

L'allergome du pollen de frêne et les allergènes d'oléacées

Pascal PONCET



Equipe Allergie & Environnement

Département
Infections & Epidémiologie



Service de Biochimie
& Biologie Moléculaire



Définition

ALLERGOME

Répertoire des allergènes d'une source allergénique

COROLLAIRES

L'allergome dépend :

- 1 – de la méthode d'extraction des protéines de la source allergénique
- 2 - du répertoire des IgE des patients utilisés pour identifier les allergènes

POURQUOI CARACTERISER, RÉPERTORIER ET CLASSER LES ALLERGÈNES ?

1. Pour rechercher une **signature allergénique**
Pourquoi un antigène est un allergène?
2. Pour comprendre les **réactivités croisées** en particulier les syndromes associant préférentiellement des réactivités IgE vis-à-vis de sources allergéniques très différentes en apparence
3. Pour améliorer et préciser le **diagnostic**
4. Pour améliorer **l'immunothérapie** spécifique

L'analyse allergomique

Basée sur l'analyse protéomique

Extraction protéique

- eau, carbonate d'ammonium, PBS, HCl
- ± agents chaotropiques (urée, thiourée, NDSB)
- ± détergents ioniques (SDS) ou non-ioniques (CHAPS)

Séparation des protéines

- 1-DE (SDS-PAGE, IEF)
- 2-DE

Caractérisation des allergènes

- Electrotransfert sur nitrocellulose
- Incubation avec des sérums de patients
- immunodétection des IgE fixées

détermination de Mr et pI

Caractérisation des protéines

- coloration du gel

détermination de Mr et pI

Identification des protéines

- Analyse MS et MS/MS des spots excisés
- Interrogation banques de données

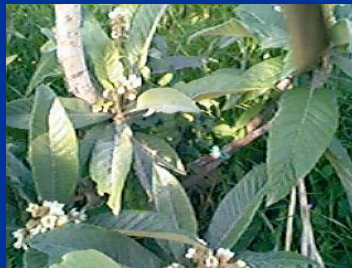
Analogies de Mr et pI

Allergie au pollen de frêne

(*Fraxinus excelsior*)

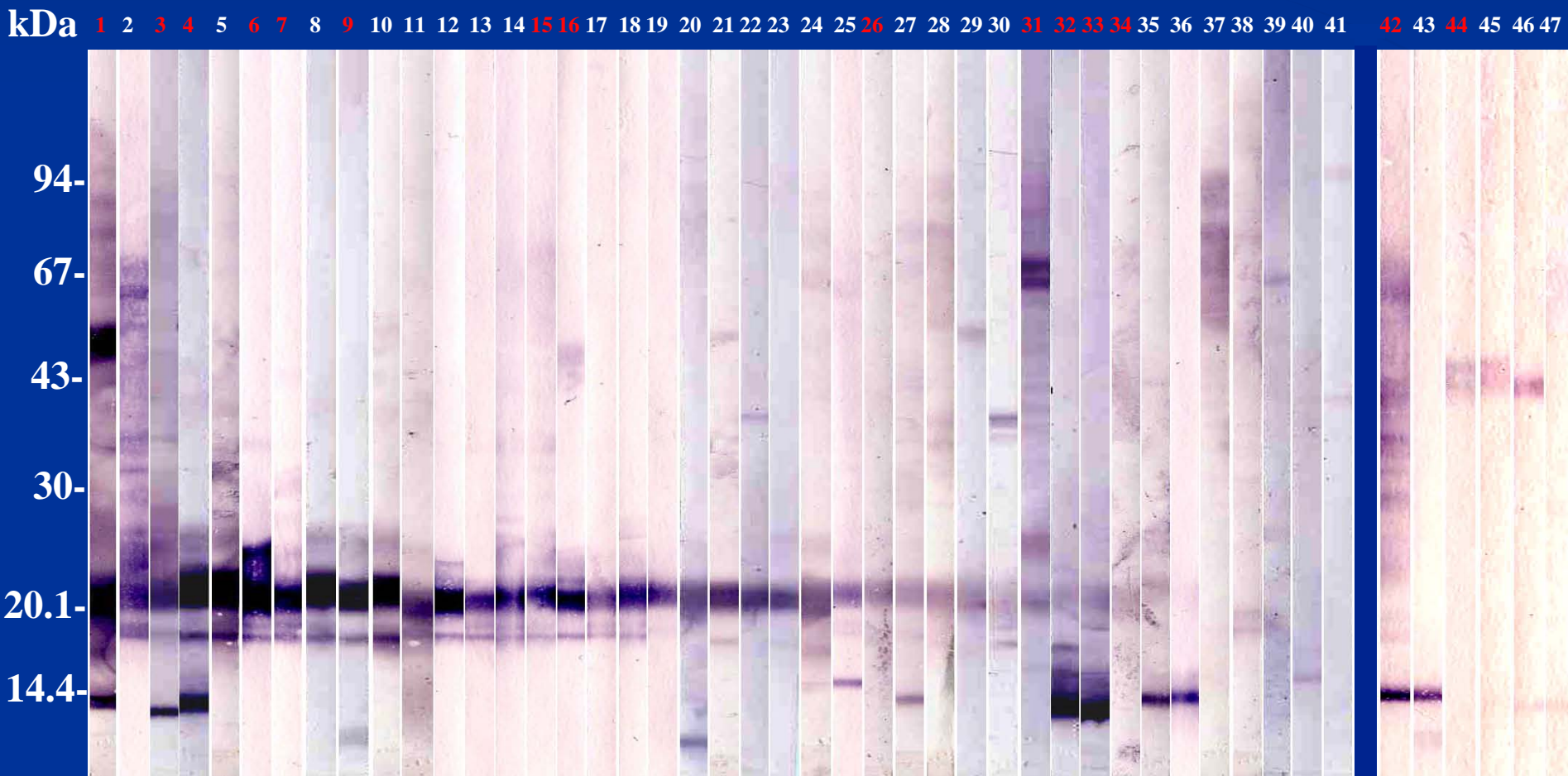


- 15 à 30% des personnes consultant en saison pollinique
- 4.4% chez les enfants (étude ISAAC)
- Rhinite, conjunctivite, **asthme** (70%)
- **Mono/poly** sensibilisation (betulaceae, ...)
- Oléacées
 - olivier (*Olea*)
 - troène (*Ligustrum*)
 - forsythia (*Forsythia*)
 - jasmin (*Jasminum*)
 - lilas (*Syringa*)
 - filaire (*Phyllirea*)
 - osmanthe (*Osmanthus*)
 - arbre de neige (*Chionanthus*)
- Largement répandu du nord au sud de l'Europe
- Pollinisation aéroportée de mars à mai



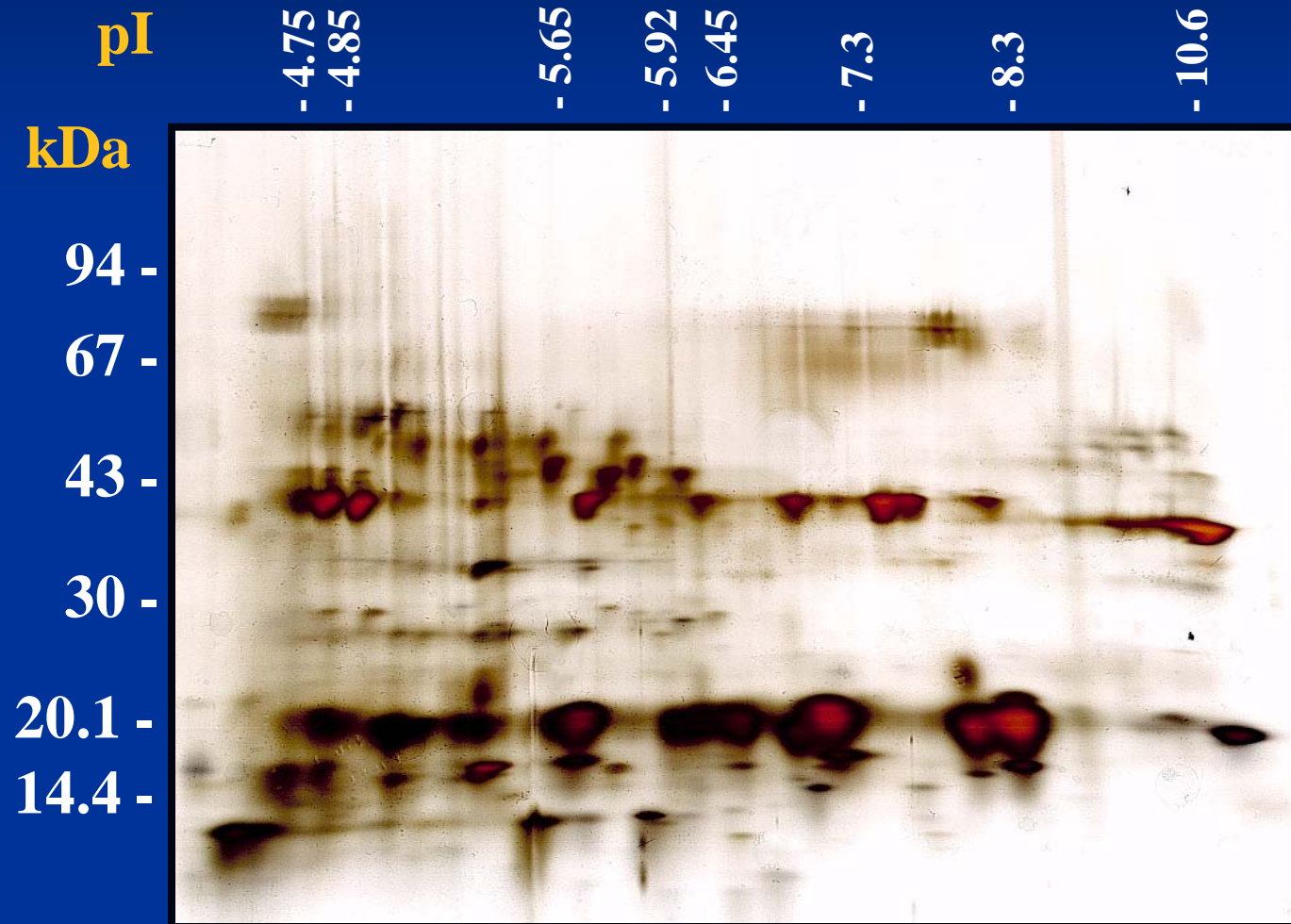
Criblage par immunoempreinte IgE

- 1 – migration en **SDS-PAGE** d'un extrait H₂O de **pollen de frêne**
- 2 – transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose
- 3 – découpe de la membrane en bandelettes et incubation de chaque bandelette avec un sérum de patient allergique
- 4 – révélation des IgE fixés sur les allergènes



