas, K.C. Smith, D.L. Yarmush, K. Aisaka, R.M. Fine, Modeling the anti-CEA antibody combining site by homology and conformational search, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 14 (1992) 483–498.
- [42] A. Roussel, C. Cambillau, in: S.G. Committee (Ed.), TURBO-FRODO, Silicon Graphics Geometry Partners Directory, Silicon Graphics, Mountain View, CA, 1982.
- [43] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemistry of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [44] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 11 (1991) 281–296.
- [45] M.K. Gilson, B.H. Honig, Calculation of electrostatic potential in an enzymic active site, *Nature* 330 (1987) 84–86.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



L'analyse structurale et fonctionnelle des LTP de fruits, de pomme (Mal d 3) et de pêche (Pru p 3) en particulier, nous a permis de préciser l'emplacement des épitopes liant les IgE (épitopes B) sur la surface moléculaire de ces allergènes.

Une combinaison de plusieurs méthodes prédictives incluant 1) les profils hydrophatiques (échelle d'hydrophilicité de Kyte et Doolittle), 2) l'accessibilité au solvant (échelle de Richards), 3) l'index antigénique (échelle de Hopp et Woods), 4) l'analyse des clusters hydrophobes (profils HCA), 5) l'existence de résidus chargés (électropositifs - Arg et Lys - et/ou électronégatifs - Asp et Glu -) dans les segments de séquence identifiés, nous a permis de prédire avec une fiabilité satisfaisante l'emplacement des régions épitopiques des LTP. La construction des modèles tri-dimensionnels de ces allergènes nous a ensuite permis d'affiner la prédiction pour ne retenir que les régions suffisamment exposées à la surface des allergènes. L'existence d'un épitope consensuel, fortement conservé dans toutes les séquences de LTP de fruits, a pu ainsi être suspectée puis vérifiée à l'aide de réaction d'inhibition de l'interaction LTP-sérum de patient allergique par l'épitope consensuel synthétique.

La détermination des cartes épitopiques réalisée ultérieurement sur les LTP de pomme (Mal d 3), de pêche (Pru p 3), d'abricot (Pru ar 3) et de prune (Pru d 3), nous a permis de délimiter plus précisément les régions épitopiques sur la surface moléculaire de ces allergènes. Pour la plupart d'entre elles, ces régions coïncident assez bien avec celles prédites précédemment. L'existence d'un second épitope consensuel a pu être proposée grâce à l'analyse de surface des modèles tri-dimensionnels et aux comparaisons de séquences primaires effectuées initialement. Les deux épitopes consensuels, dont la conformation s'avère très conservée parmi les LTP de fruits, expliquent parfaitement l'existence des réactions croisées fréquemment observées entre différentes LTP de fruits.

Les analyses de surface montrent également que la plupart des régions épitopiques prédites et/ou caractérisées sont largement contiguës et sont de ce fait susceptibles de créer des épitopes plus étendus. Cette observation rejoint les résultats de l'analyse structurale de divers complexes antigène-anticorps qui montrent une interaction du paratope avec des

acides aminés localisés sur des éléments de structure secondaires discontinus mais regroupés localement en raison du repliement de la chaîne polypeptidique (notion d'épitopes discontinus). En fait, d'autres complexes antigène-anticorps révèlent l'existence d'une interaction entre le paratope et des résidus appartenant à un même motif de structure secondaire (notion d'épitope continu), en particulier l'interaction récemment observée entre une IgE monoclonale et un allergène recombinant (Niemi et al., 2007). En réalité, cette distinction n'a de sens que rapportée aux séquences primaires mais n'offre que peu d'intérêt au plan structural. En effet, deux acides aminés éloignés l'un de l'autre le long d'un fragment de séquence continu peuvent très bien se regrouper si, par exemple, une conformation en boucle de ce segment les rapproche.

En prolongement de ces résultats, il serait intéressant d'étudier le devenir des régions épitopiques ainsi caractérisées suite à une attaque protéolytique par les enzymes digestives (pepsine, trypsine, chymotrypsine) car, au total, ce sont les fragments protéiques ainsi générés qui seront reconnus par le système immunitaire périphérique du tractus gastro-intestinal. Bien que les LTP de fruits résistent parfaitement à la dénaturation thermique et à la protéolyse enzymatique, il serait intéressant de prédire les fragments générés par les différentes protéases digestives, voire de les caractériser après traitement des allergènes purifiés par des protéases ou un mélange de protéases. Des prédictions préliminaires réalisées dans ce sens indiquent que certaines régions épitopiques seulement échappent suffisamment à la protéolyse pour être reconnues par le système immunitaire.

L'étude détaillée de la localisation et du dosage des LTP à l'aide d'IgG polyclonales de Lapins dans les différentes parties (peau et pulpe) des fruits indique 1) une localisation cellulaire superficielle: présence à l'interface membrane plasmique-paroi squelettique ou localisation pariétale, 2) une localisation tissulaire essentiellement de surface (peau des fruits) surtout dans la pomme et la pêche, beaucoup moins dans la prune, 3) des variations importantes de la teneur en allergènes de la peau en fonction des variétés de pomme étudiées. Ces observations mettent en lumière l'accessibilité des LTP vis à vis du système immunitaire qui constitue probablement un facteur d'allergénicité de ces protéines. Les variations considérables de teneurs en LTP mesurées entre les cultivars de pomme,

confirmées depuis par d'autres séries de dosages, peuvent constituer un élément de conseil pour l'Allergologue qui pourra proscrire la consommation de certaines variétés particulièrement riches en LTP (Granny Smith ou Golden Delicious) et recommander systématiquement l'épluchage des fruits en vue d'une consommation modérée. En outre, la localisation abondante des LTP dans le revêtement duveteux qui recouvre les pêches légitime la recommandation d'éviter tout contact avec des pêches faite aux patients fortement allergiques par les Allergologues Espagnols. Des dosages identiques menées actuellement dans l'équipe sur d'autre allergènes de fruits (Protéines Thaumatin-Like ou TLP, endo- $\beta$ 1,3-glucanase) semblent conduire à des constatations identiques. En outre, les premières analyses effectuées sur des fruits issus de l'Agriculture biologique, actuellement très en vogue, donnent jusqu'à présent des résultats discordants. Selon les cas, ces fruits sont plus riches ou moins riches en LTP. Ces mesures doivent être réalisées sur un plus grand nombre d'échantillons pour aboutir à des conclusions plus solides. En théorie, la synthèse des LTP, qui sont impliquées dans les processus de défense des plantes en tant que protéines PR (pour Pathogenesis-Related), pourraient être davantage stimulées par les phytopathogènes dans les fruits issues de l'Agriculture biologique dont le cahier des charges (utilisation de pesticides, d'insecticides) diffère notablement de celui des fruits provenant de l'Agriculture industrielle. Inversement, on peut considérer qu'un épandage excessif d'insecticides ou de pesticides est perçu comme une agression par la plante qui, en retour, déclenchera une synthèse plus importante de protéines PR. Il faut aussi se rappeler que les LTP de fruits sont des protéines constitutives et, qu'à ce titre, elles correspondent plus à des protéines "PR-like" qu'à de véritables protéines PR qui sont toujours inductibles.

