

Mise au point

L'association Alt a 1 (*Alternaria*)–Act d 2 (kiwi) : origine et pertinence clinique possible

The association of Alt a 1 (Alternaria) with Act d 2 (kiwi): Origin and potential clinical relevance

A. Barre^a, F. Bienvenu^b, S. Caze-Subra^a, M. Degaud^b, S. Viel^{b,c}, L. Garnier^b, J. Bienvenu^{b,c},
P. Rougé^{a,*}

^a UPS, IRD, UMR 152 PharmaDev, université Toulouse 3, faculté des sciences pharmaceutiques, 31062 Toulouse cedex 09, France

^b Laboratoire d'immunologie, hospices civils de Lyon, centre hospitalier Lyon-Sud, 165, chemin du Grand-Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France

^c Inserm U1111, université Lyon 1, 69007 Lyon, France

Reçu le 24 août 2015 ; accepté le 23 novembre 2015

Disponible sur Internet le 23 février 2016

Résumé

Récemment, l'association de l'allergène Act d 2 du kiwi avec l'allergène Alt a 1 d'*Alternaria* a été mise en évidence dans la pulpe du fruit. Cette association repose sur une interaction entre les deux allergènes dont le mécanisme reste encore mal connu. L'allergène Alt a 1 diffuse à partir de la paroi des spores d'*Alternaria* germant à la surface du fruit, pour migrer dans la pulpe du fruit où il s'associe avec Act d 2. Cette pénétration de l'allergène dans le fruit implique nécessairement un franchissement des parois et des membranes cellulaires du fruit par l'allergène. Alt a 1 emprunterait les lenticelles (stomates morts) pour franchir les parois cellulaires et des transporteurs membranaires spécifiques pour pénétrer dans les cellules de la pulpe. L'association des deux allergènes au sein de la pulpe s'effectuerait grâce à des interactions électrostatiques, hydrophiles et hydrophobes comme le suggèrent des expériences d'ancrage moléculaire in silico. Une reconnaissance des chaînes glycaniques d'Alt a 1 par la crevasse catalytique d'Act d 2, pourrait également intervenir dans cette association. D'autres fruits comme la banane ou la pomme, riches en protéines PR5 thaumatin-like, pourraient présenter ce type d'association. La pertinence clinique possible de cette association repose sur l'observation d'une fréquence élevée de cosensibilisations entre Act d 2 et Alt a 1 : 85 % des patients sensibilisés à Act d 2 le sont également à Alt a 1. Par contre, seulement 39 % des patients sensibilisés à Alt a 1 le sont également à Act d 2.

© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Alt a 1 ; Act d 2 ; *Alternaria alternata* ; *Actinidia deliciosa* ; Protéines PR5 thaumatin-like ; Kiwi ; Cosensibilisation

Abstract

The Alt a 1 allergen of *Alternaria* was reported recently to interact with the Act d 2 allergen which is found inside the pulp of kiwi fruit. This association is due to an as yet unknown interaction between these two allergens. Preceding to this interaction, Alt a 1 has to spread from the spores of *Alternaria* which were germinating on the surface of the fruit and then migrate into the pulp of the fruit where it associates with Act d 2. Such migration requires that Alt a 1 has the capacity to pass through the kiwi's exterior wall and then to pass through the plasma membrane of the pulp cells. To react with the kiwi's pulp cells, Alt a 1 enters the fruit via the lenticels that are scattered on its surface and then enters the pulp cells using plasma membrane protein transporters. Once inside these cells, Alt a 1 can associate with Act d 2 by means of electrostatic, hydrophilic and/or hydrophobic interactions, as suggested by in silico molecular docking experiments. In addition to this protein–protein interaction, the glycan moiety of *N*-glycosylated Alt a 1 could be recognized by the electro-negatively charged groove of Act d 2, resulting in an enhanced Alt a 1–Act d 2

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pierre.rouge@free.fr (P. Rougé).

association. As with kiwi fruit, Alt a 1 might associate with PR5 thaumatin-like proteins occurring in other fruits, such as cherry (Pru av 2), apple (Mal d 2), and banana (Mus a 4). The potential clinical relevance of this association is illustrated by the high frequency of cosensitizations observed between Act d 2 and Alt a 1 in ISAC microarray assays; up to 85% of patients sensitized to Act d 2 are also sensitized to Alt a 1. Conversely, only 39% of patients sensitized to Alt a 1 are also cosensitized to Act d 2.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Alternaria alternata*; Kiwi fruit; *Actinidia deliciosa*; PR5 thaumatin-like proteins; Cosensitization

