



**HAL**  
open science

## Les allergènes

Bernard David

► **To cite this version:**

Bernard David. Les allergènes : mythe ou réalité. 40e journée du GAICRM-Groupement d'allergologie et d'immunologie clinique du Rhône Moyen, Apr 2017, Rochede, France. pasteur-01556765

**HAL Id: pasteur-01556765**

**<https://pasteur.hal.science/pasteur-01556765>**

Submitted on 5 Jul 2017

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

40° journée du GAICRM - Symposium du 1°avril 2017 – Rochegude

## Les allergènes : mythe ou réalité

Professeur Bernard DAVID  
Institut Pasteur

A partir du moment où on commença à observer que de nombreux troubles morbides, d'origine jusque-là insoupçonnée, étaient dus à une sensibilisation de l'organisme, le rhume des foins fut le premier exemple historique d'un état qui illustre en médecine clinique le prélude aux phénomènes d'hypersensibilité. Quelles étaient les principales causes de ce « *catarrhe d'été* » : catarrhe typique du début de l'été, soi-disant fièvre des foins, rhume des foins, asthme des foins (*hay asthma, hay fever*), quelle était la réalité derrière ce mystère ?

La **théorie pollinique** sur la « hay fever » ne fut vraiment soutenue et défendue, au début, que par les auteurs de langue anglaise dont **Blackley** fut le précurseur en **1865** qui, dans sa recherche clinique après la caractérisation des symptômes, analysa les pollens et précisa le diagnostic spécifique en appliquant le premier la **cuti-réaction** avec du pollen pur ou en extrait liquide (1°extrait ?).

Cuti-réaction : Blackley (**1865**)

Technique : Avant-bras, vaccinostyle, scarifications linéaires,(2mm)  
Quelques gouttes d'extrait de liquide ou du pollen pur  
Témoin 1gtte de soude décimale  
Après 10mn, lecture réaction ortiée 5 millimètres (papule)  
Œdème local étendu avec érythème et prurit

Autres : Ophthlmo réaction (**1906** Dunbar), intradermoréaction (1920 Cooke)  
IDR : 0,05 à 0,1 d'une solution seringue, papule urticarienne  
Sur une base œdémateuse après 10mn

A cette théorie pollinique s'oppose la **théorie microbienne**, soutenue par Helmholtz *en Allemagne*. Le rhume des foins serait dû à des vibrions spéciaux transportés par le pollen.

En 1862, fut soutenue une **théorie nasale**, hyperesthésique où l'action du pollen est liée à une *irritation*, une *hyperexcitabilité nasale* et enfin un terrain neuro-arthritique.

Des conceptions qui se veulent plus modernes apparaissent dès **1904**. **Dunbar** de l'école allemande prépara un *extrait du pollen* de certaines plantes (seigle, orge, blé, riz, maïs) en recueillit une *substance* qu'il considéra comme une *toxine* et prétendit que le pollen de toutes les plantes qui peuvent provoquer le rhume des foins contiendrait une substance toxique, en l'espèce une toxalbumine. **C'est la théorie toxinique** qui prenait naissance. Dunbar chercha à immuniser les chevaux avec cette prétendue toxalbumine qu'il nomma pollantin pour préparer un sérum antitoxique. Quelle que soit la technique utilisée, les résultats furent décevants accompagnés de toutes sortes d'épisodes anaphylactiques. Dunbar n'avait certainement pas été informé de la découverte de Charles Richet en 1902

Le mécanisme intime responsable de la réaction cutanée et des symptômes du rhume des foins après inhalation de pollen restait un mystère d'autant plus qu'une petite partie de la population était touchée. Quelques auteurs pensent que certaines personnes sont plus sensibles à des substances de l'environnement considérées comme inoffensives pour l'organisme. C'est alors qu'apparait le terme d'hypersensibilité avant celui d'anaphylaxie.

## Hypersensibilité, anaphylaxie, allergie et allergènes

Suite à la découverte de l'anaphylaxie par Ch. Richet en 1902, **la théorie anaphylactique** fut soutenue pour la première fois par J.-P. Langlois et, Wolf-Eisner en **1906** ce qui fut démontré plus avant même que les termes allergie ou allergène soient connus comme on le découvre dans la première page du **Journal of Immunology** créé en **1913** où les 5 premières publications sont consacrées à l'anaphylaxie. C'est Noon qui divulgua les termes allergie et allergènes en effectuant la première désensibilisation chez l'homme en 1911 mais en oubliant de citer A. Besredka qui est le vrai découvreur de cette technique expérimentale (méthode de Besredka) chez le cobaye, découverte non prioritaire pour la médecine clinique. C'est ainsi qu'en 1930 il a été décidé par Doerr que l'anaphylaxie serait appliquée à l'animal et l'allergie à l'homme.

### **1- Le pollen** : premier modèle des futurs allergènes

Au tout début du XX siècle, la pollinose et le rhume des foins représentent le premier volet médical de cette mystérieuse hypersensibilité ce qui nécessite de préparer du pollen en poudre ou dilué pour pratiquer les cuti-réactions utiles au diagnostic et plus tard faire des extraits injectables pour les patients en vue d'essais thérapeutiques. Richet à la fin de son livre écrit en 1911 aborde le problème de l'anaphylaxie en médecine et fait allusion à une sensibilité extraordinaire après des ingestions alimentaires (œufs, poisson, fraises, moules, crustacés) en terminant par cette phrase « la maladie des foins et l'asthme essentiel relèvent peut être aussi de la même cause ». Vraisemblablement, certains médecins ont fait des observations entre 1910 et 1920 pour découvrir que l'inhalation de poussières, de squames de cheval, de poils d'animaux domestiques, de plumes de volatiles n'est pas inoffensive pour les patients qui souffrent d'asthme bronchique.

#### **Premiers extraits de pollen**

Noon et Freeman 1911: extrait suivant la méthode de Dunbar (macération du pollen + eau distillée). congélations et décongélations, filtration, extrait dans tubes scellés, 10min (100°).

Cooke : liquide extracteur ( solution de soude + NaCl) 1915.

Coca : élimination par l'éther, extraction de la substance active (sol. de NaOH+NaCH<sub>3</sub>O ) 1922.

C'est la recette d'A. Coca qui a été reprise pendant longtemps pour la plupart des allergologues.

### **2-La poussière de maison** : deuxième modèle des futurs allergènes

#### **Poussière et Asthme**

En 1921, RA Kern pense que les effets de la poussière inhalée sont dus à des protéines qui agissent comme des substances antigéniques induisant une sensibilisation plutôt qu'un mécanisme irritant. Il prétend que la sensibilisation à la poussière de maison prend des formes différentes impliquant des squames et des poils d'animaux (cheval, chien, chat) et des plumes de poule et d'oie. Il propose l'éviction du contact avec les animaux et un nettoyage à fond des chambres pour les poussières (mobilier, literie) et les plumes dans les oreillers. Il constate alors l'amélioration des symptômes lorsqu'on prend de telles mesures d'hygiène. Il démontre que les extraits de poussière de maison utilisés en tests cutanés suscitent des réponses positives chez de nombreux patients asthmatiques.

Pour mieux étudier les symptômes et analyser les substances inhalées présentes dans l'air ou dans les poussières, certains pneumologues ont envisagé d'aménager des chambres où l'air est filtré avec un système de ventilation adéquat. Les patients souffrant d'asthme très sévère pourraient alors inhaler de

l'air purifié débarrassé des impuretés, des allergènes et des miasmes. Storm van Leeuwen ainsi que S. Léopold et coll. inaugurèrent des cliniques dans des centres hospitaliers. Storm van Leeuwen s'intéressa à la nature des substances véhiculées par les poussières. D'abord, il pensait que l'inhalation de spores de moisissures microscopiques dans l'environnement pouvait être responsable des crises d'asthme. Ensuite il découvrit que des poussières d'avoine étaient envahies par des acariens (*Acarus siro* et non le genre *Dermatophagoïdes*), mais il ne put démontrer leur implication dans l'asthme bronchique. Enfin il s'intéressa aux effets du climat favorable, en haute montagne, *sur les crises d'asthme*, en précisant « que l'absence de crises à partir d'une certaine altitude serait due, non à la diminution de pression, mais au fait que l'air des hauteurs contient de moins en moins d'impuretés organiques ou miasmes ».

De plus en plus la poussière de maison devint un facteur étiologique important dans l'asthme bronchique et souleva des controverses quant à sa vraie nature : **mythe ou réalité ?** Une entité spécifique ou une multitude d'éléments responsables de cette hypersensibilité immédiate. L'extrait de poussière restera un mystère encore une quarantaine d'années.

### Extraits de poussière de maison

Cooke prépare en **1922** un extrait suivant la méthode utilisée pour la préparation des extraits de pollen. Cooke conclut que la poussière de maison devait contenir un allergène spécifique dont la nature et la source étaient inconnus. La poussière retirée d'un aspirateur et dégraissée est extraite par la solution de Coca pendant 2 ou 3 jours ; le surnageant est passé sur filtre de papier et stérilisé par filtration sur bougie de Berkfeld. Cet extrait perd son activité par chauffage à 100°. Il faudra attendre encore une vingtaine d'années pour que certains chercheurs développent des techniques de purification par précipitations fractionnées avec des solvants organiques (acétone) ou des solutions concentrées de sulfate d'ammonium ou de sodium. (1940 Boatner et Efron, 1942 Sutherland). Mais c'est en **1947** que **C. Rimington** et coll. proposent une méthode comportant une extraction aqueuse, une adsorption sur l'acide benzoïque, des précipitations fractionnées par l'acétone, une dialyse. Plusieurs étapes sont nécessaires (précipitations par des concentrations d'acétone de 25 à 80%) avant d'obtenir une fraction très active. qui constituera l'extrait purifié. Cette dernière méthode sera reprise par **Louis Guibert** en **1965** qui, à la demande de Pasteur Vallery-Radot, créera le Service des Allergènes à l'Institut Pasteur en **1957**. Le résultat de ses travaux sur les extraits allergéniques aboutira à un extrait aqueux de poussière de maison Pasteur, reconnu en France et en Europe comme extrait standard purifié de référence.

### L'isolement du premier allergène en 1934 par Pierre Grabar

S'intéressant aux problèmes de filtration rénale, bien avant l'avènement des fameux filtres « Millipores ». Pierre Grabar met au point des méthodes de préparation de membranes de porosité graduée permettant de réaliser des **ultrafiltrations fractionnées**. Il utilisera cette méthode pour déterminer la dimension de divers virus, bactériophages et enzymes, et effectuer certaines séparations de substances biologiquement actives comme les toxines microbiennes. Intéressés par cette invention, des médecins allergologues lui ont demandé d'essayer d'isoler l'allergène du ricin, une tâche qu'il a menée à bien en 1932-1934 (**image p. 6**).

Mais, rapidement, l'essentiel de ses recherches se concentre sur le **développement de méthodes immuno-chimiques**, domaine dont il est un des **pionniers** dans le monde. Accueillant dans son laboratoire à l'Institut Pasteur de nombreux élèves et stagiaires français et étrangers, il fondera une véritable école d'où sortiront les plus éminents immunologistes français et américains. Après E. Metchnikoff, il a été le second chercheur français le plus célèbre en immunologie. C'est lui qui créera la **Société Française d'Immunologie en 1966**, près de 50 ans après le J. of Immunology. (1913)

Précurseur de la chimie biologique et de l'immunochimie, il élabore, en collaboration avec C.A. Williams, une méthode connue sous le nom *d'analyse immuno-électrophorétique*, qui permet d'analyser de manière précise des mélanges très complexes d'antigènes (plus de 30 constituants indépendants dans le sérum humain) Cette invention eut un retentissement considérable et fut non seulement rapidement utilisée dans de nombreux laboratoires médicaux pour des besoins de diagnostics, mais aussi en fondamentales ( mise en évidence des **IgE par Ishizaka** et coll en 1966, technologie nouvelle, notamment dans l'**identification des allergènes**). Enfin, pour conclure sa prestigieuse carrière, je vous révèle ce qu'il m'a confié en 1982 : « **le premier isolement d'un allergène**, je l'ai publié en **1934** ». Il resta quasiment inconnu.

## **Le ricin (extraits originaux)**

Différenciation dans le Ricin de la toxine et d'un allergène. Grabar P& Koutseff,A.: C. R. Soc. Biol., 717,700-701, **1934**

« Le principe toxique du Ricin, dénommé ricine fit l'objet de recherches approfondies qui ont obtenu une substance extrêmement toxique. .... Ayant eu l'occasion d'observer plusieurs cas d'allergie au Ricin (dont un concerne l'un de nous), nous avons repris l'étude des substances contenues dans le Ricin pour voir si l'allergie au Ricin est identique à la ricine, ou bien s'il s'agit de deux substances différentes.

Pour mesurer, d'une part, la toxicité de nos extraits nous avons déterminé la dose mortelle minima (Souris, Cobaye) ; et, d'autre part, pour démontrer l'allergie, nous nous sommes servis de tests cutanés et oculaires sur des personnes devenues sensibles au Ricin. Les méthodes utilisées pour la préparation de nos extraits actifs à partir des graines et des tourteaux du commerce qui contiennent la ricine et l'allergène sont des précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (concentration de 20 à 33 p. 100 de saturation pour la toxine et 50 p. 100 de saturation jusqu'à 100% pour l'allergène) et l'ultrafiltration sur des membranes de porosité graduée. On peut arrêter la ricine, sans altérer son pouvoir toxique tandis que l'allergène traverse des membranes de pores plus fins

Il s'agit bien de deux substances distinctes qui se comportent différemment vis-à-vis de certains agents physiques et chimiques. Elles peuvent être séparées l'une de l'autre sans altération de leur toxicité ou de leur activité allergisante. Pour indiquer l'origine et la fonction biologique du principe allergique du Ricin, nous l'avons nommé: **ricinallergène** »

Sur la préparation du ricinallergène et sa séparation de la ricine. Grabar P& Koutseff,A.: C R Soc. Biol., 717,702-704, **1934**

« Comme matière première de la préparation de la ricine et du ricinallergène nous avons employé : soit des graines du ricin (*Ricinus zanzibariensis*) broyées et déshuilées, soit des tourteaux du commerce. Nous avons adopté deux modes opératoires : l'un nous permet d'obtenir séparément la **ricine** et **l'allergène** sans altération de leurs propriétés biologiques, l'autre, beaucoup plus simple et plus rapide, nous fournit un extrait riche en allergène débarrassé de la ricine et dépourvu de toute toxicité Pour purifier les diverses fractions, nous avons eu recours à des précipitations répétées. »

N <sup>os</sup> des fractions	Concentration du sulfate d'ammonium en p. 100 de saturation	Effet biologique	
		toxique	allergisant
1.	jusqu'à 33	intense	très faible (4*)
2.	de 33 à 50	faible ou néant	faible (4*)
3.	(a) de 50 à 60	} néant	} intense
	(b) de 50 à 75		
	(c) de 60 à 100		
	(d) de 75 à 100		

(1\*) L'huile de ricin n'est ni toxique, ni allergisante.  
(2\*) T.-B. Osborne, L.-B. Mendel et I.-F. Harris, *Amer. Journ. of Physiol.*, 1905, t. 14, p. 266.  
(3\*) Les produits qui précipitent pendant la dialyse ne sont ni toxiques, ni allergisants.  
(4\*) Avec ces fractions toxiques, nous n'avons obtenu que des réactions faibles dues vraisemblablement à l'allergène pendant la précipitation.

Voici d'autre part quelques résultats numériques

Fraction n<sup>o</sup> 1 :

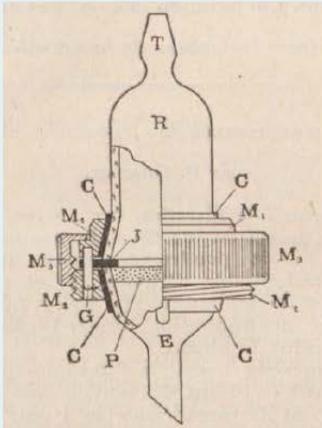
- 1) dose mortelle minima (Souris) 0,014 mgr. par kgr. d'animal (mort en quatre jours);
- 2) intradermoréaction avec 0,020 mgr. (5\*) (sujet humain allergique) faiblement positive.

Fraction n<sup>o</sup> 3 (c) :

- 1) injection de 330 mgr. par kgr. d'animal (Souris), survie;
- 2) intradermoréaction avec 0,000017 mgr. (sujet humain allergique) fortement positive (papule urticarienne de 2 cm. de diamètre).