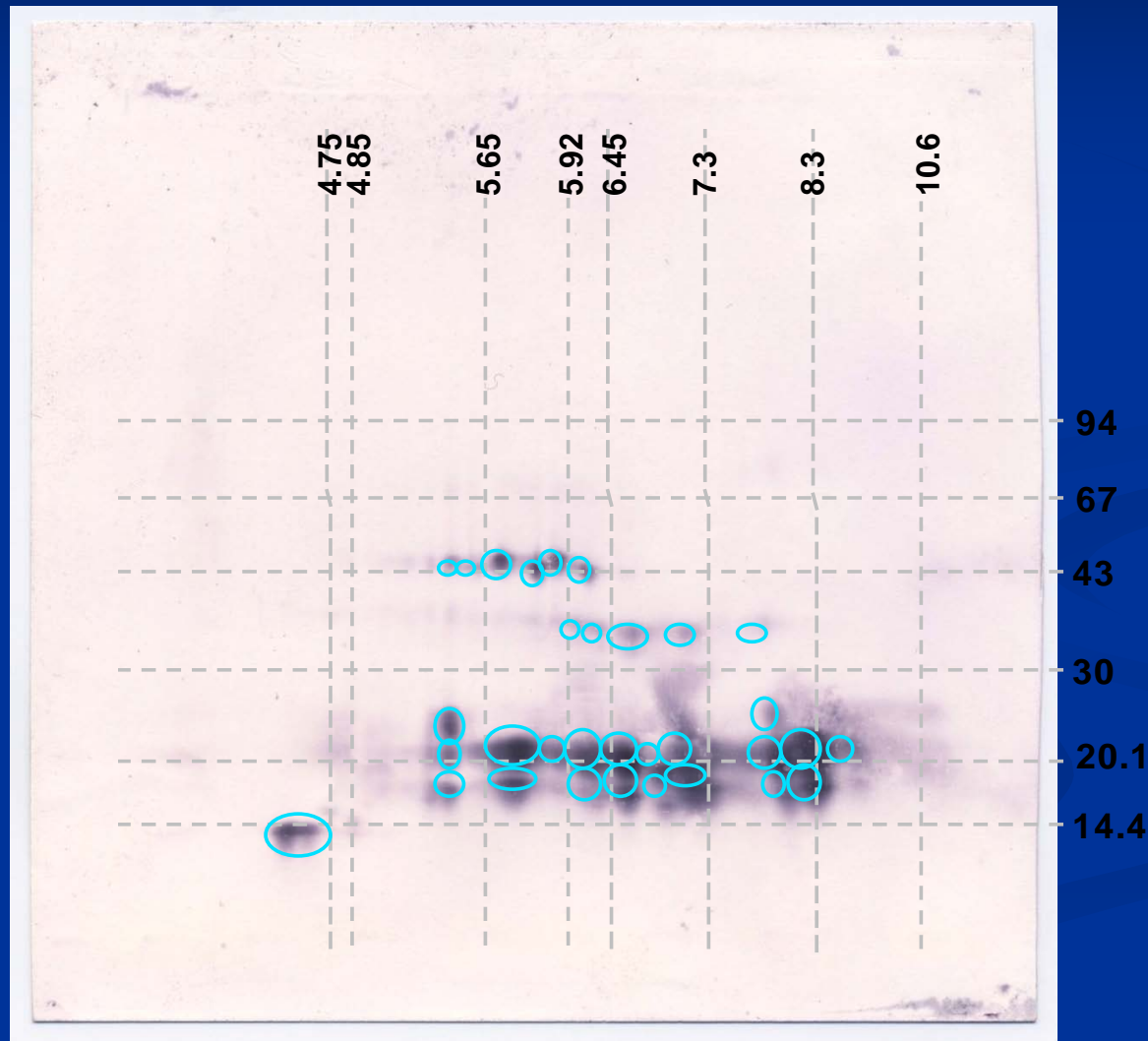
Analyse 2D d'un extrait H₂O de pollen de frêne

gel 2D coloré à l'argent



Allergènes reconnus par les IgE d'un patient allergique au pollen de frêne (N° 1)

