



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

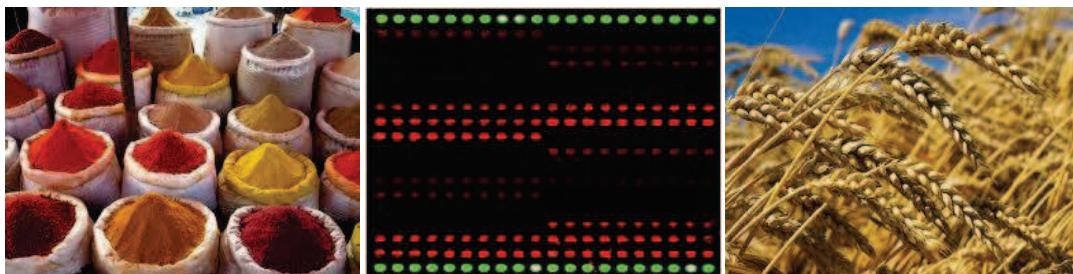
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

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

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

Master FAGE
Spécialité Biologie des Interactions Plantes-Environnement

Manon MORIN



Caractérisation immunologique de plusieurs protéines végétales impliquées dans l'allergie alimentaire en vue de la création d'un test de diagnostic sur biopuces

Dans le cadre du projet DIAGALA

Stage encadré par

Jean Philippe BORGES - PostDoc
PHARMA-DEV UMR 552 IRD/UPS
Equipe Pro-Onco-Pharma

Emmanuelle TREVISIOL-CR CNRS
LISBP-INSA UMR 5504/792
Equipe Biopuces - Bionanotechnologies

Tuteur universitaire

Yves JOLIVET - Professeur
UMR Ecologie Ecophysiologie Forestières
Université Henri Poincaré / INRA



Soutenu le 4 Septembre 2012 à Nancy

Remerciements

Je tiens à adresser mes premiers remerciements à mes deux encadrants : M. Jean-Philippe BORGES et Mme Emmanuelle TREVISIOL pour leur gentillesse, leur disponibilité, les connaissances qu'ils m'ont transmises, leur confiance tout au long de ce stage et l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de la rédaction de ce rapport. Ils ont fait en sorte que je me sente entièrement impliquée dans ce projet. Je les remercie également pour leurs conseils avisés quant à mon évolution dans le monde de la recherche.

Je remercie particulièrement Camille GIRONDE (Equipe POP) pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apportée pendant ce stage, notamment lorsque les western-blots ne fonctionnaient pas. Ma reconnaissance va également à Lidwine TROUILH (équipe Biopuces), qui a toujours été disponible lors des expériences sur puces.

Je remercie enfin les chefs des deux équipes qui m'ont accueillie : Mesdames Annick BARRE et Véronique Le Berre ainsi que tous les membres de ces équipes: Stéphanie, Etienne, Cécile, Fabien, Valérie, Clarisse, Léticia, Maëlle, Cédric, Véronique, Delphine, Nathalie, Flavien, Carine, Sophie, Adeline, Jessica et Mathieu pour tous les bons moments passés ensemble. Toutes ces personnes ont contribué à créer un environnement enrichissant et agréable durant ces derniers mois.

Je remercie également Ms. Daniel EPRON et Yves JOLIVET de m'avoir permis de m'engager dans ce stage.

Sommaire

Partie 1 : Présentation du projet DIAGALA	3
1. Contexte	3
2. Equipes d'accueil	3
3. Objectifs du stage.....	4
Partie 2 : Etat de l'art : allergie alimentaire, allergie aux protéines végétales et diagnostic	5
1. L'allergie alimentaire et allergie aux protéines végétales.....	5
1.1. Epidémiologie	5
1.2. Mécanisme de l'allergie alimentaire.....	6
1.3. Allergènes végétaux.....	7
2. Diagnostic actuel	7
2.1. Le Skin Prick Test (SPT) et le test de provocation orale, tests in vivo	7
2.2. Test in vitro de diagnostic allergologique	8
3. La biopuce à protéines : vers un diagnostic amélioré.....	8
3.1. Principe.....	9
3.2. Avantages des biopuces	9
3.3. La puce ISAC	10
3.4. Interrogations et perspectives d'amélioration des puces dans le diagnostic des allergies alimentaires.....	10
Partie 3 : Matériel et méthodes	11
1. Matériel.....	11
1.1. Matériel végétal	11
1.2. Séra de patients.....	11
2. Méthodes	12
2.1. Production d'extraits protéiques.....	12
2.1.1. Extraction	12
2.1.2. Dosage	12
2.1.3. Reconcentration	13
2.1.4. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	13
2.1.5. Dialyse	14
2.2. Western Blot.....	14
2.2.1. Transfert sur membrane de nitrocellulose	14

2.2.2. Saturation de la membrane	15
2.2.3. Incubation anticorps primaire	15
2.2.4. Incubation anticorps secondaire	15
2.2.5. Révélation.....	15
2.3. Biopuces	16
2.3.1. Préparation de quatre « lames arachide »	16
2.3.2. Tests immunologiques sur biopuce	16
Partie 4 : Résultats et Discussion.....	18
1. Préparation et sélection des extraits	18
1.1. Sélection d'un échantillon	18
1.2. Caractérisation des échantillons après dialyse	19
2. Caractérisation des séra « arachide » par Immunoblot.....	20
3. Optimisation des conditions expérimentales sur biopuce.....	22
3.1. Spotting des quatre lames arachide	22
3.2. Visualisation des interactions par le scanner Innoscan® 9000.....	23
3.3. Transformation des données visuelles en données numériques.....	23
3.3.1. Détermination de la dilution standard	24
3.3.2. Détermination de la durée d'incubation de l'anticorps primaire	25
Conclusion et Perspectives	27
Bibliographie.....	28
Annexes.....	29

Partie 1 : Présentation du projet DIAGALA

1. Contexte

Les allergies alimentaires entraînent, pour les personnes concernées, des contraintes importantes dans la vie quotidienne. Un diagnostic précis permettant de déterminer quelle(s) est(sont) la(les) molécule(s) responsable(s) de la réaction permettrait de définir le régime d'évitement et les traitements de désensibilisation à mettre en place pour diminuer ces contraintes. Actuellement, pour un patient allergique seuls les tests de dosage des IgE spécifiques peuvent indiquer dans les meilleurs cas, quels sont les aliments impliqués dans une allergie. Seules cinq recherches d'allergènes sont remboursées par la Sécurité Sociale et la recherche de la cause exacte de l'allergie peut être longue et coûteuse. Ce faible nombre de tests ne permet pas, dans tous les cas, de déterminer tous les allergènes impliqués et d'établir un diagnostic précis. De plus, les méthodes utilisées sont longues, nécessitent plusieurs consultations et peuvent présenter un danger pour la santé du patient. La mise au point d'un outil diagnostique qui apporterait des réponses à ces problèmes s'impose alors.

Pour répondre à ces demandes l'UMR 152 IRD/UPS (équipe Pro-Onco-Pharma), le LAAS (Laboratoire d'Analyse et D'architecture des Systèmes), l'équipe Biopuce du LISBP/INSA Toulouse (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés) et la société midi-pyrénéenne *INNOPSYS* se sont associées dans le projet DIAGALA (DIAGnostic de l'ALLergie Alimentaire) afin de développer un nouvel outil diagnostique sous forme de biopuce à protéines contenant un grand nombre d'allergènes alimentaires différents. Cette biopuce constituera un outil miniaturisé permettant de tester en un seul essai un grand nombre d'allergènes, d'établir le profil allergique du patient, et ce, à partir de quelques microlitres de sérum. Il s'agira d'un test simple à mettre en œuvre et économique en termes de temps de manipulation, de réactifs et de volumes de sérum de patient. Il sera alors accessible à un grand nombre de patients, dont les enfants et les nourrissons.

Dans ce projet, il est prévu de mettre au point 120 extraits protéiques d'aliments (aliments d'origine végétale : céréales, fruits, légumes, condiments et aliments d'origine animale : lait, œuf, poisson viande). Sommairement, l'équipe de l'UMR 152 met au point les extraits protéiques à greffer sur la puce et teste les séra de patients en western blot, l'équipe Biopuces (équipe EAD2) du LISBP met au point les puces pour le diagnostic, le LAAS étudie les technologies de biopuces nouvelles génération et *INNOPSYS*, partenaire industriel, produit les outils nécessaires à la technologie des biopuces notamment un nouveau scanner pour lire les biopuces à allergènes ainsi que les logiciels adéquats.

Ce projet est financé par la Région Midi-Pyrénées via l'appel d'offre EPICURE.

2. Equipes d'accueil

Le stage se partage entre deux équipes (3 mois dans chaque équipe) : l'équipe Pro-Onco-Pharma de l'UMR 152 et l'équipe Biopuces (EAD 2) du LISBP.

L'UMR 152 (Pharmacologie et Pharmacochimie pour le Développement) est une Unité Mixte de Recherche (UMR) Université Paul Sabatier et IRD (Institut de Recherche pour le Développement). Cette unité se positionne essentiellement sur des thèmes de recherches transversaux chimie-biologie comme les phénomènes de stress oxydant, les phénomènes inflammatoires et le cancer. L'équipe Pro-Onco-Pharma axe ses recherches sur différentes thématiques comme « Lectines et Cancer » et « Allergènes et Inflammation ». Dans le cadre du projet DIAGALA, l'équipe met à profit ses compétences pour la production des extraits

protéiques et pour leurs tests en western-bLOTS avec des séras de patients allergiques. Des travaux de purification des allergènes d'origine végétale sont notamment menés dans cette équipe.

Le LISBP est un laboratoire de recherche (INSA, UMR792 INRA, UMR5504 CNRS) qui se positionne à l'interface entre sciences du vivant et sciences des procédés. Ses travaux ont des applications dans les secteurs de la santé, des biotechnologies, de l'eau et de l'environnement, de l'agro-alimentaire et des agro-industries, des éco-industries ainsi que de la chimie. Au sein de ce laboratoire se trouvent différentes plateformes technologiques et équipes. La plateforme Biopuces se partage en une activité de Service à destination des laboratoires publics et privés et une équipe « Biopuces – Bionanotechnologies » permettant une activité de Recherche et Développement. La plateforme Biopuce possède tout l'équipement nécessaire pour produire des biopuces, réaliser les expériences et analyser les données. L'équipe et la plateforme Biopuces sont certifiées ISO 9001.

3. Objectifs du stage

Les travaux réalisés durant le stage de fin d'étude et présentés dans ce rapport s'inscrivent directement dans le projet DIAGALA. Ils se divisent en deux parties : production d'extraits végétaux et optimisation des tests sur biopuces à protéines. Seuls des aliments d'origine végétale ont été utilisés durant ces six mois : céréales, arachide et fruits à coques, épices et légumineuses.

Les premiers mois ont été employés à la production de tous les extraits de céréales (7 extraits au total), de légumineuses (4 extraits), d'épices (3 extraits) et de fruits à coque (3 extraits). Les conditions d'extraction (tampons, durée, température) ont été déterminées de façon à obtenir les extraits les plus proches de ceux trouvés dans la littérature (quantité de protéines, abondance des allergènes connus).

La deuxième partie du stage a été consacrée à la mise au point des expérimentations sur puce. Dans un premier temps, des séras de patients allergiques à l'arachide ont été sélectionnés et caractérisés par western-blot. Ensuite, une biopuce à protéines a été créée à partir d'extraits totaux de protéines d'arachide et d'allergènes purifiés (Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3). Cette biopuce a été spécialement conçue pour les tests d'optimisation à partir des séras caractérisés afin de définir et d'optimiser les étapes essentielles du protocole comme le temps d'incubation pour le sérum du patient, la dilution du sérum et le « design » de la puce (concentration des spots, nombre de spot par éléments spottés).

Lors de la rédaction de ce rapport, il reste encore un mois de stage à effectuer dans l'équipe Biopuces. Les résultats présentés ci-après s'arrêtent donc à la définition du temps d'incubation de l'anticorps primaire (résultats inclus).

Partie 2 : Etat de l'art : allergie alimentaire, allergie aux protéines végétales et diagnostic

1. L'allergie alimentaire et allergie aux protéines végétales

1.1. Epidémiologie

Actuellement 30% de la population mondiale fait l'objet d'une maladie allergique (allergies aux pollens, aux acariens ou allergies alimentaires), c'est pourquoi l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a classé les maladies allergiques au 4ème rang des préoccupations sanitaires mondiales. Plusieurs études épidémiologiques sont menées de façon à déterminer et à suivre la prévalence des différentes allergies (pourcentage de la population allergique pour une population donnée).

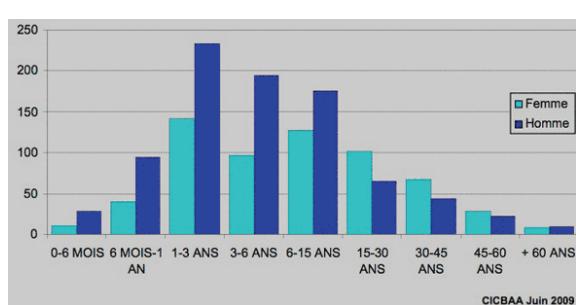


Figure 1 : Prévalence de l'allergie alimentaire en France en fonction du sexe et de la catégorie d'âge.

4% de la population mondiale présente des allergies alimentaires. Cependant, la prévalence de l'allergie alimentaire n'est pas la même selon l'âge de la population étudiée. En effet, des études récentes montrent que 6 à 8% des enfants présentent une allergie alimentaire (Peters, Gurrin, et Allen, 2011) contre 4% des adultes (Ben-Shoshan et al., 2010). Le Centre d'Investigation Clinique et Biologique en Allergies Alimentaires (CICBAA) recense l'incidence de l'allergie alimentaire en fonction de l'âge et du sexe sur 1487 cas en France (**Figure 1**).

