

Complexité allergénique & Challenges de la production des extraits de pollens de Cupressacées

Virginie Leduc, ALK

JES - RNSA, Bordeaux, 22-23 novembre 2018

Phylogénie Ordre des Pinales



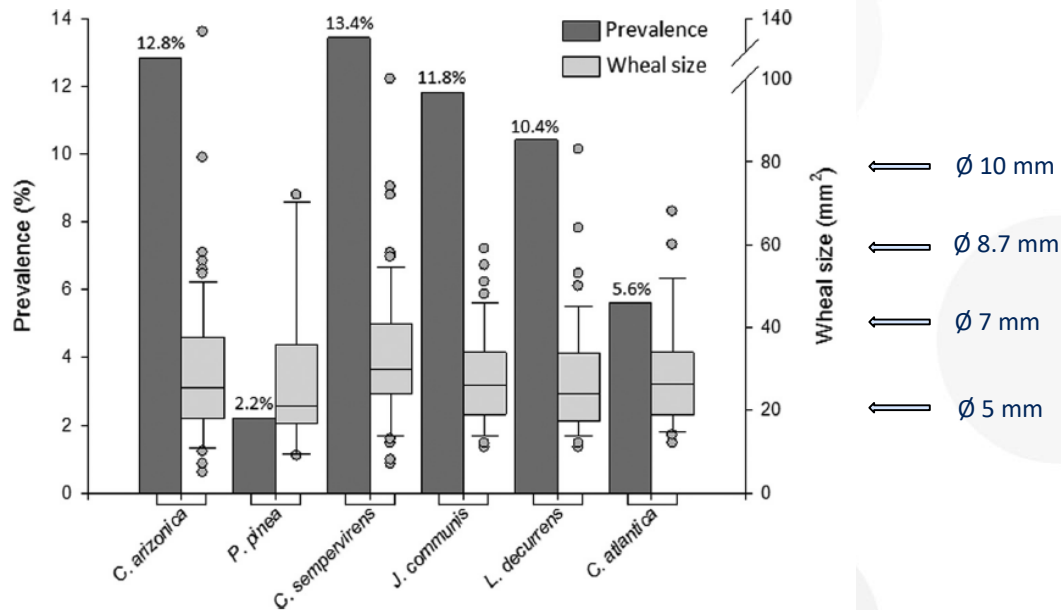
Prévalence de la sensibilisation aux pollens de conifères / région à forte exposition aux cyprès (Madrid)

Dominguez-Ortega, Allergy Rhinol 2016

499 patients testés SPT

70 SPT positif à au moins un pollen de :

- *Cupressus arizonica*
- *Pinus picea*
- *Cupressus sempervirens*
- *Juniperus communis*
- "*Libocedrus*" *decurrans* (= *Calocedrus*) = cèdre à encens
- *Cedrus atlantica* = cèdre de l'Atlas



Diversité allergénique des Cupressacées

- | | | | |
|--|--------|---------------------------|---------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pectate lyase - groupe 1 <ul style="list-style-type: none"> • Impliqué dans la dégradation de la pectine • Rôle dans l'élongation du tube pollinique | 45 kDa | Cup s 1, Cup a 1, Jun a 1 | Cry j 1 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Polygalacturonase – groupe 2 <ul style="list-style-type: none"> • Impliqué dans la dégradation de la pectine • Rôle dans l'élongation du tube pollinique | 45 kDa | Cup s 2, Cup a 2, Jun a 2 | Cry j 2 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Thaumatin- like protein – groupe 3 <ul style="list-style-type: none"> • Pathogenesis –related protein (PR-5) • Réponse anti-fongique | 28 kDa | Cup s 3, Cup a 3, Jun a 3 | Cry j 3 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Polcalcine & profiline – groupes 4 et 8 = polcalcine et profiline - Cup a 4, Cup s 8 • Bd 14kDa = snakin = famille de Pru p 7 (peamaclein) = peptide anti-microbien • <i>Cryptomeria japonica (genomic)</i>: IFR, Chitinase, LTP, Aspartic protease... | | | Cry j 4 |

