

SHAHALI Youcef<sup>1</sup>, SUTRA Jean-Pierre<sup>1</sup>, HADDAD Iman<sup>2</sup>, VINH Joëlle<sup>2</sup>, CHOLLET-MARTIN Sylvie<sup>3</sup>, CHARPIN Denis<sup>4</sup>, MARI Adriano<sup>5</sup>, PELTRE Gabriel<sup>1</sup>, SÉNÉCHAL Hélène<sup>6</sup>, PONCET Pascal<sup>7</sup>

<sup>1</sup>ESPCI, LSABM-Paris, <sup>2</sup>ESPCI, LSMBP-Paris, ESPCI 10 Rue Vauquelin, 75005 Paris, <sup>3</sup>INSERM U996-Paris, <sup>4</sup>Hôpital Nord de Marseille-Marseille, France  
<sup>5</sup>CMMA Rome-Rome, Italie, <sup>6</sup>ESPCI, LSABM et INSERM-Paris, <sup>7</sup>ESPCI, LSABM et Institut Pasteur, Paris.



## INTRODUCTION

L'analyse du répertoire des allergènes et des familles moléculaires d'allergènes permettent de distinguer les polysensibilisations des réactions croisées et sont à la base des progrès du diagnostic de l'allergie. L'allergie au pollen de cyprès (*Cupressus sempervirens*), principale pollinose en région méditerranéenne à la symptomatologie parfois très sévère, touche près de 10% des enfants et sa prévalence est en augmentation.

## OBJECTIF

- 1 - établir le répertoire des allergènes de *C. sempervirens*,
- 2 - mettre en évidence des corrélats entre les données cliniques et un profil électrophorétique d'immunoréactivité IgE.

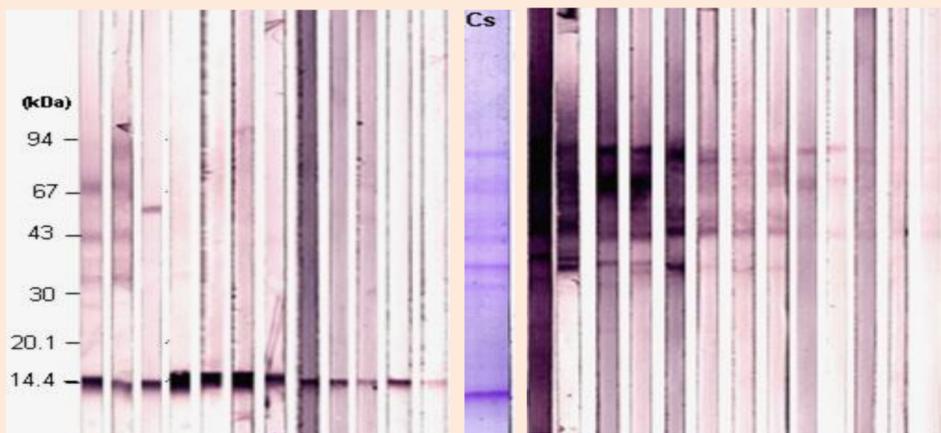
## MÉTHODES

L'analyse **allergomique** dérive de la protéomique. Les protéines, extraites en conditions aqueuses ou en détergent à partir de pollen de cyprès, sont séparées par électrophorèse 2D puis blottées sur nitrocellulose. Chaque sérum de patient est ensuite incubé avec la membrane et les IgE fixées sur les allergènes sont révélées. Les spots protéiques correspondants aux allergènes sont prélevés et identifiés par spectrométrie de masse.

## Deux profils de réactivité IgE: hautes masses (HMW) et 14 kDa

Immunoblots 1D (SDS-PAGE) – extrait de pollen en SDS 4%

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



Sérums anti-14 kDa

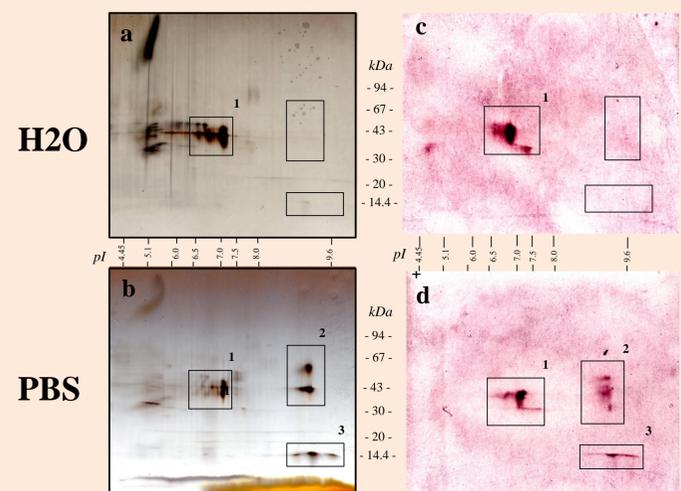
Sérums anti-HMW

## Des allergènes basiques sont extraits en PBS

(dont la 14 kDa)