L'expression de LTP recombinantes (rMal d 3 et rPru p 3) dans le colibacille sous forme soluble, correctement repliée et donc parfaitement fonctionnelle, constitue une avancée intéressante pour produire des allergènes standardisés utilisables pour le diagnostic des allergies alimentaires (dosages immunologiques, tests cutanés). Elle devrait permettre d'obtenir, par mutagenèse dirigée, des LTP recombinantes hypoallergéniques susceptibles d'être utilisées pour désensibiliser les patients allergiques. En fait, le tableau clinique de l'allergie à la pêche ou à la pomme est très différent suivant les pays ou les régions. En France en particulier, cette approche n'offre que peu d'intérêt dans la mesure où les

manifestations allergiques aux fruits sont essentiellement bénignes. Par contre, dans les pays Méditerranéens (Espagne, Italie), des accidents graves consécutifs à l'ingestion ou même, au simple contact avec des fruits, sont à déplorer et pourraient justifier une telle approche thérapeutique. De ce point de vue, il sera nécessaire de s'assurer de la conservation des épitopes T dont l'interaction avec la corbeille du CMH II doit être préservée pour qu'ils puissent être utilisés dans un traitement désensibilisant. En outre, la mise en oeuvre d'une approche technologique aussi lourde doit être appréciée à la lumière des résultats obtenus dans le domaine de la désensibilisation. En effet, les premiers résultats de désensibilisation par voie sublinguale basés sur l'utilisation d'allergènes recombinants natifs semblent suffisamment probants et dépourvus d'effets secondaires importants pour qu'un recours à des hypoallergènes recombinants soit souhaitable dans tous les cas. Le recul que l'on possède actuellement sur l'efficacité et l'inocuité de cette voie de désensibilisation semble insuffisant pour pouvoir trancher.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





## A

- Ahrazem O, Ibáñez MD, López-Torrejón G, Sánchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, Barber D and Salcedo G (2005). Lipid transfer proteins and allergy to oranges. **Int Arch Allergy Immunol** 137, 201-210.
- Alexander C, Tarzi M, Larché M and Kay AB (2005). The effect of Fel d 1-derived T-cell peptides on upper and lower airway outcome measurements in cat-allergic subjects. **Allergy** 60, 1269-1274.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 215, 403-410.
- Arondel V, Tchang F, Baillet B, Vignols F, Grellet F, Delseny M, Kader JC and Puigdomènech P (1991). Multiple mRNA coding for phospholipid-transfer protein from *Zea mays* arise from alternative splicing. **Gene** 99, 133-136.
- Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, Verbeek E, Mohammadi T, Knul-Brettlova V, Akkerdaas JH, Bulder I, Aalberse RC and van Ree R (2000). Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. **Int Arch Allergy Immunol** 122, 20-32.
- Asero R, Mistrello G, Amato S, Roncarolo D, Martinelli A and Zaccarini M (2006). Peach fuzz contains large amounts of lipid transfer protein: is this the cause of the high prevalence of sensitization to LTP in Mediterranean countries?. **Allerg Immunol (Paris)** 38, 118-121.
- Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Conti A, Dubakiene R, Fernandez-Rivas M, Hoffmann-Sommergruber K, Lidholm J, Mustakov T, Oude Elberink JNG, Pumphrey RSH, Stahl Skov P, van Ree R, Vlieg-Boerstra BJ, Hiller R, Hourihane JO, Kowalski M, Papadopoulos NG, Wal J, Mills ENC and Vieths S (2007). IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. **Mol Nutr Food Res** 51, 135-147.
- Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, Ogier V, Petit N, Proust B, Moneret-Vautrin DA, Burks AW, Bihain B, Sampson HA and Kanny G (2006). Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. **J Allergy Clin Immunol** 118(1), 250-256.
- Asturias JA, Gómez-Bayón N, Arilla MC, Sánchez-Pulido L, Valencia A and Martínez A (2002). Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies. **Int Immunol** 14, 993-1001.
- Asturias JA, Gómez-Bayón N, Eseverri JL and Martínez A (2003). Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes. **Clin Exp Allergy** 33, 518-524.
- Ayuso R, Carreira J, Lombardero M, Duffort O, Peris A, Basomba A and Polo F (1993). Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j I isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. **Mol Immunol** 30, 1347-1354.

- Ayuso R, Carreira J and Polo F (1995). Quantitation of the major allergen of several *Parietaria pollens* by an anti-Par 1 monoclonal antibody-based ELISA. Analysis of crossreactivity among purified Par j 1, Par o 1 and Par m 1 allergens. **Clin Exp Allergy** 25, 993-999

## B

- Ballmer-Weber BK, Lidholm J, Vieths S (2007). Recombinant allergens in the diagnosis of food allergy: Which are the advantages ?. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique** 47, 126-128.

- Banham AH (2006). Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. **Trends Immunol** 27, 541-544.

- Barre A, Borges JP and Rougé P (2005a). Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. **Biochimie** 87, 499-506.

- Barre A, Borges JP and Rougé P (2005b). Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. **Biochimie** 87, 499-506.

- Bashyam H (2007). Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. **J Exp Med** 204, 237.

- Beezhold DH, Hickey VL, Kostyal DA, Puhl H, Zuidmeer L, van Ree R and Sussman GL (2003). Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. **Ann Allergy Asthma Immunol** 90, 439-445.

- Besler M, Steinhart H and Paschke A (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl** 756, 207-228.

- Blank U, Ra CS and Kinet JP (1991). Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. **J Biol Chem** 266, 2639-2646.

- Blein J, Coutos-Thévenot P, Marion D and Ponchet M (2002). From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. **Trends Plant Sci** 7, 293-296.

