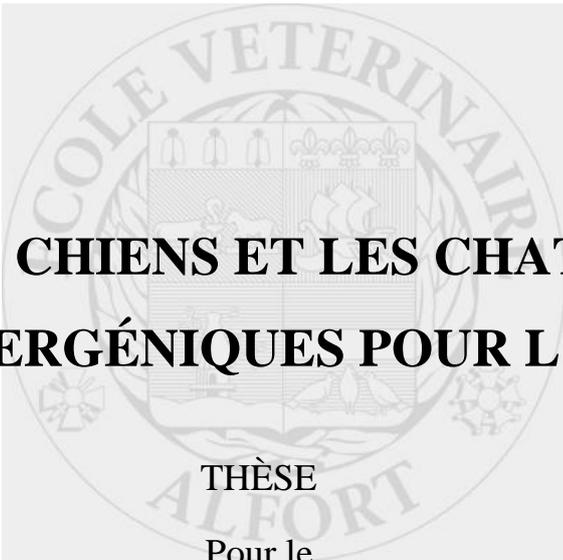


Année 2012



**LES CHIENS ET LES CHATS  
HYPOALLERGÉNIQUES POUR L'HOMME**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le.....

par

**Hélène, Odile, Ericka BLANCHET**

Née le 13 octobre 1988 à Paris 14<sup>ème</sup>

JURY

**Président : M.**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

**Membres**

**Directeur : Dr Marie ABITBOL**

**Maître de conférences à l'ENVA**

**Assesseur : Dr Ludovic FREYBURGER**

**Maître de conférences à l'ENVL**



**LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard  
Professeurs honoraires: Mme et MM. : BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard,  
CREPPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques

**DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)**

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p><b>- UNITE DE CARDIOLOGIE</b> Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. AUDIGIE Fabrice, Professeur M. DENOIX Jean-Marie, Professeur Mme DUPAYS Anne-Gaëlle, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b> Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE</b> Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel M. BLOT Stéphane, Professeur* Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b> M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur</p> <p><b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b> Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences *</p>	<p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. CHERMETTE René, Professeur * M. GUILLOT Jacques, Professeur M. HUBERT Blaise, Professeur contractuel Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences M. POLACK Bruno, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur* M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)* M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, (rattaché au DPASP)</p> <p><b>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b> Mme ROUX Françoise, Maître de conférences</p>
--	--

**DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)**

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p><b>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES</b> M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b> M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b> M. BENET Jean-Jacques, Professeur Mme DUFOUR Barbara, Professeur* Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme PRAUD Anne, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b> M. ADJOU Karim, Maître de conférences * M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b> M. ARNE Pascal, Maître de conférences* M. BOSSE Philippe, Professeur M. COURREAU Jean-François, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur</p>
---	---

**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p><b>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b> M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : ANGLAIS</b> Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p><b>- UNITE DE BIOCHIMIE</b> M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b> M. PHILIPS, Professeur certifié</p> <p><b>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b> Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*</p> <p><b>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b> Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b> M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. MAGNE Laurent, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b> Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. PERROT Sébastien, Maître de conférences M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b> Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences M. TIRET Laurent, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b> M. ELOIT Marc, Professeur Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *</p> <p><b>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b> Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences</p>
--	---

\* responsable d'unité



# REMERCIEMENTS

*Au Professeur*

Professeur de la faculté de médecine de Créteil

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Hommage respectueux.

*A Madame le Docteur ABITBOL*

Maître de conférences en génétique médicale et moléculaire à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et qui m'a accompagnée tout au long de ce travail. Merci pour votre disponibilité et vos conseils.

*A Monsieur le Docteur FREYBURGER*

Maître de conférences en immunologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à cette thèse en tant qu'assesseur. Merci pour votre temps précieux et vos conseils avisés.

Hommage respectueux.



A mes parents,

*Pour leur soutien pendant ces longues années d'études, merci pour tout !*

A mes sœurs,

*Merci les vrutis !*

A ma tante,

*Pour son aide durant toute ma scolarité,*

A toute ma famille,

A tous mes amis, de lycée, de prépa, de véto et d'ailleurs,

A Thomas,

*Pour sa patience, merci d'être toujours là pour moi,*



# TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
LISTE DES TABLEAUX .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
INTRODUCTION GENERALE .....	11
PREMIERE PARTIE : L'"ALLERGIE AU CHAT ET AU CHIEN".....	13
I. L'"allergie" : l'hypersensibilité de type I .....	15
A) Les hypersensibilités : des réactions immunitaires inappropriées .....	15
B) Historique et mise en évidence de l'hypersensibilité de type I .....	16
C) Mise en place de l'hypersensibilité de type I .....	16
II. L'importance de l'hypersensibilité de type I aux allergènes du chien et du chat .....	18
A) Epidémiologie.....	18
B) Facteurs de risque de développement d'une allergie.....	19
1) La théorie hygiéniste .....	19
2) Le sexe des patients .....	19
3) L'exposition aux animaux domestiques .....	19
4) L'exposition aux polluants chimiques .....	20
C) L'atopie, une prédisposition génétique à l'allergie .....	20
1) La "marche atopique", un concept ancien.....	21
2) Les gènes prédisposant à l'apparition de l'allergie .....	21
III. La mise en place d'une réaction d'HSI .....	22
A) Les allergènes .....	22
1) Caractéristiques générales d'un allergène .....	22
2) Particularités des allergènes du chat .....	23
3) La séquence protéique des allergènes.....	24
4) L'allergène : une molécule conduisant à la synthèse d'IgE.....	24
B) Les organes.....	25
C) Les cellules.....	26
1) Les mastocytes .....	26
a) Les mastocytes : des cellules impliquées dans les réactions inflammatoires et allergiques .....	27
b) Les granules des mastocytes .....	27
c) Mécanisme de dégranulation .....	28
2) Les granulocytes basophiles dans l'allergie.....	31
3) Les granulocytes éosinophiles dans l'allergie .....	32

a)	Production et développement .....	33
b)	Localisation et rôle des éosinophiles .....	33
-	Un rôle nouveau : l'éosinophile comme acteur de la régulation de la réponse immunitaire .....	34
-	Le granulocyte éosinophile : une cellule effectrice proinflammatoire et destructrice .....	34
D)	Les anticorps : les immunoglobulines de classe E.....	35
E)	Les mécanismes pathogéniques.....	36
1)	La réponse immunitaire innée dans la réaction allergique.....	36
2)	L'inflammation dans l'allergie aux carnivores domestiques .....	37
-	Mécanismes généraux de l'inflammation allergique .....	37
-	Les médiateurs de l'inflammation.....	39
3)	La réponse immunitaire locale dans la réaction allergique .....	40
F)	Les symptômes.....	41
G)	Le diagnostic.....	41
1)	Le recueil de l'anamnèse et des commémoratifs .....	41
2)	La Numération Formule Sanguine (NFS) .....	42
3)	Le dosage des IgE totales .....	42
4)	Le dosage des IgE spécifiques d'un allergène .....	42
5)	Le Skin Prick-Test (SPT), l'injection intra-dermique d'allergènes.....	42
6)	Bilan : démarche diagnostique.....	43
H)	Le traitement.....	45
1)	Les traitements symptomatiques.....	45
2)	L'hyposensibilisation : un traitement long nécessitant un long investissement .....	45
3)	Eviction de l'allergène : une étape nécessaire souvent très difficile à mettre en oeuvre.....	47
DEUXIEME PARTIE : LES OUTILS DE LA GENETIQUE APPLIQUES A LA PREVENTION DE L'ALLERGIE AUX CARNIVORES DOMESTIQUES.....		49
Introduction.....		51
I.	Les allergènes des carnivores domestiques :.....	51
A.	Nomenclature des allergènes : .....	51
B.	Mise en évidence d'un allergène .....	52
1)	Isolement protéique.....	52
a)	Choix de la source de protéine.....	52
b)	Techniques d'isolement de la protéine.....	52
•	Quelques techniques de chromatographie couramment utilisées .....	52
•	Techniques d'électrophorèse.....	53
•	La spectrométrie de masse .....	54
2)	Mise en évidence de l'allergénicité : liaison Antigène-Anticorps .....	55

3)	Autre stratégie : création d'une banque d'ADN complémentaire et screening .....	58
II.	Les allergènes officiellement reconnus du chien et du chat .....	60
A.	Présentation des différents allergènes .....	60
1)	Les allergènes du chat : .....	62
a)	Fel d 1, une sécrétoglobine .....	62
b)	Fel d 2 : l'albumine sérique du chat .....	63
c)	Fel d 3, la cystatine du chat .....	63
d)	Fel d 4, une lipocaline.....	64
e)	Fel d 5w : immunoglobuline A du chat.....	65
f)	Fel d 6w : immunoglobuline M du chat .....	65
g)	Fel d 7: une lipocaline.....	66
h)	Fel d 8 .....	66
2)	Les allergènes du chien .....	66
a)	Can f 1, une lipocaline du chien .....	66
b)	Can f 2.....	66
c)	Can f 3.....	67
d)	Can f 4.....	67
e)	Can f 5.....	67
f)	Can f 6.....	68
B.	Tableau récapitulatif .....	68
III.	Perspectives de prévention de l'allergie aux carnivores domestiques .....	72
A.	Variations de production d'allergènes et méthodes de prévention classiques .....	72
1)	Effets de la castration chirurgicale et du lavage chez le chat et le chien .....	72
2)	Lavages de l'environnement .....	73
B.	Les races de chiens et de chats dits « hypoallergéniques ».....	74
C.	Les animaux Allerca-Lifestyle pets <sup>®</sup> : la recherche d'une mutation naturelle et rare dans une population de chats .....	76
1)	Principe général.....	76
2)	Le génotypage : la recherche de variants naturels au sein d'une population .....	78
a)	Les mutations pouvant être recherchées au sein d'une population de chats ou de chiens.....	79
b)	Les outils de génotypage :.....	81
-	La technique de PCR.....	82
-	Analyse des produits de PCR : recherche de variants pour un gène donné .....	85
-	Le séquençage du gène .....	86
•	Le séquençage par la méthode de Sanger.....	86
•	Les séquenceurs de nouvelle génération .....	88
c)	Détection des variants hypoallergéniques :.....	95
3)	La création d'une race .....	95

a)	Individu fondateur.....	95
b)	Transmission du caractère d'intérêt .....	96
c)	Croisements.....	96
d)	Inconvénients de cette approche : l'effet fondateur .....	97
e)	Stratégie possible pour éviter les écueils inhérents à la création d'une nouvelle race	98
4)	La polémique sur les animaux Allerca® .....	98
D.	Autre perspective : la création de lignées de chats ou de chiens transgéniques hypoallergéniques .....	100
1)	Les méthodes d'obtention d'animaux transgéniques .....	101
a)	La construction du transgène.....	101
b)	L'insertion du transgène dans le noyau de la cellule hôte.....	102
-	L'électroporation :.....	102
-	Les micelles lipidiques : .....	103
-	L'utilisation de vecteurs viraux: .....	103
c)	L'intégration du transgène dans le génome de la cellule-hôte : la recombinaison homologue .....	103
d)	L'utilisation de cellules ES chez la souris et l'obtention d'animaux Knock-out (KO) ou Knock-in (KI) pour un gène.....	106
-	Les cellules ES .....	106
-	Les animaux KO .....	107
e)	Le clonage et le transfert nucléaire.....	107
2)	La transgénèse aujourd'hui chez le chat et le chien .....	108
3)	Perspective : mise au point de lignées transgéniques hypoallergéniques de chiens et de chats.....	109
4)	Controverse .....	109
	CONCLUSION .....	111
	BIBLIOGRAPHIE.....	113

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma général d'apparition d'une hypersensibilité de type I.....	17
Figure 2 : Cascade d'événements aboutissant à la réponse immunitaire allergique durant l'exposition à un allergène .....	22
Figure 3 : Deux voies possibles de production d'IgE suite à l'exposition à un allergène .....	25
Figure 4 : Structure du noeud lymphatique .....	26
Figure 5 : Photographie de mastocytes.....	27
Figure 6 : Les différents mécanismes conduisant au pontage des récepteurs RFCε1 et à l'activation des mastocytes .....	28
Figure 7: Cascade de réactions aboutissant à la dégranulation des mastocytes.....	29
Figure 8: Photographie d'un granulocyte basophile .....	32
Figure 9 : Photographie d'un granulocyte éosinophile humain.....	33
Figure 10 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de classe E .....	35
Figure 11 : Le RFCε1 : deux isoformes possibles .....	36
Figure 12 : L'inflammation allergique.....	38
Figure 13 : Les lymphocytes T ont un rôle coordinateur de l'inflammation allergique.....	39
Figure 14 : Diagnostic de la rhinite allergique (d'après BOUSQUET <i>et al.</i> , 2008).....	44
Figure 15 : Démarche raisonnée pour le choix de l'immunothérapie comme traitement de l'allergie .....	46
Figure 16 : Schéma d'un montage de chromatographie classiquement utilisé.....	53
Figure 17 : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse .....	55
Figure 18 : Exemple d'immunoblot pour la détection d'un antigène .....	56
Figure 19 : Réaction d'immunofluorescence directe .....	57
Figure 20 : Réaction d'immunofluorescence indirecte .....	58
Figure 21 : Principe général du clonage cellulaire de l'ADN .....	59
Figure 22 : Criblage de la banque d'ADNc au moyen d'un anticorps.....	60
Figure 23 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une lipocaline.....	62
Figure 24 : Représentation schématique en trois-dimensions de Fel d 1.....	63
Figure 25 : Représentation tridimensionnelle de Fel d 3 ou cystatine du chat .....	64
Figure 26 : Représentation tridimensionnelle de Fel d 4, une lipocaline .....	65
Figure 27 : Structure tridimensionnelle de rCan f 2 caractéristique des molécules de la famille des lipocalines .....	67
Figure 28 : Quelques exemples de races de chiens et de chats faussement réputées être « hypoallergéniques » dans l'opinion collective .....	75
Figure 29 : Les chiens et chats commercialisés par la société américaine Allerca ®-Lifestyle Pets.....	78
Figure 30 : Les différents types de mutations génétiques .....	80
Figure 31 : Principe d'un cycle d'amplification de l'ADN lors d'une PCR.....	83
Figure 32 : Quantité d'ADN produit lors de PCR .....	84
Figure 33 : Principe d'une PCR en temps réel .....	85
Figure 34 : Principe de la méthode de séquençage de Sanger .....	87
Figure 35 : Nucléotides modifiés employés dans la méthode de Sanger : .....	88
Figure 36 : Le séquençage de nouvelle génération - différentes stratégies pour immobiliser la matrice ADN .....	89
Figure 37 : Exemples de nucléotides modifiés utilisés dans le séquençage de nouvelle génération .....	92
Figure 38 : Méthode d'incorporation réversible de nucléotides fluorescents utilisée avec quatre couleurs ou une seule.....	93
Figure 39 : Le pyroséquençage utilisé dans la technologie Roche/454.....	94

Figure 40 : Schémas des croisements mis en œuvre en fonction du mode de transmission du caractère "hypoallergénique" .....	96
Figure 41 : Photographies d'une électrophorèse et d'un western blot visibles sur le site internet d'Allerca® .....	99
Figure 42 : Deux types de transgènes pouvant être utilisés pour inactiver ou modifier le gène codant l'allergène : la méthode knock-out ou knock-in.....	102
Figure 43 : La recombinaison homologue : trois types d'événements peuvent avoir lieu lors de l'intégration du transgène dans la cellule-cible .....	104
Figure 44 : Sélection des cellules où l'intégration du transgène a eu lieu au bon endroit par recombinaison homologue .....	105
Figure 45 : Individus chimères obtenus après transgénèse par recombinaison homologue dans des cellules ES .....	106
Figure 46 : La transgénèse par transfert nucléaire .....	107
Figure 47 : Photographie des chatons transgéniques exprimant la RFP .....	108

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des quatre types d'hypersensibilités.....	16
Tableau 2 : Récapitulatif des médiateurs libérés par les mastocytes lors de leur activation (d'après THEOHARIDES <i>et al.</i> , 2007) .....	30
Tableau 3 : Récapitulatif des allergènes du chien et du chat officiellement reconnus par L'OMS – IUIS .....	69
Tableau 4 : Comparaison des performances de quelques séquenceurs (d'après GLENN, 2011).....	95



# LISTE DES ABBREVIATIONS

- Ag : Antigène
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate
- BCR : *B Cell Receptor*
- cAMP : Adénosine Monophosphate Cyclique
- CCD : *Coupled Charge Device*
- CCL : C-C chemokine Ligand
- CCR3 (C-chemokine receptor type 3)
- CD : *Cluster of Differentiation*
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
- CRF : *Corticotropin releasing factor*
- CRH (*Corticotropin Releasing hormone*)
- DAG : *Dimeric acidic glycoprotein*
- ECP : Protéine cationique éosinophilique
- EDN : Neurotoxine dérivée des éosinophiles
- ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FGF : *Fibroblast Growth Factor*
- GATA1 : Protéine 1 de liaison à la séquence GATA
- GM-CSF : *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*
- GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormon*
- HS : Hypersensibilité
- IFN- $\gamma$  : Interféron  $\gamma$
- Ig : Immunoglobuline
- IgE : Immunoglobuline de classe E
- IgEs : Immunoglobuline de classe E spécifique
- IGF-1 : *Insuline Growth Factor 1*
- IL : Interleukine
- IP3 : Inositol triphosphate
- LB : Lymphocyte B
- LT : Lymphocyte T
- LTX : Leucotriène X
- MALT : Tissu Lymphoïde associé aux muqueuses
- MBP : Protéine basique majeure
- MCP : *Monocyte Chemoattractant Protein*
- MIF *Macrophage migration inhibitory Factor*
- NALT : Tissu Lymphoïde Associé au Nez
- NgF : *Nerve Growth Factor*
- NO : Monoxyde d'Azote
- PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
- PGD<sub>2</sub> : Prostaglandine 2
- PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-2-phosphate
- PKC : Protéine Kinase C
- PRRs : Pattern Recognition Receptors
- PTK : *Protein tyrosine kinase*
- RAST : *Radio Allergo Sorbent Test*
- RFC : Récepteur de Fragment Constant
- RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*

- RFP : *Red Fluorescent Protein*
- SCF *Stem Cell Factor*
- SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- SPT : *Skin Prick-Test*
- TCR : *T-cell receptor*
- Th : *Lymphocyte T helper*
- TLR : *Toll-Like Receptor*
- TNF : *Tumor Necrosis Factor*
- Treg : *Lymphocyte T Régulateur*
- TSLP : *Thymic Stromal LymphoPoietin*
- VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

# INTRODUCTION GENERALE

Le chien (*canis familiaris*) et le chat (*felis domesticus*) sont les animaux domestiques les plus couramment rencontrés dans les pays occidentaux, et notamment en France, avec près de 10,96 millions de chats et 7,59 millions de chiens (résultats de l'enquête FACCO/TNS SOFFRES 2010).

L'allergie (au sens commun du terme) aux animaux domestiques est un sujet majeur de santé publique. Ainsi, 10 à 25% des patients des services d'allergologie présentent une réaction cutanée aux allergènes de chat (HEINZERLING *et al.*, 2005). Ces malades doivent faire face, en cas d'exposition à un animal, à des symptômes variés : conjonctivite, rhinite, et le plus souvent asthme, nécessitant la plupart du temps une intervention thérapeutique pour mettre fin aux crises.

Parmi les personnes allergiques, nombreuses sont celles qui souhaiteraient avoir ou possèdent déjà un animal domestique. Le diagnostic d'allergie est en effet bien souvent réalisé suite à l'exposition à un chat ou un chien. De plus, toutes les études réalisées à ce sujet montrent qu'une partie non négligeable des patients allergiques possède tout de même un animal, refusant de s'en séparer lorsque le diagnostic est établi.

Après avoir passé en revue les différents aspects de l'allergie au chat et au chien, nous nous intéresserons aux multiples allergènes du chat et du chien et aux techniques permettant leur mise en évidence. Puis nous passerons en revue les races de chiens et de chats dites "hypoallergéniques" (en général des animaux nus, à poils frisés ou ne perdant pas leurs poils), c'est-à-dire réputés engendrant moins de symptômes chez les personnes allergiques, dans l'opinion collective.

Nous verrons alors comment les outils de la génétique peuvent permettre la mise au point de lignées d'animaux hypoallergéniques. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en avant : la recherche de mutants pour un gène codant un allergène de chien ou de chat, ou la transgénèse, c'est-à-dire la modification du matériel génétique des animaux, afin de les rendre hypoallergéniques.

Si certaines sociétés américaines se targuent déjà de commercialiser ce genre d'animaux, nous verrons que certaines techniques relèvent tout de même des perspectives d'avenir.



# **PREMIERE PARTIE : L'"ALLERGIE AU CHAT ET AU CHIEN"**



L'organisme vivant possède des moyens de défense contre les microorganismes et les agents infectieux qu'il peut rencontrer. L'ensemble de ces mécanismes représente l'immunité. Le système immunitaire regroupe tous les "outils" qui interagissent pour assurer l'intégrité de l'organisme. Il regroupe des cellules, des molécules en solution, et leurs récepteurs.

L'immunité innée est la première stratégie de défense, mise en place immédiatement après l'agression. Elle cible des motifs communs aux agents pathogènes et absents des cellules de l'hôte. Elle est associée à la réaction inflammatoire qui a pour objectif, entre autres, de détruire l'agent pathogène intrus.

L'immunité adaptative ou spécifique, plus lente à se mettre en place, repose sur l'interaction entre les récepteurs d'antigènes des lymphocytes T et B et les antigènes présents à la surface des microorganismes. Grâce à une diversité de structure extraordinaire, ces récepteurs peuvent "reconnaître" une infinité d'antigènes. Les effecteurs de cette réponse immunitaire acquise peuvent être spécifiques (Anticorps...) et non spécifiques (acteurs de l'inflammation). L'immunité adaptative est également caractérisée par la propriété de mémoire, qui se traduit par une réponse plus rapide et de plus grande ampleur lors d'une seconde exposition à la même molécule.

Les réactions d'hypersensibilités peuvent être définies comme une réponse à des substances étrangères classiquement non pathogènes. Ces hypersensibilités, ou allergies, peuvent avoir des conséquences et des modes d'action divers. L'"allergie", au sens commun du terme, vis-à-vis de substances produites par le chien ou le chat, correspondent en réalité à une hypersensibilité immédiate, de type I, qui engendre chez le patient malade des symptômes allant de la conjonctivite à l'asthme.

## **I. L'"allergie" : l'hypersensibilité de type I**

### **A) Les hypersensibilités : des réactions immunitaires inappropriées**

L'hypersensibilité (HS) est une réaction immunitaire spécifique dépassant son objectif d'origine (protéger l'organisme) et à l'origine de symptômes (REVILLARD, 2001). Les réactions d'hypersensibilité sont classiquement réparties en quatre groupes (HS de type I, II, III ou IV) résumés dans le tableau 1, qui correspondent à la classification établie par Philip Gell et Robert Coombs selon les modèles animaux. Outre le fait qu'elles font intervenir différents effecteurs, on peut les distinguer par le délai d'apparition des symptômes (de quelques minutes à quelques jours).

L'hypersensibilité de type I correspond aux réactions impliquant les anticorps de classe IgE (Immunoglobuline de classe E). Elle représente la plus connue des réactions d'hypersensibilité, "l'allergie" au sens commun du terme, et elle comprend notamment l'allergie aux animaux domestiques. L'hypersensibilité de type II regroupe les destructions cellulaires et lésions tissulaires induites par des anticorps cytotoxiques comme par exemple les destructions des cellules du sang. Quant à l'hypersensibilité de type III, elle concerne les lésions tissulaires dues aux dépôts de complexes immuns dans l'organisme, mettant en jeu des anticorps et le complément. Enfin, l'hypersensibilité de type IV ou hypersensibilité retardée correspond à des réactions inflammatoires causées par les lymphocytes T (mécanisme de réaction immunitaire à médiation cellulaire).

**Tableau 1 : Principales caractéristiques des quatre types d'hypersensibilités  
(classification de Gell et Coombs)**

Type d'HS	I	II	III	IV
<b>Délai d'apparition des symptômes</b>	Immédiate : de 5 à 15 minutes	Semi-retardée : de 3 à 8h		Retardée : de 12 heures à plusieurs jours
<b>Principaux symptômes observés</b>	Œdème, érythème (anaphylaxie), rhinite, conjonctivite, (asthme extrinsèque)	Nécrose, vascularite		Indurations, nodules
<b>Lésions microscopiques</b>	Exsudation plasmatique	Microthromboses, adhérences des plaquettes et Polynucléaires neutrophiles à l'endothélium		Infiltrats de lymphocytes et monocytes
<b>Principaux effecteurs</b>	Anticorps Immunoglobulines de classe E, mastocytes	Anticorps et complément, plaquettes, polynucléaires neutrophiles		Lymphocytes T, cytokines
<b>Modèle classique</b>	Anaphylaxie	Réaction d'Arthus	Maladie sérique	Hypersensibilité tuberculique

## B) Historique et mise en évidence de l'hypersensibilité de type I

En 1902, Richet et Portier vaccinent des chiens en leur injectant un extrait de tentacules d'actinie. Trois semaines plus tard, une seconde injection provoquait chez ces mêmes animaux des réactions très violentes avec vomissements, diarrhée, asphyxie et souvent la mort de l'animal. Richet et Portier appellent ce phénomène l'« anaphylaxie », par opposition à la prophylaxie, effet protecteur souhaité d'un vaccin.

Cinq ans plus tard, Von Pirquet crée le terme d'« allergie », du latin « *allergos* genre » (répondre autrement). Il désigne par là toute modification observée lors d'un deuxième contact avec un antigène, et pas spécifiquement un effet délétère. Aujourd'hui, et par extension de langage, l'allergie est devenue synonyme d'hypersensibilité de type I, c'est-à-dire d'un état pathologique.

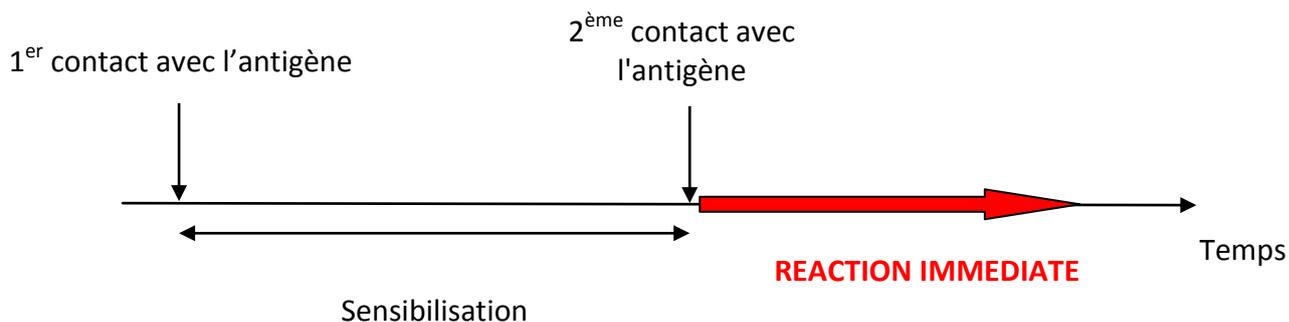
Prausnitz, en 1921, met en évidence sur sa propre peau une réaction urticarienne immédiate en s'injectant le sérum d'un donneur nommé Kütsner allergique aux poissons. Cette réponse d'anaphylaxie cutanée passive est appelée réaction de Prausnitz-Kütsner (REVILLARD, 2001).

## C) Mise en place de l'hypersensibilité de type I

La phase initiale dans le développement de l'hypersensibilité de type I est la sensibilisation (figure 1). Un allergène pénètre dans l'organisme à travers la barrière épithéliale de la peau, des voies aériennes ou digestives, et est pris en charge par une Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA).

Certaines mutations génétiques peuvent influencer ce processus et favoriser le développement d'une réaction allergique. Par exemple, des mutations entraînant une perte de fonction pour la protéine *filagrine*, protéine impliquée dans l'intégrité de la barrière cutanée sont associées à un risque plus élevé de développer un eczéma atopique (cf première partie II. C) 2.) . Les cellules dendritiques sont les CPA les plus fréquentes.

**Figure 1 : Schéma général d'apparition d'une hypersensibilité de type I**



Le premier contact avec l'antigène n'entraîne pas de symptômes. En revanche, le second contact, qui suit la phase de sensibilisation entraîne l'apparition de symptômes de façon immédiate (de l'ordre de la minute).

Les cellules dendritiques sont capables d'induire une réponse face aux antigènes étrangers, mais peuvent également présenter des antigènes du soi et des protéines de l'environnement non pathogènes de façon continue afin de créer une tolérance immunitaire (RINDSJO *et al.*, 2010). Cette double capacité leur permet d'orienter la réponse immunitaire et laisse penser qu'elles pourraient être de bons candidats pour de nouvelles immunothérapies après manipulation *in vitro* ou *in vivo*. C'est au cours du premier contact avec l'antigène que la CPA va orienter la cellule lymphocytaire T CD4+ spécifique de l'antigène vers une voie Th1, Th2 ou Th17 (lymphocyte T helper 1,2 ou 17) voire en cellules régulatrices T.

Chez les individus où la CPA émet des signaux causant la différenciation en cellules TH2, la production d'IL-4 et IL-13 (Interleukine 4 et 13) par celles-ci va entraîner les cellules B vers la sécrétion d'IgE spécifique de l'antigène. Ces IgE sécrétées vont alors se lier aux mastocytes présents dans les tissus, grâce aux récepteurs présents à leur surface (cf première partie III.D). A la faveur d'un second contact avec le même antigène, l'activation des mastocytes va libérer des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine ou des protéases.

Les raisons pour lesquelles quelques individus produisent des IgE en présence d'allergènes et d'autres non sont inconnues. Interviennent probablement le génotype de la personne, le type d'allergène ainsi que sa concentration dans l'environnement, ou encore la voie d'exposition et les agents exposés simultanément.

## II. L'importance de l'hypersensibilité de type I aux allergènes du chien et du chat

### A) Epidémiologie

L'hypersensibilité de type I touche de plus en plus de personnes dans le monde, et notamment dans les pays occidentaux, sans que cela soit très clairement compris. Les enfants par exemple sont de plus en plus sujets à développer des rhinites, conjonctivites allergiques et de l'asthme (RANCE *et al.*, 2002).

De nombreuses études épidémiologiques de grande envergure et dans plusieurs pays ont permis d'aboutir à cette affirmation. L'enquête ISAAC (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood) est un programme mondial de recherche mis en place en 1991 afin d'évaluer à grande échelle la prévalence de l'allergie (asthme, rhinite et eczéma allergique) à travers le monde ([isaac.auckland.ac.nz](http://isaac.auckland.ac.nz)). L'enquête s'est déroulée en trois phases. La première phase a constitué en un recensement dans de nombreux pays des enfants allergiques, grâce à des questionnaires remplis dans les centres de recherche qui collaboraient avec le projet. Cette étude avait pour but de :

- décrire la prévalence et la sévérité des symptômes allergiques dans les différents centres et de les comparer ;
- définir des données de base afin d'évaluer plus tard une éventuelle hausse ou baisse de la prévalence ;
- et enfin donner les bases à un futur travail en vue de mettre en lumière différents facteurs de risques dans les modes de vie, l'environnement, la génétique, ou encore les traitements médicaux.

La deuxième phase du projet ISAAC, commencée en 1998 a concerné un plus petit nombre de centres dans 22 pays différents. En étudiant les dossiers médicaux des patients et en utilisant toujours des questionnaires précis, elle avait plutôt pour but d'identifier de possibles facteurs étiologiques nouveaux expliquant les différences observées entre les prévalences de l'allergie dans les différents centres.

La troisième phase était une réédition de la première phase, cinq ans après.

Selon leurs résultats, l'asthme en France serait présent chez 9% des enfants, 12% des adolescents et 7% des adultes. La rhinite allergique, elle, concerne 7%, 15% et 15 à 20% respectivement des enfants, adolescents et adultes (STRACHAN *et al.*, 1997).

Une étude (PATEL *et al.*, 2008) a rassemblé et analysé toutes les publications relatives à la prévalence de l'asthme et des sifflements respiratoires dans le monde (enquêtes ISAAC et non ISAAC). Leurs conclusions sont que les prévalences les plus élevées sont le plus couramment retrouvées en Grande-Bretagne, en Australie et en Nouvelle-Zélande, alors que des pays comme l'Albanie, la Chine, l'Ethiopie, l'Indonésie ou encore la Turquie étaient beaucoup moins touchés. La dichotomie pays industrialisés *versus* pays en voie de développement est globalement observée, mais pas dans tous les cas. En effet, des pays comme le Chili, le Costa Rica ou le Pérou ont des prévalences équivalentes au Canada ou aux Etats-Unis. La prise en compte des populations immigrées dans les statistiques semble montrer que les facteurs environnementaux sont plus importants que les facteurs génétiques dans l'augmentation de la prévalence de l'asthme allergique.

De plus, il semble que les enquêtes ISAAC ne soient pas parfaitement représentatives. Les centres ISAAC participant aux recherches, souvent situées en ville, reçoivent globalement plus de patients allergiques que les centres d'étude non-ISAAC (PATEL *et al.*, 2008).

Enfin, ces enquêtes mondiales sont souvent très difficiles à interpréter, en raison du grand nombre de biais possibles. Les contraintes de traduction des questionnaires et d'interprétation des réponses notamment, sont autant de facteurs à prendre en considération lors des conclusions à tirer.

La sensibilisation aux allergènes inhalés semble être un processus dynamique dans le temps, avec une évolution nette des IgE produites et des symptômes entre l'âge de 4 et 8 ans (ASARNOJ *et al.*, 2008). La sensibilisation à un allergène en particulier (pollen de bouleau) semble influencer la sensibilisation ultérieure à d'autres allergènes comme les allergènes d'animaux. Cela peut être très intéressant pour des thérapeutiques : désensibiliser précocement un enfant vis-à-vis d'un allergène pourrait-il le protéger d'autres allergies ?

## **B) Facteurs de risque de développement d'une allergie**

L'augmentation récente (quelques dizaines d'années) de l'allergie dans le monde, et notamment au sein des populations occidentales des pays industrialisés semble suggérer un rôle primordial de l'environnement, en relation avec la génétique.

### **1) La théorie hygiéniste**

Selon la théorie hygiéniste, la diminution des infections subies par l'homme au cours de sa vie, par une meilleure hygiène, des meilleurs traitements, et les vaccinations, serait à l'origine d'une réorientation de la réponse immunitaire. En effet, celle-ci s'orienterait alors plus facilement vers une réponse Th2 (SUBBARAO *et al.*, 2009).

### **2) Le sexe des patients**

Il faut noter tout d'abord que les jeunes garçons sont plus touchés par l'hyperréactivité bronchique et l'asthme que les jeunes filles (avant la puberté). Ce ratio s'inverse après la puberté. De même, les femmes présentent des crises d'asthme nécessitant plus d'hospitalisation, et avec une rémission moins bonne que les hommes (SUBBARAO *et al.*, 2009).

### **3) L'exposition aux animaux domestiques**

AICHBHAUMIK *et al.* (2008) ont montré que l'exposition aux animaux domestiques pendant la grossesse influence le taux d'anticorps IgE présentes dans le sang de cordon. Lorsque la mère était exposée à un chien, un chat ou les deux durant sa grossesse, le sang de cordon était significativement moins riche en IgE que si elle ne l'est pas, et ceci quel que soit le nombre d'animaux présents dans la maison. Les personnes ayant des antécédents familiaux d'atopie peuvent volontairement éviter le contact avec les animaux domestiques. En excluant ces mères des analyses statistiques, cette étude a montré que l'association est toujours présente entre exposition à un chien ou un chat et taux d'anticorps diminués. Ceci supportait l'hypothèse d'un effet immunomodulateur précoce de l'exposition aux animaux domestiques, même si le mécanisme d'action est inconnu. Les animaux sont en effet porteurs de nombreux germes qui peuvent aussi avoir un effet immunomodulateur.

Un an plus tard, une autre étude (MANDHANE *et al.*, 2009) a également montré que posséder un chien et un chat peut avoir un effet protecteur, dans des familles possédant un

historique de terrain atopique. Les auteurs ont souligné toutefois le fait que cet effet protecteur n'est pas totalement compris, et peut aussi bien être dû à un effet immunomodulateur du fait de l'exposition à plusieurs allergènes, comme à l'exposition à certaines bactéries présentes sur les deux espèces. De leur côté, KERKHOF *et al.* (2009) ont montré que la présence d'animaux domestiques dans les foyers tôt dans la vie de l'enfant avait un effet protecteur vis-à-vis de la sensibilisation aux allergènes, mais pas vis-à-vis de l'asthme.

Toutefois, une étude (BISGAARD *et al.*, 2008) a réussi à montrer une association significative entre exposition aux chats pendant la première année de vie chez les enfants porteurs d'une mutation perte de fonction pour le gène filaggrin et l'apparition d'eczéma atopique. Leur travail reposait sur l'hypothèse de base qu'une altération de la barrière cutanée serait suivie d'une sensibilisation plus grande aux allergènes, notamment aux allergènes d'origine animale. Cette observation suggère qu'il vaut mieux éviter le contact avec les chats pendant la première année de vie (surtout pour les enfants des familles à risque), mais pas avec les chiens. De plus, GENT *et al.* (2009) ont montré également que, dans les maisons où on trouve des niveaux assez élevés d'allergènes dans les poussières de maison, la sévérité de l'asthme développé par les enfants allergiques était plus importante. Par contre, selon EPSTEIN *et al.* (2011), l'exposition aux chiens aurait un effet protecteur chez les enfants de parents atopiques, alors que ce n'était pas le cas pour les chats.

Enfin, une autre étude à grande échelle (ELLER *et al.*, 2008) souligne le fait que de nombreux paramètres ont pu biaiser toutes ces études, comme par exemple des critères sociaux-économiques des familles observées. En effet, le fait d'avoir un animal chez soi est influencé par de nombreux facteurs, et notamment l'historique d'allergie des parents. Si les familles évitent volontairement le contact avec les animaux, l'interprétation des associations statistiques n'est plus possible. Ils recommandent la plus grande prudence dans l'interprétation de résultats statistiques sur ce genre d'études à grande échelle.

#### **4) L'exposition aux polluants chimiques**

Il est aujourd'hui communément admis que l'environnement semble jouer un rôle important dans le développement de l'allergie, notamment chez les enfants, adolescents, et jeunes adultes. Cependant, les mécanismes par lesquels ce phénomène se produit sont encore mal connus. Les polluants inhalés, les peintures, le tabagisme sont autant de facteurs de risque potentiels de développement d'une hypersensibilité de type I.

CHOI *et al.* (2010) ont proposé une hypothèse selon laquelle l'éther de propylène glycol (PGE), qui contamine l'environnement domestique, serait responsable de l'apparition et/ou de l'amplification des symptômes allergiques (rhinites, asthme) chez les enfants. Cette théorie s'appuie sur l'augmentation significative qu'ils ont observée du taux de PGE dans les chambres des enfants allergiques par rapport aux enfants sains. Cela n'était pas le cas avec d'autres polluants domestiques qu'ils ont étudiés.

#### **C) L'atopie, une prédisposition génétique à l'allergie**

Selon l'OMS (JOHANSSON *et al.*, 2004), l'atopie est « une prédisposition personnelle et/ou familiale, en général pendant l'enfance ou l'adolescence, à devenir sensible et à produire des anticorps IgE en réponse à une exposition normale à des allergènes, généralement des protéines. En conséquence ces personnes peuvent développer des symptômes typiques d'asthme, rhino conjonctivite ou de l'eczéma ». L'atopie est donc un

concept clinique basé sur une réponse en anticorps IgE anormalement forte. Cette prédisposition est souvent familiale.

## 1) La "marche atopique", un concept ancien

Le mode de pénétration d'un allergène dans l'organisme peut être très varié : pénétration transcutanée, dans le tractus gastro-intestinal, ou les voies aériennes.

Le fait que l'apparition de symptômes comme l'asthme ou la rhinite allergique soit souvent précédée par la survenue d'eczéma (dermatite atopique) chez les patients allergiques, a suggéré la résurgence d'une hypothèse qui avait été formulée il y a des décennies au sein des dermatologues. Le concept de "marche atopique", c'est-à-dire de développement d'une maladie allergique d'origine génétique touchant d'abord la peau puis évoluant vers des symptômes respiratoires, est réactualisé. Selon cette théorie, la sensibilisation à l'allergène inhalé pourrait se faire d'abord par voie transcutanée. Les nombreuses sensibilisations croisées des personnes atopiques vis-à-vis d'un allergène donné ont très certainement un rôle important.