1. Introduction

Alternaria alternata est un champignon saprophyte ou endophyte extrêmement répandu dans l'environnement [1]. Phytopathogène opportuniste responsable d'infections destructrices (pourritures, rouilles, nécroses) de nombreuses plantes cultivées [2], il provoque des rhinoconjonctivites et intervient également dans l'asthme, par son allergène majeur Alt a 1 [3–8]. Dans un environnement approprié (température proche de 25 °C, humidité relative élevée) [9], il sporule abondamment et ses spores pluriseptées (conidies), de très petite taille, pénètrent facilement dans l'arbre bronchique [10–15]. Durant la période de sporulation, qui s'étale de mai à octobre, les spores peuvent contaminer de nombreux aliments, des fruits et des légumes en particulier. Récemment, Gómez-Casado et al. [16] ont montré que les spores d'*A. alternata* germant à la surface de fruits de kiwi contaminés, pouvaient diffuser l'allergène Alt a 1 sans qu'il y ait formation et envahissement du fruit par le mycélium. Des expériences d'immunodétection cellulaire, conduites à l'aide d'anticorps anti-Alt a 1 et anti-PR5 de pêche (Pru p 2), montraient une colocalisation des deux allergènes, Alt a 1 et Act d 2, dans la pulpe du kiwi, suggérant qu'Alt a 1 pouvait diffuser dans la pulpe et s'associer à l'allergène Act d 2, protéine PR5 thaumatin-like ou TLP, pour former un complexe stable. En outre, des expériences d'ancrage moléculaire in silico montraient que la formation d'un complexe Alt a 1–Act d 2 dépend essentiellement d'interactions électrostatiques. Ces résultats posent néanmoins des interrogations concernant notamment :

- les mécanismes qui assurent la migration d'Alt a 1 jusque dans la pulpe du fruit ;
- les mécanismes moléculaires qui président à l'interaction des deux allergènes ;
- la possibilité de généraliser cette interaction à d'autres champignons et à d'autres fruits.

2. Constatation biologique d'une cosensibilisation fréquente entre Act d 2 et Alt a 1

Les données extraites de 221 puces ISAC, réalisées en routine durant 15 mois (juin 2013–septembre 2014) au laboratoire d'immunologie du centre hospitalier Lyon-Sud, chez des patients allergiques (62 % d'hommes, âge médian : 12 ans/extrêmes : 11 mois–74 ans), montrent une cosensibilisation assez fréquente aux deux allergènes, Alt a 1 et Act d 2 (Tableau 1) [17]. Ainsi, 84 % des patients sensibilisés à Act d 2 sont également sensibilisés à Alt a 1. En revanche, seulement 39 % des patients sensibilisés à Alt a 1, le sont également à Act d 2. Une sensibilisation à Act d 2 n'est pas toujours cliniquement pertinente par rapport à une allergie au kiwi, mais une majorité de patients cosensibilisés à Act d 2 et Alt a 1 présentent des symptômes respiratoires (7 rhinites + asthme, 1 rhinite, 1 sans manifestation de rhinite ou d'asthme et 7 patients non documentés).

Les médianes des IgE spécifiques d'Alt a 1 sont significativement ($p < 0,01$) plus élevées (5,4 ISU-E) dans le groupe des patients cosensibilisés que dans le groupe des patients sensibilisés seulement à Alt a 1 (0,80 ISU-E).

3. Comment Alt a 1 rentre en contact avec Act d 2 ?

L'analyse immunohistochimique d'un fruit de kiwi contaminé par *Alternaria* montre une colocalisation des deux allergènes dans la pulpe du fruit et cela, en l'absence d'un envahissement de la pulpe par le mycélium du champignon [16]. Ce résultat indique qu'Alt a 1 diffuse dans le fruit à partir des spores et non du mycélium. L'allergène Alt a 1 se localise essentiellement dans la paroi des spores (conidies) [18] et au moment de la germination de la spore, il est apparemment synthétisé en plus grande quantité et il diffuse rapidement à l'extérieur de la spore [19]. Ce comportement expliquerait la présence d'Alt a 1 dans

Tableau 1
Dosage des IgE spécifiques et résultats des puces ISAC.