Environ 200 aliments ont été répertoriés comme responsables d'allergies alimentaires par la Food and Agricultural Organisation (FAO). A l'échelle mondiale, les principaux aliments responsables sont : le lait de vache, les œufs, le poisson, les crustacés, l'arachide, le soja, les noix/fruits à coque et le blé (Taylor, 1999 ; Verma et al., 2012). Ces aliments sont communément regroupés sous le terme de « the big eight » et représentent jusqu'à 90% des allergies aux Etats-Unis.

Les allergies alimentaires aux végétaux représentent plus de 50% des cas allergiques, et jusqu'à 84% des cas chez l'adulte (Moneret-Vautrin et al., 1997). Les allergènes alimentaires végétaux les plus fréquents sont, bien entendu l'arachide, les noix et fruits à coque, les rosacées (fruits), les ombellifères (carotte, céleri, coriandre...) et le groupe latex (banane, kiwi, avocat, châtaigne) (**Figure 2**).

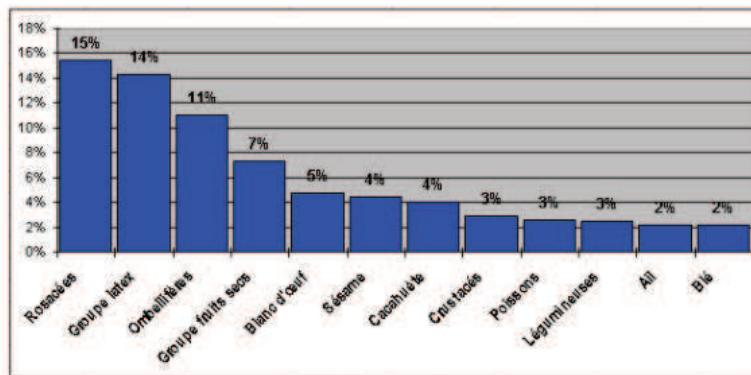


Figure 2 : Prévalence des allergies alimentaires aux végétaux chez une population de 272 adultes souffrant d'allergie alimentaire (Moneret-Vautrin et al., 1997)

1.2. Mécanisme de l'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire correspond à une réaction immunitaire excessive de l'organisme face à un aliment ou une substance normalement sans danger, qui peut alors entraîner des lésions cellulaires plus ou moins graves (Bhalla et Singh, 2008). Cette réaction est également appelée hypersensibilité (HS). La réaction HS impliquée dans les allergies alimentaires (réaction HS de type I) est immédiate dans le temps et médiée par des Immunoglobulines E (IgE) (Valenta et Kraft, 2002).

Cette réaction fait appel à des mécanismes complexes et certaines étapes restent encore incomprises. On sait toutefois que cette réaction se déroule en deux phases (**Figure 3**) : la phase de sensibilisation (asymptomatique) et la phase de manifestation (symptomatique).

La phase de sensibilisation correspond au premier contact avec la protéine allergène au niveau de la peau ou des muqueuses. L'allergène est alors pris en charge par des cellules de Langerhans ou d'autres cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques. Ces premières cellules clivent les protéines allergènes en plusieurs petits peptides. Ces derniers entrent ensuite en contact avec des cellules non différenciées du système immunitaire les Th0 (T-helper 0). Chez un patient non allergique, ces Th0 se différencient en Th1 qui génèrent une réaction immunitaire classique via des immunoglobulines G (IgG). Chez un patient allergique les Th0 se différencient en Th2 qui provoquent, par le biais de la production de cytokines, la différenciation et la prolifération de lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE. Les IgE ainsi produits se fixent à la surface des basophiles (cellules de la lignée blanche) et des mastocytes (granulocytes des tissus conjonctifs) qui présentent à leur surface des récepteurs à haute affinité pour le fragment constant (Fc) de la chaîne lourde des IgE.

Ce n'est que lors d'un contact ultérieur (phase de manifestation/déclenchement) que l'allergène est reconnu par les IgE présentes par les mastocytes et les basophiles qui libèrent alors leur contenu : prostaglandines, histamines et protéases. Ce sont ces différents médiateurs qui sont à l'origine des symptômes allergiques (Borges, 2008). La partie de l'allergène reconnue par les IgE est appelée épitope.

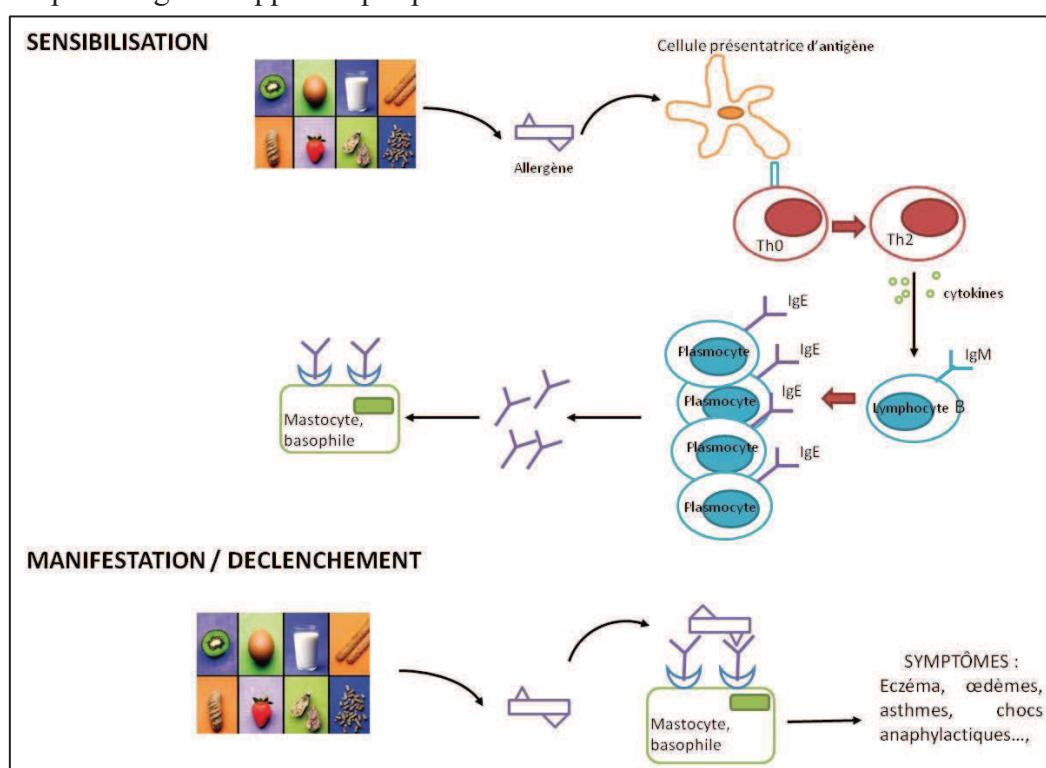


Figure 3 : Schéma de la réaction d'hypersensibilité en deux étapes, sensibilisation et manifestation. D'après Borges, 2008 et Bhalla et Singh, 2008.

1.3. Allergènes végétaux

Les principales protéines végétales impliquées dans les allergies alimentaires aux végétaux appartiennent à différentes catégories et peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante.

De nombreux allergènes végétaux sont des protéines de stockage (albumines 2S, vicilines et légumines) contenues essentiellement dans les graines. Ils sont largement incriminés dans les allergies à l'arachide, aux fruits à coques, au soja, aux graines et aux céréales (Hed, 2009). De nombreuses protéines impliquées dans les mécanismes de défense sont également des allergènes reconnus. En effet, les LTP (Lipid Transfert Protein) jouent un rôle dans les mécanismes de défense de la plante face à certains agents pathogènes (bactéries et champignons, voire virus) (García-Olmedo et al., 1995). Ce sont les principales protéines incriminées dans les allergies aux Rosacées (pêche, abricot, pomme) ou dans certaines allergies aux céréales, notamment le riz et le maïs (Pastorello et al., 2002). De même de nombreuses protéines de la famille des protéines PR (Pathogenesis Related) sont des allergènes et sont notamment impliquées dans les allergies aux ombellifères (carotte, céleri, coriandre) ou aux Rosacées (Hed, 2009).

2. Diagnostic actuel

2.1. Le Skin Prick Test (SPT) et le test de provocation orale, tests *in vivo*

Les prick-tests sont des piqûres épidermiques réalisés à partir de différents extraits (extraits crus, extraits totaux d'aliments ou d'allergènes purifiés). L'allergologue dépose des gouttes d'extraits le long du bras du patient et pique ensuite chaque goutte à l'aide d'une aiguille permettant ainsi l'entrée sous-cutanée des extraits. Après une vingtaine de minutes, en cas d'allergie, certaines piqûres présentent une inflammation (**Figure 4**). Un test témoin négatif au sérum salin et un test témoin positif à la codéine ou à l'histamine (réaction obligatoire) sont effectués en parallèle. Le test allergique est positif si l'œdème équivaut au moins à celui du test témoin.



Figure 4 : Skin Prick test d'un patient révélant un cas d'allergie au curry (Pérez Bustamante et al., 2011)

Ce test correspond au test de base mené par tous les allergologues et a comme grand avantage de pouvoir tester en une seule séance des extraits de différentes origines. Cependant, ce seul diagnostic est limité et doit être approfondi *via* d'autres tests. En effet, pour des extraits totaux, la quantité totale d'allergènes n'est pas connue et la qualité des extraits n'est pas toujours égale. De plus, seule la source de l'allergène est connue et non la molécule élicitrice. De plus, de telles pratiques peuvent engendrer une sensibilisation à d'autres allergènes (Bhalla et Singh, 2008).

Le test de provocation orale consiste à faire ingérer successivement au patient des doses croissantes d'un aliment dans le but de reproduire les symptômes cliniques (Rancé et Deschildre, 2006). Il est le seul test diagnostique à témoigner d'une réelle allergie et permet alors de connaître la quantité d'aliment minimum déclenchant la réaction allergique et la nature de la réaction. Malgré son efficacité, ce test reste dangereux et doit être mené dans un milieu hospitalier encadré. L'introduction de l'aliment peut engendrer des chocs anaphylactiques et ne peut pas être appliquée aux personnes ayant révélé leur allergie par un choc anaphylactique.

2.2. Test *in vitro* de diagnostic allergologique

Les tests *in vitro* recherchent les IgE présentes dans un échantillon sanguin et spécifiquement impliquées dans la réaction allergique. Ils permettent, à la suite d'un prick-test, de déterminer la/les molécule(s) élicitrice(s) de la réaction. Une fois les allergènes identifiés, un traitement adéquat peut alors être mis en place.

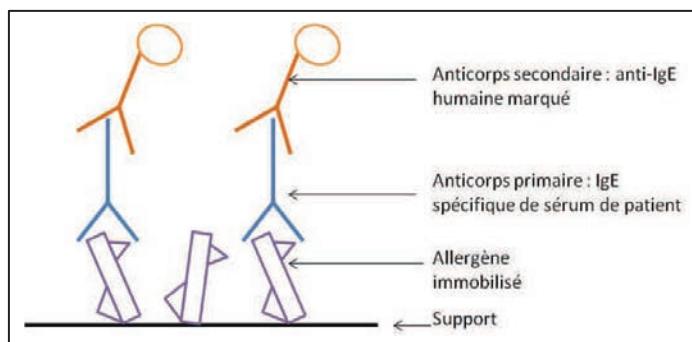


Figure 5 : Principe des tests *in vitro* du diagnostic allergologique

Les tests de dosage des IgE spécifiques sont typiquement des tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ou des tests RAST (Radio Allergo Sorbent Test). Ils reposent sur l'interaction entre les IgE spécifiques contenues dans le sérum du patient et des allergènes immobilisés sur un support. Cette interaction peut alors être révélée à l'aide d'anticorps spécifiques anti-IgE

humaines marqués et détectés de différentes façons (mesure de radioactivité, fluorescence, colorimétrie) (Hamilton et Williams, 2010) (Figure 5). Grâce au marquage de l'anticorps secondaire, il peut être possible de « doser » la quantité d'IgE spécifiques dans le sang. Toutefois, il ne s'agit pas d'un dosage à proprement parler compte tenu de l'absence d'étalement. Les résultats obtenus ne représentent donc pas une donnée quantitative mais seulement une donnée numérique. Ces données sont exprimées en unités IgE par volume de sérum (unité arbitraire), non transposables d'un produit allergisant à un autre ou d'un fabricant de réactif à un autre, ce qui rend d'autant plus difficile l'interprétation des résultats lors du suivi d'un patient (Corbillon, Rame, et Obrecht, 2005).

De plus, il n'existe aucune corrélation entre le degré de réactivité *in vitro* et la probabilité réelle d'une allergie ou la gravité des symptômes observés. Ceci rend impossible la définition d'un seuil au dessus duquel le test est définitivement positif. Il ressort cependant que plus la quantité d'IgE est importante plus la probabilité de développer une réaction allergique est grande (Sampson, 2004). C'est pour cela qu'un seuil de détection pour les tests de dosage des IgE spécifiques, défini comme la concentration minimale au dessus de laquelle le test est positif, a été défini à 0.35kU/L (Ownby, 2005). Ce seuil a été défini au vu des tests obtenus par différents laboratoires de différents pays.

Tous ces tests utilisés depuis plusieurs décennies permettent un diagnostic assez efficace des allergies des patients. Cependant, ils restent coûteux en temps, en argent et nécessitent de grandes quantités de sérum ce qui peut poser problème lors du diagnostic chez des nouveaux nés par exemple. De plus, un diagnostic précis permet la mise en place par la suite d'un traitement individualisé ciblé et souvent moins lourd. Les diagnostics actuels n'apportent pas entière satisfaction à ce sujet. Ils peuvent être améliorés grâce à l'utilisation d'outils moléculaires développés en génomique et en protéomique : les biopuces.

3. La biopuce à protéines : vers un diagnostic amélioré

Une biopuce correspond au dépôt en très petites quantités et selon un schéma très précis de biomolécules sur une surface solide (Bacarese-Hamilton et al., 2005). Un tel outil permet d'analyser en parallèle des milliers de biomolécules sur une petite surface (quelques mm² à quelques cm²). Dans le domaine des allergies alimentaires, les biopuces permettent de pallier les limites des outils de diagnostic déjà existants tout en gardant leurs avantages, de

façon à créer un outil de diagnostic miniaturisé et hautement performant. A partir d'un seul test, il est possible d'établir une « carte » des allergènes auxquels le patient réagit et de déterminer spécifiquement son traitement.