## 2) Les gènes prédisposant à l'apparition de l'allergie

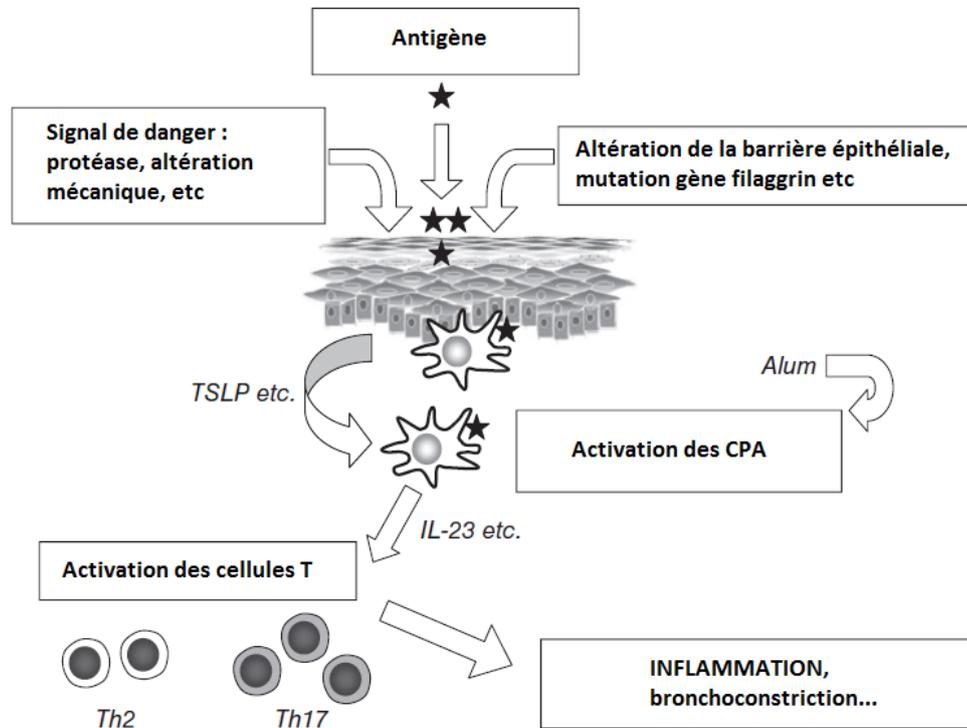
De nombreuses études visent à mettre en évidence des gènes responsables d'une plus grande sensibilité aux allergènes. Plusieurs gènes associés à une plus forte prévalence de l'allergie ont été identifiés à ce jour : *DPP10* (*dipeptidyl peptidase 10*), *ADAM33* (*disintegrin and metalloprotease 33*), *CYFIP2* (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*), *HLA-G* (*major histocompatibility complex, class I, G*), *GPRA* (*G protein-coupled receptor 154*) ou encore *PHF11* (*PHD finger protein 11*), dont la fonction biologique n'est pas toujours connue (SUZUKI *et al.*, 2011). Le gène *filaggrin* codant pour une protéine impliquée dans la perméabilité de la couche cornée de la peau, est aujourd'hui reconnu comme associé à l'apparition de l'asthme. Plusieurs mutations de ce gène (R501X et 2282del4) ont été identifiées. Les hétérozygotes porteurs de ces mutations ont plus de risques de développer une dermatite atopique, plus de risques de développer de l'asthme ou une rhinite allergique par la suite, et plus de risques de présenter des formes sévères d'asthme nécessitant une hospitalisation ou encore des traitements à base de corticoïdes par voie systémique. Un autre gène *ORMDL3* (*ORM1-like 3*) codant pour une protéine régulatrice de la synthèse de lipides (la sphingosine, par exemple, impliquée également dans l'intégrité de la barrière cutanée), est associé à l'apparition d'asthme infantile (OBER et YAO, 2011).

De nombreux allergènes provenant d'acariens ou de champignons par exemple, sont des protéases. Il a longtemps été suspecté, puis prouvé que l'activité protéasique favorisait l'allergénicité d'une molécule, en lui permettant de franchir certaines barrières. Ceci est en accord avec les récentes découvertes sur les gènes prédisposant à l'allergie. Une altération mécanique de la barrière cutanée, due à une mutation génétique, ou encore peut-être à l'action de se gratter par exemple, agit comme un signal de danger vis-à-vis du système immunitaire (SUZUKI *et al.*, 2011). L'exposition à un allergène cutanée via cette voie semble être caractérisée par une augmentation de production d'IL-23 et d'IL-17A à l'origine d'une réponse Th17 en plus de la réponse Th2 précédemment décrite. En fait, la réponse Th17 est associée au degré de sévérité de l'asthme et agit de façon synergique avec la réponse Th2.

Le TSLP (Thymic Stromal LymphoPoietin) est un médiateur libéré par la peau lors d'altération de son intégrité fonctionnelle (blessure, activité protéasique) sans que le

mécanisme de sa synthèse soit connu. Cette molécule oriente elle-aussi vers une réponse inflammatoire de type Th2, via les CPA comme les cellules dendritiques, les mastocytes ou les cellules B (figure 2).

**Figure 2 : Cascade d'événements aboutissant à la réponse immunitaire allergique durant l'exposition à un allergène**



L'apparition de symptômes dans l'allergie est la résultante de plusieurs mécanismes aboutissant à l'activation des cellules T. Les mutations génétiques associées à l'atopie correspondent à des altérations conduisant à l'amplification d'une de ces étapes (d'après SUZUKI *et al.*, 2011).

### III. La mise en place d'une réaction d'HSI

#### A) Les allergènes

##### 1) Caractéristiques générales d'un allergène

Un allergène est un antigène capable d'induire une réaction d'hypersensibilité (REVILLARD, 2001).

Un antigène peut être défini comme une structure moléculaire reconnue par le système hôte (plus précisément par les récepteurs **BCR -B Cell Receptor-** ou **TCR -T Cell Receptor-** des lymphocytes ou bien par un anticorps circulant) et capable d'induire une réponse immunitaire.

Il faut noter qu'un antigène est une molécule pouvant présenter un polymorphisme de structure ; des molécules telles que l'eau, les électrolytes, ou encore l'urée etc.,

communément retrouvées chez la plupart des organismes vivants, ne sont pas des antigènes.

Les caractéristiques d'une molécule qui conditionnent son allergénicité ne sont à l'heure actuelle pas bien connues.

Il est habituel de distinguer les allergènes selon le mode usuel de pénétration dans l'organisme. Les « pneumallergènes » comprennent les pollens végétaux, les acariens, les allergènes animaux (retrouvés sur les poils et les squames), ou encore les allergènes d'insectes ou de moisissures. Les « trophallergènes » regroupent les allergènes alimentaires (présents dans par exemple, l'arachide, l'œuf, le lait, les crustacés, etc). Enfin, les médicaments sont une source non négligeable d'allergènes, de même que les venins d'hyménoptères.

Les allergènes aériens (PLATTS-MILLS *et al.*, 2011) gagnent les voies respiratoires par le biais de particules qui comportent elles-aussi un panel de molécules pouvant avoir un effet sur la réponse immunitaire. Il faut noter que presque tous les allergènes inhalés sont solubles dans l'eau et ont une taille moléculaire de 10 000 à 50 000 Daltons. Cela correspond à la taille que doit avoir une particule pour passer la barrière de la membrane tapissant le nez. Ainsi, cette taille est une condition pour être pris en charge par une cellule dendritique. De plus, la protéine doit être étrangère, et être accompagnée de molécules susceptibles d'être reconnues par récepteurs TLR (Toll-Like Receptors) pour activer la réponse. Ces TLR, sont présents à la surface des cellules dendritiques par exemple.

La particule portant l'allergène tient également un rôle primordial. Ainsi, on suppose que les particules supportant les allergènes du chat (des fragments de peau et de sébum) sont plus petites que la moyenne et restent dans l'air ambiant plus longtemps que d'autres allergènes (PLATTS-MILLS *et al.*, 2011).

## 2) Particularités des allergènes du chat

L'allergène d'origine animale le plus étudié est l'allergène majeur du chat Fel d 1 (cf deuxième partie, II. A) 1)).

Dans les maisons où vivent des chats, la quantité inhalée d'allergène pendant un seul jour équivaut environ à la quantité d'allergènes de pollen inhalés pendant un an (PLATTS-MILLS *et al.*, 2011). Les allergènes de chat sont donc globalement "moins efficaces" pour induire une réponse immunitaire allergique. Le même principe peut être postulé pour les allergènes du chien.

Fel d 1 est véhiculé par des particules dans l'air ambiant des maisons contenant un chat. Ces particules sont plus petites que celles portant d'autres allergènes, et persistent dans l'air ambiant pendant très longtemps. Il en résulte une apparition des symptômes en moyenne plus rapide qu'après l'exposition à d'autres allergènes comme ceux du pollen par exemple. Les patients allergiques aux chats ressentent les effets en moins d'une demi-heure après l'entrée dans un environnement contenant un chat (PLATTS MILLS *et al.*, 2011).

De plus ces mêmes particules sont "collantes" et peuvent être transportées dans des environnements ne contenant pas de chats, comme les écoles, les garderies ou les hôpitaux (CUSTOVIC *et al.*, 1998 ). Des patients n'ayant pas de contact avec des chats peuvent donc développer une allergie.

### 3) La séquence protéique des allergènes

Le lien entre séquence protéique des allergènes et induction de la réponse Th2 n'est pas bien compris (PLATTS-MILLS *et al.*, 2011). Certains allergènes de sources différentes possèdent des épitopes communs reconnus par des personnes atopiques et non-atopiques. Cependant, plusieurs études ont échoué à identifier des épitopes reconnus par des cellules T qui induiraient une réponse en cytokine différente entre sujets atopiques ou non-atopiques (PLATTS-MILLS *et al.*, 2011).

Chez le chat, une étude (REEFER *et al.*, 2004) a réussi à identifier des épitopes majeurs, situés sur la chaîne 2 de l'allergène Fel d 1 du chat (cf Deuxième partie II. A) 1) a.), capables d'induire une réponse IL-10 protectrice, probablement à l'origine de l'effet protecteur de l'exposition au chat avant l'âge de 1 an vis-à-vis de l'allergie. D'autres épitopes sur la chaîne 1 induiraient quant à eux une réponse IL-5. Il a été démontré ici des relations directes entre structure protéique et orientation de la réponse immunitaire. Chez les individus non-allergiques, les cellules T dirigées contre la chaîne 2 seraient présents en plus grande quantité que chez les patients allergiques.

Il est évident que pour faire le rapport entre séquence peptidique et réponse Th2 induite préférentiellement, il faut prendre en compte plusieurs facteurs :

- la nature de l'épitope exprimé pendant la présentation de l'antigène ;
- l'affinité de cet épitope pour un récepteur de CMH II ;
- la densité des complexes peptides-CMH à la surface de la CPA ;
- l'efficacité de la liaison peptide-CMH-TCR résultant.

### 4) L'allergène : une molécule conduisant à la synthèse d'IgE

La principale caractéristique de l'allergie est la persistance des Ig-E et leur haute concentration dans le sang. Dans une infection virale ou bactérienne, de même que pour les vaccins, les IgE ne sont en général pas produites.

La commutation isotypique ou commutation de classe correspond à une recombinaison au niveau des séquences génétiques précédant les gènes de chacune des chaînes lourdes. Chaque cellule B peut ainsi produire différentes chaînes lourdes, c'est-à-dire produire des anticorps possédant la même chaîne légère mais appartenant à des classes différentes (REVILLARD, 2001).

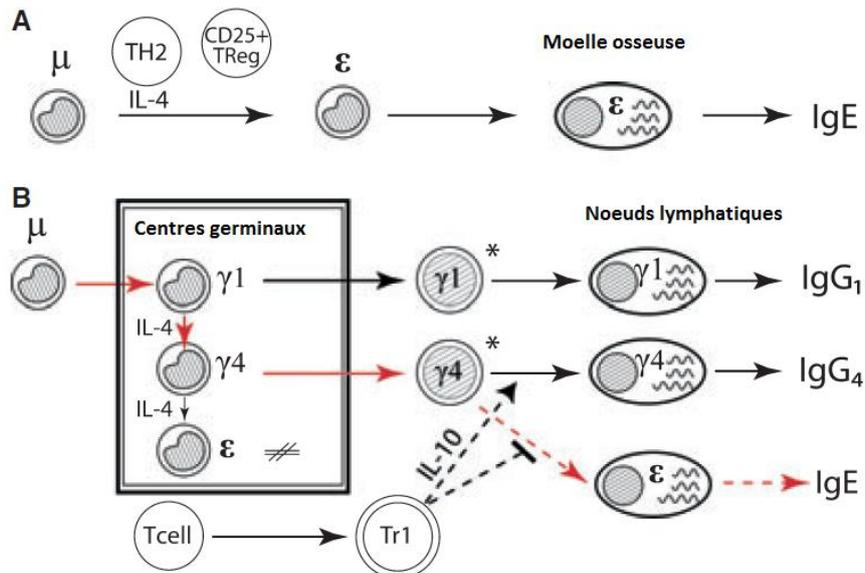
Un aspect important de la recherche actuelle est de comprendre par quelles voies un allergène peut induire une sécrétion d'IgE persistante. Plusieurs hypothèses ont été formulées (AALBERSE *et al.* 2005). Ils partent de l'observation que les cellules B ayant réalisé leur commutation isotypique en  $\epsilon$  ne survivent pas longtemps dans les centres germinatifs (car non protégés de l'apoptose) (KARNOWSKI *et al.*, 2000). En effet, les cellules subissant la commutation de classe doivent subir un certain nombre de divisions cellulaires pendant ce processus, et, pour une raison inconnue, celles-ci sont plus nombreuses lors des commutations en  $\epsilon$  que en  $\gamma$  par exemple. Les divisions cellulaires sont également accompagnées d'un fort taux d'apoptose concernant les cellules ayant subi des dommages de l'ADN. Après la commutation isotypique, la différenciation en cellules plasmiques est plus difficile pour les cellules d'isotype IgE que pour les autres isotypes, en raison d'un défaut d'expression de la forme membranaire d'IgE. Cette déficience entraîne beaucoup plus de mort cellulaire parmi les cellules  $\epsilon$  (GOULD et SUTTON, 2008).

Pour AALBERSE *et al.* (2005), la commutation isotypique des cellules B portant des IgM ( $B\mu$ ) aurait plutôt lieu à l'extérieur des centres germinaux, dans le plasma, donnant

naissance à des précurseurs qui se logeraient dans la moelle osseuse, dans des sites protégés. De plus, avec des doses d'immunisation plus élevées, la commutation isotypique de  $\mu$  vers  $\gamma 1$ ,  $\gamma 4$  dans les centres germinaux pourrait conduire quand même à la mise en circulation de cellules B $\epsilon$  sous la dépendance de l'IL-10 (figure 3).

Un bon allergène serait donc une molécule permettant d'aboutir à la synthèse d'Ig-E par l'une ou l'autre de ces voies. Enfin, il faut noter que la taille et les capacités adjuvantes des particules véhiculant l'allergène ont également une importance fondamentale dans l'orientation de la réponse immunitaire.

**Figure 3 : Deux voies possibles de production d'IgE suite à l'exposition à un allergène**



Deux voies possibles conduisant à la synthèse d'IgE :

A) la commutation isotypique de  $\mu$  en  $\epsilon$  conduit à la production à long-terme d'IgE par des cellules B $\epsilon$  situées dans des sites protégés de la moelle osseuse

B) La commutation isotypique dans les centres germinaux conduit à la formation de cellules B $\epsilon$  qui ne survivent pas car non protégées de l'apoptose. Les cellules B mémoires  $\gamma 4$  (\*) pourraient se différencier en cellules plasmatiques  $\gamma 4$  ou en cellules plasmatiques  $\epsilon$ . Cette voie de production d'IgE est favorisée par l'IL-4 et inhibée par l'IL-10 (d'après PLATTS-MILLS *et al.*, 2011).

TH2 : lymphocyte T helper 2 ; IL : Interleukine ; Ig : immunoglobuline ; Tcell : lymphocyte T ; Tr1 : Lymphocyte T régulateur 1 ; Treg : lymphocyte T régulateur ; CD : Cluster de Différenciation

## B) Les organes

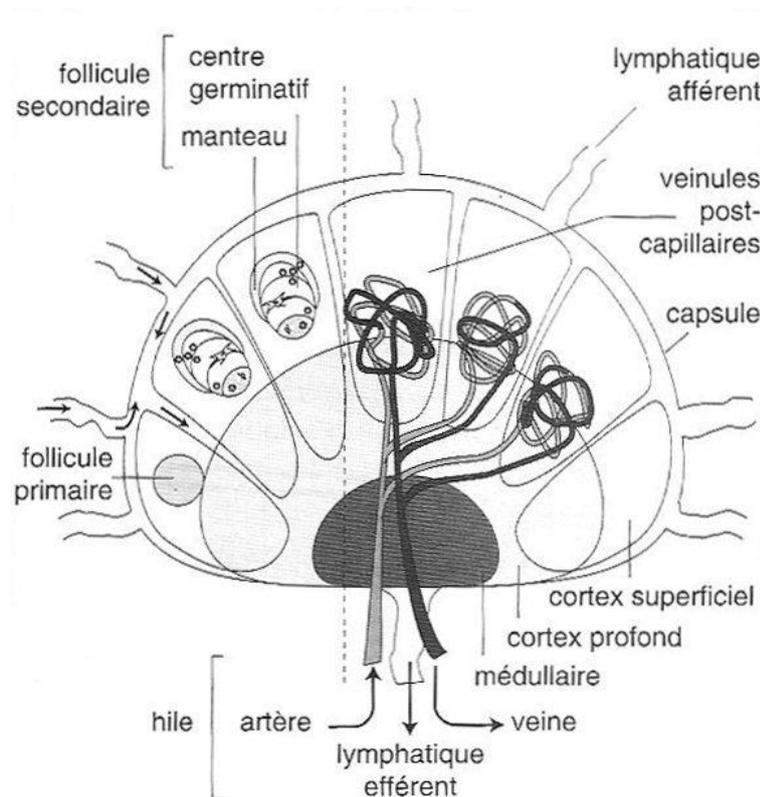
Le système lymphoïde regroupe l'ensemble des cellules impliquées dans l'immunité. Celles-ci peuvent être circulantes, situées dans les différents tissus ou encore dans les tissus et organes lymphoïdes.

Le thymus, lieu de différenciation des lymphocytes T, est un organe formé de deux lobes eux-mêmes constitués de lobules. Il se développe pendant la vie embryonnaire et augmente de taille jusqu'à la puberté. L'involution du thymus a alors lieu au cours de la vie de l'adulte.

La moelle osseuse, quant à elle, est le siège de l'hématopoïèse et de la différenciation des lymphocytes B. Elle contient également la plupart des plasmocytes synthétisant les Ig sériques, ceux-ci survivant plus longtemps dans la moelle osseuse.

Les nœuds lymphatiques, répartis dans tout l'organisme, sont le siège de l'élimination des pathogènes phagocytés par les macrophages et du développement de la réponse spécifique. Leur structure est rappelée dans la figure 4.

**Figure 4 : Structure du nœud lymphatique**



Dans le cortex superficiel se trouvent les follicules primaires et secondaires contenant eux-mêmes les centres germinatifs. Ces centres germinatifs contiennent des macrophages et des cellules dendritiques présentatrices d'Antigènes (Ag) et sont le siège de la différenciation des lymphocytes B activés par l'Ag et de la commutation isotypique. Le cortex profond est le site d'induction des réponses cellulaires T. Enfin, la médulla contient surtout des macrophages et les plasmocytes sécréteurs d'IgM (d'après REVILLARD, 2001).

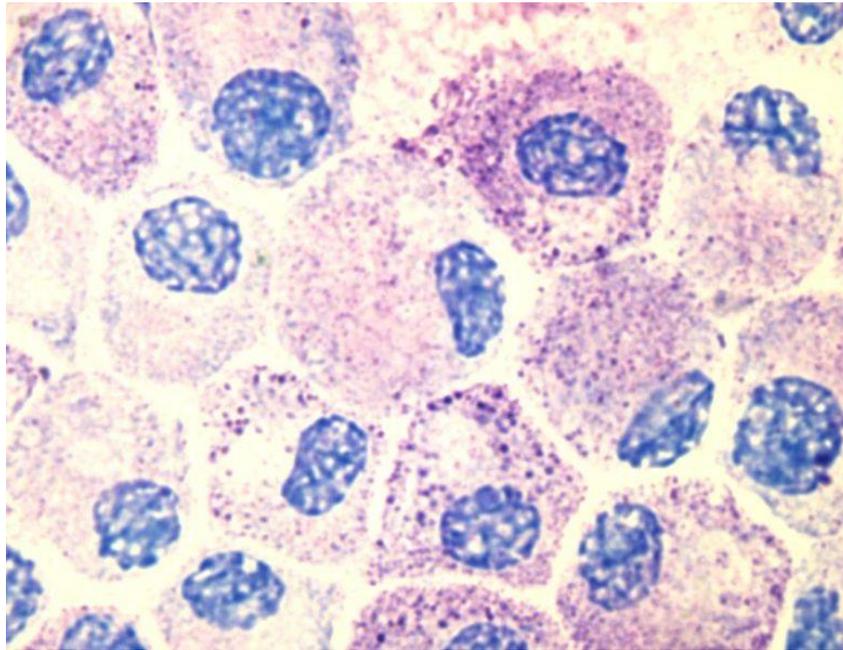
Enfin, on trouve un réseau de tissu lymphoïde associé aux muqueuses diffus dans différents tissus conjonctifs sous-épithéliaux.

## C) Les cellules

### 1) Les mastocytes

Les mastocytes conjonctifs et muqueux (figure 5) sont, comme on l'a vu précédemment, les principales cellules impliquées dans l'hypersensibilité de type I. Ces cellules occupent un rôle central dans l'allergie, puisque la dégranulation consécutive à l'exposition à un allergène, est responsable d'une libération dans le milieu extra-cellulaire de molécules ayant des effets variés (THEOHARIDES *et al.*, 2006).

**Figure 5 : Photographie de mastocytes**



Mastocytes colorés au bleu d'aniline. Ses granules cytoplasmiques apparaissent colorées en violet foncé (source fr.wikipedia.org).

#### ***a) Les mastocytes : des cellules impliquées dans les réactions inflammatoires et allergiques***

Les mastocytes sont présents dans tout l'organisme : la peau, le tractus gastro-intestinal, les voies aériennes, le cerveau, le péritoine etc (KINET 2007). On distingue les mastocytes du tissu conjonctif et les mastocytes muqueux, qui présentent des différences notables. Les mastocytes conjonctifs distribués de manière ubiquitaire sont riches en histamine, leucotriènes et produisent le leucotriène 4 (LTC<sub>4</sub>) après activation. Les mastocytes muqueux sont situés dans les poumons et l'intestin et possèdent un nombre élevé de récepteurs aux IgE à leur surface. Ils contiennent également des IgE intracytoplasmiques, de la chondroïtine sulfate et produisent des prostaglandines PGD<sub>2</sub> (prostaglandine D<sub>2</sub>).

Les mastocytes sont produits dans la moelle osseuse, sous la dépendance de l'IL-3 et surtout de l'IL-4. Ils possèdent à leur surface des récepteurs RFCεI (récepteurs de Fragment Constant ε I) de haute affinité qui, une fois liés aux complexes IgE-antigènes, induisent leur dégranulation et la synthèse de médiateurs néoformés.

Les mastocytes ont un rôle central dans les réactions d'allergie et de défense contre les parasites.

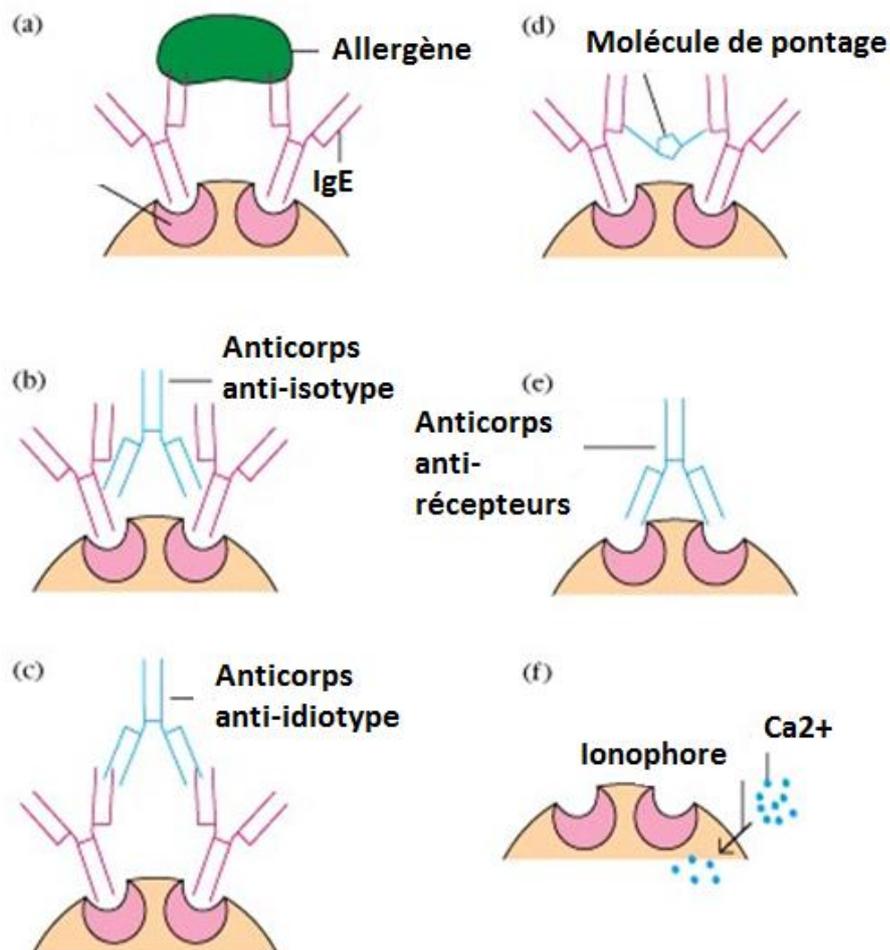
#### ***b) Les granules des mastocytes***

Deux types cellulaires peuvent être distingués en fonction de leur contenu en protéases : uniquement de la tryptase pour les premiers ou tryptase, chymase et carboxypeptidase pour les seconds. Ces types cellulaires correspondent à peu près respectivement aux mastocytes muqueux et conjonctifs.

### c) Mécanisme de dégranulation

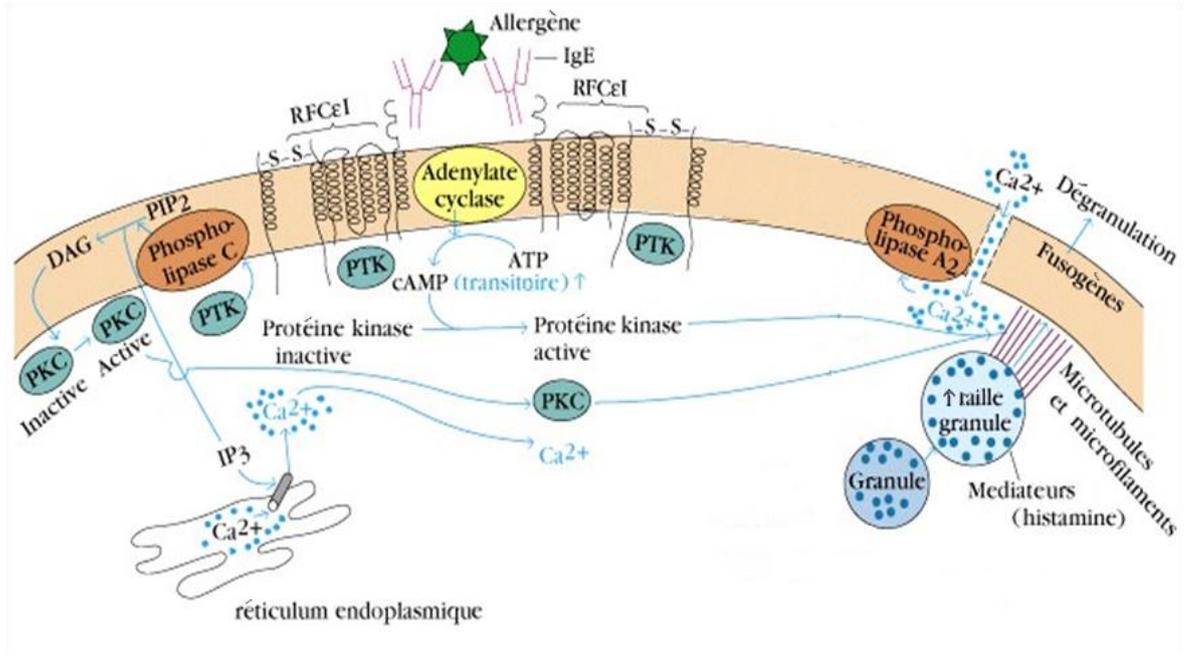
La dégranulation des mastocytes se produit lors du pontage des RFC $\epsilon$ 1 avec des IgE liés aux allergènes (figure 6). Deux IgE peuvent s'agréger à la surface des mastocytes en reconnaissant deux épitopes différents d'un même allergène, deux épitopes identiques sur un même allergène, ou encore le même épitope sur deux allergènes qui sont liés entre eux par un troisième anticorps. Le pontage des récepteurs induit une cascade de réactions chimiques aboutissant à la dégranulation (figure 7). Celle-ci nécessite deux étapes : une étape de migration des granules vers la membrane cellulaire, puis une étape d'exocytose de ces granules (THEOHARIDES *et al.*, 2007). La première est calcium-indépendante, la seconde calcium-dépendante.

Figure 6 : Les différents mécanismes conduisant au pontage des récepteurs RFC $\epsilon$ 1 et à l'activation des mastocytes



Le pontage des récepteurs d'IgE peut impliquer plusieurs mécanismes : a) Deux IgE reconnaissant deux épitopes de l'allergène sont juxtaposées au hasard sur des RFC $\epsilon$ 1 de surface ; b) et c) et e) Le pontage peut être réalisé respectivement par des anticorps anti-IgE (anti-isotype ou anti-idiotype) ou par des anticorps anti-chaîne  $\alpha$  du RFC $\epsilon$ 1 (Récepteurs de Fc de haute affinité) ; d) le pontage entre deux IgE reconnaissant chacun un épitope unique de l'allergène est réalisé et le pontage est réalisé par une molécule de pontage ; f) l'activation des récepteurs a lieu sans liaison avec l'IgE grâce à une entrée massive de  $Ca^{2+}$  dans la cellule (d'après KINDT *et al.*, 2008).

Figure 7: Cascade de réactions aboutissant à la dégranulation des mastocytes



Le pontage des récepteurs RFCεI induit une cascade de réactions à l'intérieur des mastocytes aboutissant à une entrée de Calcium à l'intérieur de la cellule.

PKC : Protéine Kinase C, PTK : *protein tyrosine kinase*, IP3 : inositol triphosphate, ATP : adenosine triphosphate, IgE : Immunoglobuline de classe E, RFCεI : récepteur de fragment constant ε I, cAMP : adénosine monophosphate cyclique, PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-2-phosphate, DAG : *dimeric acidic*

Les effets des principaux médiateurs libérés lors de la dégranulation sont résumés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Récapitulatif des médiateurs libérés par les mastocytes lors de leur activation (d'après THEOHARIDES *et al.*, 2007)**

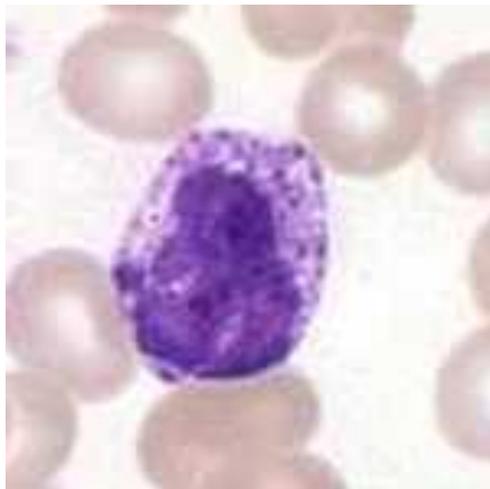
	Médiateurs libérés	Effets principaux
Préformés	Histamine	Récepteurs <b>H1</b> : contraction des fibres musculaires lisses bronchiques intestinales utérines, parois vasculaires, hypersécrétion de mucus (bronches) <b>H2</b> : rétrocontrôle négatif (diminution du chimiotactisme et de la libération d'enzymes par les polynucléaires) <b>H3</b> : modulation de la transmission de neurotransmetteurs au extrémités présynaptiques
	Sérotonine	Vasoconstriction, douleur, régulation des leucocytes
	Cytokines : IL-8, <i>monocytes chemoattractant proteins</i> (MCP-1, MCP-3, MCP-4), RANTES ( <i>regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted</i> )	Chimiotactisme et infiltration des leucocytes
	<b>ENZYMES :</b>	
	Arylsulfatases	Hydrolyse des lipides et protéoglycanes
	Carboxypeptidase A	Dégradation des peptides
	Pro-caspase 3,4	
	B-Hexosaminidase	Dégradation des glucides
	Kinogénases	Synthèse des kinines, douleur
	Métalloprotéases	Dégradation des tissus
	NO synthase	Production de Monoxyde d'Azote
	Peroxydases	Productions de radicaux libres
	Phospholipases	Inflammation, formation d'acide arachidonique
	Tryptases	Inflammation, douleur, dégradation des tissus, activation des PAR, dégradation des peptides et antigènes
	<b>POLYPEPTIDES :</b>	
	CRH ( <i>Corticotropin Releasing hormone</i> )	Vasodilatation, inflammation libération par les mastocytes du VEGF
	Endorphines	Analgésie, modulation de l'activité des leucocytes
	Endotheline	Sepsis
	Bradykinine	Douleur, inflammation, vasodilatation, activation des mastocytes
	Somatostatine	Anti-inflammatoire ?, activation des mastocytes
	Substance P	activation des mastocytes, inflammation, douleur
	VEGF ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )	Néovascularisation, vasodilatation
	Peptide intestinal vasoactif	Vasodilatation, activation des mastocytes
	<b>PROTEOGLYCANES</b>	
	Chondroïtine sulfate	Anti-inflammatoire, inhibiteur des mastocytes
	Héparine	Angiogenèse, inhibiteur des mastocytes
	Acide hyaluronique	
Néoformés	<b>CYTOKINES</b>	

IL-1, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -13, -16 (Interleukines)	Inflammation, migration des leucocytes, douleur
IFN- $\gamma$ (Interféron $\gamma$ ), MIF ( <i>Macrophage migration inhibitory Factor</i> ), TNF- $\alpha$ ( <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )	Inflammation, prolifération et activation des leucocytes
<b>FACTEURS DE CROISSANCE</b>	
SCF ( <i>Stem Cell Factor</i> ), GM-CSF ( <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i> ), GnRH-I ( <i>Gonadotropin releasing hormone</i> ) b-FGF ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> ), NGF ( <i>Nerve Growth Factor</i> ), VEGF ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )	Croissance de nombreuses cellules, prolifération des mastocytes
<b>METABOLITES DES LIPIDES</b>	
LTB <sub>4</sub>	Chimiotactisme des leucocytes
LTC <sub>4</sub>	Vasoconstriction, douleur
PAF ( <i>platelet activating factor</i> )	Activation des Plaquettes, vasodilatation, inflammation
PGD <sub>2</sub>	Bronchoconstriction, douleur
<b>NO (Monoxyde d'Azote)</b>	Vasodilatation, neuromodulateur

## 2) Les granulocytes basophiles dans l'allergie

Les basophiles (figure 8), découverts par l'immunologiste Paul Ehrlich vers 1877, sont présents en très petite quantité dans le sang (<1% des leucocytes) (SCHROEDER, 2011). Dans les années 50, on découvre que les IgE se lient aux basophiles avec une haute affinité et que ceux-ci libèrent de l'histamine. Ils sont morphologiquement et fonctionnellement proches des mastocytes, ce qui a conduit certains chercheurs à soupçonner qu'ils appartiennent à un seul et même type cellulaire (figure 8). Cependant, il apparaît aujourd'hui que les basophiles sont plus proches des éosinophiles que des mastocytes. Leur demi-vie étant d'environ 2 jours, et leurs fonctions semblables à celles des cellules mastocytaires, il a longtemps été considéré qu'ils ne jouaient qu'un rôle redondant par rapport aux mastocytes et aux éosinophiles. Cependant, ils ont toujours été associés avec des réponses immunitaires Th2, l'activité anti-helminthique, et dans l'hypersensibilité retardée chez l'homme. De la même manière que les mastocytes conjonctifs, les basophiles expriment à leur surface les récepteurs RFC $\epsilon$ .

**Figure 8: Photographie d'un granulocyte basophile**



Granulocyte basophile : les granules se colorent en bleu foncé en coloration acido-basique usuelle (source fr.wikipedia.org).

Les basophiles ont la capacité de pouvoir sécréter de l'IL-4 et de l'IL-13 en grande quantité, ce qui semble montrer leur rôle dans l'induction et ou le maintien de la réponse Th2 dans la maladie allergique. De récentes études chez la souris ont montré que les basophiles pourraient avoir une activité présentatrice d'antigène qui aurait un rôle fondamental dans la mise en place et l'amplification de l'inflammation allergique (YOSHIMOTO *et al.*, 2009).

Ils sont produits dans la moelle osseuse et sont libérés dans la circulation générale sous forme de granulocytes matures. Les granules situés dans le cytoplasme de ces cellules contiennent des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, quel que soit le statut (allergique ou non) des patients. Ils renferment également des formes actives de tryptase  $\alpha$  et  $\beta$  (comme le mastocyte), des protéases comme la cathepsine G, ou d'autres médiateurs de l'inflammation comme le granzyme B. Toutes ces substances sont libérées lors de la dégranulation des basophiles.

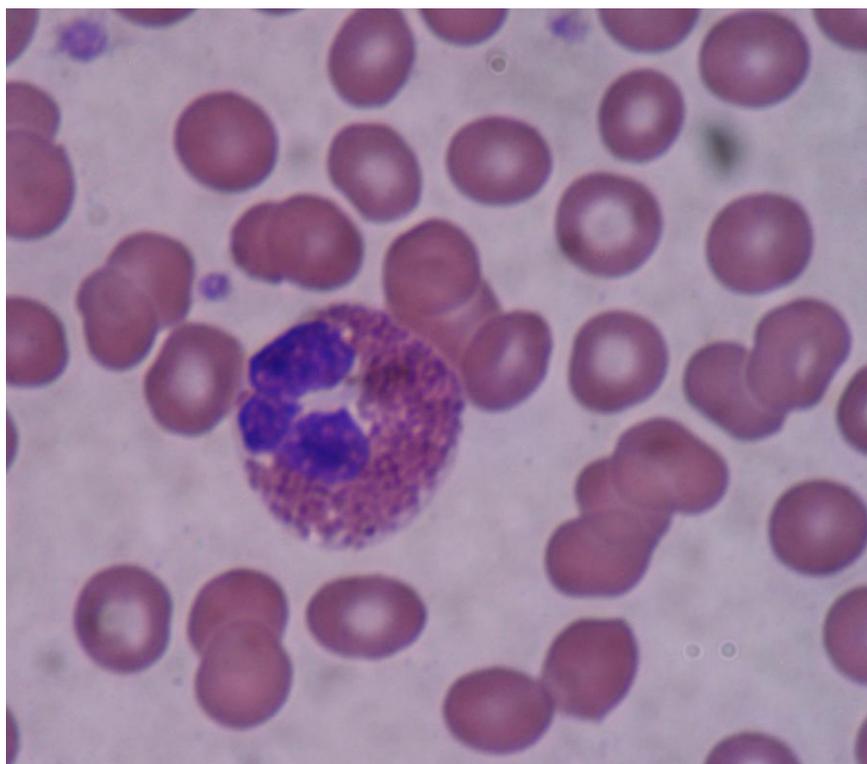
En plus de la dégranulation, les basophiles activés synthétisent de nouvelles molécules : les leucotriènes (LTC4 en majorité) et des cytokines (IL-4 et IL-13)

Les basophiles infiltrent les tissus suite à une réponse allergique à l'exposition d'un allergène. Les granulocytes basophiles ont été retrouvés en plus grande quantité, par exemple, dans les poumons de patients décédés à cause de l'asthme (KEPLEY *et al.*, 2001). Ce n'est pas le cas des cellules mastocytaires.

### **3) Les granulocytes éosinophiles dans l'allergie**

Découverts également par Paul Ehrlich en 1879, les éosinophiles (figure 9) ont toujours eu un rôle ambigu parmi les leucocytes (KITA, 2011). Leur nom provient de l'aspect que ces cellules prennent lorsqu'elles sont marquées par le colorant "éosine". Ils sont retrouvés notamment lors d'infestations parasitaires et lors de maladies allergiques.

**Figure 9 : Photographie d'un granulocyte éosinophile humain**



Les granulocytes éosinophiles sont caractérisés par l'aspect rosé de leurs granules cytoplasmiques lors de coloration à l'éosine (source : fr.wikipedia.org).

#### ***a) Production et développement***

Les éosinophiles sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules souches pluripotentes capables de donner naissance à des colonies de basophiles, d'éosinophiles, ou de colonies mixtes. La multiplication et la différenciation des cellules est sous la dépendance de plusieurs éléments régulateurs, notamment le GATA-1 (Protéine 1 de liaison à la séquence GATA). Parmi les facteurs hématopoïétiques, l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF (Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et Monocytes) ont un rôle important. L'IL-3 et le GM-CSF stimulent indifféremment la prolifération des neutrophiles, éosinophiles et basophiles, tandis que l'IL-5 ne stimule que la production d'éosinophiles.

#### ***b) Localisation et rôle des éosinophiles***

Les éosinophiles, bien que retrouvés dans la circulation périphérique, sont des cellules résidentes des tissus. Les éosinophiles sont retrouvés dans la gorge, les glandes mammaires, l'utérus, le thymus et la moelle osseuse des patients sains. De plus ils sont présents de façon physiologique dans le tractus gastro-intestinal grâce à l'expression constitutive de l'éotaxine-1 et des récepteurs à la cytokine chimio-attractante CCR3 (C-chemokine receptor type 3).