	Allergènes		
	Alt a 1	Act d 2	Alt a 1 + Act d 2
Nombre et % de patients sensibilisés	$n = 41$ (19 %)	$n = 19$ (8,6 %)	$n = 16$ (7,2 %)
Médiane des IgE : (ISU-E)	3,80	0,80	Alt a 1 : 5,40 Act d 2 : 0,71

la pulpe du fruit en l'absence de formation de mycélium si, toutefois, Alt a 1 est capable de traverser l'épaisse cuticule qui recouvre les cellules épidermiques du fruit pour diffuser à l'intérieur de la pulpe. Alt a 1 pourrait traverser cette couche de cellules superficielles en empruntant les lenticelles dont elle est parsemée. Ces lenticelles correspondent à des stomates morts dont les cellules de garde demeurent écartées et ces pertuis sont d'ailleurs utilisés par de nombreux champignons phytopathogènes pour envahir les tissus de la plante hôte. Alt a 1 doit ensuite traverser la membrane plasmique des cellules de la pulpe pour arriver au contact d'Act d 2. Alt a 1 est une protéine à caractère hydrophile qui exige des récepteurs/transporteurs membranaires spécifiques pour pouvoir traverser la membrane plasmique. Les lipocalines [20] et, en particulier, les avidines et la bradavine II [21], qui possèdent une structure très comparable à celle d'Alt a 1 (Fig. 1A–D), utilisent ce type de récepteurs pour pénétrer dans les cellules. Bien qu'elle ne corresponde à aucune homologie de séquences, cette homologie structurale que partagent Alt a 1 et les lipocalines, suggère un mécanisme analogue d'internalisation d'Alt a 1 permettant d'expliquer la diffusion de l'allergène à l'intérieur de la pulpe du fruit. D'autre part, l'interaction entre Alt a 1 et Act d 2 pourrait être facilitée par le fait que, Act d 2, comme la plupart des protéines PR, est excrétée par les cellules et se localise essentiellement au sein même des parois cellulaires où elle pourrait facilement entrer en contact avec Alt a 1 [22].

4. Mécanisme moléculaire de l'association Alt a 1–Act d 2

L'allergène Alt a 1 possède une structure homodimérique constituée par l'association non covalente de deux monomères structurés en tonnelet β (β -barrel) [23] (Fig. 1H). Les expériences d'ancrage (*docking*) moléculaire, réalisées entre Alt a 1 et Act d 2 [24], privilégient une interaction électrostatique entre les deux allergènes [16]. Une région d'Alt a 1, à caractère électropositif (basique), interagirait avec la crevasse fortement électro négative (acide) d'Act d 2. Cette crevasse à caractère acide marqué est une caractéristique structurale et fonctionnelle des TLP de toutes les plantes [22]. Les protéines PR5 TLP sont constituées de trois domaines : un domaine I central, constitué de deux feuillets β antiparallèles disposés en sandwich, encadré par les domaines III, constitué de deux brins β disposés en épingle à cheveu (β *hairpin*), et II, constitué essentiellement d'hélices α [22] (Fig. 1J). L'existence de plusieurs résidus d'acide aspartique (Asp/D) et d'acide glutamique (Glu/E) disposés au centre du domaine I, délimite cette crevasse fortement acide (Fig. 1I).

Des expériences d'ancrage moléculaire réalisées à l'aide de différents serveurs donnent des résultats souvent différents de ceux obtenus par Gómez-Casado et al. [16]. À l'exception des résultats fournis par le serveur GRAMM-X [25], qui font intervenir la crevasse électro négative d'Act d 2 dans la formation du complexe entre les deux allergènes (Fig. 1E), les prédictions similaires fournies par deux autres serveurs, ZDOCK [26] et ClusPro [27], impliquent un mélange d'interactions électrostatiques, hydrophiles et hydrophobes, dans lesquelles la crevasse

catalytique d'Act d 2 n'est plus impliquée (Fig. 1F, G). Les différences observées dans les prédictions fournies par les différents programmes d'ancrage moléculaire s'expliquent par l'utilisation d'algorithmes d'ancrage et de champs de forces différents. Elles suggèrent qu'il existe dans les deux allergènes, plusieurs surfaces complémentaires susceptibles de s'apparier pour former un complexe Alt a 1–Act d 2.