« En partant de 500 gr. de tourteaux nous avons obtenu un extrait contenant 30 gr de substances sèches qui, chez un sujet humain allergique, provoquent une intradermoréaction positive à la dose 0,00001 mgr. L'extrait est exempt de toute toxicité, car injecté à une Souris, même à la dose de 1,5 gr. par kgr. d'animal, il ne provoque pas la mort. »

(5\*) Pour éviter l'effet toxique, nous avons injecté un filtrat obtenu à l'aide d'une membrane (diamètre moyen de pores  $d=7 \mu\text{m}$ ) qui arrête la toxine et laisse passer l'allergène (voir note précédente).  
(6\*) L'allergène n'est pas entraînable par la vapeur d'eau.  
(7\*) Par exemple, un alcaloïde, la ricinine, qui n'est pas allergisante.  
(8\*) Voir la note précédente.



**Pierre Grabar**  
(1898-1986)

**Appareil de P.Grabar pour l'ultrafiltration.**

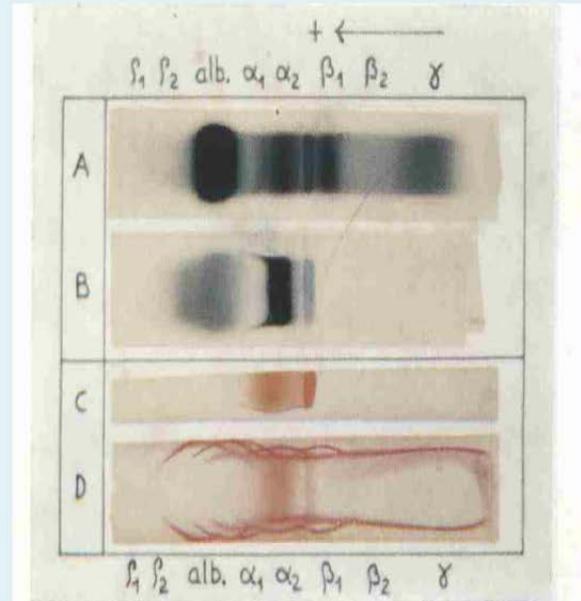
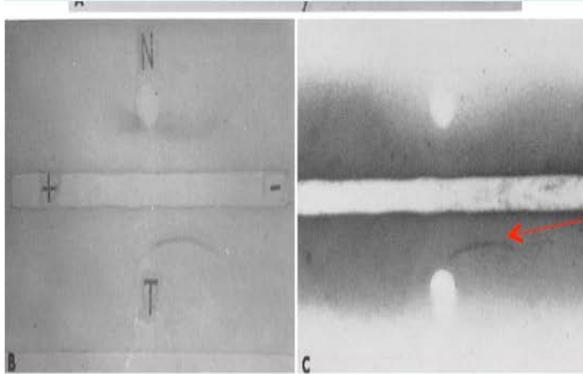
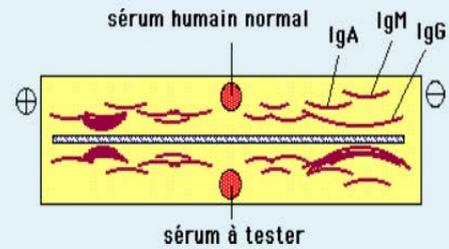


FIG. 9. — Caractérisation des protéines et lipoprotéines sériques après électrophorèse (A et B) et immuno-électrophorèse en gélose (C et D).

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF HUMAN REAGINIC ANTIBODY IV  
**K. Ishizaka et coll** *J Immunol* 1966; 97:75-85

Analyse immuno-électrophorétique P. GRABAR et P. BURTIIN  
1 livre MASSON et Cie EDITEURS 1960

1. Premier isolement d'un « allergène » en 1934 : **ricinallergène** de la graine de ricin

**Grabar P. & Kouteseff A.** Différenciation dans le Ricin de la toxine et d'un allergène  
*C.R. Soc. Biol.* 717, 700-701, 1934

**Grabar P. & Kouteseff A.** Sur la préparation du ricinallergène et sa séparation de la ricine.  
*C. R. Soc. Biol.* 118, 702-704, 1935

2. Invention de l'**immuno-électrophorèse** en 1953

**P Grabar, C Williams (1953).** Application of immunoelectrophoresis to the separation of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 10:193-4.

« Le sujet sensibilisé qui respire un air chargé de particules de Ricin est pris subitement d'éternuements, d'écoulement nasal abondant, d'oppression, voire même d'une vraie crise d'asthme.

La peau et les muqueuses des sujets allergiques réagissent de façon caractéristique et spécifique au contact avec des solutions enfermant l'allergène soit en application épidermique, soit par la cutiréaction avec un placard œdémateux blanc à contours irréguliers, étendant par pseudopodes, avec une aréole rouge. Une réaction du même genre, mais particulièrement violente, se produit après l'injection intradermique; elle est obtenue encore avec des solutions d'allergène extrêmement diluées

La sensibilisation au Ricin se fait apparemment par voie respiratoire. C'est le dépôt répété de particules de la substance sensibilisante sur la muqueuse bronchique et peut-être aussi sur la conjonctive qui, peu à peu, amène l'état de sursensibilité.

D'après tous ces caractères, l'allergie au Ricin est à ranger dans le groupe des pneumallergies. Elle est voisine des pollinoses, tant par ses manifestations cliniques que par sa pathogénie et sa physiopathologie »

**Woringer P., Grabar. P & Koutseff A.** Etude physiopathologique de l'allergie au Ricin. C.R. Soc. Biol. 118,60-62, 1935

## Vers l'identification des allergènes

A partir de 1930, si la recherche clinique a évolué dans le domaine de l'allergologie, la préparation des extraits allergéniques évaluée en valeurs arbitraire (dosage d'azote, unité Noon, P/V) variait en qualité et de nombreux praticiens discutaient l'efficacité de certains traitements. Dès 1940, des méthodes de purifications ont été appliquées qui ont permis d'obtenir des extraits dont la concentration en substance active est très élevée et qui ne contiennent pas les fractions non spécifiques. (Exemples: C. Rimington 1947 et L. Guibert 1965) (**Image p. 8**)

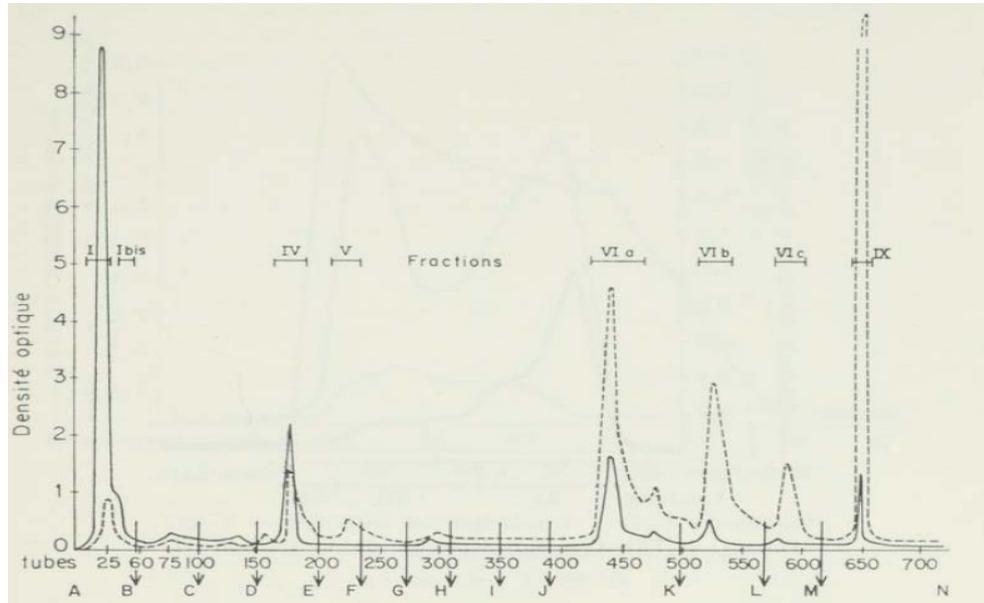
Trois événements vont contribuer à l'éclosion de l'allergie de type anaphylactique :

- 1) l'isolement du premier allergène majeur (AgE ou **Amb a 1**) extrait d'un pollen très fréquent aux Etats Unis, le Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) par **T.P. King (1962)**.
- 2) la mise en évidence par **Kimishige et Teruko Ishizaka** d'une nouvelle classe d'anticorps possédant les propriétés des réagines, qui s'est avérée être le support moléculaire de l'hypersensibilité immédiate. Elle sera nommée  $\gamma E$ , puis **IgE. (1966)**
- 3) le décryptage du mystère de la poussière de maison grâce aux travaux de **R.Voorhost** qui suspecte comme responsable de l'allergénicité de la poussière, un organisme vivant. (**1964**). Les recensements méthodiques effectués par **F.Spieksma et M. Spieksma-Boozeman** mettent en évidence de façon quasi constante la présence d'acariens du genre *Dermatophagoïdes* dans les poussières des maisons de Hollande. En 1966, l'acarologue belge **A. Fain** identifie l'espèce **Dermatophagoides pteronyssinus** (déjà décrite à la fin du siècle dernier par **Trouessart**, en France), et en précise la morphologie, le cycle biologique, le mode de vie, l'habitat et la répartition géographique. Le mythe de la poussière sera remplacé par les « mites », acariens ainsi nommés par les Anglais !

Ces trois épisodes fondamentaux seront accompagnés par toute une cascade de découvertes entre 1960 et 1980 dans les domaines de la biologie moléculaire, de l'immunologie et des biotechnologies qui vont faire progresser de façon considérable celui de l'allergologie. (**Image p.9**)

## Fractionnement de l'extrait purifié de poussière de maison par chromatographie sur DEAE-cellulose

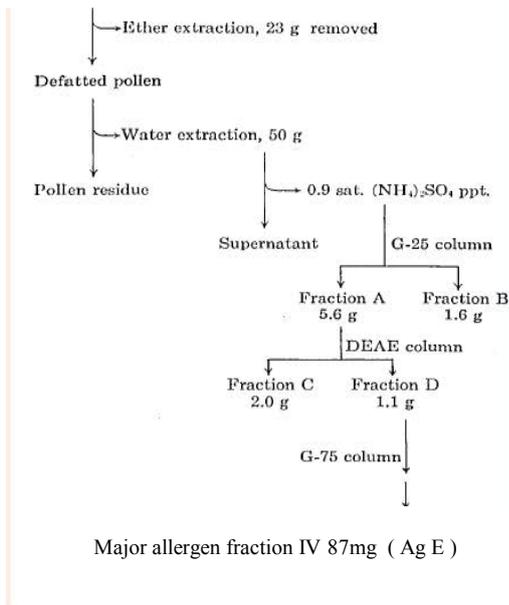
**Guibert L, Causse-Combes R.** *Activité allergénique des fractions obtenues par chromatographie de l'extrait de poussière de maison.* *Ann Inst Pasteur* (Paris) 1965 Mai ; 108(5):579–601



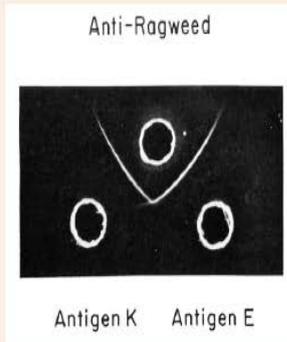
TABLÉAU III. — Réactions cutanées obtenues avec les fractions I, IV, VI, et l'extrait global chez 14 malades et avec la fraction IX chez 10 malades.

	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Réaction immédiate :</i>														
Extrait global ...	++	+	++	++	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
Fraction I .....	++	+	+	++	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
Fraction IV .....	0	0	+++	+	0	0	0	0	+	++	+	+	0	0
Fraction VI .....	0	0	++	+	0	0	0	++	+	++	+	+	+	0
Fraction IX .....		+	++	+	0	0		0			+	+	0	0
<i>Réaction retardée :</i>														
Extrait global ...	0	0	0	+	+	+	++	0	+	+	+	+	+	+
Fraction I .....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Fraction IV .....	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0
Fraction VI .....	0	0	0	+	+++	+	+(+)	+	+	++	+	+	+	+
Fraction IX .....		0	0	0	+	+		+			+	+	+	+
<i>Réaction immédiate et réaction retardée :</i>														
Extrait global ...	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
Fraction I .....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fraction IV .....	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0
Fraction VI .....	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0
Fraction IX .....		0	0	0	0	0		0			+	+	+	0

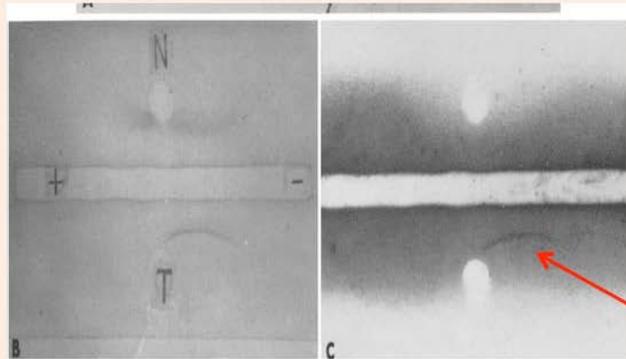
Low ragweed pollen, 200 g



Isolement de l'antigène majeur du pollen de ragweed : antigène E ( T.P.King 1962)



1962-1964: Première envolée des allergènes



Mise en évidence de l'IgE ( K. Ishizaka et coll 1966)



L'Acarien Dermatophagoïdes Pteronyssinus (Décrit par Trouessart en 1897) détrône la poussière de maison (R.Voorhost 1964)

Allergènes:

1962-64 : Ag E du ragweed (ambrosia) *Amb a 1*

1964-1967 : acariens (Dermatophagoïdes : D.Pter, D.Far.)

- - mécanismes allergiques : 1966-67 : les Immunoglobulines E ( IgE )  
: rôle des mastocytes/ basophiles
- - mécanismes immunologiques : 1972-1974 : lymphocytes B et T
- 1972 :1° cytokine : interleukine 1(IL-1)
- - nouvelles technologies: 1972, clonage moléculaire d'un gène ...en 1988 (Allergène **Der P 1**)
- 1973 électrophorèses bidimensionnelles : **CIE, CRIE**, Immunoempreintes (**IEF**)
- 1975 : anticorps monoclonaux
- 1980 : 1° allergène recombinant d'acarien Der p 1 Ky Chua

## Méthodes d'identification des allergènes et de mesure de l'activité allergénique

L'identification des constituants allergéniques par immunodétection passe nécessairement par le système de reconnaissance du site anticorps spécifique de l'IgE humaine. Dès 1972, l'invention de plusieurs techniques immuno chimiques vont permettre de détecter la plupart des constituants allergéniques potentiels présents dans un extrait. Il s'agit soit des techniques combinées d'immuno électrophorèse bidimensionnelle, soit des techniques de transfert des protéines et des glycoprotéines.

### Identification des allergènes

C'est en 1973 que B.Weeke et H.Lowenstein adaptent la technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle (Crossed Immuno Electrophoresis C.I.E.) aux extraits allergéniques et proposent l'identification des allergènes par autoradiographie à partir de sérums de sujets allergiques contenant des IgE spécifiques révélées par des anti IgE marquées à l'iode ( $^{125}\text{I}$ ) ( Crossed Radio Immune Electrophoresis C.R.I.E.)

- La **C.I.E** et le **C.R.I.E.** montrent ainsi l'hétérogénéité des antigènes contenus dans un extrait brut et la grande diversité des allergènes reconnus par les sérums de sujets allergiques. Les allergènes majeurs et mineurs visualisés peuvent être dénombrés et présentés sous formes d'allergogrammes.
- L'immunodétection des constituants allergéniques peut aussi être réalisée en utilisant un autre type de technique qui consiste à transférer des protéines séparées par électrophorèse ou par isoélectrofocalisation (**I.E.F.**) sur nitrate de cellulose. G. Peltre et B. David ont mis au point une technique appelée **immunoempreinte** où la séparation des protéines par I.E.F. s'effectue en agarose. L'empreinte effectuée par adsorption sur nitrate de cellulose est mise en présence de sérums de patients allergiques et les allergènes identifiés par les IgE spécifiques sont révélés par autoradiographie (anti IgE marquées à l'iode  $^{125}\text{I}$ ) Images (**Images p 12,13**)

## **Applications pratiques en biologie médicale (diagnostic) en médecine clinique (diagnostic et thérapie) et dans l'industrie biologique (pour la standardisation des extraits allergéniques)**

Avant d'avoir identifié ce que pouvait représenter une molécule appelée allergène, il n'était pas possible d'évaluer son activité biologique et d'analyser ses propriétés physicochimiques. Une fois l'identification d'un allergène réalisée grâce aux techniques nouvelles, la recherche fondamentale et ses applications pourront à la fois comprendre les mécanismes qu'il engendre et les moyens de les contrôler. Le fait de considérer que la combinaison d'IgE spécifique avec les antigènes d'une préparation allergénique traduit in vitro un des aspects de la réaction allergique de type immédiat.