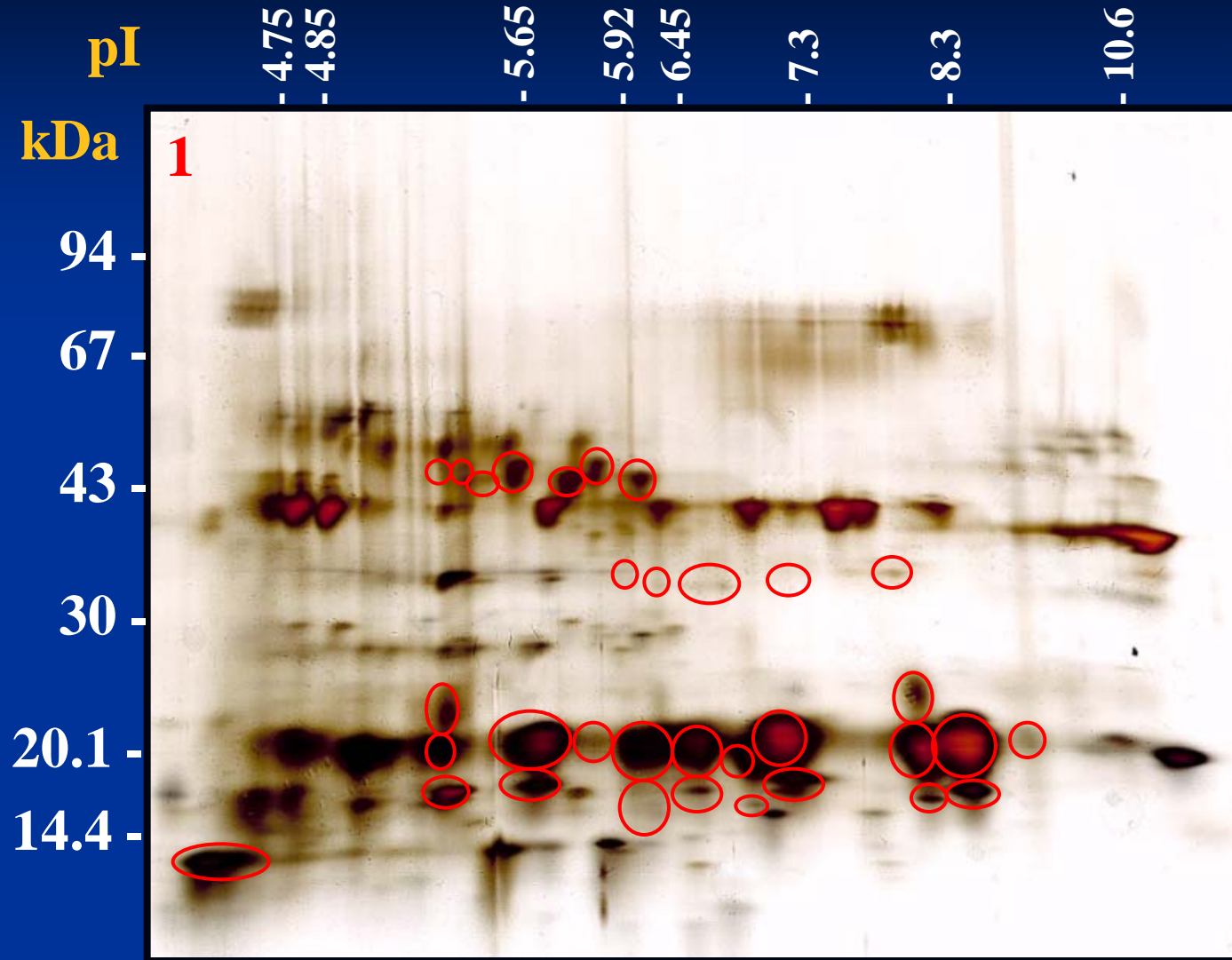
immunoempreinte IgE





Protéines reconnues par les IgE du patient N°1

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne



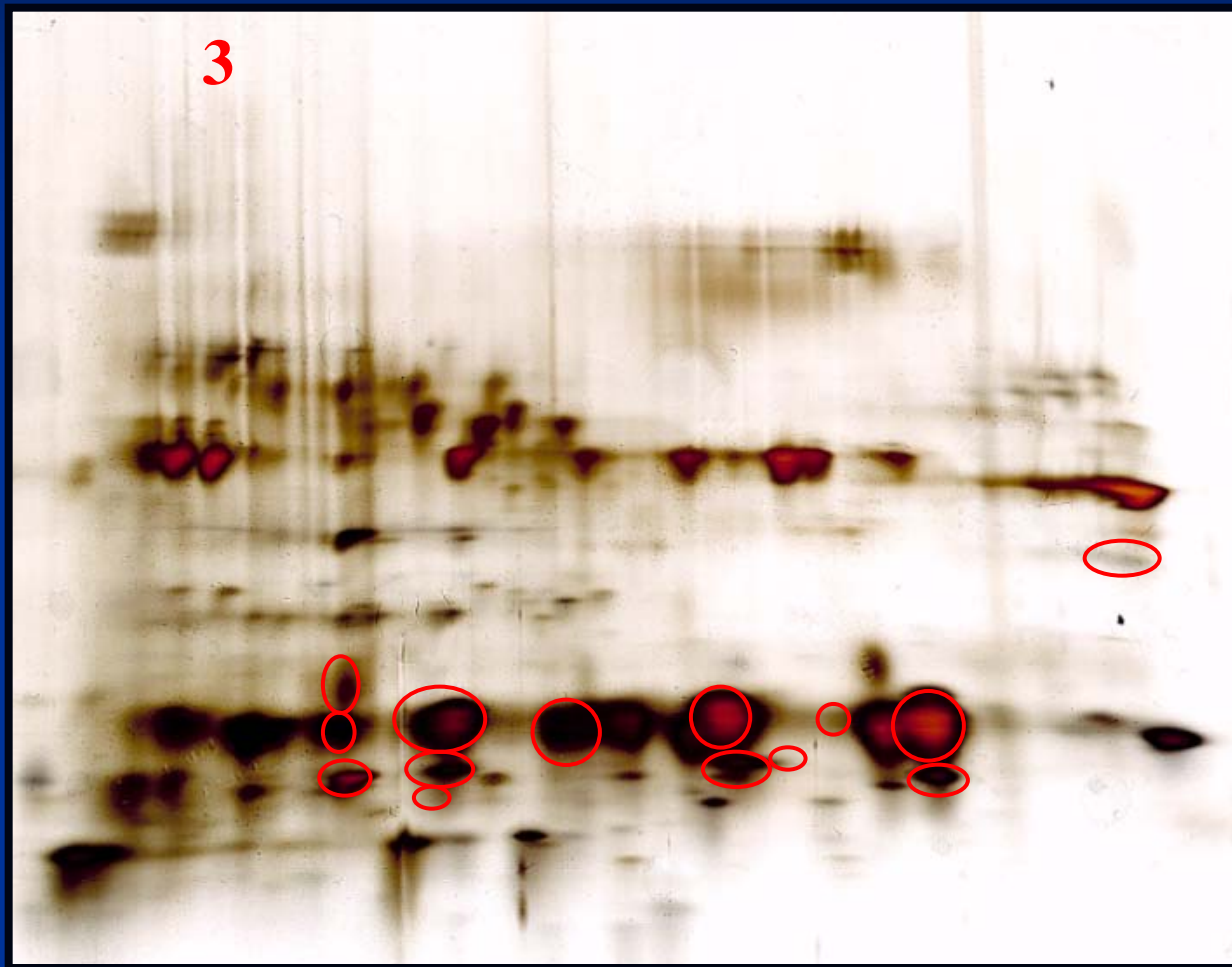
Protéines reconnues par les IgE du patient N°2

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne



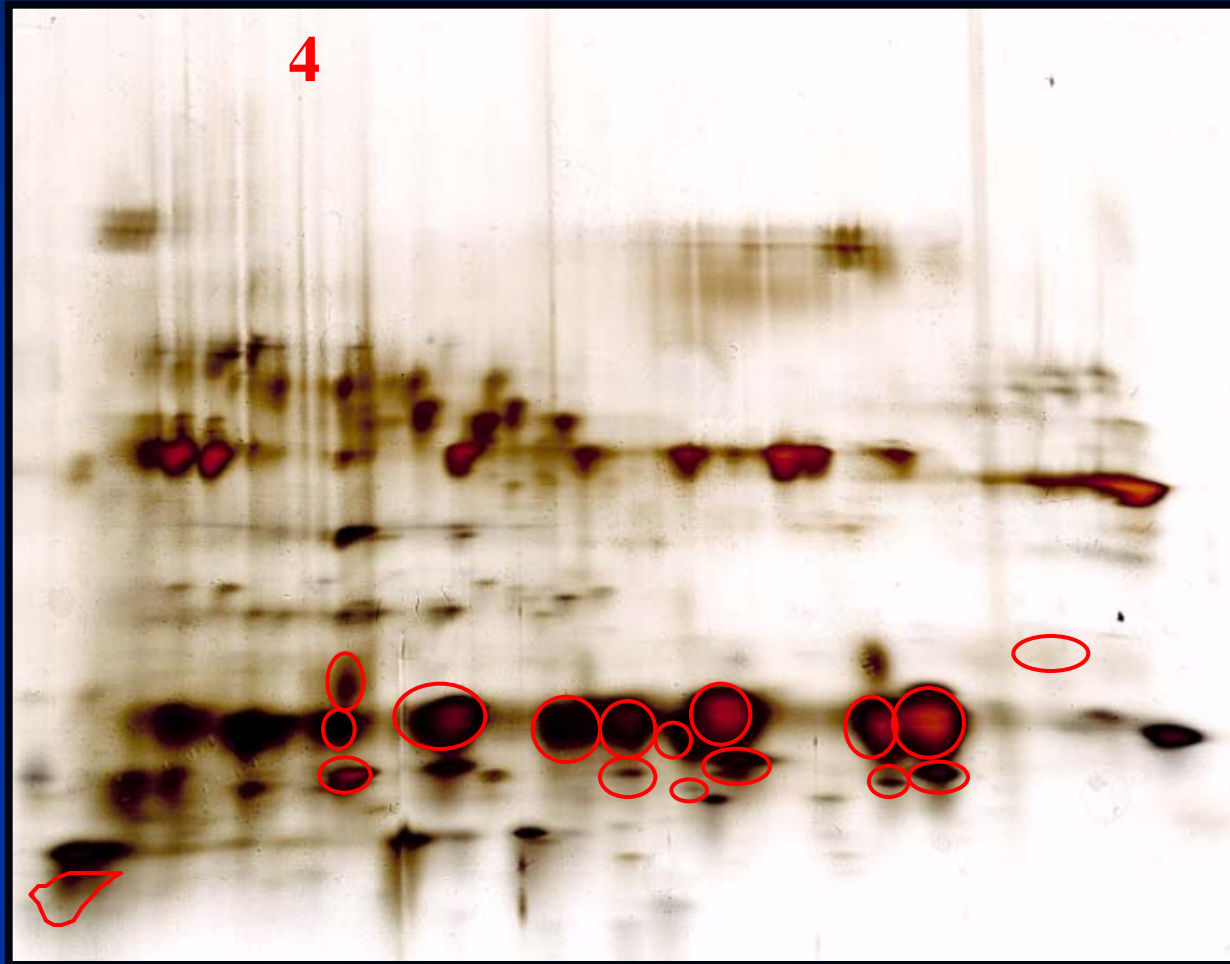
Protéines reconnues par les IgE du patient N°3

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne



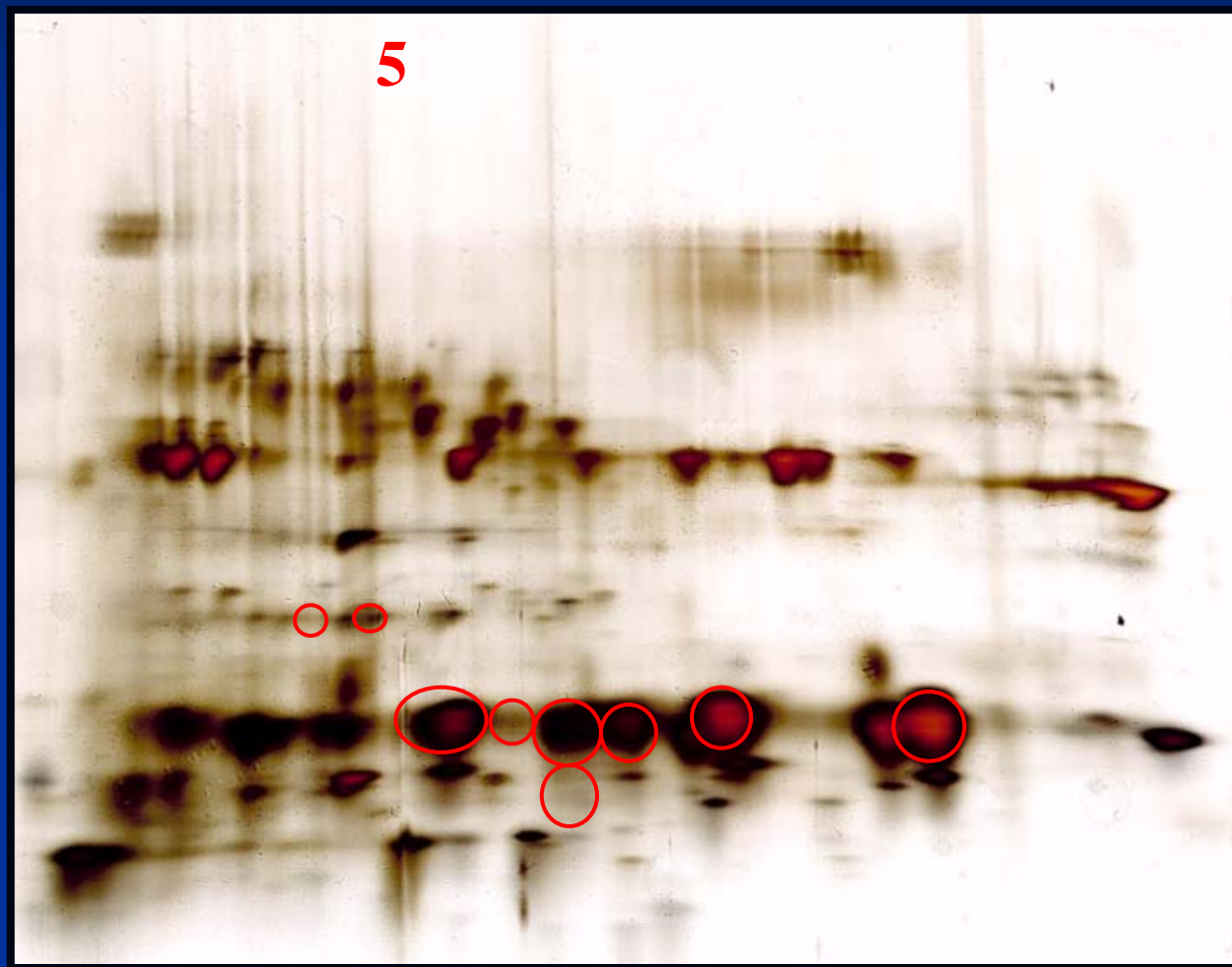
Protéines reconnues par les IgE du patient N°4