3.1. Principe

Les biopuces à protéines constituent un test allergologique miniaturisé d'identification des IgE spécifiques d'un sérum. Elles reposent sur le même principe que les tests *in vitro* de diagnostic allergologique (**Figure 6**). Des allergènes (protéines recombinantes ou purifiées) ou des extraits protéiques totaux sont greffés sur une lame de verre dans des volumes de l'ordre du nanolitre (Jahn-Schmid et al., 2003). Les manipulations se déroulent en trois étapes (Bacarese-Hamilton et al., 2005):

- *Le « spotting » ou greffage des sondes* : correspond à l'étape de fixation des protéines (sondes) sur une lame de verre de microscope fonctionnalisée chimiquement de façon à permettre l'immobilisation des protéines (Kusnezow et Hoheisel, 2003). Jusqu'à 22000 spots peuvent être greffés en fonction de la taille de la puce, permettant ainsi de tester pour un même sérum dans un seul essai, une large gamme d'allergènes. Cependant, le « design » de la puce (nombre de spots, taille de la puce) varie en fonction des utilisations souhaitées.

- *L'interaction avec les molécules cibles* : correspond au dépôt du sérum du patient sur la puce et à la fixation des IgE spécifiques (cibles) aux allergènes correspondants.

- *La révélation et la lecture* : consistent à révéler les protéines de la puce sur lesquelles se sont fixées les IgE spécifiques du patient. La révélation se fait en utilisant des anticorps secondaires anti-IgE humaines fluorescents. L'intensité de la fluorescence dépend de la concentration des anticorps secondaires fixés et donc de la concentration des IgE spécifiques dans un sérum. Cependant, la conformation et le positionnement des anticorps sur la puce influent également sur le signal, ce qui biaise toute interprétation quantitative.

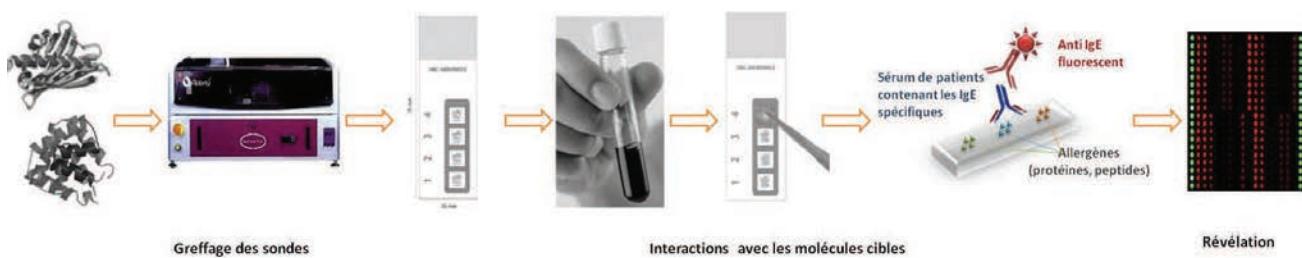


Figure 6 : Principe de la biopuce. D'après (Harwanegg, Hutter, et Hiller, 2007)

3.2. Avantages des biopuces

La première qualité d'un tel test est d'établir le profil allergique de chaque patient de façon à mettre au point un traitement individualisé le plus efficace possible. En effet, ce test permet de définir l'origine de l'allergie et d'orienter le plus spécifiquement possible le régime d'évitement et le traitement par désensibilisation. De plus, tout ceci est possible en un seul test (Jahn-Schmid et al., 2003) ce qui constitue à la fois un gain de temps et un bénéfice pour le patient.

C'est également une technologie très économique en termes de quantité de sérum de patient utilisé puisqu'elle correspond à quelques microlitres. Elle est donc beaucoup plus confortable à mettre en place pour le patient, surtout s'il s'agit d'un nourrisson.

3.3. La puce ISAC

ImmunoCAP ISAC, également appelé puce ISAC, est un test diagnostique *in vitro* commercialisé par Phadia. Cet outil repose sur la technologie des biopuces et permet de tester simultanément 112 allergènes issus de 51 sources différentes. Les allergènes testés sont tous des protéines recombinantes d'allergènes alimentaires, d'aéroallergènes (pollens), de venins et de latex (Brochure Technique ImmunoCAP-ISAC, PHADIA, Suède).

Quelques microlitres de sérum de patient sont déposés sur la biopuce. Après révélation par un scanner à fluorescence, le logiciel propriétaire Phadia Microarray Image Analysis permet d'obtenir un rapport détaillé en moins de 10 minutes. (**Figure 7**)

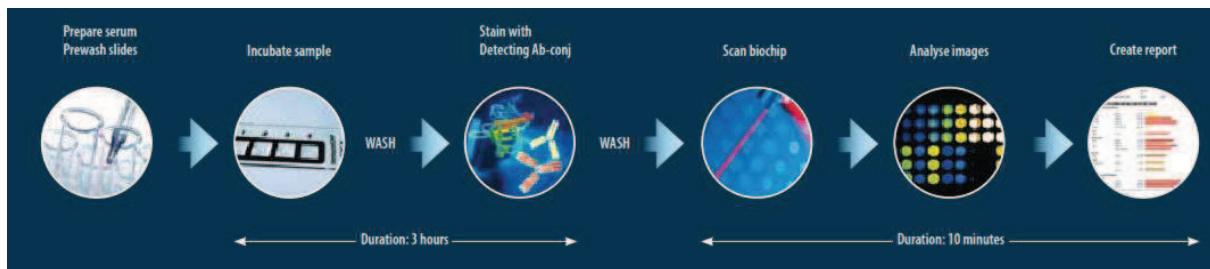


Figure 7 : Principe du test avec la puce ISAC, PHADIA. Source : *ImmunoCAP-ISAC Technical Brochure*

Cette puce, bien qu'utilisée comme test de routine dans de nombreux laboratoires, présente de nombreuses lacunes. Premièrement, le nombre d'allergènes testés reste très limité. En effet, les allergènes recombinants sont uniquement des allergènes majeurs, ce qui limite largement la gamme de molécules testées. Deuxièmement, certains tests sur puce ne révèlent pas d'allergie pour un allergène alors que le test cutané est positif. Autrement dit, soit la sensibilité de la puce est trop faible pour doser les IgE responsables de l'allergie, soit la molécule élicitrice n'est pas présente sur la puce. Enfin, ce test représente un coût conséquent et seul un nombre limité de tests remboursés par la Sécurité Sociale peuvent être prescrits.

3.4. Interrogations et perspectives d'amélioration des puces dans le diagnostic des allergies alimentaires

Toutes ces technologies sont mises en place de nos jours à l'échelle d'un laboratoire. La question fondamentale de la faisabilité à grande échelle reste encore sans réponse (Salcedo et Diaz-Perales, 2010). En effet, ceci nécessiterait une grande quantité de matériel pour produire les allergènes. De plus, de part l'hétérogénéité des protéines, chacune doit être testée et approuvée et surtout ne subir aucune altération lors du greffage sur la puce (Jahn-Schmid et al., 2003). Le problème d'absence de corrélation entre l'allergie et la quantité des IgE présentes dans le sang reste encore à résoudre. Il est nécessaire de définir, allergène par allergène, la valeur de fluorescence minimale correspondant à un diagnostic positif (le patient a plus de 95% de chances d'être allergique à cet allergène). A l'heure actuelle, aucun seuil de cette nature n'a été établi pour cette nouvelle biopuce, cela nécessitant des cohortes de patients très importantes pour une analyse statistique valide.

Partie 3 : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Au total 17 extraits ont été préparés à partir de différents aliments (céréales, noix, légumineuses et épices). Certains aliments, lors de la réception, étaient déjà sous forme de farine. Les autres aliments ont été réduits sous cette forme afin de pouvoir procéder aux extractions. Le type d'aliment, son origine et les traitements mis en œuvre pour la réduction sous forme de farine sont résumés dans le tableau 1

Aliment	Provenance	Forme de réception	Traitements
Céréales			
Blé	L'Ethique verte	Son	Broyage par robot ménager
Mais	L'Ethique verte	Farine	x
Seigle	L'Ethique verte	Graines	Broyage par robot ménager
Epeautre	Priméal AB	Graines	Broyage par robot ménager
Avoine	Markel AB	Son	Broyage par robot ménager
Riz	L'Ethique verte	Farine	x
Noix			
Noix	Données	Fruit sec	Broyage par robot ménager
Noix de coco	L'Ethique verte	Rapée	Broyage par robot ménager
Chataigne	L'Ethique verte	Farine	x
Légumineuse			
Féverole	Inconnue	Légume sec	Broyage par robot ménager
Haricot coco	Donnés	Légume frais	Broyage dans l'azote liquide
Haricot mungo	L'Ethique verte	Légume sec	Broyage par robot ménager
Pois	Les doigts verts	Légume sec	Broyage par robot ménager
Épices			
Gingembre	Masalchi/Les épices	Poudre	x
Anis vert	Masalchi/Les épices	Poudre	x
Fenugrec	Masalchi/Les épices	Poudre	x

Tableau 1 : Provenance et traitements des aliments à l'origine des extraits

Le robot ménager utilisé était le modèle KRUPS F203 de marque Grinder.

« L'Ethique verte » est un magasin de produits biologiques situé à Ramonville (31520)

1.2. Séra de patients

L'équipe de recherche dispose d'une banque de séra de patients allergiques. Ces séra ont été obtenus *via* des allergologues appartenant au réseau des allergologues francophones. Dès leur réception, les différents séra sont aliquotés et stockés à -80°C.

Pour les tests menés lors de ce stage, 7 séra ont été sélectionnés : 6 allergiques à l'arachide et un non allergique (témoin négatif).

A partir des données transmises par les allergologues, les séra ont été classés en différentes catégories : les séra dits « fortement dosés », « faiblement dosés », « dosage inconnu » et « non allergique » (Tableau 2).

Classe du sérum	Caractérisation	Sérums
Fortement dosés	Dosages IgE spécifique > 80kU/L	Nina, Suheyla
Faiblement dosés	Dosages IgE spécifiques < 80 kU/L	Clara, Guy
Dosage inconnu	Absence de données de dosage mais prick tests positifs	Dumax, Monben
Non allergique	Aucun prick test ou western blot positif	ADG

Tableau 2: Classification des séra

2. Méthodes

2.1. Production d'extraits protéiques

2.1.1. Extraction

Les extractions sont réalisées à partir des farines des différents aliments, dans des piluliers contenant 3 mL de tampon d'extraction. Pour chaque aliment deux tampons d'extraction sont testés : un tampon PBS-EDTA (Phosphate Buffer Saline : chlorure de sodium 140 mM, chlorure de potassium 2.7 mM, Sodium hydrogénophosphate 10 mM, monopotassium phosphate 1.8 mM ; pH 7.4 ; EDTA 2 mM) et un tampon borate-EDTA (acide borique 100 mM, tétraborate de sodium 25 mM, chlorure de sodium 75 mM, pH 8.45 ; EDTA 2 mM). Dans ces tampons, l'EDTA agit comme agent anti-protéase diminuant les chances de dégradation des protéines. Pour le gingembre, un cocktail d'agents anti-protéase (Roche Complete, Protease Inhibitor Cocktail tablets) a été ajouté (240 µL pour 3 mL) ainsi que du poly vinyl poly pyrrolidone (PVPP) (0.06 g pour 3mL soit 2%) pour piéger les différents tanins et polyphénols présents en grande quantité dans le gingembre.

Pour chaque aliment, différentes extractions sont réalisées en termes de rapport poids de farine/volume de tampon. Pour les épices, les extractions réalisées sont 5%, 10% et 20%. Pour les céréales et les fruits à coque les extractions se déroulent à 10%, 20%, 30%, à l'exception du maïs, du riz et de la châtaigne pour lesquels les extractions sont 20%, 30% et 40%. Pour les légumineuses et la noix de coco, les extractions effectuées sont 20% et 30%. Ces différentes extractions ont été définies en fonction des données trouvées dans la littérature et au vu des résultats précédemment obtenus au laboratoire pour des aliments semblables.

Les extractions se déroulent, pendant deux heures, sous agitation à l'aide de barreaux magnétiques et à température ambiante. Au bout des deux heures, chaque extrait est centrifugé pendant 20 minutes, à 4°C, à 16 000g rcf. Le surnageant est alors récupéré et stocké à -20°C.

2.1.2. Dosage

Les extraits sont dosés par la technique du dosage BCA (dosage à l'acide bicinchonique). Ce dosage colorimétrique est basé sur la réduction par les protéines en milieu alcalin des ions Cu²⁺ en ion Cu⁺ qui réagissent alors avec l'acide bicinchonique pour former un complexe stable de couleur violette. Le dosage est effectué à partir d'un kit « Pierce BCA Protein Assay Kit » (Thermo Sientific) et d'une gamme diluée d'Albumine Sérique de Bœuf (BSA) (800, 400, 200, 100, 50, 25, 0 µg/mL), préparée par dilution en série à partir d'une solution mère de BSA à 1.6mg/mL dans l'eau milliQ.

Sur une microplaqué de 96 puits, les extraits sont dosés en dupliques aux dilutions suivantes : 1 :15^{ème}, 1 :30^{ème}, 1 :60^{ème} et 1 :120^{ème}. 25 µL sont déposés, puis 200 µL du mélange des réactifs A et B du kit sont ajoutés dans chaque puits (rapport volume A à volume B 50 :1).

Après 30 minutes d'incubation, la plaque est lue à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (lecteur de microplaques, Titertek, Multiskan)

2.1.3. Reconcentration

Pour des raisons de stabilité des extraits, leur concentration doit être supérieure à 2.5 mg/mL. Si ce n'est pas le cas, ils sont reconcentrés à l'aide de CENTRICON® (Merck/Millipore). Ce système de deux tubes emboités et séparés par une membrane permet par un couplage de filtration et de centrifugation de reconcentrer les protéines d'un extrait (**Figure 8**). La membrane laisse passer les molécules de moins de 10 kDa. Ainsi, en déposant l'extrait dans le tube supérieur, les petites molécules se retrouvent dans le tube inférieur. Le volume de l'extrait de départ (qui contient essentiellement des protéines de taille supérieure à 10 kDa) diminue alors que sa concentration augmente.