Homologies de sequences des principaux allergènes

Pollen	Allergène	Séquence	% Identité avec	Allergène	Séquence	% Identité avec	Allergène	Séquence	% Identité avec
	Pectate lyase	UNIPROT	Cup s 1	polygalacturonase	UNIPROT	Cup a 2	thaumatin-like protein	UNIPROT	Cup s 3
Nbre Acides Aminés	367 aa			384 aa			198 aa		
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cup s 1	Q9M4S5	100%	Cup s 2	absent des bases de données		Cup s 3	Q69CS2	100%
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cup s 1	Q9M4S2	98%				Cup s 3	Q69CS3	98%
<i>Cupressus arizonica</i>	Cup a 1	Q93XL6	94%	Cup a 2	A0T2M4	100%	Cup a 3	Q9FY35	97%
<i>Juniperus ashei</i>	Jun a 1	P81294	96%	Jun a 2	Q9FY19	93%	Jun a 3	P81295	96%
<i>Cryptomeria japonica</i>	Cry j 1	P18632	78%	Cry j 2	P42212	71%	Cry j 3	A4PBQ1	86%
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 1	P27759	40%						

0% 20% 40% 60% 80% 100%

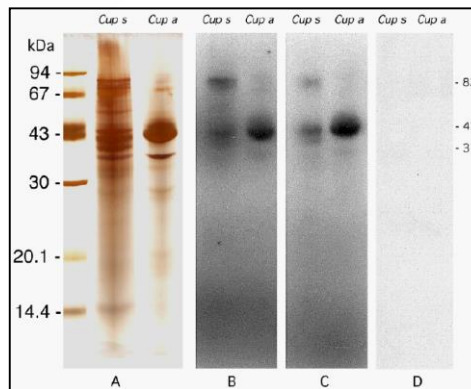
0% 20% 40% 60% 80% 100%

0% 20% 40% 60% 80% 100%

% d'identité de séquence entre les allergènes homologues de quatre cupressacées et de la pectate lyase d'Amb a 1.
 Lorsque plusieurs isoformes sont décrites, l'isoforme la plus divergente est ajoutée à l'analyse.

ALLERGIE AU POLLEN DE CYPRES :
PREPARATION D'UN EXTRAIT DE RÉFÉRENCE
ET STANDARDISATION *IN VIVO*

V. Leduc ⁽¹⁾, D. Charpin ⁽²⁾, C. Aparicio ⁽¹⁾, C. Veber ⁽¹⁾, L. Guérin ⁽¹⁾



Standardisation *in vivo*

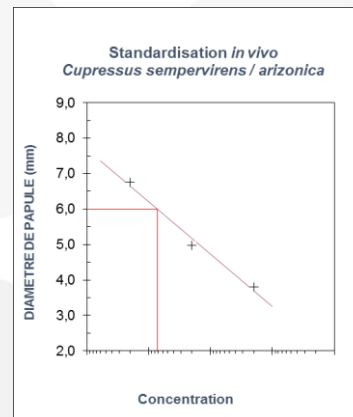
Centre : Marseille, Pr. Charpin, 1998

- Etude *in vivo* constituée du mélange de 2 PRI
 - *Cupressus sempervirens*
 - *Cupressus arizonica*
- Trois concentrations testées en SPT
- SM – SM/10 – SM/100
- Quadruplicate
- Témoin positif “Phosphate de codéine”
- Total de 44 patients testés – population généralement sensibilisée aux pollens de cyprès
 - pas de critère quantitatifs d'IgE
 - pas de critère de taille de papule lors du recrutement
- Mesure des diamètres des papules
- Pas de dermographisme – témoin négatif = 0
- → 25 patients analysés
- Moyenne géométrique
- Détermination de l'IR = équivaut à la papule papule moyenne du témoin positif (PC) (5,82 mm soit 6 mm)

