

<b>Abréviations .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>1. L'allergie.....</b>	<b>3</b>
1.1 Epidémiologie.....	4
1.2 Bases moléculaires de l'allergie .....	5
1.2.1 Facteurs de risque .....	5
1.2.2 Mécanismes moléculaires .....	6
<b>2. L'allergie aux acariens .....</b>	<b>8</b>
2.1 L'acarien <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> .....	8
2.2 Les groupes d'allergènes .....	10
2.3 Les protéases allergéniques .....	12
2.3.1 Groupe 1 .....	12
2.3.1.1 Prévalence .....	13
2.3.1.2 Localisation et fonction .....	13
2.3.1.3 Activité et spécificité .....	13
2.3.1.4 Expression recombinante .....	14
2.3.1.5 Mécanisme d'activation .....	15
2.3.2 Groupe 3 .....	17
2.3.2.1 Prévalence .....	18
2.3.2.2 Localisation et fonction .....	19
2.3.2.3 Activité et spécificité .....	20
2.3.3 Groupe 6.....	21
2.3.4. Groupe 9.....	22
2.3.5 Incidence de l'activité protéolytique sur l'allergie .....	22
2.4 Allergènes recombinants .....	24
<b>3. Les protéases à sérine active de la famille de la trypsine .....</b>	<b>25</b>
3.1 Introduction générale .....	25
3.2 Mécanisme catalytique et spécificité .....	26
3.3 Modes de régulation de l'activité enzymatique .....	28
3.3.1 Introduction générale – le propeptide .....	28
3.3.2 Autres fonctions du propeptide.....	29
3.4 Mécanismes d'activation du trypsinogène - digestion .....	30
3.4.1 Activation inter-moléculaire.....	30
3.4.2 Activation intra-moléculaire.....	31
3.4.3 Mécanisme moléculaire de l'activation du trypsinogène.....	32
3.5 Mécanisme d'activation du zymogène proDer p 3 .....	33

## Abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AMC</b>	7-amino-4-méthyl coumarine
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>BAPNA</b>	N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide
<b><i>B. tropicalis</i> (Blo t)</b>	<i>Blomia tropicalis</i>
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butoxy-carbonylamide
<b>BPTI</b>	Bovine pancreatic trypsin inhibitor
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>DC</b>	Cellules dendritiques (Dendritic cells)
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing non-Integrin
<b><i>D. farinae</i> (Df, Der f)</b>	<i>Dermatophagoides farinae</i>
<b><i>D. pteronyssinus</i> (Dp, Der p)</b>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b><i>E. maynei</i> (Eur m)</b>	<i>Euroglyphus maynei</i>
<b>ESI-QTOF</b>	Electrospray ionisation-Quadrupole time of flight
<b>Fc<math>\epsilon</math>RI</b>	Fc epsilon Receptor 1 alpha
<b>FRET</b>	Förster Resonance Energy Transfert
<b>Gal<math>\beta</math>1,3GlcNAc</b>	Galactosyl $\beta$ 1,3 N Acétylglucosamine
<b>Gal<math>\beta</math>1,4GlcNAc</b>	Galactosyl $\beta$ 1,4 N Acétylglucosamine
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
<b>GST</b>	Glutathion-S-transférase
<b>ICAM-3</b>	Intercellular adhesion molecule 3
<b>IgE</b>	Immunoglobulines de type E
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IUIS</b>	International Union of Immunological Societies
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>Man<math>\alpha</math>1,2Man</b>	Mannose $\alpha$ 1,2 Mannose
<b>Man<math>\alpha</math>1,3Man</b>	Mannose $\alpha$ 1,3 Mannose
<b>Man<math>\alpha</math>1,6Man</b>	Mannose $\alpha$ 1,6 Mannose
<b>MHC II</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
<b>NeuAc<math>\alpha</math>2,6Gal</b>	Acide neuraminique $\alpha$ 2,6 Galactose

<b>PAR-2</b>	Protease activated receptor 2
<b>pI</b>	Point isoélectrique
<b>PMSF</b>	Phenylmethanesulfonylfluoride
<b>PRM</b>	Proline rich motif
<b>pNA</b>	p-nitroanilide
<b>RAST</b>	Radio AllergoSorbent Test
<b>SBTI</b>	Soybean trypsin inhibitor
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SP-A/D</b>	Surfactant protein A/D
<b>TCR</b>	Récepteur des lymphocytes T
<b>T<sub>H</sub>1</b>	Lymphocytes T Helper de type 1
<b>T<sub>H</sub>2</b>	Lymphocytes T Helper de type 2
<b>WAO</b>	World Allergy Organization
<b>WHO</b>	World Health Organization

## Introduction

### 1. L'allergie



**Figure 1 – Clemens Peter Freiherr von Pirquet (1874-1929)**

(<http://en.wikipedia.org>)

Le terme « allergie » a été employé pour la première fois en 1906 par Clemens von Pirquet (**Figure 1**), pédiatre autrichien, qui l'a décrit suite à l'observation de deux phénomènes contradictoires rencontrés chez les patients en réponse à l'injection de vaccin destiné à combattre la variole. Ces patients développaient en effet, soit une protection (immunisation), soit une hypersensibilité caractérisée par de la fièvre, un rash épidermique et un gonflement des ganglions lymphatiques. Dans les deux cas, en comparaison aux patients qui n'avaient pas reçu le vaccin, un agent externe avait induit un changement dans la réactivité de ces patients. Il dénomma ce changement par le terme « Allergy » pour *allos* (autre) et *ergon* (travail). Il proposa également le terme « allergen » (allergène) pour décrire l'agent responsable de ce changement de réaction induit chez le patient. Plus tard, le terme allergie a été employé pour décrire uniquement le phénomène d'hypersensibilité mis à jour par C. von Pirquet (Kay 2006). Dans ce travail, le terme allergie sera utilisé pour décrire une réaction d'hypersensibilité de type I, c'est-à-dire une réaction immunitaire médiée par les immunoglobulines de type E (IgE) (Coombs and Gell 1975).

## 1.1 Epidémiologie

L'allergie est une pathologie très répandue qui, selon l'organisation mondiale de l'allergie (WAO), touche 20 à 30 % de la population mondiale (Potter *et al.* 2009). Cette réaction d'hypersensibilité est induite chez l'homme suite à l'inhalation (poussières de maison, pollen, poils), l'ingestion (nourriture) ou l'injection (médicaments, venin) d'allergènes. Ces réactions immunitaires ont notamment pour conséquences la rhinite allergique, la dermatite atopique (eczéma), l'asthme atopique ainsi que les allergies alimentaires.

En 2007, une étude basée sur les données provenant de l'ECHRS I (European Community Respiratory Survey 1) a mis en évidence la variation géographique de la sensibilité à différents allergènes environnementaux. Sur 15000 adultes (20-44 ans) provenant de 15 pays industrialisés différents soumis à des tests allergiques cutanés au moyen de 9 aéroallergènes, 37 % présentaient une réponse positive à au moins un de ces allergènes (**Table 1**). Malgré les différences observées entre les pays, les sensibilités à l'acarien *D. pteronyssinus* (22 %), le pollen de la fléole des prés (17 %) et les poils de chat (9 %) se sont révélées être prédominantes (Bousquet *et al.* 2007).

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

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

## 1.2 Bases moléculaires de l'allergie

L'allergie est une réaction immunitaire adaptative anormale en réponse à une substance non infectieuse (allergène) qui implique la synthèse d'immunoglobulines E (IgE) spécifiques de l'allergène ainsi que les lymphocytes T helper de type 2 ( $T_H2$ ) qui reconnaissent des antigènes dérivés de cet allergène.

### 1.2.1 Facteurs de risque

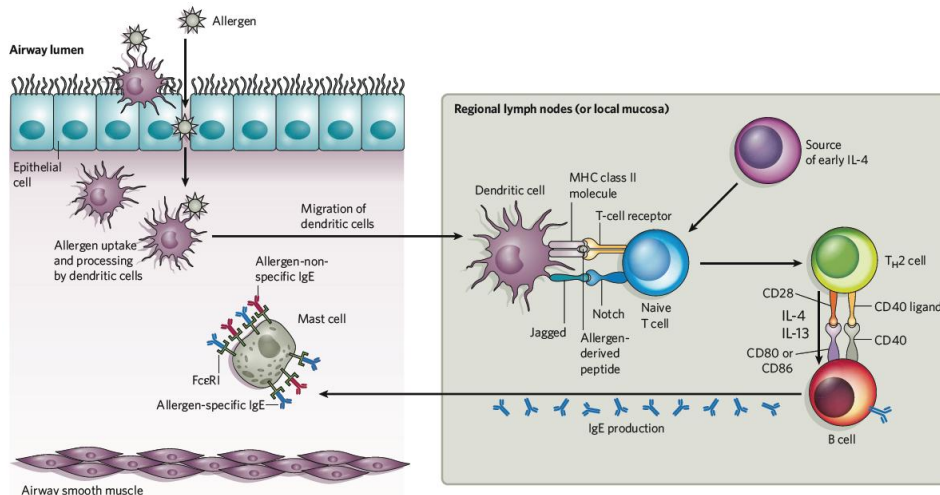
Les études réalisées sur des jumeaux mono ou hétérozygotes ou au sein de familles présentant plusieurs individus allergiques ont mis en évidence une prédisposition génétique au développement de l'allergie que l'on nomme atopie (Feijen *et al.* 2000). Ainsi des variants du gène codant pour une sous-unité du récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI), situé sur le chromosome 11q, ont pu être associés à l'asthme atopique (Cookson *et al.* 1989). De plus, un cluster de gènes polymorphiques codant pour des cytokines dont les interleukines 4 (IL-4) et 13 (IL-13), impliquées respectivement dans la balance  $T_H1/T_H2$  et la production d'IgE par les lymphocytes B, a également été mis en évidence chez les personnes allergiques (Feijen *et al.* 2000). Depuis, plus de 100 gènes ont été associés à un phénotype lié à l'asthme ou à l'allergie (Zhang *et al.* 2008). Ces observations suggèrent que les mécanismes liés à cette pathologie sont complexes et que l'attention devrait être mise sur des ensembles de gènes interagissant les uns avec les autres plutôt que sur des gènes isolés qui n'auraient que peu de répercussion sur le risque que présente le sujet face à la pathologie (Ober and Hoffjan 2006).

L'augmentation très forte de la proportion de personnes allergiques qui a été observée au cours de la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle laisse également la place à une autre hypothèse dans le déclenchement de la pathologie qui est la théorie de l'hygiène (Tse and Horner 2008). Diverses études ont montré que le style de vie (urbain *versus* rural), l'exposition répétée à des allergènes, des microbes ou encore à des polluants influencent le risque de développer l'allergie. Par exemple, des enfants vivant dans des fermes et donc plus exposés aux animaux ou buvant du lait non pasteurisé seraient « protégés », ce qui diminuerait les manifestations allergiques. Cependant les mécanismes par lesquels l'environnement influence les risques de développer de l'allergie demeurent peu connus (Tse and Horner 2008; Holt and van den Biggelaar 2010).

Il existe donc un ensemble de facteurs qui favorisent le déclenchement de la réaction allergique ; le génotype de la personne, l'allergène et sa concentration dans l'environnement,

mais également la voie d'exposition ou encore son association avec des agents qui favorisent le processus de sensibilisation.

### 1.2.2 Mécanismes moléculaires

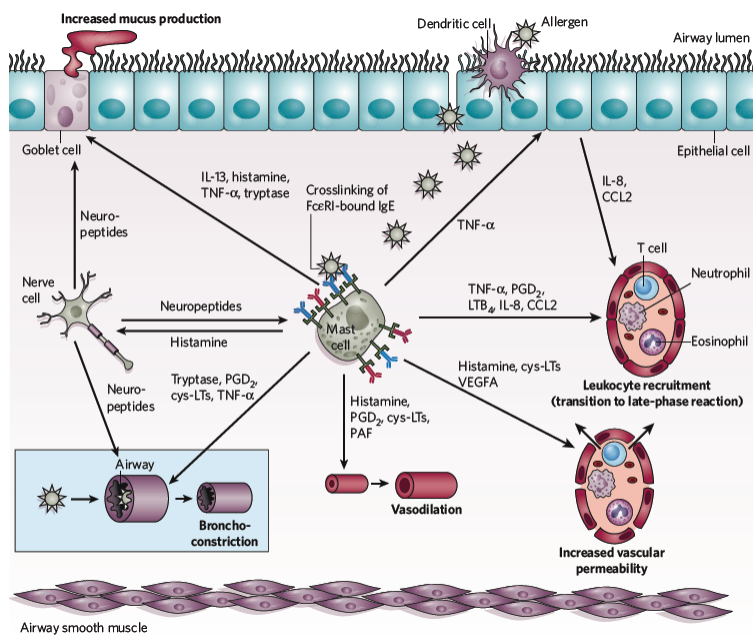


**Figure 2 – Vue simplifiée de la sensibilisation aux aéroallergènes (Galli *et al.* 2008)**

Parmi les différents types d'allergènes existants, les aéroallergènes sont pris en charge par les cellules dendritiques au niveau de l'épithélium respiratoire (ou, dans le cas des protéases, celles-ci pourraient directement traverser cet épithélium). Ces allergènes sont internalisés par ces cellules et hydrolysés par le protéasome en peptides dérivés qui sont présentés dans un complexe majeur d'histocompatibilité de type II (MHC II) aux lymphocytes T naïfs via leur récepteur, TCR, au niveau des ganglions lymphatiques les plus proches (ou au niveau de la muqueuse locale). En présence d'IL-4 (produite par des basophiles, mastocytes, éosinophiles ou des lymphocytes T), ces lymphocytes se différencient en lymphocytes TH2 qui produisent les cytokines IL-4 et IL-13 (**Figure 2**). L'interaction entre le TCR du lymphocyte TH2 et l'allergène, préalablement internalisé et présenté à la surface du lymphocyte B via son MHC II, conduit à l'expression du CD40L à la surface du lymphocyte TH2 qui, elle-même, induit l'expression du CD40 par le lymphocyte B (non montré dans la figure 2) (Pate *et al.* 2010). Il y a alors augmentation de l'expression, par le lymphocyte B, du CD80 qui lie le CD28 du lymphocyte T ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-13 qui peuvent se lier à leurs récepteurs présents à la surface des lymphocytes B. Tous ces événements conduisent au « switch isotypique » des lymphocytes B qui vont produire des IgE (Galli *et al.* 2008). Les IgE sécrétées, sont distribuées dans la circulation sanguine via les vaisseaux lymphatiques et pénètrent dans les

fluides interstitiels locaux où elles se fixent à leur récepteur de haute affinité, le FcεRI, présent à la surface des mastocytes. Ceux-ci sont dits « sensibilisés ».