### **Aspect diagnostique et recherche**

Le premier dosage radio immunologique des IgE spécifiques anti allergènes comme diagnostic in vitro parut en 1970 sous le terme « Radioallergosorbent-test » (RAST). Selon la technique du RAST, le sérum à tester est incubé avec un disque couplé à un allergène. Les IgE qu'il contient se fixent sur l'immunoabsorbant et l'addition d'un sérum de lapin anti-IgE humaines marqué par l'iode radioactif <sup>125</sup> émet un certain % de radioactivité fonction de la quantité d'IgE spécifiques sériques.

Un second dosage déjà pratiqué dès 1967 en recherche (Ishizaka, Lichtenstein) concerne le test de libération d'histamine qui consiste à mesurer, par spectrofluorimétrie, l'histamine libérée par les basophiles humains couverts d'IgE spécifiques membranaires stimulés par l'allergène. L'allure sigmoïdale des courbes de libération d'histamine en fonction de la concentration d'allergène permet de déterminer sur la partie croissante la plus sensible de la courbe un paramètre ( $D_{50}$ ) reflétant l'activité de l'allergène.

### **Standardisation des extraits allergéniques**

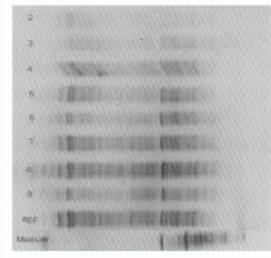
Un troisième dosage va être mis en pratique pour contrôler les normes proposées par le comité International de standardisation des allergènes : c'est **l'inhibition du RAST**, méthode indirecte du RAST qui consiste à utiliser un sérum de référence (IgE), un disque de référence (allergène) et des extraits allergéniques à comparer avec les réactifs de référence. A partir d'une courbe, (radioactivité), on détermine une inhibition de 50% ( $D_{50}$ ) reflétant comme pour **le test d'histamino- libération**, l'activité de l'allergène. Les résultats obtenus à partir des premiers travaux effectués avec des extraits de pollen et d'acariens ont montré qu'il existait une corrélation positive entre les deux tests in vitro et les tests cutanés quantitatifs.

### **Travaux sur les allergènes dans l'unité d'Immuno-Allergie**

Responsable scientifique : Dr Bernard David, Institut Pasteur (1976-2000)

Les travaux qui se sont déroulés ont permis d'abord l'identification, puis l'isolement d'allergènes issus d'extraits de substances organiques animales (ou végétales) et leur activité allergénique à partir des techniques citées plus haut. De l'extrait, on passe aux fractions, puis au constituant purifié, enfin à la molécule clonée. Avant d'entreprendre nos travaux, dès 1976-77, nous avons cherché des références et découvert que seuls deux laboratoires dans le monde avaient isolé, l'un, une protéine du pollen d'ambrosia (ou ragweed) appelée Antigène E (AgE) par T.P.King (USA) en **1962-64**, l'autre l'Ag M de la morue par K. Aas en **1967-71** (Norvège). Ces deux molécules furent dénommées allergènes majeurs. Nous avons alors choisi deux sources d'allergènes dont l'objectif a été d'identifier leurs allergènes et d'isoler un ou plusieurs allergènes majeurs: **le pollen de *Dactyle*** et les ***Acariens Dermatophagoides pteronyssinus* et *D Dermatophagoïdes farinae***





D. Pteronyssinus extracts I E F

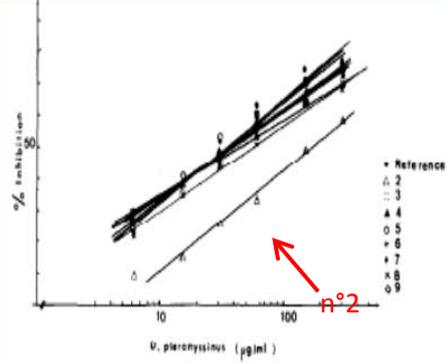


FIG. 2. RAST inhibition titration curves for nine batches.

Inhibition du RAST

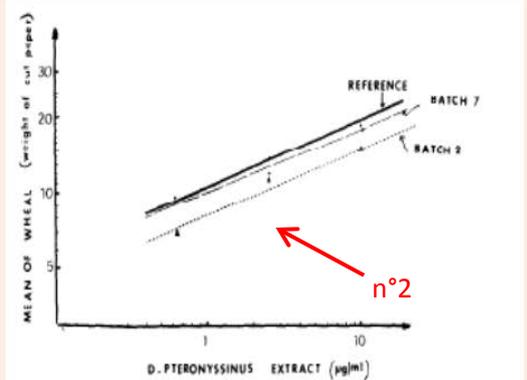


FIG. 3. Cutaneous titration curves.

Tests cutanés

Histamino-libération

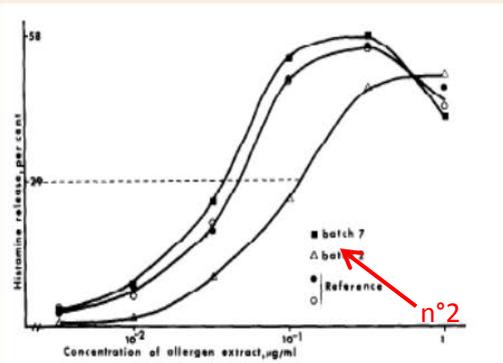


FIG. 4. Histamine-release titration curves for *D. pteronyssinus* extracts.

TABLE IV. Relative potency of *D. pteronyssinus* extracts by three methods

Batch	Intracutaneous titration	Histamine release	RAST inhibition
Reference	1	1	1
7	0.75	1.16	1.24
8	—	0.78	0.78
9	—	1	1.09
2	0.45	0.55	0.26

Standardisation des extraits allergéniques

Activité allergénique

Les trois méthodes concordent

L'échantillon n°2 est moins actif

## Recherche fondamentale ou naissance de l'allergie moléculaire (1980-1985)

### Allergènes d'acariens

Grâce à la mise en place d'un élevage d'acariens au service des allergènes, notre unité a bénéficié des deux espèces responsables de l'asthme aux acariens : *D. pteronyssinus* et *D. farinae*. La seule équipe américaine (Platts-Mill et Chapman) en compétition avec notre laboratoire en 1980 avait déjà entamé depuis quelques années ses recherches sur le *D. pteronyssinus* avec le même objectif que nous : isoler le premier allergène majeur d'acarien. ( images p 15,16 17)

#### Acarien : *Dermatophagoïdes Farinae*

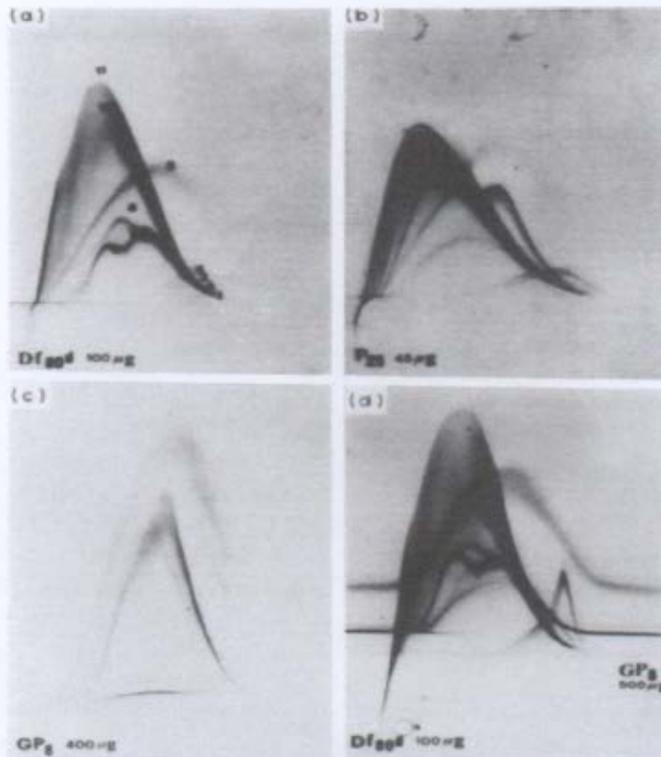
A partir d'un extrait de *D. farinae*, parmi les 6 protéines identifiées comme étant des allergènes, deux se sont révélées être des allergènes "majeurs" ainsi appelés parce qu'ils sensibilisaient chez des patients sélectionnés entre 50% et 100 % des sujets allergiques aux acariens. A côté de ces allergènes majeurs numérotés au départ Ag 11, Ag 6, et plus tard Df11, Df 6, 4 autres allergènes (3, 4, 5,8) étaient considérés comme mineurs. Des premières observations, on pouvait retenir que certains malades ne sont pas nécessairement sensibles aux mêmes allergènes (variabilité de la réponse), mais aussi qu'un allergène (Ag11) était reconnu par 100 % des patients allergiques. Cet Ag11 appelé Df11 une fois isolé et caractérisé (PM: 28 000) fut le premier allergène majeur de l'acarien *D. farinae* (1981-82) conjointement à l'allergène majeur P 1 de l'acarien *D. pteronyssinus* caractérisé par l'équipe Chapman/Platts-Mills l'an auparavant (1980). Ces deux molécules **Der f 1 et Der p 1** furent répertoriées dans la nomenclature internationale des allergènes majeurs.

L'étude de la structure antigénique et allergénique fut poursuivie et approfondie en utilisant des sérums et des cellules de patients allergiques à l'acarien et en produisant des anticorps monoclonaux. Une carte épitopique de **Der f 1** fut établie et nous permit de définir trois sites antigéniques non chevauchants et non répétitifs et de confirmer une réponse plus précise sur la reconnaissance des épitopes par les IgE et les IgG, concernant le "**concept d'allergénicité**".

Existe-t-il sur une molécule, dite allergène, des épitopes préférentiellement dirigés entre les IgE et non contre les autres classes d'anticorps ? Compte tenu de nos observations, il est apparu que tout épitope reconnu par l'IgE l'était également par l'IgG et d'autres classes d'anticorps, mais non l'inverse. Actuellement, on peut affirmer qu'il n'existe pas sur une structure moléculaire d'épitopes strictement dirigés contre l'IgE.

En améliorant les techniques CIE et CRIE, un dernier extrait purifié de *D. farinae* (Df 80) a révélé **11 antigènes** et les sérums des malades reconnaissaient **6 allergènes** (Df 3 , Df 4 , Df 5, Df 6, Df 8 et Df 11) dont toujours les majeurs Df 11 et Df 6. En comparant les extraits purifiés de Df 80d et de *D. pter.* on a pu établir **des allergogrammes** qui montrent le profil allergénique de l'extrait Df 80d réalisé à partir des sérums de patients sensibles à *D. farinae* et celui réalisé à partir d'un extrait purifié de *D. pteronyssinus* à partir des sérums sensibles à *D. pter.* Ce deuxième allergogramme révélait 2 allergènes majeurs (Dp 7 correspondant à Der p 1 et Dp 4) et 3 allergènes mineurs. Ces techniques trop lourdes nous ont incités à développer une autre méthode en analysant les antigènes polliniques.

Le travail de pionnier dans ce domaine a été réalisé par JP Dandeu (CNRS), biochimiste, J. Le Mao, ingénieur(IP), J.Rabillon, ingénieur (IP), A. Weyer (IP) enzymologiste.



#### CIE + sérum de lapin anti-Df 80d

Extrait de *D. Farinae* Df80d, fractions P25( protéines) et GP 8 (polysaccharides)  
**11 antigènes** ont été numérotés dans Df80d (Photo a) sur les arcs de précipitations



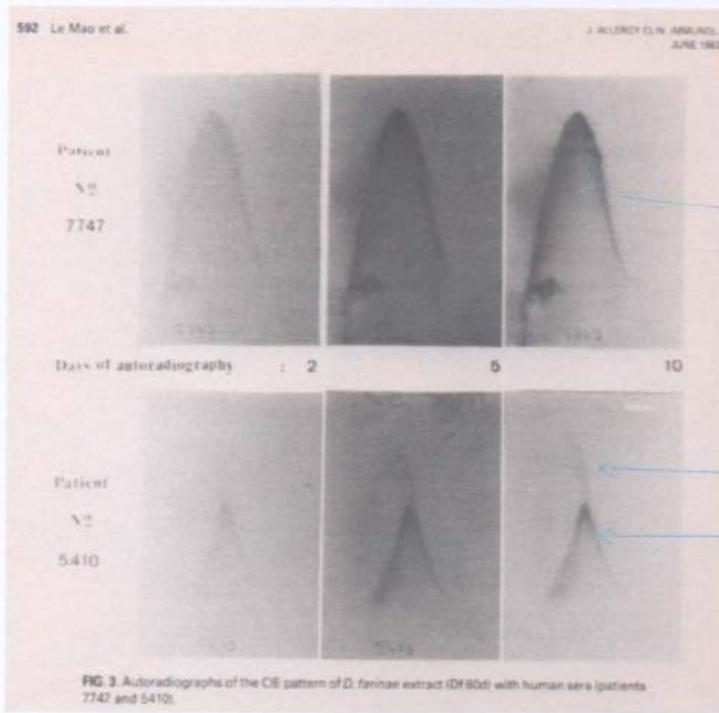
#### Autoradiographie

**CRIE:** CIE+ sérum de patient allergique à *D. Farinae* + de lapin anti-IgE humaine marqué à  $^{125}\text{I}$ . La ligne de précipitation radio marquée révèle que l'Ag 11 est un **allergène** (voir CIE(a))

J. Le Mao, J.P. Dandeu, J. Rabillon, M. Lux, B. David 1981 Immunology, 44,239-247

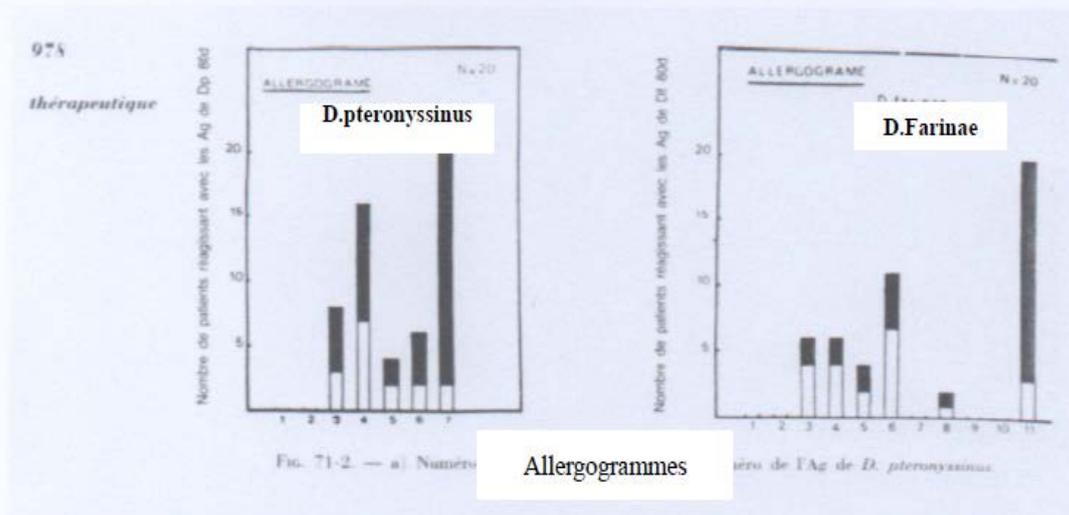
**Fractionnement de l'extrait de l'acarien *D. farinae* Df80d préparé au laboratoire :  
 identification de 11 antigènes (CIE) et révélation de l'antigène 11, l'allergène majeur (CRIE)**





Extrait purifié (Df80) de l'acarien *D. Farinae* avec sérums de 2 patients allergiques

Autoradiographies (CRIE) : Les IgE spécifiques des patients sont révélées par des anti-IgE (Ra <sup>125</sup>I)



Allergènes majeurs et mineurs de *D. pteronyssinus* et de *D. farinae* dénombrés et présentés sous forme d'allergogrammes

## Allergènes de pollen

Pour éviter l'écueil des variations dû au sérum de lapin, la technique des immuno-empreintes a été appliquée pour la détection des allergènes et notamment vis-à-vis du pollen de dactyle, en fait peu étudié jusqu'en 1980.