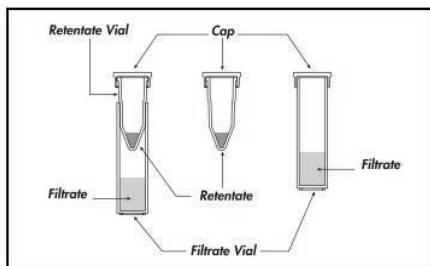


Figure 8 : Principe du Centricon® millipore.
Source CENTRICON® Centrifugal filter device : User Guide

concentration souhaitée.

Dans un premier temps, la membrane de séparation est lavée deux fois à l'eau distillée pour éliminer tout le glycérol ayant permis sa conservation lors du temps de stockage (15 minutes, 12°C, 4000 rpm) puis, après un lavage avec le tampon d'extraction, l'extrait est centrifugé à 12 °C et à 4000 rpm. Le temps de centrifugation, est ajusté afin de ne récupérer (dans le tube supérieur) que le volume correspondant à la

2.1.4. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Les protéines contenues dans les extraits sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de 1.5 mm d'épaisseur.

Composition du gel : dans un premier temps un gel de séparation 12.5% est préparé suivi d'un gel de concentration 4.8%. Les compositions sont détaillées dans le tableau 3 ci-dessous.

	Gel de séparation 12,5%	Gel de concentration 4,8%
Acrylamide	2,43 mL	466 µL
Bis-acrylamide	1,33 mL	257 µL
Tris A	2 mL	-
Tris B		400 µL
SDS 10%	80 µL	40 µL
Eau milliQ	2,11 mL	2,81 mL
APS 10%	40 µL	20 µL
TEMED 10%	8 µL	8 µL

Tris A (Tris-HCl 1.5M, pH8.8 (4x)) ; Tris B (Tris-HCl 1.25 M, pH 6.8 (10x)) ; APS (Persulfate d'Ammonium) ; TEMED (NNN'N' Tétraméthyléthylène diamine)

Tableau 3 : Composition d'un gel poly-acrylamide 1.5mm d'épaisseur.

Migration : Chaque échantillon à déposer représente l'équivalent de 80 µg de protéines ; son volume est complété et à 20 µL avec du tampon d'extraction. Avant de chauffer au bain sec cinq minutes à 90°C, 5 µL de tampon de charge TSTD sont ajoutés (SDS 2%, Tris 62mM,

Glycérol 10%, β -mercaptoéthanol 5%). Chaque échantillon est chargé dans un puits. Un puits contenant 5 μ L de marqueur moléculaire précoloré (Thermo Scientific, Page Ruler 26619) permet de suivre la migration.

La migration se déroule en trois étapes (générateur Power-Pac, BioRad) dans un tampon de migration Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.005% : 10 minutes à 50 V, 20 minutes à 100 V et la fin de la migration (jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel) à 150V.

Coloration et décoloration des gels : à la fin de la migration, les gels sont colorés sous agitation pendant 30 à 45 minutes dans une solution contenant 1 g/L de bleu de Coomassie dans une solution d'acide acétique 200mM, puis ils sont décolorés pendant une nuit dans de l'eau distillée.

2.1.5. Dialyse

Dans le but de purifier les extraits produits, ceux-ci sont dialysés contre leur tampon d'extraction. Cette technique est fondée sur le principe de diffusion entre une solution A (l'extrait à dialyser) et une solution B (le tampon d'extraction) séparés par une membrane laissant passer le solvant et les solutés de taille inférieure au seuil de coupure de la membrane. L'extrait est dialysé contre un grand volume de tampon afin d'atteindre un équilibre entre les deux solutions. La diffusion s'arrête alors.

Chaque extract est placé dans un boudin de dialyse préalablement réhydraté, de forme cylindrique et de seuil de coupure 3,4kDa. La membrane est fermée à chaque extrémité à l'aide de clips adaptés avant d'être plongée dans 3L de tampon agités par un barreau aimanté. La dialyse se déroule à 4°C sur 36h, le tampon est remplacé toutes les 12h.

Après la dialyse, les échantillons sont récupérés, re-dosés par BCA et déposés à nouveau sur gel de polyacrylamide.

2.2. Western Blot

Le western blot est un test d'immuno-détection permettant la révélation de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps primaires et d'anticorps secondaires. Les protéines recherchées ici sont les protéines allergènes contenues dans l'ensemble protéique des extraits préparés. Dans un premier temps, les protéines des extraits sont séparées par SDS-PAGE puis transférées et fixées sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps primaires utilisés correspondent aux IgE contenues dans les séra de patients. L'anticorps secondaire permettant la révélation est un anticorps anti-IgE humaines couplé à une enzyme catalysant une réaction de chimioluminescence. Ainsi, tester un sérum de patient par western blot permet de déterminer pour quelle(s) protéine(s) le patient possède des IgE spécifiques.

2.2.1. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après la migration d'un gel SDS-PAGE de 1mm d'épaisseur où 20 μ g de protéines ont été déposés (protéines totales d'arachide , Ara h 1, Ara h 2 et Ara h3 purifiées), les protéines présentes sur le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (6x9cm). Le transfert est effectué en mode semi sec (TransBlot Turbo, BioRad) selon le programme Standard SD (1 mini-gel par cassette ; 25V ; 1.0A ; 30 minutes). Pour le transfert, les éléments suivants sont déposés dans l'ordre dans une cassette : un papier buvard, la membrane, le gel et un deuxième papier buvard. Chaque élément a préalablement été imbibé dans du tampon de transfert Tris 48 mM, Glycine 39 mM, Méthanol 20%.

Le transfert terminé, la membrane est colorée à l'aide d'une solution de Rouge Ponceau (Rouge Ponceau 0.1% w/v dans de l'acide acétique 5% Sigma #P7170) pendant 5 minutes sous agitation. Elle est ensuite décolorée dans de l'eau milliQ.

2.2.2. Saturation de la membrane

Afin de bloquer tous les sites non occupés par les protéines et de laisser ces dernières disponibles pour les IgE humaines, la membrane est saturée sous agitation pendant 1h à température ambiante. Le tampon de saturation utilisé est un tampon PBS 1X, Tween 20 0.1%, lait en poudre 5%.

2.2.3. Incubation anticorps primaire

Les anticorps primaires utilisés correspondent aux IgE humaines contenues dans les séra de patient. Ces séra sont testés individuellement, dilués au 1:10^{ème} (100 µL de sérum, pour un volume final de 1mL) dans le tampon de saturation. Les séra sont présentés en annexe 1.

1 mL de préparation d'anticorps primaires est déposé sur la membrane pour une incubation en chambre humide pendant deux heures.

A la fin de l'incubation, le liquide contenant les anticorps primaires est récupéré et stocké à -20°C. La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans le tampon de saturation.

2.2.4. Incubation anticorps secondaire

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de chèvre anti-IgE humaines couplé à l'enzyme HRP (peroxydase de Raifort) dilué au 1:3000^{ème} dans le tampon de saturation (3.33 µL d'anticorps secondaire dans un volume final de 10 mL). La membrane est plongée dans 10 mL de préparation d'anticorps secondaire pour une incubation sous agitation à température ambiante pendant 1h.

A la fin de l'incubation, la membrane est lavée 3 fois 10 minutes dans une solution contenant un mélange PBS-Tween 20 0.1%.

2.2.5. Révélation

L'enzyme couplée à l'anticorps secondaire étant la HRP, la révélation se fait par chimioluminescence. Elle est réalisée à l'aide du kit « Super Signal® West Dura Extended duration substrate » (Thermo Scientific). Elle est basée sur la réaction de transformation du luminol en luminal en présence de peroxyde d'hydrogène (réaction catalysée par la HRP). Le luminal émet de la chimioluminescence détectable dans le noir grâce à une caméra ou un film photographique. Le kit Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (Millipore), moins sensible mais basé sur la même réaction de révélation, a également été utilisé pour des séra dont les signaux saturent très rapidement.

750 µL d'un mélange volume à volume de deux réactifs du kit sont déposés sur la membrane (Réactif A : Peroxide buffer West Durable ; Réactif B : SSW luminol Enhancer solution). La membrane est égouttée et placée dans le noir dans l'imageur ChemiDoc™ MP (BiRad). A partir du logiciel Image Lab™, version 4.0, édité par BioRad, programme Chemisample/Immunoblot, une série d'images est effectuée toutes les 2 secondes d'exposition pendant 20secondes.

2.3. Biopuces

2.3.1. Préparation de quatre « lames arachide »

Description d'une puce : Sur une lame de microscope 12 puces identiques sont fabriquées. Chaque puce est constituée de l'extrait total d'arachide, des allergènes purifiés Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3, de deux témoins négatifs : HSA (Human Serum Albumin, Sigma-Aldrich) et GST (Gluthatione-S-transférase from *Schistosoma japonicum*, Sigma-Aldrich) ainsi que d'un témoin positif : une gamme d'anticorps anti-IgE humaines (Anti-Human IgE ε-chain specific produced in goat, Sigma-Aldrich) : 0 mg/mL, 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.250 mg/mL, 0.5 mg/mL et 1 mg/mL (**Figure 10**). Chaque protéine est greffée 2 fois en dixplicats (soit 20 spots/protéine/puce). Afin de délimiter les puces, une ligne de cyanine 3 (Cy3) est déposée en haut et en bas de chaque puce.

Préparation des échantillons à greffer : Pour les extraits totaux ou les protéines purifiées 30 µL d'échantillon à 0.5 mg/mL sont préparés dans du tampon de greffage, le tampon phosphate à 25 mM, pH 8,4. Ces échantillons sont préparés à partir de solutions mères d'extrait total et de protéines purifiées à 3 mg/mL et à partir d'une solution mère de tampon phosphate 0.5 M, pH 8,4. 15 µL de chaque échantillon sont déposés successivement dans une plaque de microtitration (384 puits), en vue du dépôt.

Fabrication des puces (spotting) : Le greffage se fait en douze zones sur une lame époxyde (douze puces/lame) grâce au robot Qarray mini, Genetix. Les lames à greffer ainsi que la plaque de microtitration remplie avec les échantillons à déposer sont placées dans le robot. La manipulation du robot et le spotting des lames sont effectués par une ingénierie responsable du robot : Lidwine TROUILH. Après le greffage, la lame est scannée par le scanner InnoScan® 900 (Innopsys) avec les paramètres de lecture suivants : 635nm (rouge) : 10% ; 532nm (vert) : 50% de façon à vérifier si le greffage s'est déroulé correctement.

Stockage des lames : A la fin du spotting, les lames sont laissées dans le robot sous atmosphère humide afin que les spots sèchent de façon homogène permettant ainsi le greffage uniforme des protéines. Les lames sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.3.2. Tests immunologiques sur biopuce

Les étapes des tests immunologiques sur biopuce sont les mêmes que pour les westerns blot à partir de la saturation.

Un cadre étanche séparant les 12 puces les unes des autres est déposé sur la lame. Différentes conditions peuvent alors être testées sur une même lame. Les lames sont ensuite glissées sur un support pour la suite des manipulations (**Figure 9**).

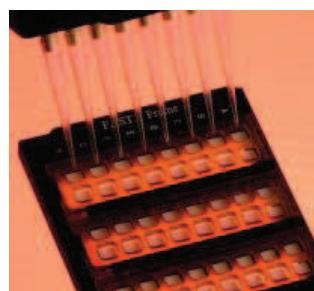


Figure 9: Cadre étanche (jaune) délimitant les puces sur les lames placées sur le support (noir)

Saturation : Sur chaque puce sont déposés 80 µl de tampon de saturation PBS 1X, HSA 1%, TWEEN 20 0.5%. L'incubation se déroule ensuite pendant 1h à température ambiante sous agitation 150 rpm.

Incubation anticorps primaires : La dilution finale de l'anticorps primaire (i.e. du sérum) est de 1:5^{ème} ou 1:10^{ème} en fonction des expériences, dans le tampon de saturation. Pour une dilution 1:5^{ème}, le sérum est dilué au 1:2.5^{ème} dans 80 µL de tampon de saturation rajoutés au 80 µL de tampon de saturation déjà déposés sur la puce. Les séra utilisés sont les mêmes que ceux utilisés lors des western-blots. L'incubation est menée pendant 1h, 1h30 ou 2h à température ambiante. A la suite de cette incubation, les puces sont lavées deux fois cinq minutes avec du PBS-T (PBS 1X, TWEEN 20 0.1%) sous agitation. Pour ce faire, la solution d'incubation est retirée à la pipette et 100 µL de solution de lavage sont ajoutés immédiatement sur chaque puce.

Incubation anticorps secondaires : En retirant à la pipette la solution de lavage, 100 µL de l'anticorps secondaire fluorescent APC anti-human IgE (clone MHE-18, concentration 12.5 µg/mL, BioLegend) diluée à la concentration de 0.5 µg/mL dans du tampon de saturation sont ajoutés sur chaque puce. L'incubation se déroule pendant 1h30 à température ambiante et à l'abri de la lumière. A la suite de l'incubation la lame est lavée deux fois pendant cinq minutes dans 40 mL de PBS-T, puis pendant quelques secondes dans de l'eau milliQ. La lame est ensuite séchée par centrifugation pendant une minute.

Révélation : La révélation se fait par lecture de lame avec le scanner InnoScan® 900 et le logiciel Mapix® mis au point par la société Innopsys. Les paramètres de lecture sont : 635nm (rouge) : 80% et 532 nm (vert) : 10%. A l'aide du logiciel, chaque puce et chaque spot sont analysés.