Lors d'une seconde exposition à l'allergène, la fixation de celui-ci aux IgE qui lui sont spécifiques et qui sont présents à la surface des mastocytes entraîne l'agrégation de plusieurs récepteurs FcεRI et l'induction d'une cascade signalétique cellulaire. Ces cellules vont alors « dégranuler » et sécréter des médiateurs tels que des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance divers qui ont pour conséquences la bronchoconstriction, la vasodilatation ainsi que l'augmentation de la production de mucus et de la perméabilité vasculaire (**Figure 3**). Ce phénomène rapide a lieu dans les secondes à minutes qui suivent l'exposition à l'allergène et est associé à divers symptômes tels que le larmoiement, le sifflement au niveau des bronches, des éternuements ou de la toux.



**Figure 3 – Phases précoces de l'inflammation respiratoire allergique** (Galli *et al.* 2008)

Dans les heures qui suivent l'exposition, l'hyperactivité bronchique est due aux cellules de l'immunité innée (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et adaptative (lymphocytes T) qui ont été recrutées à partir de la circulation sanguine par les médiateurs libérés au cours de la phase précoce. Une exposition répétée aux allergènes conduit à l'installation d'un syndrome inflammatoire chronique avec un sérieux remodelage tissulaire caractéristique de l'asthme (Galli *et al.* 2008).



## 2. L'allergie aux acariens

On estime qu'à l'heure actuelle, plus de 50 % des enfants et adolescents atteints d'asthme sont sensibilisés aux acariens (Gaffin and Phipatanakul 2009). Ces derniers représentent en effet la source prépondérante d'allergènes d'intérieurs dans un grand nombre de pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud mais également aux Etats-Unis, en Nouvelle Zélande et en Australie (Thomas 2010).

En Europe, les espèces prédominantes d'acariens sont *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) et *D. farinae* (Thomas 2010).

### 2.1 L'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus*

Les acariens sont des arthropodes de la classe des arachnides. L'acarien *D. pteronyssinus* (**Figure 4**) ainsi que *D. farinae* font partie de la famille des pyroglyphidae. Ils possèdent une forme globulaire, présentent 4 paires de pattes et une cuticule striée. Leur taille varie entre 0.1 et 1 mm.

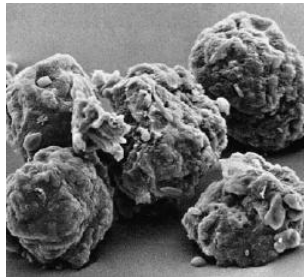


**Figure 4** – Larve de *Dermatophagoides pteronyssinus* (G. San Martin)

Les acariens, ne pouvant pas réguler leur température corporelle, présentent un cycle de vie qui dépend de la température ambiante. Dans les conditions idéales, c'est-à-dire 25-30 °C et 75-80 % d'humidité, un cycle de vie complet, de la forme œuf à l'adulte, prend 3 à 4 semaines. Les adultes vivent 4 à 6 semaines, pendant lesquelles, les femelles peuvent pondre entre 40 et 80 œufs. Les acariens ont développé des mécanismes particuliers pour réguler leur contenu en eau, indispensable à leur colonisation. Par exemple, dans nos matelas et en notre absence, le taux d'humidité diminue fortement. Ainsi, les acariens migrent vers des couches plus profondes, où ils se regroupent afin de perdre un minimum d'eau. De plus, de petites glandes à la base de leur première paire de pattes sécrètent une solution riche en sels qui absorbent l'eau ambiante et qui cristallisent quand le taux d'humidité baisse. L'obstruction de l'entrée des glandes par les cristaux de sel diminue la perte d'eau jusqu'à ce que l'humidité augmente de nouveau.

Cependant, en raison de leur forte dépendance à la température et à l'humidité ambiante, les populations d'acariens des poussières de maison fluctuent au cours de l'année et présentent un pic à la fin de l'été et en automne.

La corrélation entre l'allergénicité de la poussière de maison et son contenu en acarien fut établie en 1967. De plus, il a été observé que le taux d'allergènes augmentait en fonction de la croissance des acariens suggérant que les allergènes étaient excrétés par ceux-ci (Voorhorst *et al.* 1967). En effet, pendant la digestion de leur nourriture (composée de squames de peau, de microorganismes et de lipides), les cellules de l'épithélium du moyen intestin des acariens bourgeonnent, entourent les particules de nourriture et voyagent dans le tube digestif. Les produits de la digestion sont absorbés le long de l'intestin, traversent l'épithélium et arrivent dans l'hémolymphe. Les cellules, quant à elles, se déshydratent, meurent et entourent les particules fécales particulièrement riches en enzymes (**Figure 5**).



**Figure 5 – Particules fécales d'acarien**  
(<http://enhs.umn.edu/current/5100/asthma/allergens.html>)

Ces particules, atteignant des dimensions de 20 à 50  $\mu\text{m}$ , sont excrétées et s'accumulent dans l'habitat de l'acarien (c'est-à-dire nos tapis, nos matelas...) à partir duquel elles sont facilement volatilisées (Colloff 2009). Il a été estimé qu'environ 100 particules fécales contenant chacune 0.2 ng d'allergènes seraient respirées durant une heure d'activité domestique (Platts-Mills and Chapman 1987). Enfin, Ferguson et Broide ont montré que l'exposition des patients à l'acarien *D. pteronyssinus* en concentrations environnementales (contenant 13  $\mu\text{g}$  à 27  $\mu\text{g}$  d'allergène majeur Der p 1 par g de poussière) permet de retrouver Der p 1 au sein des lavages broncho-alvéolaires à une concentration moyenne de 3.4 ng/ml (Ferguson and Broide 1995).

## 2.2 Les groupes d'allergènes

Un allergène est défini comme toute molécule étant capable d'induire chez un patient une réponse d'hypersensibilité de type I médiée par les IgE. Lors des premières études réalisées à ce sujet, les bandes isolées par analyse SDS-PAGE d'extraits d'acariens et sur lesquelles se fixaient les IgE provenant de sera de patients allergiques étaient identifiées comme allergènes. Ceux-ci étaient alors isolés des extraits d'acariens et partiellement caractérisés (Thomas *et al.* 2002).

La nomenclature actuelle, adoptée par la WHO et l'IUIS fut établie en 1994 (King *et al.* 1994). Dans cette nomenclature, les allergènes sont nommés en utilisant les trois premières lettres du genre (Der pour *Dermatophagoides*) suivies de la lettre de l'espèce (p pour *pteronyssinus*) et d'un nombre caractéristique de l'ordre chronologique de purification de l'allergène (Chapman *et al.* 2007). Ainsi, l'allergène Der p 1 est le premier allergène de l'acarien *D. pteronyssinus* ayant été purifié (Chapman and Platts-Mills 1980). Les allergènes des acariens des poussières de maison sont classés en groupes. Chacun d'entre eux contient des protéines présentant des pourcentages d'identité élevés entre elles ainsi que des fonctions biochimiques identiques (si ces dernières sont connues).

Grâce au développement de la biologie moléculaire et du génie génétique, certains allergènes ont pu être clonés et exprimés de manière recombinante après avoir obtenu leur ADN complémentaire transcrit à partir des ARNm trouvés au sein de cultures d'acariens (Thomas 2011). A l'heure actuelle, 20 groupes d'allergènes ont été identifiés chez les espèces *D. pteronyssinus* et *D. farinae* (**Table 2**) (Thomas *et al.* 2002; Hales *et al.* 2006; Weghofer *et al.* 2008; Yong and Jeong 2009) (<http://www.allergome.org>). Les fonctions biochimiques de 15 groupes ont été identifiées. Neuf d'entre eux sont des enzymes.

Groupe	Fonction	MM (kDa)	Espèces	Fixation IgE (%)
1	Protéase à cystéine active	25	Dp, Df	70-90
2	Niemann-Pick C2 homologue	14	Dp, Df	60-90
3	Trypsine	25	Dp, Df	16-100
4	$\alpha$ -amylase	56	Dp	25-46
5	Inconnue	15	Dp	9-70
6	Chymotrypsine	25	Dp, Df	30-40
7	Inconnue	24	Dp, Df	50-62
8	Glutathion-S-transférase	26	Dp	40
9	Protéase à sérine active collagénolytique	29	Dp	>90
10	Tropomyosine	35	Dp, Df	5-80
11	Paramyosine	100	Dp, Df	80
14	Vitellogénine (apolipoporphin-like)	177	Dp, Df	30-70
15	Chitinase	63	Df	70
16	Gelsoline	55	Df	35
17	Protéine fixant le Ca <sup>2+</sup>	30	Df	35
18	Chitinase	60	Df	54
20	Arginine kinase	20	Dp	15-44
21	Inconnue	15	Dp	56
22	Inconnue	15	Dp	?
23	Inconnue	14	Dp	?

**Table 2 – Groupes d’allergènes identifiés chez les espèces *D. pteronyssinus* et *D. farinae*** (Thomas *et al.* 2002; Hales *et al.* 2006; Weghofer *et al.* 2008; Yong and Jeong 2009) (<http://www.allergome.org>)

Ces dernières années, les groupes 1 et 2 ont été mis en évidence comme étant les groupes majeurs. Ils représentent plus de 50 % de la fixation des IgE totaux provenant de sera de patients allergiques (Hales *et al.* 2006; Weghofer *et al.* 2008; Thomas *et al.* 2010). En plus de la reconnaissance des épitopes par les IgE, l’activité de protéase à cystéine active du groupe 1 aurait un rôle important à jouer dans l’initiation ainsi que dans la chronicité de l’allergie (Shakib *et al.* 2008). Des activités protéolytiques sont également retrouvées pour les groupes de sérine active 3, 6 et 9.

## 2.3 Les protéases allergéniques

### 2.3.1 Groupe 1

L'allergène Der p 1 fut purifié en 1980 à partir de cultures de l'acarien *D. pteronyssinus*. Il a été montré que cette protéine majoritaire dans les extraits d'acariens (10-20 %) est glycosylée (Chapman and Platts-Mills 1980). L'analyse de son ADN complémentaire indique que cet allergène est synthétisé chez l'acarien, sous forme d'une préproprotéine constituée d'un peptide signal de 18 acides aminés permettant sa sécrétion, d'un propeptide de 80 acides aminés et d'un domaine protéase de 222 acides aminés (**Figure 6**) (Chua *et al.* 1988). Son haut pourcentage d'identité avec la papaïne (24 %), la cathepsine H (28 %) et la cathepsine B (21 %) ainsi que la conservation des résidus formant le site catalytique dont la triade catalytique impliquant la Cys 34, l'His 170 et l'Asn 190, la classe parmi les protéases à cystéine active de la famille CA1 (Chua *et al.* 1988).

```

1  MKIVLAIASLLLSAVVYARPSSIKTFEEYKKA FNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN
60  GGAINHLS DLSLDEFK N RFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNAC SINGNAPAEIDL RQMRTV
120 TPIRMQGGCGS WAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEY
180 IQHNGVVQESYYRYVAREQSCRREPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVII
240 GIKDLDAFRHYDGR TIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWDGNGYG
300 YFAANIDLMMIEEYPYVVIL

```

**Figure 6 – Séquence de préproDer p 1 (PO8176)** comprenant le peptide signal surligné en noir, le propeptide surligné en gris clair et le domaine protéase. Les deux sites potentiels de N-glycosylation dans le propeptide (N16p) et dans la forme mature (N52) sont soulignés et la triade catalytique (C34-H170-N190) est surlignée en gris foncé.

Deux sites potentiels de N-glycosylation sont présents dans la forme zymogène proDer p 1 constituée du propeptide et du domaine protéase. Une analyse différentielle de la glycosylation du site N52 a été réalisée au moyen de lectines sur Der p 1 naturel. Celui-ci présente des glycosylations de type Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc, NeuAca2,6Gal et Man $\alpha$ 1,2Man, Man $\alpha$ 1,3Man, Man $\alpha$ 1,6Man qui seraient responsables de sa prise en charge par le récepteur mannose des cellules dendritiques (Deslee *et al.* 2002; Royer *et al.* 2010). A l'heure actuelle, aucune information sur la glycosylation du site N16 du zymogène naturel n'est disponible.

