

Etude allergomique du pollen de cyprès

Shahali Y¹, Sutra JP¹, Haddad I¹, Vinh J¹, Chafey P², Chollet-Martin S³, Charpin D⁴, Mari A⁵, Sénéchal H¹, Poncet P¹

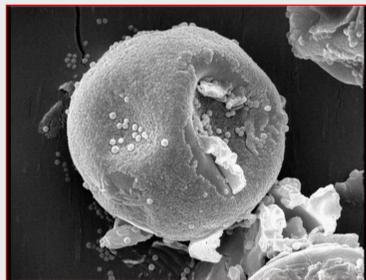
1- ESPCI ParisTech, LSABM et LSMBP, Paris; 2- ICGM, INSERM U567, Paris; 3 - Hôpital Bichat, Paris; 4 - Hôpital Nord, Marseille; 5 - CCEA, IDIIRCCS, Rome, Italie.

Allergomique:

Le terme « Allergomique » est proposé pour définir l'application de la protéomique dans l'identification des allergènes. L'extrait protéique d'une source d'allergénique est analysé en gel 2D, en immunoempreinte pour localiser les allergènes et par spectrométrie de masse pour l'identification des allergènes.

Objectif

Etablir le répertoire des allergènes de *C. sempervirens* et celui de la réponse IgE des patients allergiques. Mettre en évidence des corrélations entre les données cliniques et des profils électrophorétiques d'immunoréactivité IgE.



L'analyse du répertoire des allergènes et des familles moléculaires d'allergènes permet de distinguer les polysensibilisations des réactions croisées et est 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.

SDS-PAGE

Western-blot

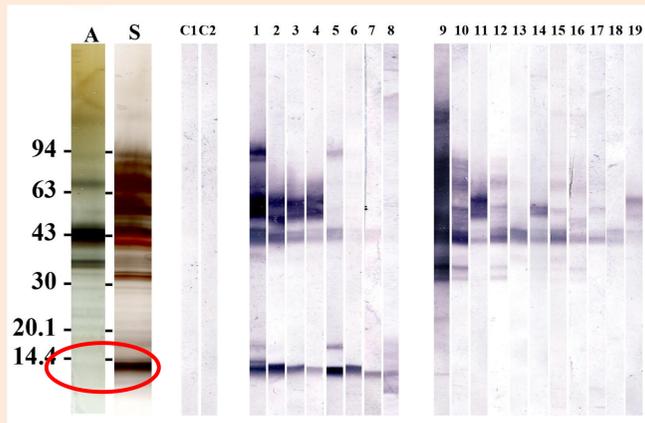
19 sérums testés individuellement

DEUX PROFILS DE REACTIVITE IgE

Profil 1 (14kDa)

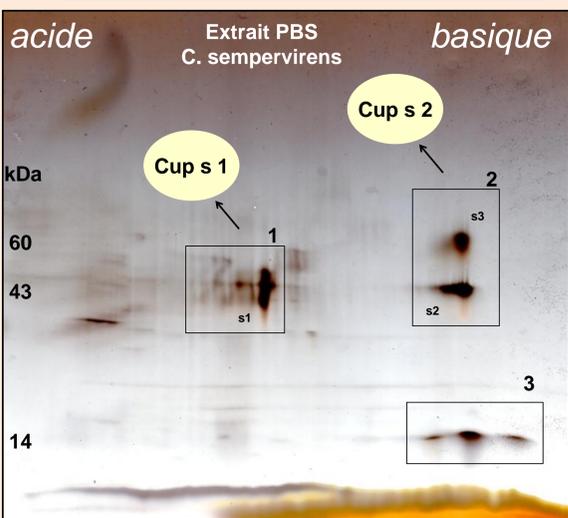
Profil 2 (HMW)

Extrait PBS
A: *Cupressus arizonica*
S: *Cupressus sempervirens*



- certains patients n'ont pas d'IgE reconnaissant la protéine de 14kDa (profil 2)
- le pollen de *C. arizonica* contient des quantités très très faibles de protéines 14 kDa

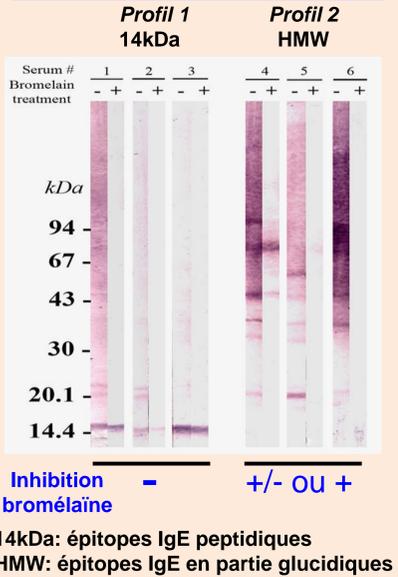
ANALYSE PROTEOMIQUE



Les spots d'intérêt ont été excisés et digérés. Les analyses sont effectuées en MALDI-TOF-TOF et en LC-ESI FT-ICR

Frame	Spot (s)	Protein Name	Accession No.	Peptide count	Mascot score
1	1	Cup s 1 pollen allergen precursor (pectate lyase family)	gi 8101715	17	551
2	2	*Putative allergen Cup a 2 variant 1 [Hesperocyparis]-Polygalacturonase	gi 11819795	8	120
2	3	*Polygalacturonase OS=Juniperus ashei - GN=JNA2	PGLR2_JUNAS	8	133
3		unidentified			