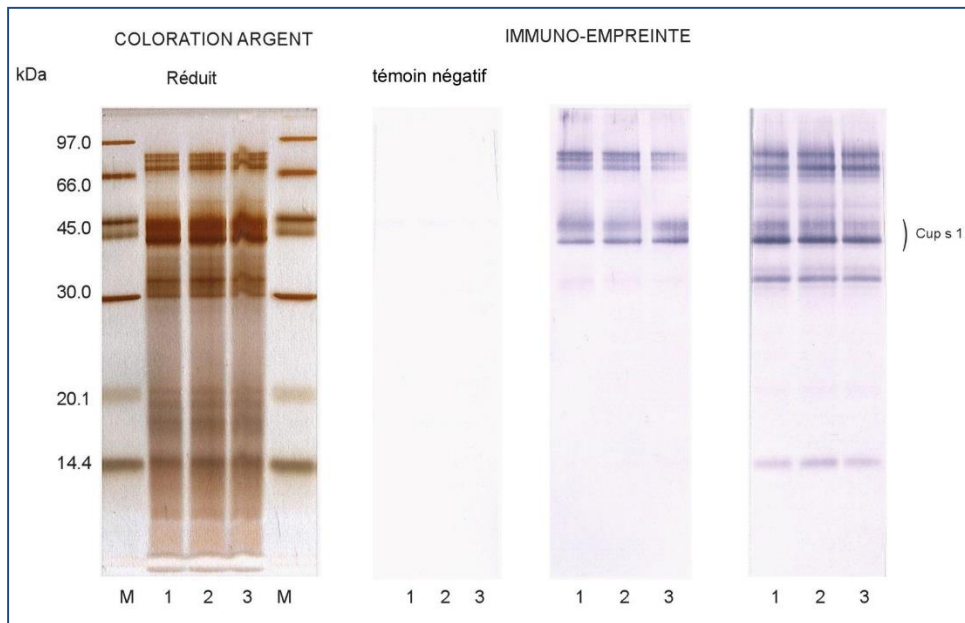
Constitution d'un pool de sérums

PRIMARY POOL of SERUM = PPS Cupressaceae	
<i>In vivo study</i>	<i>Cupressus sempervirens - Cupressus arizonica pollen</i>

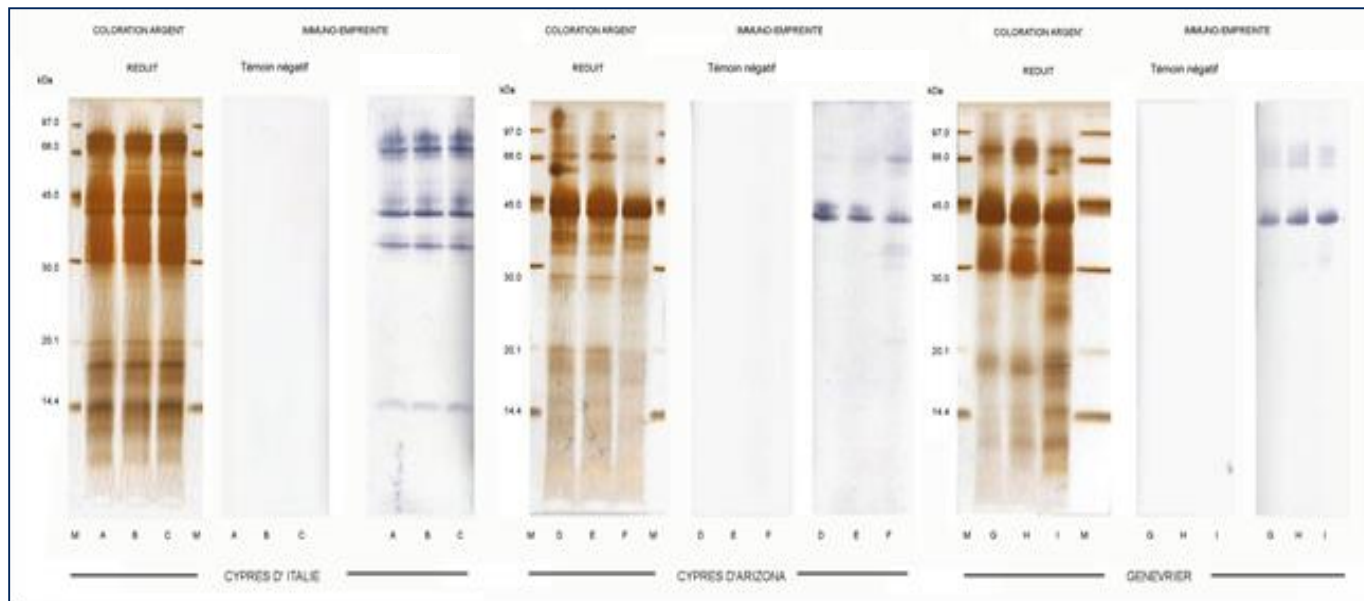
IgE specificity	
	PPS Cupressaceae
ImmunoCAP	kUI/L
Extracts	
Cupressus sempervirens t23	3,0
Juniperus sabinoides (ashei) t6	14,4
Molecular allergens	
Cup a 1 t226	20,6
Carbohydrate structure	
CCD MUXF3 Ro214	0,31