Les résidus d'acides aspartique et glutamique de la crevasse électro négative sont responsables d'une activité endo- β 1-3-glucanasique des TLP, qui reste néanmoins modérée [22]. Cette activité glucanasique permet aux TLP de s'associer à des chaînes glucaniques pour les scinder ultérieurement. Elle permet d'envisager un autre mode d'interaction entre Alt a 1 et Act d 2. La séquence d'Alt a 1 possède un site putatif de *N*-glycosylation Asn69-Phe-Ser dont l'exposition à la surface de l'allergène crée des conditions géométriques favorables à une glycosylation. L'allergène Alt a 1 correspond très vraisemblablement à une glycoprotéine (Fig. 1H, I). Dès lors, les deux chaînes glycaniques exposées à la surface du dimère d'Alt a 1 [23] pourraient être facilement reconnues par la crevasse acide d'Act d 2 (Fig. 1I) et cette reconnaissance assurerait l'association des deux allergènes. En fait, les deux mécanismes d'association d'Alt a 1 avec Act d 2 ne sont pas incompatibles dans la mesure où l'emplacement des chaînes glycaniques sur Alt a 1 est suffisamment éloigné de l'emplacement des régions d'Alt a 1 reconnues par Act d 2. On peut imaginer qu'ils interviennent conjointement pour renforcer l'association des deux allergènes.

5. Une association impliquant d'autres champignons ?

L'interaction Alt a 1–Act d 2 pourrait intéresser d'autres champignons ascomycètes apparentés au genre *Alternaria*. L'allergène Alt a 1 possède, en effet, de nombreux homologues chez d'autres ascomycètes de la même famille des Pleosporacées ou d'autres familles apparentées [28,29]. Une analyse deltaBLAST montre l'existence de très nombreux homologues d'Alt a 1 dans les genres *Ulocladium*, *Sinomyces*, *Pleospora*, *Stemphyllum*, *Embellisia*, *Nympha* et *Lewia*, avec des pourcentages d'identité allant de 75 % jusqu'à 100 %, sans aucun espace (*gap*) (Tableau 2). D'autres genres de Pleosporacées, comme *Undifilum*, *Bipolaris*, *Setosphaeria* ou *Pyrenophora*, présentent des homologies beaucoup moins élevées, ne dépassant que très rarement 50 %. Avec les genres appartenant à d'autres familles d'ascomycètes, comme *Zymoseptoria* (Mycosphaerellacées) ou *Macrophomina* (Botryosphaeriacées), les homologies restent inférieures à 40 % et on observe un pourcentage élevé de *gaps* entre les séquences. La protéine Alt a 1-like du genre *Leptosphaeria* (famille des Leptosphaeriacees), fait exception avec 79 % d'homologie et aucun *gap*. Ces résultats suggèrent que d'autres espèces de Pleosporacées possèdent des protéines Alt a 1-like susceptibles d'interagir avec les TLP de divers fruits, d'autant que toutes ces espèces sont des saprophytes ou parasites de nombreuses plantes fructifères.