- Bolhaar STHP, Tiemessen MM, Zuidmeer L, van Leeuwen A, Hoffmann-Sommergruber K, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Taams LS, Knol EF, van Hoffen E, van Ree R and Knulst AC (2004). Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. **Clin Exp Allergy** 34, 761-769.

- Borges JP, Barre A, Culerrier R, Archimbaud N, Didier A and Rougé P (2007). How reliable is the structural prediction of IgE-binding epitopes of allergens? The case study of plant lipid transfer proteins. **Biochimie** 89, 83-91.
- Botturi K, Vervloet D and Magnan A (2007). T cells and allergens relationships: are they that specific?. **Clinical & Experimental Allergy Journal Compilation**, 1-3.
- Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Bousquet PJ, Colombo P, Crameri R, Daëron M, Fokkens W, Leynaert B, Lahoz C, Maurer M, Passalacqua G, Valenta R, van Hage M and Van Ree R (2006). Factors responsible for differences between asymptomatic subjects and patients presenting an IgE sensitization to allergens. A GA2LEN project. **Allergy** 61, 671-680.
- Bredehorst R and David K (2001). What establishes a protein as an allergen?. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl** 756, 33-40.
- Breiteneder H and Ebner C (2001). Atopic allergens of plant foods. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 1, 261-267.
- Breiteneder H and Radauer C (2004). A classification of plant food allergens. **J Allergy Clin Immunol** 113, 821-30; quiz 831.
- Breiteneder H and Mills C (2005). Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 5, 275-279.
- Breiteneder H and Mills C (2006). Structural bioinformatic approaches to understand cross-reactivity. **Mol Nutr Food Res** 50, 628-632.
- Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L and Pastorello EA (2000). Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. **J Agric Food Chem** 48, 493-497.
- Brenna OV, Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V and Pompei C (2004). Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. **J Agric Food Chem** 52, 7997-8000.
- Bublin M, Mari A, Ebner C, Knulst A, Scheiner O, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H and Radauer C (2004). IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries. **J Allergy Clin Immunol** 114, 1169-1175.
- Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, Milat ML, Ponchet M, Mikès V, Kader JC and Blein JP (2001). A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. **FEBS Lett** 509, 27-30.
- Buhot N, Gomès E, Milat M, Ponchet M, Marion D, Lequeu J, Delrot S, Coutos-Thévenot P and Blein J (2004). Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. **Mol Biol Cell** 15, 5047-5052.

- Burnette WN (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal Biochem** 112, 195-203.

## C

- Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B and Mornon JP (1997). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. **Cell Mol Life Sci** 53, 621-645.

- Cammue BP, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbet F, Kader JC and et al. (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiol** 109, 445-455.

- Carnés J, Fernández-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A and Cuesta-Herranz J (2002). Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. **Allergy** 57, 1071-1075.

- Carvalho ADO and Gomes VM (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. **Peptides** 28, 1144-1153.

- Castro MS, Gerhardt IR, Orrù S, Pucci P and Bloch CJ (2003). Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 794, 109-114.

- Chang TW, Wu PC, Hsu CL and Hung AF (2007). Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. **Adv Immunol** 93, 63-119.

- Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H and Ferreira F (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. **J Allergy Clin Immunol** 119, 414-420.

- Cheng C, Samuel D, Liu Y, Shyu J, Lai S, Lin K and Lyu P (2004). Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. **Biochemistry** 43, 13628-13636.

- Chou PY and Fasman GD (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 47, 45-148.

- Cocco RR, Järvinen K, Han N, Beyer K and Sampson HA (2007). Mutational analysis of immunoglobulin E-binding epitopes of beta-casein and beta-lactoglobulin showed a heterogeneous pattern of critical amino acids between individual patients and pooled sera. **Clin Exp Allergy** 37, 831-838.

- Coffman RL (2006). Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nat Immunol** 7, 539-541.

- Costa MA, Colombo P, Izzo V, Kennedy H, Venturella S, Cocchiara R, Mistrello G, Falagiani P and Geraci D (1994). cDNA cloning, expression and primary structure of Par jI, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. **FEBS Lett** 341, 182-186.

- Cuesta-Herranz J, Lázaro M, de las Heras M, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A, Hernandez J and Cuesta C (1998). Peach allergy pattern: experience in 70 patients. **Allergy** 53, 78-82.

## D

- Dayhoff MO, Barker WC and Hunt LT (1983). Establishing homologies in protein sequences. **Methods Enzymol** 91, 524-545.

- de Blok BMJ, Vlieg-Boerstra BJ, Oude Elberink JNG, Duiverman EJ, Dunngalvin A, Hourihane JO, Cornelisse-Vermaat JR, Frewer L, Mills C and Dubois AEJ (2007). A framework for measuring the social impact of food allergy across Europe: a EuroPrevall state of the art paper. **Allergy** 62, 733-737.

- De Lorenzo G, D'Ovidio R and Cervone F (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annu Rev Phytopathol** 39, 313-335.

- Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Pernas M, Fernández-Rivas M, Barber D and Salcedo G (2000). Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. **Clin Exp Allergy** 30, 1403-1410.

- Díaz-Perales A, Tabar AI, Sánchez-Monge R, García BE, Gómez B, Barber D and Salcedo G (2002). Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. **J Allergy Clin Immunol** 110, 790-796.

- Diz MSS, Carvalho AO, Rodrigues R, Neves-Ferreira AGC, Da Cunha M, Alves EW, Okorokova-Façanha AL, Oliveira MA, Perales J, Machado OLT and Gomes VM (2006). Antimicrobial peptides from chili pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochim Biophys Acta** 1760, 1323-1332.

- Dodo HW, Konan KN, Chen FC, Egnin M and Viquez OM (2007). Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. **Plant Biotechnol J** , .

- Douliez JP, Pato C, Rabesona H, Mollé D and Marion D (2001). Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. **Eur J Biochem** 268, 1400-1403.

- Dubreil L, Gaborit T, Bouchet B, Gallant DJ, Broekaert WF, Quillien L and Marion D (1998). Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of

Triticum aestivum seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. **Plant Science** 138(2), 121-135.

- Dubuisson C, La Vieille S and Martin A (2002). Allergies alimentaires : état des lieux et propositions d'orientation (AFSSA). , .

- Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, García-Casado G, Salcedo G and Barber D (2002). Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. **J Agric Food Chem** 50, 7738-7741.

- Dunwell JM, Khuri S and Gane PJ (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. **Microbiol Mol Biol Rev** 64, 153-179.

- Duro G, Colombo P, Costa MA, Izzo V, Porcasi R, Di Fiore R, Locorotondo G, Mirisola MG, Cocchiara R and Geraci D (1996). cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the Parietaria judaica pollen. **FEBS Lett** 399, 295-298.