### 2.3.1.1 Prévalence

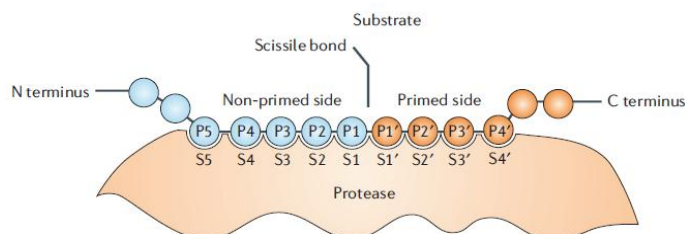
L'allergène Der p 1 est considéré comme un allergène majeur de l'acarien *D. pteronyssinus*. En effet, plus de 80 % des patients allergiques aux acariens présentent des IgE dirigées contre cet allergène (Meyer *et al.* 1994). Des études quantitatives ont également montré qu'approximativement 50 % des IgE totaux sont dirigés contre les groupes 1 et 2 (Hales *et al.* 2006; Weghofer *et al.* 2008). En plus de ses caractéristiques structurales qui en font un allergène majeur, l'activité protéolytique de Der p 1 contribuerait fortement à son allergénicité (point 2.3.5).

### 2.3.1.2 Localisation et fonction

Der p 1 a été localisé au niveau de l'intestin antérieur ainsi qu'au niveau de l'intestin moyen et postérieur au moyen d'un anticorps polyclonal anti-Der p 1. Cette protéase a également été localisée dans la région de l'œsophage et au niveau de l'épithélium de la partie postérieure de l'estomac (Tovey and Baldo 1990; Thomas *et al.* 1991). En 1992, il fut mis en évidence au niveau des particules fécales d'acariens (Rees *et al.* 1992). Sur base de ces observations, il a été postulé que Der p 1 serait une protéase impliquée dans la digestion de l'acarien. Celle-ci serait sécrétée de la paroi de l'intestin antérieur et incorporée ensuite aux particules fécales.

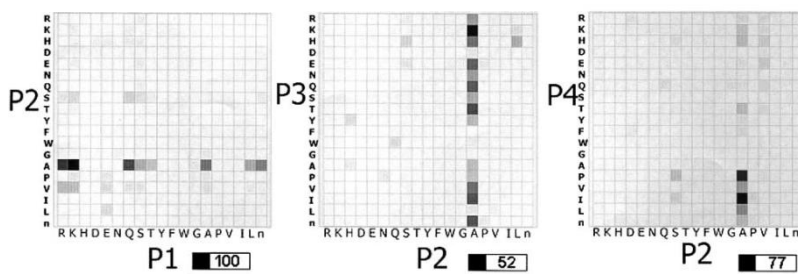
### 2.3.1.3 Activité et spécificité

La spécificité d'une endoprotéase est dictée par les acides aminés en positions S4-S1 et S1'-S3' des poches de spécificité qui fixent les positions P4-P1 et P1'-P3' du substrat entourant la liaison peptidique à cliver (**Figure 7**) (Schechter and Berger 1967).



**Figure 7 – Schéma d'une protéase liée à un substrat.** Les sous-site de la protéase qui se lie à une chaîne latérale d'un résidu du substrat se trouvant du côté N-terminal par rapport au site de clivage sont notés S1-Sn à partir de ce site et ceux se trouvant du côté C-terminal S1'-Sn. Les résidus du substrat sont respectivement notés P1-Pn et P1'-Pn' (Turk 2006).

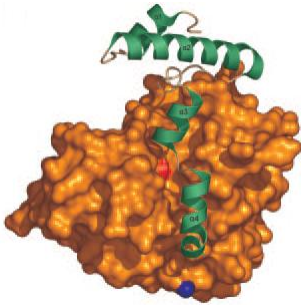
En 1998, Schulz *et al.* étudia le clivage, par Der p 1 naturel, de petits peptides contenant un fluorophore (AMC) à leur extrémité C-terminale (Schulz *et al.* 1998). Cette étude a montré que Der p 1 a une spécificité très restreinte pour ces substrats car seul le tripeptide Boc-Gln-Ala-Arg-AMC est clivé par la protéase. De plus, l'absence de clivage de deux substrats similaires (Boc-Gln-Gly-Arg-AMC et Boc-Gln-Arg-Arg-AMC) met en évidence l'importance du résidu Ala en position P2. En 2004, une analyse combinatoire de la spécificité de Der p 1 fut réalisée au moyen de 4000 térapeptides portant un groupement fluorescent (Harris *et al.* 2004). Cette étude confirma la préférence de Der p 1 pour une alanine en P2. En positions P1 et P3, l'enzyme semble accepter un grand nombre d'acides aminés, avec une préférence respectivement pour un acide aminé basique et un résidu polaire. La position P4 semble plus restrictive avec la nécessité d'un acide aminé aliphatique tel que la valine, la leucine, l'isoleucine ou la proline (**Figure 8**).



**Figure 8 – Analyse combinatoire de la spécificité de l'allergène Der p 1 au moyen d'une librairie de térapeptides fluorescents** (Harris *et al.* 2004). Les positions fixées sont notées en gras. Le chiffre en bas à droite correspond à l'activité maximale mesurée (100 %).

### 2.3.1.4 Expression recombinante

L'allergène Der p 1 a été exprimé de manière recombinante sous sa forme zymogène avec succès et ce, notamment en levure *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (Jacquet *et al.* 2002; Takai *et al.* 2002; van Oort *et al.* 2002). Le zymogène, sécrété par la levure est glycosylé au niveau des sites N16p et N52. La structure tridimensionnelle du double mutant C34AN52Q, au sein duquel la cystéine du site catalytique ainsi que le site de N-glycosylation dans le domaine protéase ont été mutés en alanine, a été résolue en 2005 (**Figure 9**) (Meno *et al.* 2005).



**Figure 9 – Structure tridimensionnelle du zymogène proDer p 1 (1XKG).** Le propeptide est représenté en cartoon et est coloré en vert. Le domaine protéase est représenté en surface et est coloré en orange. La cystéine active (C34) et l'Asn 52 sont colorées respectivement en rouge et en bleu (Meno *et al.* 2005).

L'allergène Der p 1 est caractérisé par la présence de deux domaines délimitant un sillon catalytique à leur interface qui comprend les 3 résidus de la triade C34-H170-N190. Le propeptide de 80 acides aminés est constitué de 4 hélices  $\alpha$  et se loge parfaitement dans le sillon catalytique de la protéase, inhibant ainsi son activité enzymatique. De plus, la faible reconnaissance du zymogène proDer p 1 ainsi que de son homologue proDer f 1 par les IgE provenant de patients allergiques indique que le propeptide masque des épitopes importants de l'allergène (Takai *et al.* 2005).

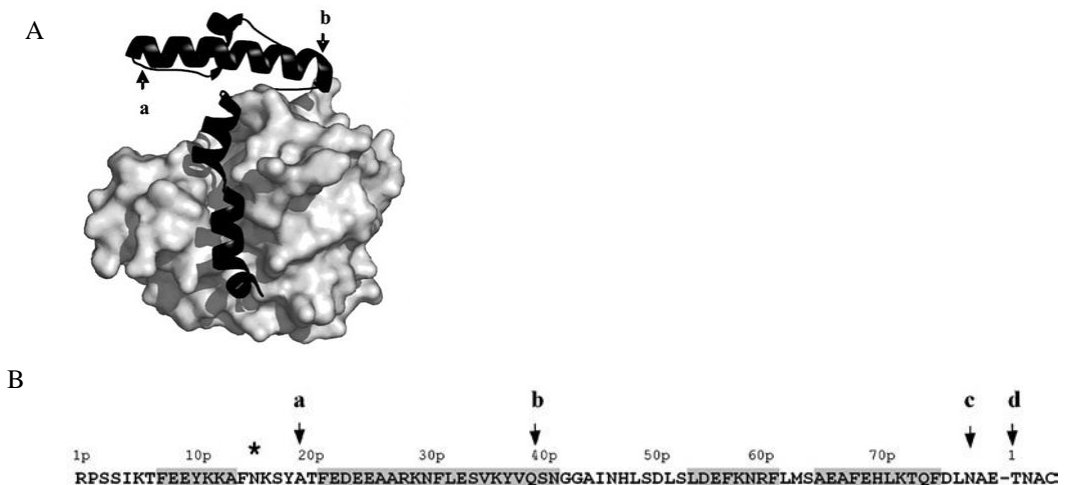
### 2.3.1.5 Mécanisme d'activation

L'obtention d'une forme recombinante et active de Der p 1 a pu être réalisée en incubant le zymogène déglycosylé à pH acide (Takai *et al.* 2002; van Oort *et al.* 2002). Ce mécanisme d'activation de proDer p 1 a été élucidé en 2007 au sein du laboratoire de Macromolécules Biologiques (CIP/ULg) (Chevigne *et al.* 2007). Il a aussi pu être mis en évidence que, lors de l'incubation de proDer p 1 à pH acide, le propeptide se déplie partiellement et perd sa capacité inhibitrice à pH 4. A ce pH, le processus séquentiel d'auto-activation du zymogène proDer p 1 commence (**Figure 10**).

Le premier clivage (**Figure 10B**, a) a lieu au niveau de la boucle reliant les 2 premières hélices du propeptide entre les résidus Tyr19p-Ala20p donnant lieu au premier intermédiaire ATFE-. Ce clivage semble être l'étape limitante de ce mécanisme d'activation et serait régulé à la fois par l'encombrement stérique engendré par la présence de la N-glycosylation sur le résidu N16p qui se trouve 3 résidus en amont du site d'hydrolyse, ainsi que par la déstructuration du propeptide à pH acide (Chevigne *et al.* 2007). L'implication de cette glycosylation dans le ralentissement de la maturation de proDer p 1 en Der p 1 avait été préalablement observée en



comparant les cinétiques d'activation des formes glycosylée et non glycosylée (mutant N16pQ) du zymogène proDer p 1 (Takai *et al.* 2006).



**Figure 10 -Représentation du propeptide de proDer p 1 et localisation des différents sites de clivage identifiés pendant le processus d'activation.** (A) Structure du zymogène proDer p 1 (1XKG). Le propeptide est en noir et le domaine protéase en gris. (B) Séquence du propeptide de proDer p 1. La numérotation du propeptide est notée par la lettre p. La position 1 correspond au premier acide aminé de la forme mature. Les lettres a, b, c et d indiquent les différents sites de clivage identifiés lors de la maturation de proDer p 1 à pH 4. Les hélices  $\alpha$  sont surlignées en gris et le site de N-glycosylation du propeptide (N16p) est indiqué par un astérisque. D'après Chevigné *et al.* 2007.

Le deuxième clivage (**Figure 10B**, b) a lieu entre les résidus Gln40p-Ser41p de l'extrémité C-terminale de la deuxième hélice du propeptide et donne lieu à l'intermédiaire SNGG-. Au terme de ce processus, deux formes de Der p 1 actives qui présentent l'extrémité N-terminale AETNA- (**Figure 10B**, c) ou TNA- (**Figure 10B**, d) ont été observées (Chevigne *et al.* 2007). Cette extension de deux résidus a également été observée dans d'autres études s'intéressant à la maturation de proDer p 1 exprimé de manière recombinante en levure ou en cellules d'insectes ainsi que plus récemment en plantes de tabac (Massaer *et al.* 2001; Takai *et al.* 2002; Burtin *et al.* 2009).

Le processus d'activation de Der p 1 ne semble pas impliquer de changement structural de l'allergène. En effet, la structure de Der p 1 déterminée par cristallographie correspond exactement à la structure tridimensionnelle du domaine protéase du zymogène proDer p 1 (de Halleux *et al.* 2006). De plus, une étude comparative de la stabilité de proDer p 1 et de Der p 1 a montré que le propeptide ne stabilise pas l'allergène et ce quel que soit le pH (Chevigne *et al.* 2010).

### 2.3.2 Groupe 3

En 1992, l'allergène naturel Der p 3 fut purifié à partir de cultures de *D. pteronyssinus* (Stewart *et al.* 1992). L'analyse de son ADN complémentaire indique que Der p 3 est synthétisé sous forme d'une préproprotéine constituée d'un peptide signal de 18 acides aminés permettant sa sécrétion, d'un propeptide de 11 acides aminés et d'un domaine protéase de 232 acides aminés (**Figure 11**) (Smith *et al.* 1994). Dans la suite de ce travail, la numérotation qui sera utilisée pour identifier les acides aminés de l'allergène Der p 3 est celle du zymogène proDer p 3, la position 1 correspondant au premier acide aminé du propeptide (Asn1).

```

1  MIIYNILIVLLLAINTLANPILPASP NATIVGGEKALAGECPYQISLQSSSHFCGGTIL
60  DEYWILTAAHCVAGQTASKLSIRYNSLKHSLGGEKISVAKIFAHEKYDSYQIDNDIALI
120  KLKSPMKLNQKNAKAVGLPAKGS DVKVG DQVRVSGWGYLEEGSYSLPSELRRVDIAVVS
180  RKECNELYSKANA EVTDNMI CGGDVANGGKDSCQGD SGGPVVDVKNNQVVGIVSWG YGC
240  ARKGYPGVYTRVGNFIDWIESKRSQ

```

**Figure 11 - Séquence de préproDer p 3 (ABU50814)** comprenant le peptide signal surligné en noir, le propeptide surligné en gris clair et le domaine protéase. Le site potentiel de N-glycosylation dans le propeptide (N9, numérotation de proDer p 3) ainsi que les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont soulignés et la triade catalytique (H51-D96-S196) est surlignée en gris foncé.