Allergenic profile of *Cupressus sempervirens* pollen extracts.



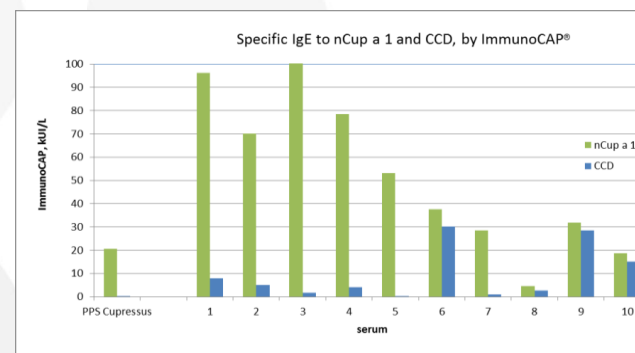
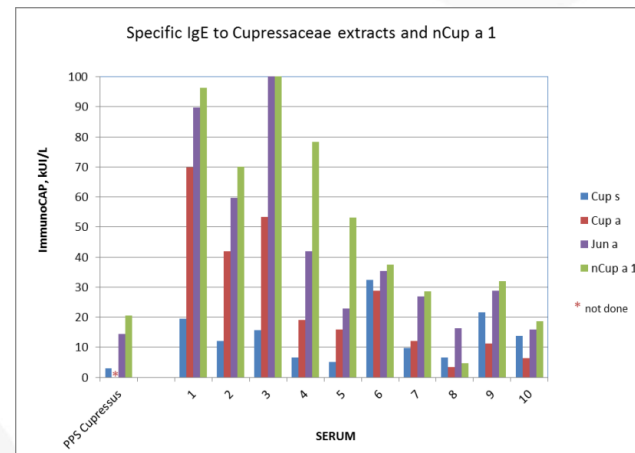
Allergenic profiles of *Cupressus sempervirens*, *C. arizonica* and *Juniperus ashei*.