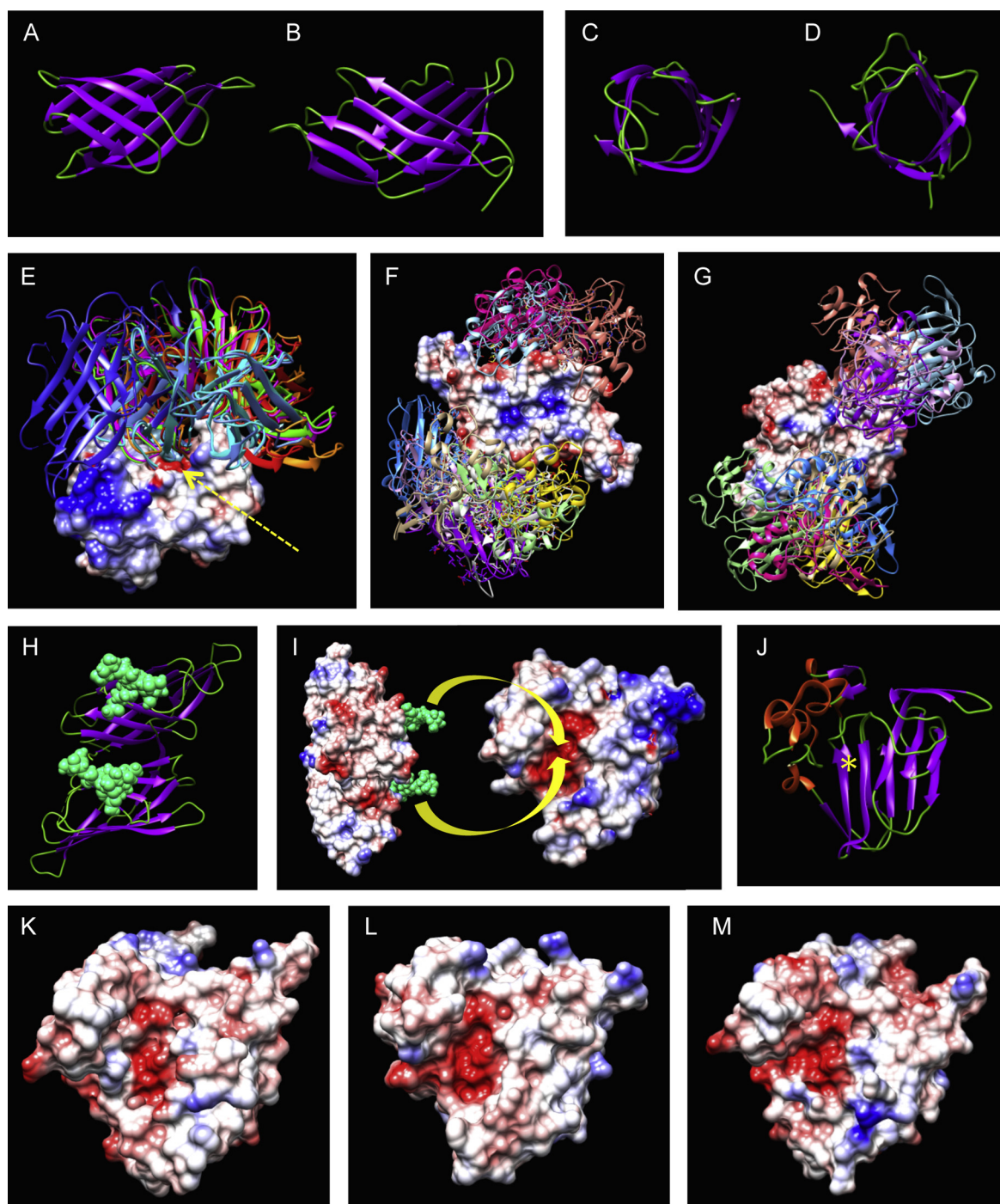


Fig. 1. A, B. Similarités structurales entre le monomère d'Alt a 1 (A, C) et la bradavidine II (B, D). Le monomère d'Alt a 1 et la bradavidine II sont représentés de profil (A, B) et de face (C, D). E. Ancrage moléculaire (serveur GRAMM-X) d'Alt a 1 (dimères de couleurs variées) sur Act d 2 (surface moléculaire colorée selon les charges coulombiennes de surface). La flèche indique l'emplacement de la crevasse catalytique électro négative d'Act d 2. F. Ancrage moléculaire (serveur ZDOCK) d'Alt a 1 (dimères de couleurs variées) sur Act d 2 (surface moléculaire colorée selon les charges coulombiennes de surface). G. Ancrage moléculaire (serveur ClusPro) d'Alt a 1 (dimères de couleurs variées) sur Act d 2 (surface moléculaire colorée selon les charges coulombiennes de surface). H. Structure tridimensionnelle du dimère d'Alt a 1 montrant l'emplacement des chaînes glycaniques (en vert). I. Schéma montrant l'ancrage moléculaire possible des chaînes glycaniques (en vert) d'Alt a 1 dans la crevasse moléculaire électro négative (en rouge) d'Act d 2. J. Structure tridimensionnelle d'Act d 2 montrant l'emplacement de la crevasse catalytique électro négative (astérisque). K. Cartographie des charges coulombiennes sur la surface moléculaire de la TLP de cerise, Pru av 2. La crevasse catalytique, fortement électro négative, est colorée en rouge. L. Cartographie des charges coulombiennes sur la surface moléculaire de la TLP de banane, Mus a 4. La crevasse catalytique, fortement électro négative, est colorée en rouge. M. Cartographie des charges coulombiennes sur la surface moléculaire de la TLP de pomme, Mal d 2. La crevasse catalytique, fortement électro négative, est colorée en rouge.