On ne dispose à l'heure actuelle d'aucune donnée structurale de l'allergène Der p 3. Cependant, un alignement de séquences montre que cette protéase à sérine active de la famille de la trypsine contient un domaine protéolytique qui présente un pourcentage d'identité de 47 % avec la trypsine de saumon, 45 % avec la trypsine de bœuf ou du moustique *Anopheles gambiae* et 44 % avec celle d'écrevisse. Les résidus de la triade catalytique (His51-Asp96-Ser196), les 6 cystéines impliquées dans la formation de 3 ponts disulfures (C36-C52, C163-C180 et C192-C218) de même que l'Asp 190 de la poche de spécificité sont conservés (Smith *et al.* 1994). Le propeptide, quant à lui, est tout à fait différent de celui de la trypsine, ce qui suggère un mécanisme d'activation particulier (Smith *et al.* 1994). L'allergène Der p 3 présente peu de polymorphisme. Les ADNc isolés à partir de différents extraits commerciaux ne présentent en effet que des substitutions de 1 ou 2 résidus. Ainsi les résidus en position 109 sont soit un acide aspartique, soit une asparagine. De même, les résidus en position 116 correspondent soit à une alanine, soit à une valine (Smith and Thomas 1996).

L'allergène Der f 3 de l'espèce *D. farinae* est un homologue de Der p 3. Il fut découvert en 1989 et décrit comme étant une protéine de poids moléculaire apparent de 30 kDa et ayant une séquence N-terminale présentant 50 % d'identité avec la trypsine et la chymotrypsine de vertébrés et invertébrés (Heymann *et al.* 1989). Cet allergène fut cloné en 1995. L'analyse de la séquence indique que le zymogène proDer f 3 possède 80 % d'identité avec proDer p 3 (Nishiyama *et al.* 1995). Un autre allergène du groupe 3 provenant de la même famille d'acariens, Eur m 3, de l'espèce *Euroglyphus maynei*, a également été cloné. Il possède 81 % d'identité avec proDer p 3. Le groupe 3 a également été identifié chez d'autres espèces d'acariens provenant de familles différentes. C'est le cas de l'espèce *Blomia tropicalis* (Blo t 3) ainsi que des acariens de stockage tels que *Suidasia medanensis* (Sui m 3), *Lepidoglyphus destructor* (Lep d 3) ou encore *Glycyphagus domesticus* (Gly d 3) qui présentent respectivement 50 %, 62 %, 56 % et 51 % d'identité avec proDer p 3.

A l'heure actuelle, l'allergène Der p 3 n'a pas encore été exprimé de manière recombinante. Par contre, ses homologues Der f 3 et Blo t 3 ont, quant à eux, pu être exprimés en *Escherichia coli*. Le zymogène proDer f 3 en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST) a été produit sous forme de corps d'inclusion et aucune activité enzymatique n'a pu être mesurée. Cependant, la simple mutation de la thréonine C-terminale du propeptide en arginine permet l'activation du zymogène en forme active Der f 3 (Nishiyama *et al.* 1995). Blo t 3 fut également exprimé en fusion avec la GST en *E. coli* et ce, en l'absence de son propeptide. Bien qu'aucune information sur l'activité enzymatique de l'enzyme n'ait été reportée, il semble que ce zymogène ne soit pas correctement replié. En effet, celui-ci est très peu reconnu par les IgE provenant de patients allergiques (Cheong *et al.* 2003).

### 2.3.2.1 Prévalence

A l'heure actuelle, le taux de fixation de Der p 3 aux IgE provenant de patients allergiques reste controversé. En effet, les résultats obtenus jusqu'à présent sur l'allergène naturel divergent fortement en fonction des études réalisées.

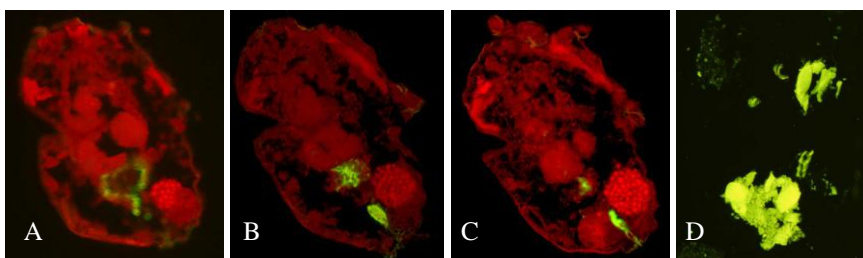
En 1989, des tests radio isotopiques (RAST) ont été effectués au moyen de 51 sera provenant de patients allergiques sur l'allergène Der f 3 isolé des extraits d'acariens par précipitation au sulfate ammonique suivie d'un tamis moléculaire. Cet allergène ne présentait que 16 % de liaison des IgE (Heymann *et al.* 1989). Plus tard, une étude réalisée sur Der f 3 purifié par chromatographie échangeuse d'ions et ensuite concentré au polyéthylène glycol, mit en évidence un taux de fixation des IgE provenant de 23 patients allergiques, par test ELISA, de l'ordre de 70 % (Ando *et al.* 1993). Un taux de fixation des IgE provenant de 56 patients

allergiques fut déterminé à 100 % par RAST au moyen de l'allergène naturel Der p 3 purifié par chromatographie d'affinité de type benzamidine (Stewart *et al.* 1992). Enfin, un taux de fixation intermédiaire de 60 % déterminé par RAST fut observé pour l'allergène naturel Der p 3 purifié par chromatographie échangeuse d'ions suivie d'une étape de purification par affinité (Yasueda *et al.* 1993). Ces études classèrent l'allergène Der p 3 parmi les allergènes majeurs de l'acarien *D. pteronyssinus*. Néanmoins, une étude quantitative réalisée sur des sujets asthmatiques australiens indique que la liaison des IgE à l'allergène naturel Der p 3 ne serait que de 1 % en comparaison de 22 % et 27 % respectivement pour les groupes 1 et 2 recombinants (Hales *et al.* 2006).

Les différences observées dans ces différentes études pourraient provenir des techniques de purification, des méthodes de mesure utilisées, des populations étudiées mais également du manque d'homogénéité des préparations d'allergènes naturels, notamment dû à leur dégradation au sein de ces préparations (Stewart *et al.* 1992; Smith *et al.* 1994). Il serait donc nécessaire de pouvoir réitérer ces études au moyen d'un allergène recombinant stable et homogène. En effet, à ce jour, aucune étude de la prévalence de l'allergène Der p 3 n'a pu être réalisée au moyen de l'allergène recombinant en raison de son indisponibilité. De plus, une source recombinante d'allergènes du groupe 3 serait intéressante afin de poursuivre les recherches sur l'implication de son activité protéolytique dans l'allergie (point 2.3.5).

### 2.3.2.2 Localisation et fonction

Une étude de solubilisation de l'allergène Der p 3 indique que celui-ci est présent en quantités supérieures dans les déjections d'acariens par rapport au reste de la culture. Cette observation suggère que cette protéase aurait une origine intestinale (Stewart *et al.* 1991). Récemment, son homologue Der f 3 a été localisé sur des coupes de *D. farinae* au moyen d'un anticorps monoclonal anti-Der f 3 (**Figure 12**).



**Figure 12 – Immunomarcage de Der f 3 sur des sections longitudinales ainsi que sur des particules fécales de l'acarien *D. farinae* ; (A) Epithélium de l'intestin antérieur, (B) contenu de l'intestin, (C) intestin postérieur et (D) particules fécales. D'après Zhan *et al.* 2010**

Ce marquage a permis de mettre l'allergène en évidence au niveau de l'épithélium de l'intestin antérieur (**Figure 12A**), dans le contenu de l'intestin (**Figure 12B**), dans l'intestin postérieur (**Figure 12C**) ainsi que dans les particules fécales de l'acarien (**Figure 12D**) (Zhan *et al.* 2010). Ceci suggère que, tout comme les allergènes du groupe 1, les protéases du groupe 3 seraient des enzymes digestives sécrétées de la paroi intestinale vers l'intestin au sein duquel elles seraient incorporées aux particules fécales et excrétées.

### 2.3.2.3 Activité et spécificité

Les protéases à sérine active de la famille S1 de la trypsine présentent une très grande spécificité pour le résidu en position P1 du substrat qui est soit une Arg, soit une Lys (Smith *et al.* 1994).

Une activité de protéase de type trypsine a été initialement mesurée dans les extraits de l'acarien *D. pteronyssinus* au moyen du substrat synthétique BAPNA contenant le chromophore p-nitroanilide (pNA) (Stewart *et al.* 1991). La protéine responsable de cette activité, identifiée plus tard comme étant l'allergène Der p 3, présente un pI de 8.5 et est inhibée par les inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine active tels que le PMSF, la benzamidine ou le SBTI (Stewart *et al.* 1992; Stewart *et al.* 1994). En raison des faibles quantités de cet allergène que l'on retrouve dans les extraits d'acariens, sa caractérisation biochimique complète n'a pas pu être réalisée. Cependant, une étude réalisée sur Der f 3 naturel au moyen de substrats tétra ou tri-peptidiques couplés au fluorophore AMC montra que l'allergène présente une préférence pour un résidu Arg en position P1. Le clivage optimal est observé pour le substrat térapeptidique Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC (Ando *et al.* 1993).

### 2.3.3 Groupe 6

En 1993, l'allergène Der p 6 ainsi que son homologue Der f 6 (nommés respectivement DP5 et DF5 à l'époque) furent purifiés à partir de cultures d'acariens (Yasueda *et al.* 1993). Ces protéases furent classées dans la famille des protéases à sérine active de type chymotrypsine en raison de leur spécificité de clivage, déterminée au moyen du substrat térapeptidique Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC et de leur susceptibilité à un inhibiteur spécifique de la chymotrypsine, la chymostatine. Le séquençage de l'ADN complémentaire de l'allergène Der p 6 (EC 3.4.21.-) confirma cette hypothèse (**Figure 13**).

```

1  MKIITTIILIIITVVVDCRFPRILQPKWSYLDSLPASSMMNDNSSPIAGVIGGQDAAEA
60  EAPFQISLMKDYLIKSHMCGGSLISASTVITAACTDGQKASSLSIRYGTNKRTSSKYA
120  DLSIKRIVQHESYDPETIQNDISLLILSQPKVSSNVDFIDIETKDIDGGEKVTIYGWGL
180  TDGNTNNLPDNLQKGSMTIVGNDKCNDKWGSVNTIHPGMICALDATQSGCNGDGGPLVS
240  ADRKLTGIVSWGPSKCPPGEYMSVFTRPQYYSDWIAKNIVQ

```

**Figure 13 - Séquence de préproDer p 6 (EC 3.4.21.-)** comprenant le peptide signal surligné en noir, le propeptide surligné en gris clair et le domaine protéase. Le site potentiel de N-glycosylation dans le propeptide (N26, numérotation de proDer p 6) ainsi que les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont soulignés et la triade catalytique (H78-D124-S217) est surlignée en gris foncé.

Un alignement de séquences avec les chymotrypsines de crevette, d'humain et de bovin indique que la triade catalytique (His78-Asp124-Ser217), les cystéines impliquées dans la formation de 3 ponts disulfures ainsi que la Ser 211 déterminant la spécificité pour les gros résidus hydrophobes en position P1 sont conservées (Bennett and Thomas 1996). De la même façon que la chymotrypsine, l'allergène Der p 6 est synthétisé sous forme d'une préproprotéine constituée d'un peptide signal de 16 acides aminés, d'un propeptide de 32 acides aminés et d'un domaine protéolytique de 231 acides aminés. Cependant, de manière similaire à Der p 3, son propeptide présente une extrémité C-terminale tout à fait inhabituelle pour une chymotrypsine (PIAG-), ce qui suggère un processus de maturation particulier. De plus, de la même façon que les allergènes Der p 1 et Der p 3, le zymogène proDer p 6 présente un site potentiel de N-glycosylation dans le propeptide au niveau de l'Asn 26.

Alors que l'allergène Der p 6 présente 75 % d'identité avec son homologue Der f 6, il ne possède que 37 % d'identité avec l'allergène Der p 3, ce qui pourrait expliquer l'absence de réaction croisée entre les deux groupes (Kawamoto *et al.* 1999). Le taux de fixation des IgE de patients allergiques par l'allergène naturel Der p 6 a été déterminé à 41 % et 65 %, cependant avec une intensité de signal inférieure à celle mesurée pour les allergènes Der p 1 et Der p 3 (Stewart *et al.* 1992; King *et al.* 1996).

### 2.3.4. Groupe 9

```

1  MIILCTPLIILAILNATRNIPLGIVGGSNASPGDAVYQIALQSASHFCGGSILDEYWI
61  LTAACVVDGQTVSKLIRSKVLGEKISVSKIFFAHEKYDSRLLDNDIALIKLKSPRLNSKN
121 ARVLPGSDVVKDGQVQSVWGYLEEGSYSLPPELRRVDIGGASRKECNELYSKVNAEVD
181 NMICGGDVANGGKDSCQGDSGGPLVDVKNQVVGNVSWGYGCERKGYPGVYTRVGNFID
241 WIESKRPQ

```

**Figure 14 - Séquence de préproDer p 9 (AF409110.1)** comprenant le peptide signal surligné en noir, le propeptide surligné en gris clair et le domaine protéase. Les cystéines impliquées dans la formation des 3 ponts disulfures sont soulignées et la triade catalytique (H48-D88-S200) est surlignée en gris foncé.

L'allergène Der p 9 est une protéase à sérine active qui est également synthétisée sous forme d'une préproprotéine constituée d'un peptide signal de 17 acides aminés, suivi d'un court propeptide de 6 acides aminés et d'un domaine protéase de 225 résidus. Malgré la haute conservation de la triade catalytique (His48-Asp88-Ser200), des 6 cystéines impliquées dans la formation de 3 ponts disulfures et de l'Asp 194 caractéristique de la poche de spécificité de la trypsine, l'allergène Der p 9 est classé comme protéase à sérine active de type collagénase en raison de sa capacité à dégrader le collagène (King *et al.* 1996). Son pourcentage d'identité élevé avec la protéase Der p 3 (76 %) expliquerait la réaction croisée observée entre les deux groupes.