Outils de caractérisation des allergènes

- 10 serums humains IgE

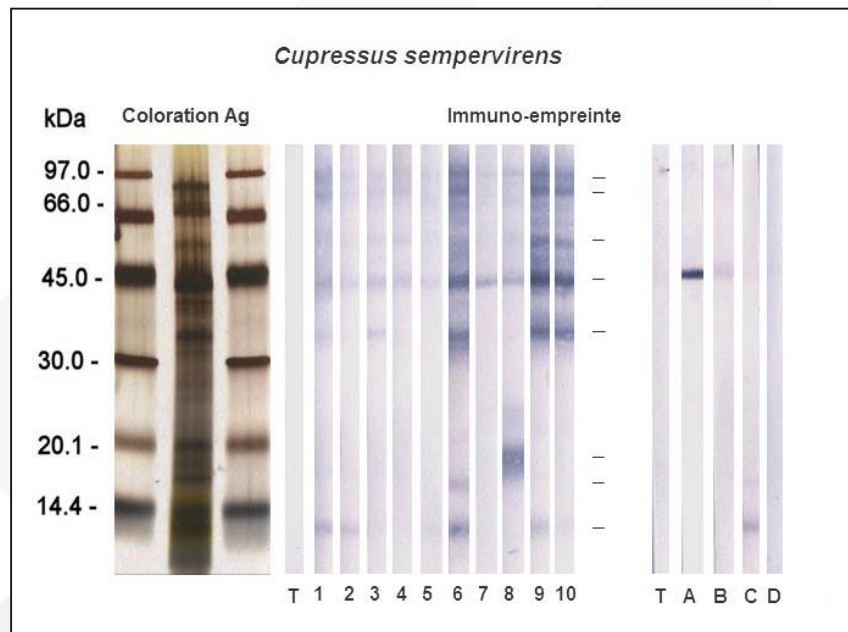
Serum ID	ImmunoCAP					
	ISAC	t23	t222	t6	t226	o214
	ISU/L	kUI/L				
	nCup a 1	Cup s	Cup a	Jun a	nCup a 1	CCD
PPS Cupressus	ND	3,0	ND	14,4	20,6	0,31
1	92	19,40	69,90	89,70	96,20	7,90
2	68	12,00	42,00	59,80	70,10	5,00
3	54	15,60	53,30	101,00	101,00	1,81
4	28	6,50	19,00	42,00	78,40	4,19
5	21	5,18	15,90	22,80	53,20	0,24
6	19	32,50	28,80	35,40	37,50	30,30
7	12	9,81	12,10	27,00	28,60	1,10
8	11	6,52	3,35	16,30	4,69	2,70
9	6	21,70	11,30	28,80	31,90	28,60
10	6	13,70	6,35	15,80	18,70	15,10



Profils allergéniques

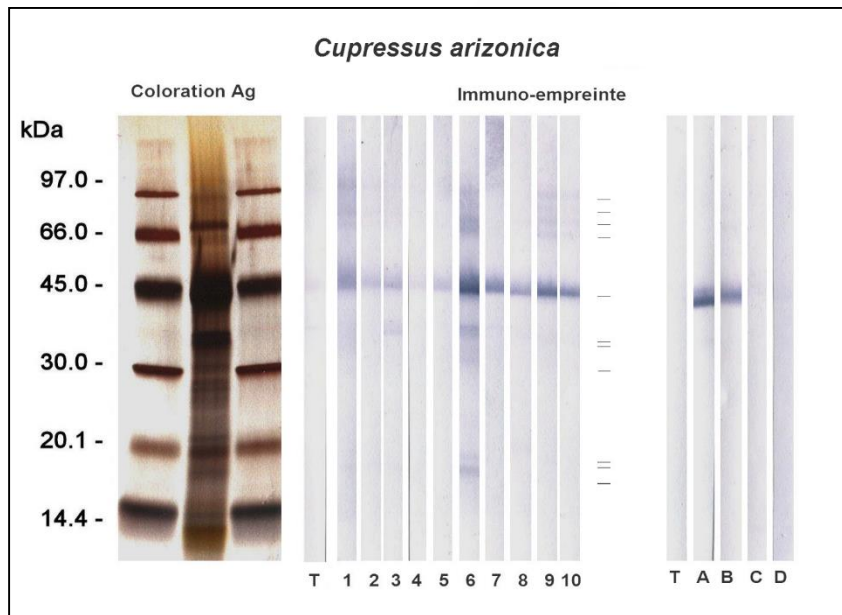
Cupressus sempervirens

- 10 sérums humains
- Anticorps spécifiques
 - A : anti-groupe 1
 - B : anti-groupe 2
 - C : anti-profiline
 - D : anti-Jun a 3