## E

- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K and Pikaard CS (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. **Plant J** 45, 616-629.

- Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, Kraft D and Scheiner O (1995). Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). **J Allergy Clin Immunol** 95, 962-969.

- Enerbäck L (1997). The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the allergic response: mast cells and basophils. **Allergy** 52, 4-10.

- Eriksson NE, Formgren H and Svenonius E (1982). Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. **Allergy** 37, 437-443.

## F

- Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R and Almo SC (1997). The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. **Structure** 5, 33-45.

- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science** 246, 64-71.

- Fernández-Rivas M, van Ree R and Cuevas M (1997). Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. **J Allergy Clin Immunol** 100, 728-733.
- Fernández-Rivas M, González-Mancebo E, Rodríguez-Pérez R, Benito C, Sánchez-Monge R, Salcedo G, Alonso MD, Rosado A, Tejedor MA, Vila C and Casas ML (2003). Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. **J Allergy Clin Immunol** 112, 789-795.
- Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, Ma Y, Ebner C, Rigby N, Sancho AI, Miles S, Zuidmeer L, Knulst A, Breiteneder H, Mills C, Hoffmann-Sommergruber K and van Ree R (2006). Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. **J Allergy Clin Immunol** 118, 481-488.
- Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ, Grimm R, Jahn-Schmid B, Breiteneder H, Kraft D, Breitenbach M, Rheinberger HJ and Scheiner O (1998). Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. **FASEB J** 12, 231-242.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 391, 806-811.
- Frank R (2002). The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. **J Immunol Methods** 267, 13-26.
- Frew AJ (2007). How does sublingual immunotherapy work?. **J Allergy Clin Immunol** 120, 533-536.

## G

- Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T and Mornon JP (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. **FEBS Lett** 224, 149-155.
- García-Casado G, Crespo JF, Rodríguez J and Salcedo G (2001). Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. **J Allergy Clin Immunol** 108, 647-649.
- García-Casado G, Pacios LF, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Selles FJ, Polo F, Barber D and Salcedo G (2003). Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. **J Allergy Clin Immunol** 112, 599-605.
- García-Garrido JM, Menossi M, Puigdoménech P, Martínez-Izquierdo JA and Delseny M (1998). Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. **FEBS Lett** 428, 193-199.
- García-Sellés FJ, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, Alcántara M, Lombardero M, Barber D, Salcedo G and Fernández-Rivas M (2002). Patterns of reactivity to lipid transfer proteins

of plant foods and Artemisia pollen: an in vivo study. **Int Arch Allergy Immunol** 128, 115-122.

- Ge X, Chen J, Li N, Lin Y, Sun C and Cao K (2003). Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. **J Biochem Mol Biol** 36, 603-607.

- Gell P and Coombs R (1963). Clinical Aspects of Immunology, Vol , edn () .

- Gilissen LJWJ, Bolhaar STHP, Matos CI, Rouwendal GJA, Boone MJ, Krens FA, Zuidmeer L, Van Leeuwen A, Akkerdaas J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Bosch D, Van de Weg WE and Van Ree R (2005). Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. **J Allergy Clin Immunol** 115, 364-369.

- Gincel E, Simorre JP, Caille A, Marion D, Ptak M and Vovelle F (1994). Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers. **Eur J Biochem** 226, 413-422.

- Golden DB (2007). What is anaphylaxis?. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 7, 331-336.

- Gomar J, Sodano P, Sy D, Shin DH, Lee JY, Suh SW, Marion D, Vovelle F and Ptak M (1998). Comparison of solution and crystal structures of maize nonspecific lipid transfer protein: a model for a potential in vivo lipid carrier protein. **Proteins** 31, 160-171.

- Gomez G, Jogie-Brahim S, Shima M and Schwartz LB (2007). Omalizumab Reverses the Phenotypic and Functional Effects of IgE-Enhanced Fc{epsilon}RI on Human Skin Mast Cells. **J Immunol** 179, 1353-1361.

- Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC and Zachowski A (1999a). Comparison of lipid binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. **Biochemistry** 38, 14131-14137.

- Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC and Zachowski A (1999b). Lipid-transfer proteins from plants: structure and binding properties. **Mol Cell Biochem** 192, 157-161.

## H

- Hale IL and Matsumoto B (1993). Resolution of subcellular detail in thick tissue sections: immunohistochemical preparation and fluorescence confocal microscopy. **Methods Cell Biol** 38, 289-324.

- Hakimi J, Seals C, Kondas JA, Pettine L, Danho W and Kochan J (1990). The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding. **J Biol Chem** 265, 22079-22081.

- Han GW, Lee JY, Song HK, Chang C, Min K, Moon J, Shin DH, Kopka ML, Sawaya MR, Yuan HS, Kim TD, Choe J, Lim D, Moon HJ and Suh SW (2001). Structural basis of non-



specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **J Mol Biol** 308, 263-278.

- Hantusch B, Krieger S, Untersmayr E, Schöll I, Knittelfelder R, Flicker S, Spitzauer S, Valenta R, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O and Jensen-Jarolim E (2004). Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library. **J Allergy Clin Immunol** 114, 1294-1300.

- Hartley JL, Temple GF and Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Res** 10, 1788-1795.

- Henikoff JG and Henikoff S (1996). Blocks database and its applications. **Methods Enzymol** 266, 88-105.

- Heredia A (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochim Biophys Acta** 1620, 1-7.

- Hiller KM, Lubahn BC and Klapper DG (1998). Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. **Scand J Immunol** 48, 26-36.

- Hoffmann-Sommergruber K (2002). Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. **Biochem Soc Trans** 30, 930-935.

- Hoffmann-Sommergruber K (2005). The SAFE project: 'plant food allergies: field to table strategies for reducing their incidence in Europe' an EC-funded study. **Allergy** 60, 436-442.

- Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Lund L, Jacobi H, Millner A, Würtzen PA and Spangfort MD (2004). Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. **J Immunol** 173, 5258-5267.

- Hopp TP and Woods KR (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A** 78, 3824-3828.

## I

- Ito K, Inagaki-Ohara K, Murosaki S, Nishimura H, Shimokata T, Torii S, Matsuda T and Yoshikai Y (1997). Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants. **Eur J Immunol** 27, 3427-3437.

## J

- Jang CS, Lee HJ, Chang SJ and Seo YW (2004). Expression and promoter analysis of the TaLTP1 gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science** 167, 995-1001.

- Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H and Mills ENC (2005). Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. **J Allergy Clin Immunol** 115, 163-170.
- Jung HW, Kim W and Hwang BK (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. **Plant Cell Environ** 26, 915-928.
- Jung HW, Kim KD and Hwang BK (2005). Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic Arabidopsis against pathogen and environmental stresses. **Planta** 221, 361-373.
- Jung HW, Lim CW, Lee SC, Choi HW, Hwang CH and Hwang BK (2007). Distinct roles of the pepper hypersensitive induced reaction protein gene CaHIR1 in disease and osmotic stress, as determined by comparative transcriptome and proteome analyses. **Planta** , .

## K

- Kader JC (1975). Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. **Biochim Biophys Acta** 380, 31-44.
- Kader J (1996). LIPID-TRANSFER PROTEINS IN PLANTS. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 47, 627-654.
- Kaiserlian D, Lachaux A, Grosjean I, Graber P and Bonnefoy JY (1993). Intestinal epithelial cells express the CD23/Fc epsilon RII molecule: enhanced expression in enteropathies. **Immunology** 80, 90-95.
- Kalla R, Shimamoto K, Potter R, Nielsen PS, Linnestad C and Olsen OA (1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. **Plant J** 6, 849-860.
- Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M and Thevenin F (2001). Population study of food allergy in France. **J Allergy Clin Immunol** 108, 133-140.
- Karplus M (1984). Dynamics of proteins. **Adv Biophys** 18, 165-190.
- Katoh N, Kraft S, Wessendorf JH and Bieber T (2000). The high-affinity IgE receptor (FcepsilonRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. **J Clin Invest** 105, 183-190.
- Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A, Spitzauer S, Fröschl R, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Scheiner O, Kraft D and Valenta R (2000). Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. **J Allergy Clin Immunol** 105, 116-125.

- Kelly SM, Jess TJ and Price NC (2005). How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta** 1751, 119-139.
- Kerzl R, Simonowa A, Ring J, Ollert M and Mempel M (2007). Life-threatening anaphylaxis to kiwi fruit: protective sublingual allergen immunotherapy effect persists even after discontinuation. **J Allergy Clin Immunol** 119, 507-508.
- King TP, Hoffman D, Løwenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TA and Thomas W (1995). Allergen nomenclature. **Allergy** 50, 765-774.
- Köhler G and Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256, 495-497.
- Kreis M, Forde BG, Rahman S, Mifflin BJ and Shewry PR (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **J Mol Biol** 183, 499-502.
- Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Jones H, Umland SP, Kreutner W, Egan RW and Chapman RW (1995). Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol** 12, 404-409.
- Kyte J and Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol** 157, 105-132.

## L

- Lajoix A, Gross R, Aknin C, Dietz S, Granier C and Laune D (2004). Cellulose membrane supported peptide arrays for deciphering protein-protein interaction sites: the case of PIN, a protein with multiple natural partners. **Mol Divers** 8, 281-290.
- Laune D, Molina F, Ferrières G, Villard S, Bès C, Rieunier F, Chardès T and Granier C (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **J Immunol Methods** 267, 53-70.
- Larché M (2007). Peptide immunotherapy for allergic diseases. **Allergy** 62, 325-331.
- Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D, Cistero-Bahima A, Vieths S and Scheurer S (2007). Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. **Clin Exp Allergy** 37, 261-269.
- Lavaud F, Sabouraud D, Deschamps F and Perdu D (1997). Crossreactions involving natural rubber latex. **Clin Rev Allergy Immunol** 15, 429-447.
- Le LQ, Lorenz Y, Scheurer S, Fötisch K, Enrique E, Bartra J, Biemelt S, Vieths S and Sonnewald U (2006). Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. **Plant Biotechnol J** 4, 231-242.

- Lee B and Richards FM (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. **J Mol Biol** 55, 379-400.
- Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY and Suh SW (1998). Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. **J Mol Biol** 276, 437-448.
- Lemesle-Varloot L, Henrissat B, Gaboriaud C, Bissery V, Morgat A and Mornon JP (1990). Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. **Biochimie** 72, 555-574.
- Leurs R, Church MK and Taglialatela M (2002). H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Clin Exp Allergy** 32, 489-498.
- Levitt M (1976). A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. **J Mol Biol** 104, 59-107.
- Lin K, Liu Y, Hsu SD, Samuel D, Cheng C, Bonvin AMJJ and Lyu P (2005). Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. **Biochemistry** 44, 5703-5712.
- Lindorff-Larsen K and Winther JR (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. **FEBS Lett** 488, 145-148.
- Liu Y, Samuel D, Lin C and Lyu P (2002). Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **Biochem Biophys Res Commun** 294, 535-540.
- Lombardero M, García-Sellés FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, García-Casado G, Sánchez-Monge R, Díaz-Perales A, Salcedo G and Barber D (2004). Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. **Clin Exp Allergy** 34, 1415-1421.

## M

- Magnan A and Humbert M (2005). Is deficient tolerance the true paradigm for atopic diseases?. **Clin Exp Allergy** 35, 1507-1510.
- Magnani E, Bartling L and Hake S (2006). From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. **BMC Mol Biol** 7, 46.
- Malandain H (2003). [Allergies associated with both food and pollen]. **Allerg Immunol (Paris)** 35, 253-256.
- Malandain H, Lavaud F (2004). Allergénicité des protéines de défense végétale. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique** 44, 469-475.

- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ and Cameron RK (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature** 419, 399-403.
- Marzban G, Puerhinger H, Dey R, Brynda S, Ma Y, Martinelli A, Zaccarini M, van der Weg E, Housley Z, Kolarich D, Altmann F and Laimer M (2005). Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. **Plant Sci** 169, 387-394.
- Mas MT, Smith KC, Yarmush DL, Aisaka K and Fine RM (1992). Modeling the anti-CEA antibody combining site by homology and conformational search. **Proteins** 14, 483-498.
- Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Panabières F, Ricci P and Blein JP (1998). Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. **Biochem Biophys Res Commun** 245, 133-139.
- Mills ENC, Mackie AR, Burney P, Beyer K, Frewer L, Madsen C, Botjes E, Crevel RWR and van Ree R (2007). The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. **Allergy** 62, 717-722.
- Molina A, Segura A and García-Olmedo F (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Lett** 316, 119-122.
- Molina A and García-Olmedo F (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. **Plant J** 12, 669-675.
- Molina C (1995). L'allergie à l'aube du troisième millénaire. **John Libbey Eurotext** , .
- Moneret-Vautrin DA (2006). Les plantes transgéniques (OGM végétaux): connaissances et inconnues sur les risques d'allergénicité.. **Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique** 46, 85-91.
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P and Cassagne C (1998). Lipid trafficking in plant cells. **Prog Lipid Res** 37, 371-391.
- Moreland N, Ashton R, Baker HM, Ivanovic I, Patterson S, Arcus VL, Baker EN and Lott JS (2005). A flexible and economical medium-throughput strategy for protein production and crystallization. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 61, 1378-1385.
- Mosmann TR and Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today** 17, 138-146.
- Murray JS (1998). How the MHC selects Th1/Th2 immunity. **Immunol Today** 19, 157-163.