### 2.3.5 Incidence de l'activité protéolytique sur l'allergie

Les mécanismes par lesquels les protéines d'acariens induisent une réponse immunitaire de type allergique sont divers et certains facteurs adjuvants ont été identifiés et reportés (Shakib *et al.* 2008; Georas *et al.* 2010; Jacquet 2010). Ainsi, la capacité que les allergènes Der p 2 et Der p 7 auraient de lier des lipides adjuvants présents dans l'environnement, tel que le lipopolysaccharide (LPS), faciliterait le processus de sensibilisation par la voie des Toll-like Récepteurs (TLR) (Trompette *et al.* 2009; Mueller *et al.* 2010).

L'implication de l'activité protéolytique des allergènes des groupes 1, 3, 6 et 9 en tant qu'adjuvant dans le déclenchement et la chronicité de l'allergie aux acariens a également été relatée dans un certain nombre d'études.

La protéase à cystéine active Der p 1 est capable de dégrader totalement les protéines SP-A et SP-D du surfactant pulmonaire qui sont impliquées dans l'inhibition de la liaison des allergènes aux IgE présents à la surface des mastocytes (Deb *et al.* 2007; Shakib *et al.* 2008). De

plus, Der p 1 peut rompre l'équilibre qui est observé au niveau de la muqueuse respiratoire entre les protéases à sérine active et leur inhibiteur, l' $\alpha$ 1-antitrypsine, en hydrolysant ce dernier, ce qui peut conduire à des dommages tissulaires. Tout comme Der p 1, les allergènes des groupes 3, 6 et 9 sont capables de dégrader l'occludine et ZO-1, protéines des jonctions cellulaires épithéliales, favorisant ainsi la pénétration des allergènes au sein de l'organisme (Wan *et al.* 1999; Wan *et al.* 2001). Il a pu être montré au moyen d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques mais également à partir de l'épithélium respiratoire de patients allergiques que ces protéases allergéniques sont également capables d'induire la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que le « Granulocyte macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF), l'IL-6 et l'IL-8 (King *et al.* 1998; Jacquet 2010). Pour les protéases Der p 3 et Der p 9, ce processus serait induit par l'hydrolyse et l'activation spécifique du récepteur PAR-2 (Protease Activated Receptor-2) présent à la surface des cellules épithéliales respiratoires (Sun *et al.* 2001). Le mode d'action de Der p 1 est par contre sujet à controverse et se ferait via une voie indépendante de ce récepteur (Adam *et al.* 2006).

Le clivage de la molécule DC-SIGN, présente à la surface des cellules dendritiques et des macrophages, par l'allergène Der p 1 empêcherait son interaction avec la molécule ICAM-3 présente à la surface des lymphocytes T. Ceci favoriserait la polarisation de la réponse immunitaire en faveur des  $T_H2$  (Furmonaviciene *et al.* 2007). De plus, il a été observé que des cellules dendritiques (DC) incubées avec Der p 1 actif sécrètent moins d'IL-12, cytokine impliquée dans la polarisation des lymphocytes T en  $T_H1$ , que des DC incubées en présence de Der p 1 inactif. Cette observation serait due au clivage du CD40 à la surface des DC par la protéase (Shakib *et al.* 2008).

Enfin, il a été montré que l'allergène naturel Der p 1 est capable d'activer directement le système immunitaire adaptatif et de favoriser ainsi la réponse médiée par les lymphocytes  $T_H2$ . Cette activation est notamment médiée par le clivage du CD23 des lymphocytes B qui est associée à l'augmentation de la production d'IgE ainsi que par l'hydrolyse du CD25 des lymphocytes T associée à la diminution de la production de l'interféron- $\gamma$  (Shakib *et al.* 1998; Gough *et al.* 2003; Kikuchi *et al.* 2006).

Très récemment, la papaïne, protéase à cystéine active appartenant à la même famille que l'allergène Der p 1, a été mise en cause dans le recrutement de basophiles au niveau des ganglions lymphatiques de souris sensibilisées au moyen de papaïne active injectée en sous-cutané. Ces basophiles seraient activés par le clivage d'un récepteur inconnu à ce jour par la protéase. Ils agiraient alors en tant que cellules présentatrices d'antigènes et seraient nécessaires et suffisants pour induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en  $T_H2$  (Sokol *et al.* 2008; Sokol *et al.* 2009; Sokol and Medzhitov 2010). Cependant, une étude réalisée sur un modèle de



souris ayant inhalé des extraits d'acariens, montre que les cellules dendritiques sont nécessaires et suffisantes pour le déclenchement de cette réponse allergique  $T_H2$ -dépendante. Les auteurs suggèrent dès lors que l'initiation de la réponse immunitaire  $T_H2$ -dépendante, dirigée contre les extraits d'acariens, se ferait par la voie des Toll-like récepteurs et des lectines de type-C des cellules dendritiques. Les basophiles contribueraient alors à l'amplification de cette réponse  $T_H2$  (Hammad *et al.* 2010).

## 2.4 Allergènes recombinants

Un grand nombre d'études visant à comprendre les mécanismes moléculaires liés à l'allergie ont été réalisées en utilisant des extraits naturels d'acariens. Cependant, ces extraits sont hétérogènes et il est difficile d'en standardiser la composition (van Ree 2004). De plus, ils contiennent certains facteurs adjuvants de la réponse allergique tels que le LPS, des glucans et peuvent également présenter des allergènes provenant d'autres sources (Ong and Chew 2009; Jacquet 2010). Les allergènes naturels purifiés à partir de ces extraits présentent également un haut risque de contamination par d'autres allergènes. De cette façon, l'allergène Der p 1, isolé à partir de cultures d'acariens, a été décrit comme étant une protéase possédant une double activité enzymatique, de type cystéine et sérine (Hewitt *et al.* 1997). L'obtention de sa forme recombinante confirma uniquement son activité de protéase à cystéine active : la préparation de Der p 1 naturel était contaminée par la présence de la protéase à sérine active, Der p 3 (Takai *et al.* 2005). L'allergène Der p 6 peut également contaminer les préparations de Der p 3 naturel (Stewart *et al.* 1994).

Les allergènes recombinants constituent de bons modèles, reproductibles et homogènes permettant une caractérisation physico-chimique, biologique et immunologique (Thomas 2011). De plus, ils peuvent être obtenus en grandes quantités, ce qui est primordial pour une caractérisation complète des allergènes moins représentés ou soumis à des dégradations tels que l'allergène Der p 3.

Les allergènes recombinants sont également de plus en plus utilisés afin notamment d'établir un diagnostic différentiel des patients allergiques (Pittner *et al.* 2004; Hales *et al.* 2007; Lucas 2010). Enfin, la manipulation génétique des allergènes est également une approche prometteuse utilisée en immunothérapie afin de sensibiliser les patients au moyen d'hypoallergènes au sein desquels les épitopes reconnus par les IgE ont été mutés (Casale and Stokes 2011; Valenta *et al.* 2011).

### 3. Les protéases à sérine active de la famille de la trypsine

#### 3.1 Introduction générale

La protéolyse est un processus indispensable à la vie qui peut intervenir dans la dégradation non spécifique des protéines en acides aminés mais également de manière très spécifique dans le contrôle de processus physiologiques (Page and Di Cera 2008).

Les protéases ont été classées en clans et en familles (Rawlings *et al.* 2008). Un clan contient des protéases qui ont une structure tertiaire similaire ou, si celle-ci n'est pas connue, qui présentent la même succession de résidus catalytiques dans la chaîne polypeptidique ainsi que des motifs conservés entourant ces résidus. Ainsi le clan PA contient des protéases à sérine ou à cystéine active présentant une structure à deux feuillets  $\beta$  telles que la chymotrypsine. Les protéases qui présentent une très haute similarité de séquence ont été regroupées en familles. Celles-ci sont identifiées par une lettre qui correspond au type catalytique suivie d'un numéro. Ainsi la famille S1 du clan PA comprend des protéases à sérine active de structure similaire à la chymotrypsine et comprenant la triade catalytique His-Asp-Ser (Rawlings *et al.* 2008).

Les protéases à sérine active ont été classées en 13 clans et 40 familles. Elles représentent plus d'un tiers des protéases connues à ce jour. Cependant, leur représentativité varie en fonction des organismes. Ainsi, les protéases de la famille S1 du clan PA, les trypsines, ont une distribution limitée chez les plantes et les procaryotes alors qu'elles sont largement représentées chez les animaux. Cette famille correspond, notamment, à 20 % du dégradome humain. Les trypsines sont des endoprotéases impliquées dans différents processus physiologiques extracellulaires dont la digestion, la coagulation ou encore l'immunité au sein desquels elles jouent un rôle essentiel dans l'activation séquentielle de zymogènes en cascade (Page and Di Cera 2008; Di Cera 2009). Ces mécanismes nécessitent l'intervention de protéases qui présentent des spécificités de clivage très diverses allant des protéases digestives qui hydrolysent les liaisons peptidiques suivant des résidus chargés positivement ou hydrophobes à celles qui reconnaissent un site de clivage de 5 résidus ou même une seule protéine spécifique (Hedstrom 2002). En raison de leur implication dans différents processus physiologiques, les protéases de la famille S1 sont également des cibles thérapeutiques pour traiter diverses pathologies dont la pancréatite, ou encore pour diminuer les risques de thrombose (Turk 2006).

Dans ce travail, nous parlerons de la spécificité et du mécanisme d'activation des protéases digestives de type trypsine et chymotrypsine.

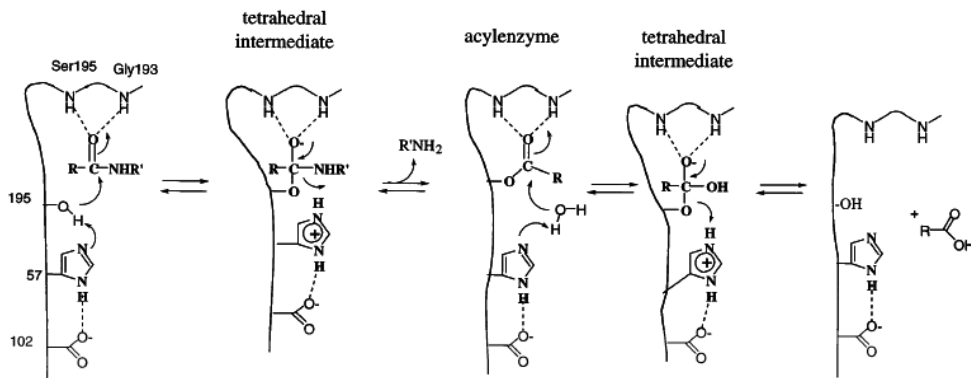
### 3.2 Mécanisme catalytique et spécificité



**Figure 15 – Structure tridimensionnelle de la trypsine bovine (1S0Q) représentée en cartoon.** Les deux domaines à feuillets  $\beta$  portant la S195 et les H57 et D102 sont représentés respectivement en noir et en gris. Les résidus de la triade catalytique H57-D102-S195 sont représentés par des bâtonnets rouges.

Les résidus de la triade catalytique de la trypsine (H57-D102-S185) sont distribués sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique de 223 acides aminés. Cependant, au sein de la structure tertiaire de la protéase, ces résidus sont rassemblés au niveau du sillon catalytique délimité par l'association de deux tonneaux  $\beta$  à 6 brins (**Figure 15**). L'His57 et l'Asp102 appartiennent au tonneau  $\beta$  N-terminal. La Ser195 ainsi que le trou de l'oxyanion (S195, G193) sont portés par le tonneau  $\beta$  C-terminal (Hedstrom 2002; Di Cera 2009).

Le clivage de la liaison peptidique par la trypsine se fait en plusieurs étapes qui sont représentées de façon schématique à la **Figure 16**.



**Figure 16 – Mécanisme catalytique de la trypsine** (la triade catalytique étant notée H57, D102 et S195 et l'oxyanion hole par la S195 et G193) (Hedstrom 2002)

L'atome d'oxygène de la sérine active 195 provoque une attaque nucléophile au niveau du carbone du groupement carbonyle de la liaison peptidique à cliver avec l'aide de l'histidine 57 qui agit en tant que base générale. Il y a formation du premier intermédiaire tétraédrique dont l'oxyanion est stabilisé grâce à deux liaisons hydrogène formées avec les groupements  $\alpha$ -aminés des résidus Gly193 et Ser195. Ce motif constitue le trou de l'oxyanion. L' $\text{His57-H}^+$  est stabilisée par la liaison hydrogène formée avec l'Asp102. Le réarrangement du complexe tétraédrique conduit à l'élimination du premier groupement partant et à la formation d'un acyl-enzyme. Cette réaction est catalysée par l' $\text{His57-H}^+$  qui agit en tant qu'acide général. L'hydrolyse de l'acyl-enzyme se traduit par la formation d'un second intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire évolue vers la régénération de l'enzyme libre et l'expulsion du substrat hydrolysé (Hedstrom 2002; Di Cera 2009).

La trypsine présente une préférence de clivage ( $10^5$  fois) pour les liaisons peptidiques qui suivent un résidu basique. Par contre, la chymotrypsine qui présente la même structure et la même triade catalytique que la trypsine clive les liaisons peptidiques après un résidu aromatique. L'origine moléculaire de cette préférence pour les résidus basiques ou aromatiques en position P1 du substrat, selon la nomenclature de Schechter et Berger (Schechter and Berger 1967), est due en partie à l'architecture de la poche de spécificité primaire (poche S1) de ces protéases. Cette cavité est formée de 3 brins  $\beta$  (résidus 189-192, 214-216, 226-228) et se localise de la même façon que le trou de l'oxyanion (Gly193, Ser195) au niveau du tonneau  $\beta$  C-terminal

(Czapinska and Otlewski 1999). Pour la trypsine, cette poche, connectée au site catalytique, contient en effet un résidu Asp (D189) qui lui permet d'interagir avec les chaînes latérales des résidus basiques en position P1 du substrat. La poche S1 de la chymotrypsine présente une Ser (S189) à cet endroit. Cependant, l'acide aminé présent au fond de la poche S1 ne détermine pas à lui seul la spécificité de la protéase. Ainsi, la simple mutation de l'Asp189 en Ser189 ne suffit pas pour modifier la spécificité de la trypsine vers la chymotrypsine, ce qui indique que d'autres éléments structuraux sont impliqués, tels que des boucles situées en surface de la protéase dont la G226 fait partie (Jelinek *et al.* 2004; Di Cera 2009).