### Pollen : *Dactylis glomerata*

.Pour le pollen de Dactyle, par exemple, l'extrait hydrosoluble a été obtenu à partir d'une macération de grains de pollens après avoir défini les conditions de pH, de température et de force ionique. L'influence du paramètre « temps d'extraction » a été étudiée après 2', 20' et 4 heures de macération. Un extrait brut et une fraction purifiée ont été étudiés qualitativement par isoelectrofocalisation et quantitativement par la mesure de l'activité allergénique ( **images p 19,20,21**)

### Immunoempreinte et isolement du **Dg 1**

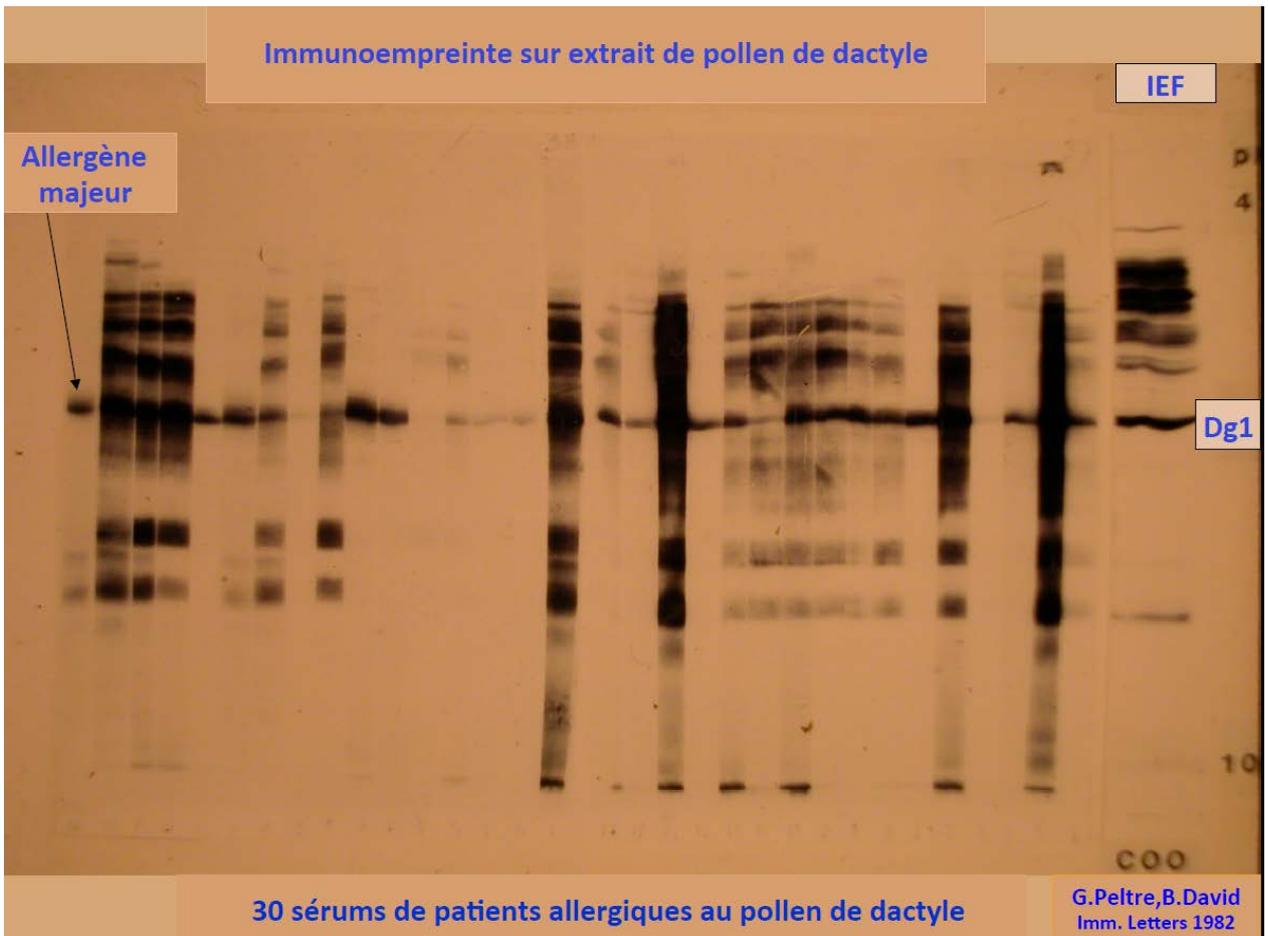
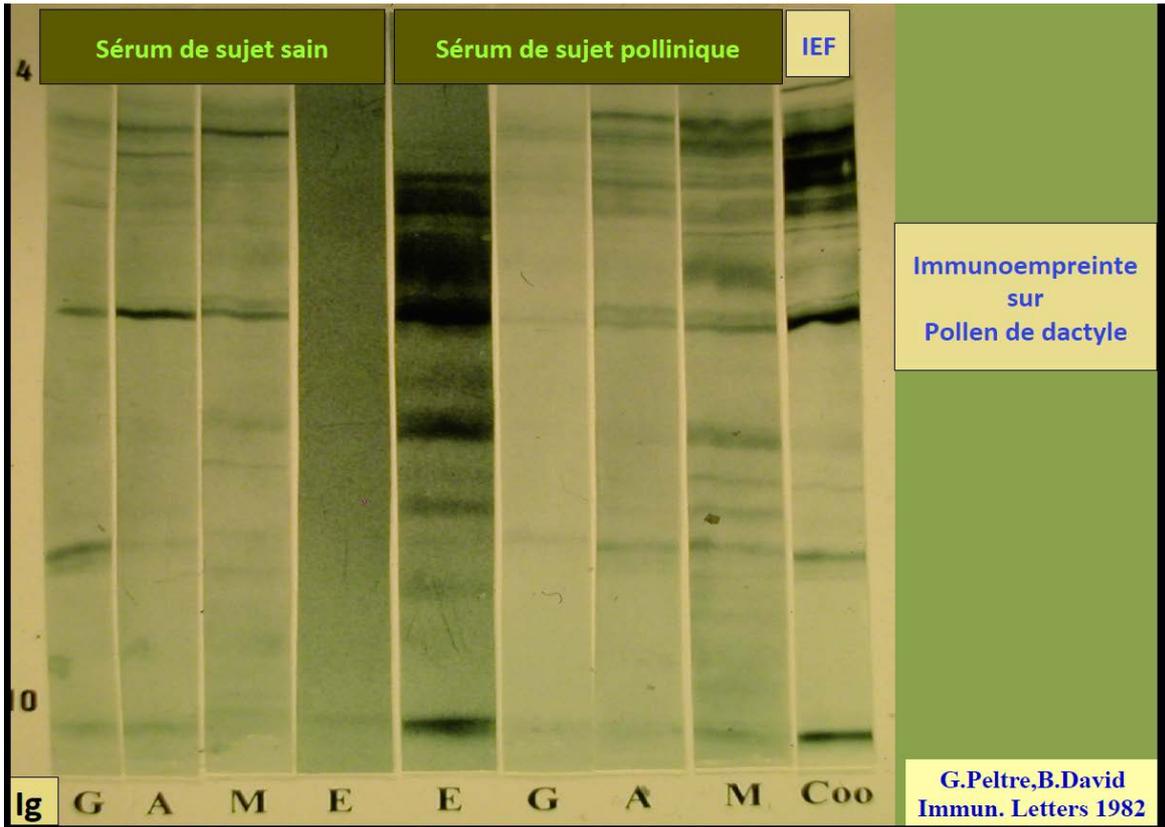
Grâce à la technique des immunoempreintes sur nitrate de cellulose mise au point au laboratoire par G. Peltre, il a été possible de transférer les protéines de pollen de **Dactyle séparées par IEF** (le spectrotype du dactyle représente environ **60 bandes protéiques**) et d'analyser les sérums contenant les anticorps spécifiques anti pollen. Les antigènes reconnus par les IgE humaines, soit les allergènes, sont mis en évidence par un sérum anti-IgE humain radio-marqué. Les autoradiographies obtenues ont permis de déceler une très grande hétérogénéité dans les réponses à IgE spécifiques. 4 groupes de répondeurs ont pu être établis sur 1000 sérums de patients allergiques au pollen de dactyle : le premier groupe (18%) ne reconnaissant qu'un seul allergène sur les 60 bandes protéiques, le second groupe (15%) entre 2 et 5, le troisième groupe (50%) entre 10 et 30 et le dernier (17%) plus de 30.

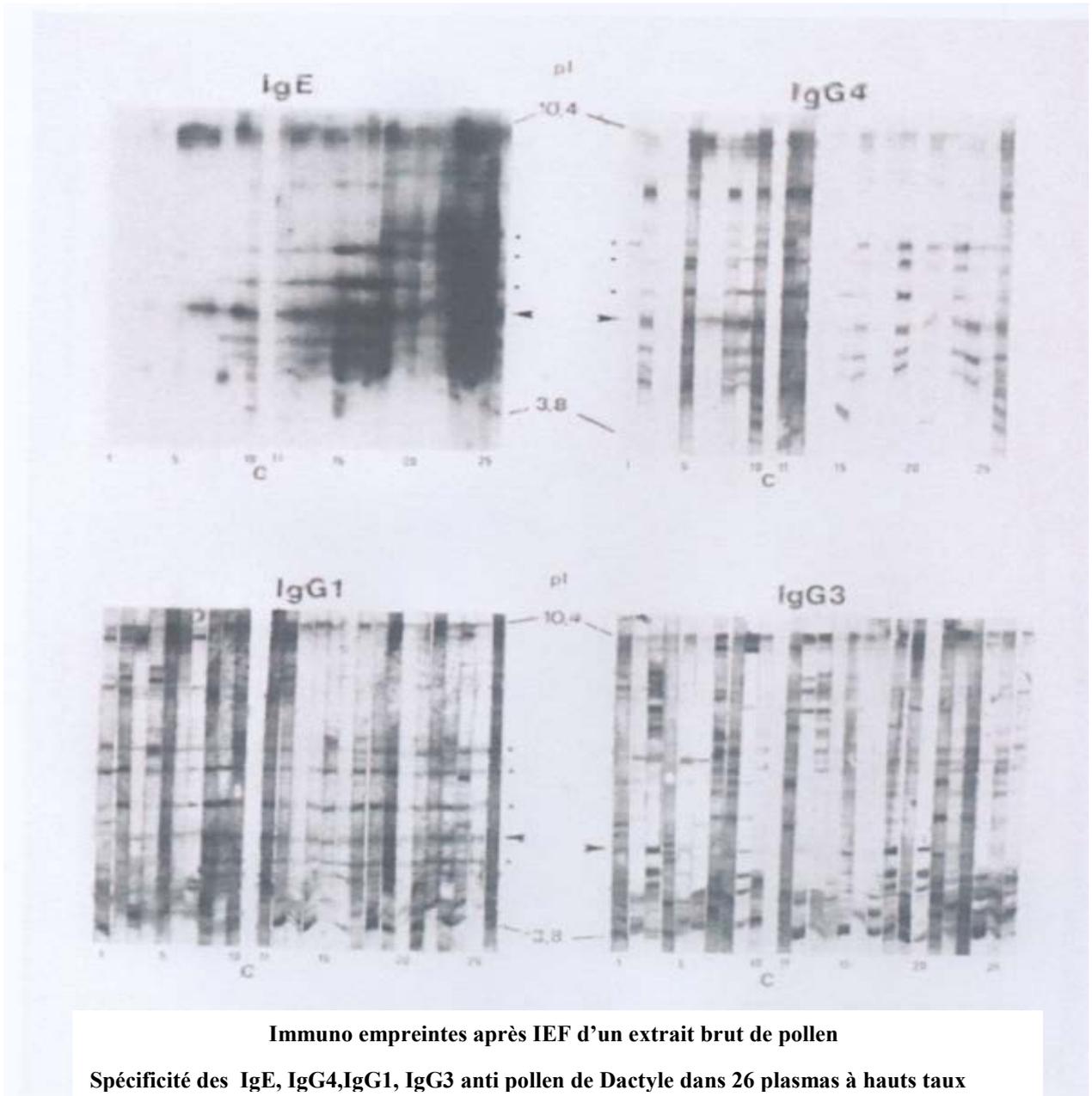
Comme pour l'acarien un allergène a été identifié comme majeur puisque presque 100 % des sujets polliniques sont sensibles. Cet allergène dénommé **Dac g 1** (accepté comme premier allergène majeur du Dactyle dans la nomenclature internationale) a été isolé et caractérisé (MM : 33000 d et .pI : 5,9)

Par la suite un **anticorps monoclonal anti-Dac g 1** a été obtenu au laboratoire par Salah Mécheri, ce qui a permis de localiser un épitope présent sur **Dac g 1** et de révéler sa présence sur d'autres allergènes de pollen de graminées telles que l'ivraie, l'avoine, la fétuque, la flouve. (**Détection des réactions croisées**). En outre, il a été observé une hétérogénéité de réponse au niveau des anticorps IgG, IgM et IgA dans les sérums de sujets allergiques, mais aussi dans les sérums de sujets non allergiques.

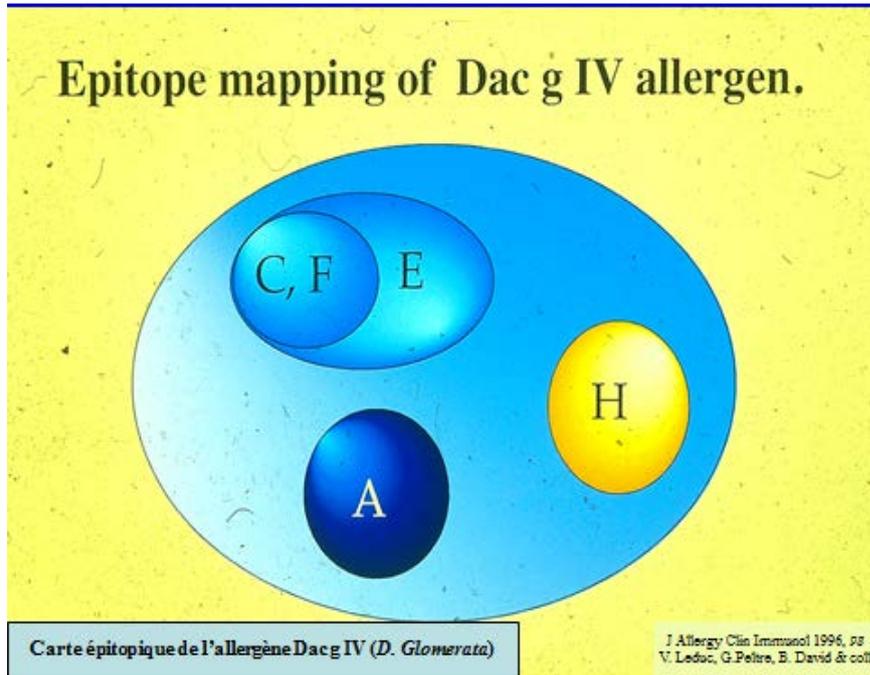
D'autres travaux ont suivi et notamment l'isolement et la caractérisation de l'allergène **Dac g 4**, protéine majeure basique, qui possède des épitopes qui se croisent avec beaucoup d'autres espèces (fréquence des allergènes croissants). Enfin, un allergène recombinant **Dac g 3** a été obtenu par clonage à partir de l'ARN messager du pollen de Dactyle afin d'en établir plus précisément les caractéristiques immunologiques (1996)

Toutes ces études mènent à la conclusion que l'hétérogénéité des allergènes et l'hyper variabilité de la réponse allergique vis à vis des différentes molécules prouvent que si l'on veut avoir des notions plus précises sur la sensibilisation chez l'homme, il est absolument indispensable d'utiliser les molécules identifiées allergéniques "majeures" comme marqueurs biologiques référencées. (Der f 1, **Dac g 1**) ) Les recherches sur les pollens ont été initiées par G. Peltre, immunochimiste (CNRS) et S. Mécheri, immunologiste (IP)