## N

- Neudecker P, Lehmann K, Nerkamp J, Haase T, Wangorsch A, Fötisch K, Hoffmann S, Rösch P, Vieths S and Scheurer S (2003). Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1,

the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. **Biochem J** 376, 97-107.

- Niederberger V, Reisinger J, Valent P, Krauth M, Pauli G, van Hage M, Cromwell O, Horak F and Valenta R (2007). Vaccination with genetically modified birch pollen allergens: immune and clinical effects on oral allergy syndrome. **J Allergy Clin Immunol** 119, 1013-1016.

- Niemi M, Jylhä S, Laukkanen M, Söderlund H, Mäkinen-Kiljunen S, Kallio JM, Hakulinen N, Haahtela T, Takkinen K and Rouvinen J (2007). Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. **Structure** 15, 1413-1421.

- Novak N, Bieber T and Katoh N (2001a). Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. **J Immunol** 167, 797-804.

- Novak N, Kraft S and Bieber T (2001b). IgE receptors. **Curr Opin Immunol** 13, 721-726.

- Nozaki Y and Tanford C (1971). The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. **J Biol Chem** 246, 2211-2217.

- Nürnberger T and Brunner F (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Curr Opin Plant Biol** 5, 318-324.

## O

- Oreste U, Coscia MR, Scotto d'Abusco A, Santonastaso V and Ruffilli A (1991). Purification and characterization of Par o I, major allergen of *Parietaria officinalis* pollen. **Int Arch Allergy Appl Immunol** 96, 19-27.

- Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A and Ansaloni R (1988). The oral allergy syndrome. **Ann Allergy** 61, 47-52.

- Ouchterlony O (1958). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **Prog Allergy Vol. 5**, 1-78.

## P

- Palacín A, Cumplido J, Figueroa J, Ahrazem O, Sánchez-Monge R, Carrillo T, Salcedo G and Blanco C (2006). Cabbage lipid transfer protein Bra o 3 is a major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens. **J Allergy Clin Immunol** 117, 1423-1429.

- Papageorgiou PS (2002). Clinical aspects of food allergy. **Biochem Soc Trans** 30, 901-906.
- Park C, Shin R, Park JM, Lee G, You J and Paek K (2002). Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. **Plant Mol Biol** 48, 243-254.
- Pasquato N, Berni R, Folli C, Folloni S, Cianci M, Pantano S, Helliwell JR and Zanotti G (2006). Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens. **J Mol Biol** 356, 684-694.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, Baroglio C, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C and Conti A (1999). The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. **J Allergy Clin Immunol** 103, 520-526.
- Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida G, Monza M, Ansaloni R, Fortunato D, Scibola E, Rivolta F, Incorvaia C, Bengtsson A, Conti A and Ortolani C (2000a). Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. **J Allergy Clin Immunol** 105, 371-377.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C, Giuffrida MG, Ansaloni R, Godovac-Zimmermann J, Conti A, Fortunato D and Ortolani C (2000b). The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. **J Allergy Clin Immunol** 106, 744-751.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, Trambaioli C, Scibola E, Calamari AM, Robino AM and Conti A (2001). Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl** 756, 95-103.
- Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, Lüttkopf D, Calamari M, Ansaloni R, Scibilia J, Ballmer-Weber BK, Poulsen LK, Wütrich B, Hansen KS, Robino AM, Ortolani C and Conti A (2002). Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. **J Allergy Clin Immunol** 109, 563-570.
- Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Conti A, Ispano M, Fortunato D, Bengtsson A and Bianchi M (2002). Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression. **J Allergy Clin Immunol** 110, 310-317.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, Perono Garoffo L, Calamari AM, Brenna O and Conti A (2003). Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. **J Allergy Clin Immunol** 111, 350-359.
- Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S and Ortolani C (2003). Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. **J Allergy Clin Immunol** 112, 775-783.

- Pastorello EA and Robino AM (2004). Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. **Mol Nutr Food Res** 48, 356-362.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Robino AM, Scibilia J, Fortunato D, Conti A, Borgonovo L, Bengtsson A and Ortolani C (2004). Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. **J Allergy Clin Immunol** 114, 908-914.
- Pelèse-Siebenbourg F, Caelles C, Kader JC, Delseny M and Puigdomènech P (1994). A pair of genes coding for lipid-transfer proteins in Sorghum vulgare. **Gene** 148, 305-308.
- Peng Z, Liu Q, Wang Q, Rector E, Ma Y and Warrington R (2007). Novel IgE peptide-based vaccine prevents the increase of IgE and down-regulates elevated IgE in rodents. **Clin Exp Allergy** 37, 1040-1048.
- Petrey D and Honig B (2003). GRASP2: visualization, surface properties, and electrostatics of macromolecular structures and sequences. **Methods Enzymol** 374, 492-509.
- Ponchet M, Panabières F, Milat M-L, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y and Blein JP (1999). Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications?. **Cell Mol Life Sci** 56, 1020-1047.
- Ponder JW and Richards FM (1987). Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. **J Mol Biol** 193, 775-791.
- Presta LG, Lahr SJ, Shields RL, Porter JP, Gorman CM, Fendly BM and Jardieu PM (1993). Humanization of an antibody directed against IgE. **J Immunol** 151, 2623-2632.
- Pyee J, Yu H and Kolattukudy PE (1994). Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. **Arch Biochem Biophys** 311, 460-468.

## R

- Rancé F (2007). Diagnostic and therapeutic management of food allergies in children. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique** 46, S22-S26.
- Reineke U, Sabat R, Volk HD and Schneider-Mergener J (1998). Mapping of the interleukin-10/interleukin-10 receptor combining site. **Protein Sci** 7, 951-960.
- Reljić R, Cosentino G and Gould HJ (1997). Function of CD23 in the response of human B cells to antigen. **Eur J Immunol** 27, 572-575.
- Reuter M, Schneider-Mergener J, Kupper D, Meisel A, Mackeldanz P, Krüger DH and Schroeder C (1999). Regions of endonuclease EcoRII involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires. **J Biol Chem** 274, 5213-5221.