Le rôle des éosinophiles constitutifs a été peu étudié. Ils auraient un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie.

- Un rôle nouveau : l'éosinophile comme acteur de la régulation de la réponse immunitaire

Les éosinophiles ont longtemps été considérés comme des effecteurs de la réponse immunitaire, notamment de la réponse Th2. Il est aujourd'hui reconnu qu'ils peuvent avoir des fonctions régulatrices de la réponse immunitaire.

Ils possèdent une fonction présentatrice d'antigènes via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité CMH II, interagissent physiquement avec les cellules T CD4 + et expriment des molécules costimulatrices comme le CD80 (*Cluster of Differentiation 80*), CD86 et CD40 (SPENCER et WELLER, 2010).

Les éosinophiles sécrètent des cytokines dites "autocrines" (ayant une action sur l'éosinophile lui-même) : l'IL-3 et le GM-CSF. Les autres cytokines produites peuvent influencer les cellules des tissus ou d'autres cellules immunitaires. Ils sont notamment capables de produire de l'IL-4 dans les voies aériennes, la peau des patients allergiques, des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) ou encore des cytokines chimio-attractantes. Les éosinophiles, par le biais des nombreuses molécules qu'ils sont capables de produire, sont donc soupçonnés aujourd'hui d'être impliqués dans de nombreux domaines, du remodelage tissulaire à l'activation des cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes.

Enfin, les éosinophiles sécrètent des médiateurs capables d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2, en favorisant l'apoptose des cellules Th1.

- Le granulocyte éosinophile : une cellule effectrice proinflammatoire et destructrice

Toutes les considérations précédentes ne doivent pas faire oublier que les éosinophiles ont un rôle d'effecteur de la réponse inflammatoire allergique. Les éosinophiles sont des leucocytes résidents dans les tissus muqueux. Pendant la réaction inflammatoire de type Th2, ils sont recrutés de la moelle osseuse et du sang et se rendent sur les sites de la réponse immunitaire. Ils y produisent des cytokines et des médiateurs qui peuvent réguler la réponse immunitaire, et libèrent également des protéines cytotoxiques pouvant altérer les tissus environnant.

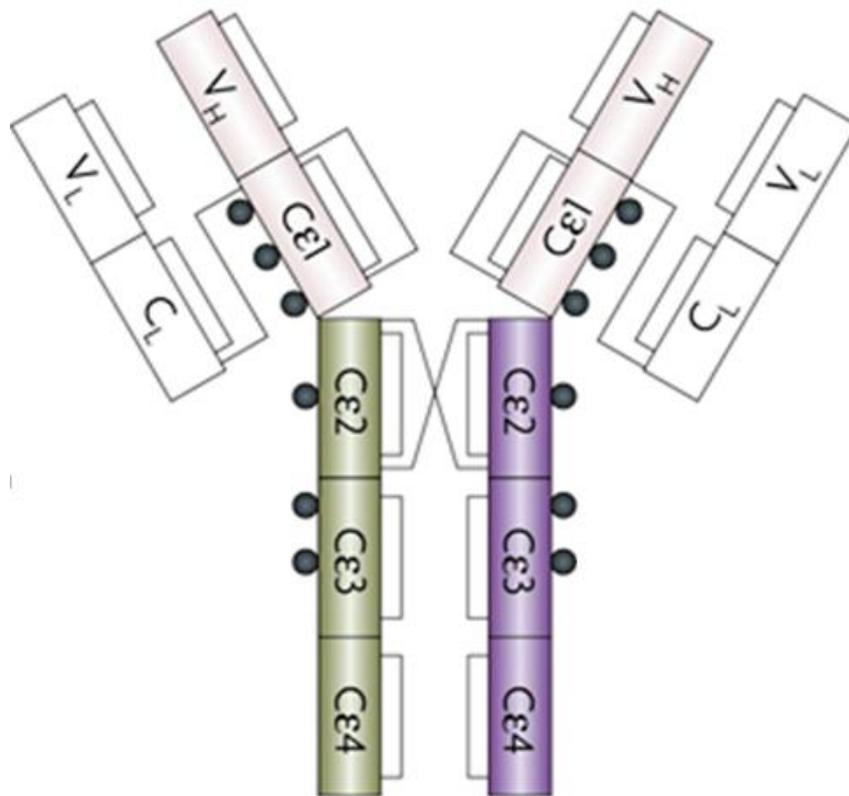
Parmi les effecteurs sécrétés par les éosinophiles, citons la protéine basique majeure (MBP), le MBP2, la protéine cationique éosinophilique (ECP), la peroxydase éosinophilique (EPO), la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN), et la b-glucuronidase.

La MBP a un rôle majeur de cytotoxicité active sur certains parasites et bactéries et envers les cellules en altérant l'intégrité de la membrane cytoplasmique. La MBP 2 est un analogue de la MBP ayant des effets similaires à la MBP. L'ECP est également une protéine basique toxique pour les parasites, virus et bactéries. L'EDN est une neurotoxine très puissante à activité ribonucléasique. L'EPO appartient à la famille des peroxydases et participe à la fabrication de composés oxydants et de radicaux libres toxiques pour les cellules au contact de l'éosinophile (KITA, 2011).

## D) Les anticorps : les immunoglobulines de classe E

Les IgE impliquées dans l'hypersensibilité de type I sont des molécules possédant la fonction anticorps et appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Une immunoglobuline est composée de deux chaînes lourdes ou H (Heavy) associées à deux chaînes légères ou L (Light), le tout formant une structure en Y (figure 10).

**Figure 10 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de classe E**



L'immunoglobuline de classe E : les différents domaines sont représentés : le domaine C<sub>H</sub>2 constitue la principale différence avec l'IgG et serait responsable d'une conformation tertiaire "pliée" de la molécule. Les cercles gris représentent les sites de N-glycosylation (d'après GOULD et SUTTON, 2008).

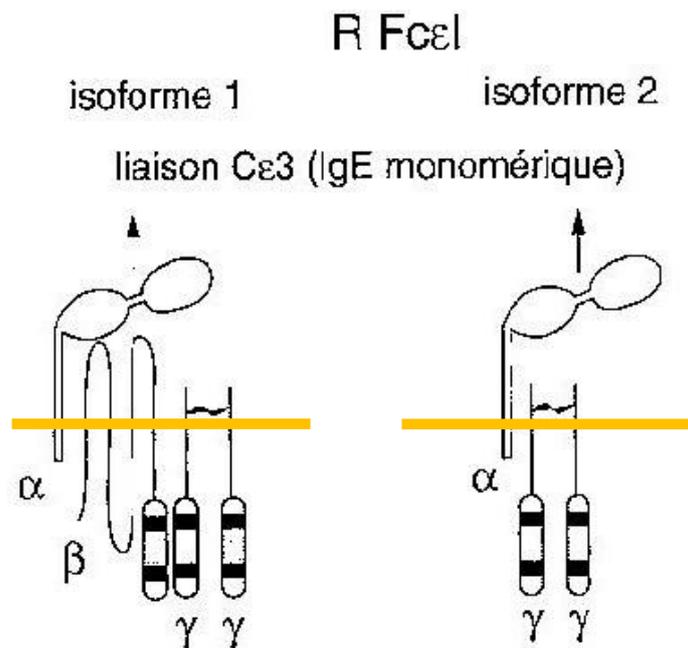
Chez l'Homme, les chaînes lourdes peuvent être de plusieurs natures :  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$  déterminant la classe et la sous classe de l'immunoglobuline (respectivement A, G1, G2, G3, G4, M, D et E)

Les IgE se fixent sur les récepteurs de haute affinité RFC<sub>H</sub>1 (figure 11) présents sur les mastocytes, les basophiles et dans une moindre mesure sur certains macrophages, éosinophiles et cellules de Langerhans. Ils se fixent aussi sur les récepteurs de faible affinité RFC<sub>H</sub>2 et CD23 des éosinophiles, plaquettes, macrophages, cellules de Langerhans et lymphocytes B.

Le RFE $\epsilon$ 1 est fortement impliqué dans les réactions anaphylactiques. La densité des RFE $\epsilon$ 1 à la surface des cellules est conditionnée par la concentration plasmatique en IgE, qui augmente en cas d'allergie. En fixant l'IgE, le RFE $\epsilon$ 1 évite sa dégradation rapide.

L'isoforme 1 du RFE $\epsilon$ 1, contenant la chaîne  $\beta$  est indispensable pour que l'activation cellulaire ait lieu. L'isoforme 2 a surtout pour rôle l'internalisation des complexes IgE-Ag et la présentation des Ag (il est présent, par exemple, sur les cellules dendritiques). Cette chaîne  $\beta$ , qui a un rôle central, possède des allèles associés aux réactions d'hypersensibilité de type 1.

Figure 11 : Le RFE $\epsilon$ 1 : deux isoformes possibles



Les isoformes 1 sont présents sur les mastocytes et les basophiles, les isoformes 2 sur les monocytes, macrophages, éosinophiles, les cellules dendritiques. Seule une partie de ces cellules porte l'isoforme 1. Lors d'atopie, ce ratio augmente et l'isoforme 1 est retrouvé plus fréquemment. La chaîne  $\beta$  uniquement présente sur l'isoforme 1 conditionne l'activation cellulaire nécessaire à la réponse allergique (d'après REVILLARD, 2001).

## E) Les mécanismes pathogéniques

### 1) La réponse immunitaire innée dans la réaction allergique

Le système immunitaire inné constitue une première barrière entre l'organisme et les agressions extérieures. Il est composé de cellules et de molécules particulières, mais également de tous les obstacles physiques à la pénétration des microorganismes comme la peau, les phanères, etc.

Dans l'appareil respiratoire, les premiers obstacles que rencontre l'allergène sont les cils présents sur la paroi des voies respiratoires supérieures (MINNICOZZI *et al.*, 2011). Après ce premier contact, le système immunitaire inné va éliminer l'allergène, induire une réponse

inflammatoire, une tolérance, ou une réponse immunitaire acquise. Lorsque les particules inhalées ont une taille supérieure à 10 $\mu$ m, elles se déposent dans les voies respiratoires hautes où elles entrent en contact avec le mucus qui recouvre les cellules épithéliales. Dans ce mucus se trouvent des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui reconnaissent les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) présents sur les organismes pathogènes intrus. Si l'allergène parvient à contourner ces premières difficultés, il entre en contact avec les cellules épithéliales et dendritiques présentes dans le poumon. Ces cellules possèdent elles-mêmes des PRR qui reconnaissent les PAMPs voire les allergènes. Si les particules sont encore plus fines (<5 $\mu$ m), elles peuvent gagner directement les alvéoles où elles rencontreront les cellules épithéliales, des PRRs sécrétés, et des macrophages alvéolaires.

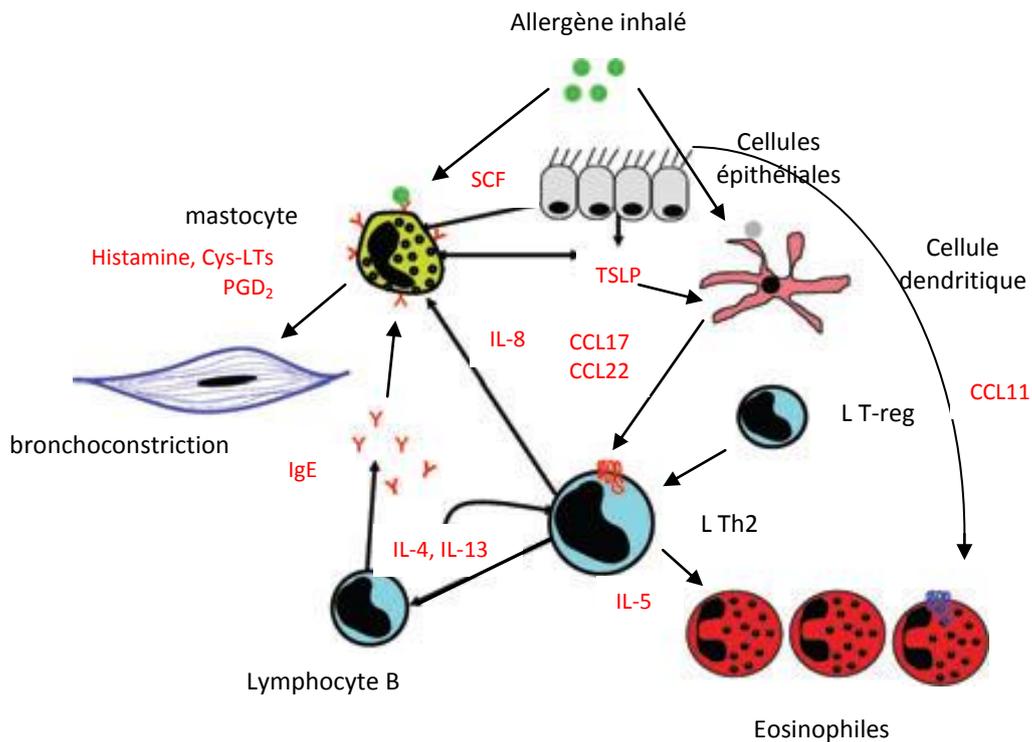
## 2) L'inflammation dans l'allergie aux carnivores domestiques

L'inflammation est évidemment au cœur de la réaction allergique (figure 12), et ceci dans toutes les formes cliniques. L'inflammation allergique est la résultante d'interactions complexes entre des cellules inflammatoires (mastocytes, granulocytes basophiles, lymphocytes, cellules dendritiques, granulocytes éosinophiles, et parfois neutrophiles) mais les raisons pour lesquelles l'inflammation est maintenue ne sont pas complètement connues. Elle repose sur des mécanismes dépendants de l'IgE.

### - *Mécanismes généraux de l'inflammation allergique*

Les cellules mastocytaires jouent un rôle primordial dans l'initiation de l'inflammation allergique (BARNES, 2011). En effet, elles sont directement activées par l'allergène, conduisant à une libération rapide de médiateurs préformés et néoformés à l'origine de bronchoconstriction, vasodilatation, et exsudation plasmatisque. Ces phénomènes conduisent aux symptômes de l'asthme (éternuements et dyspnée) ou de la rhinite allergique (augmentation des sécrétions nasales). C'est l'activation des mastocytes qui conduit aux symptômes, même lorsque celle-ci n'est pas causée par un allergène, mais d'autres facteurs (froid ou variations d'osmolalité dans l'asthme induit par l'effort). Les mastocytes muqueux sont maintenus à la surface des muqueuses par des cytokines comme l'IL-9 et le SCF (Stem-Cell Factor). S'il est donc clair qu'ils jouent un rôle primordial au début des symptômes, leur importance dans le maintien de la réponse immunitaire et dans l'inflammation allergique chronique est incertaine.

**Figure 12 : L'inflammation allergique**

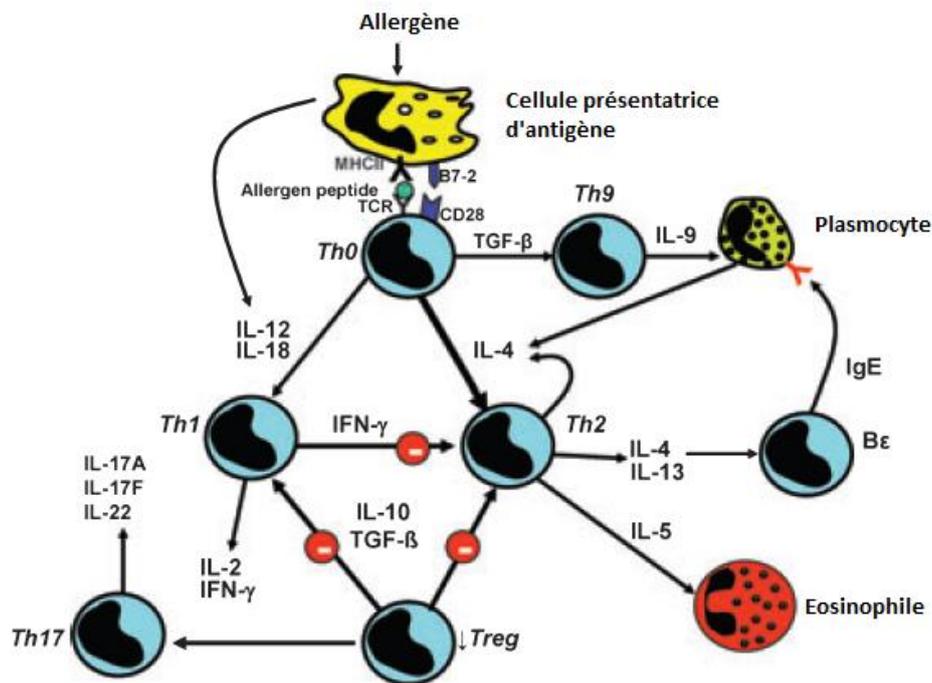


L'allergène inhalé active les mastocytes pré-sensibilisés. Ceux-ci libèrent des médiateurs de bronchoconstriction comme l'histamine, la prostaglandine D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) et des leucotriènes (LT). Les cellules épithéliales sécrètent le SCF (Stem-Cell Factor) contribuant à maintenir les mastocytes dans la région. La TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) sécrétée par les mastocytes et les cellules épithéliales permet à la cellule dendritique ayant pris en charge l'antigène de sécréter CCL17 (C-C chemokine Ligand 17) et CCL22, les chimiokines permettant d'attirer les cellules T-helper 2 (Th2). Celles-ci libèrent des interleukines entretenant l'inflammation. Les éosinophiles sont recrutés par le biais des cellules épithéliales qui sécrètent la chimiokine CCL11 (d'après BARNES, 2011).

Les lymphocytes T ont de nombreuses fonctions dans l'inflammation allergique. Les cellules Th2, prédominantes dans la réaction allergique, ont vraisemblablement un rôle coordinateur de l'inflammation. Elles libèrent notamment des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 ou l'IL-13 qui vont entretenir l'inflammation. Elles sont recrutées par les CPA et notamment les cellules dendritiques, qui les activent via la sécrétion de CCL17 et CCL22, des chimiokines. Cependant, les cellules dendritiques ne sécrètent pas l'IL-4 pourtant nécessaire à la différenciation des lymphocytes Th2. Les basophiles jouent certainement un rôle dans ce processus en sécrétant de l'IL-4 dans les nœuds lymphatiques.

D'autres lymphocytes T jouent également un rôle dans l'inflammation allergique, résumés dans la figure 13.

**Figure 13 : Les lymphocytes T ont un rôle coordinateur de l'inflammation allergique**



Les lymphocytes Th2 ont un rôle central dans l'inflammation allergique et sont prépondérants par rapport aux cellules Th1. Les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules Th17 ont respectivement un effet inhibiteur et pro inflammatoire. Les cellules Th9 sécrètent l'IL-9 indispensable à la différenciation des mastocytes (d'après BARNES 2011) IFN : Interféron ; TCR : *T-cell receptor*.

Les granulocytes éosinophiles, stimulés par l'IL-5 libérée par les cellules Th2, contribuent à l'inflammation en libérant des cysteinyl-leucotriènes, mais dans une moindre mesure que les mastocytes. Ils auraient également une fonction présentatrice d'antigène et produiraient des cytokines Th1 et Th2. Des traitements anti-IL-5 réduisent l'intensité de l'asthme et réduisent les doses de corticoïdes nécessaires pour soulager les patients lors des crises sévères (BARNES, 2011).

Les lymphocytes B, localisés dans les nœuds lymphatiques, synthétisent les IgE au cœur de l'inflammation allergique. Cette synthèse est régulée par l'IL-4 et l'IL-13 et serait peut-être accrue par l'IL-9. Une synthèse locale d'IgE pourrait avoir lieu dans les voies aériennes. Les lymphocytes B agissent aussi en tant que CPA.

Le rôle des granulocytes éosinophiles dans l'inflammation allergique a été très peu étudié.

### - Les médiateurs de l'inflammation

De très nombreuses molécules sont impliquées dans l'inflammation. L'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes ou les kinines ont des effets broncho-constricteurs, augmentent la sécrétion de mucus et attirent les autres cellules inflammatoires. Tous les médiateurs ont des effets multiples et parfois redondants, ce qui rend difficile l'étude de leurs effets individuels. De plus, les traitements agissant sur un seul médiateur sont souvent inefficaces, ou uniquement efficaces sur certaines formes cliniques. Ainsi, si les anti-

histaminiques réduisent l'intensité des rhinites allergiques, ils sont sans effet sur l'asthme. C'est l'inverse pour les anti-leucotriènes (BARNES, 2011).

Parmi cette multitude d'intervenants, on peut distinguer :

- les substances lipidiques. Les cystéines-leucotriènes (Cys-LT) sont des bronchoconstricteurs impliqués dans la pathogénie de l'asthme. Des antagonistes des récepteurs à Cys-LT1 sont utilisés pour traiter l'asthme. Les Leucotriènes B4 ont également un rôle important, en attirant sur place les éosinophiles, mais aussi en activant les cellules T. Les prostaglandines ont aussi été largement étudiées. La PGD<sub>2</sub> est libérée en grande quantité par les cellules mastocytaires et agit sur des récepteurs des cellules musculaires lisses des voies aériennes pour provoquer une bronchoconstriction. Elle agit aussi en dilatant les vaisseaux et attirant les cellules Th2, les éosinophiles et les basophiles, expliquant le lien entre dégranulation des mastocytes et inflammation allergique ;
- le réseau des cytokines permet d'orchestrer et d'entretenir la réaction inflammatoire. L'allergie est caractérisée par la production des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13) sécrétées par les cellules Th2, mais aussi par les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et certaines cellules structurelles. L'IL-4 et l'IL-13 occupent un rôle central puisqu'elles sont nécessaires à la commutation isotypique des cellules B. L'IL-5 est, elle, indispensable à la différenciation et la survie des éosinophiles. D'autres cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α, GM-CSF) sont connues pour amplifier l'inflammation. Enfin, la TSLP, (Thymic Stromal Lymphopoietin) est soupçonnée d'être au cœur de l'initiation de l'inflammation, car elle est sécrétée par les cellules épithéliales. Elle entraîne la différenciation des cellules dendritiques en cellules matures qui ont pour rôle d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th2 (via CCL17 et CCL22). La TSLP favorise également la transcription de l'IL-4 dans les cellules Th2, la production d'IL-13 par les cellules mastocytaires, le recrutement des éosinophiles, et amplifie la réponse des basophiles. D'autres cytokines comme l'IL-25 et l'IL-33 sont également impliquées (BARNES, 2011).

### 3) La réponse immunitaire locale dans la réaction allergique

La réponse immunitaire au niveau des muqueuses, classiquement associée aux anticorps IgA, tient une place importante dans la rhinite allergique (DEMOLY *et al.*, 1998). Cependant, les IgA ont un rôle ambigu et mal compris dans l'allergie. Dans la muqueuse nasale, les CPA, constituées principalement des cellules des lignées myéloïdes (monocytes-macrophages et cellules dendritiques), présentent l'allergène remanié aux lymphocytes des tissus lymphoïdes.

Cela est possible grâce à la présence des Tissus Lymphoïdes Associés aux muqueuses (MALT) ou plus précisément au NALT (Tissu Lymphoïde Associé au Nez), organe lymphoïde secondaire présent dans les muqueuses. Ce NALT a un rôle d'alerte et permet à la muqueuse d'être plus qu'une simple barrière physique au passage d'un antigène.

## F) Les symptômes

Les expressions cliniques de l'hypersensibilité de type I sont variables.

Le choc anaphylactique correspond à une diminution du tonus vasculaire grave consécutive à l'exposition à l'allergène. Chez l'homme, peuvent intervenir des sensations de malaise, des signes cutanés (urticaire), des signes de collapsus, un œdème de Quincke (œdème de la face, du cou atteignant le larynx), et une dyspnée pouvant aller jusqu'à la mort. Ce type de manifestation est en général rencontré lors d'exposition à des médicaments (injectés ou ingérés), des allergènes alimentaires (cacahuète) ou d'injection de venin d'hyménoptère (guêpe, abeille...).

La forme cutanée (dermatite atopique ou eczéma atopique) est caractérisée par l'apparition de papules très prurigineuses.

L'allergie alimentaire digestive se manifeste par des diarrhées et des vomissements.

Enfin, dans le cas le plus fréquent et notamment lors d'allergie aux animaux domestiques, on rencontre la forme dite muqueuse de l'hypersensibilité de type I. Elle est due à la pénétration des allergènes dans l'organisme humain par les voies aériennes (yeux, cavités nasales, trachée et bronches). Les symptômes alors rencontrés vont de la rhinite allergique à l'asthme en passant par la conjonctivite ou la trachéite spasmodique. C'est la forme la plus courante, qui inclut le "rhume des foins" saisonnier et l'allergie aux substances sécrétées par les chats et les chiens. L'asthme bronchique est défini comme une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes entraînant une diminution du flux de l'air à l'origine de toux. Cette réduction de la fonction pulmonaire et de la ventilation est due à une obstruction bronchique réversible et une hypersécrétion de mucus.

## G) Le diagnostic

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour le diagnostic de l'allergie (GAUSSORGUES *et al.*, 2010 ; BOUSQUET *et al.*, 2008).

### 1) Le recueil de l'anamnèse et des commémoratifs

Il est primordial de réaliser un questionnaire précis, long et rigoureux du patient. En effet, c'est l'interrogatoire qui permet d'orienter de façon plus sûre le diagnostic de l'allergie, et c'est la seule façon de suspecter un type d'allergène d'être responsable de la symptomatologie. La saisonnalité, l'âge d'apparition, l'évolution des symptômes sont autant de paramètres à explorer de façon précise. Tous les tests cités précédemment peuvent avoir des résultats complètement dissociés des présentations cliniques comme un RAST (*Radio Allergo Sorbent Test* – variante de l'ELISA où l'IgE est mise en évidence grâce à un anticorps marqué radioactivement) positif chez des patients asymptomatiques par exemple.

Le questionnement du patient sur son mode de vie, son historique familial, peuvent également amener le médecin à suspecter un terrain atopique chez un patient.

## 2) La Numération Formule Sanguine (NFS)

La NFS peut être réalisée par le praticien pour exclure d'autres maladies mais n'est en aucun cas diagnostique. Chez le patient allergique, une éosinophilie peut être observée, mais ce paramètre n'est pas spécifique. Les polynucléaires éosinophiles peuvent en effet augmenter en cas de parasitoses par exemple, ou d'autres maladies immunitaires.

## 3) Le dosage des IgE totales

Il est classique également de réaliser un dosage des IgE totales (IgEtot) qui est pourtant peu sensible et spécifique également. Les IgEtot sont certes augmentées en cas d'allergie, mais d'autres facteurs peuvent influencer ce processus, comme le tabagisme actif ou des viroses, parasitoses, etc. Cette méthode utilise en général des techniques immuno-enzymatiques (ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*).

## 4) Le dosage des IgE spécifiques d'un allergène

La présence d'IgE spécifiques (IgEs) d'un allergène peut être mise en évidence par des techniques reposant en général aussi sur le principe ELISA, ou de RAST. Les résultats sont malheureusement peu standardisés, très dépendants des extraits et de la qualité des allergènes. La présence des IgEs prouve la sensibilisation à un allergène donné, sans que cela ne soit réellement diagnostique (il faut pour cela éliminer toutes les réactions croisées possibles). En effet, de nombreux enfants par exemple peuvent présenter une concentration sérique en IgEs élevée pour un antigène, sans être réellement "allergique" à cette substance (SICHERER *et al.*, 2012 ; LIEBERMAN *et al.*, 2010).

Parmi les tests évaluant les IgEs, on trouve des tests sérologiques dits "multi-allergéniques" qui ont pour but d'évaluer de façon semi-quantitative la réactivité des IgEs vis-à-vis d'un panel d'antigènes (résultats positif ou négatif). L'identification précise de l'allergène n'est pas possible avec ce genre de tests. Souvent ces tests proposent un dépistage avec des allergènes alimentaires (trophallergènes) ou respiratoires (pneumallergènes) mais certains tests mixtes existent. Ils permettent en réalité de mettre en évidence un "terrain atopique" (GAUSSORGUES et KERDRANVAT, 2010).

D'autres tests, dits tests "unitaires" pour les IgEs cherchent à identifier plus précisément l'allergène contre lequel sont dirigés les IgEs rencontrés. Les techniques sont les mêmes que celles citées précédemment. Il faut noter que ces techniques ont connu un essor formidable ces dernières années, avec le développement de l'utilisation des allergènes recombinants. En effet, les extraits d'allergènes autrefois employés pour le diagnostic et le traitement étaient produits, extraits et purifiés à partir de substances d'origine naturelle (par exemple, un extrait de poils de chats). Aujourd'hui, avec l'essor des techniques de génie génétique, on arrive à déterminer la séquence des gènes des allergènes, puis à les produire artificiellement grâce au clonage dans des micro-organismes (intégration de l'ARN messager à l'intérieur des cellules hôtes comme des bactéries). Ces techniques permettent la production en masse d'extraits allergéniques très standardisés utilisés pour les tests diagnostiques et les traitements (GAUSSORGUES et KERDRANVAT, 2010).

La présence d'IgEs d'un allergène ne peut pas seul être considéré comme diagnostique de l'allergie, car souvent non associée à des signes cliniques (MATRICARDI *et al.*, 2009). De plus, les changements des taux rencontrés ne renseignent pas sur l'évolution des patients ni sur l'efficacité des traitements. Seule la clinique importe dans le suivi de l'allergie.

## 5) Le Skin Prick-Test (SPT), l'injection intra-dermique d'allergènes

Une des méthodes les plus couramment employées encore aujourd'hui pour le diagnostic de l'allergie aux carnivores domestiques est le "Skin Prick-Test" (SPT) ou injection intra-dermique de solutions contenant des allergènes, d'origine naturelle ou synthétique.

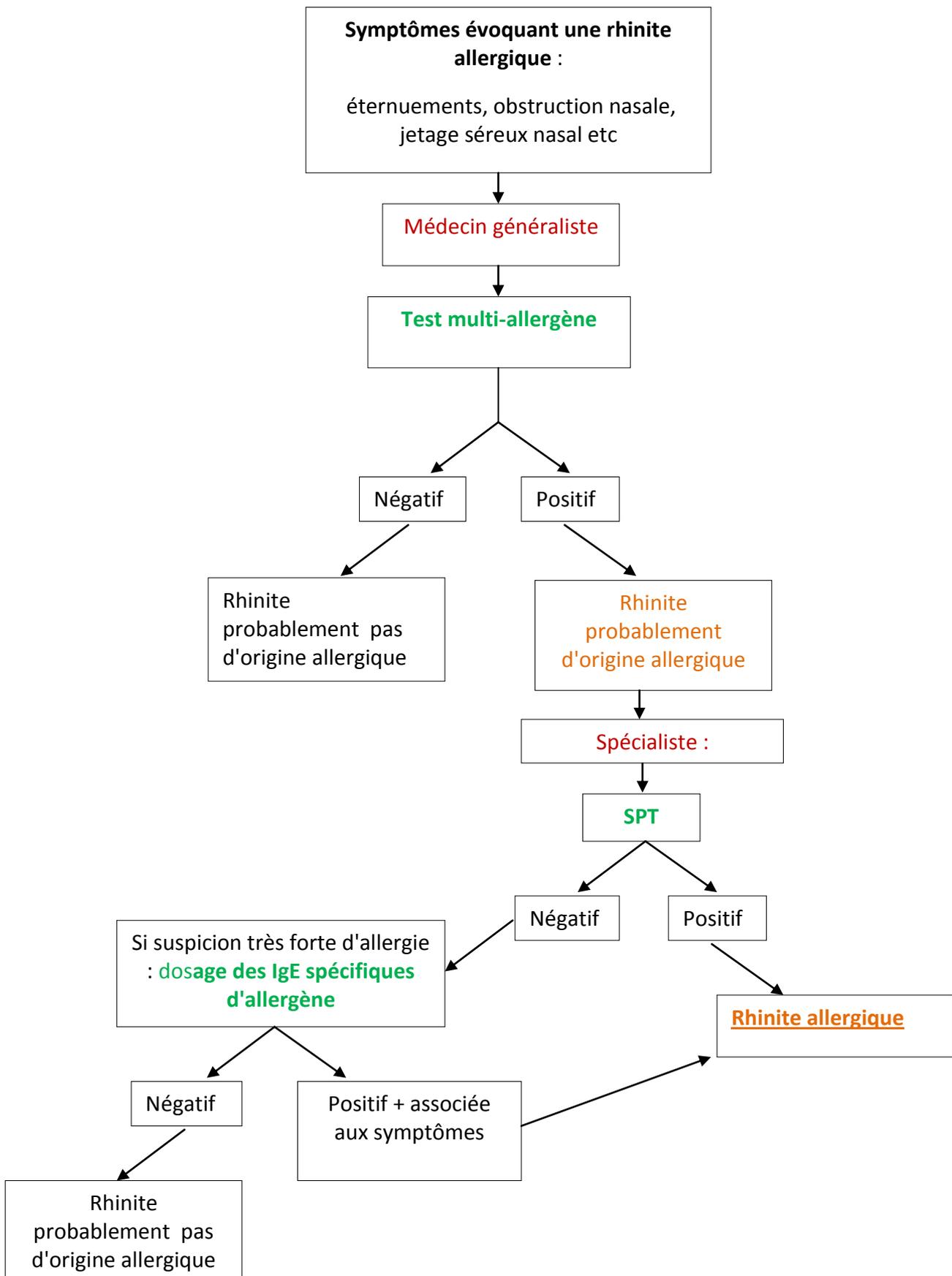
Cette injection, pratiquée sur le bras ou dans le dos, entraîne chez le patient allergique une réaction érythémato-papuleuse au point d'injection en 15 à 20 minutes. Cette technique, peu coûteuse et facile à mettre en œuvre, doit être mise en œuvre en cas de suspicion d'allergie.

Cette technique présente l'inconvénient d'être peu standardisée au niveau international.

## **6) Bilan : démarche diagnostique**

La WONCA (*World Organization of National Colleges, Academies and Academic Associations of General Practitioners/Family Physicians*, ou *World Organization of Family Doctors*), association mondiale des médecins généralistes, a proposé des guides de démarches diagnostiques et thérapeutiques à l'attention des médecins généralistes et spécialistes face à des patients présentant des rhinites allergiques ou de l'asthme (BOUSQUET *et al.*, 2008 ; VAN WEEL *et al.*, 2008). Les auteurs soulignent très clairement l'importance capitale de l'interrogatoire, qui doit être à la base de la suspicion clinique. Il permet notamment de faire la différence entre rhinite allergique et rhinite d'étiologie différente par exemple. L'interrogatoire doit être composé de questions claires et très précises. Ces conduites à tenir sont résumées dans la figure 14.

Figure 14 : Diagnostic de la rhinite allergique (d'après BOUSQUET *et al.*, 2008)



## H) Le traitement

### 1) Les traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques que le médecin peut être amené à prescrire vont des anti-histaminiques aux glucocorticoïdes en passant par les anti-leucotriènes et autres anti-inflammatoires.

Ils sont bien sûr nécessaires à l'atténuation d'une crise allergique (rhinite, asthme, urticaire) mais ne permettent en aucun cas de traiter la maladie allergique elle-même. Le but de ces traitements est avant tout de contrôler les crises allergiques, afin de réduire la fréquence et l'intensité des symptômes (lors de crises d'asthme par exemple).

Les étapes de la prise en charge thérapeutique de l'allergie sont :

- l'évaluation de l'état de contrôle de l'allergie : parfaitement contrôlé, partiellement contrôlé, non contrôlé ou exacerbé ;
- la décision d'ajouter un ou plusieurs traitements : dans l'ordre : des corticoïdes inhalés à faible dose, des inhibiteurs des leucotriènes, des  $\beta$ 2-agonistes de longue action, des corticoïdes inhalés à forte dose, des corticoïdes par voie orale et des traitements anti-IgE.

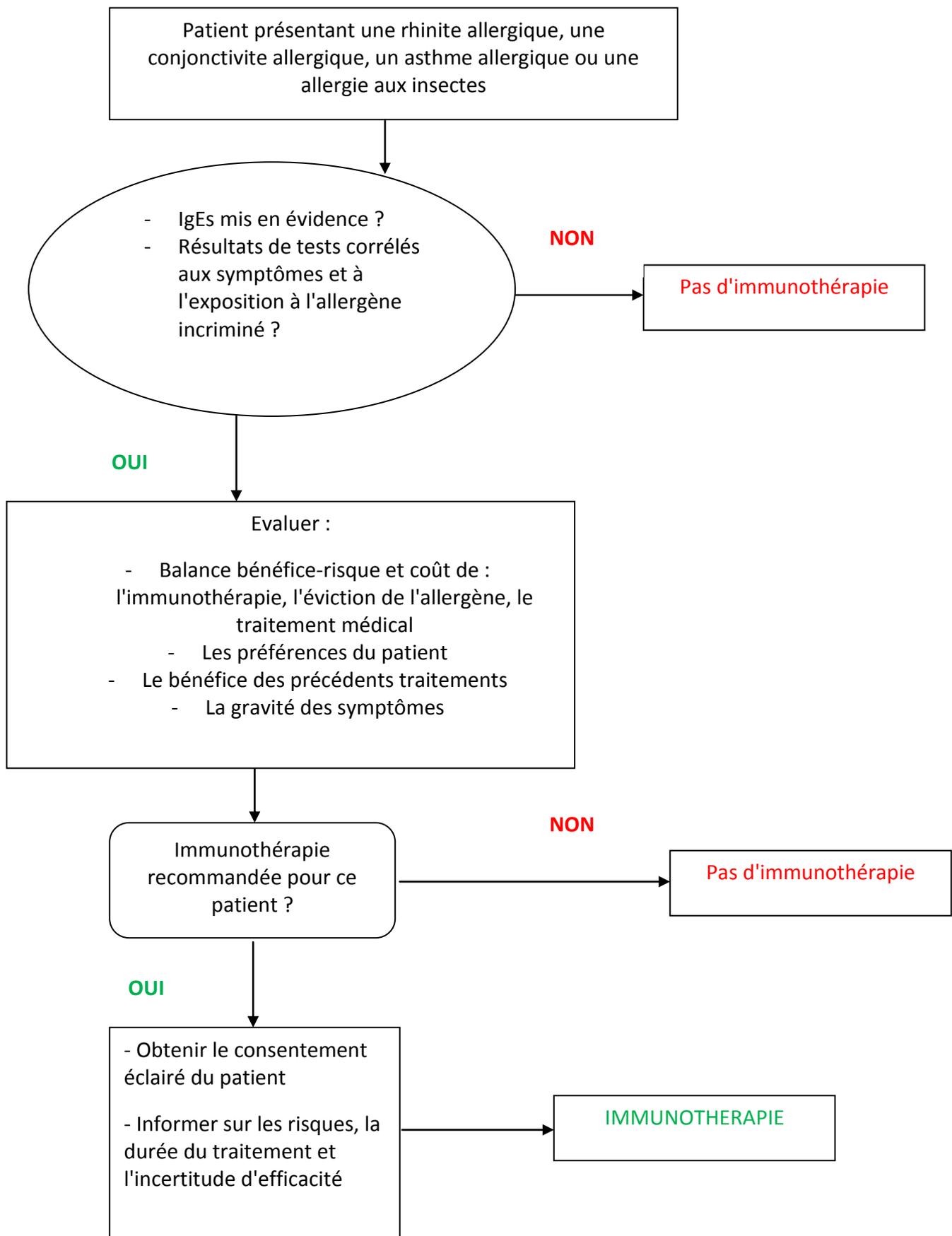
Tous ces traitements doivent bien sûr être accompagnés de mesures éducatives, notamment sur les techniques d'administration des molécules inhalées

### 2) L'hyposensibilisation : un traitement long nécessitant un long investissement

La "désensibilisation" est le seul traitement potentiellement capable de "guérir" un patient de son allergie. Elle consiste en l'administration (par voie sous-cutanée, nasale ou per-linguale) d'allergène à des doses croissantes. Cet allergène doit être capable d'induire une synthèse d'IgG en atténuant la réponse Th2 et la synthèse d'IgE.

La désensibilisation doit être réservée aux patients présentant des signes cliniques de rhinite allergique, d'asthme allergique, ou d'hypersensibilité au venin d'insectes. En effet, aucune étude n'a prouvé l'intérêt d'une immunothérapie pour d'autres types d'hypersensibilité, comme l'urticaire (JOINT TASK FORCE ON PRACTICE PARAMETERS *et al.*, 2007). Un arbre décisionnel permet d'aider le praticien allergologue à déterminer si son patient est un bon candidat à une immunothérapie (figure 15).

Figure 15 : Démarche raisonnée pour le choix de l'immunothérapie comme traitement de l'allergie



Le principal inconvénient de ce traitement est qu'il implique un investissement important du patient, car le traitement peut être long. De plus, à chaque instillation d'extrait allergénique, il existe un risque de déclenchement d'une réaction allergique qui peut être

grave. Il est primordial que le patient soit conscient du risque et l'accepte en connaissance de cause.

### **3) Eviction de l'allergène : une étape nécessaire souvent très difficile à mettre en oeuvre**

L'éviction de l'allergène de l'environnement du patient est le traitement le plus efficace. Il sous-entend bien entendu que l'allergène ait été identifié avec précision et que son élimination soit possible. Dans le cadre de l'allergie aux pollens, par exemple, elle est impossible. Pour l'allergie aux acariens, elle est difficile mais pas forcément inenvisageable. Pour ce qui est des allergies alimentaires, elle reste la seule mesure efficace à long terme pour soulager les malades.