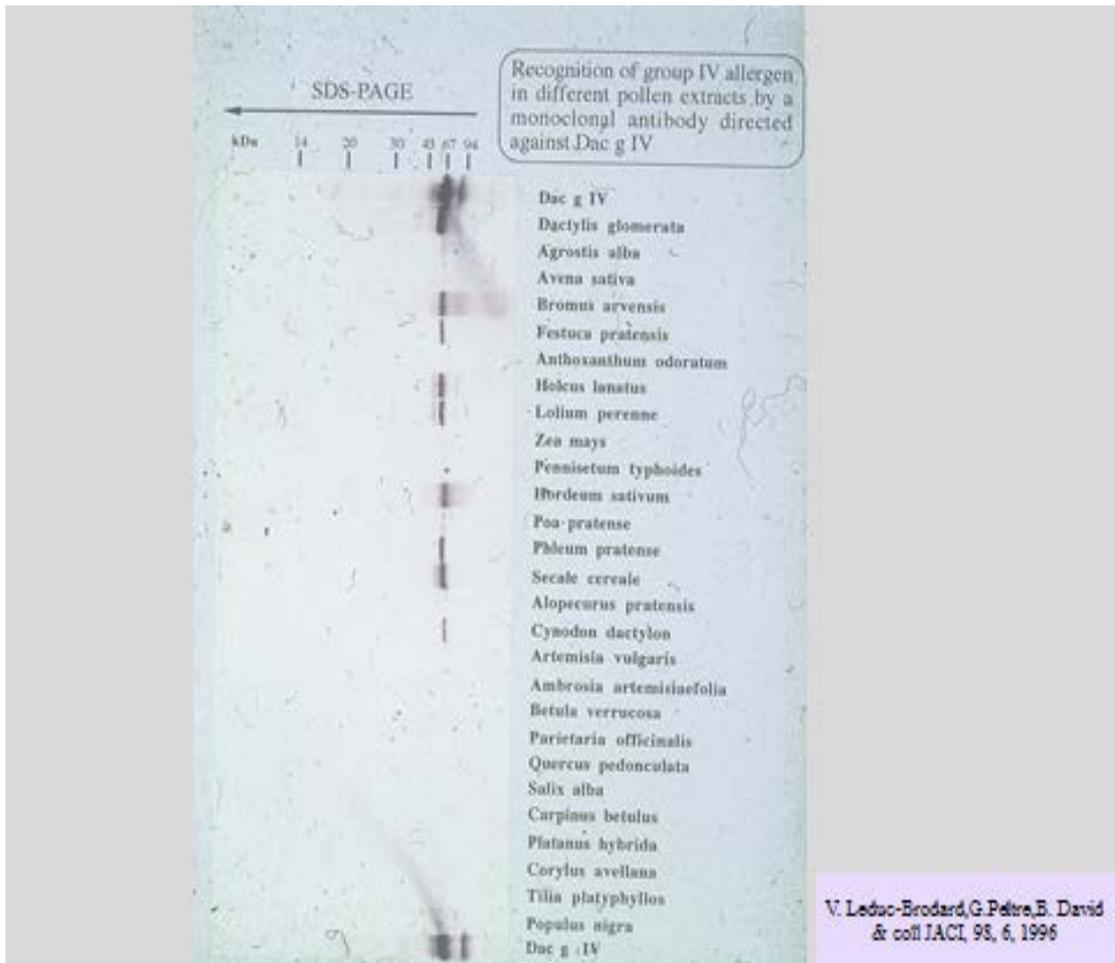




G. Peltre, B. David Institut Pasteur



**Réactions croisées : anticorps monoclonal anti Dac g 4 et autres pollens de graminées**



## Allergènes de cheval

Une enquête en 1990 a attiré notre attention sur la fréquence croissante d'asthme allergique chez l'enfant vis-à-vis de •nouveaux allergènes• parmi lesquels l'arachide, le kiwi et le cheval. La recrudescence des loisirs d'origine équine a amplifié de façon considérable ce qui n'était connu qu'en allergie professionnelle.

Nous avons engagé un travail sur les allergènes d'origine équine pour trois raisons

- 1) L'allergène aux protéines du cheval est l'une des plus sévères que l'on rencontre en raison de la quantité d'allergènes inhalée par le patient et de la puissance des allergènes
- 2) La fréquence de l'asthme de l'enfant allergique à ces protéines ;
- 3) La difficulté d'isoler et de purifier ces allergènes.

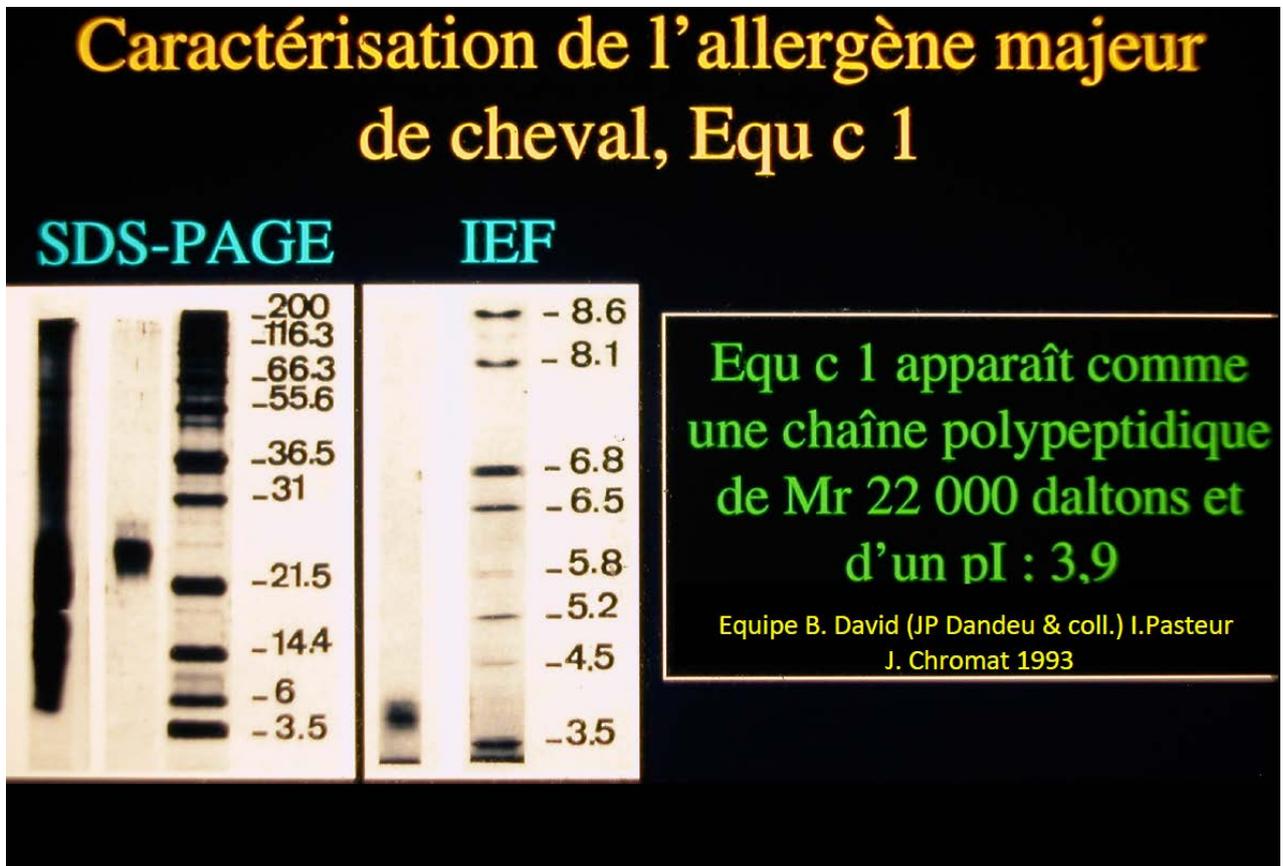
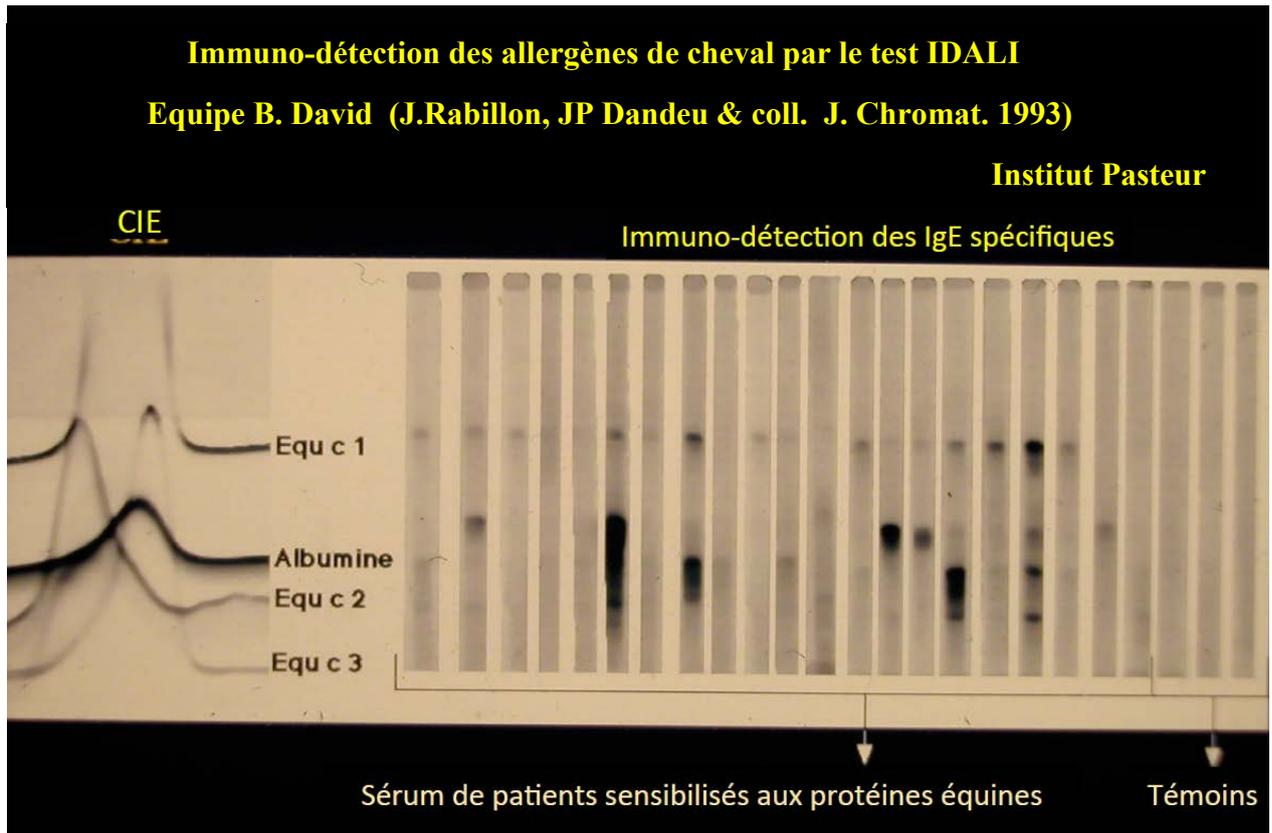
### *Isolement et clonage de l'allergène majeur du cheval : Equ c 1*

Après avoir identifié par radio immune électrophorèse bidimensionnelle, les différents constituants reconnus comme allergènes, par les IgE spécifiques sériques de patients allergiques, nous avons entrepris d'isoler le premier allergène majeur Equ c 1 en partant d'un extrait aqueux de crins et de squames de l'animal. (**Images p 23 24**)

Par des techniques chromatographiques faisant appel aux interactions hydrophobes, nous avons réussi à isoler, purifier, et séquencer l'allergène majeur du cheval **Equ c 1** avant clonage du gène. Ce clonage fut réalisé grâce à une collaboration avec l'Unité de génétique et de Biologie du Développement de l'Institut Pasteur. L'allergène recombinant Equ c 1, constitué d'une chaîne polypeptidique de 187 Acides aminés, deux sites de glycosylation et un pont disulfure possède une masse apparente de 21.500 daltons (**Images p 25 26**). Un alignement de séquence a permis de déterminer une forte identité de 80 % avec la protéine urinaire majeure de la souris (**Mus m 1**) et l' $\alpha_2$ -microglobuline de rat (protéine majeure du rat (**Rat n 1**)) connus pour être des allergènes majeurs responsables de l'asthme chez les animaliers. Toutes ces molécules ont un point commun : elles font partie de la superfamille des lipocalines parmi lesquelles un certain nombre d'allergènes ont été décrits.

La nature de cette structure commune est bien décrite comportant une séquence d'aminés bien conservés :(-G-x-W-) nommée par Flower « *l'empreinte des lipocalines* » (tableau). Nous avons décrit l'existence d'un équilibre entre une forme monomérique et une forme dimérique de l'allergène Equ c 1, ceci aussi bien pour la forme naturelle de l'allergène que pour sa forme recombinante. Lorsque nous avons obtenu la cristallisation, nous avons constaté que c'est dans sa forme dimérique que la protéine cristallisait

La modélisation cristallographique réalisée avec la collaboration de l'Unité de Biochimie structurale de l'Institut Pasteur) a révélé une structure similaire à celle des autres membres de la famille des **lipocalines** nous permettant également de préciser les acides aminés intervenant dans l'armature de la structure de la protéine. En résumé, la cristallisation d'une protéine représente le moyen idéal pour déterminer d'une façon extrêmement précise les régions structurales de la protéine impliquées dans des fonctions biologiques, mais elle n'est possible que si la molécule est d'une pureté quasi absolue. Nous avons également purifié et isolé deux autres molécules identifiées comme allergènes mineurs révélés par immunoempreintes à partir de sérums de patients allergiques. Ils ont été répertoriés **Equ c 2** (lipocaline) et **Equ c 3** (albumine). Les expérimentations en biochimie ont été menées par JP Dandeu qui a découvert les techniques et les méthodes qui ont abouti à la purification des extraits équins et à l'isolement d'Equ c 1 assisté de C. Grégoire, étudiant qui a présenté sa thèse de Doctorat ès Sciences sur Equ c 1, J. Rabillon, ingénieur (IP), H. Goubran-Botros, ingénieur (IP), P. Poncet, chercheur (IP). Le clonage a été effectué avec le concours de C. Rosinski-Chupin (Unité génétique de F. Rougeon) et la cristallisation avec le concours de P. Alzari (biochimie structurale), cités plus haut.