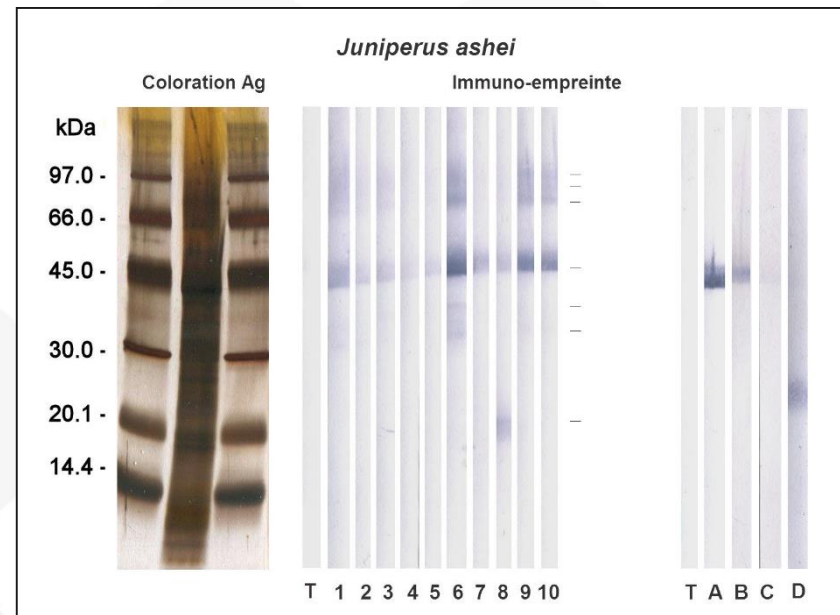


Profils allergéniques

Cupressus arizonica



Juniperus ashei



Impacts des CCD ?

Iacovacci, CEA, 2002

nCup a 1 (CCD) comparé à rCup a 1 (no CCD) et à nCup a 1 déglycosylé

Table 2. IgE reactivity by immunoblotting (OD obtained by densitometric analysis) and direct ELISA (OD₄₉₀). The sera were tested with the nCup a 1, the rCup a 1.02 and the nCup a 1 deglycosylated (nCup a 1 deg)

Sera number	Immunoblotting nCup a1	Immunoblotting rCup a 1.02	Immunoblotting nCup a 1 deg	ELISA nCup a 1	ELISA rCup a 1.02	ELISA nCup a 1 deg
1	0.45	neg	neg	0.40	0.06	0.06
3	1.39	neg	neg	1.37	0.06	0.06
7	0.75	neg	neg	0.63	0.06	0.07
9	0.50	neg	neg	0.41	0.06	0.06
12	1.03	neg	neg	0.87	0.06	0.05
14	1.22	1.19	1.23	1.50	1.30	1.31
15	0.81	0.90	0.80	0.59	0.50	0.49
16	0.69	0.64	0.77	0.52	0.48	0.48
17	0.42	neg	neg	0.34	0.05	0.05
19	0.53	neg	neg	0.30	0.06	0.06
21	1.29	neg	neg	0.59	0.06	0.06
22	1.17	neg	neg	0.60	0.06	0.06
23	0.43	neg	neg	0.47	0.05	0.06
25	0.47	neg	neg	0.24	0.05	0.06
28	0.78	neg	neg	0.44	0.05	0.06
29	1.33	neg	neg	0.86	0.06	0.05
30	0.63	neg	neg	0.40	0.05	0.06

Basophil histamine release

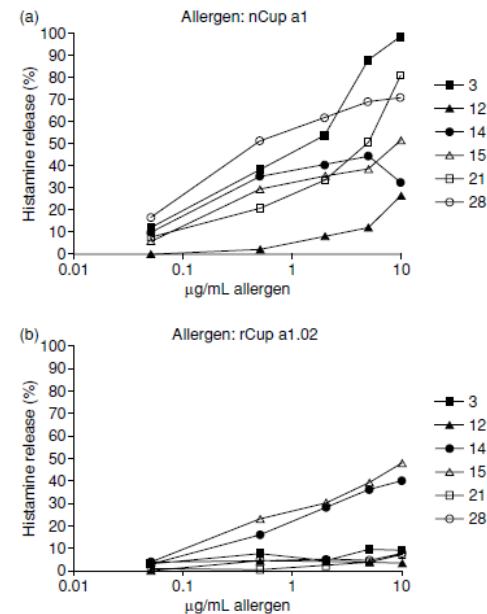


Fig. 4. Basophil histamine release test performed with IgE from sera n. 3 (filled squares), 12 (filled triangles), 14 (filled circles), 15 (open triangles), 21 (open squares) and 28 (open circles). Panels (a) and (b) show the dose-related release curves obtained after stimulation with nCup a 1 and with rCup a 1.02, respectively. Allergens were used at the concentration of 10, 5, 2, 0.5 and 0.05 µg/mL.