Coloration Argent

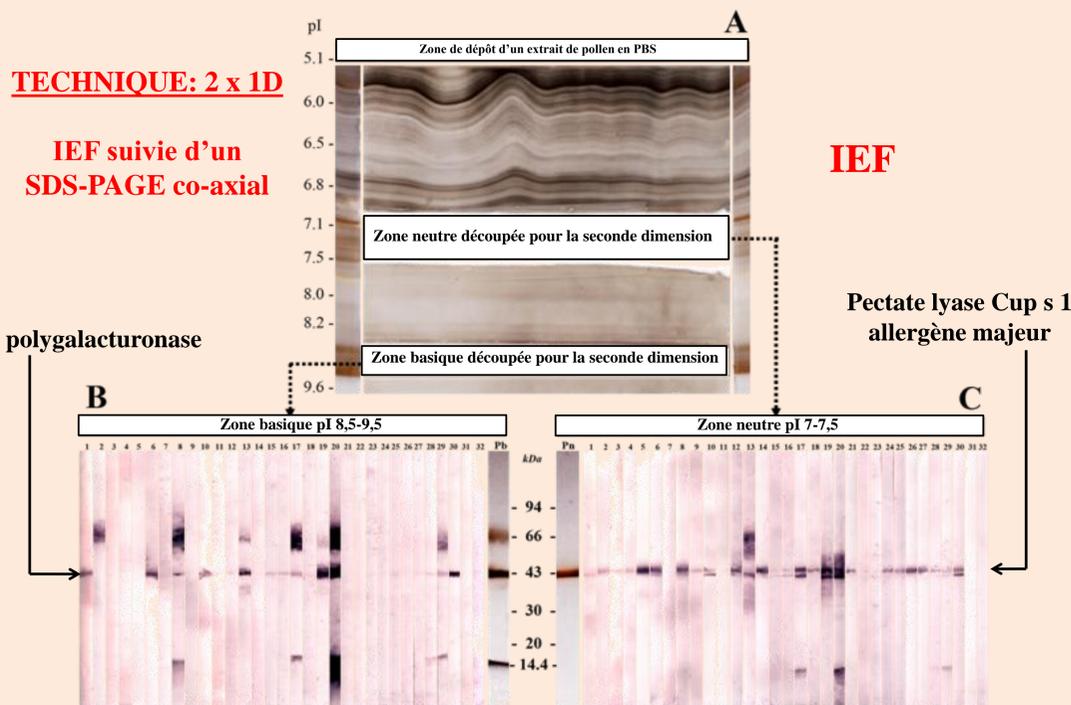
Immunoblot IgE



Prévalence de réactivité à la polygalacturonase : 70% (21/30)  
Prévalence de réactivité à la pectate lyase (*Cup s 1*) : 75% (22/30)

TECHNIQUE: 2 x 1D

IEF suivie d'un SDS-PAGE co-axial



Immunoblots IgE après la 2<sup>e</sup> dimension du 2 x 1D (SDS-PAGE co axial)

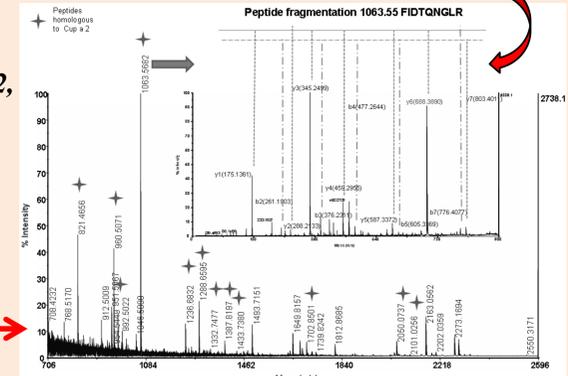
## Les spots protéiques #2 = polygalacturonase (PG)

Analyse en LC/MS/MS

Les peptides obtenus montrent 100% d'homologie avec *Cu p a 2*, la polygalacturonase de *Cupressus arizonica* et couvrent 40 % de sa séquence.