## Distribution des allergènes de cheval

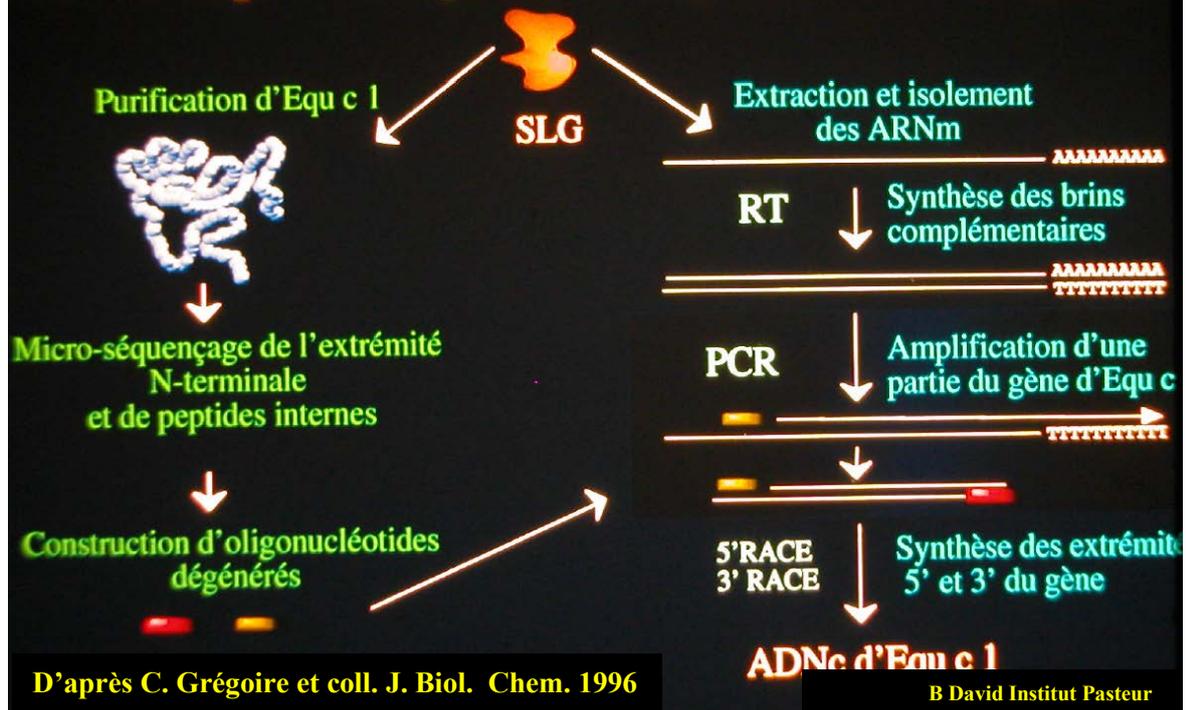


### Répartition d'Equ c I dans différents Compartiments physiologiques de l'animal

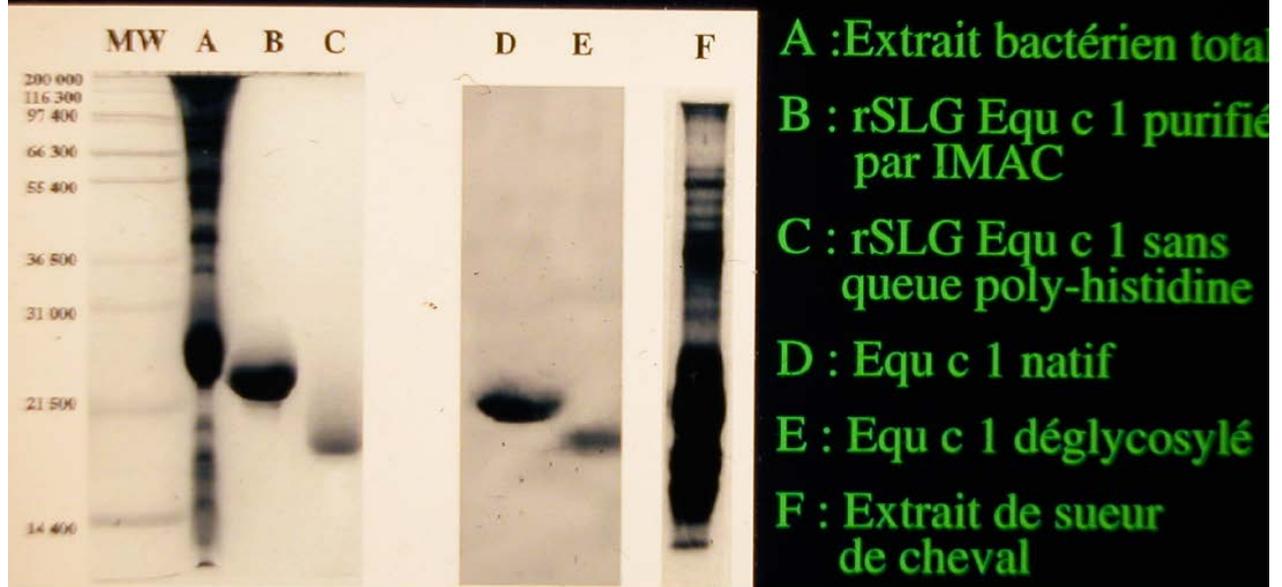
	Sueur	Salive	Sérum	Fèces et Urine
Etalon	120	310	0	>10
Jument	160	360	0	> 10
Hongre	150	330	0	> 10
Poulain	0	0	0	> 10
< 12 mois				

Valeurs exprimées en ug d'Equ c I /gramme de poids sec

## Stratégie de clonage de l'allergène majeur de cheval Equ c 1, à partir des glandes sublinguales

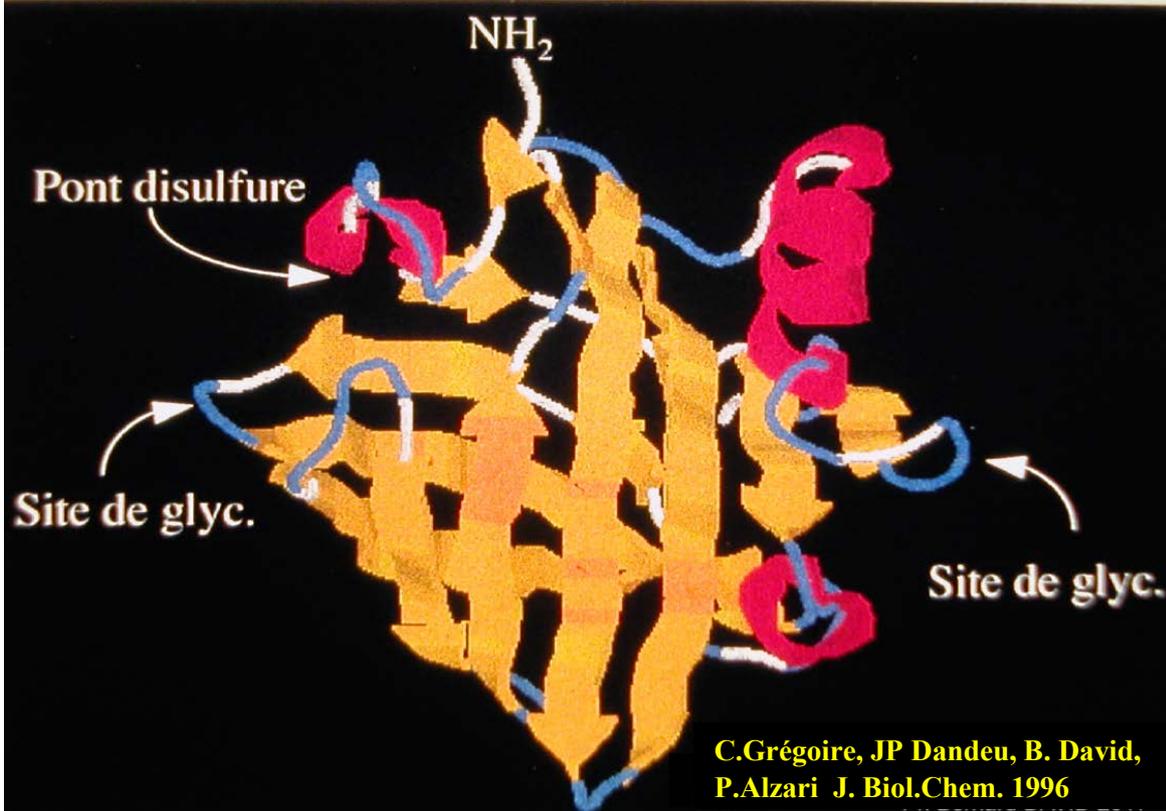


## Comparaison en SDS -PAGE d'Equ c 1 naturel et recombinant

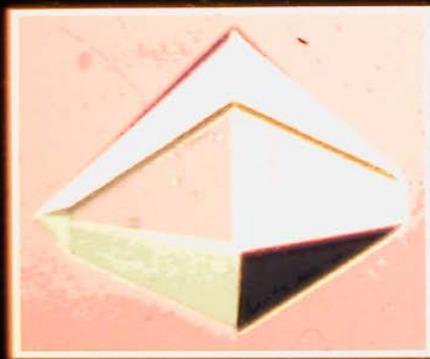


C. Grégoire, JP Dandeu, B. David J.Biol.Chem. 1996

## Modélisation structurale d'Equ c 1.



## Analyse cristallographique de rSLG Equ c 1



Groupe d'espace tétragonal  $P4_21_2$   
Résolution : 2,3Å

C.Grégoire, JP Dandeu, B. David, P.Alzari

ActaCrystallogr 1999

Du cheval à l'allergène majeur isolé Equ c 1 qui va devenir recombinant rSLG Equ c 1.  
La nature de sa structure moléculaire, une lipocaline sera modélisé et transformé en cristal pur..

## Conclusions

La caractérisation de la structure moléculaire d'une protéine antigénique représente un élément capital pour faire progresser nos connaissances sur le mode de fonctionnement du système immunitaire.

Cependant, jusqu'à présent, il n'a pas été formellement démontré l'existence d'un lien entre la structure et la fonction d'une protéine au niveau **du concept de l'allergénicité** d'une molécule.

Tous les membres d'une famille de protéine ne sont pas des allergènes et tous les allergènes d'une famille de protéines n'induisent pas de réactivités croisées. (ex: cystéine protéases des acariens et des fruits exotiques, lipocalines des souris, blattes,  $\beta$  lactoglobuline, cheval)

Enfin, les seules structures, séquentielle et/ou conformationnelle et/ou ayant une fonction, ne sont pas suffisantes pour expliquer pourquoi un antigène est un allergène.

Personnellement, je considère depuis fort longtemps que les allergènes n'existent pas dans la nature (**le mythe**) et que c'est l'organisme qui transforme une protéine banale en allergène avec la complicité de son patrimoine génétique et de l'environnement (**la réalité**).

J'approuve totalement la citation de T. Platts-Mills « Allergens are recognized as the proteins that induce immunoglobuline E (IgE) responses in humans. » response ( *Immunological Reviews* 2011 Vol. 242: 51–68).

Allergologie J. Charpin, D.Vervloet Med .Sci .Flammarion 1988 Ch 71 : Allergènes (B.David ,M. Thibaudon) Ch 72: Standardisation des préparations ( B Guérin)

Traité d'allergologie D. Vervloet, A. Magnan Flammarion 2003 Ch 2 : Allergènes : structure , fonctions ( B.David, J. Rabillon, H. Goubran Botros) Ch3 : Allergènes recombinants ( G. Pauli, P. Deviller) Ch38 : Allergènes alimentaires (D.A. Moneret- Vautrin) Ch. 66 : Standardisation des produits allergènes (L.Guérin, V. Leduc, H. Chabanne)

## Annexe

## Allergènes et Protéines

### STRUCTURES MOLÉCULAIRES DE QUELQUES ALLERGÈNES

Les antigènes de nature protéique potentiellement allergéniques constituent les immunogènes les plus nombreux et les plus diversifiés. Les bases structurales et moléculaires d'un allergène sont donc équivalentes à celles de toute protéine. À partir de la séquence des aminoacides des chaînes polypeptidiques la structure primaire d'une protéine peut être établie, mais chaque protéine possède une conformation tridimensionnelle qui lui est propre et maintenue par d'autres types de liaisons que la liaison peptidique. Les liaisons intervenant dans la structure spatiale des protéines (pont disulfure, liaison ionique, liaison hydrogène, liaison hydrophobe) déterminent respectivement leurs structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Le déterminant critique de la fonction d'une protéine est sa conformation (disposition tridimensionnelle des atomes d'une molécule) (**Image p28**).

Trois conformations régulièrement répétées des chaînes polypeptidiques sont connues. En premier lieu, l'**hélice  $\alpha$** , structure en bâtonnets (liaisons hydrogène entre les groupes NH et CO). Les hélices peuvent s'enrouler l'une autour de l'autre pour former des superhélices. En second lieu, les **feuilletts plissés  $\beta$**  représentent un autre modèle structural périodique, sont composés de chaînes polypeptidiques presque totalement étirées, appelées **brins  $\beta$**  qui peuvent être de même sens (feuilletts  $\beta$  parallèles) ou de sens opposé (feuilletts  $\beta$  antiparallèles). Des segments **d'hélice  $\alpha$**  et de feuillet **plissé  $\beta$**  sont rencontrés dans de nombreuses protéines, de même que les **coudes  $\beta$**  en *épingle à cheveux*. En définitive, la *séquence des aminoacides d'une protéine* détermine sa **séquence tridimensionnelle** comme cela a été démontré pour la première fois pour la ribonucléase et a pu ensuite être appliquée à toute *molécule d'origine protéique. en particulier aux antigènes et aux allergènes*

Durant ces dernières années, la structure primaire d'un grand nombre d'allergènes a été résolue, et il existe de nombreuses séquences d'allergènes et d'isoallergènes dans les banques de données. Par ailleurs, la majorité des gènes des allergènes majeurs ont été clonés et exprimés sous forme de protéines recombinantes et les structures tridimensionnelles de certains allergènes ont été également déterminées grâce à l'utilisation de la cristallographie, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et des techniques de modélisation. Parmi ces derniers, on peut citer les allergènes Bet v1, Bet v 2, Mus m 1, Bos d 5 (l $\beta$ -lactoglobuline), Bos d 2, Der p 1, Der p 2, Bla g 4 et **Equ c 1**. les structures cristallographiques qui s'accumulent dans les banques de données confirment l'observation que les protéines qui partagent des séquences importantes identiques supérieures à 25 p . 100, adoptent généralement des organisations spatiales similaires. La détermination de la structure tertiaire des allergènes peut nous éclairer sur leur fonction biologique et leur antigénicité potentielle et nous aider à expliquer la présence des réactions allergéniques croisées. Voici trois exemples d'allergènes possédant des structures analogues à celles appartenant à des familles de protéines particulièrement bien définies : la famille des cystéines protéinases, la famille des lipocalines et la famille des profilines (**Image p 29**)

### Allergènes de la famille des cystéines protéinases

Plus de 130 cystéines protéinases différentes ont été répertoriées jusqu'à nos jours dans les banques de données. Ces enzymes ont des origines très variées et plusieurs d'entre elles ont été décrites comme allergènes : acariens, (**Der p1**, 1<sup>o</sup> allergène cloné), fruits exotiques (papaïne, bromélaïne, ananaïne (ananas), actinidine), (kiwi)), parasites (cruzipaïne (trypanosome). En se basant sur des méthodes de prédiction des structures des protéines, il a été possible de construire un modèle tridimensionnel de Der p 1 sur la base de la structure cristalline de la papaïne. De plus, l'alignement de la séquence de Der p I avec celle de la papaïne met en évidence la présence d'un fort pourcentage d'identité

### Allergènes de la famille des lipocalines

Les protéines membres de la famille des lipocalines font partie d'un groupe large et diversifié. Actuellement plus de 90 séquences de lipocalines sont répertoriées dans les banques de données. Typiquement extracellulaires, ces petites protéines sécrétées ont une masse comprise entre 15 et 30 Da. La cristallisation de plusieurs d'entre elles révèle une très forte conservation de la structure tridimensionnelle. Celle-ci est constituée de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles ménageant une cavité hydrophobe (**calice**) susceptible de lier et donc de transporter des petites molécules lipidiques. Cette structure est commune avec deux autres familles : les avidines et les protéines liant les acides gras, les *fatty acid binding proteins* (FABP). Les membres de ces trois familles sont regroupés sous le terme générique de **calycine**. Parmi les molécules de cette famille se trouve la  $\beta$ -lactoglobuline, l' $\alpha_1$ microglobuline (protéine urinaire de souris ou **Mus m1**,) protéine du rat ou **Rat n 1**, l'allergène majeur de cheval **Equ c 1**.....)

### Allergènes de la famille des profilines

Les profilines sont des protéines ubiquitaires qui lient l'actine et constituent un groupe de molécules qu'on trouve abondamment dans différents organismes allant de la levure et de l'amibe jusqu'aux arbres, aux plantes et aux mammifères dont l'homme. La comparaison entre les profilines de diverses sources montre que malgré une identité de séquences inférieure à 25 p. 100 toutes les profilines adoptent le même La molécule de la profiline du bouleau est composée de trois hélices  $\alpha$ , sept brins  $\beta$  et dix boucles  $\beta$ . D'autres allergènes de pollen ont été répertoriés, comme profilines (Phl p 11, Phl p 12, Ole e 2.....) mais on ne doit pas conclure pour autant que toutes les profilines sont des allergènes. (**Images 30 31**)

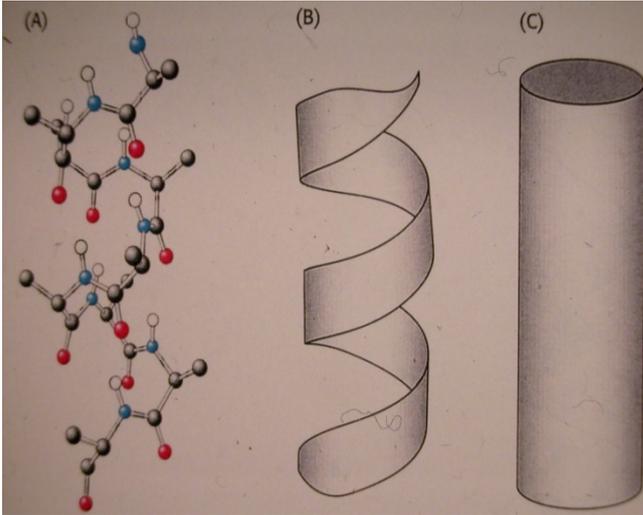
## STRUCTURE MOLECULAIRE ET LOCALISATION DES EPITOPES B ET T

En conclusion, la connaissance de la structure tridimensionnelle d'une protéine est un complément indispensable à l'analyse de sa structure primaire. Afin d'élucider les bases structurales de l'antigénicité permettant d'identifier des épitopes variants au cours de l'évolution et non soumis à la tolérance immunologique, on peut analyser des protéines de structure tertiaire connue pour faire apparaître certaines corrélations entre la localisation des épitopes et certains paramètres structuraux (hydrophilie, mobilité, accessibilité, amphipathité, terminaison des chaînes). ( **Image p 33**)

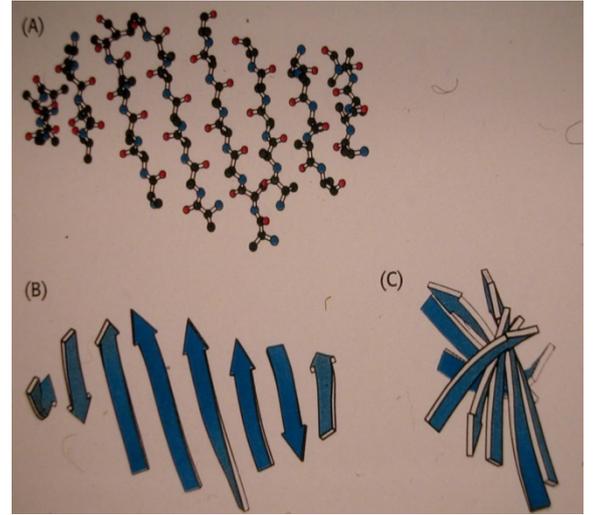
Deux types de spécificité apparaissent: l'un lié à la séquence d'une région de l'antigène (ou allergène) situé à la surface de la structure tridimensionnelle de la protéine (molécule repliée) correspond à **l'épitope B** reconnu par l'anticorps ; l'autre, plus interne dans la molécule qui apparaît après apprêtement de l'antigène par la cellule présentatrice d'antigène, et qui correspond à une structure séquentielle portée par le peptide linéaire qui se lie au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I pour activer spécifiquement un récepteur situé sur les lymphocytes T est **l'épitope T** .