Dans l'allergie aux carnivores domestiques, contrairement à ce que l'on peut imaginer au premier abord, l'éviction de l'allergène n'est pas évidente. Certes un patient allergique aux chats et/ou aux chiens devrait en théorie ni acquérir un animal, ni entrer volontairement en contact avec l'un d'entre eux. Cependant, les allergènes des chats et des chiens sont véhiculés dans l'air ambiant via des particules, et surtout déplacés passivement sur les vêtements des personnes possédant un animal. De nombreuses études ont mis en évidence leur présence dans les crèches, les écoles, les hôpitaux, et tous les lieux publics en général. Il est donc "facile" d'éliminer l'animal de son environnement privé, mais l'entrée en contact avec les allergènes est possible voire probable, même au quotidien.

Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment, il faut noter que les allergènes du chat en particulier sont peu "efficaces" et que des doses massives d'allergènes sont souvent nécessaires pour le déclenchement d'une rhinite allergique ou d'une crise d'asthme. Pour cela, l'environnement extérieur contaminé est souvent toléré par les personnes allergiques, même si, dans les cas les plus sévères, cela peut rester problématique.

Un autre aspect très important à prendre en compte est la motivation des patients. De nombreuses études ont montré que la plupart des patients allergiques continuaient d'entretenir des contacts avec des animaux, même si cela est dangereux pour leur santé. Se séparer volontairement de son propre animal par exemple est une mesure souvent très mal perçue par les patients et rarement appliquée.

De plus, les personnes sont souvent demandeuses de désensibilisation avec pour objectif ultime de pouvoir acquérir un chien ou un chat.

Dans cette perspective, il paraît légitime de se demander s'il existe des races de chiens ou de chats hypoallergéniques, c'est-à-dire que les personnes allergiques pourraient acquérir sans déclencher de symptômes d'allergie.



**DEUXIEME PARTIE : LES OUTILS DE LA  
GENETIQUE APPLIQUES A LA  
PREVENTION DE L'ALLERGIE AUX  
CARNIVORES DOMESTIQUES**



## Introduction

L'allergie aux carnivores domestiques reste une maladie difficile à traiter et dont la plus simple des préventions consiste à éviter le contact avec l'animal. Cependant, de nombreuses études ont montré que les personnes atteintes possèdent autant d'animaux domestiques que les non atteintes. Il existe donc un réel désir des propriétaires de chats et de chiens de conserver leur animal même s'ils y sont allergiques, et même d'acquérir des nouveaux animaux. La mise au point d'animaux hypoallergéniques est donc un enjeu économique important.

Depuis quelques dizaines d'années, l'essor des techniques de génie génétique a permis aux chercheurs de concentrer leurs travaux sur la mise en évidence et la caractérisation moléculaire des allergènes. La connaissance précise de ces molécules est indispensable pour comprendre les mécanismes de l'allergie aux carnivores domestiques et pour envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques ou de prévention.

### I. Les allergènes des carnivores domestiques :

#### A. Nomenclature des allergènes :

Depuis plusieurs dizaines d'années, de très nombreuses études visant à identifier des allergènes ont été publiées dans différents pays. Chaque source d'information ou presque possédait son propre système d'identification et de caractérisation des antigènes, et de ce fait une nomenclature propre. Dans le but d'homogénéiser ces données à grande échelle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place, dès 1984, un sous-comité de la nomenclature des allergènes au sein de l'IUIS (*International Union of Immunological Societies*). Ce comité est composé d'experts chargés d'établir une nomenclature pour tous les allergènes connus. Une première version a été publiée en 1986.

Les antigènes devaient alors être désignés par les trois premières lettres du nom de genre en italique (par exemple *Fel* pour *Felis*), un espace, la première lettre du nom de l'espèce en italique (*d* pour *domesticus*), et un chiffre romain, le n° I étant habituellement réservé aux allergènes majeurs pour chaque espèce. Les allergènes devaient ensuite être numérotés dans l'ordre d'isolement, sauf avis contraire de l'IUIS (MARSH et al., 1986).

Cette nomenclature a été révisée en 1994, avec l'abolition de l'écriture en italique et des chiffres romains. De nouvelles définitions pour les isoallergènes, les variants, les gènes codant pour les allergènes ont été mis en place.

Les isoallergènes sont des formes variables du même allergène. Ils sont caractérisés dans la nomenclature comme des allergènes d'une même espèce qui partagent au moins 67% de leur séquence d'acides aminés. On les distingue en ajoutant des nombres après le nom conventionnel (ex : Fel d 1.01).

Les variants ou isoformes sont quant à eux des versions polymorphes du même allergène. Ils partagent cette fois au moins 90% de leur séquence. Ils sont distingués dans la nomenclature par encore 2 chiffres supplémentaires (ex : Fel d 1.0101).

Pour soumettre une proposition de nouvel allergène mis en évidence, les chercheurs doivent aujourd'hui remplir un formulaire disponible sur Internet, et l'envoyer au sous-comité de la nomenclature des allergènes à l'IUIS. Ce document doit clairement contenir les propriétés moléculaires de l'allergène, sa séquence de nucléotide et d'acides aminés, et

surtout montrer qu'il entraîne une production d'IgE chez au moins cinq individus (CHAPMAN, 2008).

## B. Mise en évidence d'un allergène

### 1) Isolement protéique

Les allergènes d'origine animale, et en particulier les allergènes du chien et du chat sont en général des protéines. Chaque protéine est caractérisée par sa séquence en acides aminés (structure primaire), laquelle conditionne l'arrangement tridimensionnel de la molécule (structure secondaire et tertiaire), mais aussi ses propriétés physico-chimiques et biochimiques. Les caractères propres d'une protéine, comme la solubilité, la taille, le point isoélectrique, la charge, ou encore l'hydrophobicité ou l'affinité pour certains ligands, peuvent être utilisées pour isoler cette protéine.

#### a) Choix de la source de protéine

En ce qui concerne les allergènes du chien et du chat, la source de protéines à partir de laquelle on cherche à purifier un allergène peut être une suspension de poils de chat ou de chien, de l'urine, de la salive, ou tout autre liquide contenant des substances pouvant être présentes sur la peau des animaux ou se disperser dans l'environnement. Les chercheurs peuvent aussi s'appuyer sur des extraits de poils standardisés et commercialisés par certains laboratoires. La teneur en allergènes dépend des techniques de préparation de ces extraits allergéniques. Le choix de la source de protéine est essentiellement fait en fonction de la disponibilité, du coût, et de la teneur supposée en protéine recherchée (LY et WASLINGER, 2011).

#### b) Techniques d'isolement de la protéine

La chromatographie et l'électrophorèse sont les méthodes les plus largement utilisées pour fractionner un mélange protéique (LY et WASLINGER, 2011).

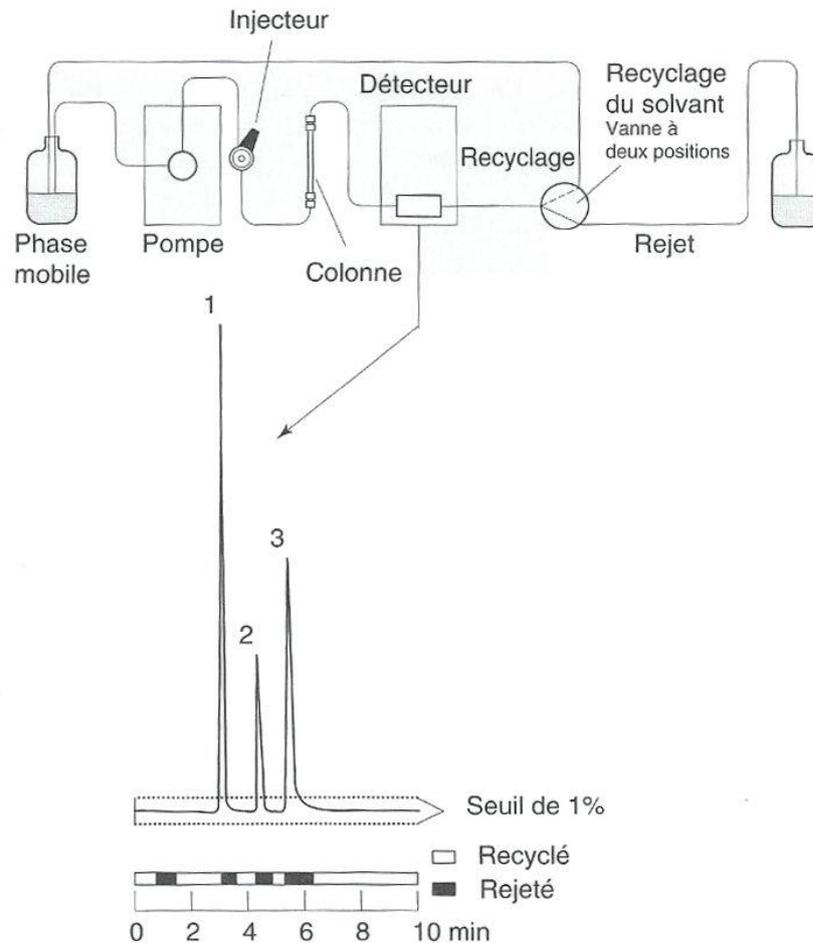
La technique de chromatographie repose sur l'interaction entre les constituants d'une solution, la phase mobile (contenant l'éluant et les espèces à séparer), et d'un support solide poreux, la phase stationnaire ou résine (on néglige la phase gazeuse environnante). La grande variété de résines disponibles permet des approches multiples pour séparer des constituants protéiques.

- Quelques techniques de chromatographie couramment utilisées
  - La RPLC (*Reverse phase Liquid chromatography*), ou chromatographie en phase inverse, repose sur les interactions hydrophobes entre les protéines dénaturées et la matrice ;
  - La chromatographie échangeuse d'ions : ici, la force de rétention des protéines est de nature ionique. La résine contient alors un échangeur de cations ou d'anions, gel porteur de charges respectivement négatives ou positives ;
  - Chromatographie par exclusion sur gel : dans cette technique relativement simple, les protéines sont séparées à travers un gel en fonction de leur taille, mais aussi de leur forme, ce qui permet d'avoir une estimation de la masse moléculaire des constituants séparés. Une augmentation progressive du volume de solvant permet d'obtenir des protéines de plus en plus petites ;

- Chromatographie par affinité : dans cette technique, également beaucoup employée, un ligand est fixé de façon covalente à la matrice, laquelle retient alors la protéine d'intérêt qui se fixe spécifiquement à ce ligand (MENDHAM *et al.*, 2006).

Un montage de chromatographie est représenté dans la figure 16.

Figure 16 : Schéma d'un montage de chromatographie classiquement utilisé



La phase mobile migre dans la colonne où a lieu la séparation. Le signal détecté est représenté sous la forme d'un graphe représentant chaque constituant dans l'espace (d'après MENDHAM *et al.*, 2006).

#### • Techniques d'électrophorèse

L'électrophorèse consiste à faire migrer, dans un support, des solutés dans un champ électrique. Les protéines en solution se déplacent dans le gel en fonction de leur taille et de leur charge.

- La focalisation isoélectrique est une technique d'électrophorèse dans un gradient de pH. Ici, les solutés se déplacent vers le pH de leur point isoélectrique ;
- L'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) permet de séparer les résidus protéiques en fonction de leur masse moléculaire et de la nature du gel. Le SDS est une molécule qui se lie aux acides

aminés et qui masque leur charge intrinsèque. On considère qu'une protéine se lie à une molécule de SDS pour deux acides aminés. Si le gel de polyacrylamide contient du SDS, l'électrophorèse sépare le mélange protéique en fonction de la masse moléculaire (CALLEN, 2005) ;

- L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) permet de combiner deux migrations conduites dans deux axes perpendiculaires l'un à l'autre. La première migration sépare les constituants selon leur pH isoélectrique, et la seconde selon la taille après dénaturation par le SDS. On augmente alors considérablement la résolution de la séparation (CALLEN, 2005).

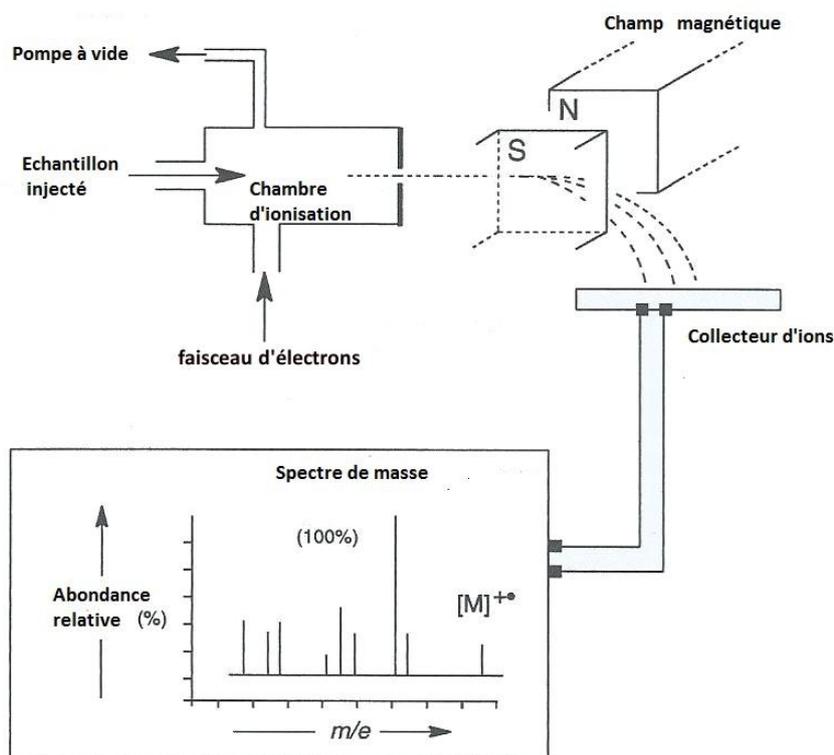
- **La spectrométrie de masse**

L'analyse par spectrométrie de masse permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces chimiques présentes dans un échantillon. Les molécules présentes dans celui-ci sont tout d'abord ionisées. Les espèces chargées ainsi créées sont accélérées puis soumises à l'action de champs électriques et/ou magnétiques, ce qui modifie leur trajectoire, en fonction de leur masse et de leur charge (figure 17). Le "spectre" ainsi détecté montre sous forme graphique l'abondance des ions en fonction de leur rapport masse/charge (figure 17).

Si la spectrométrie de masse est une excellente technique pour identifier chimiquement un composé inconnu, elle est beaucoup moins efficace pour analyser un mélange. Les spectres obtenus sont alors complexes et trop difficiles à analyser. Pour contourner cette difficulté, on couple la spectrométrie de masse à une technique de chromatographie par exemple, afin de séparer les constituants d'un mélange (MENDHAM *et al.*, 2006).

Toutes ces techniques sont des exemples. Il faut souvent associer plusieurs d'entre elles afin d'optimiser les chances d'identifier des constituants inconnus.

**Figure 17 : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse**



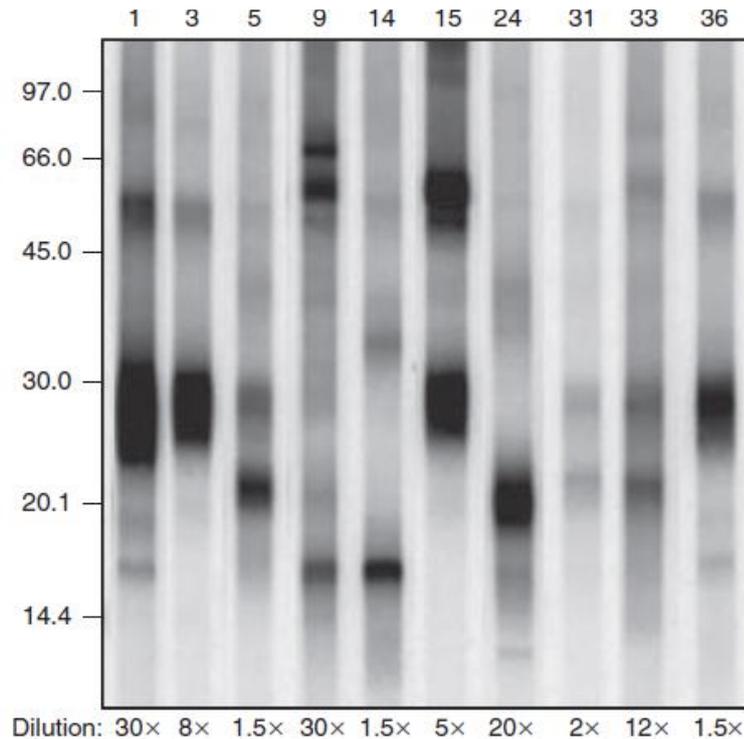
L'échantillon est introduit dans la chambre d'ionisation, où le faisceau d'électrons projeté entraîne l'ionisation et la fragmentation des composés chimiques. Les différents ions formés sont séparés par l'action d'un champ magnétique. On obtient un spectre de masse (l'abondance relative de chaque ion en fonction de la masse électronique sur la charge) (d'après FIELD *et al.*, 2008).

## 2) Mise en évidence de l'allergénicité : liaison Antigène-Anticorps

L'enjeu majeur dans la mise en évidence d'un allergène est d'apporter la preuve de l'allergénicité de la molécule isolée.

Le western blot ou immunoblot est une méthode de choix pour la séparation et l'identification des protéines allergisantes. La première étape consiste à séparer les constituants du mélange protéique par électrophorèse sur gel (le plus souvent un en SDS-PAGE). L'étape-clé du western blot consiste à transférer les constituants du gel sur une membrane en nitrocellulose ou en polyfluorure de vinylidène (PCDF). Ce transfert est réalisé en apposant le gel sur la membrane et en appliquant un courant électrique entre deux plaques qui enserrant le gel et la membrane. Les protéines chargées vont migrer vers la membrane en conservant leur organisation spatiale (figure 18). La membrane est incubée avec du sérum de patient allergique (contenant des IgE). Lorsque les IgE humaines reconnaissent une protéine sur la membrane, elles s'y fixent spécifiquement. Les complexes Antigène-Anticorps sont détectés dans une seconde étape, à l'aide d'un anticorps d'une autre espèce (souvent de lapin ou de chèvre) anti-IgE humaines. Cet anticorps est marqué par de la fluorescence, de la radioactivité, par chimioluminescence ou à l'aide d'une enzyme, la peroxydase. La révélation finale de la membrane s'effectue par détection de la fluorescence, de la radioactivité, de la lumière ou d'un composé coloré produit par la peroxydase.

Figure 18 : Exemple d'immunoblot pour la détection d'un antigène

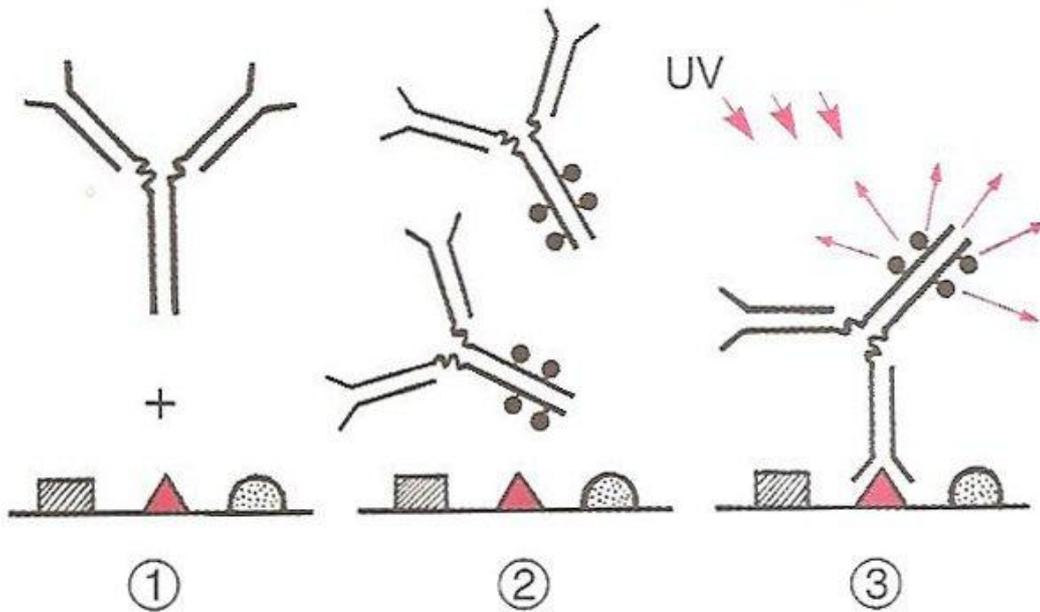


Résultat d'immunoblot : l'extrait protéique de poils de chiens a été séparé par électrophorèse SDS-PAGE puis transféré sur une membrane en nitrocellulose et mise en présence de sérums de patients allergiques (numéros au dessus). Les marqueurs de masse moléculaire (en kiloDalton, kDa) sont indiqués sur la gauche, ainsi que les dilutions des sérums utilisés au dessous. La révélation a ici été effectuée à l'aide d'un anticorps anti IgE humain marqué par de  $I^{125}$ I (d'après MATTSSON , 2010).

Si l'on possède l'extrait protéique purifié, par exemple lorsque l'on a produit un allergène recombinant, on peut également tester la propriété des protéines à se lier aux IgE de patients allergiques en s'affranchissant de l'étape de séparation. On réalise alors une réaction d'immuno-fluorescence ou d'immuno-enzymatie (ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) où l'allergène ou l'anticorps est marqué avec un composant radioactif ou le plus souvent fluorescent et la liaison antigène-anticorps est révélée par ce marqueur.

Dans cette technique, la réaction immunitaire de formation du complexe antigène-anticorps est utilisée (figure 19). Lors d'une réaction d'immunocytochimie, l'anticorps (le plus souvent) est covalamment couplé à un composé qui servira de révélateur de sa présence (un fluorochrome, une protéine enzymatique comme une phosphatase ou une peroxydase par exemple). On fixe l'un des composants de la réaction sur un support (ce peut être l'allergène recombinant ou les IgE de patients allergiques). Puis on met en présence l'autre composé. La réaction de couplage entre les deux va avoir lieu si l'allergène possède bien la propriété de liaison avec l'IgE. Après une étape de rinçage, on révèle la présence des complexes antigène-anticorps grâce au marqueur précédemment couplé.

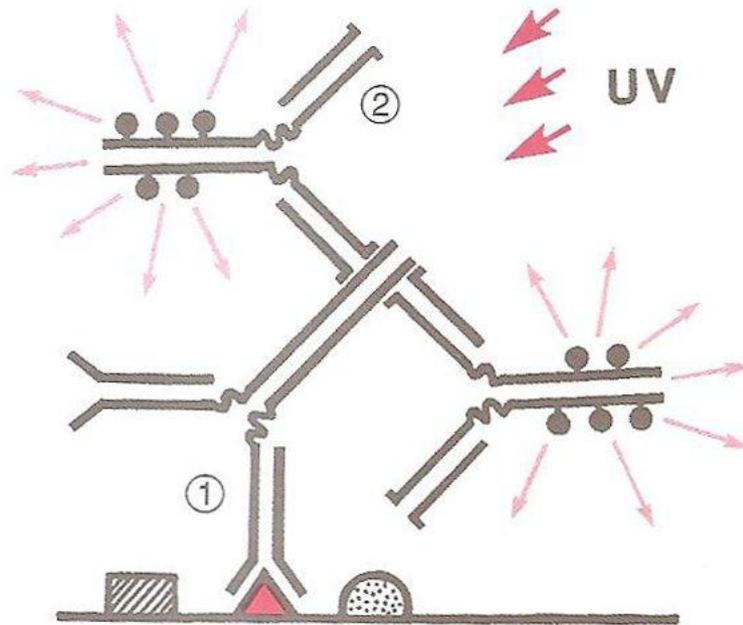
Figure 19 : Réaction d'immunofluorescence directe



Ici, c'est l'allergène qui est fixé sur le support (rectangle hachuré, triangle noir ou sphère à pois). L'IgE spécifique de l'allergène (en Y) est couplé avec un fluorochrome (billes grises sur l'IgE) et émet un signal lumineux en présence de rayons UV. On met ainsi en évidence la liaison anticorps-antigène (d'après CALLEN, 2005).

On peut également mettre en évidence les complexes grâce à un deuxième type d'anticorps dit secondaire (figure 20). On utilise pour cela des anticorps d'un autre mammifère (comme le lapin) qui reconnaît l'immunoglobuline initiale comme un antigène. Dans ce cas de figure, c'est l'anticorps secondaire qui est marqué et qui sert de révélateur.

Figure 20 : Réaction d'immunofluorescence indirecte

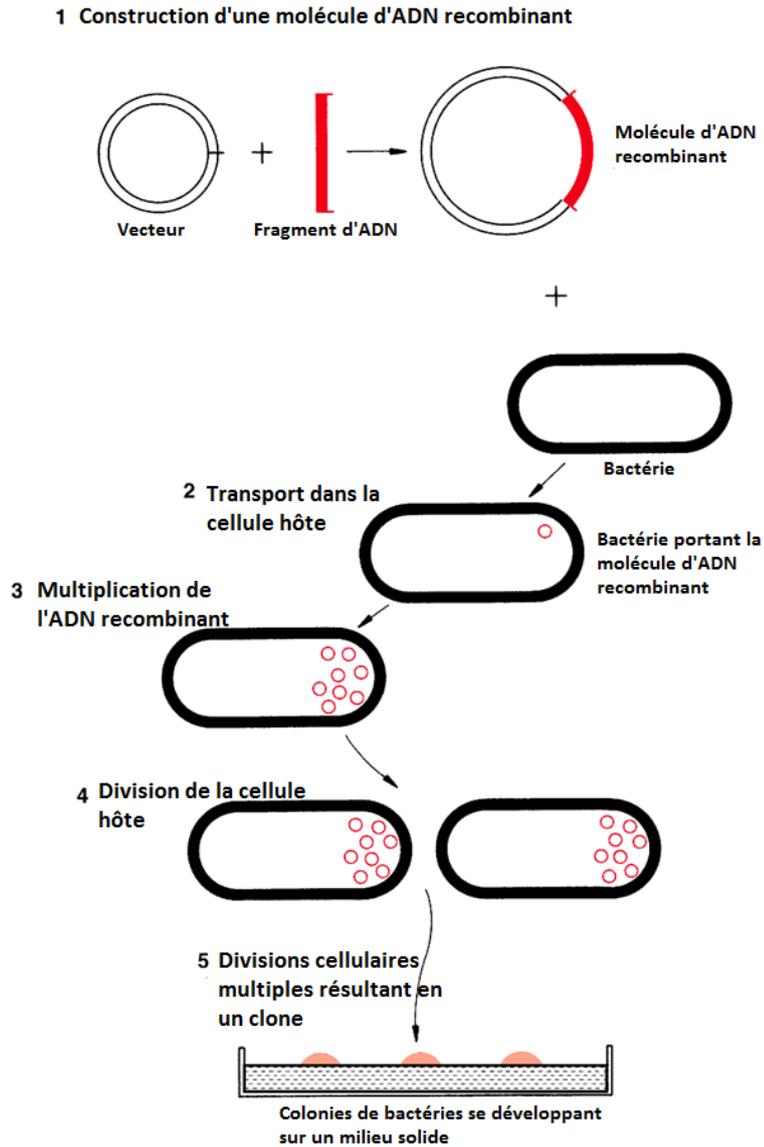


L'allergène, fixé sur le support, se lie à l'IgE qui n'est pas marqué. La révélation du complexe antigène-anticorps se fait dans un second temps grâce à des anticorps anti-IgE humaine marqués par un fluorochrome. (d'après CALLEN, 2005).

### 3) Autre stratégie : création d'une banque d'ADN complémentaire et screening

D'autres équipes (par exemple, SMITH *et al.*, 2004) ont choisi de s'intéresser aux ARNm présents dans un tissu. Après avoir extrait et isolé la totalité des ARNm d'un tissu, ils ont créé une banque d'ADN complémentaire (ADNc) spécifique du tissu étudié, qui reflète les ARNm présentes dans ce tissu. Ces ADNc ont été synthétisés par Reverse-Transcriptio, qui utilise une transcriptase inverse, enzyme capable de synthétiser un brin d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Les ADNc sont ensuite clonés dans des vecteurs d'expression dans des bactéries pour former une banque (figure 21). Cette banque peut ensuite être criblée à l'aide d'anticorps spécifiques ou d'IgE marqués. Il est ainsi possible de sélectionner les ADNc produisant des protéines reconnues par les IgE (figure 22). L'ADNc est ensuite séquencé et amplifié par PCR, puis cloné pour obtenir un allergène recombinant. L'obtention d'allergène recombinant est fondamentale pour étudier les propriétés intrinsèques d'une molécule, mais également pour envisager la production à grande échelle d'allergène purifié standardisé, pour le diagnostic et/ou le traitement de patients allergiques.

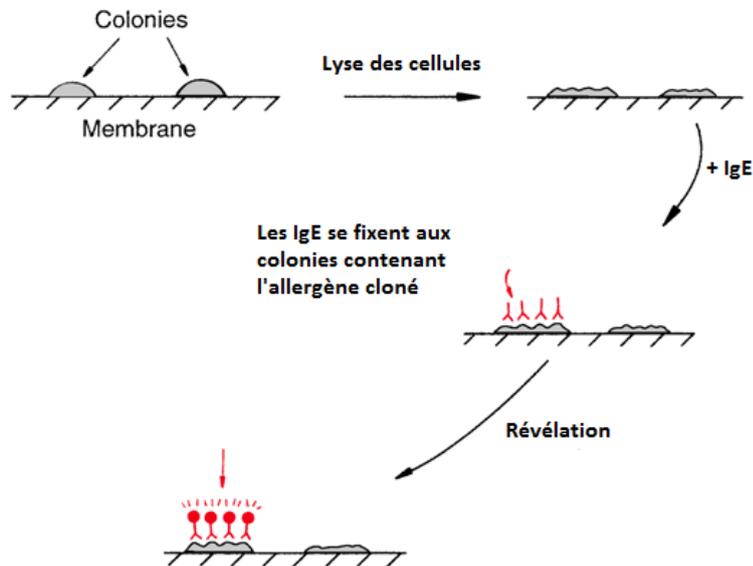
Figure 21 : Principe général du clonage cellulaire de l'ADN



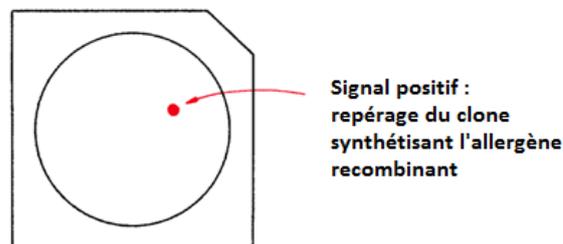
Le clonage cellulaire de l'ADN comporte 5 étapes résumées dans ce schéma. On obtient des colonies bactériennes sur un milieu de culture. Il faut ensuite cribler ces colonies pour sélectionner celles produisant un allergène (d'après BROWN, 2006).

Figure 22 : Criblage de la banque d'ADNc au moyen d'un anticorps

(a) Criblage grâce aux anticorps



(b) Autoradiographe obtenu



Pour cribler la banque d'ADNc obtenue par clonage cellulaire, on peut utiliser les IgE produits par les patients allergiques. Ces IgE vont se fixer sur les colonies produisant des allergènes. Après une étape de révélation, le signal repéré permet de détecter ces colonies. (d'après BROWN, 2006).

## II. Les allergènes officiellement reconnus du chien et du chat

### A. Présentation des différents allergènes

Depuis les années 80, des centaines d'allergènes ont été mis en évidence et étudiés du point de vue moléculaire. Les allergènes appartiennent à un nombre restreint de familles protéiques, que l'on peut résumer ainsi (CHAPMAN, 2008) :

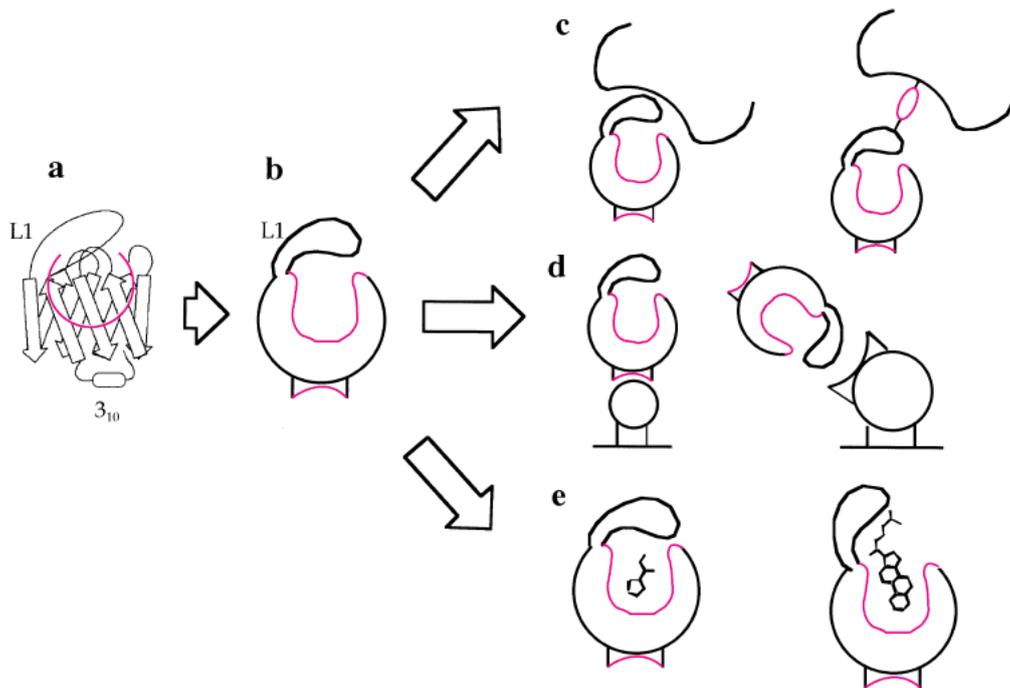
- les allergènes d'intérieur sont principalement des enzymes (notamment des protéases), des lipocalines (protéines de transport), des albumines, des tropomyosines et des protéines liant le calcium ;

- les allergènes des pollens sont des protéines intervenant dans la pathogénie, des protéines liant le calcium, des pectases (enzymes de dégradation des pectines végétales), des bêta-expansines (protéines végétales), des inhibiteurs de la trypsine ;
- les allergènes des plantes et les allergènes alimentaires d'origine animale sont plutôt des protéines de transfert de lipides, des tropomyosines, des profilines (protéines musculaires et du cytosquelette des cellules) et des protéines de stockage comme l'ovalbumine de l'œuf.

Les allergènes majeurs des carnivores domestiques sont des protéines appartenant à la famille des lipocalines. Un seul pourtant, l'allergène majeur du chat, Fel d 1, se distingue par le fait qu'il est un analogue des protéines sécrétoglobines, et que son affinité pour les immunoglobulines IgE soit largement supérieure à celle des lipocalines.

Les molécules de la famille des lipocalines sont des protéines fonctionnellement et structurellement liées. Ce sont typiquement des protéines extracellulaires de transport, qui lient des petites molécules hydrophobes comme des phéromones ou encore le rétinol, mais elles interviennent également dans la synthèse enzymatique des prostaglandines (FLOWER, 1996). Les lipocalines sont caractérisées également par quelques propriétés moléculaires : la capacité à se lier avec des récepteurs à la surface cellulaire, et de former des complexes avec des macromolécules solubles. Cette famille protéique partage un motif structural particulier : un feuillet bêta anti-parallèle à huit brins englobant le site de liaison au ligand, le premier brin de ce feuillet étant beaucoup plus long que les autres et formant une boucle (figure 23).

**Figure 23 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une lipocaline**



Représentation schématique de la structure tertiaire et des interactions moléculaires des lipocalines. a) Sont représentés les feuillets bêta (flèches), la boucle en L1, et l'hélice alpha à l'extrémité N-terminale. Le cercle représente la cavité de liaison avec le ligand. b) Représentation schématique des points-clés de la structure : la cavité de liaison et le potentiel site d'ancrage à un récepteur. c) Deux modes possibles d'interaction avec des macromolécules : interaction covalente ou non-covalente. d) Liaison avec des récepteurs membranaires cellulaires par le biais de la boucle en L1 ou par le site d'ancrage. e) Liaison avec des ligands de différentes tailles, en position ouverte / fermée et plus ou moins exposé (d'après FLOWER D.R., 1996).

Les Immunoglobulines de classe A et M représentent également des allergènes reconnus des chats. Ils ont été identifiés comme des allergènes par ADENOYIN *et al.* (2007) – cf partie II. Nous avons vu précédemment que les chaînes lourdes (ici  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) des immunoglobulines définissaient la classe (G et A) et la sous-classe de celles-ci. Selon ADENOYIN *et al.*, les épitopes seraient plutôt portés par les résidus glucidiques des chaînes, notamment les chaînes lourdes (ADENOYIN *et al.*, 2007).

Enfin, il faut noter que les albumines des carnivores domestiques ont une place particulière au sein des allergènes. En effet, elles sont à l'origine d'allergies croisées au chat et au chien, ainsi qu'à d'autres animaux, comme le porc. Elles appartiennent à la famille des ALB/AFP/VDB (albumines sériques, protéines fœtales alpha, et protéines de liaison à la vitamine D) (HILGER *et al.*, 1996).

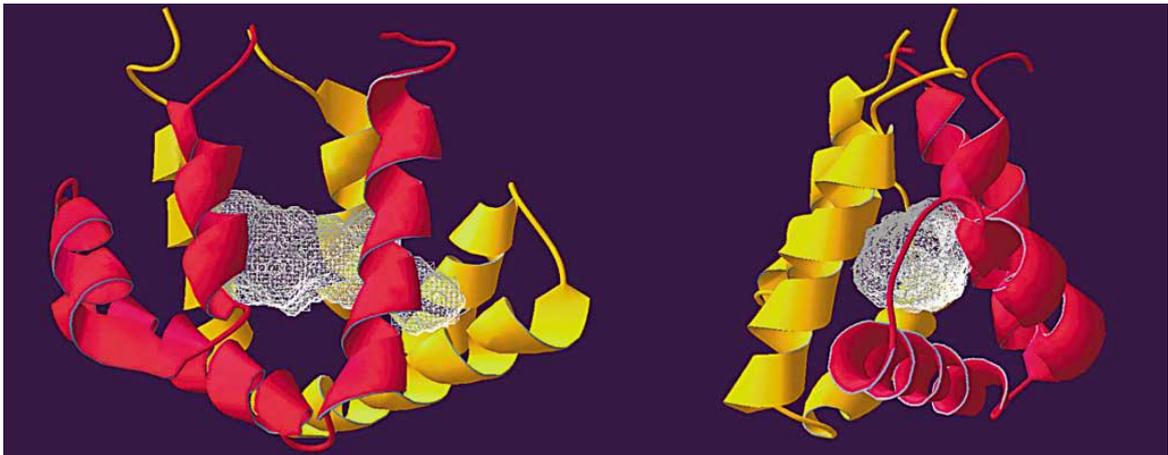
## 1) Les allergènes du chat :

### a) *Fel d 1, une sécrétoglobine*

L'allergène majeur Fel d 1 (autrefois appelé « Cat 1 ») est une glycoprotéine de la famille des sécrétoglobines. Sa structure polypeptidique et sa représentation

tridimensionnelle sont aujourd'hui bien connues (figure 24). Elle est constituée de deux dimères de 18 kDa chacun, non reliés par des liaisons covalentes. Chaque dimère est constitué de deux polypeptides antiparallèles liés ensemble par trois ponts dissulfures. Il existe quelques différences entre les allergènes Fel d 1 sécrétés par la peau et par les glandes salivaires (notamment dans la taille de la chaîne 2). Fel d 1 a été retrouvé sur la peau des chats, dans la salive, mais aussi les sécrétions des glandes anales (KAISER *et al.*, 2003).

**Figure 24 : Représentation schématique en trois-dimensions de Fel d 1**



Les polypeptides 1 et 2 sont représentés en jaune et en rouge respectivement. La cavité interne est, elle, colorée en blanc (d'après KAISER *et al.*, 2003).

Fel d 1 est l'allergène d'origine animale qui a été le plus étudié au cours des dernières décennies. Environ 90% des personnes allergiques présentent des IgE spécifiques de Fel d 1, d'où son importance, et l'enjeu des études à son sujet (OHMAN *et al.*, 1976).

#### ***b) Fel d 2 : l'albumine sérique du chat***

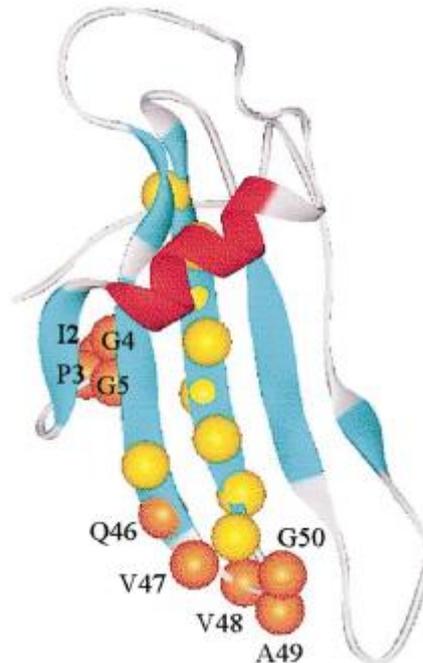
L'albumine sérique du chat a été décrite en tant qu'allergène par HILGER *et al.* (1997), après observation de patients allergiques aux poils de chat et à la viande de porc. L'équipe a tenté de mettre en évidence l'allergène et la réaction croisée mis en cause. Ils ont montré que l'albumine sérique du porc et du chat étaient reconnues par les sérums des patients allergiques. La réactivité vis-à-vis de l'albumine porcine semble être incluse dans celle vis-à-vis du chat, ce qui suggère une sensibilisation à l'albumine féline en premier lieu. Selon les auteurs, Fel d 2 est d'une importance intermédiaire en tant qu'allergène inhalé puisque seuls 14 à 23% des patients allergiques aux chats montrent une sensibilisation à l'albumine féline, mais il est d'une importance cruciale puisque 100% des patients allergiques à Fel d 2 ont des anticorps anti albumine canine (Can f 3), et un certain nombre d'entre eux sont sensibles à d'autres allergènes d'origine animale (y compris des allergènes alimentaires). L'albumine sérique féline appartient à la famille des ALB/AFP/VDB (HILGER *et al.*, 1997).