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne



Protéines reconnues par les IgE du patient N°5

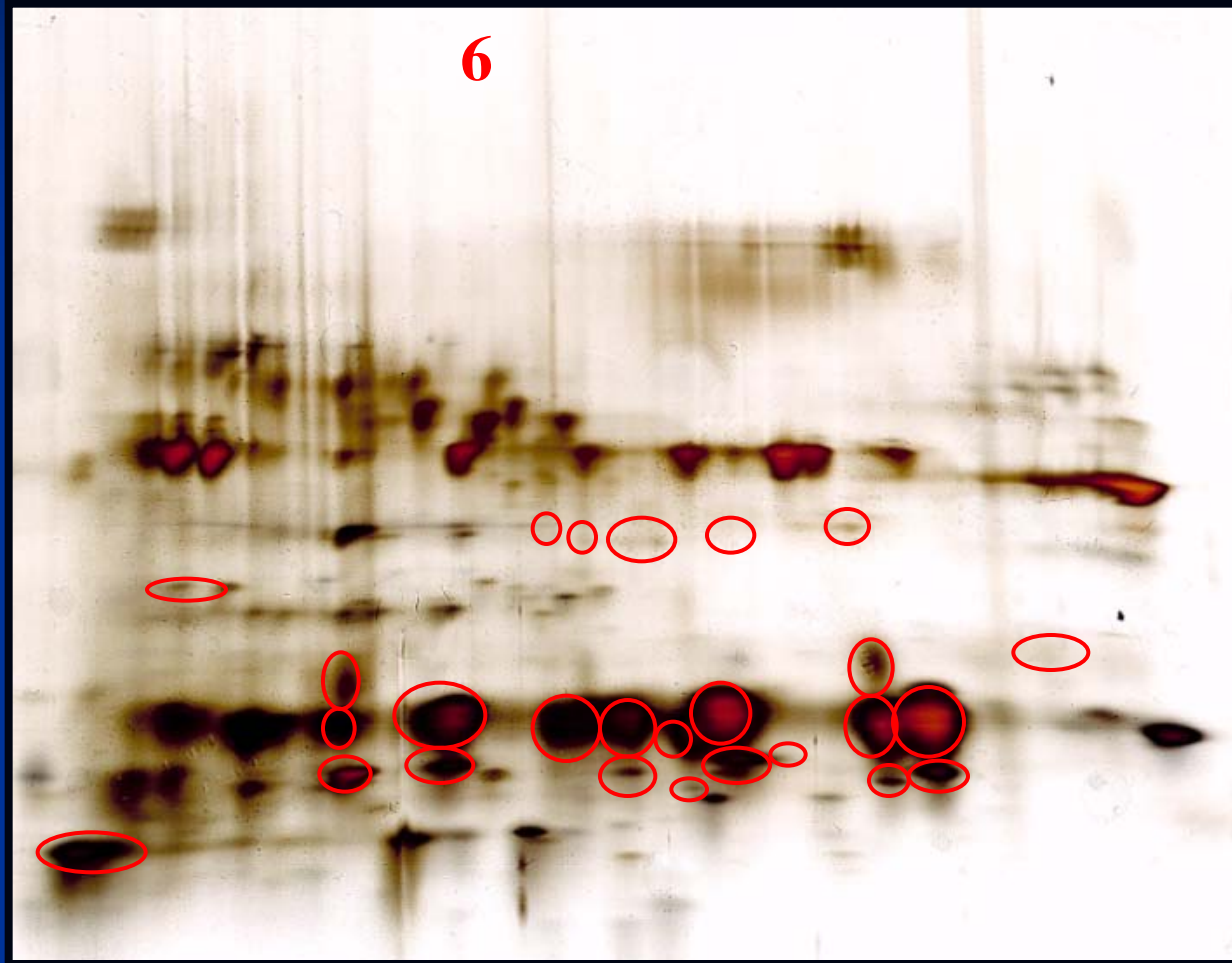
Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°6

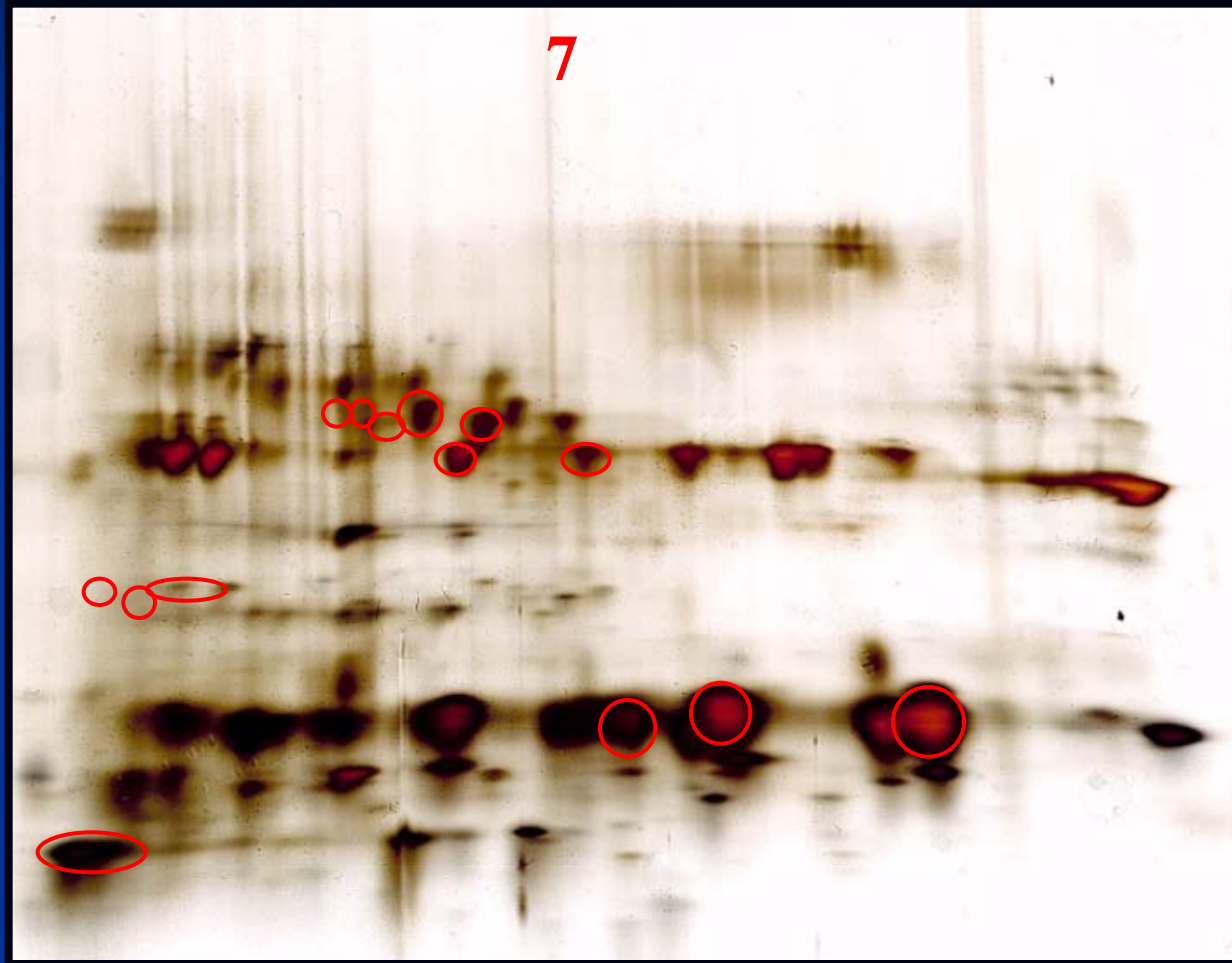
Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°7

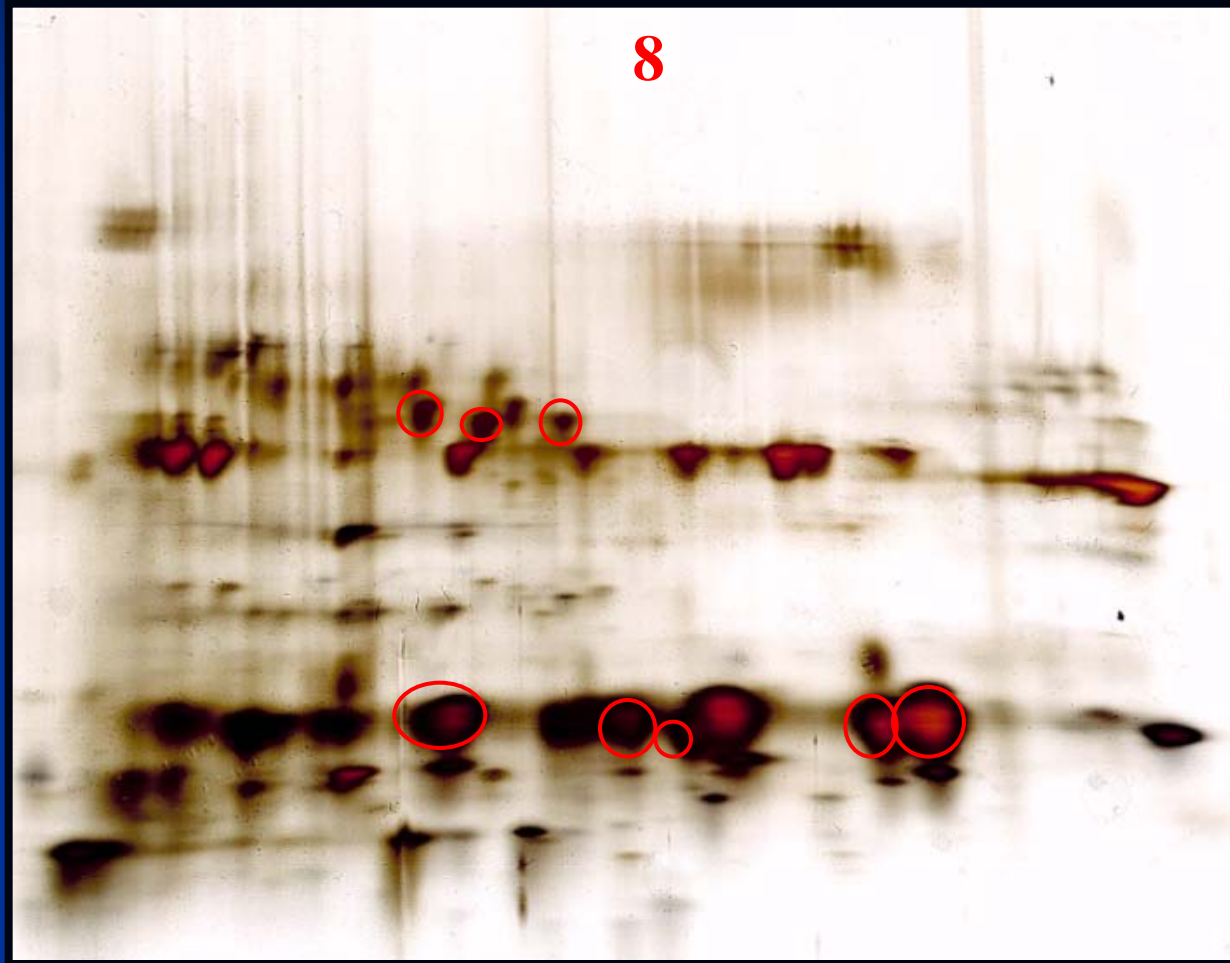
Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