Réactivité IgE anti-CCD



14kDa: épitopes IgE peptidiques
HMW: épitopes IgE en partie glucidiques

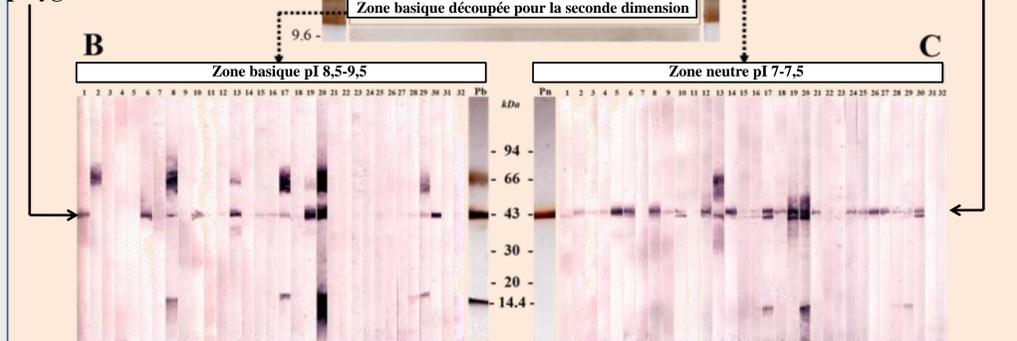
L'allergène de 14kDa est une protéine inconnue des banques de données et reste à identifier. La pectate lyase, Cup s 1, (Mr 45 kDa, pI : 7,2) allergène majeur de *C. sempervirens* ainsi qu'une polygalacturonase (Mr 43-60 kDa, pI 9,0), non encore décrite pour ce pollen, ont aussi été mis en évidence en tant qu'allergènes dans nos extraits.

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

polygalacturonase

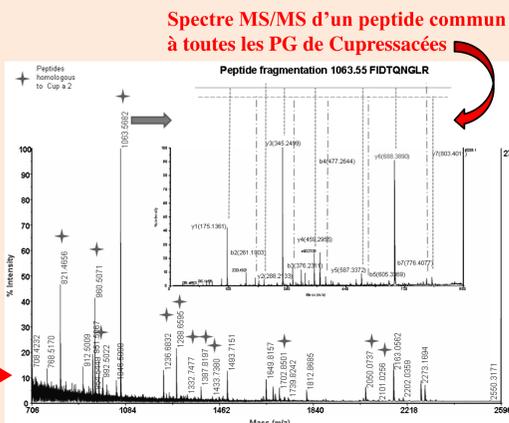


Immunoblots IgE après la 2^e dimension du 2 x 1D (SDS-PAGE co axial)

Les spots protéiques #2 = polygalacturonase (PG)

Analyse en LC/MS/MS

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



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

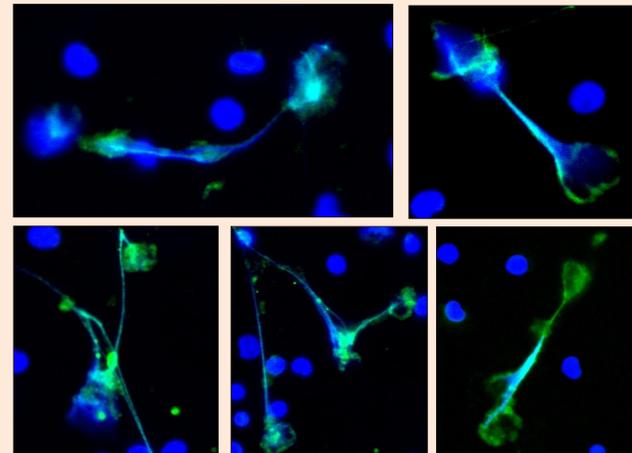


Les sérums présentant une réactivité IgE à la protéine de 14 kDa (profil 1) ont aussi une réactivité IgE vis-à-vis des "Neutrophil Extracellular Traps" (NET), prolongements cytoplasmiques et nucléaires anti-infectieux des neutrophiles

- activation de neutrophiles humains au PMA
- fixation
- incubation avec des sérums humains d'allergiques au pollen de cyprès
 - profil 1 anti-14kDa
 - profil 2 anti-HMW
- révélation des IgE fixées avec des Ac anti IgE humaines couplés FITC
- coloration des noyaux
- microscopie, photos

BLUE Noyaux, DAPI staining
GREEN FITC anti-IgE humaine

Pas de coloration obtenue avec des sérums de patients reconnaissant des allergènes de hautes masses (profil 2)



CONCLUSIONS

- Deux profils d'immunoréactivité IgE sont mis en évidence chez les patients allergiques au pollen de cyprès. → Aucune corrélation avec des paramètres cliniques n'a été trouvée pour l'instant
- 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% est décrit grâce à la technique 2 x 1D. → rôle dans les réactivités croisées avec les fruits???
- La protéine basique de 14 kDa, aux épitopes IgE polypeptidiques, n'a pas été identifiée formellement jusqu'à présent. → C'est un marqueur du genre Cupressaceae
- Les sérums de profil 1 présentent une réactivité IgE dirigée contre des neutrophiles humains activés révélant donc une autoréactivité → rôle dans la sévérité des symptômes de la pollinose au cyprès (complications infectieuses chez 50% des patients) ???