On parle de *réactivité antigénique* pour la reconnaissance de *l'épitope B* par l'anticorps, et d'*immunogénicité* pour la reconnaissance de *l'épitope T* par le récepteur des lymphocytes T. Ces deux termes sont souvent associés à l'allergénicité lorsque l'antigène se révèle être allergène chez un individu et pour un allergène donné l'épitope B sera défini par sa liaison avec l'IgE.

Une technique utilisée pour *prédire les épitopes B* d'un antigène consiste à déterminer les résidus d'une molécule en contact avec une sphère de rayon élevé lorsque celle-ci roule à la surface de la protéine (*résidus protubérants*). Une région protubérante est une aire continue qui peut être considérée comme un **épitope B** potentiel. C'est ce qui a été réalisé dans le cas de Der p I par exemple (couleurs figure ) La *carte épitopique* d'un allergène correspond au nombre d'épitopes B reconnus par l'IgE et la réaction allergique dépend donc de sa liaison avec les IgE fixées sur le mastocyte et le basophile aboutissant à la dégranulation de ces cellules.

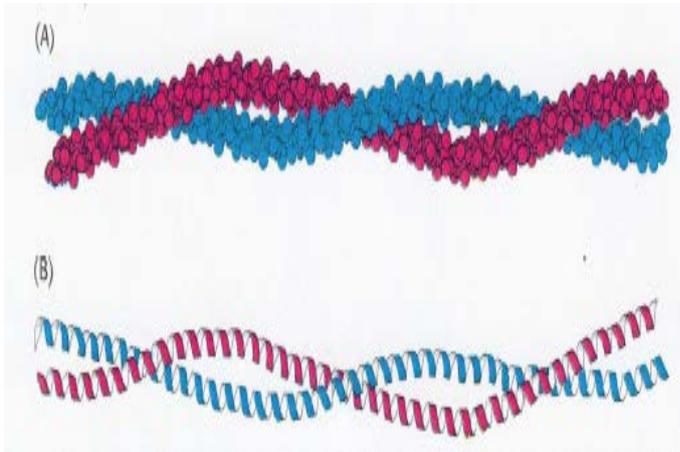


**Représentation schématique des hélices  $\alpha$**   
 ( modèle, ruban, cylindre)

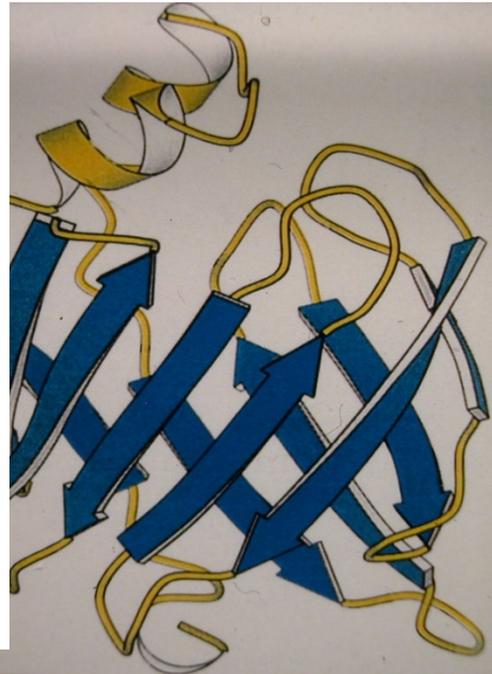


**Feuillet  $\beta$**   
 ( modèle schématique et torsion)

Une structure en hélice  $\alpha$  surenroulée



Les deux hélices de l' **$\alpha$ -kératine** sont associées par des interactions faibles telles les forces de van der Waals et les interactions ioniques

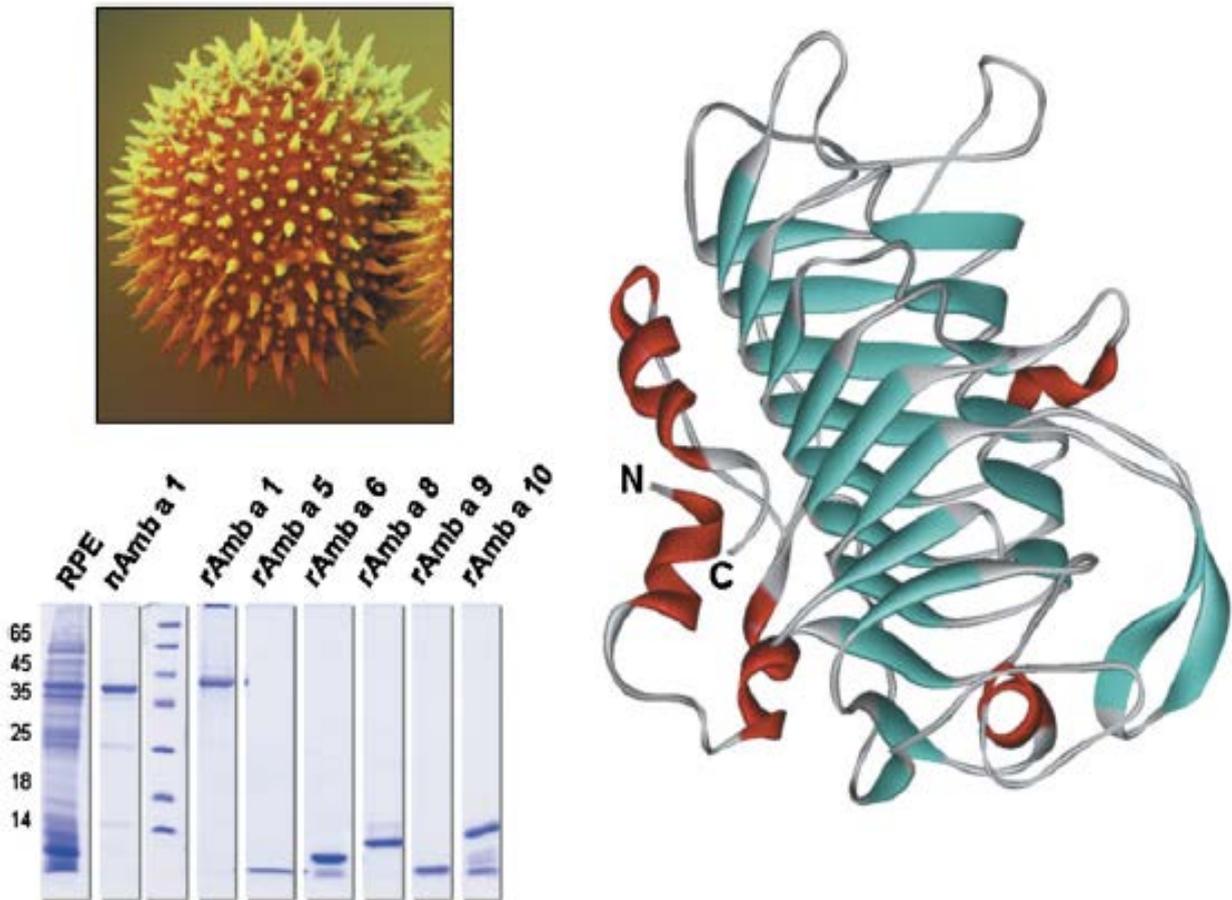


**Protéine riche en feuillets  $\beta$**   
**riche en acides gras**

**Bases structurales et moléculaires d'une protéine**

Du grain de pollen à la protéine  
moléculaire tridimensionnelle

et à sa structure



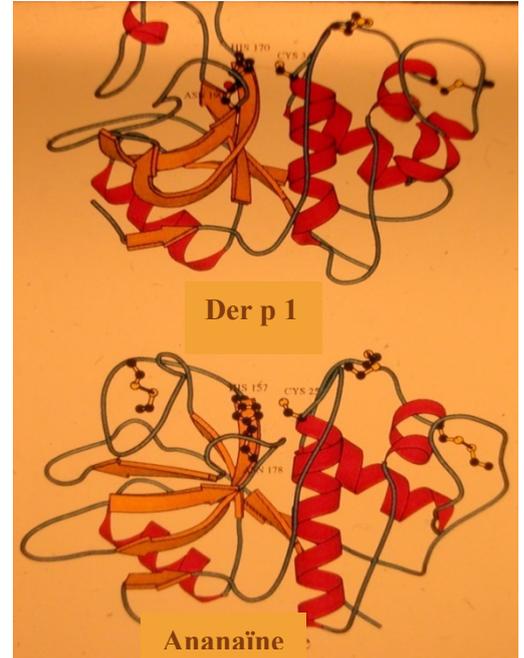
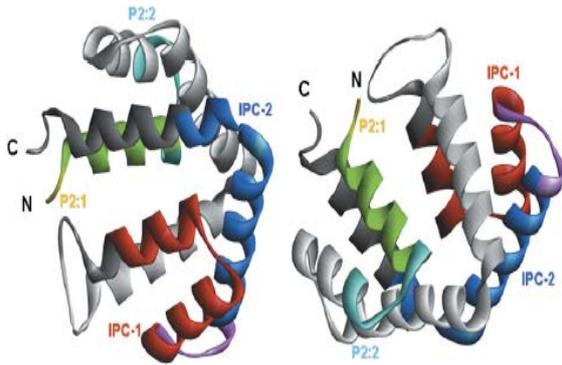
allergène majeur Amb a 1

Allergènes recombinants du pollen d'Ambrosia (Ragweed)

Chapman JACI 2007

Structure moléculaire de  
l'allergène majeur du chat Fel d 1

Cystéines protéases

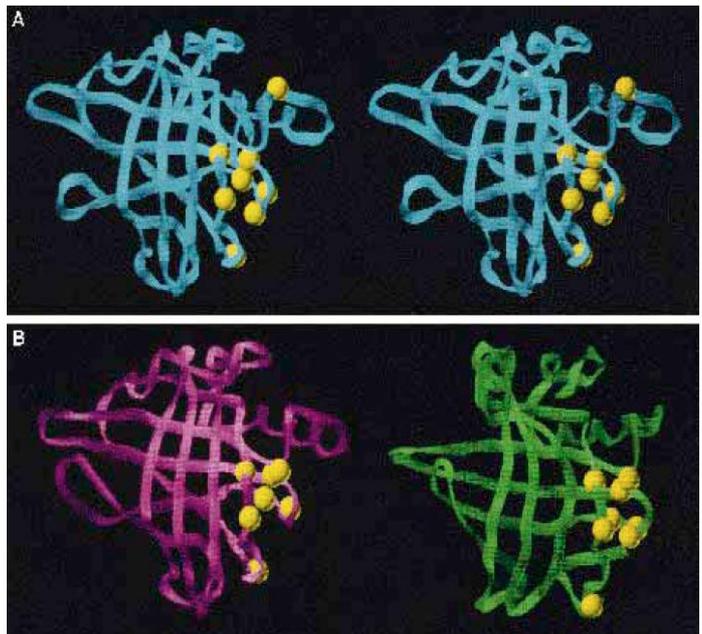


Calycines: lipocalines

A) blatte (Bla g 4)

B) papillon (BBP)

B) protéine urinaire  
de rat (Rat n 1)

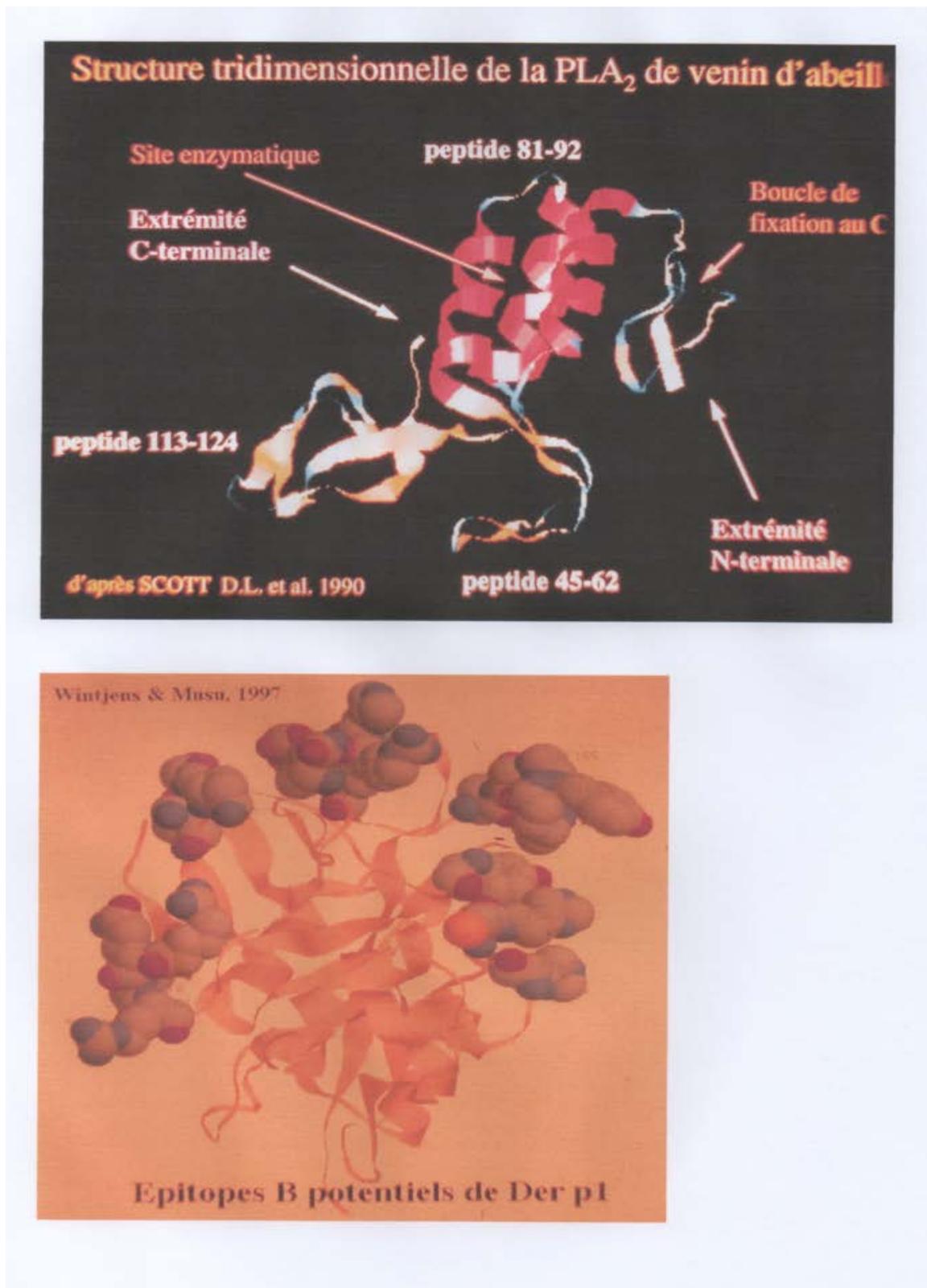


Arruda....Chapman JBC 1995

of butterfly BBP

Structure moléculaire des épitopes T et B

## Epitope T de la phospholipase A



**D.pteronyssinus modélisation de Der p 1 (résidus protubérants) epitopes B ?**

## Naissance des allergènes et de l'allergie (Recherche fondamentale)

### A l'Institut Pasteur



A la demande de Pasteur Vallery-Radot, **Louis Guibert** crée le Service des Allergènes, le premier en France, à l'Institut Pasteur en 1956 et sera qualifié jusqu'en 1973 de « monsieur **Allergène** » au sein de l'**allergologie française**.