#### ***c) Fel d 3, la cystatine du chat***

Fel d 3 a été mis en évidence par ICHIKAWA *et al.* (2001a et 2001b) à partir d'une banque d'ADNc de peau de chat. Fel d 3 ou cystatine, a été clonée et séquencée avec succès. La protéine contient un motif caractéristique des inhibiteurs des protéases à cystéines. Celles-ci sont des peptidases participant à la dégradation des protéines intracellulaires. La superfamille des cystatines regroupe des protéines ayant pour fonction de complexer les

protéases à cystéines afin de protéger des effets délétères de celles-ci. Fel d 3 appartient à la sous-famille des stefines (ou cystatines de type I). La représentation tridimensionnelle schématique de Fel d 3 est montrée dans la figure 25.

**Figure 25 : Représentation tridimensionnelle de Fel d 3 ou cystatine du chat**

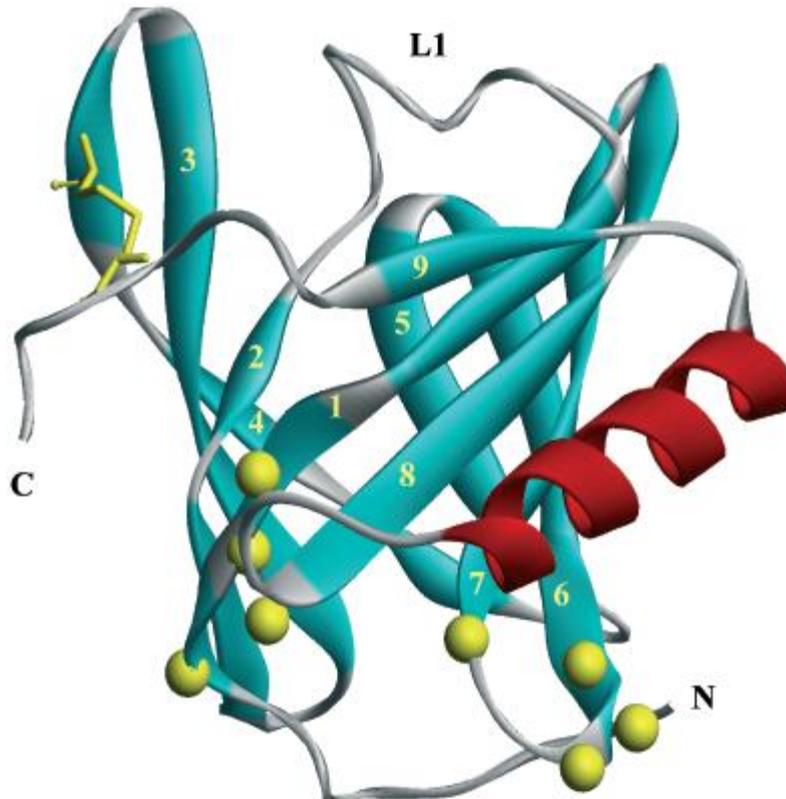


Fel d 3 est composé d'une hélice  $\alpha$  (en rouge), de boucles en épingle à cheveux (en gris) et de cinq feuillets  $\beta$  antiparallèles (en bleu). Le motif inhibiteur des protéases à cystéines est symbolisé en jaune. Les sphères oranges représentent les résidus protéiques directement impliqués dans les complexes formés avec les protéases (d'après ICHIKAWA *et al.*, 2001b).

#### ***d) Fel d 4, une lipocaline***

Fel d 4 (SMITH *et al.*, 2004) est un allergène de la famille des lipocalines (figure 26), analogue à Equ c 1, l'allergène majeur du cheval. Dans l'étude de SMITH *et al.*, 62,96% des individus allergiques aux chats présentaient des IgE spécifiques de Fel d 4.

Figure 26 : Représentation tridimensionnelle de Fel d 4, une lipocaline



Les feuillets bêta anti-parallèles sont colorés en bleu, l'hélice alpha en rouge. Les points jaunes symbolisent les résidus conservés dans les motifs (d'après SMITH *et al.*, 2004).

#### ***e) Fel d 5w : immunoglobuline A du chat***

On estime à 2,6 mg/mL la concentration en IgA dans le sérum du chat, et à 0,54 mg/mL dans la salive. Fel d 5w, ou encore l'immunoglobuline de classe A du chat a été mise en évidence en tant qu'allergène par ADENOYIN *et al.*, (2007), même si l'hypothèse d'une allergénicité des immunoglobulines avait été formulée depuis des décennies. L'équipe a montré la liaison aux IgE des patients allergiques aux chats chez près de 40% d'entre eux. Cette découverte a été compliquée puisque l'équipe a également mis en évidence une réaction croisée complète entre les IgA et les IgM de chat, vis-à-vis des IgM hétérophiles humains.

Ils ont montré que les IgE des extraits des sérums des patients allergiques réagissaient pour la plupart avec des épitopes situés sur les résidus glucidiques des chaînes lourdes des IgA, épitopes partagés par les IgM de chat. C'est la première fois qu'une étude montrait la réaction des IgE humains avec des résidus glucidiques sur des allergènes de mammifères (cela avait été prouvé auparavant sur des allergènes végétaux) (ADENOYIN *et al.*, 2007).

#### ***f) Fel d 6w : immunoglobuline M du chat***

L'étude d'ADENOYIN *et al.* (2007) suggère également que les IgM de chat représentent eux aussi des allergènes.

### ***g) Fel d 7: une lipocaline***

SMITH *et al.* ont mis en évidence en 2011 la protéine Fel d 7. Ils recherchaient chez le chat un analogue à la protéine des glandes de Von Ebner chez le chien (petites glandes salivaires situées dans la langue). Cette protéine a été mise en évidence en criblant une banque d'ADNc de langue de chat. Fel d 7 a été détecté dans la salive des chats, mais pas sur la peau, ni dans les glandes anales ou encore les glandes salivaires sous-mandibulaire et parotidienne. Les auteurs ont d'ailleurs suggéré que la sensibilisation à cet allergène précis se fasse plutôt par voie cutanée que respiratoire, par contact direct avec la salive du chat. Fel d 7 appartient à la famille des lipocalines.

### ***h) Fel d 8***

Parallèlement à la découverte de Fel d 7, SMITH *et al.* (2011) ont également mis en évidence la protéine appelée Fel d 8, analogues aux allergènes du cheval Equ c 4 et Equ c 5, dans les glandes salivaires mandibulaires. Cependant, l'étude a porté sur une banque d'ADNc des glandes salivaires mandibulaires, et Fel d 8 n'a pas été ensuite retrouvée ni dans la salive, ni dans les poils de chats. Cependant, il est possible qu'elle y soit tout de même présente, sous forme de traces ou à une concentration trop faible pour être détectée.

## **2) Les allergènes du chien**

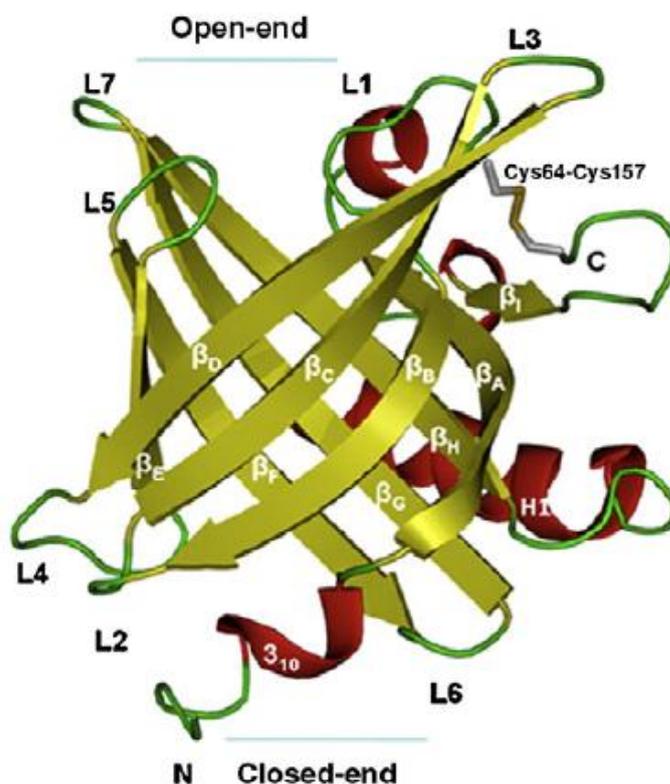
### ***a) Can f 1, une lipocaline du chien***

L'allergénicité de Can f 1 a été mise en évidence par SCHOU *et al.* (1991). L'équipe a isolé la protéine grâce à plusieurs techniques : chromatographie d'affinité en utilisant des anticorps de lapin spécifiques de l'antigène auparavant appelé A13, une électrophorèse en SDS-PAGE. Ils ont montré que plus de 90% de leurs patients allergiques aux chiens montraient un test SPT (*Skin-Prick Test*) positif, et que Can f 1 se liait aux IgE de patients allergiques dans la majorité des cas. Can f 1 est donc un allergène majeur du chien. KONIECZNY *et al.* (1997) ont étudié la distribution tissulaire de cette protéine et ne l'ont retrouvée que dans le tissu épithélial de la langue. En étudiant la séquence en acides aminés de Can f 1, ils ont montré que Can f 1 appartenait à la famille des lipocalines et était un analogue à la protéine des glandes de Von Ebner chez l'homme. Ils ont également réussi à produire des allergènes recombinants rCanf 1 et rCan f 2 et ont prouvé qu'ils induisaient une libération d'histamine dans les basophiles des patients allergiques, mais pas chez les personnes qui n'étaient pas allergiques, ce qui montre la conservation des épitopes dans ces protéines produites artificiellement (KONIECZNY *et al.*, 1997).

### ***b) Can f 2***

Can f 2 a été isolé pour la première fois par DE GROOT *et al.* (1991) qui ont mis en évidence son allergénicité. De même que pour Can f 1, Can f 2 a été isolé et cloné (KONIECZNY *et al.*, 1997) afin de mieux connaître sa structure moléculaire et sa distribution tissulaire. Can f 2 a été retrouvé dans les glandes parotides principalement et dans une moindre mesure dans les tissus de la langue, mais pas sur la peau. Elle appartient également à la famille des lipocalines. Plus récemment, la technique de cristallographie a été utilisée (MADHURANTAKAM *et al.*, 2010) afin de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine Can f 2 recombinante (rCan f 2) (figure 27). De plus, et contrairement à ce que l'équipe attendait, il existait une réaction croisée importante entre Can f 2 et Fel d 4, bien que cette donnée n'ait pas été totalement expliquée. En effet, les deux molécules ne présentent que 22% d'homologie au niveau de leurs séquences en acides aminés (MADHURANTAKAM *et al.*, 2010).

Figure 27 : Structure tridimensionnelle de rCan f 2 caractéristique des molécules de la famille des lipocalines



La structure tridimensionnelle de rCan f 2 est composée de 8 feuillets bêta anti-parallèles ( $\beta_A$  à  $\beta_H$ ). Les boucles sont colorées en vert et les hélices  $\alpha$  en rouge. L'extrémité ouverte (*open-end*) donne accès à la cavité interne hydrophobe (d'après MADHURANTAKAM *et al.*, 2010).

### c) *Can f 3*

De même que pour l'albumine du chat, l'albumine sérique du chien est aussi un allergène pour l'homme. Allergène d'importance intermédiaire chez le chien, il a pourtant un rôle central puisque à l'origine de multiples réactions croisées et probablement responsable de sensibilisations croisées à différents mammifères (YMAN *et al.*, 1973 ; SPITZAUER *et al.*, 1994).

### d) *Can f 4*

Une troisième lipocaline retrouvée dans les poils de chien a été purifiée, clonée, caractérisée et nommée Can f 4 (MATTSSON *et al.*, 2010). Il a été difficile pour l'équipe de purifier la protéine, notamment en raison de la présence probable de plusieurs isoformes, même si les clones d'ADNc ne montraient pas de variation de séquence. Dans leur étude, et contrairement à de précédentes expériences, Can f 4 apparaissait comme un allergène d'importance supérieure à Can f 2 et Can f 3 qui étaient donc, pour leur échantillon, des allergènes mineurs (MATTSSON *et al.*, 2010).

### e) *Can f 5*

En étudiant l'urine de chiens, MATTSSON *et al.* (2009) ont purifié une protéine identifiée comme une arginine estérase appartenant à la famille des kallikréines et produite par la prostate. La séquence en nucléotides de l'ARNm et l'enchaînement en acides aminés

de cette protéine avait déjà été mise en évidence (CHAPDELAINÉ *et al.*, 1998). Des études ultérieures seront nécessaires pour préciser la structure exacte de la protéine et son absence certaine dans les poils et également dans l'urine de chiens femelles.

### *f) Can f 6*

Enfin, Can f 6 est une protéine de la famille des lipocalines qui présente un certain degré d'analogie avec Fel d 4 et qui est donc supposée être un allergène chez le chien (prédiction informatique automatique du NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) à partir des séquences homologues du gène codant pour cette protéine). Cependant, elle n'a pas encore été étudiée en détail à ce jour, ni son allergénicité mise en évidence ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)).

## **B. Tableau récapitulatif**

Le tableau 3 récapitule de façon synthétique les principales caractéristiques des allergènes du chien et du chat officiellement reconnus par l'IUIS

**Tableau 3 : Récapitulatif des allergènes du chien et du chat officiellement reconnus par L'OMS – IUIS**

<u>Animal</u>	<u>Allergène</u>	<u>Localisation tissulaire</u>	<u>Nom de la protéine</u>	<u>Famille protéique</u>	<u>Isoallergènes / variants</u>	<u>Gène et localisation</u>	<u>Protéine : nombre d'acides aminés (AA)</u>	<u>Fonction biologique</u>	<u>Allergénicité</u>	<u>Références</u>
<i>Canis familiaris</i>	<b>Can f 1</b>	Sécrétée dans le tissu épithélial de la langue	Lipocaline 1	Lipocalines	Can f 1.0101	<i>LCN 1 (Lipocaline 1)</i> (Chromosome 9)	174 AA	Protéine de transport	90% des patients allergiques présentent une liaison IgE-Canf 1. Au moins 90% d'entre eux ont un SPT positif	[1]
	<b>Can f 2</b>	Sécrétée dans le tissu épithélial de la langue et par les glandes parotides	CAN F 2	Lipocalines	Can f 2.0101	<i>Can f 2</i> (chromosome 9)	180 AA	Protéine de transport	80% des sérums de patients allergiques montrent une liaison IgE-Can f 2, 25% montrent une liaison IgE-rCanf 2	[2]
	Can f 3	Sécrétée dans le plasma	Albumine sérique	Famille des ALB/AFP/VDB	Can f 3.0101	<i>ALB (Albumin)</i> (Chromosome 13)	608 AA	Protéine majoritaire du plasma sanguin rôle majeur osmotique et de transport	35% des sérums de patients allergiques montent une liaison à Can f 3	[3]
	Can f 4	Retrouvée dans les poils de chien	Lipocaline	Lipocalines	Can f 4.0101	<i>OBP (Odorant-Binding protein)</i> (Chromosome X)	174 AA	Protéine de transport	35% des sérums de patients allergiques montrent une liaison IgE-Can f 4	[4]
	<b>Can f 5</b>	Sécrétée sous l'action des androgènes et retrouvée dans le liquide	Kallikréine 1	Kallikréines	Can f 5.0101	<i>KLK1 (Kalikrein 1)</i> (Chromosome 1)	260 AA	Arginine estérase	70% des sérums de patients allergiques montrent une liaison IgE-Can f 5	[5][6]  69

		séminal des chiens								
	Can f 6		Lipocaline (allergène Fel d 4 – like)	Lipocalines	Can f 6.0101	Chromosome 11	190 AA	Protéine de transport et de liaison aux phéromones	Protéine analogue à Fel d et donc supposée être un allergène	[7]
Felis domesticus	<b>Fel d 1</b>	Sécrétée dans la salive et les glandes sébacées	Utéroglobine	Sécrétoglobines	Fel d 1.0101	Chaîne 1 : <i>CH1</i>  Chaîne 2 : <i>CH2</i>	Isoforme 1 : 92AA (leader A) Isoforme 2 : 88AA (leader B)  Isoforme 1 (CH2L) : 109AA Isoforme 2 (CH2S) : 107AA Isoforme 3 (CH2ST tronqué) : 95AA	Rôle inconnu	Baisse de 90% de la réactivité des tests cutanés chez les patients allergiques après absorption de Fel d 1 de l'extrait de poils de chats	[8][9]
	Fel d 2	Sécrétée dans le plasma sanguin	Albumine sérique	ALB/AFP/VDL	Fel d 2.0101	<i>ALB</i> (Albumine)	608AA	Protéine majoritaire du plasma, rôle osmotique et de transport	14-23% des sérums de patients allergiques présentent des liaisons IgE-Fel d 2	[10][11]
	<b>Fel d 3</b>	Peau	Cystatine-A	Super famille des cystatines (premier groupe :	Fel d 3.0101	<i>CSTA</i> ( <i>Cystatine A</i> )	98 AA	Inhibiteur de protéases à cystéines	60-90% des sérums de patients allergiques montrent une liaison IgE-rFel d 3	[12]

				les stefines)						
	<b>Fel d 4</b>	Isolé dans les glandes salivaires sous-mandibulaires	Lipocaline	Lipocalines	Fel d 4.0101	<i>Fel d 4</i>	186 AA	Rôle de transport et de liaison aux phéromones	63% des personnes allergiques possèdent des IgE spécifiques de Fel d 4	[13]
	Fel d 5w	Retrouvé dans la salive	Immunoglobuline A	Immunoglobulines	Fel d 5w.0101					[14]
	Fel d 6w	Retrouvé dans la salive	Immunoglobuline M	Immunoglobulines	Fel d 6w.0101					[14]
	Fel d 7	Retrouvé dans la salive et dans les poils		Lipocalines	Fel d 7.0101	<i>Fel d 7</i>	180AA		14,7% des sérums de patients allergiques présentent des IgE se liant à Fel d 7	[15]
	Fel d 8	Isolé dans les glandes salivaires sous-mandibulaires (non retrouvé dans la salive et sur la peau des chats à ce jour)		Protéine latherin-like, protéine liant les lipides	Fel d 8.0101	<i>Lipid binding protein coding gene</i>	228AA		14,7% des sérums de patients allergiques présentent des IgE se liant à Fel d 8	[15]

Les allergènes notés en gras sont ceux reconnus comme des allergènes majeurs par l'IUIS

[1] SCHOU *et al.* (1991) ; [2] De Groot *et al.* (1991) ; [3] SPITZAUER *et al.* (1994) ; [4] MATTSSON *et al.* (2010) ; [5] CHAPDELAINE *et al.* (1988) ; [6] MATTSSON *et al.* (2009) ; [7] <http://www.allergen.org/> ; [8] MORGENSTERN *et al.* (1991) ; [9] OHMAN *et al.* (1976) ; [10] HILGER *et al.* (1996) ; [11] HILGER *et al.* (1997) ; [12] ICHIKAWA *et al.* (2001a et b) ; [13] SMITH *et al.* (2004) ; [14] ADENOYIN *et al.* (2007) ; [15] SMITH *et al.* (2011)

### III. Perspectives de prévention de l'allergie aux carnivores domestiques

#### A. Variations de production d'allergènes et méthodes de prévention classiques

##### 1) Effets de la castration chirurgicale et du lavage chez le chat et le chien

Dans un but de prévenir l'exposition aux allergènes du chien et du chat, la production de ceux-ci a été largement étudiée ces dernières décennies.

En 1994, ZIELONKA *et al.* ont supposé que la production d'allergène Fel d 1 par les glandes holocrines de la peau des chats était sous contrôle hormonal. En dosant la quantité de Fel d 1 sur la peau de chats mâles et femelles, castrés ou non et après injection de testostérone, ils ont montré que la sécrétion d'allergène était liée aux hormones, et notamment que la castration permettait une réduction significative de la quantité d'allergène présente sur la peau. Ils n'en concluaient pas qu'une castration permettait de prévenir l'exposition aux allergènes, étant donné qu'ils n'avaient dosé l'allergène qu'un mois après la castration.

A la même période, une autre étude (JALIL-COLOME *et al.*, 1995), a renforcé cette idée en montrant que les chats mâles non castrés produisaient beaucoup plus d'allergène Fel d 1 que les femelles non stérilisées. Ils ont réalisé une expérience similaire, en analysant des eaux de rinçage de peau de chat sur trois zones préalablement rasées : à la base de la queue, sur la zone axillaire et au milieu de l'abdomen. Malgré le faible nombre de chats inclus dans l'étude (cinq mâles et cinq femelles), la différence de production de Fel d 1 par la peau était statistiquement significative entre mâles et femelles. Les chats mâles produisent plus de sébum que les femelles, ce qui a conduit l'équipe à supposer que Fel d 1 était produit conjointement avec le sébum par les glandes sébacées.

De nombreuses idées reçues peuvent circuler concernant l'allergie aux carnivores domestiques. Ainsi, aux Etats-Unis, il est encore fréquent d'administrer de l'acépromazine aux chats présents dans les foyers de personnes allergiques, dans le but de réduire la dispersion des allergènes dans l'environnement. Une étude (KLUCKA *et al.*, 1995) a montré que ni le lavage du chat à l'eau distillée une fois par semaine ni l'utilisation d'un spray du commerce Allerpet-C® spray, ni l'administration d'acépromazine à raison de 0,3mg/chat une fois par jour n'était efficace et ne permettait une réduction de la dispersion de Fel d 1 dans l'environnement. Cette constatation a été renforcée par une autre expérience (AVNER *et al.*, 1997) qui a montré que, chez les chats mâles castrés, les lavages (douche à l'eau, bain à l'eau ou avec du savon à raison de 3 minutes minimum), se montraient insuffisants car ils permettaient une réduction immédiate du taux d'allergènes dans l'environnement, mais que cette réduction ne persistait pas une semaine après.

Cependant, certaines études ont suggéré le contraire, et ce notamment chez le chien. HODSON *et al.* (1999) ont choisi de s'intéresser à la quantité d'allergène Can f 1 présent sur le chien et dans l'habitat des chiens en fonction du lavage ou non de l'animal. Pour cela, ils ont recruté 25 chiens qui n'avaient pas été nettoyés pendant 3 semaines précédant l'étude. Ils ont réalisé des prélèvements en coupant des poils sur le chien, et, pour 5 d'entre eux, ils

ont également réalisé des analyses de l'air ambiant dans leur habitat, en plaçant des filtres à air fonctionnant pendant une durée de 8 heures par jour. Selon les auteurs, le fait de nettoyer l'animal permet une réduction significative du taux d'allergène présent sur la peau du chien mais aussi dans l'habitat. Mais cet effet n'est pas permanent et, pour être efficace, l'animal doit être nettoyé au moins deux fois par semaine.

Il apparaît donc vraisemblable que si ces mesures permettent de limiter la teneur en allergènes dans l'environnement de façon temporaire, elles restent largement insuffisante pour les personnes souffrant d'allergie aux chiens et/ou aux chats.

En outre, toutes ces études ne s'intéressaient qu'à Fel d 1 et Can f 1, compte tenu de leur importance majeure pour l'allergie aux chats et aux chiens domestiques. Cependant, nous avons vu qu'ils sont loin d'être les seuls allergènes mis en cause. Il apparaît donc évident que des perspectives de prévention ne concernant que ces allergènes ne pourront pas être totalement efficaces pour lutter contre l'allergie aux animaux domestiques.

## 2) Lavages de l'environnement

Le nettoyage de l'animal ou la castration des mâles étant insuffisants, il semble que d'autres mesures soient nécessaires pour réduire l'exposition aux allergènes. Agir sur l'environnement pourrait éventuellement être un moyen d'action efficace.

De plus, de nombreuses études ont montré que les allergènes sont présents non seulement dans les foyers des personnes possédant un animal domestique, mais aussi et de façon plus surprenante, dans des lieux publics comme des crèches, des hôpitaux ou encore des maisons sans chat ou chien (CUSTOVIC *et al.*, 1998 ; BOLLINGER *et al.*, 1996). Cela serait dû à un portage passif des allergènes sur les vêtements des individus en contact avec les animaux.

Pour résoudre ce problème dans les lieux publics ou au domicile des patients, des purificateurs d'air peuvent être utilisés, comme les filtres HEPA (*High-Efficiency Particulate Arresting*). Leur efficacité est néanmoins largement mise en cause (SULSER *et al.*, 2009), notamment car il est assez contraignant de les utiliser (nuisances sonores), mais aussi parce que les patients allergiques ne restent pas constamment dans ces lieux. De plus, il apparaît très clair que si ces appareils retiennent dans leurs filtres une grande quantité d'allergènes, ceux-ci restent présents, par exemple, dans la poussière de maison.

Cependant, une autre étude (LICCARDI *et al.*, 1998) semble montrer que le simple fait de nettoyer les vêtements des propriétaires de chats pouvait prévenir la dispersion des allergènes, dans le cadre de la dissémination de ceux-ci dans des environnements ne contenant pas de chats habituellement (écoles, garderies, lieux publics, etc.). Cette action basique et facile à mettre en œuvre est cependant évidemment très compliquée à contrôler dans la société.

## B. Les races de chiens et de chats dits « hypoallergéniques »

L'allergie aux animaux domestiques est un problème de santé publique qui engendre un certain nombre d'idées reçues au sein de la population. Ainsi, si les races d'animaux nus ou perdant peu de poils : chats nus (Sphynx et Donskoy), ou à poils frisés (Devon et Cornish Rex) et Chien nu (Chinois à crête ou Mexicain) ou à poils frisés, tels que Barbets ou Chien d'eau portugais par exemple (figure 28) permettent d'avoir un environnement moins chargé en poils et donc potentiellement moins à risque pour une personne allergique, aucune étude scientifique n'a jamais montré leur effet réel chez les personnes allergiques. Ces chats et chiens sécrètent en effet les allergènes en cause exactement de la même façon que les autres, et peuvent donc causer les mêmes réactions chez les patients allergiques. Un certain nombre de médecins et sites internet conseillent tout de même aux personnes présentant une allergie légère à modérée aux carnivores domestiques et souhaitant à tout prix avoir un animal, d'acquérir un chien ou un chat appartenant à ces races, en associant un traitement hygiénique strict (toilette de l'animal, entretien de la maison) afin de réduire au maximum la teneur en allergène de l'environnement.

Figure 28 : Quelques exemples de races de chiens et de chats faussement réputées être « hypoallergéniques » dans l'opinion collective

a)



b)



c)



d)



a) Chien Chinois à crête (source wikipedia : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Chien\\_chinois](http://fr.wikipedia.org/wiki/Chien_chinois)) b) chat Sphynx (source Sphynx Club de France: <http://www.scf-fr.net> ) c) Chat Devon Rex (source wikipedia : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Devon\\_rex](http://fr.wikipedia.org/wiki/Devon_rex) ) d) Chien Caniche (source wikipedia : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Caniche> )

Ceci est largement contestable, l'allergie étant une affection évolutive et non prévisible.

Une étude menée en France (RAMADOUR *et al.*, 2005) a montré qu'aucune des races de chiens étudiées (Caniche, Berger Allemand, Berger des Pyrénées, Epagneul, Griffon,

Cocker, Labrador et Yorkshire terrier) n'était hypoallergénique. Seul le Labrador montrait une concentration en allergène (Can f 1 et Can f 2) statistiquement différente et inférieure aux autres races. Cependant, les auteurs ont souligné que cette concentration variait énormément au sein d'une race et était notamment liée à la quantité de sébum présente sur la peau, ou encore au sexe de l'animal. Il n'est donc pas possible, pour une personne allergique, de se procurer un animal pour lequel il n'y aurait aucun ou quasi aucun risque de développer une allergie.

Plus récemment, NICHOLAS et al. (2011) ont confirmé cette idée, en testant un plus grand nombre de races de chiens ayant été décrites auparavant comme hypoallergéniques. Ils se sont intéressés à 60 races de chiens "dites hypoallergéniques", c'est-à-dire ayant été au moins une fois décrite comme hypoallergénique par une source internet. Ils ont ainsi recensé des races de chiens très variées, allant du Yorkshire terrier au Caniche en passant par le Terrier Australien et le Chihuahua, avec une nette majorité de terriers. Au lieu d'analyser la quantité d'allergène (Can f 1) présente sur l'animal, l'équipe a choisi de rechercher Can f 1 dans l'habitat des chiens, en comparant des groupes de chiens dits hypoallergéniques et des chiens non hypoallergéniques parmi des pures races ou des croisés. Leurs conclusions ont été que les chiens dits hypoallergéniques contaminaient leur environnement en allergène de la même façon que les chiens dits « classiques », et ils suggéraient des études plus précises pour démontrer l'existence d'une véritable race hypoallergénique.

Tout ceci conforte l'idée que les races de chiens et de chats doivent toutes être a priori considérées comme allergéniques, notamment par les vétérinaires et les médecins. Il paraît douteux et même dangereux de conseiller l'acquisition d'une quelconque race d'animaux à un patient allergique, même si l'allergie est jugée comme modérée.

## **C. Les animaux Allerca-Lifestyle pets® : la recherche d'une mutation naturelle et rare dans une population de chats**

### **1) Principe général**

Les observations précédentes conduisent à formuler la question suivante : les races hypoallergéniques n'existant pas, serait-il possible de mettre au point des lignées de chiens et de chats réellement hypoallergéniques ?

La société américaine Allerca® - Lifestyle pets commercialise depuis 2006, via son site Internet, des animaux (chiens et chats) dits 100% hypoallergéniques, aux prix variant entre 6950 \$ et 26950 \$. Cette entreprise présente ces animaux comme les premières races de chiens et de chats hypoallergéniques, scientifiquement prouvés.

Selon leur site internet ([www.allerca.com](http://www.allerca.com)), ils ont recherché, au sein de vastes populations de chats tout d'abord, des mutations naturelles mais rares dans le gène codant pour Fel d 1, en utilisant des techniques de séquençage génétique.

Ils ont ensuite sélectionné ces animaux, les ont reproduits, et, de la même façon que l'on crée de nouvelles races sur des critères esthétiques, ont mis en place des lignées de chats produisant une version modifiée de la protéine Fel d 1.

Leur première mutation féline identifiée étant dominante, ils ont pu croiser ces chats et fixer le caractère sans trop de difficultés. Lors d'une interview du fondateur de la société sur une radio américaine, retransmise sur le site internet d'Allerca®, celui-ci admet tout de même qu'une réaction allergique est possible vis-à-vis des allergènes mineurs du chien et du chat, et évalue empiriquement l'efficacité de ces animaux à 95%. Ces animaux sont donc échangeables ou remboursables, garantis pendant un an, et fournis obligatoirement stérilisés, afin de protéger les lignées de la société.

Allerca® a présenté deux races de chats nommées "Allerca GD" et "Ashera GD" et une race de petits chiens "Jabari dog GD" (figure 29).

Figure 29 : Les chiens et chats commercialisés par la société américaine Allerca®-Lifestyle Pets

a)



c)

b)



Les animaux commercialisés par Allerca® . a) La race de chat "Ashera GD" s'apparente esthétiquement aux chats de race Bengal. b) Les chiens "Jabari dog GD" sont des chiens de petite taille s'apparentant à de petits terriers. c) Enfin, les chats "Allerca GD" sont les chats de type européen commercialisés par Allerca® (d'après le site internet Lifestyle pets : [www.allerca.com](http://www.allerca.com)).

## 2) Le génotypage : la recherche de variants naturels au sein d'une population

Cette stratégie pour produire des lignées d'animaux hypoallergéniques impliquerait l'utilisation d'outils de génotypage, ou plus précisément de recherche de variants alléliques naturels pour un gène donné. On s'intéresse à un gène connu codant un allergène majeur du chien ou du chat (par exemple, le gène *CH1* codant pour la chaîne 1 de l'allergène Fel d 1 chez le chat). Ce gène est caractérisé par sa séquence en bases. De nombreuses variations de cette séquence (insertions, délétions, ou inversions) peuvent avoir lieu de façon spontanée chez des individus. En fonction de la nature de la mutation et de la position de celle-ci dans le gène (dans la séquence codante, promotrice...), ces mutations peuvent avoir plusieurs conséquences :

- aucune : la protéine est tout de même sécrétée de façon normale, et sa fonctionnalité est conservée ;
- la protéine peut être sécrétée de façon anormale : trop ou pas assez ;
- la protéine peut être sécrétée mais être tronquée et plus ou moins fonctionnelle ;
- la protéine peut ne pas être sécrétée du tout.

Ici, on recherche des animaux pour lesquels ces deux dernières options sont atteintes. Dans ces cas extrêmes, il se peut que l'absence de protéine fonctionnelle soit pathologique, voire une cause de létalité embryonnaire.

La fonction réelle de la plupart des allergènes du chat et du chien est inconnue. On sait que Fel d 1, par exemple, est sécrété par les glandes salivaires, les glandes sébacées et les glandes anales, mais on ignore son rôle exact. Une mutation d'un tel gène pourrait entraîner un phénotype normal chez un chat, même si on ne peut pas en être certain. Le principal problème de cette stratégie est qu'elle recherche des variants alléliques naturels pour un gène donné, mais on ne sait pas à l'avance si ce variant sera intéressant vis-à-vis de la problématique (trouver un chien ou un chat produisant une version hypoallergénique d'un allergène majeur).

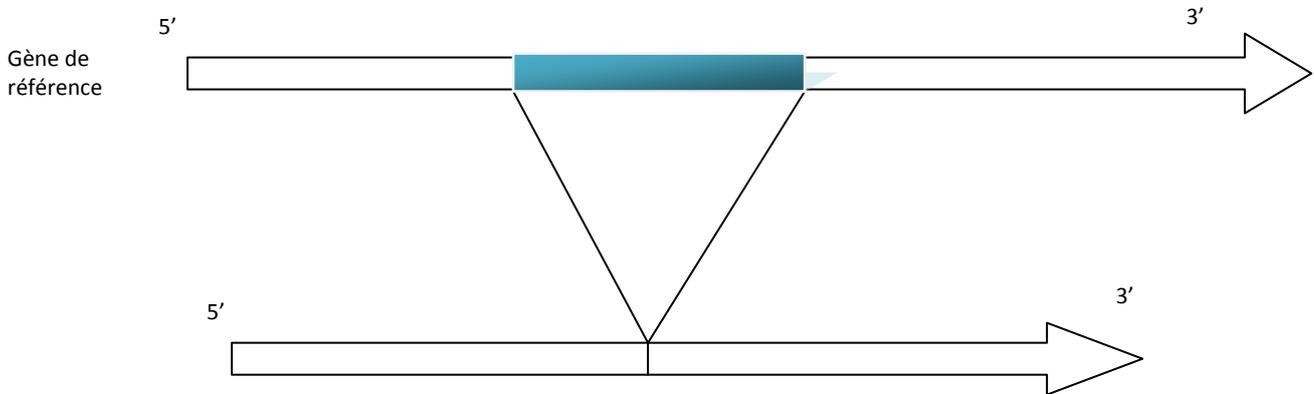
#### *a) Les mutations pouvant être recherchées au sein d'une population de chats ou de chiens*

Les variations de la séquence d'ADN d'un individu, conjointement avec les effets de l'environnement sont à la base de la diversité des organismes vivants. Ces variations sont le résultat de mutations qui peuvent être classées en différentes catégories (figure 30) : les variations d'un seul nucléotide (ou SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*), l'insertion ou la délétion de fragments d'ADN de longueur très variable, et enfin la duplication ou l'inversion de segments. En fonction de leur position sur l'ADN (dans la séquence codante, dans les régions régulatrices, dans les régions non codantes) leur effet peut être variable.

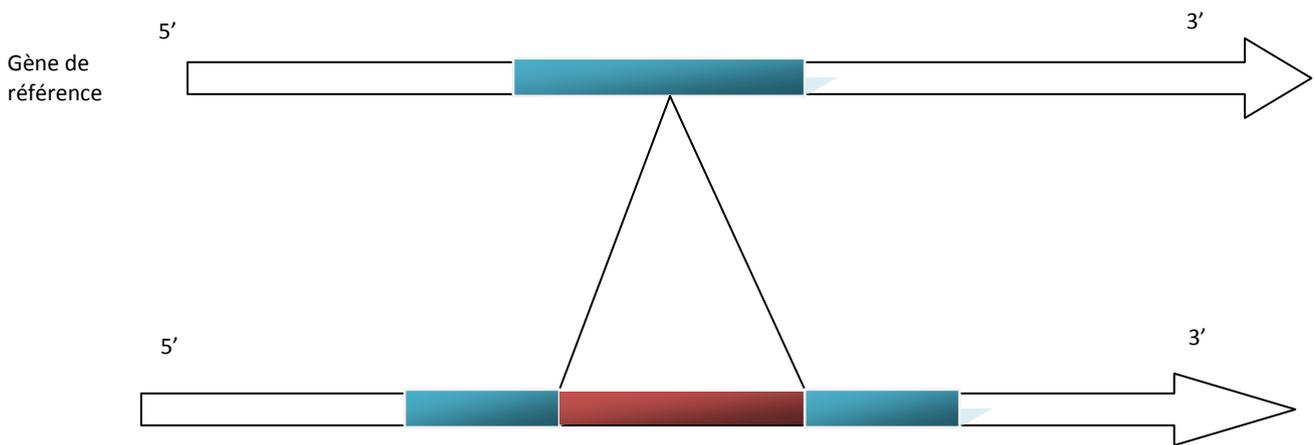
Dans le cadre de la détection de variants naturels pour le gène codant un allergène, et ne connaissant pas le rôle exact des allergènes, il est difficile d'étudier le phénotype résultant pour repérer les animaux intéressants. Il paraît donc légitime de commencer par s'intéresser à l'ADN avant de poursuivre par l'étude de la protéine codée.

**Figure 30 : Les différents types de mutations génétiques**

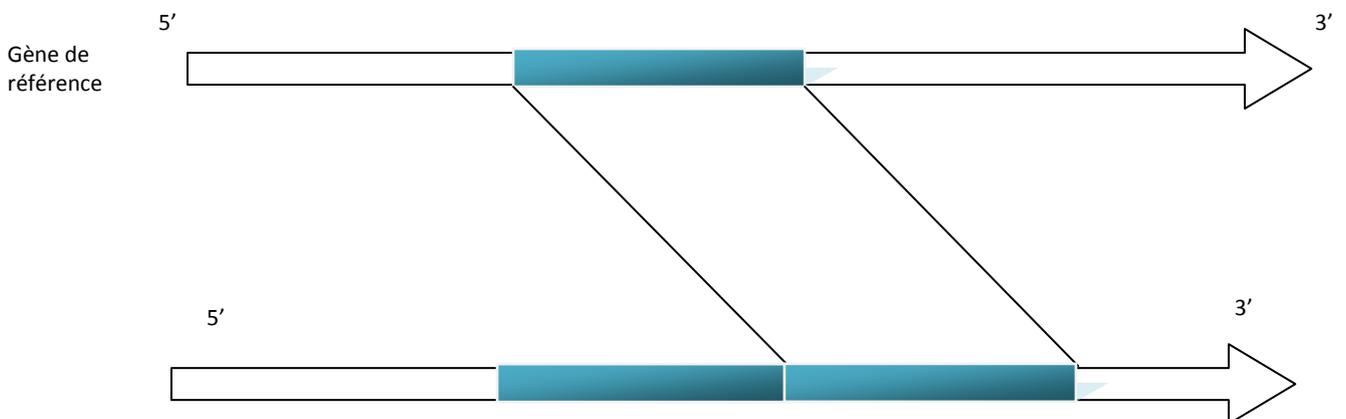
1) Délétion de un à plusieurs kb



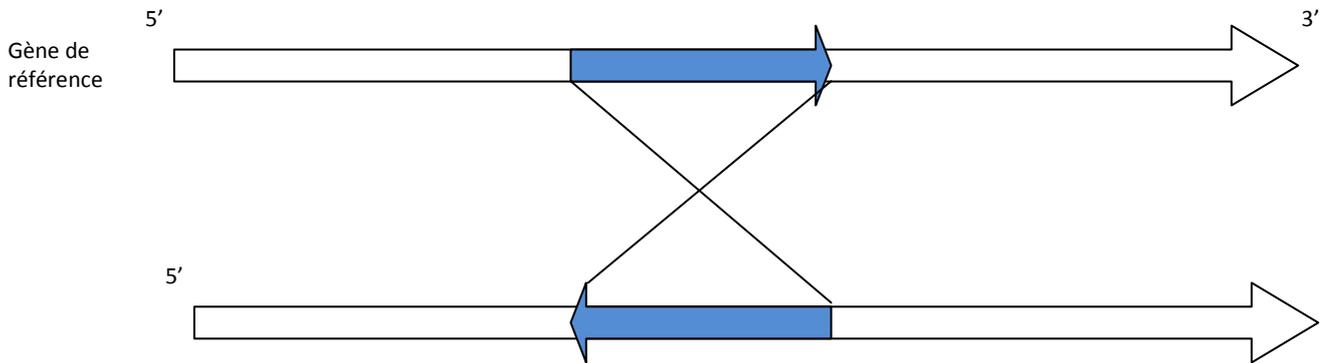
2) Insertion d'une nouvelle séquence ou d'éléments mobiles de taille variable



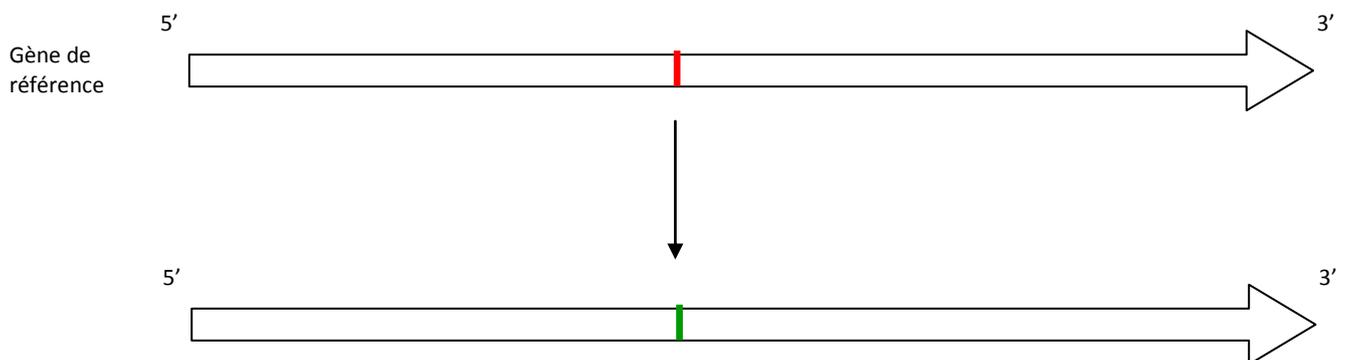
3) Duplication d'une partie du gène (intron ou exon), à côté (duplication en tandem comme sur le schéma) ou à distance



#### 4) Inversion d'une portion d'ADN



#### 5) Substitution d'une base



Les éléments mobiles sont des fragments d'ADN capables de se déplacer au sein du génome par transposition. De taille et de composition variable, ils contiennent des séquences (gène codant pour la transposase notamment) leur permettant de s'intégrer dans le génome, sous forme de copies par exemple.