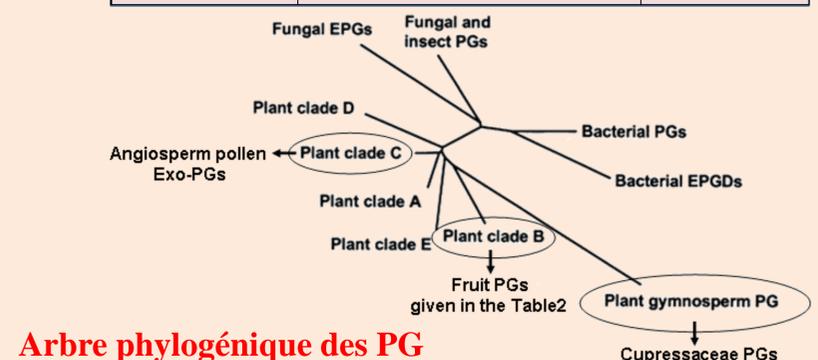
Spectre MS/MS d'un peptide commun à toutes les PG de Cupressacées

Spectre MS



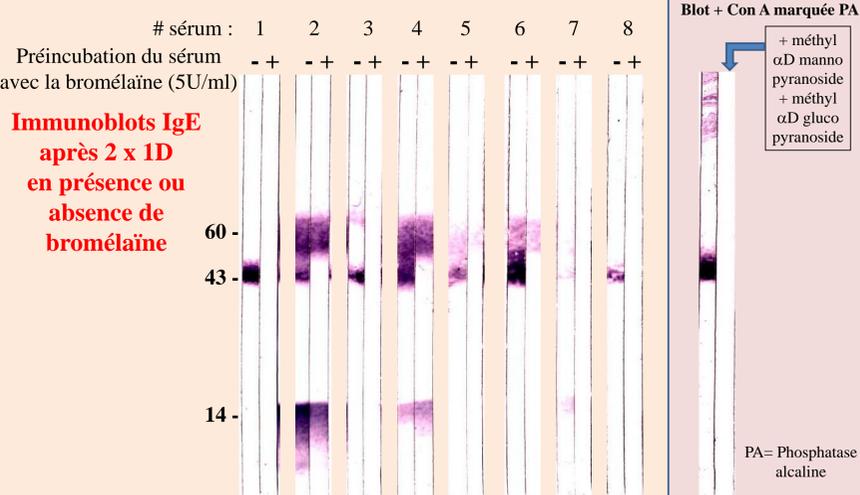
La PG du pollen de *C. sempervirens* présente plus d'homologie vis-à-vis des PG de fruits que des PG d'autres pollens (non Cupressacées)

PG Clade	Common name	Sequence identity with Jun a 2 (%)
C (Pollen exo-PG)	London plane/Olive/Timothy grass	33-36
B (Fruit endo-PG)	Tomato/Rice/Sorghum/Kiwi/Sweet orange/Rape/Peach/Maize/Soybean/Muskmelon	40-43
B (Fruit endo-PG)	Cucumber/Grape	45-47
Gymnosperms (pollen)	Arizona cypress/Japanese cypress/Japanese cedar pollen	70-97



Arbre phylogénique des PG

La réactivité IgE contre la PG est principalement dirigée contre des résidus oligosaccharidiques (CCD) contrairement à celle dirigée contre la 14 kDa



La protéine de 14 kDa ne porte pas de sucres reconnus par la Concanaviline A (Con A)

## CONCLUSIONS

- Nos études décrivent un nouvel allergène majeur, basique, de 43 kDa, du pollen de *C. sempervirens*: la polygalacturonase (*Cup s 2*), aux épitopes IgE principalement polysaccharidiques et d'une prévalence de 72%.
- La protéine basique de 14 kDa, aux épitopes IgE polypeptidiques, n'a pas été identifiée formellement jusqu'à présent. D'après nos résultats biochimiques et immunochimiques ce n'est ni une LTP ni des histones. Aucune corrélation évidente avec les paramètres cliniques disponibles n'a été mise en évidence pour le moment.
- voir le poster n° 25 pour encore plus d'informations sur la caractérisation de cet allergène