Par lame, trois puces seront toujours utilisées comme témoins négatifs : une puce incubée uniquement avec de l'anticorps secondaire anti-IgE humaines et une puce incubée uniquement avec un anticorps anti-GST (GST Z-5 Alexa Fluor® 647, 0.5 g/mL, Santa Cruz Biotechnology). Le dernier témoin négatif correspond à l'incubation d'un sérum de patient non allergique. Les plans des lames pour les différentes expériences sont présentés en annexe 4

Figure 10 : Plan de la puce Arachide

Partie 4 : Résultats et Discussion

1. Préparation et sélection des extraits

1.1. Sélection d'un échantillon

A l'issue des deux heures d'extraction, 3mL de solution sont récupérés pour chaque extrait, sauf pour les extraits d'épices. Les liquides récupérés sont plus ou moins visqueux en fonction de l'aliment, du tampon utilisé et du pourcentage initial de farine. Par exemple, les extraits d'avoine sont très visqueux en tampon PBS alors qu'en tampon borate, ils ne le sont pas. Les extraits d'épices devenant trop denses au bout de quelques minutes d'extraction pour de fortes concentrations, les rapports poids/volume initiaux ont alors été diminués à 5 et 10%. Ces rapports ont permis d'obtenir des dosages et des profils protéiques considérés comme suffisants, aucune donnée bibliographique n'existant à ce sujet.

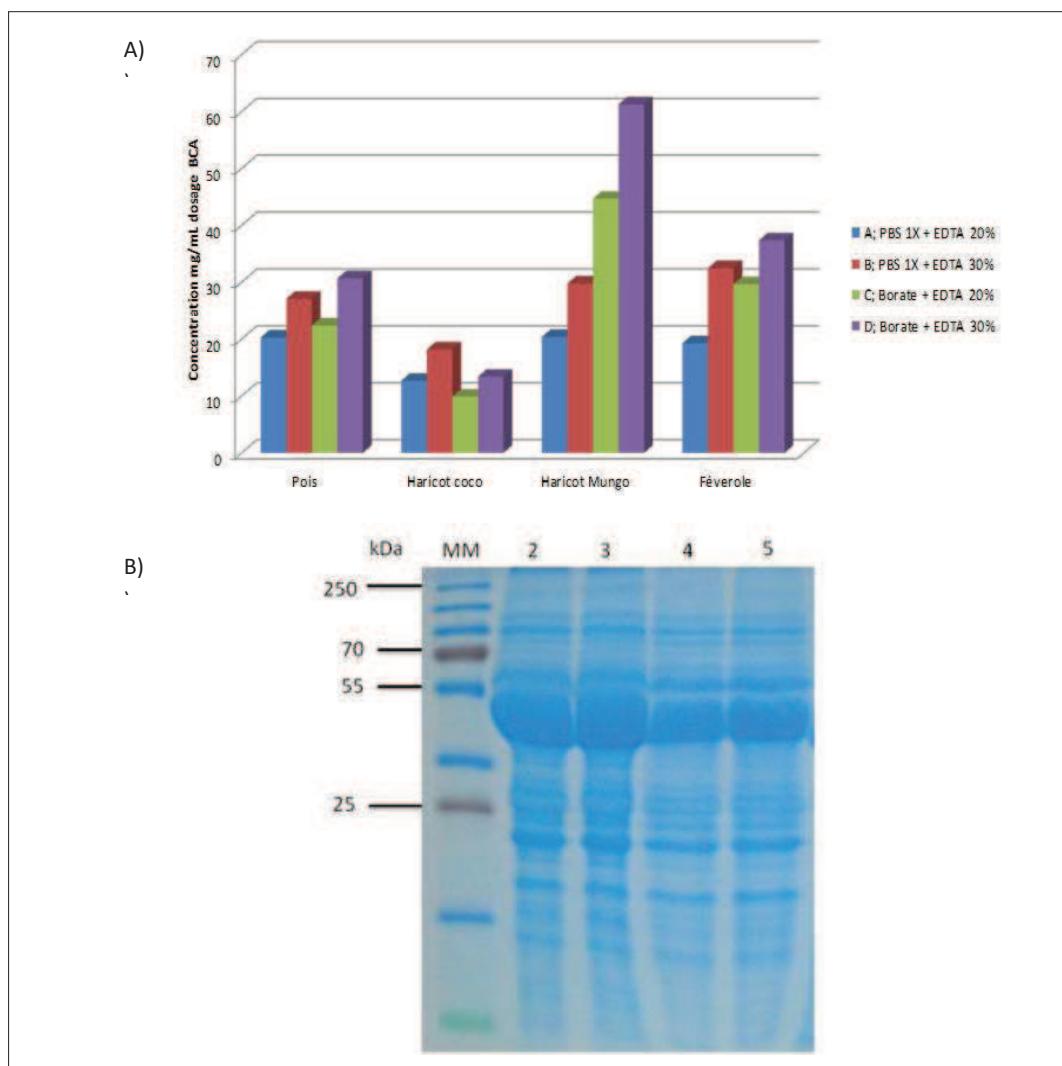


Figure 11 : A) Comparaison des dosages BCA pour les différents extraits de légumineuses. B) Migration des protéines de haricots mungo. Gel SDS-PAGE 12.5%, 1.5mm, 80µg de protéines/puits. MM : marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619). 2-3: Tampon PBS (1X, pH 7.4) : 20 et 30% ; 4-5: Tampon Borate (0.1M, pH 8.45) : 20 et 30 %

Après la centrifugation, entre 1 mL et 2 mL de surnageant limpide sont récupérés pour chaque extrait. Pour des extraits comme la noix de coco ou la noix une épaisse couche de lipides s'est déposée en surface.

Chaque surnageant est dosé par la technique du BCA (résultats en annexe 2). La **figure 11, A** présente les résultats obtenus pour les différents extraits de légumineuses. Pour la plupart des aliments, le tampon borate permet d'obtenir les plus fortes concentrations en protéines. Pour un même extrait, des concentrations en protéines plus importantes sont obtenues pour des rapports initiaux d'extraction plus importants. Il serait possible d'augmenter les ratios initiaux de poudre/volume de façon à obtenir de plus grandes quantités de protéines, mais les dosages étant à ce stade suffisants, il n'est pas nécessaire de le faire

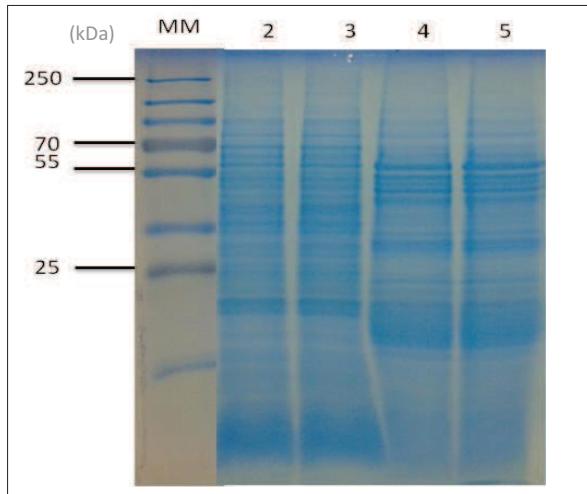


Figure 12 : Migration des protéines de noix; Gel SDS-PAGE 12.5%, 1.5mm, 80 µg de protéines/puits. MM : marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619). 2-3: Noix PBS : 20 et 30 %, 4-5 : Noix borate : 20 et 30%

contenir différentes protéines et donc immunologiques (western blots) avec des séra de patients allergiques ainsi que des analyses en spectrométrie de masse permettraient de caractériser ces différences. Il serait alors possible de savoir si les deux extraits doivent être greffés sur la puce ou si un seul pourrait suffire.

Suite à la dialyse, les extraits sélectionnés sont de nouveau dosés et déposés sur gel SDS-PAGE.

1.2. Caractérisation des échantillons après dialyse

La dialyse permet de filtrer les petites molécules comme les sels qui peuvent biaiser le dosage. Les résultats des dosages présentés dans le tableau 4 indiquent qu'à la suite de la dialyse, la concentration en protéines a diminué et ce, de façon plus importante pour les extraits en tampon PBS. Pour quelques extraits des diminutions importantes sont observées (pour la féverole la concentration passe de 32,5 mg/mL à 3,6 mg/mL après dialyse). Ceci témoigne du biais engendré par les sels mais également d'un manque de précision de la technique de dosage au BCA pour ces échantillons.

Afin de vérifier la présence de protéines et de sélectionner le meilleur extrait pour chaque aliment testé, chaque extrait est déposé sur un gel SDS-PAGE. Pour les extraits de haricot mungo (**Figure 11,B**), les bandes de protéines sont plus intenses avec le tampon PBS. En revanche pour un même tampon, aucune différence n'est visible entre une extraction à 20% et une extraction à 30%. C'est donc l'extrait de la piste 2 : extraction à 20% dans PBS, qui est sélectionné.

Ainsi, le meilleur extrait de chaque aliment est sélectionné pour être dialysé (Tableau 4). Pour la noix, un extrait obtenu dans le tampon borate et un extrait obtenu dans le tampon PBS ont été sélectionnés car les deux extraits ne présentent pas les mêmes profils d'extraction (**Figure 12**). Les extraits peuvent différents allergènes potentiels. Des tests

Extrait	Extraction	Tampon	Concentration avant dialyse (mg/mL)	Concentration après dialyse (mg/mL)
Chataigne	40%	Borate-EDTA	18,8	18
Maïs	40%	PBS-EDTA	3,8	1,7
Riz	20%	Borate-EDTA	5,5	7,8
Fenugrec	10%	Borate-EDTA	19,6	17
Anis vert	10%	PBS-EDTA	14	4,5
Blé	30%	PBS-EDTA	31,3	17,4
Noix de coco	20%	Borate-EDTA	11,2	10,1
Avoine	30%	PBS-EDTA	6,3	9,4
Gingembre	20%	Borate + PVPP 2% + cocktail	15,9	2,5
Seigle	10%	PBS-EDTA	2,8	2
Epeautre	10%	PBS-EDTA	2,6	2,7
Noix	20%	PBS-EDTA	5,8	3,06
	20%	Borate-EDTA	21	9,2
Pois	20%	PBS-EDTA	20,3	8,2
Haricot mungo	20%	PBS-EDTA	20,4	11,1
Féverole	30%	PBS-EDTA	32,5	3,6
Haricot coco	20%	Borate-EDTA	9,9	6,9

Tableau 4: Dosages avant et après dialyse des extraits sélectionnés

Les gels SDS-PAGE permettent de visualiser les profils de migration obtenus (**Figures 13 et 14**). Les bandes protéiques apparaissent plus nettement après dialyse. Pour certains extraits, des bandes de haut poids moléculaire ont disparu mais des bandes de faible poids moléculaire sont apparues. Ceci peut correspondre à la séparation des différentes sous-unités composant la protéine (exemple de la noix de coco en annexe 3). Les protéines de l'avoine (**Figure 14**, piste 6) sont très peu visibles sur la photographie. Cependant, elles sont présentes sur le gel.

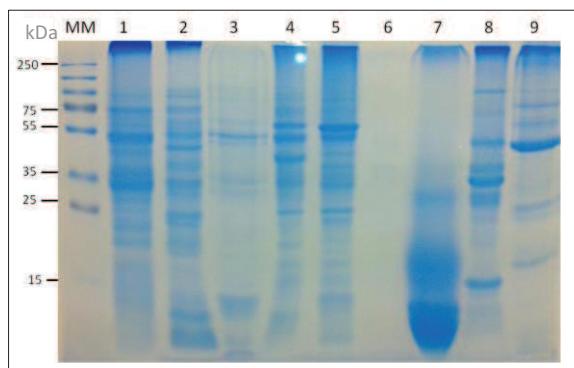


Figure 13 : Gel SDS-PAGE, 12.5%, 1.5mm. Extraits protéiques produits, Céréales et Epices (80µg de protéines). MM: marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619), 1: Blé, 2: Maïs, 3: Riz, 4: Seigle, 5: Epeautre, 6: Avoine, 7: Gingembre, 8: Anis vert, 9 : Fenugrec.

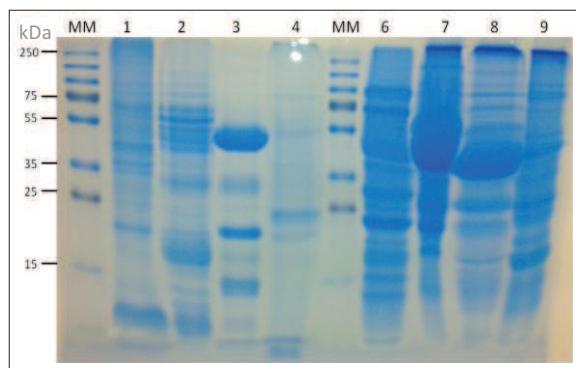


Figure 14 : Gel SDS-PAGE, 12.5%, 1.5mm. Extraits protéiques produits, Noix et légumineuses (80µg de protéines). MM: marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619), 1: Noix-PBS, 2: Noix-Borate, 3: Noix de coco, 4: Chataigne, 6: Pois, 7: Haricot mungo, 8 : Haricot coco, 9 : Féverole

Les extraits préparés correspondent à des catégories d'aliments riches en protéines ce qui rend plus facile leur extraction. De même, une coloration au bleu de Coomassie est suffisante pour visualiser les protéines extraites, contrairement aux protéines de certains aliments comme les légumes qui nécessitent une coloration au nitrate d'argent.

Ces 17 nouveaux extraits complètent la liste établie pour le projet. Actuellement, cette liste a été réalisée à 60%. La deuxième partie des travaux réalisés porte sur la partie biopuce. Afin de pouvoir déterminer les conditions expérimentales sur biopuce à partir de séra allergiques à l'arachide, il est nécessaire dans un premier temps de caractériser immunologiquement ces séra.

2. Caractérisation des séra « arachide » par Immunoblot

En vue de l'optimisation des conditions expérimentales sur biopuce, des séra allergiques à l'arachide sont caractérisés par western blot. Les résultats obtenus nous

permettent de connaître les molécules pour lesquelles les patients possèdent des IgE spécifiques. Ces résultats seront utilisés en corrélation avec ceux obtenus sur biopuces pour déterminer les conditions expérimentales d'utilisation des séra lors des tests de diagnostic.