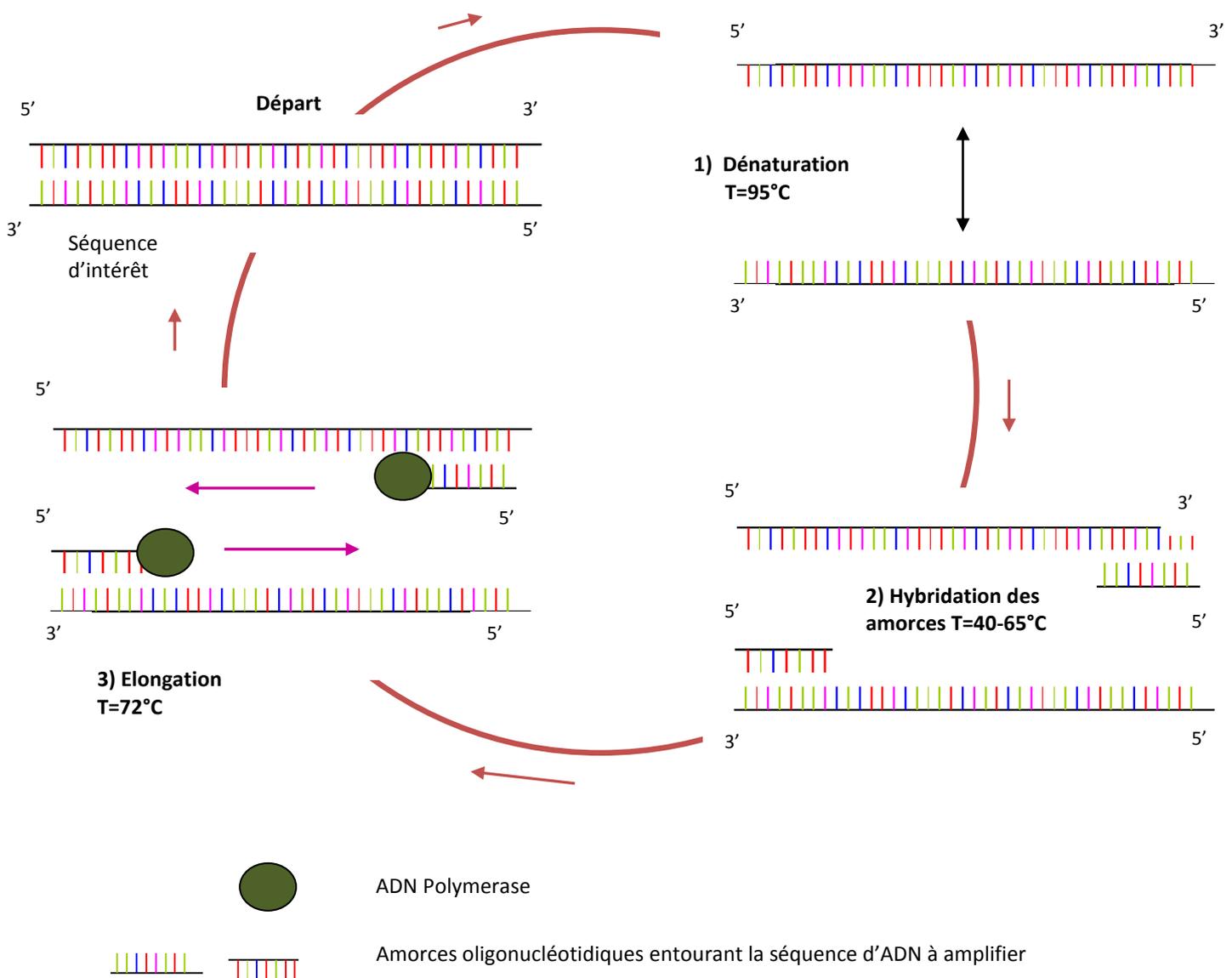
#### ***b) Les outils de génotypage :***

Les méthodes de génotypage, c'est-à-dire d'identification des allèles portés par un génome ou d'une partie de génome impliquent presque toutes la réalisation d'une première étape de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) afin d'amplifier la portion d'ADN d'intérêt. La PCR est ensuite suivie d'une deuxième étape permettant l'analyse de la séquence amplifiée. Cette étape peut être le séquençage, la digestion enzymatique puis l'électrophorèse, l'électrophorèse, des techniques d'hybridation, ou encore les puces à ADN. Certaines de ces manipulations sont très coûteuses ou difficiles à réaliser à grande échelle.

## - La technique de PCR

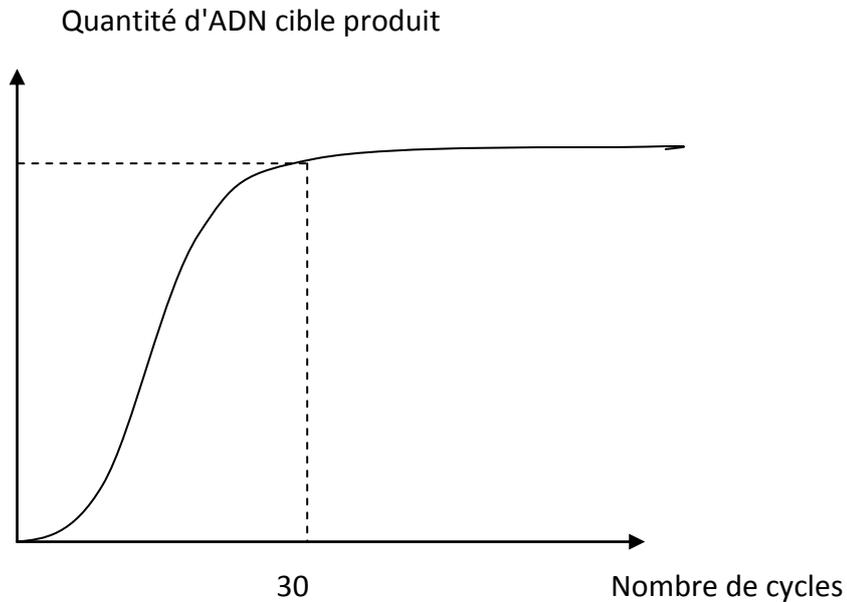
La PCR est une technique de biologie moléculaire servant à amplifier de façon acellulaire une séquence d'ADN donnée (figure 31). Mise au point par Kary Mullis en 1985, ce qui lui valut un prix Nobel, elle se déroule en plusieurs cycles. A partir d'une molécule d'ADN (génomique ou autre : mitochondrial, ADN complémentaire), le principe est d'amplifier une séquence cible, par exemple le gène d'intérêt, grâce à des amorces oligonucléotidiques spécifiques des extrémités de la séquence cible et l'encadrant, et d'une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase). En faisant varier la température du milieu, trois étapes du cycle de PCR vont avoir lieu : la dénaturation de l'ADN cible, l'hybridation des amorces et la synthèse du brin d'ADN complémentaire. En théorie, la séquence cible se retrouve donc en quantité  $n_0 \times 2^n$  (n étant le nombre de cycles et  $n_0$  étant le nombre de molécules initial) et le brin d'ADN cible non amplifié devient négligeable en quantité, par rapport à la séquence amplifiée. En réalité, cette quantité n'est pas atteinte et les rendements sont plus faibles (d'après CALLEN, 2005). Une PCR ne s'effectue en général "que" entre une vingtaine et une trentaine de cycles (figure 32).

Figure 31 : Principe d'un cycle d'amplification de l'ADN lors d'une PCR



Un cycle de PCR comprend trois étapes. 1) La dénaturation s'effectue à plus de 90°C. 2) L'hybridation des amorces s'effectue à une température spécifique pour chaque couple d'amorces. 3) L'élongation permet la synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase et s'effectue généralement à 72°C.

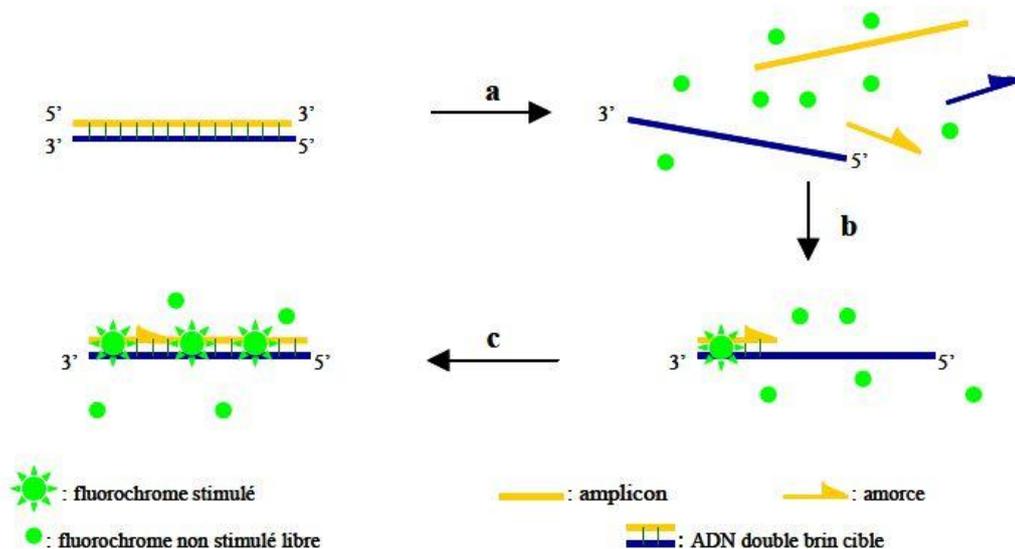
**Figure 32 : Quantité d'ADN produit lors de PCR**



Lors des cycles de PCR, la quantité d'ADN cible produit atteint un maximum au bout d'environ 30 cycles.

La PCR en temps réel est une variante de la PCR classique permettant une quantification cycle par cycle de la quantité d'ADN synthétisée, et donc aussi de la quantité d'ADN initial (figure 33). Elle repose sur l'utilisation de molécules fluorescentes, qui émettent un signal proportionnel au nombre d'amplicons (de répliques du brin) produits (d'après POITRAS et HOUDE, 2002).

Figure 33 : Principe d'une PCR en temps réel



Dans l'une des techniques de PCR en temps réel, une molécule fluorescente peut servir de marqueur de quantité d'ADN produit. Ici le fluorochrome se lie à la molécule d'ADN double brin uniquement et produit un signal lumineux lors de la stimulation. Lors de l'élongation le signal fluorescent augmente d'intensité, ce qui permet de suivre la quantité totale d'ADN produite (d'après POITRAS et HOUDE, 2002).

- Analyse des produits de PCR : recherche de variants pour un gène donné

Après l'étape de PCR peuvent suivre des étapes d'analyse des fragments d'ADN produits. Celles-ci passent par l'utilisation d'outils variés. La technique de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilise les enzymes de restrictions qui coupent l'ADN à des endroits précis, propres à chacune. L'utilisation combinée de plusieurs enzymes de restriction puis d'une électrophorèse peut permettre de mettre en évidence un polymorphisme dans la séquence du gène étudié.

Nous remarquerons que la technique des RFLP n'est plus utilisée actuellement, du fait de l'existence d'outils plus puissants de recherche de variants, tels que les diverses méthodes de séquençage.

## - Le séquençage du gène

Une alternative pour l'analyse des produits de PCR est le séquençage complet du segment d'ADN amplifié par PCR. Il s'agit ici de déterminer la séquence exacte en nucléotide (par exemple d'un gène), afin de mettre en évidence des variants. Plusieurs méthodes existent pour le séquençage (METZKER, 2009).

- *Le séquençage par la méthode de Sanger*

Le séquençage par la méthode de Sanger (figure 34), fondé sur l'amplification de l'ADN par clonage bactérien ou PCR, et l'utilisation de nucléotides marqués et modifiés, a largement été utilisé ces dernières décennies, et a notamment permis le séquençage entier du génome de l'homme et de nombreux animaux. Cette méthode est fondée sur l'utilisation de nucléotides modifiés (figure 35) capables d'interrompre la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase et qui sont également marqués. Autrefois marqués avec des composés radioactifs, c'est la fluorescence qui est aujourd'hui utilisée. Les séquenceurs actuels utilisent la méthode de Sanger et la technique de l'électrophorèse capillaire pour séparer les brins d'ADN dans des capillaires de quelques microns de diamètre. Des nucléotides normaux et des nucléotides modifiés et marqués par de la fluorescence sont introduits en concentration connue dans la solution contenant l'ADN cible dénaturé.

La réplication n'a alors lieu et ne se poursuit que si les concentrations relatives en nucléotides n'ont pas permis l'incorporation d'un nucléotide modifié. Si l'un d'entre eux est incorporé, la réplication cesse immédiatement pour ce brin d'ADN. En multipliant les cycles et en faisant varier la concentration en chaque nucléotide, on obtient une multitude de brins tronqués qui, une fois analysés, conduisent à la séquence complète de l'ADN cible.

**Figure 34 : Principe de la méthode de séquençage de Sanger**

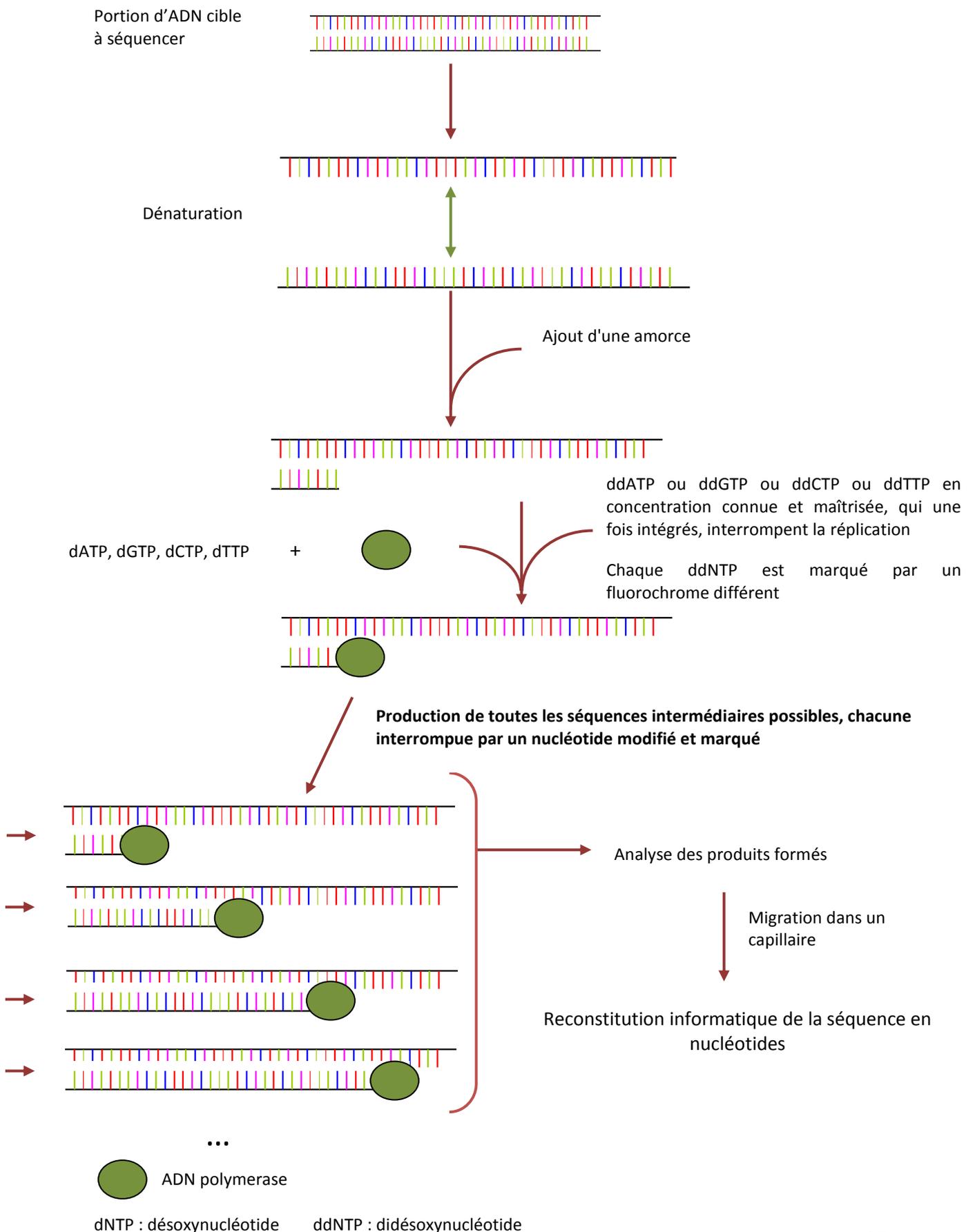
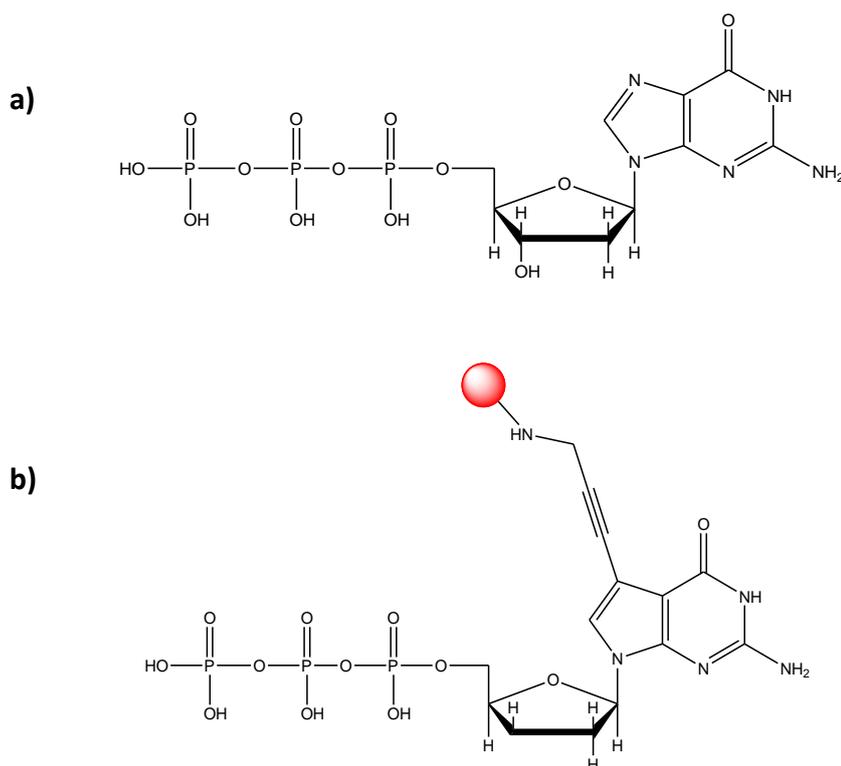


Figure 35 : Nucléotides modifiés employés dans la méthode de Sanger :



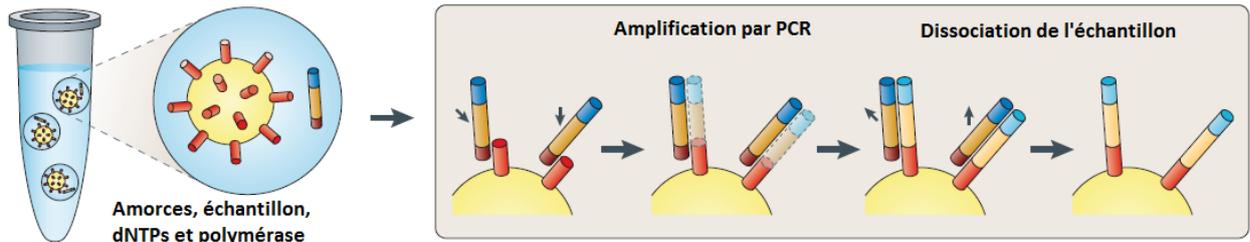
a) Désoxyadenosinetriphosphate ou dATP, nucléotide normal utilisé pour la synthèse d'ADN. b) ddATP : didésoxyadenosinetriphosphate marqué avec un fluorophore. Dépourvue d'extrémité 3'-OH, il possède la capacité d'interrompre la réplication de l'ADN une fois intégré.

- *Les séquenceurs de nouvelle génération*

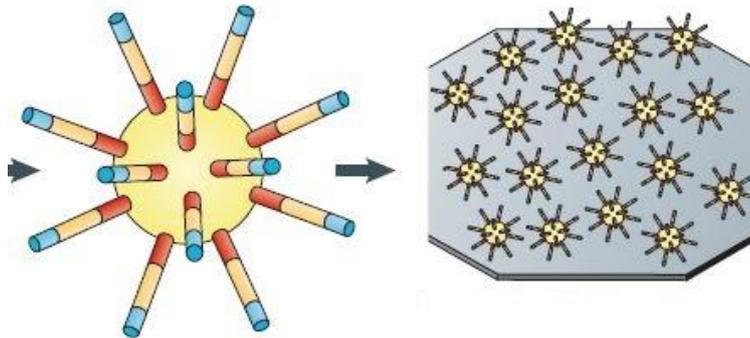
De nouvelles technologies ont révolutionné le monde du séquençage. Ce sont les méthodes de nouvelle génération (NGS – *Next-Generation Sequencing*), commercialisés par Roche/454, Illumina/Solexa, Life/APG ou encore Helicos BioSciences. Ces techniques offrent la possibilité de séquencer l'ADN à faible coût, et surtout d'obtenir un très grand nombre de données à la fois. Ces procédés révolutionnaires sont fondés sur la mise au point d'une matrice, molécule d'ADN composée d'une région connue (une séquence adaptatrice à laquelle une amorce universelle peut se lier) et de la portion d'ADN à séquencer. L'ADN cible est en effet aléatoirement coupé en brins de petite taille à l'origine chacun d'une matrice. Les techniques de séquençage de nouvelle génération impliquent toutes l'immobilisation de cette matrice sur un support fixe, comme une plaque ou une microbille (figure 36).

Les étapes suivantes sont le séquençage lui-même, l'acquisition des données par imagerie, et l'analyse des données. Deux approches existent : le séquençage direct d'une seule molécule d'ADN, ou le séquençage des produits d'amplification par PCR d'une molécule d'ADN.

Figure 36 : Le séquençage de nouvelle génération - différentes stratégies pour immobiliser la matrice ADN

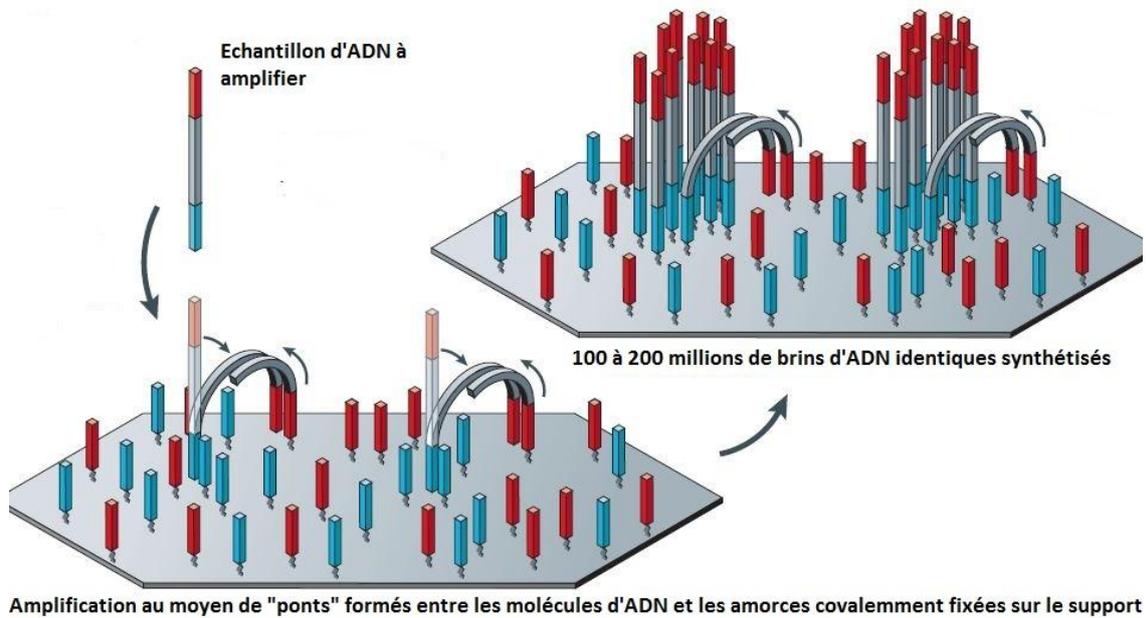


a)



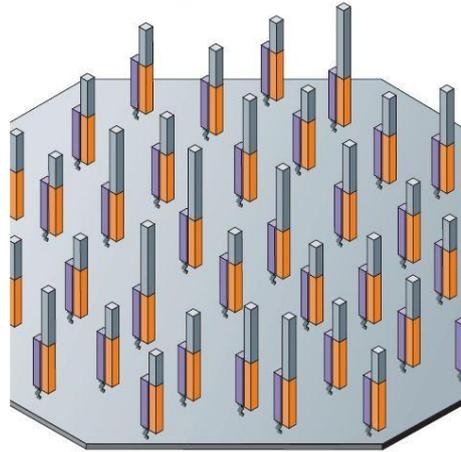
a) Dans la technologie Roche/454, Life/APG et Polonator, des conditions sont créées pour qu'une molécule d'ADN à séquencer se lie à une microbille (par l'intermédiaire d'une amorce). L'amplification par PCR de chaque molécule a lieu sur la microbille. Chaque microbille porte alors des millions de clones de la même molécule d'ADN, l'étape de séquençage peut avoir lieu.

b)

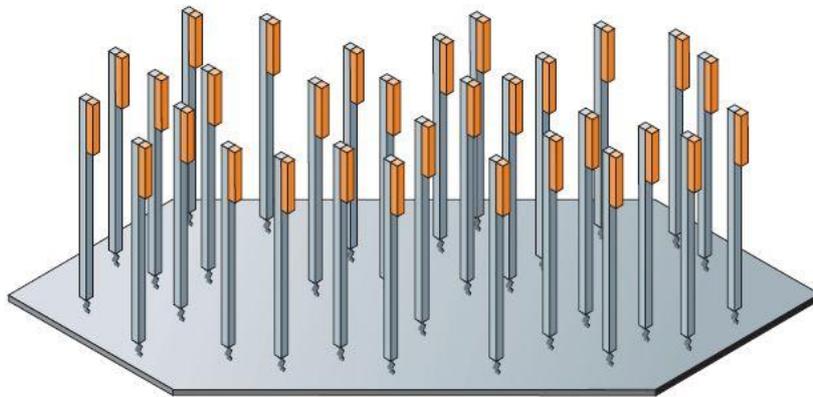


b) Dans la technologie Illumina/Solexa, une molécule d'ADN est fixée sur une plaque. Les plaques portent les amorces complémentaires de l'ADN matrice. L'amplification se fait au moyen de ponts créés entre les brins d'ADN et les amorces environnantes. Chaque plaque porte alors des millions de copies du brin d'ADN.

c)

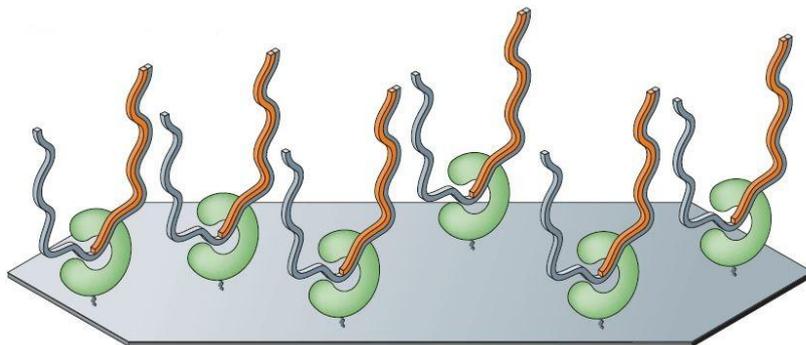


d)



c) Chez Helicos BioSciences, deux stratégies existent : l'immobilisation des amorces sur une plaque, ou d) l'immobilisation de la matrice d'ADN elle-même. Dans ces deux techniques, l'amplification de l'ADN génomique n'a pas lieu. Il s'agit du séquençage d'une seule molécule d'ADN, elle-même clivée en une multitude de fragments de petite taille.

e)



e) Enfin, chez Pacific BioSciences, Life/Visigen et LI-COR Biosciences, l'ADN polymérase est immobilisée sur la plaque, et les fragments d'ADN génomique sont amplifiés directement par les polymérases. Cette technique permettrait d'utiliser des fragments d'ADN de plus grande taille (d'après METZKER, 2010).

Les techniques de séquençage de nouvelle génération utilisent toutes le phénomène de fluorescence ou de luminescence. Lors de l'étape de séquençage, il y a une différence fondamentale entre la stratégie à une seule molécule et la stratégie de l'ADN amplifié par

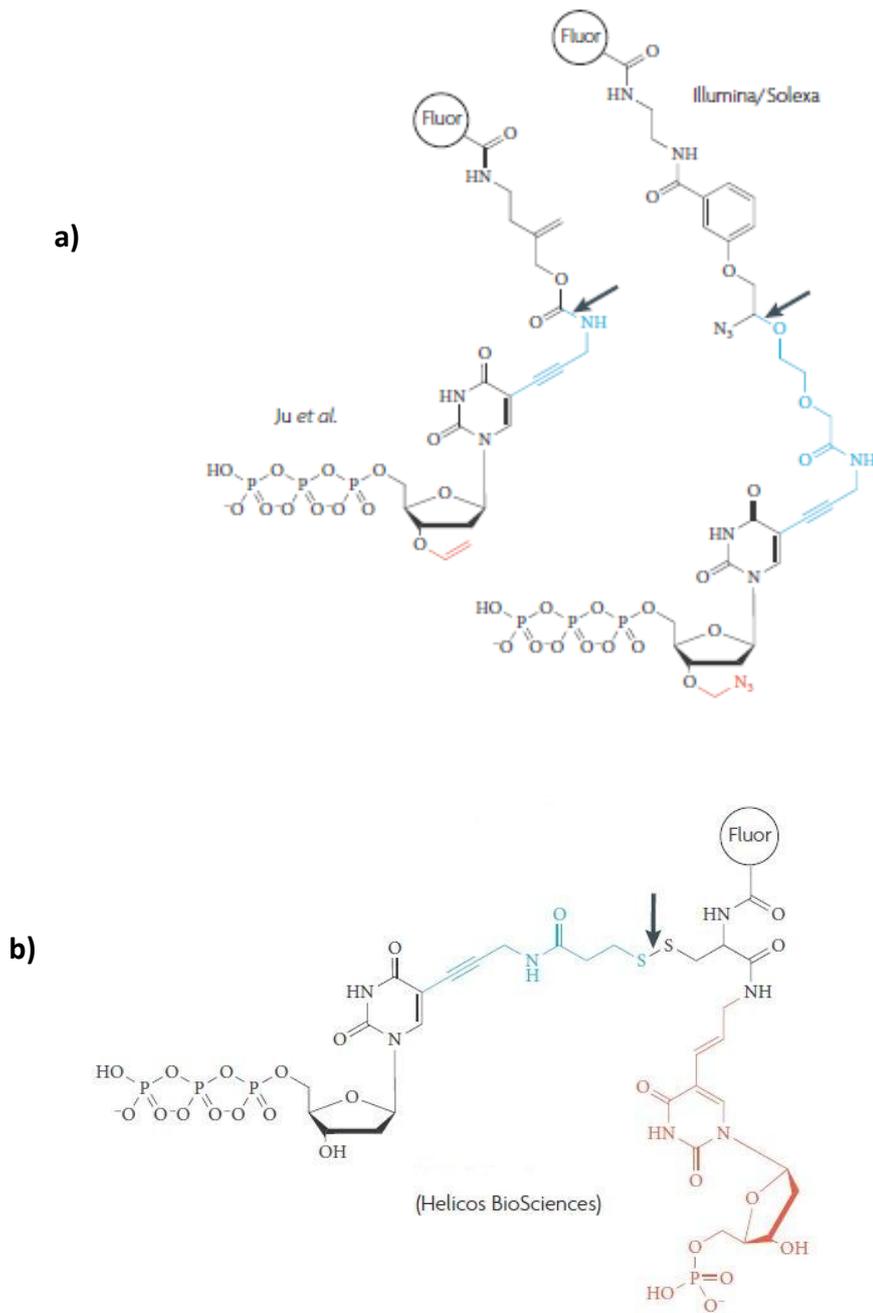
PCR. En effet, deux stratégies peuvent être utilisées : une seule molécule d'ADN est liguée à un adaptateur et fixée sur le support pour y être séquencée individuellement. Ou bien la matrice fixée sur le support est préalablement dupliquée un grand nombre de fois par PCR pour former un clone d'ADN qui sera ensuite séquencé.

Pour l'étape de séquençage, lors de la lecture après chaque cycle, le signal émis lors du séquençage d'une population de clones d'ADN correspond à un consensus entre chaque signal émis par chaque molécule. Or, il est possible d'observer un décalage sur quelques molécules par rapport à l'état attendu au cycle  $n$  (par exemple, il manque un nucléotide et la molécule est en réalité au stade du cycle précédent  $n-1$ ). Ceci implique que la stratégie d'addition de nucléotides soit très efficace afin de limiter au maximum ce genre d'erreurs. Cet inconvénient n'a pas lieu lors du séquençage d'une seule molécule d'ADN. Cependant d'autres problèmes peuvent subvenir : des erreurs de type délétion peuvent apparaître en raison d'effets de blanchiment (ou « quenching ») : la fluorescence observée est moins importante à cause d'interactions entre molécules adjacentes. En outre, des nucléotides non fluorescents (car hydrolysés au cycle précédent ou au cycle en cours) peuvent être incorporés et donc non lus.

Les différentes firmes ont choisi de développer plusieurs méthodes de séquençage.

La technique basée sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents (ou CRT : *Cyclic Reversible Termination*), inspirée de la méthode de Sanger, est utilisée par Illumina/Solexa et Helicos BioSciences. A chaque cycle, on injecte un seul nucléotide modifié et fluorescent (si un seul fluorochrome est utilisé) ou quatre nucléotides marqués par quatre fluorochromes différents, que la polymérase incorpore s'il est complémentaire de la base sur la matrice. La synthèse s'interrompt dès qu'un seul nucléotide est ajouté. L'excès de nucléotides restant est éliminé par rinçage et une étape d'imagerie repère la fluorescence afin de déterminer quel nucléotide a été incorporé et sur quel brin. Avant de reprendre un cycle, une étape de clivage est nécessaire afin de retirer l'extrémité inhibitrice et le fluorophore. La clé de cette méthode est donc l'utilisation de nucléotides terminateurs réversibles. Ils peuvent être de deux natures : 3' bloqué ou non bloqué (figure 37).

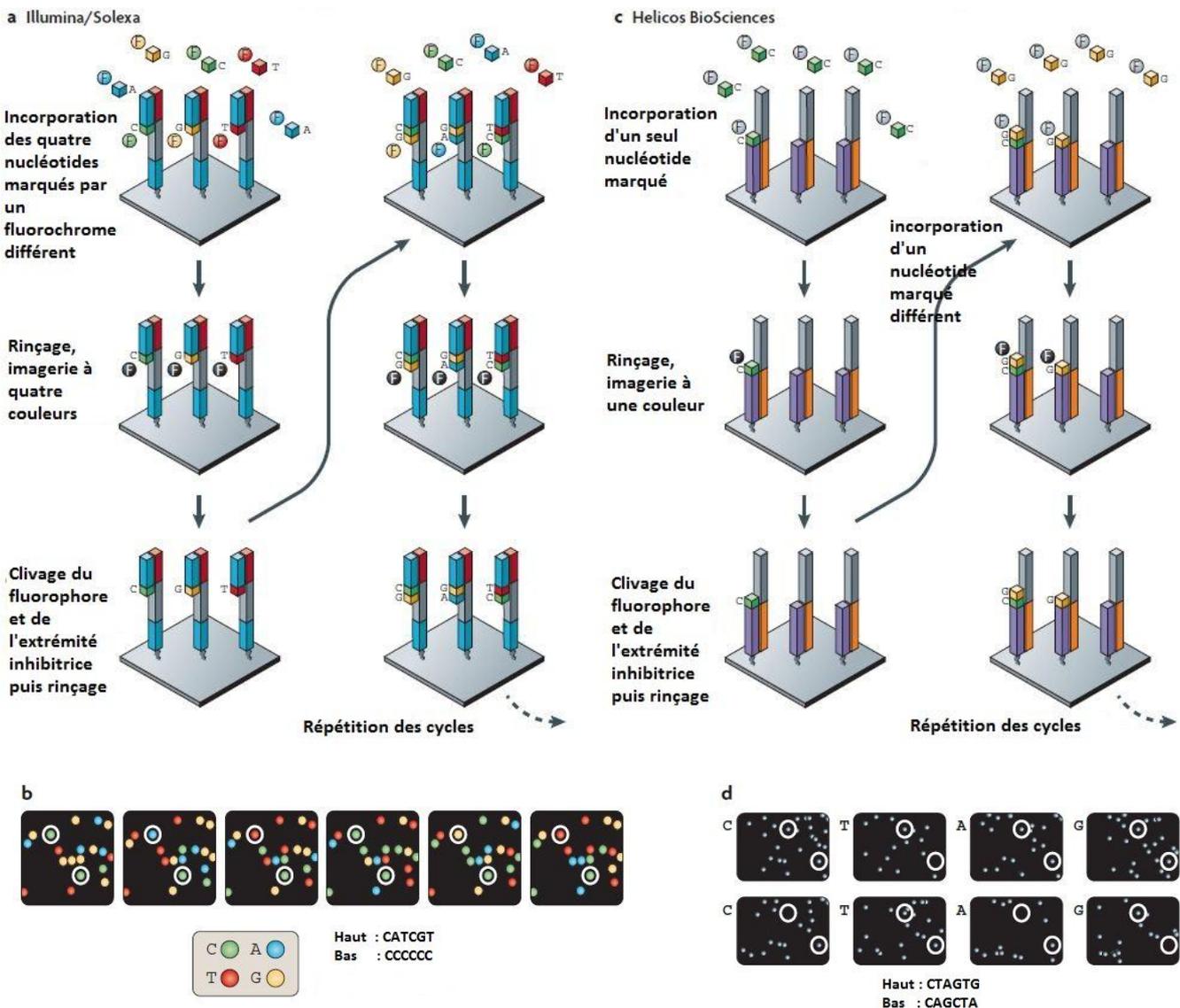
Figure 37 : Exemples de nucléotides modifiés utilisés dans le séquençage de nouvelle génération



Les groupements rouges représentent des structures inhibitrices, les flèches désignent les sites de clivage séparant le fluorophore et le nucléotide et en bleu sont représentés des résidus chimiques liés au nucléotide qui s'accumulent à chaque cycle. a) Les nucléotides à extrémité 3' bloquée utilisés par Illumina/Solexa : le 3'-O-C=dTTP et le 3'-O-N<sub>3</sub>-dTTP. Les groupements 3'-O-allyl et 3'-O-azidométhyl ont la capacité de terminer la synthèse d'ADN (JU *et al.*, 2006). b) Les nucléotides à extrémité 3' non bloquée utilisés par Helicos BioSciences (d'après METZKER, 2010).