- IgE anti-CCD joue un rôle dans la dégranulation
- Absence de pertinence clinique de IgE anti-CCD remise en cause

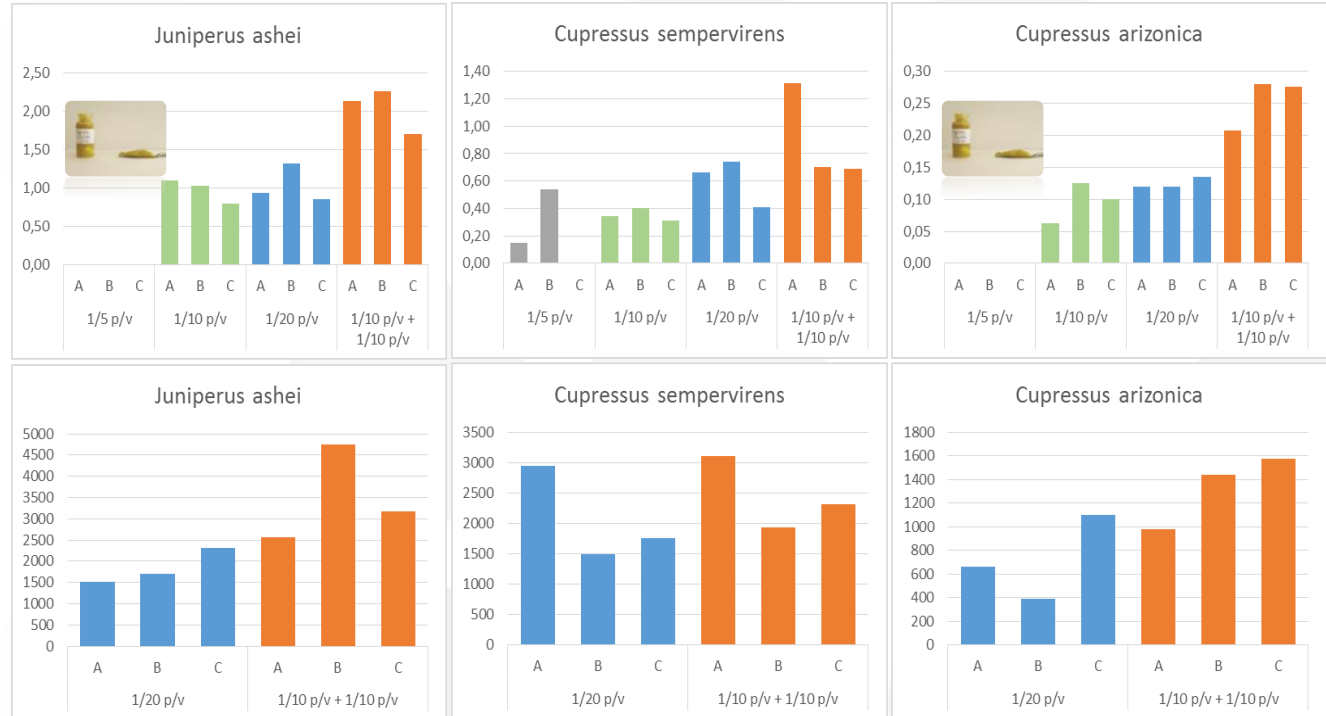
Production “large scale” des Préparations-mères