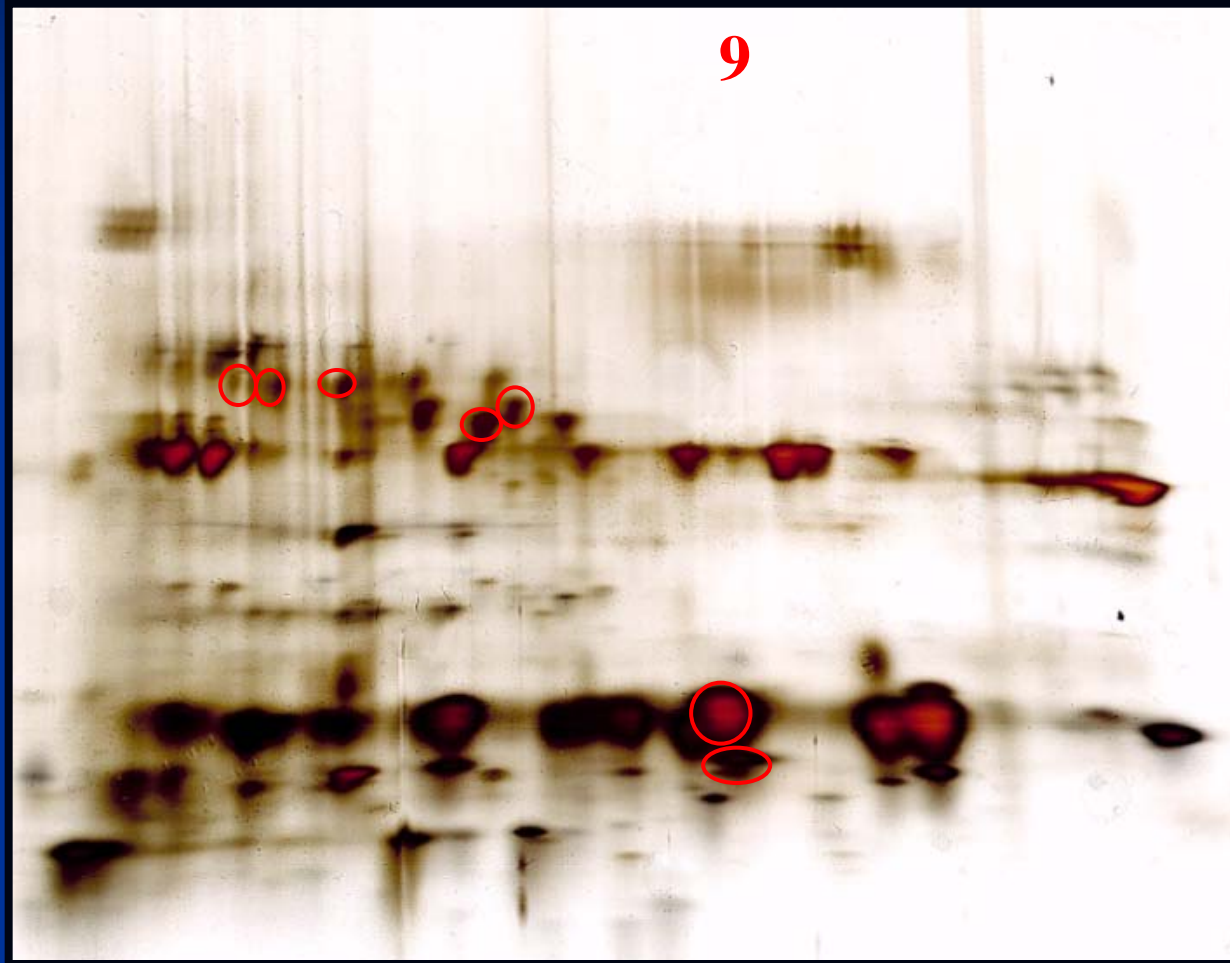
Protéines reconnues par les IgE du patient N°8

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne



Protéines reconnues par les IgE du patient N°9

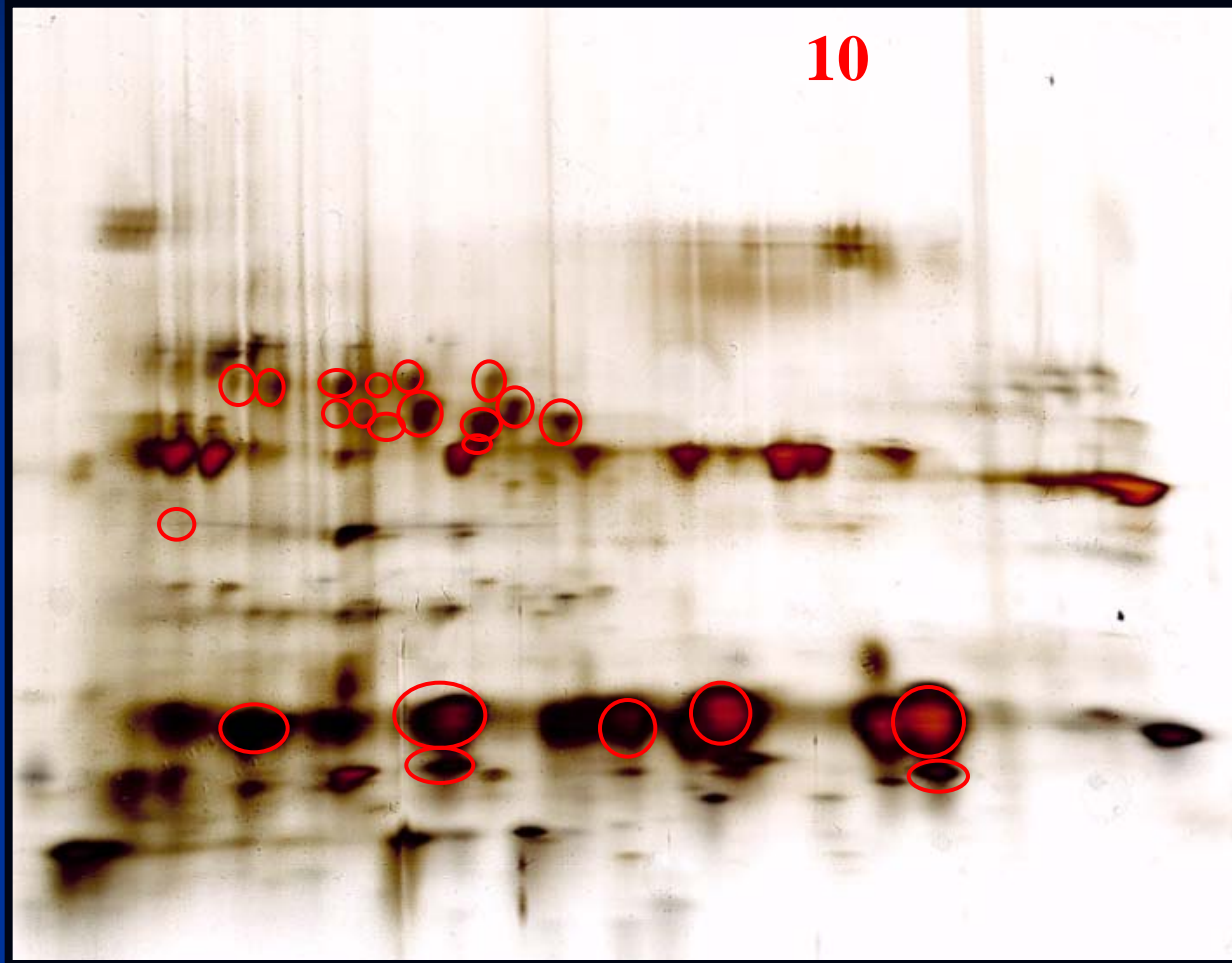
Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°10