Deux techniques fondées sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents sont présentées en figure 38. Dans la première, les 4 nucléotides sont incorporés à chaque cycle, chacun étant lié à un fluorochrome différent, entraînant un signal lumineux de 4 couleurs possibles. Dans la seconde, les nucléotides sont incorporés à la suite, chacun émettant le même signal fluorescent.

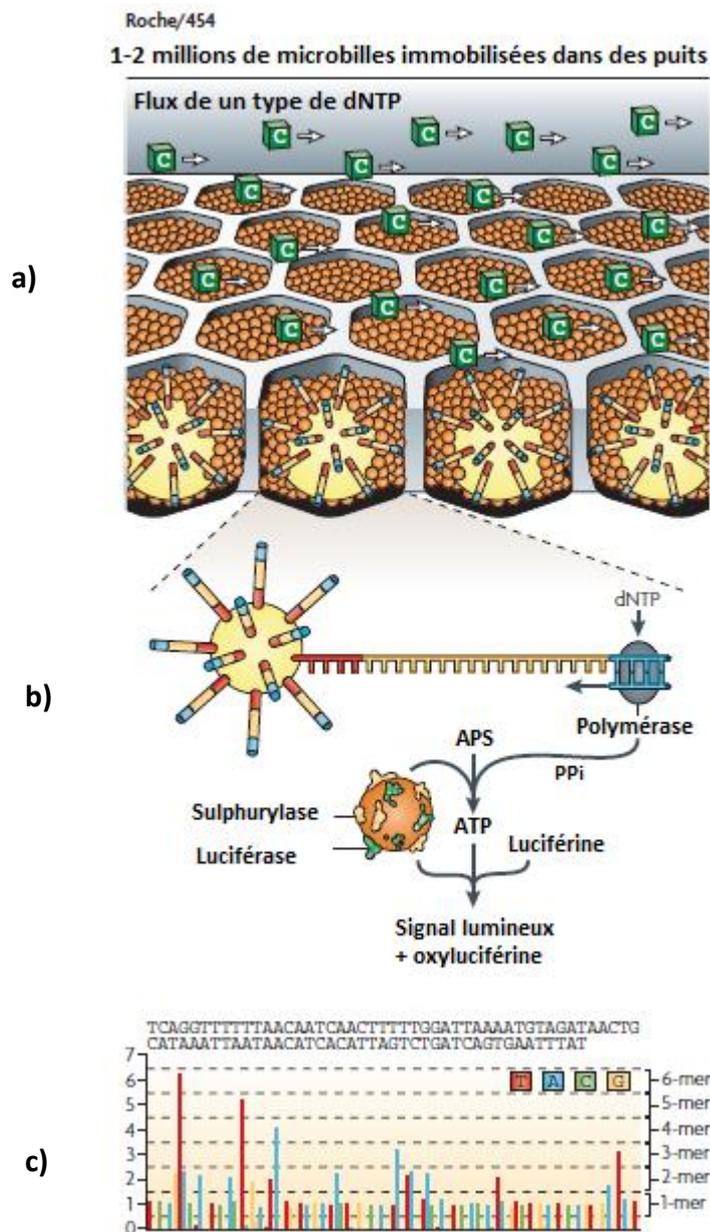
**Figure 38 : Méthode d'incorporation réversible de nucléotides fluorescents utilisée avec quatre couleurs ou une seule**



a) Les quatre nucléotides sont incorporés simultanément à chaque cycle, chacun couplé avec un fluorophore différent. Après incorporation, une étape de rinçage, puis d'imagerie et de clivage de l'extrémité inhibitrice sont nécessaires avant la reprise du cycle suivant. b) Images obtenues à chaque cycle dans la technologie Illumina/Solexa. Les points fluorescents correspondent à l'image d'un clone moléculaire d'ADN. c) Chez Helicos BioSciences, les nucléotides sont couplés au même fluorophore, mais introduits un par un à chaque cycle. Les étapes intermédiaires sont les mêmes que chez Illumina. d) Image obtenue : chaque point correspond à la fluorescence émise par chaque fragment d'ADN (séquençage d'une seule molécule) (d'après METZKER, 2010).

D'autres stratégies comme le pyroséquençage ou le séquençage avec ligase ont également été développées (respectivement par Roche/454 et Life/APG). Au cours du pyroséquençage, c'est la libération de pyrophosphate (PPi ou diphosphate) au cours de l'addition de chaque nucléotide qui est utilisée pour générer un signal lumineux. Des billes couplées à des sulfurylases permettent de transformer, en présence de PPi, de l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS) en ATP, lui-même permettant la conversion de luciférine en signal lumineux par l'intermédiaire d'une luciférase. Un capteur CCD (*Coupled Charge Device*) repère alors le signal lumineux et l'information est traitée par ordinateur afin de déterminer la séquence (figure 39).

**Figure 39 : Le pyroséquençage utilisé dans la technologie Roche/454**



a) Les nucléotides sont mis en contact de façon séquentielle avec les billes liées aux clones d'ADN, elles-mêmes immobilisées dans des puits sur une plaque. b) Lors de l'incorporation d'un nucléotide, la libération de PPi est convertie en signal lumineux, retranscrit sur un diagramme (c) (d'après METZKER, 2010).

Le séquençage de nouvelle génération permet ainsi de générer, en peu de temps et de façon automatisée, un très grand nombre de séquences de courte taille (Tableau n°4). Le coût du séquençage est également réduit par rapport aux méthodes classiques (Tableau n°4). Une analyse informatique permet ensuite de reconstituer de longs fragments d'ADN et même de reconstituer un génome entier.

**Tableau 4 : Comparaison des performances de quelques séquenceurs (d'après GLENN, 2011)**

<u>Séquenceur utilisé</u>	<u>Taille des brins séquencés (pb)</u>	<u>Nombre de brins séquencés par cycle</u>	<u>Coût du séquençage (par Mb) en dollar</u>	<u>Durée de séquençage</u>	<u>% d'erreurs</u>
Méthode de Sanger + électrophorèse capillaire	650	96	\$1500	2h	0,1-1
HelicosBioSciences	35	800 millions			
Illumina	150 + 150	3,4 millions	\$0,74	26h	0,1
Pyroséquençage (Roche/454)	400	1 million	\$12,4	10h	1
SOLiD	50+35	>840 millions	<\$0,11	12 jours	0,06

Pb : paire de bases, Mb : méga base

### *c) Détection des variants hypoallergéniques :*

Dans notre problématique (trouver un variant allélique naturel pour un gène codant un allergène), repérer simplement le variant ne suffit pas. Dans l'hypothèse où, en screenant une population de chien ou de chat, on découvre un ou plusieurs individus présentant une version modifiée du gène ne suffit pas. En effet, il faut que la protéine produite soit hypoallergénique, et donc suffisamment différente de la protéine sauvage pour que ses épitopes ne soient pas conservés. Pour analyser les produits des gènes, on pourra utiliser les techniques de western blot (immuno blot) ou ELISA (cf deuxième partie I. B. 2). Si la protéine n'est pas reconnue par des IgE de sérums de patients allergiques, alors on sera en présence d'un variant hypoallergénique.

## **3) La création d'une race**

### *a) Individu fondateur*

La création d'une race implique de définir de façon précise les caractères que l'on souhaite fixer au sein de la nouvelle race. Dans notre cas, il s'agit de reproduire l'individu possédant la mutation du gène codant pour l'allergène, afin de fixer cette caractéristique,

c'est-à-dire de reproduire le chat ou le chien présentant un allèle différent pour le gène codant un allergène majeur. Cet individu est appelé "individu fondateur".

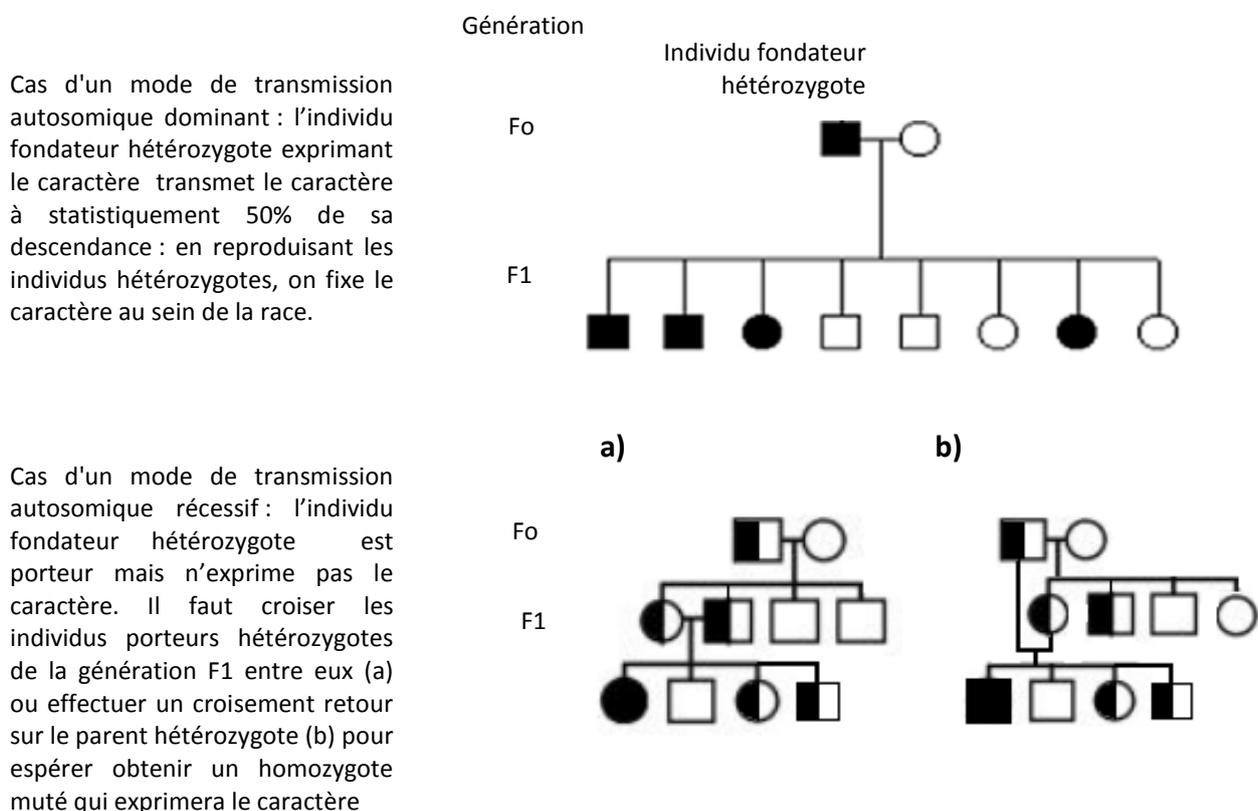
### b) Transmission du caractère d'intérêt

La fixation du caractère d'intérêt au sein d'une lignée dépend du mode de transmission de celui-ci. Ici, on souhaite fixer le caractère « protéine hypoallergénique » au sein d'une lignée. Chaque allergène étant codé par un ou plusieurs gènes, la position de ce gène sur les chromosomes (autosome ou chromosome sexuel) va déterminer le mode de transmission du caractère hypoallergénique. Pour tous les allergènes sauf Fel d 1, le caractère hypoallergénique est monogénique (déterminé par un seul gène). Si le gène se trouve sur un chromosome non sexuel, on parlera de transmission autosomique. S'il se situe sur un chromosome sexuel X, elle sera liée à l'X. Si l'allèle muté doit être présent en deux exemplaires pour que le caractère s'exprime, l'allèle est dit récessif. Si l'allèle muté s'exprime même lorsqu'il n'est qu'en un exemplaire, il est dominant. La création de la race et la fixation du caractère "variant hypoallergénique" sera plus facile si l'allèle muté est dominant, puisqu'il s'exprimera chez tous les individus hétérozygotes et homozygotes mutés.

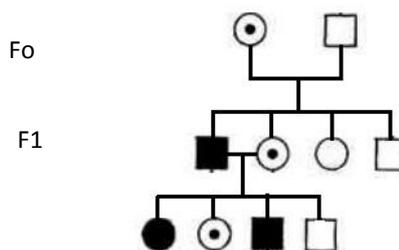
### c) Croisements

Les premiers croisements entre l'individu fondateur et un mâle ou une femelle permettront de savoir si la transmission est autosomique dominante ou récessive, ou liée à l'X dominante ou récessive. Les différents croisements que l'on pourra mettre en œuvre sont décrits dans la figure 40.

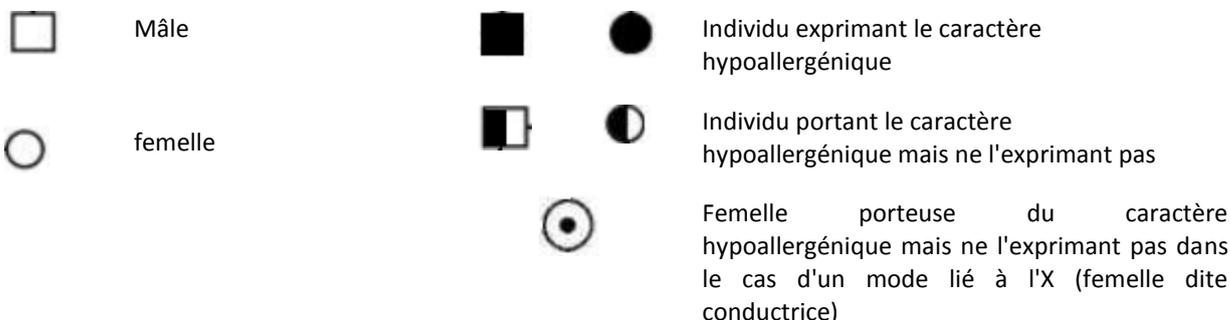
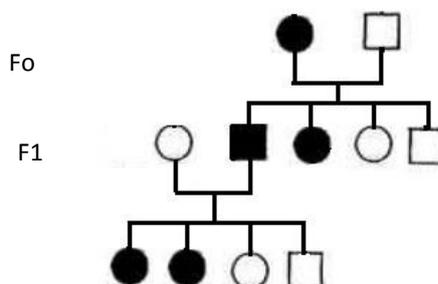
**Figure 40 : Schémas des croisements mis en œuvre en fonction du mode de transmission du caractère "hypoallergénique"**



Cas d'un mode de transmission récessif lié à l'X : l'individu porteur hétérozygote est ici une femelle qui n'exprime pas le caractère hypoallergénique, mais qui transmet le caractère. Les mâles porteurs expriment tous le caractère hypoallergénique. Pour qu'une femelle l'exprime, il faut qu'elle soit homozygote mutée.



Cas d'un mode de transmission dominant lié à l'X : les femelles hétérozygotes et homozygotes mutées expriment le caractère hypoallergénique, de même que les mâles porteurs de la mutation.



Les croisements sont longs à mettre en œuvre, dépendants de la fertilité des animaux, de la durée de gestation et des paramètres d'élevage en général. Cette approche nécessite de vrais moyens techniques comme humains, et sont donc excessivement coûteux.

**d) Inconvénients de cette approche : l'effet fondateur**

Il faut toutefois noter que la création d'une race à partir d'un seul individu présente des inconvénients qu'il va falloir prendre en compte. Si cet individu est porteur d'un allèle délétère rare indépendant de l'allèle hypoallergénique, celui-ci sera transmis à la descendance. On parle alors d'effet fondateur. L'anomalie associée à cet allèle, rare au sein

de la population d'origine, se retrouve beaucoup plus fréquemment au sein de la race et peut être à l'origine d'une maladie qui n'était pas apparue dans la population d'origine.

D'autres phénomènes peuvent accentuer ce processus. L'augmentation de la consanguinité, qui sera inévitable lors de la création de la race, surtout si le caractère est récessif, va augmenter la fréquence des anomalies génétiques rares dues en particulier à des allèles récessifs. De plus les reproducteurs seront sur-utilisés, puisque les génotypes intéressants ne seront pas très nombreux.

Ainsi, de très nombreuses maladies génétiques sont aujourd'hui spécifiques de races de chiens ou de chats, du fait de l'effet fondateur et de l'usage de la consanguinité, comme par exemple chez le chat persan, la polykystose rénale (BILLER *et al.*, 1996).

Créer une race à partir d'un individu est une entreprise difficile, longue et coûteuse, dont l'issue est incertaine : les individus de la race créée seront-ils en bonne santé, ou prédisposés à certaines maladies génétiques ? Cette question soulève un problème éthique, mais qui ne concerne pas que les animaux hypoallergéniques, mais toutes les races en général. Certaines races de chiens et de chats, sélectionnées depuis des dizaines d'années sur des critères morphologiques et esthétiques, peuvent avoir une qualité de vie diminuée, voire une espérance de vie réduite

#### *e) Stratégie possible pour éviter les écueils inhérents à la création d'une nouvelle race*

La création d'une nouvelle race, et ce quel que soit le caractère que l'on souhaite fixer, implique donc d'être attentif aux risques engendrés par l'effet fondateur et la sur-utilisation de la consanguinité.

Pour réduire ce risque et limiter l'impact des croisements consanguins, une option intéressante est d'utiliser un test génétique de génotypage à chaque croisement, pour connaître le statut de chaque animal de l'élevage. Les techniques de génotypage pouvant être utilisées sont les mêmes que celles décrites précédemment, mais il est préférable qu'un test rapide de détection soit développé afin de pouvoir mettre en œuvre ce test de façon rapide et à moindre coût.

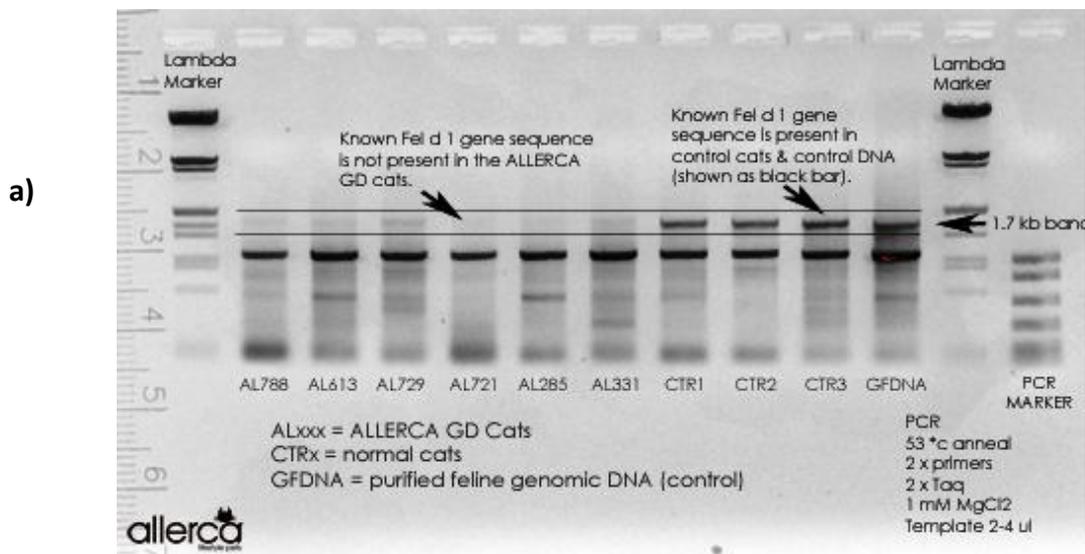
Ainsi, si on connaît le statut de l'individu : hétérozygote, homozygote muté ou homozygote sauvage, il est possible d'introduire au maximum des animaux extérieurs, de différentes races ou sans pedigree, afin d'amener une diversité génétique (augmenter le nombre total des allèles présents dans la nouvelle race).

#### **4) La polémique sur les animaux Allerca®**

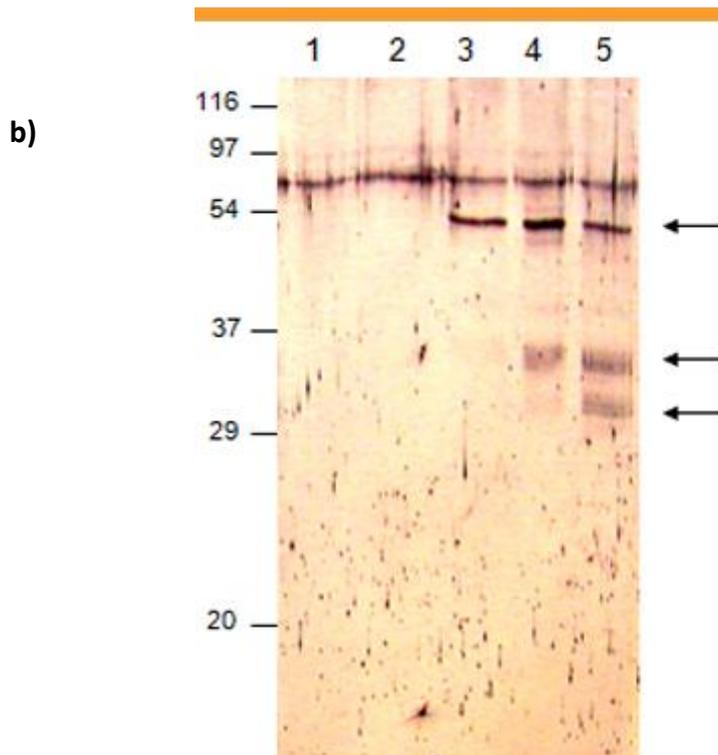
Il faut noter qu'une polémique est née au sujet des animaux Allerca®, polémique relayée en grande partie par Internet. En effet, des blogs ou sites Internet relayent des témoignages de personnes présentant des signes d'allergie aux animaux Allerca®.

Cette polémique sur la réelle efficacité des animaux repose majoritairement sur l'absence d'étude scientifique objective publiée. Ceci soulève un grand nombre d'interrogations et justifie le scepticisme de beaucoup de scientifiques, qui jugent cela troublant. Les seules informations que le grand public et les scientifiques ont à disposition sont celles contenues dans le site internet de la société elle-même, illustré par deux photographies d'électrophorèses peu commentées (figure 41).

**Figure 41 : Photographies d'une électrophorèse et d'un western blot visibles sur le site internet d'Allerca®**



a) Photographie d'une électrophorèse de produits de PCR pour Fel d 1 visible sur le site internet d'Allerca® : chaque colonne correspond à un chat, les chats sauvages sont notés CTRx et les chats Allerca® mutants pour le gène codant Fel d 1 sont notés ALxxx. Il est indiqué l'absence de la bande haute à 1,7kb chez les chats Allerca®, comparés aux chats sauvages. GFDNA : ADN félin contrôlé purifié servant de témoin positif. On note l'absence de témoin négatif de PCR et le fait qu'aucune information n'indique à quoi correspondent les deux bandes (deux amplicons de PCR). S'agit-il d'une électrophorèse de produits de PCR ou de RT-PCR ? De plus, on note la présence d'une bande discrète à 1,7kb chez les chats AL788, AL613, AL729 et AL331. Ceci suggère qu'il s'agit d'une RT-PCR (analyse des transcrits de Fel d 1) et que les chats Allerca® sous-expriment le variant de Fel d 1 de 1,7kb, alors qu'un variant de plus faible taille est exprimé par tous les chats (bande basse).



b) Western blot de protéines extraites de la salive de cinq chats. Electrophorèse en SDS-PAE, transfert sur une membrane de nitrocellulose et révélation avec un anticorps anti-Fel d 1 à la dilution 1/500 puis un second anticorps à la dilution 1/3000. Colonne 1 : chat contrôle. Colonnes 2, 3 et 4 : chats Allerca® mutés pour Fel d 1. Colonne 5 non légendée. On note la présence d'une bande basse supplémentaire chez les chats Allerca®, à 54 kDalton, ainsi que deux autres bandes basses. Aucune information n'est disponible : on ne sait pas à quoi correspondent ces différentes bandes (Source : [www.allerca.com](http://www.allerca.com)).

#### D. Autre perspective : la création de lignées de chats ou de chiens transgéniques hypoallergéniques

Les mutations génétiques naturelles sont rares et extrêmement dures à détecter puis à fixer au sein d'une lignée. Aussi certaines sociétés comme Felixpets® ([www.felixpets.com](http://www.felixpets.com)) ont concentré leurs recherches sur la mise au point d'animaux transgéniques, c'est-à-dire d'organismes dont le matériel génétique a été modifié, et pour lesquels celui-ci est transmis à la descendance. Dans le cadre de l'allergie aux carnivores domestiques, l'idée consiste à inactiver le gène codant pour un allergène majeur du chat ou du chien et à croiser l'individu transgénique obtenu afin de mettre en place une lignée. A l'heure actuelle, Felixpets® n'a ni publié de résultats ni commercialisé d'animaux transgéniques.

Ce type de recherche implique de très lourds moyens techniques (personnel, animalerie) et financiers et est en général très long.

## 1) Les méthodes d'obtention d'animaux transgéniques

De nombreuses équipes à travers le monde se concentrent sur l'obtention d'animaux transgéniques. L'investissement pour de telles recherches est lourd, mais les applications sont très nombreuses. Dans la plupart des cas, il s'agit de comprendre la fonction d'un gène *in vivo*, mettre au point des modèles animaux pour des maladies humaines ou d'utiliser certaines espèces animales comme producteurs de protéines d'intérêt (par exemple, la production d'*Insuline Growth Factor 1* (IGF-1) dans le lait de lapins transgéniques (ZINOVIEVA *et al.*, 1998). A ce jour, plusieurs espèces ont permis la production d'individus transgéniques avec succès (rongeurs, lapin, chien, chat, bovins, ovins, entre autres).

Différentes stratégies ont été envisagées, d'efficacité, de coût, et de facilité de mise en œuvre variables. La transgénèse implique :

- de construire le transgène *in vitro*, en accord avec la problématique de l'étude ;
- de permettre à cet ADN de passer les barrières de la membrane plasmique, du cytoplasme pour atteindre le noyau de la cellule ;
- d'intégrer ce transgène au sein du génome de la cellule hôte, de façon pérenne pour qu'il soit transmis à la descendance ;
- d'assurer l'expression correcte, c'est-à-dire à un niveau adéquat, à un stade de développement adéquat, dans le ou les tissus ciblé(s), du transgène, chez les individus transgéniques.

### a) La construction du transgène

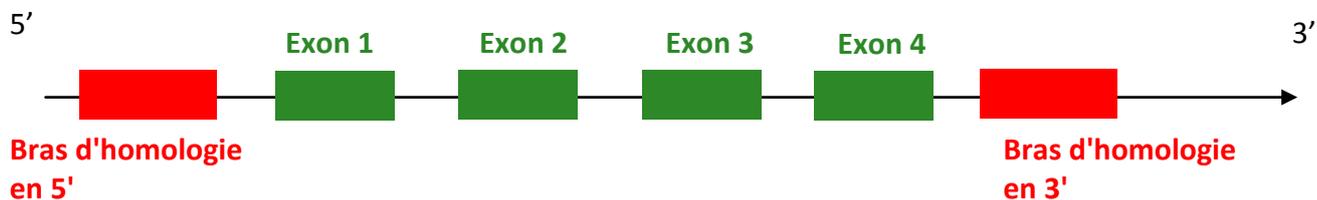
On souhaite ici modifier un gène codant un allergène du chat ou du chien : le remplacer ou l'inactiver.

La construction d'un transgène peut avoir pour but son insertion au hasard dans le génome (stratégie qui ne nous intéresse pas ici) ou son intégration à un locus précis, sur un chromosome donné, par le mécanisme appelé recombinaison homologue (stratégie qui nous intéresse ici).

Nous allons donc uniquement nous intéresser à la transgénèse *via* la recombinaison homologue. Le transgène est donc construit de façon à cibler le locus du gène endogène codant l'allergène majeur du chien ou du chat. Deux stratégies sont possibles : inactiver totalement le gène d'allergène ou y insérer une mutation particulière (HOUDEBINE, 1998). Les deux types de transgènes correspondant à ces deux stratégies sont représentés dans la figure 42.

**Figure 42 : Deux types de transgènes pouvant être utilisés pour inactiver ou modifier le gène codant l'allergène : la méthode knock-out ou knock-in**

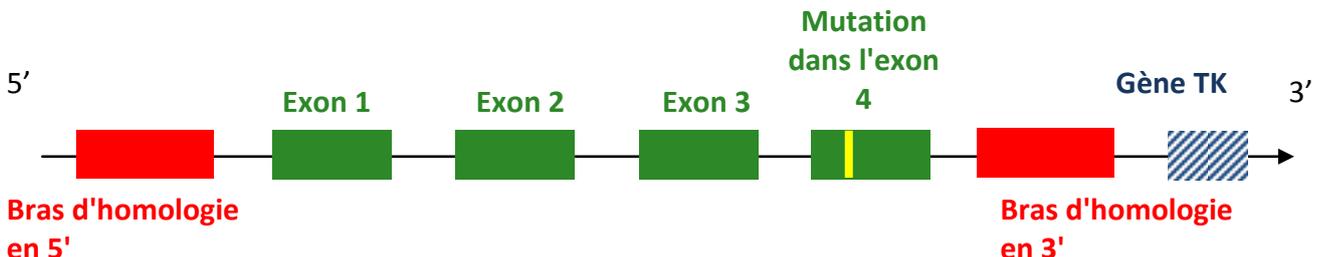
a) Locus endogène codant un allergène majeur, ciblé par le transgène :



b) Transgène pour l'inactivation totale du gène d'allergène (Knock-out)



b) Transgène pour l'insertion ciblée d'une mutation (Knock-in) :



a) Un allergène codé par un gène à quatre exons est représenté.

b) Le transgène contient deux bras d'homologie en 5' et 3' pour permettre la recombinaison homologue. Un gène de résistance à un antibiotique remplace la quasi-totalité de la séquence codante du gène. Après le bras 3' est inséré le gène de la thymidine kinase qui servira de gène de sélection négative.

c) Le transgène est identique au locus ciblé sauf pour une mutation insérée dans l'exon 4 et le gène codant la thymidine kinase.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour permettre à l'ADN exogène de pénétrer dans le noyau de la cellule hôte (CHAIBLE *et al.*, 2010 ; HOUDEBIME, 1998), mais seules certaines sont efficaces et utilisées en routine :

- **L'électroporation :**

Les cellules, mises en présence d'une solution contenant de l'ADN, reçoivent un courant électrique qui entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique. L'ADN peut alors pénétrer dans la cellule. C'est une méthode physique plutôt efficace qui est encore largement utilisée dans la plupart des types cellulaires (CHAIBLE *et al.*, 2010).

- Les micelles lipidiques :

Cette méthode implique la formation de complexes lipidiques contenant les molécules d'ADN, ce qui facilite leur pénétration à travers la membrane cellulaire, mais aussi les protège des nucléases. Cette méthode est facile à mettre en œuvre, peu coûteuse, mais moins efficace que l'électroporation (CHAIBLÉ *et al.*, 2010 ).

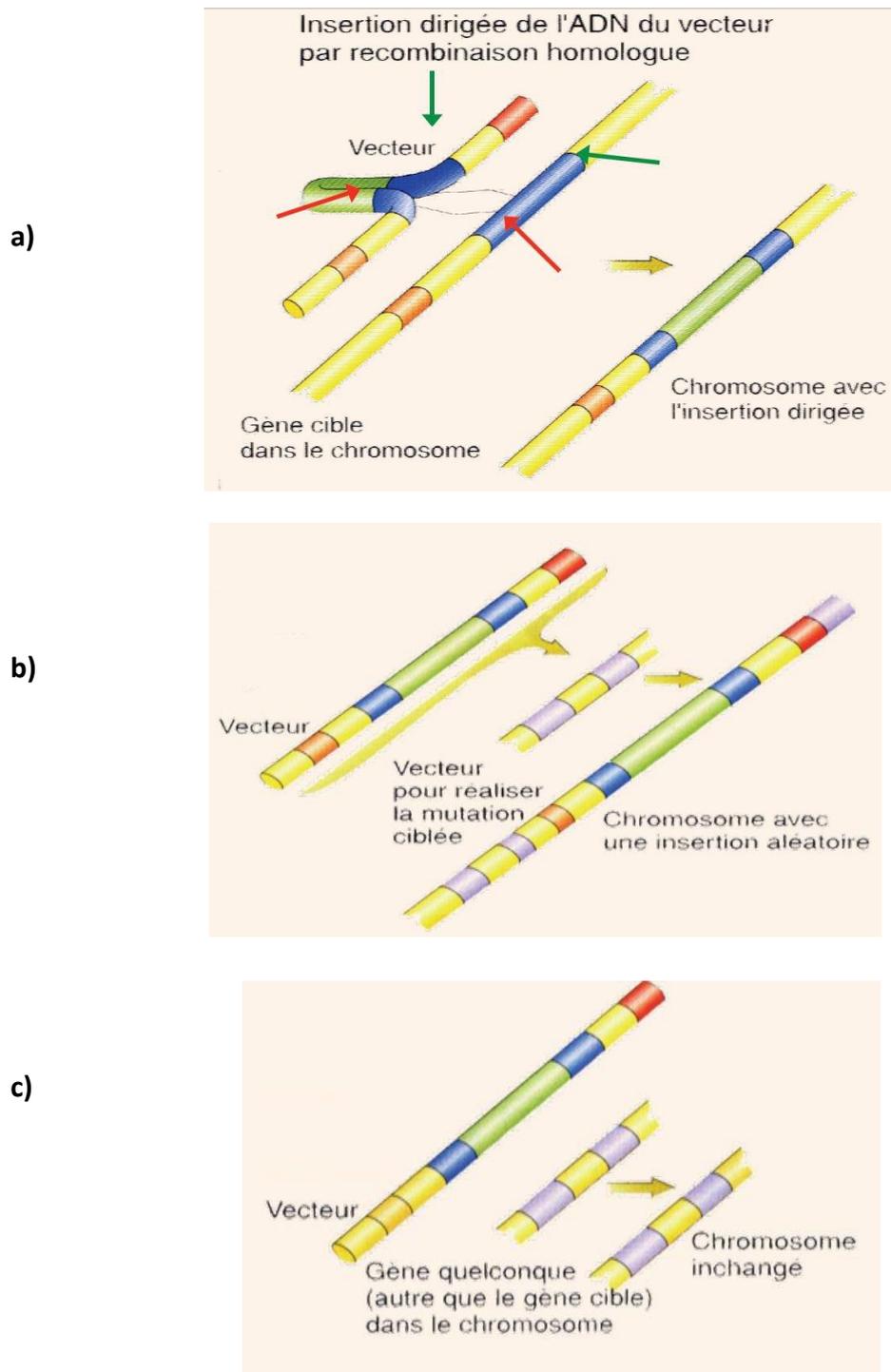
- L'utilisation de vecteurs viraux:

Afin d'optimiser l'intégration du transgène dans la cellule, une possibilité peut être d'avoir recours à des vecteurs possédant la capacité intrinsèque de pénétrer dans la cellule puis d'intégrer leur matériel génétique au génome de la cellule-cible avec une grande efficacité, comme les rétrovirus. Cette méthode est la plus récente : la portion d'ADN d'intérêt est d'abord intégrée dans le virus qui lui-même est chargé d'infecter la cellule-hôte. Parmi les virus employés, on peut citer les rétrovirus et plus particulièrement les lentivirus qui ont la capacité d'infecter les cellules non en division (CHAIBLÉ *et al.*, 2010 ).

***c) L'intégration du transgène dans le génome de la cellule-hôte : la recombinaison homologue***

La recombinaison homologue est une technique permettant l'insertion du transgène à un locus précis du génome hôte. Elle repose sur l'interaction entre séquences homologues du vecteur et de l'ADN génomique. La recombinaison homologue a lieu spontanément chez les levures, mais est beaucoup plus difficile à obtenir chez les mammifères. Pour que le mécanisme ait lieu, les séquences homologues doivent être suffisamment longues (2-3kb au moins) et trois types d'événement peuvent survenir lorsque le transgène a été intégré à la cellule-cible (figure 43).

**Figure 43 : La recombinaison homologue : trois types d'événements peuvent avoir lieu lors de l'intégration du transgène dans la cellule-cible**

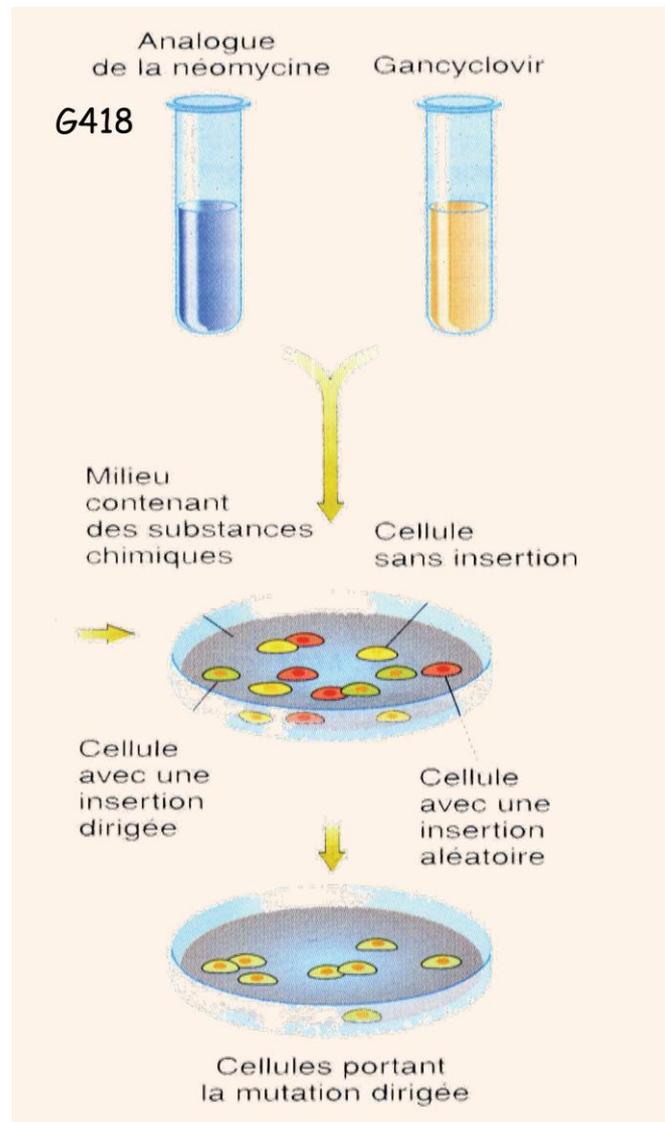


Lors de l'intégration du transgène, trois événements peuvent se produire.

- a) le transgène s'intègre grâce au mécanisme de recombinaison homologue au niveau du gène ciblé. C'est l'effet recherché .
- b) le transgène s'intègre à un endroit quelconque du génome de l'hôte.
- c) Le transgène ne s'intègre pas du tout (d'après GRIFFITHS *et al.*, 2001).

De façon à sélectionner les événements rares de recombinaison homologue, une double sélection positive (utilisant la résistance à l'antibiotique) et négative (utilisant le gène de la thymidine kinase) est effectuée (figure 44)

**Figure 44 : Sélection des cellules où l'intégration du transgène a eu lieu au bon endroit par recombinaison homologue**



Les cellules ayant intégré le transgène au bon endroit par recombinaison homologue sont sélectionnées par double sélection : elles possèdent un gène de résistance à un antibiotique (ici le gène *néo* de résistance au G418 un analogue de la néomycine) et le gène *tk* (thymidine kinase) qui permet une sélection négative en présence du gancyclovir (un substrat de la tk). Seules les cellules ayant intégré le gène *néo* mais pas le gène *tk* (par recombinaison homologue) survivent (d'après GRIFFITHS *et al.*, 2001).

#### d) L'utilisation de cellules ES chez la souris et l'obtention d'animaux Knock-out (KO) ou Knock-in (KI) pour un gène

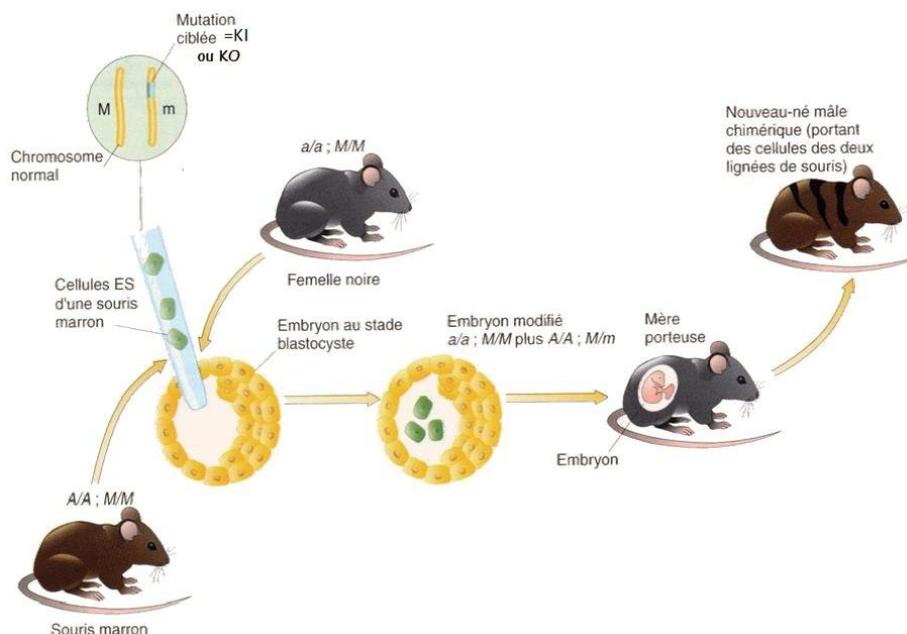
##### - Les cellules ES

Chez la souris, la recombinaison homologue a pu être utilisée avec succès grâce à l'utilisation des cellules ES (*Embryonic Stem Cells*), dans lesquelles, pour une raison inconnue, la recombinaison homologue a lieu de façon plus fréquente que dans les autres types cellulaires plus différenciés (HOUDEBINE, 2002).