Tableau 2
Recherche de protéines homologues d'Alt a 1 chez les Pleosporacées et les familles d'ascomycètes apparentées.

Champignon (genre)	Famille	% d'identité	% de gaps (espaces)
<i>Alternaria</i>	Pleosporacées	100-90	0
<i>Ulocladium</i>	–	94-92	0
<i>Sinomyces</i>	–	90	0
<i>Pleospora</i>	–	85-80	0
<i>Stemphyllum</i>	–	84	0
<i>Embellisia</i>	–	81-78	0
<i>Nympha</i>	–	80-66	0
<i>Leptosphaeria</i>	Leptosphaeriacees	79	0
<i>Lewia</i>	Pleosporacées	77-74	0
<i>Undifilum</i>	–	57	1
<i>Bipolaris</i>	–	50-21	3–12
<i>Setosphaeria</i>	–	47	1
<i>Zymoseptoria</i>	Mycosphaerellacées	37-25	9–10
<i>Pyrenophora</i>	Pleosporacées	33	6
<i>Macrophomina</i>	Botryosphaeriacees	35-23	2–9

6. Une association commune à d'autres fruits ?

Plus généralement, l'interaction Alt a 1–Alt a 1-like-TLP pourrait ainsi intéresser de nombreux fruits autres que le kiwi, en raison du caractère ubiquitaire des protéines PR5 thaumatin-like ou TLP [30]. Ces protéines sont des allergènes reconnus de nombreux fruits comme la banane (Mus a 4) [31] (Fig. 1L), le maïs (zeamatine) [32], la pomme (Mal d 2) [33] (Fig. 1M), la cerise (Pru av 2) [34] (Fig. 1K), ou la sapote du sapotiller (*Manilkara zapota* ou *Achras sapota*) [35]. Toutes ces TLP ont en commun de posséder une crevasse fortement électro-négative, susceptible d'interagir avec les chaînes N-glycaniques d'Alt a 1 ou des protéines Alt a 1-like d'autres genres de Pleosporales, dont beaucoup sont glycosylées, ou avec les régions fortement électropositives (basiques) de ces protéines. Ainsi, la consommation de fruits contaminés par des sujets asthmatiques sensibilisés à *Alternaria* pourrait éventuellement constituer un facteur déclenchant de la crise d'asthme, au même titre que l'inhalation directe de spores fongiques.

7. Conclusion

La contamination fréquente des fruits de kiwi par les spores d'*A. alternata* entraîne une diffusion de l'allergène Alt a 1 qui migre ensuite dans la pulpe du fruit pour s'associer à l'allergène Act d 2 du kiwi. Des simulations d'ancrage moléculaire suggèrent que la formation du complexe Alt a 1–Act d 2 repose sur des interactions non covalentes de trois sortes : électrostatiques, hydrophiles et hydrophobes.

En raison du caractère ubiquitaire des TLP et de l'abondance des spores d'*Alternaria* dans l'environnement, il est probable que d'autres fruits comestibles puissent être contaminés et développer des complexes Alt a 1-TLP similaires. Les allergènes TLP de la pomme (Mal d 2), de la cerise (Pru av 2), de la banane (Mus a 4), possèdent les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnelles qu'Act d 2 et pourraient s'associer à Alt a 1 pour

former des complexes stables. De même, d'autres espèces de moisissures de la famille des Pléosporacées ou d'autres familles apparentées, possèdent des protéines Alt a 1-like susceptibles d'interagir avec les TLP. Ainsi, plusieurs genres d'ascomycètes sécrètent des protéines Alt a 1-like qui partagent avec Alt a 1 des pourcentages d'identité élevés.

La présence d'un complexe Alt a 1–Act d 2 dans la pulpe du kiwi pose naturellement la question de sa pertinence clinique. La fréquence élevée (85 %) des cosensibilisations à Alt a 1 observées chez les patients sensibilisés à Act d 2, plaide en faveur d'une pertinence clinique pour l'association d'Alt a 1 avec Act d 2. En sens inverse, une sensibilisation aux spores d'*Alternaria* (Alt a 1) s'accompagne moins fréquemment (39 %) d'une sensibilisation au kiwi (Act d 2).