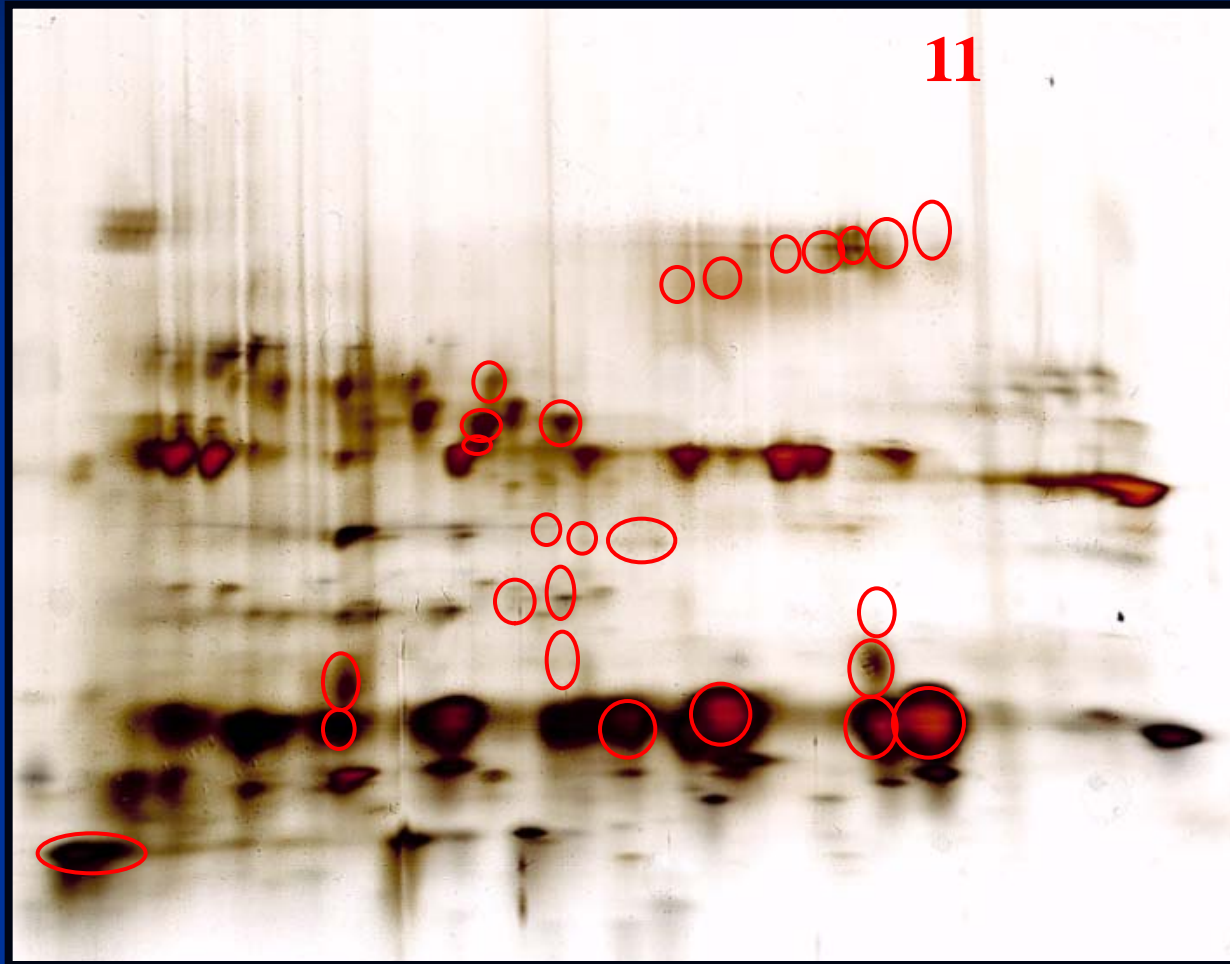
Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°11

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°12

Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°13

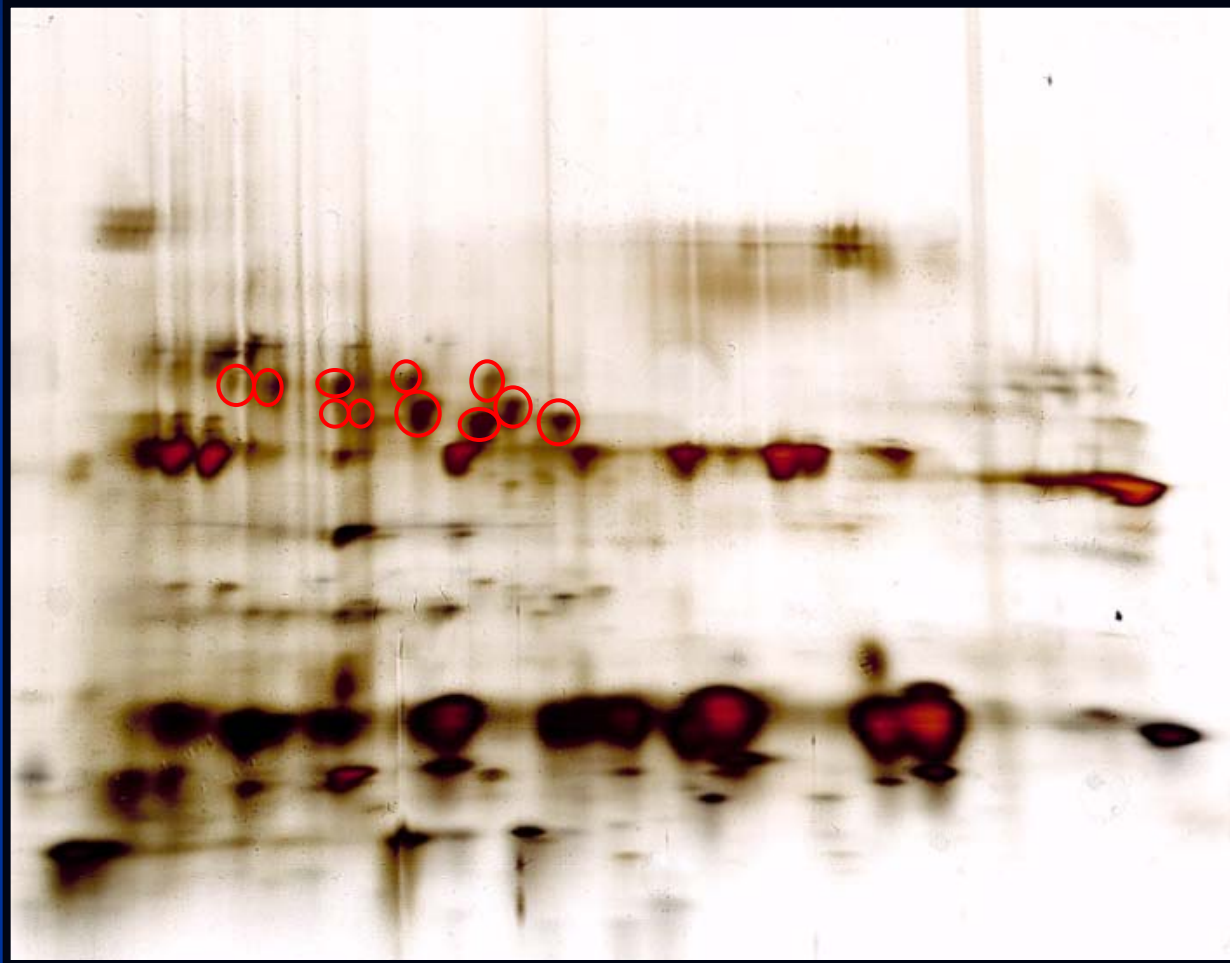
Diagnostiqué allergique au pollen de frêne





Protéines reconnues par les IgE du patient N°14

Diagnostiqué allergique au pollen de **graminées**



Protéines reconnues par les IgE du patient N°15

Diagnostiqué allergique au pollen de **graminées**





Protéines reconnues par les IgE de 13 patients

Diagnostiqués allergiques au pollen de frêne



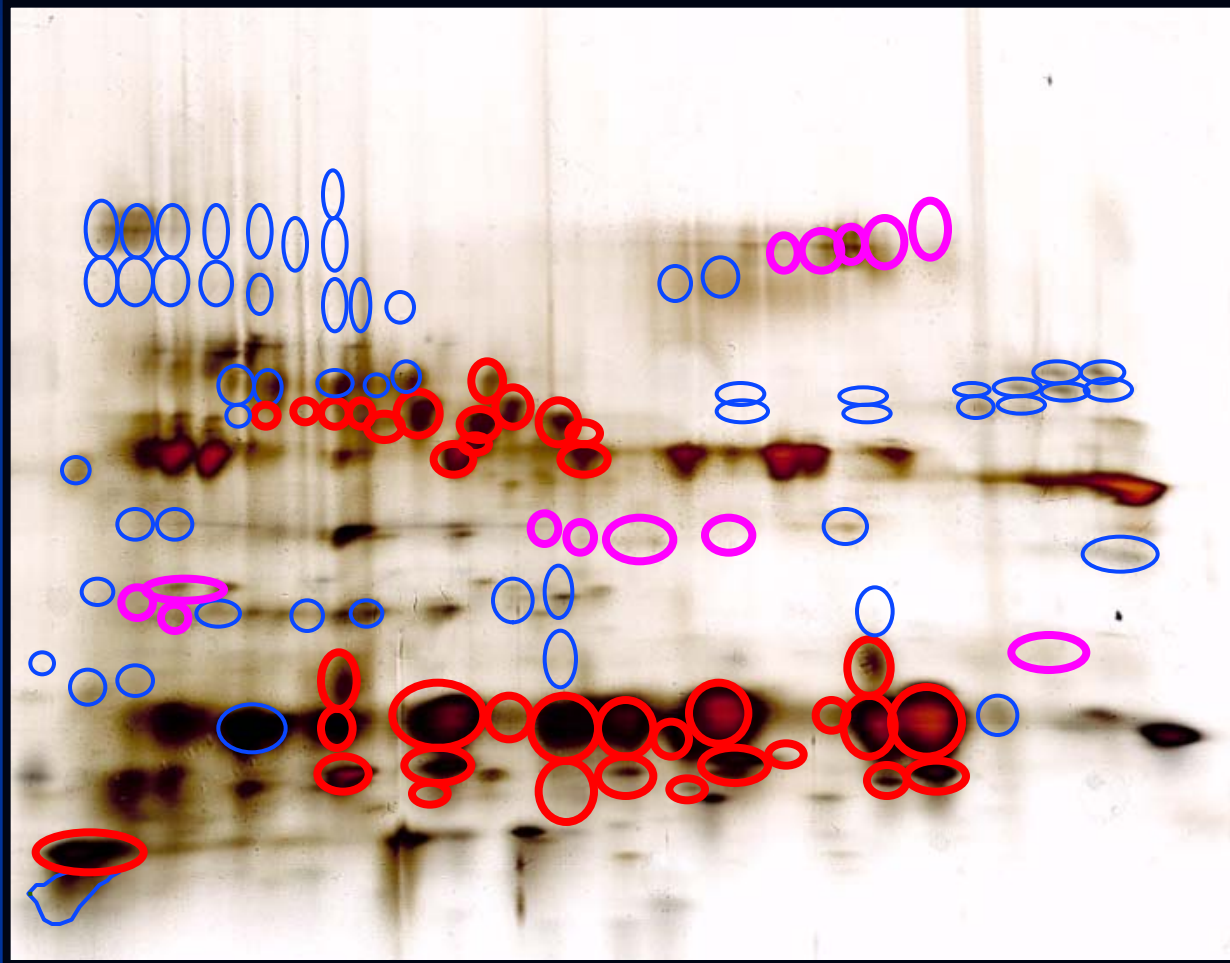
Protéines reconnues par les IgE de 13 patients