### 3.3 Modes de régulation de l'activité enzymatique

#### 3.3.1 Introduction générale – le propeptide

Les protéases sont indispensables à la vie. Cependant, la protéolyse d'un substrat est irréversible. Leur activité enzymatique doit donc être étroitement contrôlée afin d'éviter toute hydrolyse non spécifique et tout dommage qu'elle pourrait causer aux tissus producteurs. Il existe différents mécanismes de contrôle qui régulent leur activité de façon positive ou négative dont la compartimentation, la synthèse d'inhibiteurs spécifiques, l'inhibition par le substrat et/ou le produit, la régulation de leur expression ou encore leur activation en cascade. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et sont en général utilisés de concert pour contrôler les activités protéolytiques (Lazure 2002).

Un moyen de régulation largement répandu au sein des différentes familles de protéases est leur synthèse sous la forme d'un zymogène inactif constitué d'une séquence N-terminale de longueur variable appelée propeptide ou proséquence suivie du domaine protéolytique. En effet, afin d'éviter toute protéolyse non désirée, la synthèse du propeptide qui doit agir en tant qu'inhibiteur précède celle du domaine catalytique. Ce propeptide peut agir en tant qu'inhibiteur de la protéase soit en obstruant le sillon catalytique dans une orientation non productive, ce qui est le cas des zymogènes de protéases à cystéine active de la famille CA1 (procathepsine, propapaïne) (Wiederanders *et al.* 2003), soit en maintenant le domaine catalytique dans un état partiellement déstructuré et non accessible, ce qui est observé pour les zymogènes de protéases à sérine active de la famille S1 (trypsinogène, chymotrypsinogène) (Brunger *et al.* 1987). En effet, la courte proséquence du trypsinogène joue un rôle primordial dans l'inhibition de la protéase et constitue donc un mécanisme de contrôle de la protéolyse non spécifique.

### 3.3.2 Autres fonctions du propeptide

Le propeptide peut exercer différentes fonctions. Il peut agir en tant que chaperonne intramoléculaire en assistant le repliement des protéases (Eder and Fersht 1995), diriger la localisation cellulaire de celles-ci (Wiederanders *et al.* 2003) ou encore inhiber leur activité protéolytique, comme mentionné plus haut.

L'expression recombinante d'un grand nombre de protéases directement sous forme mature ne conduit pas à l'obtention de protéases actives. Ceci démontre que ces protéases ne sont pas capables d'acquérir seules leur structure tridimensionnelle en conditions natives. Leur propeptide fonctionne alors comme l'élément manquant et leur permet d'acquérir cette structure. Les exemples type de protéases à sérine active dont le propeptide est essentiel au repliement sont la subtilisine de *Bacillus subtilis* (clan SB, famille S8) et l' $\alpha$ -lytic protéase de *Lysobacter enzymogenes* (clan PA, famille S1) dont les propeptides ont une longueur respective de 77 et 166 acides aminés (Eder and Fersht 1995). En absence de leur propeptide, ces protéases sont bloquées dans un état intermédiaire de type molten globule qui est incapable d'acquérir seul leur structure native. Le propeptide interagit avec cet intermédiaire et diminue la barrière énergétique à franchir afin d'obtenir la structure correcte de la protéase (Sauter *et al.* 1998). Il y a ensuite clivage de ce propeptide et production de la forme mature et active de la protéase (Subbian *et al.* 2005).

Les propeptides des protéases à sérine active de la famille S1 de type trypsine sont courts. Ils sont en effet constitués d'approximativement 8-10 résidus et ne seraient dès lors pas impliqués dans le repliement correct des protéases (Lazure 2002). Lors de la résolution de la structure du trypsinogène par cristallographie, une structure de cette courte proséquence n'a pas pu être déterminée très certainement en raison de sa grande flexibilité (Venekei *et al.* 1996). En 1989, Vasquez *et al.* réussirent à exprimer de manière recombinante en *Escherichia coli* la trypsine de rat directement sous sa forme native (Vasquez *et al.* 1989). Récemment, il a été montré qu'après dénaturation de la trypsine de pancréas bovin au moyen de chlorure de guanidinium, entre 95 et 100 % de son activité a pu être récupérée après repliement de la protéase dans des conditions natives en absence de son propeptide (Ohshima *et al.* 2008).

Le propeptide du trypsinogène ne semble pas non plus impliqué dans la localisation cellulaire du zymogène, le peptide signal portant l'information nécessaire à sa sécrétion. Ainsi, il a été mis en évidence que l'introduction de mutations ou de délétions au sein du propeptide ne porte pas à conséquence sur l'adressage de la protéine (Burgess *et al.* 1987).

### 3.4 Mécanismes d'activation du trypsinogène

Une forme partiellement purifiée de la trypsine à partir de pancréas humain fut pour la première fois caractérisée en 1962 (Buck *et al.* 1962). En 1969, Figarella *et al.* purifièrent la forme zymogène de la trypsine pancréatique (Figarella *et al.* 1969). Trois formes distinctes de trypsinogène ont été mises en évidence et ont été appelées respectivement trypsinogène anionique, cationique et mésotrypsinogène en raison de la variabilité de leur point isoélectrique respectivement de 4.4/4.9, 6.4/6.2 et 5.5/5.7 (Chen and Férec 2004). Alors que les formes cationiques et anioniques sont sécrétées dans un rapport 2 :1, la forme méso est très faiblement représentée.

#### 3.4.1 Activation inter-moléculaire

```

1  MNLLLLILTFVAAAVAAPFDDDDKIVGGICEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSLISEQWVV
60  SAGHCYKSRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINAAKIIRHPKYNSRTLDNILLIKLSSPAV
120  INSRVSAISLPTAPPAAGTESLISGWGNTLSSGADYPDELQCLDAPVLSQAECEASYPG
180  KITNNMFCVGFLEGGKDSCQGDSGGPVVSNGELQGIVSWGYGCAQKNRPGVYTKVYNYV
240  DWIKDTIAANS

```

**Figure 17 – Séquence du prétrypsinogène anionique humain (P07478).** Le peptide signal est surligné en noir et le propeptide est surligné en gris clair. Les cystéines impliquées dans la formation des 4 ponts disulfures ainsi que la boucle liant le calcium sont soulignées et la triade catalytique (H57-D102-S195) est surlignée en gris foncé.

La trypsine est synthétisée sous forme de prétrypsinogène (**Figure 17**) au niveau du réticulum endoplasmique des cellules acinaires du pancréas où a lieu le clivage de son peptide signal. Lors de la digestion, le trypsinogène est sécrété dans le conduit pancréatique et finalement déchargé dans la lumière duodénale où il est activé en trypsine mature par l'entérokinase duodénale (Chen and Férec 2004; Keller and Layer 2005). Cette protéase transmembranaire est constituée de deux domaines. Le domaine C-terminal correspond à une protéase à sérine active de la famille S1 et est orienté vers le milieu extracellulaire alors que le domaine N-terminal transmembranaire lui permet son ancrage à la paroi duodénale (Antalis *et al.* 2010). Une fois activée, la trypsine va à son tour activer d'autres zymogènes tels que le chymotrypsinogène ou la proélastase.

Chez les oiseaux, les amphibiens, les poissons et les mammifères, le propeptide du trypsinogène est caractérisé par la présence d'un motif particulier comprenant 3 ou 4 résidus Asp qui précèdent la Lys C-terminale, le motif (D)DDDK. Ce court motif aurait été sélectionné au cours de l'évolution principalement afin d'éviter tout processus d'auto-activation non contrôlé du trypsinogène. Par l'utilisation de peptides synthétiques ou de formes du trypsinogène bovin

mutées au niveau du propeptide, différentes études ont mis en également en évidence l'importance des résidus Asp dans la cinétique d'activation du trypsinogène par l'entérokinase (Chen *et al.* 2003; Nemoda and Sahin-Toth 2005). Cependant, la spécificité de cette protéase pour les résidus Asp précédant la Lys C-terminale ne serait pas vérifiée chez l'homme pour lequel la mutation des 4 Asp en Ala n'affecte pas la cinétique d'activation du trypsinogène (Nemoda and Sahin-Toth 2005). Les propeptides du trypsinogène de bactéries, de champignons et de la lamproie, quant à eux, ne présentent pas de résidus Asp. De plus, leurs proséquences se terminent respectivement par une proline, une asparagine et une histidine, indiquant que ces zymogènes doivent être activés par une autre protéase que la trypsine ou l'entérokinase (Chen *et al.* 2003).

En 1959, Greenbaum *et al.* montrèrent *in vitro* que la cathepsine B, protéase à cystéine active lysosomale qui a une préférence pour les résidus Arg ou Lys en P1, est capable d'activer le trypsinogène en trypsine (Greenbaum *et al.* 1959). Par la suite, le lien entre l'activation prématurée de ce zymogène par la cathepsine B au niveau des cellules acinaires pancréatiques et la pancréatite aiguë fut établi. En effet, durant la première phase de la pathologie, une redistribution de la cathepsine B a été mise en évidence et ce, notamment au niveau des organelles sécrétoires contenant le trypsinogène. De plus, dans un modèle de pancréatite aiguë, des souris déficientes en cathepsine B présentent un faible taux d'activité trypsine au sein de leur pancréas qui contient dès lors moins de cellules nécrotiques (Halangk *et al.* 2000).

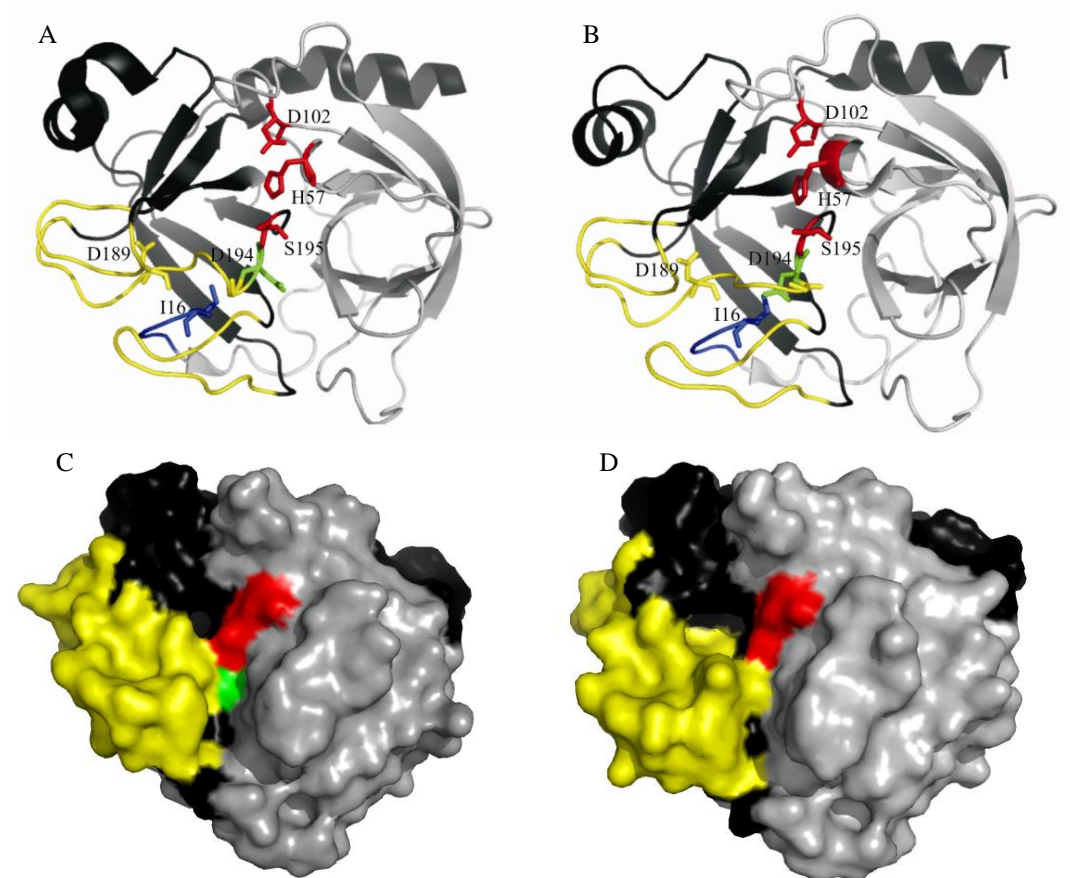
### 3.4.2 Activation intra-moléculaire

Le propeptide du trypsinogène a évolué de façon à éviter tout processus d'auto-activation par la conservation de 3 à 4 résidus Asp précédant le site de clivage. Cependant, cette auto-activation a été observée et décrite dans des conditions particulières (Chen *et al.* 2003). La trypsine est en effet capable de cliver un peptide synthétique correspondant à son propeptide. Alors que ce clivage dépend de la présence d'ions calcium, le remplacement des résidus Asp en Ala suffit à augmenter fortement l'efficacité de la trypsine et ce en absence d'ions calcium (Delaage *et al.* 1967). Cet ion serait dès lors impliqué dans la neutralisation des charges négatives des Asp du propeptide facilitant ainsi l'auto-activation du trypsinogène. La dépendance de l'auto-activation du trypsinogène bovin et du trypsinogène anionique humain au calcium fut ensuite démontrée au moyen des zymogènes naturels (Kay and Kassell 1971; Brodrick *et al.* 1978). Bien que les formes cationique (PRSS1) et anionique (PRSS2) du trypsinogène humain présentent 90 % d'identité, la dépendance de l'auto-activation de PRSS1 aux ions calcium n'a pas pu être confirmée sur sa forme recombinante (Kukor *et al.* 2003).