Ces cellules ont été dérivées de cellules prélevées dans la masse cellulaire interne d'un embryon au stade blastocyste. Elles sont pluripotentes et peuvent se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme, y compris les cellules germinales. Ces cellules, très difficiles à maintenir en culture au laboratoire, n'ont été dérivées à l'heure actuelle que chez l'homme et quelques espèces animales dont la souris et la poule (GRIVENNIKOV, 2008).

La recombinaison homologue s'effectue dans les cellules ES qui, une fois injectées dans un embryon de souris à un stade précoce, conduit à la formation d'individus chimères porteurs de cellules contenant le transgène (figure 45). Des croisements appropriés permettent d'obtenir des lignées transgéniques exprimant le transgène de façon stable. Ceci n'est évidemment valable que si la modification induite n'est pas létale pour l'embryon et si tous les types cellulaires supportent la modification génétique apportée.

**Figure 45 : Individus chimères obtenus après transgénèse par recombinaison homologue dans des cellules ES**



Une fois la transgénèse réalisée dans les cellules ES, celles-ci sont injectées dans un blastocyste (ici de souris). Ici, la souris donneuse de cellules ES est de couleur marron (génotype A/A pour le locus Agouti), la souris réceptrice est noire (génotype a/a pour le locus Agouti). Après développement de l'embryon dans la mère porteuse, on obtient un individu chimère portant les deux types cellulaires et ayant des rayures noires et marrons facilement identifiables (d'après GRIFFITHS *et al.*, 2001).

### - Les animaux KO

Les lignées d'animaux « Knock-out » (KO) pour un gène sont des lignées pour lesquelles on a réussi à inactiver un gène, de façon pérenne, et dont la modification est transmissible aux descendants.

Dans le cas de l'allergie, il serait intéressant d'inactiver un gène codant un allergène (par exemple Can f 1 ou Fel d 1) chez le chien ou le chat, afin d'obtenir des animaux hypoallergéniques pour l'homme.

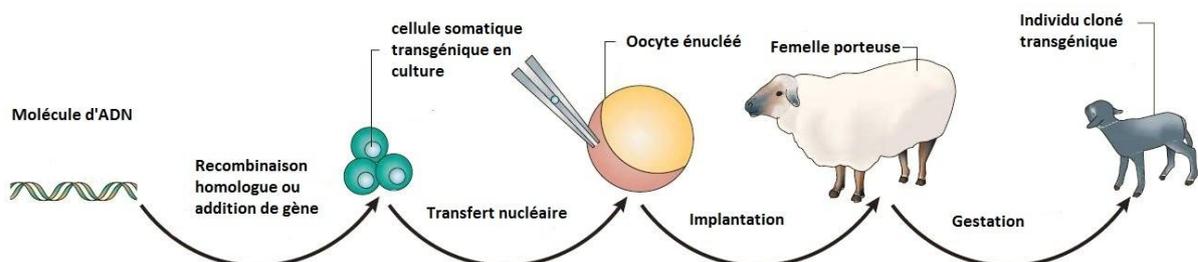
En raison de la non-disponibilité des cellules ES, les animaux KO pour un gène n'ont été mis au point que chez la souris à ce jour (GRIVENNIKOV, 2008).

Cependant, chez le chien ou le chat, des animaux transgéniques ont été obtenus, mais en passant par la technique du clonage.

### e) Le clonage et le transfert nucléaire

Les cellules ES, très utilisées aujourd'hui chez la souris, ne sont pas disponibles chez d'autres espèces comme chez le chien ou le chat. Chez ces deux espèces, la transgénèse passe obligatoirement par une étape de clonage via un transfert de noyau (GOMEZ *et al.*, 2006). La transgénèse est réalisée dans des cellules somatiques, comme des fibroblastes, et celles où le transgène s'est correctement intégré subissent un transfert de noyau. Le noyau de la cellule transgénique est prélevé et injecté dans un oocyte (ovocyte immature) énucléé, qui une fois implanté dans un utérus, pourra se développer en un individu transgénique (figure 46).

Figure 46 : La transgénèse par transfert nucléaire



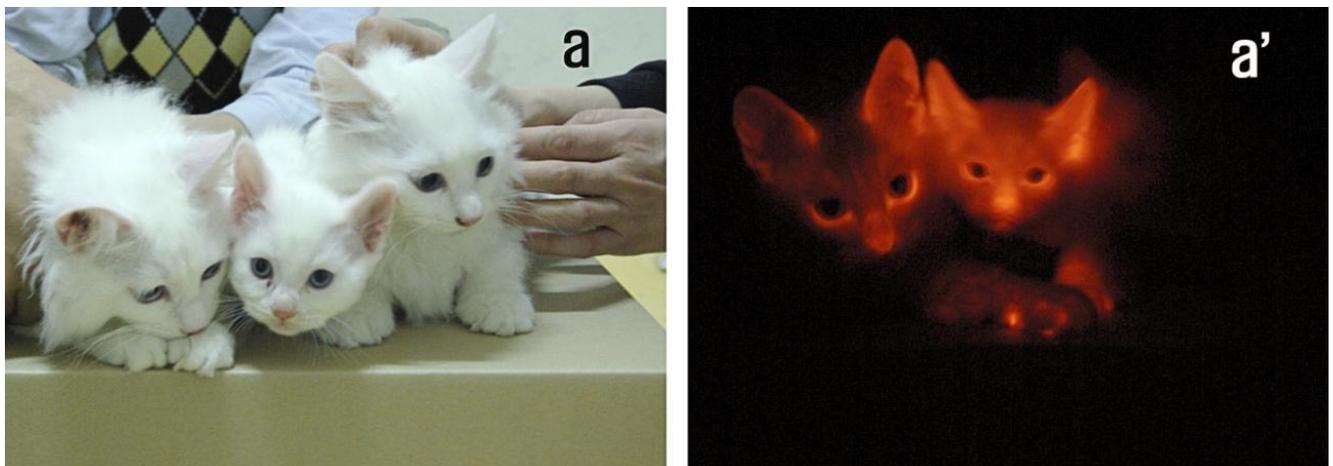
Une fois la transgénèse effectuée dans une cellule somatique, on injecte le noyau de celle-ci dans un oocyte énucléé. Après implantation dans une femelle porteuse, l'embryon ainsi formé peut se développer en un individu qui est donc un clone de la cellule somatique transgénique (d'après CLARK et WHITE LAW, 2003).

La multiplication des étapes et le fait que la transgénèse s'effectue dans des types cellulaires différenciés comme les fibroblastes, expliquent le rendement peu élevé de cette méthode. De plus, à ce jour aucune lignée transgénique chez le chien ou le chat n'a utilisé le mécanisme de recombinaison homologe permettant le ciblage d'un gène, comme cela est nécessaire à notre problématique.

## 2) La transgénèse aujourd'hui chez le chat et le chien

La première génération de chats transgéniques a été mise au point en 2008 (YIN *et al.*, 2008). L'équipe a utilisé un rétrovirus comme vecteur pour intégrer de façon non ciblée (intégration du transgène au hasard dans le génome) le gène codant une molécule fluorescente de couleur rouge (RFP – *Red Fluorescent Protein*) dans des lignées de fibroblastes félins. Les noyaux des fibroblastes transgéniques ont ensuite été introduits dans des oocytes préalablement énucléés. Après une culture *in vitro* de ces embryons, ils ont ensuite été implantés dans l'utérus de femelles porteuses. Sur 176 embryons implantés dans 11 mères porteuses, seules 3 chattes ont été gestante. L'une a avorté, et les deux autres ont donné naissance respectivement à un chaton vivant et deux chatons dont l'un vivant et l'autre mort-né. Les trois chatons exprimaient de façon ubiquitaire la protéine fluorescente (figure 47).

Figure 47 : Photographie des chatons transgéniques exprimant la RFP



a : Photographie des deux chatons exprimant la RFP et d'un chaton témoin. a' : Photographie de ces mêmes chatons éclairés avec une lumière de longueur d'onde de 540nm (YIN *et al.*, 2008).

Un protocole similaire a été utilisé chez le chien (HONG *et al.*, 2009) pour créer des chiens exprimant la RFP de manière ubiquitaire.

Dans ces deux cas, le transgène a été introduit de façon non ciblée (aléatoire) dans le génome du chat et du chien. Cette stratégie n'est donc pas envisageable pour le cas de l'allergie où l'on souhaiterait inactiver ou modifier le gène codant un allergène canin ou félin.

### **3) Perspective : mise au point de lignées transgéniques hypoallergéniques de chiens et de chats**

La transgénèse chez le chien et le chat n'est donc largement pas aussi avancée que chez, par exemple, la souris. De nombreuses études additionnelles sont nécessaires avant que l'on puisse mettre au point des lignées transgéniques d'intérêt commercial, comme des animaux hypoallergéniques pour l'homme.

La première étape-clé à franchir est celle de l'utilisation avec succès de la recombinaison homologe dans des types cellulaires compatibles avec un transfert nucléaire ultérieur, chez le chat ou chez le chien.

### **4) Controverse**

Les inconvénients de cette approche reposent principalement sur la mauvaise image de la transgénèse dans l'opinion générale. Il est difficile d'évaluer le succès qu'auraient de telles lignées auprès des consommateurs, étant donné l'impact psychologique négatif de ce genre de techniques.

Il est évident que la recherche d'une mutation naturelle et la fixation de celle-ci au sein d'une race est une technique plus "acceptée" par le grand public, car elle repose sur les mêmes principes que la mise au point de races sur des critères esthétiques.

Cependant, il est toutefois nécessaire de souligner la confusion régnant dans l'opinion publique, qui n'est pas forcément sensible aux arguments commerciaux de la société Allerca®, par exemple. Nombreuses sont les réactions des journalistes, ou des internautes, reprochant à cette société d'avoir manipulé génétiquement les chiens et les chats, alors qu'ils n'ont pas eu recours à des techniques de transgénèse.

Enfin, il semble évident que l'investissement financier nécessaire à la réalisation de ces recherches, justifie un prix moyen des animaux assez élevé. Il est probable que si Felixpets® parvient à mettre au point ses lignées, les chats et chiens seront vendus à des prix prohibitifs pour la majorité des personnes allergiques.



## CONCLUSION

Nous avons vu que l'hypersensibilité de type I aux allergènes du chat et du chien reste une maladie difficile à traiter et dont la plus efficace des préventions consiste en l'éviction des allergènes, donc l'évitement par le patient du contact avec ces animaux. Les patients souhaitant rester en contact avec les animaux cherchent bien souvent à se procurer un animal hypoallergénique, avec lequel ils pourront entrer en contact sans manifester de réaction allergique. De nombreuses races de chiens (Caniche, Yorkshire terrier, Barbet...) et de chats (Sphynx, Cornish Rex...) sont réputées "hypoallergéniques" dans l'opinion collective. Cependant, elles permettent uniquement de limiter la quantité de poils dans l'environnement domestique et potentiellement une réduction de particules ambiantes portant des allergènes, et ne sont en aucun cas hypoallergéniques.

Afin qu'un animal soit hypoallergénique, il faut qu'il présente une variation dans la séquence du gène codant un allergène. Afin d'espérer créer une lignée hypoallergénique, il faut donc rechercher un tel mutant dans une vaste population de chats ou de chiens, et le reproduire pour fixer le caractère, ou bien induire cette variation grâce à la transgénèse. Ces démarches, très longues et coûteuses semblent difficiles à mettre en œuvre. Cependant, deux firmes américaines au moins ont entamé des travaux de recherche : Allerca® qui commercialise déjà des animaux issus de croisements entre individus mutants et sauvages, et Felixpets® qui cherche actuellement à créer des lignées de chats transgéniques hypoallergéniques. La confidentialité des recherches d'Allerca® a conduit à une absence totale d'étude scientifique publiée et objective évaluant l'efficacité des animaux hypoallergéniques commercialisés à ce jour.

L'investissement nécessaire justifie certainement des prix d'achat très élevés de ces animaux. De plus, ces deux stratégies ne conduisent à la mise au point d'animaux hypoallergéniques que pour un seul allergène (un allergène majeur), ce qui remet en cause leur efficacité pour un grand nombre de patients. En effet, la plupart des malades sont sensibles à au moins deux allergènes produits par l'animal et présentent donc un risque de développement de réaction allergique au contact de ces animaux pourtant annoncés comme hypoallergéniques.



## BIBLIOGRAPHIE

1. AALBERSE RC, PLATTS-MILLS TA (2004) How do we avoid developing allergy: modifications of the TH2 response from a B-cell perspective, *J Allergy Clin Immunol*. May **113**(5):983-6.
2. ADÉDOYIN J, GRÖNLUND H, OMAN H, JOHANSSON SG, VAN HAGE M (2007) Cat IgA, representative of new carbohydrate cross-reactive allergens, *J Allergy Clin Immunol*, Mar, **119**(3), 640-5
3. AICHBHAUMIK N, ZORATTI EM, STRICKLER R, WEGIENKA G, OWNBY DR, HAVSTAD S, JOHNSON CC (2008) Prenatal exposure to household pets influences fetal immunoglobulin E production, *Clin Exp Allergy*, Nov **38**(11), 1787-94
4. ALKAN C, COE BP, EICHLER EE. (2011) Genome structural variation discovery and genotyping, *Nat Rev Genet*, May, **12**(5), 363-76
5. ALLERCA® *Lifestyle Pets*, mise à jour le 16 août 2011, [<http://www.allerca.com>] (page consultée le 15/05/2012)
6. ASARNOJ A, OSTBLOM E, KULL I, LILJA G, PERSHAGEN G, HEDLIN G, VAN HAGE M, WICKMAN M (2008), Sensitization to inhalant allergens between 4 and 8 years of age is a dynamic process: results from the BAMSE birth cohort, *Clin Exp Allergy*, Sep **38**(9) 1507-13
7. ASHER I(2011) World Asthma Day: reflections on ISAAC *Int J Tuberc Lung Dis* May **15**(5) 569.
8. ASHER MI, WEILAND SK (1998), The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee, *Clin Exp Allergy*, Nov **28** Suppl 5, 52-66
9. AVNER DB, PERZANOWSKI MS, PLATTS-MILLS TA, WOODFOLK JA (1997), Evaluation of different techniques for washing cats: quantitation of allergen removed from the cat and the effect on airborne Fel d 1, *J Allergy Clin Immunol*, Sep **100**(3), 307-12.
10. BARNES PJ (2011), Pathophysiology of allergic inflammation, *Immunol Rev*, Jul, **242**(1), 31-50
11. BILLER DS, DIBARTOLA SP, EATON KA, PFLUEGER S, WELLMAN ML, RADIN MJ (1996) Inheritance of polycystic kidney disease in Persian cats, *J Hered*, Jan-Feb **87**(1)1-5
12. BISGAARD H, SIMPSON A, PALMER CN, BØNNELYKKE K, MCLEAN I, MUKHOPADHYAY S, PIPPER CB, HALKJAER LB, LIPWORTH B, HANKINSON J, WOODCOCK A, CUSTOVIC A (2008), Gene-environment interaction in the onset of eczema in infancy: filaggrin loss-of-function mutations enhanced by neonatal cat exposure, *PLoS Med*, Jun 24, **5**(6), 131.
13. BOLLINGER ME, EGGLESTON PA, FLANAGAN E, WOOD RA (1996) Cat antigen in homes with and without cats may induce allergic symptoms, *J Allergy Clin Immunol*. Apr **97**(4), 907-14.
14. BOUSQUET J, REID J, VAN WEEL C, BAENA CAGNANI C, CANONICA GW, DEMOLY P, DENBURG J, FOKKENS WJ, GROUSE L, MULLOL K, OHTA K, SCHERMER T, VALOVIRTA E, ZHONG N, ZUBERBIER T (2008) Allergic rhinitis management pocket reference, *Allergy* Aug **63**(8) 990-6.
15. BROWN TA (2006), *Gene cloning & DNA analysis*, 5ème édition, edition Blackwell Publishing, 408p
16. CALLEN JC (2005), *Biologie cellulaire*, 2e édition, edition Dunod, 500p
17. CHAIBLE LM, CORAT MA, ABDELHAY E, DAGLI ML (2010), Genetically modified animals for use in research and biotechnology, *Genet Mol Res*, Jul 27, **9**(3), 1469-82
18. CHAPDELAIN P, HO-KIM MA, TREMBLAY RR, DUBÉ JY (1988) Nucleotide sequence of the androgen-dependent arginine esterase mRNA of canine prostate. *FEBS Lett*, May 9, **232**(1), 187-92.
19. CHAPMAN MD (2008) Allergen nomenclature, *Clin Allergy Immunol*, **21**, 47-58.

20. CHARLOTTE E. NICHOLAS, GANESA R. WEGIENKA, SUZANNE L. HAVSTAD, EDWARD M. ZORATTI, DENNIS R. OWNBY, CHRISTINE COLE JOHNSON (2011) Dog allergen levels in homes with hypoallergenic compared with nonhypoallergenic dogs, *American journal of Rhinology and Allergy*, **25** (4), 252-6
21. CHOI H, SCHMIDBAUER N, SUNDELL J, HASSELGREN M, SPENGLER J, BORNEHAG CG (2010) Common household chemicals and the allergy risks in pre-school age children, *PLoS One*, Oct 18, **5**(10), 13423.
22. CLARK J, WHITELAW BA (2003), future for transgenic livestock, *Nat Rev Genet*, Oct **4**(10) 825-33
23. CUSTOVIC A, FLETCHER A, PICKERING CA, FRANCIS HC, GREEN R, SMITH A, CHAPMAN M, WOODCOCK A (1998) Domestic allergens in public places III: house dust mite, cat, dog and cockroach allergens in British hospitals, *Clin Exp Allergy*, Jan, **28**(1), 53-9.
24. DE GROOT H, GOEI KG, VAN SWIETEN P, AALBERSE RC (1991) Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f I and of Can f I-depleted extract, *J Allergy Clin Immunol* Jun **87**(6), 1056-65.
25. DEMOLY P, YSSEL H, BOUSQUET J (1998), La réponse immunitaire locale dans la rhinite allergique, *Rev. Fr. Allergol.*, **38** (7), 585-590  
*disease Immunological Reviews* **242**, 161–177
26. ELLER E, ROLL S, CHEN CM, HERBARTH O, WICHMANN HE, VON BERG A, KRÄMER U, MOMMERS M, THIJIS C, WIJGA A, BRUNEKREEF B, FANTINI MP, BRAVI F, FORASTIERE F, PORTA D, SUNYER J, TORRENT M, HØST A, HALKEN S, LØDRUP CARLSEN KC, CARLSEN KH, WICKMAN M, KULL I, WAHN U, WILLICH SN, LAU S, KEIL T, HEINRICH J for the Working Group of GA2LEN--Work Package 1.5 Birth Cohorts (2008), Meta-analysis of determinants for pet ownership in 12 European birth cohorts on asthma and allergies: a GA2LEN initiative, *Allergy*, Nov **63**(11), 1491-8.
27. EPSTEIN TG, BERNSTEIN DI, LEVIN L, KHURANA HERSHEY GK, RYAN PH, REPONEN T, VILLAREAL M, LOCKEY JE, LEMASTERS GK (2011), Opposing effects of cat and dog ownership and allergic sensitization on eczema in an atopic birth cohort, *J Pediatr*, Feb **158**(2), 265-71
28. FACCO (Chambre Syndicale des Fabricants d'Aliments pour Chiens, Chats, Oiseaux et autres animaux familiers) *Enquête FACCO/TNS SOFRES 2010 sur le Parc des Animaux Familiers Français* Mise à jour le 17 juin 2012 [<http://www.facco.fr>] (page consultée le 17/06/2012)
29. FIELD LD, STERNHELL S, KALMAN JR (2008), *Organic Structures from Spectra*, 4ème édition, édition Wiley, 453p
30. FLOWER DR (1996), The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem J*, Aug 15, **318** 1-14.
31. GAUSSORGUES R, KERDRANVAT H (2010), Contribution de la biologie dans l'aide au diagnostic en allergologie. Mise au point 2010 *Revue française d'allergologie* **50** 55–63
32. GENT JF, BELANGER K, TRICHE EW, BRACKEN MB, BECKETT WS, LEADERER BP (2009), Association of pediatric asthma severity with exposure to common household dust allergens, *Environ Res*, Aug **109**(6), 768-74
33. GLENN TC (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* Sep **11**(5), 759-69
34. GOMEZ MC, POPE E, DRESSER BL (2006), Nuclear transfer in cats and its application, *Theriogenology*, Jul 1, **66**(1), 72-81
35. GOULD HJ, SUTTON BJ (2008) IgE in allergy and asthma today, *Nat Rev Immunol*, Mar **8**(3) 205-17

36. GRIFFITHS AJF, GELBART WM, MILLER JH, LEWONTIN (2001), *Analyse génétique moderne*, édition De Boeck Université, 676p
37. GRIVENNIKOV IA (2008) Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation, *Biochemistry (Mosc)*, Dec, **73**(13), 1438-52
38. HEINZERLING L, FREW AJ, BINDSLEV-JENSEN C, BONINI S, BOUSQUET J, BRESCIANI M, *et al.* (2005) Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe - a survey from the GALEN network, *Allergy* **60**, 1287–300
39. HILGER C, GRIGIONI F, HENTGES F (1996) Sequence of the gene encoding cat (*Felis domesticus*) serum albumin, *Gene*, Mar 9 **169**(2), 295-6
40. HILGER C, KOHNEN M, GRIGIONI F, LEHNERS C, HENTGES F (1997) Allergic cross-reactions between cat and pig serum albumin. Study at the protein and DNA levels, *Allergy* Feb **52**(2), 179-87.
41. HODSON T, CUSTOVIC A, SIMPSON A, CHAPMAN M, WOODCOCK A, GREEN R (1999) Washing the dog reduces dog allergen levels, but the dog needs to be washed twice a week, *J Allergy Clin Immunol*, Apr **103**(4) 581-5
42. HONG SG, KIM MK, JANG G, OH HJ, PARK JE, KANG JT, KOO OJ, KIM T, KWON MS, KOO BC, RA JC, KIM DY, KO C, LEE BC (2009) Generation of red fluorescent protein transgenic dogs, *Genesis*, May, **47**(5), 314-22
43. HOUEBINE LM (1998), *les animaux transgéniques*, éd Tec&Doc, 181p
44. HOUEBINE LM (2002), The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression, *J Biotechnol*, Sep 25 **98**(2-3) 145-60
45. ICHIKAWA K, VAILES LD, POMÉS A, CHAPMAN MD (2001a) Identification of a novel cat allergen--cystatin, *Int Arch Allergy Immunol* Jan-Mar **124**(1-3), 55-6.
46. ICHIKAWA K, VAILES LD, POMÉS A, CHAPMAN MD (2001b) Molecular cloning, expression and modelling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitor, *Clin Exp Allergy* Aug **31**(8), 1279-86.
47. ISAAC - The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, mise à jour le 4 juin 2012, [<http://isaac.auckland.ac.nz/>] (page consultée le 10/06/2012)
48. IUIS, *Allergen Nomenclature Home Page*, mise à jour le 20/03/12, [<http://www.allergen.org/>] (page consultée le 20/03/2012)
49. JALIL-COLOME J, DE ANDRADE AD, BIRNBAUM J, CASANOVA D, MEGE JL, LANTEAUME A, CHARPIN D, VERVLOET D (1996) Sex difference in Fel d 1 allergen production, *J Allergy Clin Immunol* Jul **98**(1), 165-8.
50. JOHANSSON SG, BIEBER T, DAHL R, FRIEDMANN PS, LANIER BQ, LOCKEY RF, MOTALA C, ORTEGA MARTELL JA, PLATTS-MILLS TA, RING J, THIEN F, VAN CAUWENBERGE P, WILLIAMS HC (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003, *J Allergy Clin Immunol*, May **113**(5), 832-6.
51. Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology; Joint Council of Allergy, (2007) Asthma and Immunology Allergen immunotherapy: a practice parameter second update, *J Allergy Clin Immunol*, Sep **120**(3 Suppl) 25-85
52. JU J, KIM DH, BI L, MENG Q, BAI X, LI Z, LI X, MARMA MS, SHI S, WU J, EDWARDS JR, ROMU A, TURRO NJ (2006), Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators, *Proc Natl Acad Sci U S A* Dec 26 **103**(52), 19635-40.

53. KAISER L, GRÖNLUND H, SANDALOVA T, LJUNGGREN HG, ACHOUR A, SCHNEIDER G, VAN HAGE-HAMSTEN M (2003) Three-dimensional structure of Fel d 1, the major allergen in cat. *Int Arch Allergy Immunol* **132**, 25–26.
54. KARNOWSKI A, YU P, ACHATZ G, LAMERS MC (2000) The road to the production of IgE is long and winding, *Am J Respir Crit Care Med*, Sep **162**(3 Pt 2) 71-5.
55. KEPLEY CL, McFEELEY PJ, OLIVER JM, LIPSCOMB MF (2001) Immunohistochemical detection of human basophils in postmortem cases of fatal asthma, *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1053-1058
56. KERKHOF M, WIJGA AH, BRUNEKREEF B, SMIT HA, DE JONGSTE JC, AALBERSE RC, HOEKSTRA MO, GERRITSEN J, POSTMA DS (2009), Effects of pets on asthma development up to 8 years of age: the PIAMA study, *Allergy*, Aug **64**(8), 1202-8
57. KINDT TJ, GOLDSBY RA, OSBORNE BA (2008), *Immunologie: le cours de Janis Kuby avec questions et révisions*, 6<sup>ème</sup> édition, édition Dunod, 704p
58. KINET JP (2007) The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev* Jun **217** 5-7.
59. KITA H (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease, *Immunol Rev*, Jul **242**(1), 161-77
60. KLUCKA CV, OWNBY DR, GREEN J, ZORATTI E (1995) Cat shedding of Fel d I is not reduced by washings, Allerpet-C spray, or acepromazine, *J Allergy Clin Immunol* Jun **95**(6) 1164-71
61. KONIECZNY A, MORGENSTERN JP, BIZINKAUSKAS CB, LILLEY CH, BRAUER AW, BOND JF, AALBERSE RC, WALLNER BP, KASAIAN MT (1997) The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms, *Immunology* Dec **92**(4) 577-86
62. LICCARDI G, RUSSO M, BARBER D, CARREIRA J, D'AMATO M, D'AMATO G (1998), Washing the clothes of cat owners is a simple method to prevent cat allergen dispersal, *J Allergy Clin Immunol*, Jul **102**(1), 143-4
63. LIEBERMAN P, NICKLAS RA, OPPENHEIMER J, KEMP SF, LANG DM, BERNSTEIN DI, BERNSTEIN JA, BURKS AW, FELDWEIG AM, FINK JN, GREENBERGER PA, GOLDEN DB, JAMES JM, KEMP SF, LEDFORD DK, LIEBERMAN P, SHEFFER AL, BERNSTEIN DI, BLESSING-MOORE J, COX L, KHAN DA, LANG D, NICKLAS RA, OPPENHEIMER J, PORTNOY JM, RANDOLPH C, SCHULLER DE, SPECTOR SL, TILLES S, WALLACE D (2010) The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter: 2010 update, *J Allergy Clin Immunol*, Sep **126**(3) 477-80.
64. LY L, WASINGER VC (2011) Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: tools for the complex proteome, *Proteomics* Feb **11**(4), 513-34
65. MADHURANTAKAM C, NILSSON OB, UCHTENHAGEN H, KONRADSEN J, SAARNE T, HÖGBOM E, SANDALOVA T, GRÖNLUND H, ACHOUR A (2010) Crystal structure of the dog lipocalin allergen Can f 2: implications for cross-reactivity to the cat allergen Fel d 4, *J Mol Biol*, Aug 6, **401**(1), 68-83
66. MANDHANE PJ, SEARS MR, POULTON R, GREENE JM, LOU WY, TAYLOR DR, HANCOX RJ (2009), Cats and dogs and the risk of atopy in childhood and adulthood, *J Allergy Clin Immunol* Oct **124**(4), 745-50
67. MARSH DG, GOODFRIEND L, KING TP, LOWENSTEIN H, PLATTS-MILLS TA (1986), Allergen nomenclature, *Bull World Health Organ*, **64**(5), 767-74
68. MATRICARDI PM, BOCKELBRINK A, KEIL T, GRÜBER C, NIGGEMANN B, HAMELMANN E, WAHN U, LAU S (2009) Dynamic evolution of serum immunoglobulin E to airborne allergens throughout childhood: results from the Multi-Centre Allergy Study birth cohort, *Clin Exp Allergy* Oct **39**(10), 1551-7

69. MATTSSON L, LUNDGREN T, EVERBERG H, LARSSON H, LIDHOLM J (2009) Prostatic kallikrein: a new major dog allergen, *J Allergy Clin Immunol*, Feb **123**(2), 362-8
70. MATTSSON L, LUNDGREN T, OLSSON P, SUNDBERG M, LIDHOLM J (2010) Molecular and immunological characterization of Can f 4: a dog dander allergen cross-reactive with a 23 kDa odorant-binding protein in cow dander, *Clin Exp Allergy* Aug **40**(8), 1276-87
71. MENDHAM, DENNEY, BARNES *et al.* (2006), *analyse chimique quantitative de Vogel*, 6<sup>ème</sup> édition, édition De Boeck, 889p
72. METZKER ML (2009) Sequencing technologies - the next generation, *Nat Rev Genet*, Jan **11**(1), 31-46
73. MINNICOZZI M, SAWYER RT, FENTON MJ (2011), Innate immunity in allergic disease, *Immunol Rev*, Jul, **242**(1), 106-27
74. MORGENSTERN JP, GRIFFITH IJ, BRAUER AW, ROGERS BL, BOND JF, CHAPMAN MD, KUO MC (1991) Amino acid sequence of Fel dl, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nov 1, **88**(21), 9690-4.
75. NCBI, National Center for Biotechnology Information, mise à jour le 10 juin 2012, [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)] (page consultée le 10/06/2012)
76. NICHOLAS CE, WEGIENKA GR, HAVSTAD SL, ZORATTI EM, OWNBY DR, JOHNSON CC (2011) Dog allergen levels in homes with hypoallergenic compared with nonhypoallergenic dogs, *Am J Rhinol Allergy*, Jul-Aug **25**(4) 252-6
77. OBER C, YAO TC (2011) The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective, *Immunol Rev*, Jul **242**(1) 10-30
78. OHMAN JL JR, LOWELL FC, BLOCH KJ, KENDALL S (1976) Allergens of mammalian origin V. Properties of extracts derived from the domestic cat, *Clin Allergy*, Sep **6**(5), 419-28.
79. PATEL SP, JÄRVELIN MR, LITTLE MP (2008) Systematic review of worldwide variations of the prevalence of wheezing symptoms in children, *Environ Health* Nov **10**, 7-57.
80. PAWANKAR R, MORI S, OZU C, KIMURA S (2011) Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis, *Asia Pac Allergy* Oct **1**(3), 157-67
81. PLATTS-MILLS TA, WOODFOLK JA (2011) Allergens and their role in the allergic immune response, *Immunol Rev*, Jul, **242**(1), 51-68
82. POITRAS E, HOUDE P (2002), La PCR en temps réel : principes et applications, *reviews in Biology and Biotechnology*, dec **2** (2), 2-11
83. RAMADOUR M, GUETAT M, GUETAT J, EL BIAZE M, MAGNAN A, VERVLOET D (2005) Dog factor differences in Can f 1 allergen production, *Allergy*, Aug **60**(8), 1060-4.
84. RANCE F, ABBAL M, DIDIER A (2002), Allergies et hypersensibilités chez l'enfant et chez l'adulte : aspects épidémiologiques, diagnostiques et principes de traitement, *Rev Fr Allergol immunol Clin*, **42**, 378-401
85. REEFER AJ, CARNEIRO RM, CUSTIS NJ, PLATTS-MILLS TAE, SUNG SSJ, HAMMER J, WOODFOLK JA (2004), A Role for IL-10-Mediated HLA-DR7-Restricted T Cell-Dependent Events in Development of the Modified Th2 Response to Cat Allergen, *J Immunol* **172**, 2763-2772
86. REVILLARD JP (2001), *Immunologie*, 4<sup>e</sup> édition, édition De Boeck Université, 595p
87. RINDSJÖ E, SCHEYNIUS A (2010), Mechanisms of IgE-mediated allergy, *Exp Cell Res*, May 1, **316**(8), 1384-9
88. SANDINI U, KUKKONEN AK, POUSSA T, SANDINI L, SAVILAHTI E, KUITUNEN M (2011), Protective and risk factors for allergic diseases in high-risk children at the ages of two and five years, *Int Arch Allergy Immunol*, **156**(3), 339-48
89. SCF Sphynx Club de France, *le club de race du Sphynx affilié au LOOF*, Mise à jour le 10 juin 2012, [<http://www.scf-fr.net>] (page consultée le 10/06/2012)

90. SCHOU C, SVENDSEN UG, LØWENSTEIN H (1991) Purification and characterization of the major dog allergen, Can f 1, *Clin Exp Allergy*, May **21**(3), 321-8
91. SCHROEDER JT (2011), Basophils : emerging roles in the pathogenesis of allergic disease, *Immunological Reviews*, **242**, 144-160
92. SICHERER SH, WOOD RA; COLLABORATORS (9) SICHERER SH, ABRAMSON S, CHIPPS BE, FLEISHER T, LESTER MR, MAHR TA, MATSUI EC, VIRANT FS, WILLIAMS PV (2012) Allergy testing in childhood: using allergen-specific IgE tests, *Pediatrics. American Academy of Pediatrics Section On Allergy And Immunology*, Jan **129**(1) 193-7
93. SMITH W, BUTLER AJ, HAZELL LA, CHAPMAN MD, POMÉS A, NICKELS DG, THOMAS WR (2004) Fel d 4, a cat lipocalin allergen, *Clin Exp Allergy*, Nov, **34**(11), 1732-8
94. SMITH W, O'NEIL SE, HALES BJ, CHAI TL, HAZELL LA, TANYARATSRISAKUL S, PIBOONPOCANUM S, THOMAS WR (2011) Two Newly Identified Cat Allergens: The von Ebner Gland Protein Fel d 7 and the Latherin-Like Protein Fel d 8, *Int Arch Allergy Immunol*, May 17, **156**(2), 159-170
95. SPENCER LA, WELLER PF (2010) Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights, *Immunol Cell Biol*, Mar-Apr **88**(3) 250-6
96. SPITZAUER S, SCHWEIGER C, SPERR WR, PANDJAITAN B, VALENT P, MÜHL S, EBNER C, SCHEINER O, KRAFT D, RUMPOLD H *et al*,(1994) Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen, *J Allergy Clin Immunol*, Mar, **93**(3), 614-27
97. STRACHAN D, SIBBALD B, WEILAND S, AÏT-KHALED N, ANABWANI G, ANDERSON HR, ASHER MI, BEASLEY R, BJÖRKSTÉN B, BURR M, CLAYTON T, CRANE J, ELLWOOD P, KEIL U, LAI C, MALLOL J, MARTINEZ F, MITCHELL E, MONTEFORT S, PEARCE N, ROBERTSON C, SHAH J, STEWART A, VON MUTIUS E, WILLIAMS H (1997) Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), *Pediatr Allergy Immunol* Nov **8**(4) 161-76.
98. SUBBARAO P, MANDHANE PJ, SEARS MR (2009), Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*, Oct 27, **181**(9),E181-90
99. SULSER C, SCHULZ G, WAGNER P, SOMMERFELD C, KEIL T, REICH A, WAHN U, LAU S (2009) Can the use of HEPA cleaners in homes of asthmatic children and adolescents sensitized to cat and dog allergens decrease bronchial hyperresponsiveness and allergen contents in solid dust?, *Int Arch Allergy Immunol*, **148**(1), 23-30
100. SUZUKI Y, KODAMA M, ASANO K (2011) Skin barrier-related molecules and pathophysiology of asthma. *Allergol Int*. Mar **60**(1):11-5.
101. THEOHARIDES TC, KALOGEROMITROS D (2006) The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* Nov **1088** 78-99.
102. THEOHARIDES TC, KEMPURAJ D, TAGEN M, CONTI P, KALOGEROMITROS D (2007) Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev* Jun 217 65-78.
103. VAN WEEL C, BATEMAN ED, BOUSQUET J, REID J, GROUSE L, SCHERMER T, VALOVIRTA E, ZHONG N (2008) Asthma management pocket reference 2008 *Allergy* Aug 63(8) 997-1004.
104. WIKIPEDIA, *l'encyclopédie libre*, mise à jour le 3 juin 2012, [<http://fr.wikipedia.org/>] (page consultée le 03/06/2012)
105. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) *Eur Respir J* 1998 Aug **12**(2), 315-35.
106. YIN XJ, LEE HS, YU XF, CHOI E, KOO BC, KWON MS, LEE YS, CHO SJ, JIN GZ, KIM LH, SHIN HD, KIM T, KIM NH, KONG IK (2008) Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein, *Biol Reprod*, Mar, **78**(3), 425-31

107. YMAN L, BRANDT R, PONTERIUS G (1973) Serum albumin--an important allergen in dog epithelia extracts, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **44**(3), 358-68
108. YOSHIMOTO T, YASUDA K, TANAKA H, NAKAHIRA M, IMAI Y, FUJIMORI Y, NAKANISHI K (2009) Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells, *Nat Immunol*, Jul **10**(7) 706-12
109. ZHENG ZHANG, SCOTT SCHWARTZ, LUKAS WAGNER, AND WEBB MILLER (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol*, **7**(1-2), 203-14
110. ZIELONKA TM, CHARPIN D, BERBIS P, LUCIANI P, CASANOVA D, VERVLOET D (1994), Effects of castration and testosterone on Fel dl production by sebaceous glands of male cats: I-- Immunological assessment, *Clin Exp Allergy*, Dec, **24**(12), 1169-73
111. ZINOVIEVA N, LASSNIG C, SCHAMS D, BESENFELDER U, WOLF E, MÜLLER S, FRENYO L, SEREGI J, MÜLLER M, BREM G (1998) Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations, *Transgenic Res*, Nov, **7**(6), 437-47



# LES CHIENS ET LES CHATS

## HYPOALLERGÉNIQUES POUR L'HOMME

**NOM et Prénom :** BLANCHET Hélène

### Résumé

L'hypersensibilité de type I, ou allergie au sens commun du terme, concerne de plus en plus de personnes dans le monde. Si les mécanismes pathologiques sont bien connus et les traitements de plus en plus accessibles aux patients, l'éviction de l'allergène incriminé reste la solution idéale pour les malades. Dans le cadre de l'"allergie" aux chiens et aux chats, celle-ci peut être mal vécue. Il est ainsi légitime de se demander si des animaux hypoallergéniques pour l'homme existent. Nous constatons qu'aucune race existante n'a jamais prouvé son hypoallergénicité. La création d'une race hypoallergénique implique qu'un gène codant un allergène donné présente une variation. Deux stratégies peuvent être envisagées : la recherche d'une mutation naturelle et rare dans la population, ou la modification du matériel génétique de l'animal (la transgénèse). Dans ce manuscrit, nous présentons l'état actuel des connaissances concernant l'allergie au chien et au chat et nous abordons les solutions qui pourraient, à l'avenir, aboutir à la commercialisation de chiens et de chats hypoallergéniques pour l'homme.

**Mots clés :** HYPERSENSIBILITE, HYPOALLERGENIQUE, GENOTYPAGE, TRANSGENESE, HOMME, CARNIVORE, CHIEN, CHAT

**Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Dr. ABITBOL

Assesseur : Dr. FREYBURGER



# **HYPOALLERGENIC DOGS AND CATS**

**SURNAME : BLANCHET**

**Given name : Hélène**

## **Summary**

Type I hypersensitivity, also known as an "allergy" is a growing and major issue. If the pathomechanisms of the allergic disease are well known, and treatments are more accessible, allergen avoidance is the ideal solution for the patients. For cat and dog hypersensitivity, this latter is not always well accepted by allergic people. It is therefore legitimate to wonder if hypoallergenic breeds of cats and dogs actually exist. We note that no breed has ever been proven to be hypoallergenic. To create such a breed, the gene encoding an allergen needs to be modified. Two strategies can be considered: the detection of a natural and rare mutation in a large number of animals, or the modification of the animal's genome (transgenesis). In this work, we present the actual knowledge concerning allergy to dog and cat allergens. We also approach the solutions that could in the future lead to the marketing of true hypoallergenic dogs and cats.

**Keywords : HYPERSENSITIVITY, HYPOALLERGENIC, GENOTYPING, TRANSGENESIS, HUMAN, CARNIVOROUS, DOG, CAT**

## **Jury :**

President : Pr.

Director : Dr. ABITBOL

Assessor : Dr. FREYBURGER