La recherche d'une cosensibilisation à Alt a 1 chez des patients sensibilisés aux allergènes PR-5 TLP d'autres fruits, serait intéressante pour vérifier les possibilités d'interaction d'Alt a 1 avec d'autres allergènes du groupe des TLP. Les allergènes Mal d 2 de la pomme et Pru av 2 de la cerise, seraient particulièrement intéressants car il s'agit de protéines qui s'accumulent à la surface des fruits et qui, de ce fait, pourraient facilement interagir avec Alt a 1 en cas de contamination des fruits par des spores d'*Alternaria*.

8. Matériel et méthodes

Les alignements de séquences ont été effectués avec CLUSTAL-X [36]. L'analyse deltaBLAST est effectuée sur le serveur du National Center for Biological Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM>).

Les structures moléculaires des allergènes Alt a 1 (code PDB 3VOR) [23], Act d 2 (code PDB 4BCT) [24], Mal d 2 (code PDB 3ZS3) [33], Mus a 4 (code PDB 1Z3Q) [31], Pru av 2 (code PDB 2AHN) [34], et de la zeamatine (code PDB 1DU5) [32], leurs surfaces moléculaires et les charges coulombiennes de surface, ont été visualisées avec Chimera [37].

L'ancrage moléculaire d'Alt a 1 sur Act d 2 a été prédit à l'aide des serveurs GRAMM-X [23], ZDOCK [24], et ClusPro [25]. Les dix meilleures simulations proposées par les différents serveurs ont été analysées. Elles sont classées suivant un score qui prend en compte la valeur des paramètres utilisés pour réaliser l'ancrage de type *rigid-body* (sans possibilité de déformations des structures protéiques) des deux protéines : surfaces complémentaires, interactions électrostatiques, interactions hydrophiles, interactions hydrophobes, énergies libres les plus favorables à une bonne stabilité du complexe, etc. Ces paramètres ainsi que les champs de force (ensemble des paramètres énergétiques qui assurent la liaison des atomes de la molécule protéique) utilisés, varient sensiblement selon les serveurs.