### 3.4.3 Mécanisme moléculaire de l'activation du trypsinogène

Alors que le site actif du trypsinogène ne soit pas totalement formé, le zymogène présente une activité enzymatique mesurable. Celle-ci est approximativement  $10^3$ - $10^4$  fois inférieure à celle de la trypsine (Stroud *et al.* 1977). Les structures du trypsinogène et de la trypsine sont à 85 % identiques (**Figure 18**), les 15 % restant, non structurés dans le trypsinogène, ont été dénommés le domaine d'activation.



**Figure 18 – Structures tridimensionnelles du trypsinogène bovin (1TGB) et de la trypsine bovine (1S0Q) représentées en cartoon (A et B) ou en surface (C et D).** Les deux domaines à feuillet  $\beta$  portant la S195 et les H57 et D102 sont représentés respectivement en noir et en gris. Les résidus de la triade catalytique H57-D102-S195 sont représentés par des bâtonnets rouges. Les 3 segments de boucles (142-152, 184-193 et 216-223) ainsi que la séquence N-terminale impliqués dans le domaine d'activation sont respectivement en jaune et en bleu. L'Asp189 de la poche de spécificité est représenté sous forme de bâtonnets jaunes. L'Asp194 en interaction avec l'Ile 16 sont respectivement représentés sous forme de bâtonnets verts et bleus.

Lors de l'activation du zymogène en trypsine, la poche de spécificité S1 ainsi que le trou de l'oxyanion acquièrent leur structure. Le domaine d'activation, alors ordonné, est constitué de 3 segments de boucles (résidus 142-152, 184-193 et 216-223) et de la séquence N-terminale I16-V17-G18. En effet, la nouvelle extrémité N-terminale de l'Ile16 libérée et chargée permet au résidu de s'insérer dans la poche hydrophobe formée par les boucles du domaine d'activation et d'être stabilisé par un pont salin formé avec l'Asp 194. La liaison entre l'Ile16 et l'Asp194 est indispensable afin que la transition trypsinogène-trypsine puisse avoir lieu. Ainsi la délétion de l'Ile16 engendre un variant de la trypsine présentant une activité enzymatique 10000 fois inférieure à celle de la trypsine sauvage (Brunger *et al.* 1987; Hedstrom *et al.* 1996; Pasternak *et al.* 1998; Huntington 2009).

L'inhibiteur de la trypsine provenant du pancréas de bovin (BPTI) est capable de lier le trypsinogène et d'induire cette transition. Le zymogène acquiert alors la conformation de la trypsine à l'exception de l'extrémité N-terminale qui reste désordonnée. Ceci suggère que le trypsinogène peut exister sous deux conformations, une active et une inactive avec un équilibre en faveur de la conformation inactive (Hedstrom *et al.* 1996).

### 3.5 Mécanisme d'activation du zymogène proDer p 3

Bien que la protéase à sérine active Der p 3 possède 45 % d'identité avec la trypsine bovine ainsi qu'avec cette même protéase issue d'autres espèces (Smith *et al.* 1994), le propeptide de son zymogène présente quelques caractéristiques totalement inhabituelles pour une protéase de la famille de la trypsine (**Figure 19**).

proDer p 3	NH <sub>2</sub> -NPILPASP NAT
trypsine bovine	NH <sub>2</sub> -APFDDDDK

**Figure 19 – Alignement de séquences des propeptides de proDer p 3 et de la trypsine bovine**

Premièrement, le propeptide de proDer p 3 ne présente pas le motif DDDDK, site de reconnaissance et de clivage du trypsinogène par l'entérokinase, ce qui suggère un mécanisme d'activation particulier. De plus, le résidu carboxy-terminal du propeptide est une thréonine et non une lysine ou une arginine, habituellement retrouvées et permettant l'auto-activation du trypsinogène. L'absence de résidu basique à l'extrémité C-terminale du propeptide indique que le zymogène proDer p 3 serait activé de manière inter-moléculaire par une autre protéase présente chez l'acarien (Smith *et al.* 1994).

Deuxièmement, de manière similaire à Der p 1, le propeptide de proDer p 3 présente un site potentiel de N-glycosylation au niveau de l'Asn 9 (-N<sub>9</sub>AT-), située 3 résidus en amont du site

d'activation. Le zymogène de l'allergène et protéase à cystéine active Der p 1 possède également un site de N-glycosylation au niveau de son propeptide. Il a été montré que cette glycosylation, située 4 résidus en amont du site de clivage permettant l'obtention du premier intermédiaire, est impliquée dans le ralentissement de la cinétique d'autoactivation de proDer p 1 (Takai *et al.* 2006; Chevigne *et al.* 2007).

Enfin, le propeptide de proDer p 3 présente un motif particulier constitué d'une succession de prolines présentes à intervalles réguliers (NP<sub>2</sub>ILP<sub>5</sub>ASP<sub>8</sub>NAT). Des prolines sont souvent retrouvées à l'extrémité N-terminale des protéines. La contrainte structurale engendrée par ces résidus protègent ainsi les protéines contre des dégradations non spécifiques (Vanhoof *et al.* 1995). Cependant, on retrouve également régulièrement des résidus prolines en amont des sites de clivage qui sont reconnus par une protéase spécifique. C'est le cas notamment des protéases de la famille de la trypsine tels que les facteurs de la coagulation ou la trypsine (Vanhoof *et al.* 1995).

Les motifs contenant plusieurs prolines (PRM) adoptent une conformation particulière en hélice gauche (PPII) dont un tour est constitué de 3 résidus (Ball *et al.* 2005). Ce type d'hélices, fréquent chez les protéines globulaires, est en général situé en surface de la protéine (Adzhubei and Sternberg 1993) et souvent impliqué dans des interactions protéine-protéine. Leur rigidité et stabilité structurales sont en effet souvent exploitées comme site de liaison et d'autre part les chaînes latérales des résidus impliqués dans ces hélices PPII sont exposées au solvant et donc accessibles (Rath *et al.* 2005). Ces motifs sont conservés dans les cascades d'activation signalétique cellulaire où ils interagissent avec des résidus aromatiques de domaines particuliers présents à la surface d'autres protéines tels que les domaines SH3 (Src Homology 3) (Williamson 1994; Cubellis *et al.* 2005). Par la construction d'une protéine chimérique portant un domaine SH3 et son ligand, il a été montré qu'un PRM peut se lier de façon intra-moléculaire et stabiliser ainsi la protéine qui le porte (Gmeiner *et al.* 2001).

Ces motifs sont impliqués dans la résistance à la dégradation, dans la stabilité ainsi que dans les interactions protéine-protéine mais également dans le clivage spécifique par des protéases. Il est donc intéressant d'étudier le rôle de ce PRM constituant le propeptide de proDer p 3 que ce soit dans l'obtention d'une protéine correctement repliée, dans son mécanisme d'activation ainsi que dans l'inhibition de la protéase Der p 3.

- Adam, E., K. K. Hansen, et al. (2006). "The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism." J Biol Chem **281**(11): 6910-6923.
- Adzhubei, A. A. and M. J. Sternberg (1993). "Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins." J Mol Biol **229**(2): 472-493.
- Ando, T., R. Homma, et al. (1993). "Trypsin-like protease of mites: purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides farinae*. Relationship between trypsin-like protease and Der f III." Clin Exp Allergy **23**(9): 777-784.
- Antalis, T. M., M. S. Buzza, et al. (2010). "The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment." Biochem J **428**(3): 325-346.
- Ball, L. J., R. Kuhne, et al. (2005). "Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains." Angew Chem Int Ed Engl **44**(19): 2852-2869.
- Bennett, B. J. and W. R. Thomas (1996). "Cloning and sequencing of the group 6 allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*." Clin Exp Allergy **26**(10): 1150-1154.
- Bousquet, P. J., S. Chinn, et al. (2007). "Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I." Allergy **62**(3): 301-309.
- Brodrick, J. W., C. Largman, et al. (1978). "Human cationic trypsinogen. Purification, characterization, and characteristics of autoactivation." J Biol Chem **253**(8): 2732-2736.
- Brunger, A. T., R. Huber, et al. (1987). "Trypsinogen-trypsin transition: a molecular dynamics study of induced conformational change in the activation domain." Biochemistry **26**(16): 5153-5162.
- Buck, F. F., M. Bier, et al. (1962). "Some properties of human trypsin." Arch. Biochem. Biophys. **98**: 528-530.
- Burgess, T. L., C. S. Craik, et al. (1987). "In vitro mutagenesis of trypsinogen: role of the amino terminus in intracellular protein targeting to secretory granules." J Cell Biol **105**(2): 659-668.
- Burtin, D., H. Chabre, et al. (2009). "Production of native and modified recombinant Der p 1 molecules in tobacco plants." Clin Exp Allergy **39**(5): 760-770.
- Casale, T. B. and J. R. Stokes (2011). "Future forms of immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **127**(1): 8-15; quiz 16-17.

- Chapman, M. D. and T. A. Platts-Mills (1980). "Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1." J Immunol **125**(2): 587-592.
- Chapman, M. D., A. Pomes, et al. (2007). "Nomenclature and structural biology of allergens." J Allergy Clin Immunol **119**(2): 414-420.
- Chen, J. M. and C. Férec (2004). Human trypsin. Handbook of Proteolytic Enzymes, 2<sup>nd</sup> Edn. E. Ltd.
- Chen, J. M., Z. Kukor, et al. (2003). "Evolution of trypsinogen activation peptides." Mol Biol Evol **20**(11): 1767-1777.
- Cheong, N., L. Yang, et al. (2003). "Cloning of a group 3 allergen from *Blomia tropicalis* mites." Allergy **58**(4): 352-356.
- Chevigne, A., R. Barumandzadeh, et al. (2007). "Relationship between propeptide pH unfolding and inhibitory ability during ProDer p 1 activation mechanism." J Mol Biol **374**(1): 170-185.
- Chevigne, A., M. E. Dumez, et al. (2010). "Comparative study of mature and zymogen mite cysteine protease stability and pH unfolding." Biochim Biophys Acta **1800**(9): 937-945.
- Chua, K. Y., G. A. Stewart, et al. (1988). "Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases." J Exp Med **167**(1): 175-182.
- Colloff, M. J. (2009). Dust mites, CSIRO publishing.
- Cookson, W. O., P. A. Sharp, et al. (1989). "Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q." Lancet **1**(8650): 1292-1295.
- Coombs, R. and P. G. Gell (1975). Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. Clinical aspects of Immunology. R. R. C. a. P. J. L. P. Gell. Oxford, UK: Blackwell Scientific: 761.
- Cubellis, M. V., F. Caillez, et al. (2005). "Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions." Proteins **58**(4): 880-892.
- Czapinska, H. and J. Otlewski (1999). "Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases." Eur J Biochem **260**(3): 571-595.
- de Halleux, S., E. Stura, et al. (2006). "Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen." J Allergy Clin Immunol **117**(3): 571-576.
- Deb, R., F. Shakib, et al. (2007). "Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D." J Biol Chem **282**(51): 36808-36819.

- Delaage, M., P. Desnuelle, et al. (1967). "On the activation of trypsinogen. A study of peptide models related to the N-terminal sequence of the zymogen." Biochem Biophys Res Commun **29**(2): 235-240.
- Deslee, G., A. S. Charbonnier, et al. (2002). "Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells." J Allergy Clin Immunol **110**(5): 763-770.
- Di Cera, E. (2009). "Serine proteases." IUBMB Life **61**(5): 510-515.
- Eder, J. and A. R. Fersht (1995). "Pro-sequence-assisted protein folding." Mol Microbiol **16**(4): 609-614.
- Feijen, M., J. Gerritsen, et al. (2000). "Genetics of allergic disease." Br Med Bull **56**(4): 894-907.
- Ferguson, P. and D. H. Broide (1995). "Environmental and bronchoalveolar lavage Dermatophagoides pteronyssinus antigen levels in atopic asthmatics." Am J Respir Crit Care Med **151**(1): 71-74.
- Figarella, C., F. Clemente, et al. (1969). "On zymogens of human pancreatic juice." FEBS Lett **3**(5): 351-353.
- Furmonaviciene, R., A. M. Ghaemmaghami, et al. (2007). "The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR: experimental analysis of in silico substrate identification and implications in allergic responses." Clin Exp Allergy **37**(2): 231-242.
- Gaffin, J. M. and W. Phipatanakul (2009). "The role of indoor allergens in the development of asthma." Curr Opin Allergy Clin Immunol **9**(2): 128-135.
- Galli, S. J., M. Tsai, et al. (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**(7203): 445-454.
- Georas, S. N., F. Rezaee, et al. (2010). "Dangerous allergens: why some allergens are bad actors." Curr Allergy Asthma Rep **10**(2): 92-98.
- Gmeiner, W. H., I. Xu, et al. (2001). "Intramolecular binding of a proximal PPII helix to an SH3 domain in the fusion protein SH3Hck : PPIIhGAP." Cell Biochem Biophys **35**(2): 115-126.
- Gough, L., E. Campbell, et al. (2003). "Proteolytic activity of the house dust mite allergen Der p 1 enhances allergenicity in a mouse inhalation model." Clin Exp Allergy **33**(8): 1159-1163.
- Greenbaum, L. M., A. Hirshkowitz, et al. (1959). "The activation of trypsinogen by cathepsin B." J Biol Chem **234**: 2885-2890.
- Halangk, W., M. M. Lerch, et al. (2000). "Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis." J Clin Invest **106**(6): 773-781.
- Hales, B. J., I. A. Laing, et al. (2007). "Distinctive immunoglobulin E anti-house dust allergen-binding specificities in a tropical Australian Aboriginal community." Clin Exp Allergy **37**(9): 1357-1363.