### I Laboratoire des Allergènes

A) Période 1956- 1964 : production d'extraits pour le diagnostic et le traitement

-1958: Premiers extraits allergéniques fabriqués en France

- Poussière de maison
- Pollens de Graminées (Pollineraies implantées à Rennemoulin)
- cultures de moisissures
- extraits bactériens

- 1963 : Préparation d'extraits allergéniques publiée (1° Traité des maladies allergiques )

B) Période 1965-1972

- Recherche clinique : avec des services hospitaliers en particulier à l'hôpital Rothschild
- Recherche expérimentale : biochimie et expérimentale animale
- Activité allergénique des fractions obtenues par chromatographie (*Ann Inst Pasteur* (Paris) **1965**) (poussière de maison purifiée standardisée sur tests cutanés)

### II Edification de la recherche pasteurienne en allergie

1973-1975

Après le décès de Louis Guibert en 1973, le service des allergènes est confié à A. Lamensans, pharmacien scientifique, pour continuer la production des extraits allergéniques. Durant cette période, le Dr Bernard David est envoyé en mission aux USA dans le laboratoire du Pr Michael Heidelberger (Columbia University, New York University Medical Center) pour effectuer un stage Post Doc afin de concevoir un projet dans le but de développer une recherche fondamentale sur l'allergie moléculaire et cellulaire.

1976-1977

A) **Orientation du service des allergènes** Engagé par A. Lamensans au service des allergènes en septembre 1976, Michel Thibaudon sera chargé des responsabilités pharmaceutiques de la production qu'il assumera dès 1981. D'autre part, suite aux travaux de J. Charpin et de N. Nolard, il met en place des capteurs de pollen en 1984 et crée le laboratoire d'Aérobiologie (premier réseau français d'aérobiologie en 1986). Ce réseau aboutira à la création d'un réseau indépendant, le **RNSA** (Réseau National de Surveillance Aérobiologique) en mars 1996.

B) **Créations d'une unité de recherche « unité d'Immuno-Allergie »** et de l'**Allergotest** (laboratoire d'explorations allergologiques) dont les responsabilités scientifiques sont confiées au Dr Bernard David, chef de laboratoire.

### III Travaux et découvertes:

- A) 1978-1980 :
- essais cliniques et standardisation des allergènes
  - premiers essais cliniques en France sur la désensibilisation au pollen de graminées en **double aveugle**
- B) -1980-2000 :
- Thèmes : allergènes ( acariens, pollens, cheval), cellules ( basophiles et mastocytes),
  - sur les allergènes (acariens, pollens, cheval) : biochimie, immunochimie, immunologie)
  - sur les basophiles humains et l'histamine, sur les RBL et les récepteurs IgE,
  - sur les mastocytes et leurs lysosomes ( mastocyte, cellule **présentatrice d'antigènes 1992, sécrétions d'exosomes immunologiquement actifs 2001**) « découverte »,
  - biologie moléculaire: allergènes (acarien *D. farinae*, **Der f 1**) pollen dactyle, (**Dac g1, Dac g 3**) allergènes de cheval (Equ c 1, Equ c2 et c3 )( **isolement et clonage de molécules allergéniques**).

### IV Scientifiques de l'Unité d'Immuno-Allergie

Lors de la création (1976-77), 2 scientifiques : Dr Bernard David, chef de laboratoire, puis professeur en 1983 et Anne Weyer, chargée de recherche puis chef de laboratoire en 1985.

**De 1978 à 1985 : 1<sup>o</sup>** groupe J. Rabillon, I.P. ; A. Weyer, I.P. ; J. Le Mao, I.P. ; JP Dandeu, CNRS ; G. Peltre, CNRS ; JM Cavaillon (actuellement professeur) I.P. ; S. Mécheri (actuellement, chef de laboratoire) I.P. ; M. Etievant I.P. jusqu' en 2000.

**De 1986 à 2000:** H.Goubran- Botros, I.P. ; X. Devaux, universitaire ; A. Prouvost-Danon, CNRS ; C. Marchand, CNRS ; U. Blank, CNRS ; M. Roa, I.P. ; P. Poncet, I.P. ; H. Sénéchal INSERM.

Au total, en **2000**, l'unité compte **30** personnes dont **15 scientifiques**.

## Bibliographie sélective

### Articles

#### 1 Bioclinique

1) 1976 Taux d'histamine intracellulaire dans les basophiles humains et variabilité individuelle chez des sujets allergiques au cours de la désensibilisation. B. David, A. Weyer, **C.R.Acad. Sci. (Paris)** t 283, 1811- 1814.

2) 1978 Cellular histamine release, specific and total serum IgE levels in hay fever patients and controls. A. Weyer, B. David, M. Laurent, E. Henocq, **Clin. Allergy**, 187-194.

Grass pollen hyposensitization versus placebo therapy.

3) 1981 I. Clinical effectiveness and methodological aspects of a pre-seasonal course of desensitization with a four-grass pollen extract. A. Weyer, N. Donat, C. L'heritier, F. Juilliard, G. Pauli, B. Soufflet, B. David, **Allergy**, 36, 306-317

4) 1981 II Immunotherapy induced changes in serum IgE and IgG levels . A. Weyer, C. Doinel, M. Debbia, C. L'heritier, L.Rivat, J. Le Mao, C. Hirth, B. David **Allergy**, 36, 319-328.

#### 2 Basophiles humains, IgE et histamine

5) 1982 In vitro histamine release from human basophils triggered by a purified allergen from *D. farinae* : bimodal aspect of the dose response curve. A. Weyer, J.P. Dandeu, F. Marchand, B. David **Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)**, 1330, 87-94.

6) 1986 Passive in vitro sensitization of human basophils with *Dermatophagoïdes farinae* specific IgE. A. Weyer, J.P. Dandeu, P. Ougen, F. Marchand, B. David **Agents and Actions**, 18, 178-181

7) 1987 Monoclonal anti-human IgE: Histamine release capacity and effect on in vitro sensitization of human basophils. A. Weyer, C. Demeulemester, J.C. Mazie, G. Peltre, B. David **Agents and Actions**, 20, 206-209.

8) 1987 Basophil sensitivity and reactivity to monoclonal anti-human IgE after in vitro sensitization with human myeloma IgE. A. Weyer, J.L.Guesdon, P. Ougen, F. Marchand, B. David **Agents and Actions**, 20, 210-212.

#### 3 Allergènes

##### A Acariens: *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae* mite

9) 1980 Studies on *Dermatophagoïdes pteronyssinus* allergens: Measurement of the relative potencies of *D.pteronyssinus* purified extracts by in vitro and in vivo methods. J. Le Mao, A. Weyer, G. Pauli, B. Lebel, B. David, **J. Allergy Clinical Immunology**, 65, 381-388.

10) 1980, Histamine release in the standardization of *Dermatophagoïdes pteronyssinus* extracts. **in** Regulatory control and standardization of Allergenic Extracts. **1 volume** - Gustav Fischer Verlag - Stuttgart - New York, 155-159.

11) -1981 Antigens and allergens in *Dermatophagoïdes farinae* mite. I. Immunochemical and physicochemical study of two allergenic fractions from a partially purified *Dermatophagoïdes farinae* mite extract. J. Le Mao, J.P. Dandeu, J. Rabillon, M. Lux, B. David **Immunology**, 44, 239-247.

12) 1982 Antigens and allergens in *D. farinae* mite. II. Purification of Ag 11, (Der f 1) a major allergen in *D. farinae*. J.P. Dandeu, J. Le Mao, J. Rabillon, M. Lux, B. David, **Immunology**, 46, 679-687.

- 13)-1983 Comparison of antigenic and allergenic composition of two partially purified extracts from *Dermatophagoïdes farinae* and *Dermatophagoïdes pteronyssinus* mite cultures J.Le Mao, JP.Dandeu, J.Rabillon, M. Lux, B.David **J. Allergy and. Clinical Immunology**, 71, 588-596
- 14) 1985 Relationship between specific circulating IgE, basophil cell-bound IgE and histamine release induced by purified allergens of *Dermatophagoïdes farinae* - J. Le Mao, A. Weyer, J.P. Dandeu, J. Rabillon, B. David **Int. Archs Allergy appl.Immun.**, 76, 289-295
- 15) 1992 Identification of allergenic epitopes on **Der f 1**, a major allergen of *D. farinae*, using monoclonal antibodies. Le Mao J., Weyer A, Mazie J.C., Rouvre S., Marchand F., Le Gall A David B. **Mol Immunol**, 29, 205-211.
- 16) 1998 Mapping of *Dermatophagoïdes farinae* mite allergens by two-dimensional immunoblotting. Le Mao J., Mayer C., Peltre G., Desvaux F.X, David B., Weyer A, Senechal H **J. Allergy Clin. Immunol.** 102, 631-636

### **B Pollen de graminées *Dactylis glomerata***

- 17)1982 Heterogeneity of grass pollen allergens (*Dactylis glomerata*) recognized by IgE antibodies in human patients sera by a new nitrocellulose immunoprint technique. G. Peltre, J. Lapeyre, B. David **Immunology Letters**, 5, 127-131
- 18) 1985 Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen : the Ag Dg1. S. Mecheri, G. Peltre, B. David **Int. Archs Allergy appl. Immun.** 78, 283-289
- 19) 1985 Production of a monoclonal antibody against a major allergen of *Dactylis glomerata* pollen (Dg1 ). S. Mecheri, G. Peltre, A. Weyer, B. David **Ann. Inst. Pasteur**, 136 C, 195-209.
- 20) 1988 Study of the epitope structure of purified Dac g 1 and Lol p 1 , the major allergens of *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne* pollens, using monoclonal antibodies. W. Mourad, S. Mecheri, G. Peltre, B. David, J. Hebert **J. Immunol.** 141, 3486-3491
- 21)-1988 Demonstration of idiotypes expressed on basophil-bound IgE antibodies by using anti-idiotypic induced histamine release. in grass-pollen allergic patients. S. Mecheri, W. Mourad, J. Lapeyre, M. Jobin, B. David, J. Hebert **Immunology** 64, 11-16.
- 22) 1996 Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. Guerin-Marchand C., Senechal H., Bouin A P., Leduc-Brodard V., Taudou G., Weyer A, Peltre G., David B. **Mol. Immunol.** 33, n° 9, 797-806
- 23) 1996. Characterization of Dac g 4, a major basic allergen from *Dactylis glomerata* pollen. Leduc-Brodard V., Inacio Ph., Jaquinod M., Forest E, David B., Peltre G **J. Allergy Clin. Immunol.** 98, n° 6, part. 1, 1065-1072.

### **C Cheval : allergènes Equ c 1, Equ c2 and Equ c3**

- 24) 1993 Dandeu J.P., Rabillon J., Divanovic A, Carmi-Leroy A, David B Hydrophobic interaction chromatography for isolation and purification of **Equ c 1**, the horse major allergen. **J. Chromat.** 621, 23-31
- 25) 1996 cDNA Cloning and Sequencing Reveal the Major Horse Allergen **Equ c 1** to Be a Glycoprotein Member of the Lipocalin Superfamily. Gregoire C.,Rosinski-Chupin I. Rabillon J., Alzari P.M., David B., Dandeu J. P **J. Biol. Chem.** 271, n° 51, p.32951-32959.

- 26) 1998 Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat. Gouban Botros H., Rabillon J., Gregoire C., David B., Dandeu J.P. **J. Chromatogr.** 710, 57-65.
- 27) 1999 Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the major horse allergen **Equ c 1**. Gregoire C., Tavares G.A, Lorenzo H.K., Dandeu J.P., David B., Alzari P.M. **Acta Crystallogr. D**, 55, 880-882.
- 28) 2000 Crystal Structure of the Allergen **Equ C 1**. A Dimeric Lipocalin With Restricted IgE-Reactive Epitopes Marie-Bernard Lascombe, Christophe Grégoire, Pascal Poncet, Gisele A. Tavares, Isabelle Rosinski-Chupin, Jacques Rabillon, Hany Goubran-Botros, Jean-Claude Mazié, Bernard David and Pedro M. Alzari **J. Biol. Chem.**, Vol. 275, Issue 28, 21572-21577, July 14,
- 29) 2001 Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens. Goubran Botros H., Poncet P., Rabillon J., Fontaine T., Laval J.M. & David B **Eur. J. Biochem.** 268, 3126-3136

### **D Mastocyte : cellule présentatrice d'antigène et biochimie des granules sécrétoires**

- 30) 1993 Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II restricted T cell Hybridoma. Frandji P., Oskeritzian C., Cacaraci F., Lapeyre J., Peronet R., David B., Guillet J.G., Mecheri S. **J. Immunol.** 151, 63-18-6328.
- 31) 1995 Cytokine-dependent regulation of MHC class II expression and antigen presentation of mast cells Frandji P., Tkaczvk C., Oskeritzian C., Lapeyre J., Peronet R, David B., Guillet J. G. And Mecheri S. **Cell. Immunol.** 163, 37.
- 32) 1996 Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells taCD4+ T lymphocytes Frandji P., Tkaczvk C., Oskeritzian C., David B., Desaymard C., Mecheri S. **Eur. J. Immunol.** 26, 2517-2528.
- 33) 1996 Mouse bone marrow-derived mast cells and mast cell lines constitutively produce B cell growth and differentiation activities. C Tkaczyk, P Frandji, H G Botros, P Poncet, J Lapeyre, R Peronet, B David, and S Mécheri **J. Immunol.** 157, 1720-1728.
- 34) 1997. Unravelling the mast cell dilemma: culprit or victim of its generosity? Mecheri S., David B **Immunol Today** 18, 212-215.
- 39) 1998 Specific antigen targeting to surface IgE and IgG on mouse bone marrow-derived mast cells enhances efficiency of antigen presentation Tkaczyk C., Viguier M., Boutin Y, Frandji P., David B., Hebert J., Mecheri S **Immunology**, 94, 318-324.121
- 40) 1999 MHC class II dependent activation of CD4+ T cells hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. Poncet P., Arock M., And David B. **Journal of Leukocyte Biology**, 66,105-112
- 41) 2001 Non specific B and T Cell-Stimulatory Activity Mediated by Mast Cells Is Associated with Exosomes Skokos D., Le Panse S., Villa I, Rousselle J.C., Peronet R., Namane A. **David B., & Mecheri S. International Archives of Allergy and Immunology**; 124:133-136
- 42) 2001 Mast Cell-Dependent B and T Lymphocyte Activation Is Mediated by the Secretion of Immunologically Active Exosomes. D Skokos, S Le Panse, I Villa, J C Rousselle, R Peronet, B David, A Namane and S Mécheri, **J Immunol.**166: 868-876.

43) 2003 mast Cell-derived Exosomes Induce Phenotypic and functional maturation of dendritic Cells and Elicit Specific immune responses in Vivo D. Skokos and coll **J Immunol** 170, 3037-3045

## Ouvrages

1989 Improved immunodection methods in allergy diagnosis David B., Peltre G., Dandeu J.P., Rabillon J., Desvaux X, . In Progress in Allergy and Clinical Immunology. Ed. Pichler. W.J., Stadler B.M., et col., Hogrefe and Huber Publishers

1992. New trends in immunotherapy David B. and Peltre G in Advances in allergol and clin immunol Ed. Godard P., Bousquet J., Michel F.B., The Parthenon Publishing group

1993. Etats d'hypersensibilité Bach J.F., David B in J.F. Bach (Ed). Immunologie., (Flammarion).

2003 Mieux comprendre les maladies allergiques Editeur scientifique : Bernard David. Ann.Inst.Pasteur – Actualités 18, 240 p (1vol)

2003 Allergènes: structures, fonctions in D.Vervloet et A.

2016 Bernard David. **Histoire de l'anaphylaxie et de l'allergie**. 39ème journée du GAICRM - groupement d'allergologie et d'immunologie clinique du Rhône Moyen, Apr 2016, Roehgude, France. 27 p. (Sur HAL-Pasteur : <http://www.gaicrm.org/gaicrm/defaultfr.html>)