Diagnostiqués allergiques au pollen de frêne

1 patient

2 ou 3 patients

plus de 3 patients



13 patients

Allergome du pollen de frêne

Extrait hydrosoluble

Identification par la spectrométrie de masse

Malate deshydrogenase

Ascorbate reductase

Mitochondrial glycoprotein

calmoduline

Polcalcine
Fra e 3

Profiline : Fra e 2

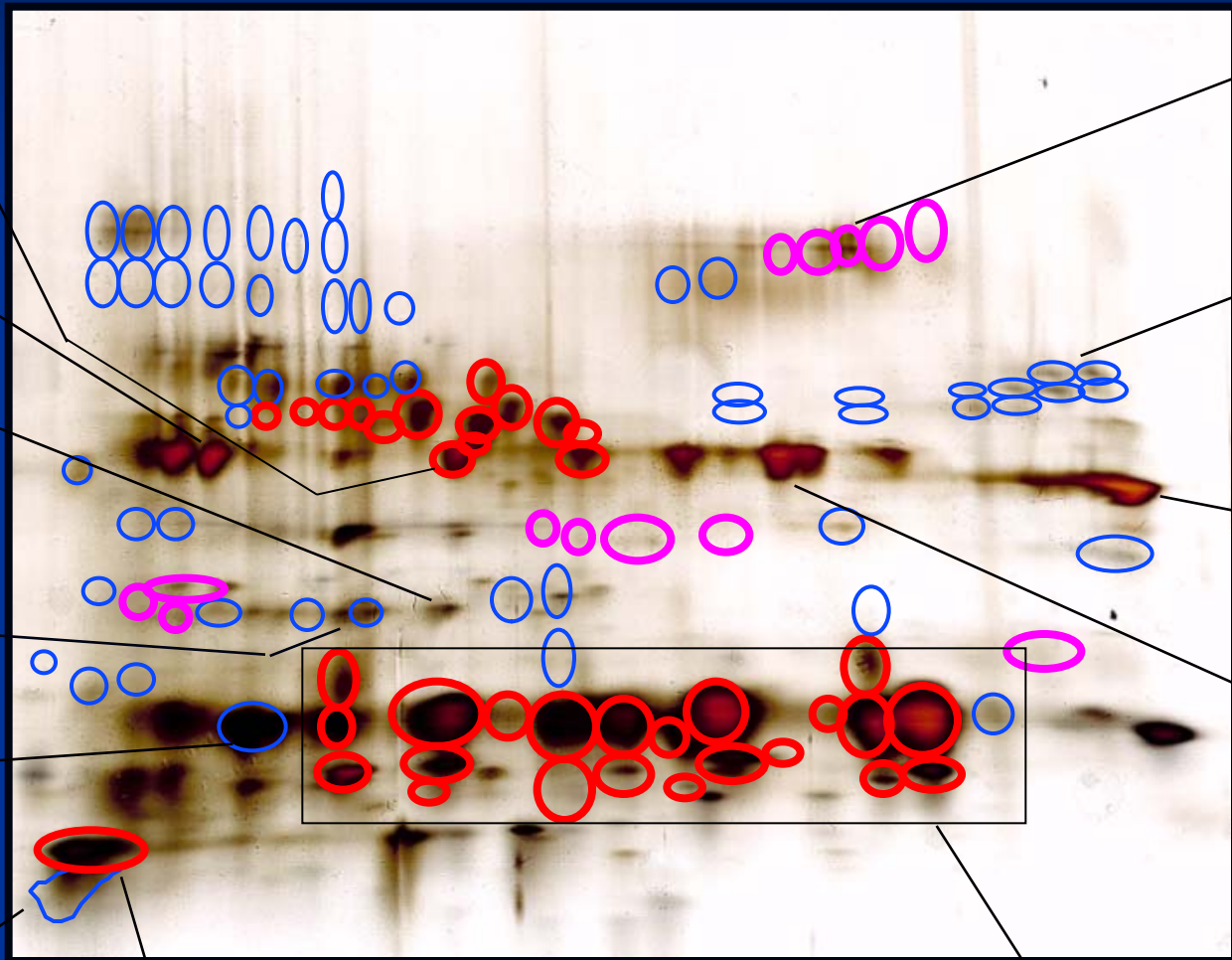
Isoformes de Fra e 1

β-galactosidase

4 spots :
Sugar Transport proteins

Pectine Methyl esterase

translocation protein



This figure is a 2D gel electrophoresis image of an allergome from Fraxinus pollen. The gel shows numerous protein spots, with several key spots identified by mass spectrometry and labeled with colored circles and arrows. The labels include: Malate deshydrogenase, Ascorbate reductase, Mitochondrial glycoprotein, calmoduline, Polcalcine (Fra e 3), Profiline (Fra e 2), Isoformes de Fra e 1, β-galactosidase, 4 spots (Sugar Transport proteins), Pectine Methyl esterase, and translocation protein. The gel is divided into lanes, and a black box highlights a cluster of red-circled spots at the bottom center.

Allergènes du pollen d'olivier



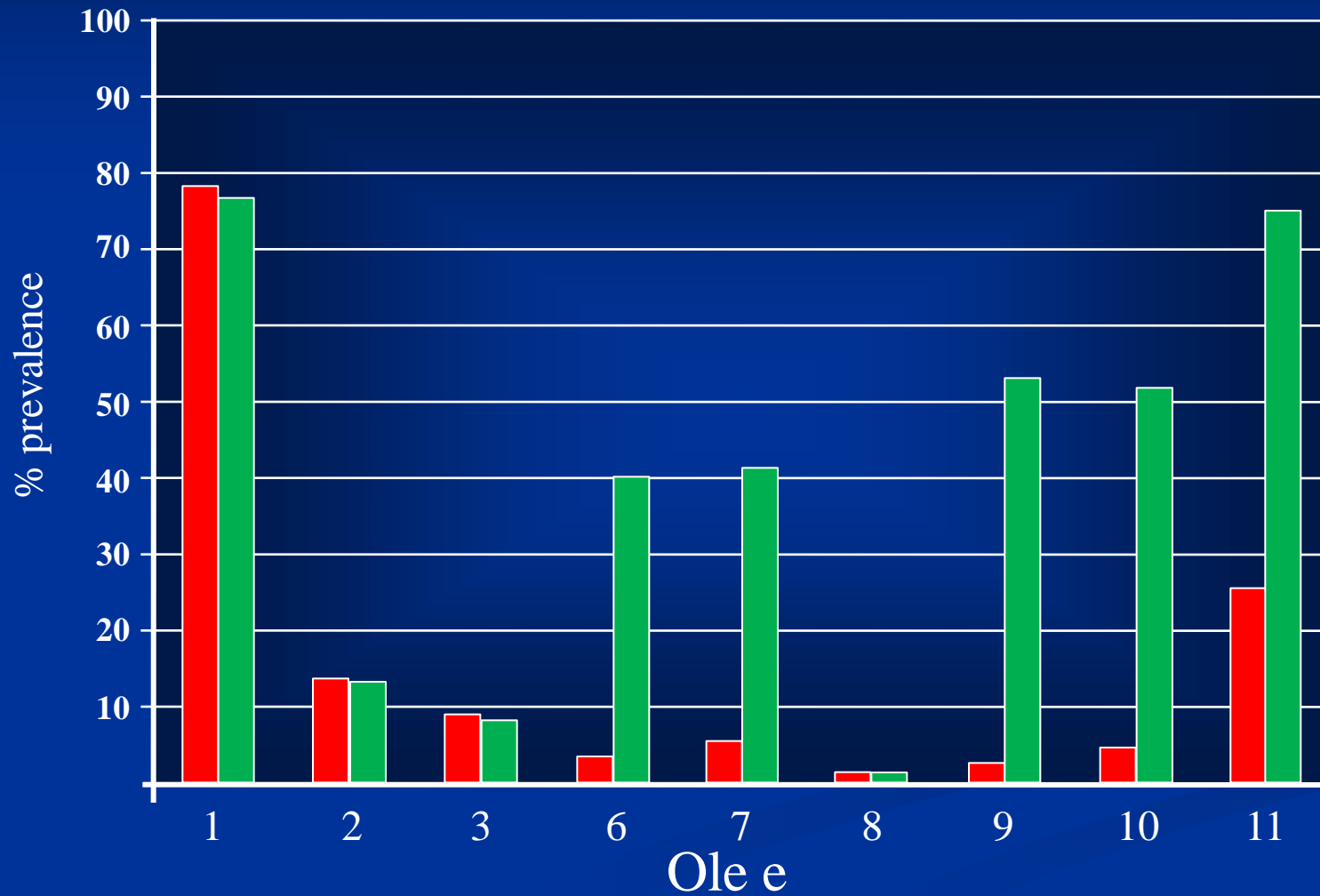
Allergènes du pollen d'olivier (sauf Ole e13)

(Rodriguez *et al.*, 2001, 2007; Barral *et al.*, 2004; Villalba *et al.*, 2013)