- Hales, B. J., A. C. Martin, et al. (2006). "IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease." J Allergy Clin Immunol **118**(2): 361-367.
- Hammad, H., M. Plantinga, et al. (2010). "Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen." J Exp Med **207**(10): 2097-2111.
- Harris, J., D. E. Mason, et al. (2004). "Activity profile of dust mite allergen extract using substrate libraries and functional proteomic microarrays." Chem Biol **11**(10): 1361-1372.
- Hedstrom, L. (2002). "Serine protease mechanism and specificity." Chem Rev **102**(12): 4501-4524.
- Hedstrom, L., T. Y. Lin, et al. (1996). "Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases." Biochemistry **35**(14): 4515-4523.
- Hewitt, C. R., H. Horton, et al. (1997). "Heterogeneous proteolytic specificity and activity of the house dust mite proteinase allergen Der p I." Clin Exp Allergy **27**(2): 201-207.
- Heymann, P. W., M. D. Chapman, et al. (1989). "Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp)." J Allergy Clin Immunol **83**(6): 1055-1067.
- Holt, P. G. and A. H. van den Biggelaar (2010). "99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: the role of infections in allergy: atopic asthma as a paradigm." Clin Exp Immunol **160**(1): 22-26.
- Huntington, J. A. (2009). "Slow thrombin is zymogen-like." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 159-164.
- Jacquet, A. (2010). "The Role of the House Dust Mite-Induced Innate Immunity in Development of Allergic Response." Int Arch Allergy Immunol **155**(2): 95-105.
- Jelinek, B., J. Antal, et al. (2004). "Ala226 to Gly and Ser189 to Asp mutations convert rat chymotrypsin B to a trypsin-like protease." Protein Eng Des Sel **17**(2): 127-131.
- Kawamoto, S., Y. Mizuguchi, et al. (1999). "Cloning and expression of Der f 6, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*." Biochim Biophys Acta **1454**(2): 201-207.
- Kay, A. B. (2006). "100 years of 'Allergy': can von Pirquet's word be rescued?" Clin Exp Allergy **36**(5): 555-559.
- Kay, J. and B. Kassell (1971). "The autoactivation of trypsinogen." J Biol Chem **246**(21): 6661-6665.
- Keller, J. and P. Lauer (2005). "Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease." Gut **54 Suppl 6**: vi1-28.

- Kikuchi, Y., T. Takai, et al. (2006). "Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses." J Immunol **177**(3): 1609-1617.
- King, C., S. Brennan, et al. (1998). "Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium." J Immunol **161**(7): 3645-3651.
- King, C., R. J. Simpson, et al. (1996). "The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*." J Allergy Clin Immunol **98**(4): 739-747.
- King, T. P., D. Hoffman, et al. (1994). "Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee." Int Arch Allergy Immunol **105**(3): 224-233.
- Kukor, Z., M. Toth, et al. (2003). "Human anionic trypsinogen: properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases." Eur J Biochem **270**(9): 2047-2058.
- Lazure, C. (2002). "The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis." Curr Pharm Des **8**(7): 511-531.
- Lucas, J. M. (2010). "Microarrays: Molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (II)." Allergol Immunopathol (Madr) **38**(4): 217-223.
- Massaer, M., P. Mazzu, et al. (2001). "High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage." Int Arch Allergy Immunol **125**(1): 32-43.
- Meno, K., P. B. Thorsted, et al. (2005). "The crystal structure of recombinant proDer p 1, a major house dust mite proteolytic allergen." J Immunol **175**(6): 3835-3845.
- Meyer, C. H., J. F. Bond, et al. (1994). "Comparison of the levels of the major allergens Der p I and Der p II in standardized extracts of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*." Clin Exp Allergy **24**(11): 1041-1048.
- Mueller, G. A., L. L. Edwards, et al. (2010). "The structure of the dust mite allergen Der p 7 reveals similarities to innate immune proteins." J Allergy Clin Immunol **125**(4): 909-917 e904.
- Nemoda, Z. and M. Sahin-Toth (2005). "The tetra-aspartate motif in the activation peptide of human cationic trypsinogen is essential for autoactivation control but not for enteropeptidase recognition." J Biol Chem **280**(33): 29645-29652.
- Nishiyama, C., T. Yasuhara, et al. (1995). "Cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA encoding house dust mite allergen Der f 3,



- serine protease from *Dermatophagoides farinae*." FEBS Lett **377**(1): 62-66.
- Ober, C. and S. Hoffjan (2006). "Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery." Genes Immun **7**(2): 95-100.
- Ohshima, Y., Y. Suzuki, et al. (2008). "Refolding of fully reduced bovine pancreatic trypsin." J Biosci Bioeng **106**(4): 345-349.
- Ong, S. T. and F. T. Chew (2009). Reconstructing the repertoire of mite allergens by recombinant DNA technology. Allergy Frontiers: From Epigenetics to Future therapies. L. R. a. R. P. Steve Holgate. **6**: 49-64.
- Page, M. J. and E. Di Cera (2008). "Serine peptidases: classification, structure and function." Cell Mol Life Sci **65**(7-8): 1220-1236.
- Pasternak, A., X. Liu, et al. (1998). "Activating a zymogen without proteolytic processing: mutation of Lys15 and Asn194 activates trypsinogen." Biochemistry **37**(46): 16201-16210.
- Pate, M. B., J. K. Smith, et al. (2010). "Regulation and dysregulation of immunoglobulin E: a molecular and clinical perspective." Clin Mol Allergy **8**: 3.
- Pittner, G., S. Vrtala, et al. (2004). "Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens." Clin Exp Allergy **34**(4): 597-603.
- Platts-Mills, T. A. and M. D. Chapman (1987). "Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control." J Allergy Clin Immunol **80**(6): 755-775.
- Potter, P. C., J. O. Warner, et al. (2009). "Recommendations for competency in allergy training for undergraduates qualifying as medical practitioners." WAO Journal **2**: 150-154.
- Rath, A., A. R. Davidson, et al. (2005). "The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition." Biopolymers **80**(2-3): 179-185.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton, et al. (2008). "MEROPS: the peptidase database." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D320-325.
- Rees, J. A., J. Carter, et al. (1992). "Localization of the major house dust mite allergen Der p I in the body of *Dermatophagoides pteronyssinus* by ImmStain." Clin Exp Allergy **22**(6): 640-641.
- Royer, P. J., M. Emara, et al. (2010). "The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity." J Immunol **185**(3): 1522-1531.
- Sauter, N. K., T. Mau, et al. (1998). "Structure of alpha-lytic protease complexed with its pro region." Nat Struct Biol **5**(11): 945-950.
- Schechter, I. and A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." Biochem Biophys Res Commun **27**(2): 157-162.

- Schulz, O., H. F. Sewell, et al. (1998). "A sensitive fluorescent assay for measuring the cysteine protease activity of Der p 1, a major allergen from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*." Mol Pathol **51**(4): 222-224.
- Shakib, F., A. M. Ghaemmaghami, et al. (2008). "The molecular basis of allergenicity." Trends Immunol **29**(12): 633-642.
- Shakib, F., O. Schulz, et al. (1998). "A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity." Immunol Today **19**(7): 313-316.
- Smith, W. A., K. Y. Chua, et al. (1994). "Cloning and sequencing of the *Dermatophagoides pteronyssinus* group III allergen, Der p III." Clin Exp Allergy **24**(3): 220-228.
- Smith, W. A. and W. R. Thomas (1996). "Sequence polymorphisms of the Der p 3 house dust mite allergen." Clin Exp Allergy **26**(5): 571-579.
- Sokol, C. L., G. M. Barton, et al. (2008). "A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses." Nat Immunol **9**(3): 310-318.
- Sokol, C. L., N. Q. Chu, et al. (2009). "Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response." Nat Immunol **10**(7): 713-720.
- Sokol, C. L. and R. Medzhitov (2010). "Role of basophils in the initiation of Th2 responses." Curr Opin Immunol **22**(1): 73-77.
- Stewart, G. A., M. R. Kollinger, et al. (1994). "A comparative study of three serine proteases from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*." Allergy **49**(7): 553-560.
- Stewart, G. A., F. R. Lake, et al. (1991). "Faecally derived hydrolytic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*: physicochemical characterisation of potential allergens." Int Arch Allergy Appl Immunol **95**(2-3): 248-256.
- Stewart, G. A., L. D. Ward, et al. (1992). "The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme." Immunology **75**(1): 29-35.
- Stroud, R. M., A. A. Kossiakoff, et al. (1977). "Mechanisms of zymogen activation." Annu Rev Biophys Bioeng **6**: 177-193.
- Subbian, E., Y. Yabuta, et al. (2005). "Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: intrinsically unstructured propeptide modulates stochastic activation of subtilisin." J Mol Biol **347**(2): 367-383.
- Sun, G., M. A. Stacey, et al. (2001). "Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells." J Immunol **167**(2): 1014-1021.

- Takai, T., T. Kato, et al. (2005). "Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity." Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 944-952.
- Takai, T., T. Kato, et al. (2005). "Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE epitopes blocked by prodomains." J Allergy Clin Immunol **115**(3): 555-563.
- Takai, T., R. Mineki, et al. (2002). "Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p 1 and Der f 1, and its implication in the blockade of proteolytic activity." FEBS Lett **531**(2): 265-272.
- Takai, T., E. Mizuuchi, et al. (2006). "Glycosylation of recombinant proforms of major house dust mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation." Int Arch Allergy Immunol **139**(3): 181-187.
- Thomas, B., P. Heap, et al. (1991). "Ultrastructural localization of the allergen Der p I in the gut of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*." Int Arch Allergy Appl Immunol **94**(1-4): 365-367.
- Thomas, W. R. (2010). "Geography of house dust mite allergens." Asian Pac J Allergy Immunol **28**(4): 211-224.
- Thomas, W. R. (2011). "The advent of recombinant allergens and allergen cloning." J Allergy Clin Immunol **127**(4): 855-859.
- Thomas, W. R., B. J. Hales, et al. (2010). "House dust mite allergens in asthma and allergy." Trends Mol Med **16**(7): 321-328.
- Thomas, W. R., W. A. Smith, et al. (2002). "Characterization and immunobiology of house dust mite allergens." Int Arch Allergy Immunol **129**(1): 1-18.
- Tovey, E. R. and B. A. Baldo (1990). "Localization of antigens and allergens in thin sections of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae)." J Med Entomol **27**(3): 368-376.
- Trompette, A., S. Divanovic, et al. (2009). "Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein." Nature **457**(7229): 585-588.
- Tse, K. and A. A. Horner (2008). "Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited." Curr Allergy Asthma Rep **8**(6): 475-483.
- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 785-799.
- Valenta, R., B. Linhart, et al. (2011). "Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens." Allergy.
- van Oort, E., P. G. de Heer, et al. (2002). "Maturation of *Pichia pastoris*-derived recombinant pro-Der p 1 induced by deglycosylation and by the natural

- cysteine protease Der p 1 from house dust mite." Eur J Biochem **269**(2): 671-679.
- van Ree, R. (2004). "The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe." Allergy **59**(6): 571-574.
- Vanhoof, G., F. Goossens, et al. (1995). "Proline motifs in peptides and their biological processing." FASEB J **9**(9): 736-744.
- Vasquez, J. R., L. B. Evnin, et al. (1989). "An expression system for trypsin." J Cell Biochem **39**(3): 265-276.
- Venekei, I., L. Graf, et al. (1996). "Expression of rat chymotrypsinogen in yeast: a study on the structural and functional significance of the chymotrypsinogen propeptide." FEBS Lett **379**(2): 139-142.
- Voorhorst, R., F. T. Spijksma, et al. (1967). "The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: identity with the house dust allergen." J Allergy **39**: 325.
- Wan, H., H. L. Winton, et al. (2001). "The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*." Clin Exp Allergy **31**(2): 279-294.
- Wan, H., H. L. Winton, et al. (1999). "Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions." J Clin Invest **104**(1): 123-133.
- Weghofer, M., Y. Dall'Antonia, et al. (2008). "Characterization of Der p 21, a new important allergen derived from the gut of house dust mites." Allergy **63**(6): 758-767.
- Weghofer, M., W. R. Thomas, et al. (2008). "Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients." Eur J Clin Invest **38**(12): 959-965.
- Wiederanders, B., G. Kaulmann, et al. (2003). "Functions of propeptide parts in cysteine proteases." Curr Protein Pept Sci **4**(5): 309-326.
- Williamson, M. P. (1994). "The structure and function of proline-rich regions in proteins." Biochem J **297** ( Pt 2): 249-260.
- Yasueda, H., H. Mita, et al. (1993). "Allergens from *Dermatophagoides* mites with chymotryptic activity." Clin Exp Allergy **23**(5): 384-390.
- Yong, T. S. and K. Y. Jeong (2009). "Household arthropod allergens in Korea." Korean J Parasitol **47 Suppl**: S143-153.
- Zhan, Z. K., K. M. Ji, et al. (2010). "Monoclonal antibodies against recombinant Der f 3 reveal localization of Der f 3 in the gut and faecal pellets of *Dermatophagoides farinae*." Exp Appl Acarol **52**(1): 63-71.
- Zhang, J., P. D. Pare, et al. (2008). "Recent advances in asthma genetics." Respir Res **9**: 4.