Les résultats de l'ancrage moléculaire sont visualisés avec Chimera.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Barnes C, Schreiber K, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J. Comparison of outdoor allergenic particles and allergen levels. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:47–54.
- [2] Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. Gaithersburg MA: A Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication; 1999. p. 69–72.
- [3] Kurup VP, Vijay HM, Kumar V, Castillo L, Elms N. IgE binding synthetic peptides of Alt a 1, a major allergen of *Alternaria alternata*. *Peptides* 2003;24:179–85.
- [4] Sáenz-de-Santamaria M, Guisantes JA, Martínez J. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). *Mycoses* 2006;49:288–92.
- [5] Martínez J, Gutiérrez A, Postigo I, Cardona G, Guisantes J. Variability of Alt a 1 expression by different strains of *Alternaria alternata*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:279–82.
- [6] Salo PM, Arbes Jr SJ, Sever M, Jaramillo R, Cohn RD, London SJ, et al. Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:892–8.
- [7] Knutsen AP, Vijay HM, Kariuki B, Santiago LA, Graff R, Wofford JD, et al. Association of IL-4RA single nucleotide polymorphisms, HLA-DR and HLA-DQ in children with *Alternaria*-sensitive moderate-severe asthma. *Clin Mol Allergy* 2010;8:5–9.
- [8] Feo BF, Alonso AM, Carnes J, Martin-Martin R, Fernandez-Caldas E, Galindo PA, et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;22:154–9.
- [9] Hatzipapas P, Kalosak K, Dara A, Christias C. Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mysol Res* 2002;106:1349–59.
- [10] Barnes C, Tuck J, Simon S, Pacheco F, Hu F, Portnoy J. Allergenic materials in the house dust of allergy clinic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:517–23.
- [11] Ibarrola I, Suarez-Cervera M, Arilla MC, Martínez A, Monteseirín J, Conde J, et al. Production profile of the major allergen Alt a 1 in *Alternaria alternata* cultures. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:589–93.
- [12] Barnes C, Portnoy J, Sever M, Arbes Jr S, Vaughn B, Zeldin DC. Comparison of enzyme immunoassay-based assays for environmental *Alternaria alternata*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:350–6.
- [13] Peters JL, Muilenberg ML, Rogers CA, Burge HA, Spengler JD. *Alternaria* measures in inner-city, low-income housing by immunoassay and culture-based analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:364–9.
- [14] Besancenot JP, Thibaudon M, Fonteyne PA, Nolard N, Berger U. Rapport Convention 2010 DGS/RNSA sur les impacts attendus du changement climatique sur les moisissures aéroportées et les risques sanitaires associés. RNSA; 2010 <http://www.pollens.fr/accueil.php>.
- [15] Baxi SN, Muilenberg ML, Rogers CA, Sheehan WJ, Gaffin J, Permaul P, et al. Exposures to molds in school classrooms of children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24:697–703.
- [16] Gómez-Casado C, Murua-García A, Garrido-Arandia M, González-Melendi P, Sánchez-Monge R, Barber D, et al. Alt a 1 from *Alternaria* interacts with PR5 thaumatin-like proteins. *FEBS Lett* 2014;588:1501–8.
- [17] Degaud M, Viel S, Lleres M, Garnier L, Barre A, Rougé P, et al. Consensibilisation à Alt a 1 et Act d 2 : une association fortuite ? *Rev Fr Allergol* 2015;55:222–3.
- [18] Twaroch TE, Arcalís E, Sterflinger K, Stöger E, Swoboda I, Valenta R. Predominant localization of the major *Alternaria* allergen Alt a 1 in the cell wall of airborne spores. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1148–9.
- [19] Mitakakis TZ, Barnes C, Tovey ER. Spore germination increases allergen release from *Alternaria*. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:388–90.
- [20] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996;318:1–14.
- [21] Leppiniemi J, Meir A, Kähkönen N, Kukkurainen S, Määttä JA, Ojanen M, et al. The highly dynamic oligomeric structure of bradavidin II is unique among avidin proteins. *Protein Sci* 2013;22:980–94.
- [22] Menu-Bouaouiche L, Vriet C, Peumans WJ, Barre A, Van Damme EJM, Rougé P. A molecular basis for the endo-beta1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* 2003;85:123–31.
- [23] Chruszcz M, Chapman MD, Osinski T, Solberg R, Demas M, Porebski PJ, et al. *Alternaria alternata* allergen, Alt a 1—a unique, β -barrel protein dimer exclusively found in fungi. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:241–7.
- [24] Pavkov-Keller T, Bublin M, Jankovic M, Breiteneder H, Keller W. Crystal structure of kiwi-fruit allergen Act d 2. PDB code 4BCT (to be published).
- [25] Tovchigrechko A, Vakser IA. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W310–4.
- [26] Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 2014;30:1771–3.
- [27] Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* 2004;20:45–50.
- [28] Sáenz-de-Santamaria M, Postigo I, Gutierrez-Rodriguez A, Cardona G, Guisantes JA, Asturias J, et al. The major allergen of *Alternaria alternata* (Alt a 1) is expressed in other members of the Pleosporaceae family. *Mycoses* 2006;49:91–5.
- [29] Gutiérrez-Rodríguez A, Postigo I, Guisantes JA, Martínez J. Identification of allergens homologous to Alt a 1 from *Stemphylium botryosum* and *Ulocladium botrytis*. *Med Mycol* 2011;49:892–6.
- [30] Rougé P, Borges JP, Culerrier R, Brulé C, Didier A, Barre A. Les allergies alimentaires aux fruits. *Rev Fr Allergol* 2009;49:S23–7.
- [31] Leone P, Menu-Bouaouiche L, Peumans WJ, Barre A, Payan F, Roussel A, et al. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. *Biochimie* 2006;88:45–52.
- [32] Batalia MA, Monzingo AF, Ernst S, Roberts W, Robertus JD. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nat Struct Biol* 1996;3:19–23.
- [33] Kopec J, Smole U, Pavkov T, Breiteneder H, Keller W. High resolution structure of Mal d 2, the thaumatin-like food allergen from apple, <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3zs3/pdb> (to be published).
- [34] Dall'Antonia Y, Pavkov T, Fuchs H, Breiteneder H, Keller W. The high-resolution crystal structure of an allergenic thaumatin-like protein, Pru av 2, isolated from ripe cherry, <http://dx.doi.org/10.2210/Pdb2ahn/pdb> (to be published).
- [35] Kumar HGA, Venkatesh YP. *In silico* analyses of structural and allergenicity features of sapodilla (*Manilkara zapota*) acidic thaumatin-like protein in comparison with allergenic plant TLPs. *Mol Immunol* 2014;57:119–28.
- [36] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res* 1997;15:4876–82.
- [37] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF-Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605–12.