Les conditions de saturation et d'incubation lors des western-blots pour ce type d'aliment ont été définies par des travaux préliminaires d'optimisation menés par Camille GIRONDE au sein de l'équipe POP.

A l'issue des transferts sur membrane de nitrocellulose et après coloration au rouge Ponceau, les protéines transférées peuvent être visualisées (**Figure 15**). Il ressort que l'extrait d'Ara h 1 purifiée était moins concentré que les autres, peu de protéines Ara h 1 ont donc été transférées. Pour les protéines purifiées, plusieurs bandes sont observables. Ces bandes correspondent aux différents isomères ou aux différentes sous-unités de la protéine.

Les résultats des séra Nina et Monben sont présentés dans les **figures 16 et 17**. Pour le sérum Monben, seule Ara h 2, dans l'extrait total et dans Ara h 2 purifiée est clairement visible. Pour Nina, l'extrait total et les trois protéines purifiées réagissent avec les IgE.

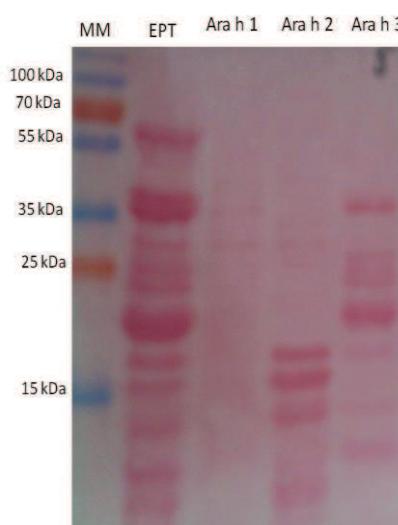


Figure 15 : Transfert des protéines (20µg) sur membrane de nitrocellulose après coloration au rouge Ponceau. MM : marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619) ; EPT : Extrait Protéines Totales d'arachide.

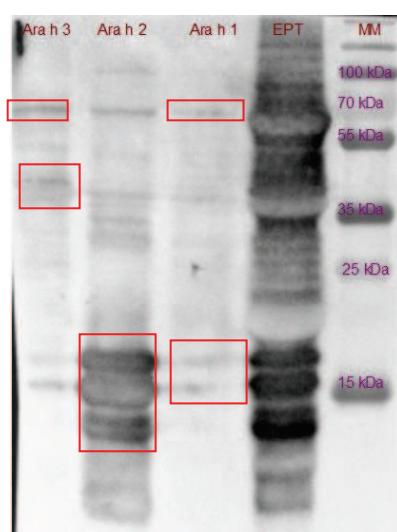


Figure 16: Western-blot sérum Nina (1/10ème). Temps d'exposition 1sec. Révélation kit Luminata TM. MM : marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619). EPT : Extrait Protéines Totales

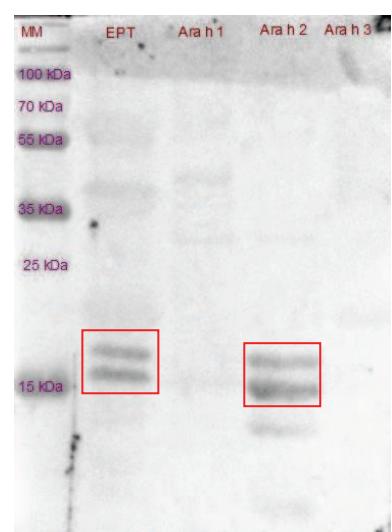


Figure 17: Western-blot sérum Monben (1/10ème). Temps d'exposition 2sec. Révélation kit Westdura. MM : marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619). EPT : Extrait Protéines Totales

Les résultats obtenus lors des western-blots sont regroupés dans le tableau 5. Les immunoblots permettent uniquement d'obtenir un résultat de « présence/absence », concernant les IgE spécifiques pour une protéine, mais ne témoignent en rien de la quantité de ces IgE.

	EPT	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 3
Nina	+	+	+	+
Suheyla	+	-	+	+
Clara	+	-	+	+
Dumax	+	-	+	+
Guy	+	-	+	+
Monben	+	-	+	-
ADG	-	-	-	-

Tableau 5 : Résultats des westerns blots pour les différents séra testés. - : absence d'interaction ; + : Interaction

Grâce à ces informations, il est désormais possible d'utiliser ces séra avec ce même extrait et ces mêmes protéines purifiées en tests sur biopuces. A partir de données connues, les conditions expérimentales standards des tests sur la biopuce de diagnostic peuvent être définies.

3. Optimisation des conditions expérimentales sur biopuce

Sur les quatre lames sont « spottées » douze puces avec un extrait total d'arachide, et trois allergènes majeurs purifiés de l'arachide : Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3. Nous utilisons pour les tests les mêmes séra allergiques que ceux caractérisés en western-blot. Les résultats sur puces comparés avec ceux des western-blots vont nous permettre de mettre au point certains paramètres des conditions expérimentales sur biopuce. Le but est de déterminer les conditions standards pour obtenir un signal représentatif pour n'importe quel type de sérum.

Lors des manipulations, le sérum du patient contenant ses IgE est d'abord déposé sur la puce, puis, après incubation, une solution d'anticorps secondaire anti-IgE humaines permettant la révélation des interactions par fluorescence est ajoutée (**Figure 18**).

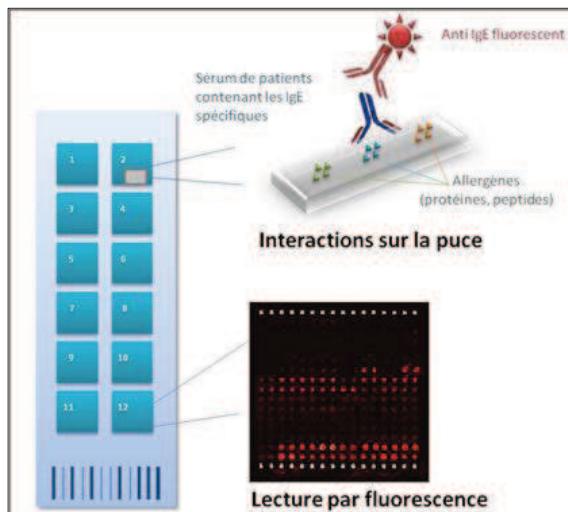


Figure 18 : Rappel du principe des interactions et de la révélation sur biopuces

3.1. Spotting des quatre lames arachide

Le spotting des quatre lames a duré 10h30. A la suite du spotting et une fois sèches les lames sont lues grâce à un scanner en fluorescence. Lors de la lecture, les puces de toutes les lames sont semblables à celle présentée en **figure 19**. Les différents spots sont bien définis, les vides ne sont pas contaminés, les quatre lames sont donc utilisables.

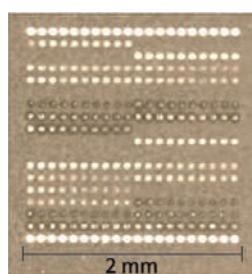


Figure 19 : Visualisation d'une puce après spotting. InnoScan® 900, 532nm : 80%; 650nm : 10%.

3.2. Visualisation des interactions par le scanner InnoScan® 9000

Trois des quatre lames initialement spottées sont utilisées afin de tester différentes conditions de manipulation (plan des lames en annexe 4). Chaque lame permet de tester un temps d'incubation différent pour l'anticorps primaire : lame A 2h, lame B 1h et lame C 1h30. Sur chaque lame deux puces sont dédiées aux témoins négatifs pour lesquels aucun sérum n'est déposé. Un sérum non allergique est également testé comme dernier témoin négatif.

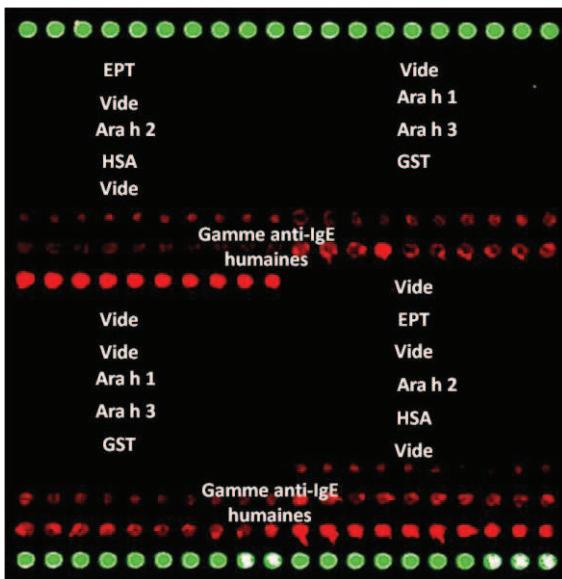


Figure 20 : Sérum ADG dilué au 1/5, Durée d'incubation 1h30. Révélation InnoScan® 900. Paramètres de lectures: 535nm: 10%; 650nm : 80%

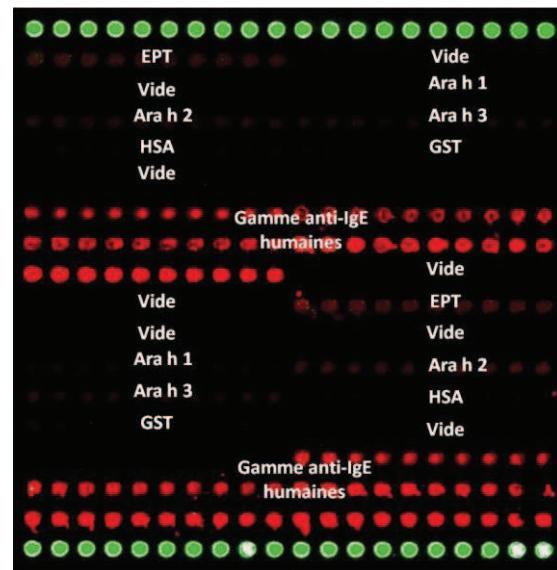


Figure 21 : Sérum Monben dilué au 1/5, Durée d'incubation 1h30. Révélation InnoScan® 900. Paramètres de lectures: 535nm: 10%; 650nm : 80%

Lors de la visualisation des résultats, pour tous les séra testés et quelle que soit la durée ou la dilution testée, les mêmes profils de spots sont révélés. Les signaux obtenus sont exploitables pour tous les séra pour des spots de concentration en protéines de 0.5 mg/mL. Après 2 heures d'incubation, les spots pour les extraits totaux d'arachide forment des trainées. Elles sont certainement dues au mauvais séchage de la lame mais n'entachent en rien l'analyse de la puce. Le témoin négatif « anticorps secondaire seul », indique que les signaux sont bien spécifiques. Le patient ADG est effectivement non allergique à l'arachide mais possède quand même des IgE comme tout individu (**Figure 20**).

Pour certains séra, le témoin négatif GST s'allume, alors qu'il ne devrait pas. Rappelons que les IgE sont les immunoglobulines principalement impliquées dans les allergies alimentaires mais également lors des réponses aux infections parasitaires. La GST greffée sur la biopuce est produite par *Schistosoma japonicum*, ver plat (parasite du Sud Est de l'Asie). Une similarité de séquence entre cette GST et la GST d'autres parasites pourrait exister. Ainsi, à la suite d'une infection parasitaire, les patients concernés ont pu développer des IgE anti-GST pouvant interagir avec la GST déposée. Une telle interaction a été démontrée entre des IgE anti-GST spécifiques à la GST de *Wuchereria bancrofti* (ver filiforme responsable de la filariose lymphatique) et la GST du cafard (Santiago et al., 2012). Dès lors, la GST ne peut être considérée comme un bon témoin négatif, c'est pour cela qu'elle doit être remplacée par des spots de tampon de greffage seul.

3.3. Transformation des données visuelles en données numériques

En fonction des zones révélées sur la puce, il est possible de savoir pour quelle(s) molécule(s) un patient présente des IgE spécifiques. Par exemple le sérum Monben (**Figure 21**) réagit à l'extrait total d'arachide, et à la protéine purifiée Ara h 2, comme obtenu en western-blot.

Les signaux obtenus sont ensuite traités numériquement. Le logiciel Mapix® permet pour chaque puce d'obtenir, après traitement de l'image, un tableau de données. On définit le signal d'un spot comme la différence entre la médiane de sa fluorescence à 635nm et la médiane de son bruit de fond. Les moyennes des signaux ont alors été calculées pour les 20 spots de chaque élément de la puce. Les signaux sont exprimés en unités de fluorescence.

Même si les dosages d'IgE spécifiques ne sont pas réellement quantitatifs nous pouvons quand même supposer que les séra « fortement dosés » possèdent plus d'IgE spécifiques que les autres. Dès lors, ces séra présenteront des signaux plus importants.

Une forte différence d'échelle de signal ressort effectivement entre les séra préalablement définis comme « fortement dosés » et les séra « faiblement dosés » (**Figures 22 et 23**) avec des signaux de l'ordre de 20000 unités de fluorescence pour Nina et Suheyla et des signaux de l'ordre 500 unités de fluorescence pour les autres à l'exception de Clara.

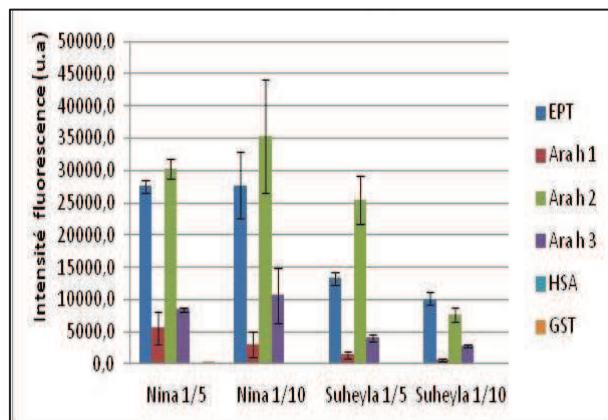


Figure 22 : Réponse des séra "fortement dosés" pour deux heures d'incubation d'anticorps primaires

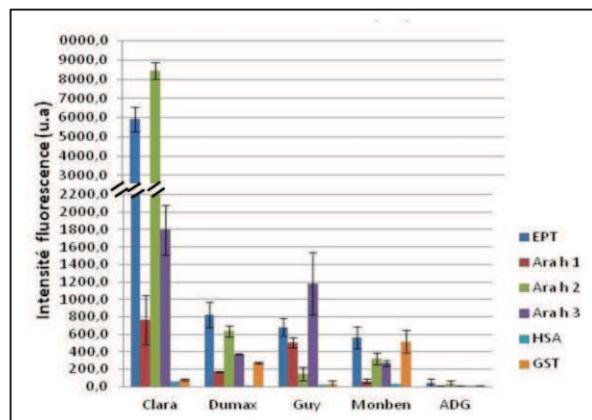


Figure 23 : Réponse des séra "faiblement dosés" pour deux heures d'incubation d'anticorps primaires

Les séra Dumax et Monben dont on ne connaît pas les dosages s'apparenteraient alors à des séra « faiblement dosés ».