- Riffo-Vasquez Y, Pitchford S and Spina D (2000). Murine models of inflammation: role of CD23. **Allergy** 55 Suppl 61, 21-26.
- Risler JL, Delorme MO, Delacroix H and Henaut A (1988). Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new and efficient scoring matrix. **J Mol Biol** 204, 1019-1029.
- Roebber M, Hussain R, Klapper DG and Marsh DG (1983). Isolation and properties of a new short ragweed pollen allergen, Ra6. **J Immunol** 131, 706-711.
- Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Mehl A, Hamelmann E, Beyer K and Niggemann B (2005). Specific oral tolerance induction with food in children: transient or persistent effect on food allergy?. **Allergy** 60, 1320-1322.

## S

- Saini SS and MacGlashan D (2002). How IgE upregulates the allergic response. **Curr Opin Immunol** 14, 694-697.
- Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G and Barber D (2004). Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. **Clin Exp Allergy** 34, 1336-1341.
- Salcedo G, Sánchez-Monge R, Barber D and Díaz-Perales A (2007). Plant non-specific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy. **Biochim Biophys Acta** 1771, 781-791.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol , edn (2).
- Samuel D, Liu Y, Cheng C and Lyu P (2002). Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **J Biol Chem** 277, 35267-35273.
- San Miguel-Moncín M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, Cisteró-Bahíma A and Vieths S (2003). Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. **Allergy** 58, 511-517.
- Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D and Salcedo G (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. **J Allergy Clin Immunol** 103, 514-519.
- Sánchez-Monge R, Blanco C, López-Torrejón G, Cumplido J, Recas M, Figueroa J, Carrillo T and Salcedo G (2006). Differential allergen sensitization patterns in chestnut allergy with or without associated latex-fruit syndrome. **J Allergy Clin Immunol** 118, 705-710.
- Schatten G and Pawley JB (1988). Advances in optical, confocal, and electron microscopic imaging for biomedical researchers. **Science** 239, G164,G48.

- Scheurer S, Pastorello EA, Wangorsch A, Kästner M, Hausteiner D and Vieths S (2001). Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. **J Allergy Clin Immunol** 107, 724-731.
- Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel Moncin M, Retzek M, Hartz C, Enrique E, Lidholm J, Cistero-Bahima A and Vieths S (2004). Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. **J Allergy Clin Immunol** 114, 900-907.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, Shevchenko A, Mortensen P and Mann M (1996). A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. **Biochem Soc Trans** 24, 893-896.
- Segura A, Moreno M and García-Olmedo F (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of Arabidopsis and spinach. **FEBS Lett** 332, 243-246.
- Sharma S, Kumar P, Betzel C and Singh TP (2001). Structure and function of proteins involved in milk allergies. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl** 756, 183-187.
- Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK and Suh SW (1995). High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. **Structure** 3, 189-199.
- Shin DS, Compadre CM, Maleki SJ, Kopper RA, Sampson H, Huang SK, Burks AW and Bannon GA (1998). Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. **J Biol Chem** 273, 13753-13759.
- Sicherer SH and Leung DYM (2007). Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. **J Allergy Clin Immunol** 119, 1462-1469.
- Siebenhaar F, Kühn W, Zuberbier T and Maurer M (2007). Successful treatment of cutaneous mastocytosis and Ménière disease with anti-IgE therapy. **J Allergy Clin Immunol** 120, 213-215.
- Simons FER (2004). Advances in H1-antihistamines. **N Engl J Med** 351, 2203-2217.
- Sinha N, Mohan S, Lipschultz CA and Smith-Gill SJ (2002). Differences in electrostatic properties at antibody-antigen binding sites: implications for specificity and cross-reactivity. **Biophys J** 83, 2946-2968.
- Sodano P, Caille A, Sy D, de Person G, Marion D and Ptak M (1997). <sup>1</sup>H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. **FEBS Lett** 416, 130-134.
- Soufleri IA, Vergnolle C, Miginiac E and Kader JC (1996). Germination-specific lipid transfer protein cDNAs in Brassica napus L. **Planta** 199, 229-237.
- Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A and De Vries SC (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. **Plant Cell** 3, 907-921.

- Subirade M, Salesse C, Marion D and Pézolet M (1995). Interaction of a nonspecific wheat lipid transfer protein with phospholipid monolayers imaged by fluorescence microscopy and studied by infrared spectroscopy. **Biophys J** 69, 974-988.

## T

- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y and Yoshida T (1988). Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 2(8), 151-153.

- Tassin S, Broekaert WF, Marion D, Acland DP, Ptak M, Vovelle F and Sodano P (1998). Solution structure of Ace-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. **Biochemistry** 37, 3623-3637.

- Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A and Rabilloud T (2003). A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. **Electrophoresis** 24, 1787-1794.

- Taudou G, Varin-Blank N, Jouin H, Marchand F, Weyer A and Blank U (1993). Expression of the alpha chain of human Fc epsilon RI in transfected rat basophilic leukemia cells: functional activation after sensitization with human mite-specific IgE. **Int Arch Allergy Immunol** 100, 344-350.

- Tejera ML, Villalba M, Batanero E and Rodríguez R (1999). Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. **J Allergy Clin Immunol** 104, 797-802.

- Texier C, Pouvelle S, Busson M, Hervé M, Charron D, Ménez A and Maillère B (2000). HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. **J Immunol** 164, 3177-3184.

- Thoma S, Hecht U, Kippers A, Botella J, De Vries S and Somerville C (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from Arabidopsis. **Plant Physiol** 105, 35-45.

- Thoma S, Kaneko Y and Somerville C (1993). A non-specific lipid transfer protein from Arabidopsis is a cell wall protein. **Plant J** 3, 427-436.

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res** 25, 4876-4882.

- Tsuboi S, Osafune T, Tsugeki R, Nishimura M and Yamada M (1992). Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. **J Biochem (Tokyo)** 111, 500-508.