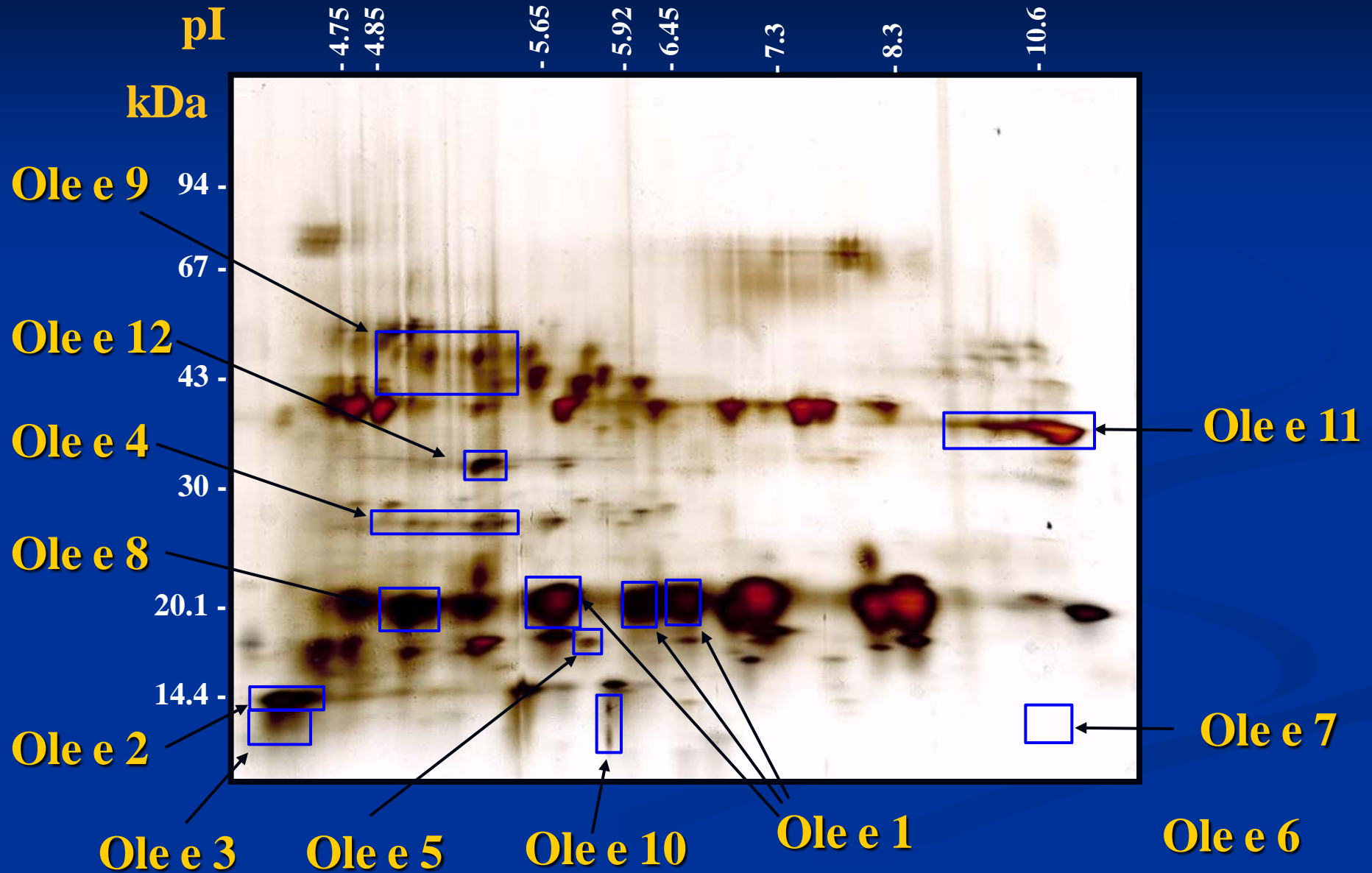
Allergène	Mr	pI	Famille de protéine
Ole e 1	20-24	5,5-6,5	<i>(hydratation durant la germination)</i>
Ole e 2	14-18	5,1	Profiline
Ole e 3	9,2	4,3	Polcalcine (2 régions de fixation au Ca ²⁺)
Ole e 4	32	4,6-5,1	<i>(produit de dégradation d'Ole e 9 ?)</i>
Ole e 5	16	5,1-6,5	Superoxide dismutase (Cu/Zn)
Ole e 6	10 (5.5)	4,2	<i>Protéine enrichie en cystéines</i>
Ole e 7	9,9-10,3	>9	Protéine de transfert lipidique (LTP)
Ole e 8	18,8-21	4,5	Calmoduline (4 régions de fixation au Ca ²⁺)
Ole e 9	46,4	4,8-5,4	β 1,3-glucanase
Ole e 10	10,8	5.8	CBM-43 (lectine)
Ole e 11	39,6	6,3-9,3	Pectine méthyl-esterase
Ole e 12	33,9	4,8-5,7	Isoflavone réductase
Ole e 13	23	4,3-4,8	Protéine thaumatin-like

Prévalence des différents allergènes du pollen d'olivier

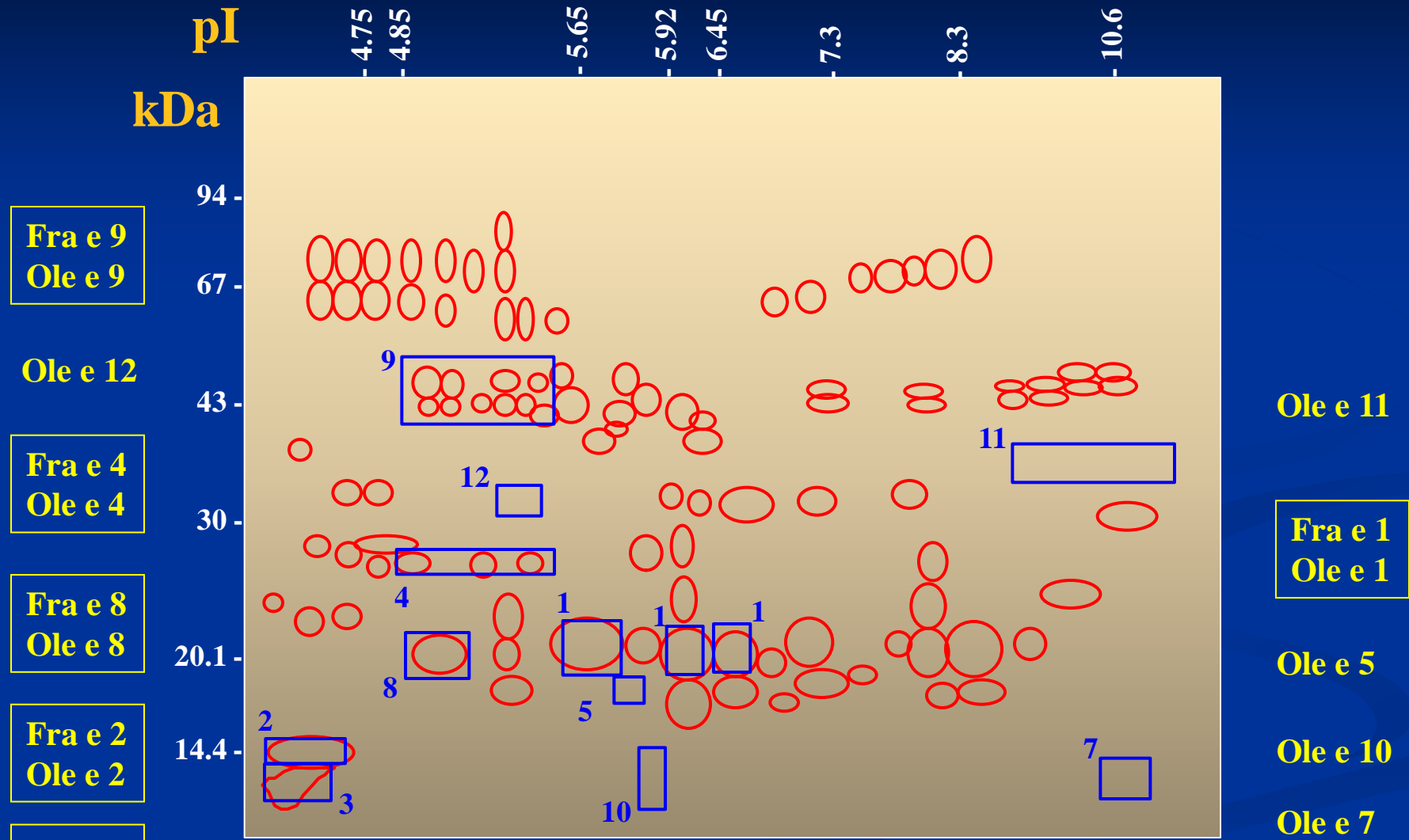
niveau de grains de pollen en saison: faible (Madrid) ■
très fort (Jaén) ■



Allergome du pollen d'olivier



Allergome comparatif frêne/olivier



Frêne: approche analytique immunoprotéomique

Olivier: approche préparative biochimique et de biologie moléculaire

CONCLUSIONS

POLLEN DE FRÊNE

Approche analytique allergomique

Avantage : **répertoire complet** des allergènes du pollen. Possibilité d'analyser tous les allergènes (hydrosolubles et non hydrosolubles suivant les solvants utilisés pour faire l'extrait)

Inconvénient : difficulté pour caractériser biochimiquement, immunologiquement et structuralement les allergènes pondéralement minoritaires.

→ solution « Proteominer »

POLLEN D'OLIVIER

Approche préparative (natif et recombinant)

Avantage: protéine et gène codant en quantité non limitante pour des caractérisations moléculaires plus poussées et pour produire des mutants d'intérêt immunothérapeutique.

Inconvénient: faible nombre d'allergène caractérisé → **répertoire incomplet**

Yggdrasil
Grand Frêne
Cosmique

REMERCIEMENTS

Charpente des neufs
mondes dans la
mythologie nordique

Allergie & Environnement, Paris

Hélène SENECHAL
Jean-Pierre SUTRA
Andrea BRAZDOVA
Olga RIVERA
Gabriel PELTRE

HUS, Strasbourg
Ashok PUROHIT
Gabrielle PAULI

INRA, Versailles
Gilles CLEMENT

CEA-DSV, Saclay
Jean-Michel WAL