Il est nécessaire de garder à l'esprit que ces données ne nous donnent qu'une indication sur les proportions des IgE spécifiques mais en aucun cas sur leur quantité. Pour approfondir cette analyse, des dosages d'IgE spécifiques doivent être menés par les allergologues sur les séra que nous testons et à partir des extraits que nous utilisons. De même, il n'existe aucun seuil au dessus duquel on peut affirmer que le patient est allergique à telle ou telle molécule. Il est nécessaire de définir un seuil allergène par allergène. Chaque définition de seuil nécessiterait un nombre de séra trop important par rapport au nombre de séra dont dispose le projet actuellement. L'acquisition de nouveaux séra est prévue pour les mois à venir.

3.3.1. Détermination de la dilution standard

La dilution de l'anticorps primaire est un des facteurs à optimiser pour l'utilisation des biopuces. L'objectif est de déterminer une dilution standard à partir de laquelle tous les autres facteurs seront optimisés et tous les seuils pourront être définis. L'effet d'une dilution au 1:10^{ème} n'est pas le même d'un sérum à un autre (**Figure 22**). Alors que pour Nina, cela semble augmenter la spécificité de réponse, pour Suheyla, le signal est fortement diminué. A la vue de l'ensemble des résultats nous avons donc choisi de définir une dilution standard au 1:5^{ème}. En effet, les écarts types présentés ne permettent pas de mettre en évidence une dilution meilleure qu'une autre. Dans le souci de pouvoir tester une majorité de séra (des plus riches au moins riches en IgE) la dilution 1:5^{ème} ressort comme la plus pertinente.

Dans cet objectif également, la création d'une puce avec une gamme de dépôt (0.125mg/mL, 0.250mg/mL, 0.5mg/mL et 1mg/mL) pour les extraits et les protéines purifiées permettra de distinguer les séra faiblement dosés des séra fortement dosés. Par exemple, plus un sérum sera riche en IgE spécifiques, plus il sera à même d'allumer les faibles concentrations de la gamme. De la même façon pour un sérum inconnu, on augmente par cette gamme les chances d'obtenir un signal. La création d'une telle gamme semble être un outil informatif intéressant, cependant elle implique directement la définition de nouveaux seuils par concentration et par aliment.

3.3.2. Détermination de la durée d'incubation de l'anticorps primaire

L'optimisation de ce nouvel outil de diagnostic passe également par l'optimisation de la durée d'incubation du sérum (pour un sérum dilué au 1/5). Trois durées d'incubation de l'anticorps primaire ont été testées : 1h, 1h30 et 2h. L'ensemble des résultats sérum par sérum est présenté dans la figure ci-dessous (**Figure 24**).

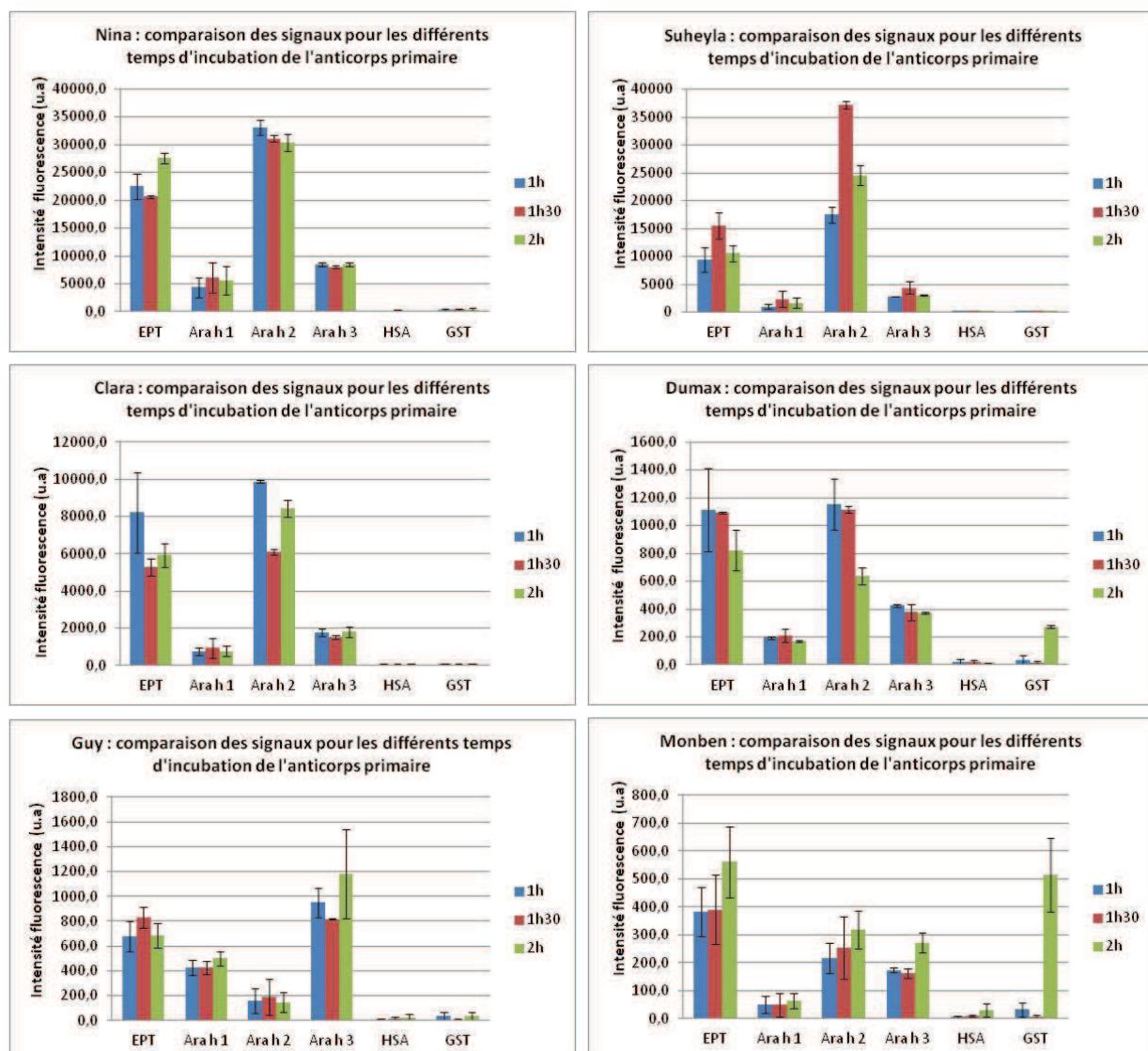


Figure 24 : Comparaison par sérum des signaux obtenus pour différentes durées d'incubation de l'anticorps primaire.

Pour chaque patient, les profils de réactions restent les mêmes quelle que soit la durée d'incubation de l'anticorps primaire. Aucune tendance particulière quant à un effet de la

diminution du temps d'incubation n'est révélée. Compte tenu de la variabilité rattachée à différents facteurs (variabilité inter-lame, variabilité du manipulateur) et de l'absence de seuil de significativité concernant les différences de signaux fluorescents, il est possible de dire qu'il n'y a pas de différence entre les trois temps d'incubation. Nous choisissons donc de définir à 1h30 la durée d'incubation de l'anticorps primaire pour un sérum dilué au 1:5^{ème}. Une telle durée permet d'avoir une marge de manœuvre assez importante dans la gestion du temps d'incubation de l'anticorps primaire. En effet, par souci pratique, l'expérimentateur peut alors décider de faire 1h ou 2h d'incubation sans risquer de biaiser ses résultats.

Conclusion et Perspectives

Actuellement, les allergologues sont confrontés à de nombreux problèmes lors de l'utilisation d'un test de diagnostic de l'allergie alimentaire. L'augmentation inquiétante de la prévalence de l'allergie alimentaire ces quinze dernières années renforce ce besoin d'un outil de diagnostic fiable, rapide et efficace. En effet, la prescription d'un traitement adapté passe tout d'abord par un diagnostic précis. Des zones d'ombres persistent à propos de la compréhension du mécanisme et de l'origine de ces allergies, ce qui n'est pas sans compliquer la tâche. Le projet DIAGALA qui a pour but de mettre au point une biopuce comme nouvel outil de diagnostic de l'allergie alimentaire entreprend donc un travail considérable.

Au cours des trois premiers mois, j'ai pu mettre au point 17 extraits protéiques issus de 16 aliments différents : céréales, légumineuses, épices, noix et fruits à coque. Ces 17 extraits ont été dosés, comparés aux extraits de la littérature. Ils seront par la suite caractérisés par Immunoblot avec des séra de patients allergiques.

Les western-blots sur extraits et allergènes purifiés d'arachide ont permis de caractériser 6 séra de patients. Ces séra ont alors pu être utilisés lors des tests sur biopuces à protéines afin de définir les conditions expérimentales de ces tests. Les premiers tests sur puces ont permis de déterminer les conditions standards suivantes : dilution du sérum au 1:5^{ème} et temps d'incubation du sérum sur la puce d'1h30. Une telle dilution ne permet pas, pour certains séra d'obtenir des signaux exploitables (saturation pour certains séra fortement dosés, signaux insuffisants pour certains séra faiblement dosés). Ce problème pourra être résolu avec la création d'une puce sur laquelle les allergènes seront greffés selon une gamme de concentration. Ainsi, pour n'importe quel sérum, une échelle commune de signaux interprétables pourra permettre d'affiner le diagnostic. Ces nouvelles puces ont été greffées avec succès fin juillet. Les nouveaux tests seront menés au cours du dernier mois de mon stage.

Ces expériences ont eu pour but de déterminer des conditions expérimentales et se placent au début de la fabrication d'un outil générique efficace, rapide et sensible pour le diagnostic de l'allergie alimentaire. En aucun cas nous n'avons cherché à établir un diagnostic pour les séra utilisés. Il manque actuellement de nombreuses données avant de pouvoir les tester dans ce but et surtout avant de pouvoir mettre en place des tests statistiques pertinents validant nos hypothèses. De nombreux nouveaux séra caractérisés à partir de nos extraits en skin prick test, en dosage d'IgE spécifiques et en Immunoblot sont nécessaires. Avant de pouvoir parler de diagnostic il est nécessaire de déterminer les concentrations de greffage pertinentes et le seuil de fluorescence allergène par allergène permettant de dire avec certitude si un patient est allergique. Tout ceci est un travail colossal requérant des cohortes de plusieurs milliers de patients mais qui aboutira à un outil de pointe, utilisable simplement et rapidement.

Bibliographie

- Bacarese-Hamilton T., Gray J., Ardizzone A., Crisanti A. « Allergen microarrays ». In : *Microarrays in Clinical Diagnosis*. Totowa : T. Joos and P. Fortina, 2005. p. 195-207.
- Ben-Shoshan M., Harrington D. W., Soller L., Fragapane J., Joseph L., St Pierre Y., Godefroy S. B., Elliot S. J., Clarke A. E. « A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010. Vol. 125, n°6, p. 1327-1335.
- Bhalla P. L., Singh M. B. « Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination ». *Trends in Biotechnology*. 2008. Vol. 26, n°3, p. 153-161.
- Borges J.-P. *Caractérisation structurale et immunologique d'allergènes alimentaires : les protéines de transfert de lipides de fruits*. Immunologie. Toulouse : Université toulouse III, 2008. 182 p.
- Corbillon E., Rame J., Obrecht O. *Indications du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic et le suivi des maladies allergiques*. France : Haute Autorité de Santé, 2005.
- Hamilton R. G., Williams P. B. « Human IgE antibody serology: A primer for the practicing North American allergist/immunologist ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010. Vol. 126, n°1, p. 33-38.
- Harwanegg C., Hutter S., Hiller R. « Allergen Microarrays for the Diagnosis of Specific IgE Against Components of Cow's Milk and Hen's Egg in a Multiplex Biochip-Based Immunoassay ». In : *Microchip-Based Assay System: Methods and Applications*. Totowa : Pierre N. Floriano, 2007.
- Hed J. « Réactivité croisée entre allergènes d'origine végétale. Impact clinique du diagnostic moléculaire ». *Phadia, AB*. 2009.
- Jahn-Schmid B., Harwanegg C., Hiller R., Bohle B., Ebner C., Scheiner O., Mueller M. W. « Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E ». *Clinical and experimental allergy*. 2003. Vol. 33, p. 1443-1449.
- Knol E. F., Knulst A. C. « Application of multiplexed immunoglobulin E determination on a chip in component-resolved diagnostics in allergy ». *Clinical and experimental allergy*. 2009. Vol. 40, p. 190-192.
- Kusnezow W., Hoheisel J. . « Solid supports for microarray immunoassays ». *Journal of Molecular Recognition*. 2003. Vol. 16, p. 165-176.
- Moneret-Vautrin D. A., Kanny G., Rancé F., Lemery P. « Les allergènes végétaux alimentaires. Allergies associées et réactions croisées. ». *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 1997. Vol. 37, n°3, p. 316-324.
- Owneby D. . « Diagnostic Test in Allergy ». In : *Current Clinical Practice: Allergic Diseases: Diagnostis and Treatment, Third Edition*. Totowa : Humana Press, 2005. p. 27-37.
- Pastorello, E. A., Pravettoni, V., Calamari, A. M., Banfi, E. and Robino, A. M. "New plant-origin food allergens". *Allergy*. 2002. Vol 57, p. 106-110.
- Peters R. L., Gurrin L. C., Allen K. J. « The predictive value of skin prick testing for challenge-proven food allergy: A systematic review ». *Pediatric Allergy and Immunology*. 2011
- Pérez Bustamante, S.; Alvarez-Perea, A.; De Barrio, M.; Tomás, M.; Luisa Baeza, M.; Bartolomé-Zavala, B. Allergy to curry : case report. *Immunology and Allergopathology*. 2011. Vol 39, n°6, p 383-385.
- Rancé F., Deschildre A. « Oral food challenge in children : who, when, and how? Introduction, definitions, glossary ». *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 2006. Vol. 46, p. 604-609.
- Salcedo G., Diaz-Perales A. « Component-resolved diagnostic of allergy : more is better ? ». *Clinical and experimental allergy*. 2010. Vol. 40, p. 836-838.
- Sampson H. A. « Update on food allergy ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004. Vol. 113, n°5, p. 805-819.
- Santiago H. , Leevan E., Bennuru S., Ribeiro-Gomes F., Mueller E., Wilson M., Wynn T., Garboczi D., Urban J., Mitre E., Nutman T. . « Molecular mimicry between cockroach and helminth glutathione S-transferase promotes cross-reactivity and cross-sensitization ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012. Vol. 130, n°1, p. 248-256.
- Taylor S. . « Emerging Problems with food allergens ». *Food, Nutrition and Agriculture*. 2000.
- Valenta R., Kraft D. « From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy ». *Current Opinion in Immunology*. 2002. Vol. 14, p. 718-727.
- Verma, A.K., Kumar, S., Das, M. et Dwivedi, P.D. A comprehensive review of legume allergy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2012. Online First™