## V

- Vaguine AA, Richelle J and Wodak SJ (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 55, 191-205.
- Valenta R (2002a). Recombinant allergen-based concepts for diagnosis and therapy of type I allergy. **Allergy** 57 Suppl 71, 66-67.
- Valenta R (2002b). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. **Nat Rev Immunol** 2, 446-453.
- Valenta R and Kraft D (2002). From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. **Curr Opin Immunol** 14, 718-727.
- Valenta R and Niederberger V (2007). Recombinant allergens for immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol** 119, 826-830.
- van Loon LC and van Strien EA (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 55, 85-97.
- van Loon LC, Rep M and Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu Rev Phytopathol** 44, 135-162.
- van Ree R (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. **Biochem Soc Trans** 30, 910-913.
- Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, Scheiner O and Breiteneder H (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. **Biochem Biophys Res Commun** 214, 538-551.
- Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Papadopoulos NG, Saxoni-Papageorgiou P, van Ree R and Mills C (2006). Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. **J Allergy Clin Immunol** 118, 473-480.
- Vassilopoulou E, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Rigby NR, Mills ENC, van Ree R, Saxoni-Papageorgiou P and Papadopoulos NG (2007). Severe Immediate Allergic Reactions to Grapes: Part of a Lipid Transfer Protein-Associated Clinical Syndrome. **Int Arch Allergy Immunol** 143, 92-102.
- Vieths S, Scheurer S and Ballmer-Weber B (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. **Ann N Y Acad Sci** 964, 47-68.

- Vignols F, Lund G, Pammi S, Trémousaygue D, Grellet F, Kader JC, Puigdomènech P and Delseny M (1994). Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein. **Gene** 142, 265-270.
- Vignols F, Wigger M, García-Garrido JM, Grellet F, Kader JC and Delseny M (1997). Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. **Gene** 195, 177-186.
- Vogel L, Lüttkopf D, Hatahet L, Hausteiner D and Vieths S (2005). Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. **Allergy** 60, 1021-1028.
- Vrtala S, Focke M, Kopec J, Verdino P, Hartl A, Sperr WR, Fedorov AA, Ball T, Almo S, Valent P, Thalhamer J, Keller W and Valenta R (2007). Genetic Engineering of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 6, to Reduce Allergenic Activity and Preserve Immunogenicity. **J Immunol** 179, 1730-1739.

## W

- Wagner S and Breiteneder H (2002). The latex-fruit syndrome. **Biochem Soc Trans** 30, 935-940.
- Wallace BA and Janes RW (2001). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics. **Curr Opin Chem Biol** 5, 567-571.
- Wallner M, Stöcklinger A, Thalhamer T, Bohle B, Vogel L, Briza P, Breiteneder H, Vieths S, Hartl A, Mari A, Ebner C, Lackner P, Hammerl P, Thalhamer J and Ferreira F (2007). Allergy multivaccines created by DNA shuffling of tree pollen allergens. **J Allergy Clin Immunol** 120(2), 374-382.
- Wardlaw AJ (1994). Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. **Postgrad Med J** 70, 536-552.
- Warner JA and Kroegel C (1994). Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. **Eur Respir J** 7, 1326-1341.
- Wiche R, Gubesch M, König H, Fötisch K, Hoffmann A, Wangorsch A, Scheurer S and Vieths S (2005). Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen. **Biochem J** 385, 319-327.
- Woodfolk JA (2007). T-cell responses to allergens. **J Allergy Clin Immunol** 119, 280-94; quiz 295-6.
- Woody RW (1995). Circular dichroism. **Methods Enzymol** 246, 34-71.

- Wurm FM (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat Biotechnol** 22, 1393-1398.

## Z

- Zachowski A, Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A and Kader JC (1998). Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein. **Eur J Biochem** 257, 443-448.

- Zuidmeer L, Salentijn E, Rivas MF, Mancebo EG, Asero R, Matos CI, Pelgrom KTB, Gilissen LJWJ and van Ree R (2006). The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. **Clin Exp Allergy** 36, 666-675.

**Jean-Philippe Borges**

**TITLE : Structural and immunological characterization of food allergens : lipid transfer proteins from fruits**

---

**Abstract**

Non-specific Lipid Transfer Proteins (nsLTP) share, on their molecular surface, some IgE-binding areas responsible for their allergenicity. Analyzing the conformation of these epitopes is an important step for understanding the molecular basis of the allergic reaction. IgE-binding epitopes of nsLTP from plants were predicted using a combination of predictive tools and subsequently characterized by biochemical and immunological approaches using IgE from allergic patients. Consensus epitopic regions responsible for some IgE-binding cross-reactivity among different Rosaceae fruits were identified by epitope mapping and conformational analysis. The localization and distribution of nsLTP allergens in the skin and pulp of different fruits has been investigated. nsLTP essentially concentrate as surface allergens in the pericarp of the fruits whereas the pulp contains lower amounts of allergens. nsLTP from apple and peach were produced as correctly-folded and reactive recombinant allergens, usable as standardized allergens for diagnosis and immunotherapy purposes.

---

**KEYWORDS**

**Allergy, allergens, epitopes, cross reactions, lipid transfer proteins**

---

**PhD thesis : Immunology**

**AUTEUR : Jean-Philippe BORGES**

**TITRE : Caractérisation structurale et immunologique d'allergènes alimentaires: les protéines de transfert de lipides de fruits**

**DIRECTEUR DE THESE : Pr. Pierre ROUGE et Dr. Annick BARRE**

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 21 Mars 2008, Salle du Conseil de la Faculté de Pharmacie de Toulouse**

---

**RESUME en français**

Les protéines de transfert de lipides possèdent, à leur surface, des régions responsables des interactions avec les molécules du système immunitaire. Ainsi, la liaison de ces régions appelées « épitopes », avec les IgE de patients allergiques représente une étape importante dans l'étude des bases de la réaction allergique. Nous avons prédit et caractérisé ces régions épitopiques grâce à la combinaison d'outils de bioinformatique d'une part et, d'autre part, une étude biochimique et immunologique complétée par une étude de biologie moléculaire. La carte épitopique de cette famille d'allergènes de fruits a permis de mettre en évidence des zones consensus, certainement impliquées dans des réactions croisées entre les fruits. Des dosages de ces allergènes dans les fruits comestibles ont également été réalisés, ainsi que l'étude fine de leur localisation cellulaire. Des allergènes recombinants ont été produits; ils devraient permettre d'envisager le démarrage dans un futur proche de protocoles de désensibilisation des patients allergiques.

---

*TITRE et résumé en anglais au recto de la dernière page*

---

**MOTS-CLES**

**Allergie, allergènes, épitopes, réactions croisées, protéines de transfert de lipides**

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Immunologie**

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : UMR 5546 CNRS-UPS, Laboratoire SCSV « Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux » - Pôle de Biotechnologies Végétales, 24 chemin de Borde Rouge / BP 42617 Auzeville / 31326 CASTANET TOLOSAN Cedex**