Annexes

ANNEXE 1 : Description des séra utilisés lors du stage

ANNEXE 2 : Résultats des dosages BCA de tous les extraits préparés

ANNEXE 3 : Comparaison de l'extrait de Noix de coco 20% Borate avant et après dialyse

ANNEXE 4 : Plans des lames pour les tests de durées d'incubation de l'anticorps primaire

ANNEXE 1 : Description des séra utilisés lors du stage

Code	Trophallergènes	Date des aliquots	Commentaires de l'allergologue	Classement du sérum
Dumax	Arachide, Noisette, Noix du Brésil, Pignon de pin	-	-	Dosage inconnu
Guy	Arachide, lentille, noisette, noix de cajou, noix de Pécan, pois, pomme	-	Extrait arachide 11kU/Lara h 1 0,15kU/L ; ara h 2 0,14kU/L ; ara h 3 0,15kU/L	Faiblement dosé
Monben	Arachide, Fruits à coque	-	-	Dosage inconnu
Clara	Arachide, lupin	-	rAra h 1 31,7kU/L ; rAra h 3 6,69kU/L	Faiblement dosé
Nina	Arachide, lupin	-	Extrait arachide>100kU/L ; rAra h 1 >100kU/L ; rAra h 2 >100kU/L ; rAra h 3 98,30kU/L	Fortement dosé

ANNEXE 2 : Résultats des dosages BCA de tous les extraits préparés

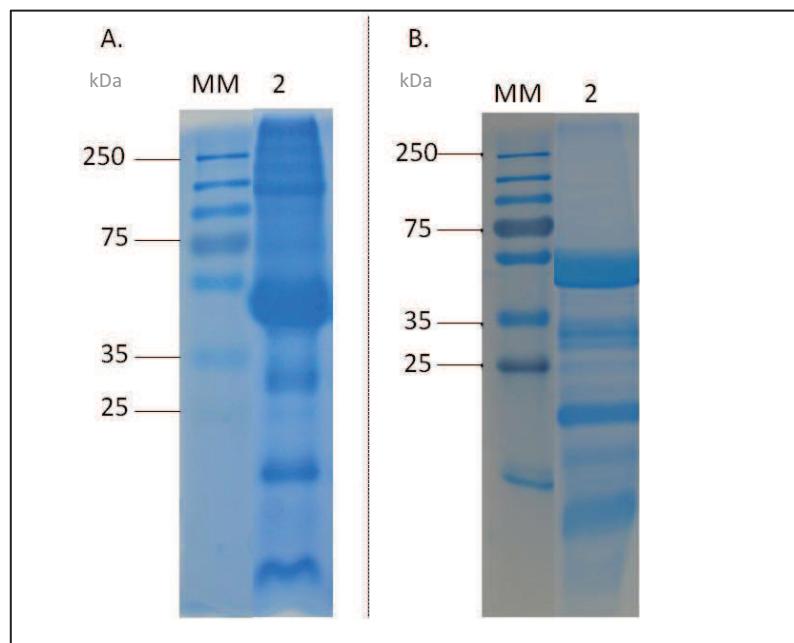
Céréales			
Aliment	Tampon	Extraction	Concentration (mg/mL)
Blé	PBS-EDTA	10%	9,4
	PBS-EDTA	20%	22,1
	PBS-EDTA	30%	31,3
	Borate-EDTA	10%	31
	Borate-EDTA	20%	83
	Borate-EDTA	30%	54,2
Maïs	PBS-EDTA	20%	2,3
	PBS-EDTA	30%	3,5
	PBS-EDTA	40%	3,8
	Borate-EDTA	20%	2,4
	Borate-EDTA	30%	2,9
	Borate-EDTA	40%	4,4
Riz	PBS-EDTA	20%	5,9
	PBS-EDTA	30%	5,2
	PBS-EDTA	40%	9,5
	Borate-EDTA	20%	5,5
	Borate-EDTA	30%	5,7
	Borate-EDTA	40%	8,2
Seigle	PBS-EDTA	10%	2,8
	PBS-EDTA	20%	8,2
	PBS-EDTA	30%	10
	Borate-EDTA	10%	x
	Borate-EDTA	20%	7,1
	Borate-EDTA	30%	7,4
Epeautre	PBS-EDTA	10%	2,6
	PBS-EDTA	20%	5,5
	PBS-EDTA	30%	8,2
	Borate-EDTA	10%	x
	Borate-EDTA	20%	6
	Borate-EDTA	30%	10,9
Avoine	PBS-EDTA	10%	2,4
	PBS-EDTA	20%	13,2
	PBS-EDTA	30%	6,3
	Borate-EDTA	10%	5,6
	Borate-EDTA	20%	9
	Borate-EDTA	30%	9

Légumineuses			
Aliment	Tampon	Extraction	Concentration (mg/mL)
Pois	PBS-EDTA	20%	20,3
	PBS-EDTA	30%	27,1
	Borate-EDTA	20%	22,4
	Borate-EDTA	30%	30,7
Haricot coco	PBS-EDTA	20%	12,7
	PBS-EDTA	30%	18,2
	Borate-EDTA	20%	9,9
	Borate-EDTA	30%	13,4
Haricot mungo	PBS-EDTA	20%	20,4
	PBS-EDTA	30%	29,8
	Borate-EDTA	20%	44,7
	Borate-EDTA	30%	61,3
Féverole	PBS-EDTA	20%	19,3
	PBS-EDTA	30%	32,5
	Borate-EDTA	20%	29,7
	Borate-EDTA	30%	37,4

Fruits à coques			
Aliment	Tampon	Extraction	Concentration (mg/mL)
Noix	PBS-EDTA	20%	5,8
	PBS-EDTA	30%	6,9
	Borate-EDTA	20%	21
	Borate-EDTA	30%	26
Noix de coco	PBS-EDTA	10%	3
	PBS-EDTA	20%	3,8
	Borate-EDTA	10%	8,1
	Borate-EDTA	20%	11,2
Chataigne	PBS-EDTA	20%	6,2
	PBS-EDTA	30%	10
	PBS-EDTA	40%	16,4
	Borate-EDTA	20%	8,5
	Borate-EDTA	30%	14,8
	Borate-EDTA	40%	18,8

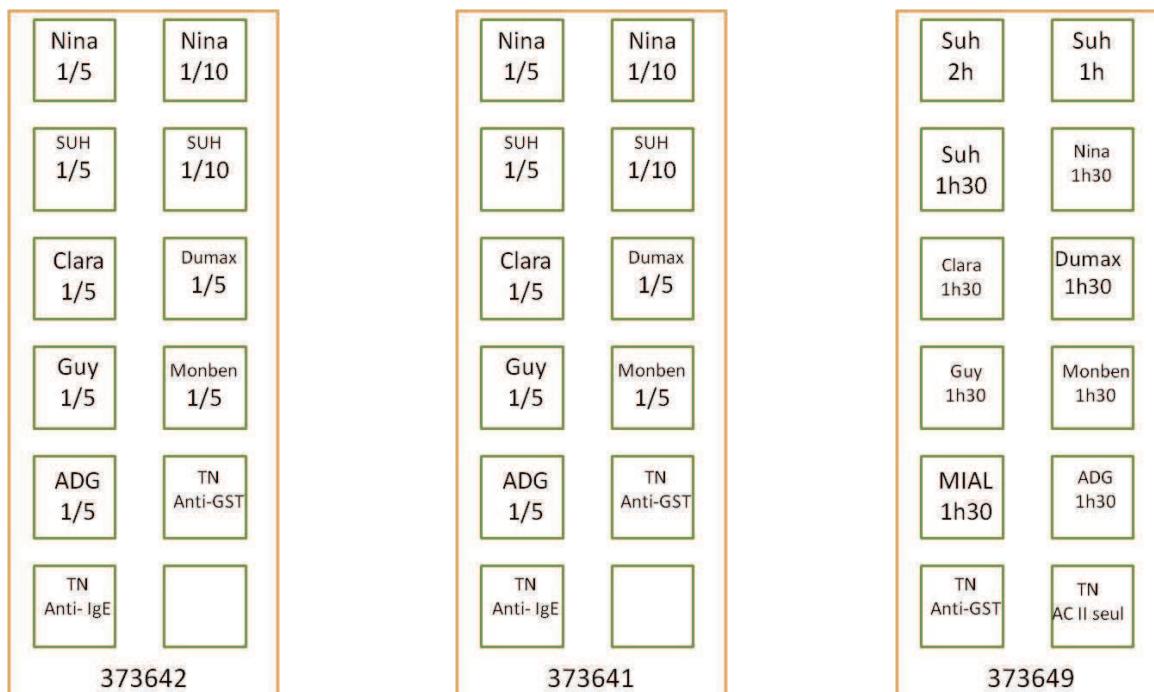
Epices			
Aliment	Tampon	Extraction	Concentration (mg/mL)
Anis vert	PBS-EDTA	10%	7,9
	PBS-EDTA	20%	x
	Borate-EDTA	10%	24,9
	Borate-EDTA	20%	68,1
Fenugrec	PBS-EDTA	7%	28,3
	PBS-EDTA	20%	x
	Borate-EDTA	7%	x
	Borate-EDTA	20%	39,1
Gingembre	PBS-EDTA, Cocktail, PVPP	20%	8,6
	PBS-EDTA, Cocktail	20%	8,4
	Borate-EDTA, Cocktail, PVPP	20%	15,7
	Borate-EDTA, Cocktail	20%	15,9

ANNEXE 3 : Comparaison de l'extrait de Noix de coco 20% Borate avant et après dialyse



Noix de coco 20% Borate avant (A) et après (B) dialyse. SDS-PAGE 12.5%, 1.5mm. MM : marqueur moléculaire (Thermo Scientific, Page Ruler 26619) ; 2 : Noix de coco

ANNEXE 4 : Plans des lames pour les tests de durées d'incubation de l'anticorps primaire



Lame A : 2h
d'incubation

Lame B : 1h
d'incubation

Lame C : 1h30
d'incubation

SUH : Suheyla

TN : Témoin négatif

Anti-GST : Anticorps secondaire anti-GST

AC II seul : Anticorps secondaire anti-IgE

Résumé

Les allergies alimentaires entraînent d'importantes contraintes dans la vie des patients. Les tests de diagnostic actuels n'étant pas assez efficaces pour établir précisément le profil allergique du patient et mettre en place un traitement personnalisé, le projet DIGALA (Diagnostic de l'ALLergie Alimentaire) propose de mettre au point comme outil diagnostic de ces allergies alimentaires, une biopuce contenant 120 extraits protéiques d'aliments. Durant six mois de stage, dix sept extraits ont été produits, dosés et caractérisés par SDS-PAGE en vue de leur greffage sur la biopuce. Ces extraits de céréales, légumineuses, épices, noix et fruits à coques sont semblables à ceux de la littérature. Six sérums allergiques à l'arachide ont été caractérisés par western blot. D'autre part, des biopuces permettant l'optimisation des conditions expérimentales des tests personnalisés ont été créées à partir d'extraits et de protéines purifiées d'arachide. Utilisées avec les six sérums caractérisés, elles ont permis de définir la dilution du sérum à 1/5 et son incubation d'une durée de 1h30 lors des tests. De nombreux sérums et de nombreuses données statistiques sont encore à acquérir de façon à pouvoir valider ce nouvel outil comme un outil diagnostic pertinent.

Mots clé : allergie alimentaire, protéines végétales, biopuces, diagnostic, arachide.

Immunological characterization of different plants' allergens responsible for food allergy and design of a macroarray as a diagnosis test for food allergy.

Food allergy triggers many restrictions in allergic patients' life. A new and more accurate diagnostic test has to be elaborated since the currently available tests are not accurate enough to determine precisely the allergic profile of a patient. A couple of research teams decided to share their knowledge to elaborate a macroarray as a diagnostic tool. This tool enables to test 120 different foods in one trial. In 6 months, 17 extracts of different cereals, spices, legumes and nuts have been produced and characterized by SDS-PAGE.. Six sera from peanut allergic patient have been characterized with immunoblotting (western-blot). Moreover some experimental conditions concerning the macroarray tests have been determined thanks to a "biopuce" designed with peanut extract and 3 purified peanut allergens. The tests were carried out with the previous characterized sera and the best conditions were: dilution of the serum 1/5 and its incubation time 1h30. However a lot of new data have to be acquired before being able to statistically assert the validity of this new "biopuce" as a diagnostic tool.