Difficulté de production

Extraits visqueux

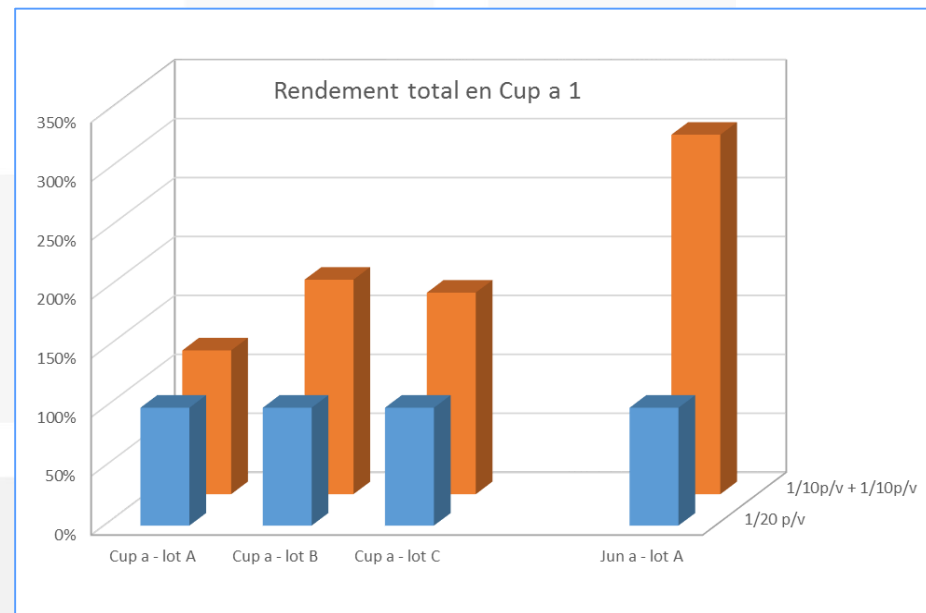
Optimisation des procédés d'extraction

Amélioration des rendements



Amélioration du rendement en Cup a 1

- Dosage de Cup a 1
 - mAb anti – Cup a 1
 - Standard interne
 - pAb anti - Cup a 1



Besoins annuels en préparations-mères.

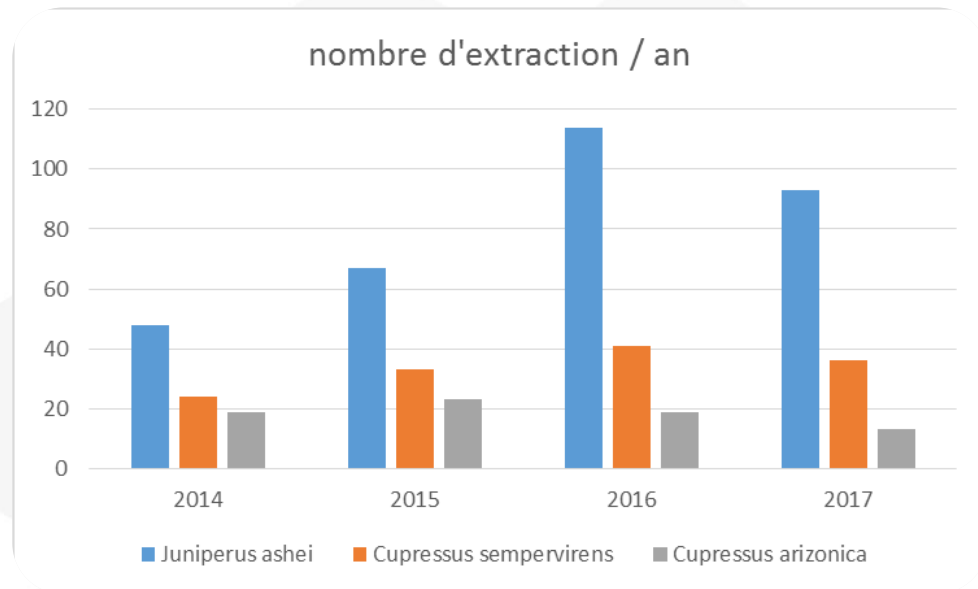
Cyprès mix (sempervirens/arizonica) 100 IR/mL
 Juniperus ashei 300 IR/mL

Quantité de pollen nécessaire en lien
 avec accroissement des besoins



Challenge dans l'approvisionnement des matières
 premières

Contrôle qualité sur chaque lot de pollen



Les pollens

ALK Source materials Traçabilité complète

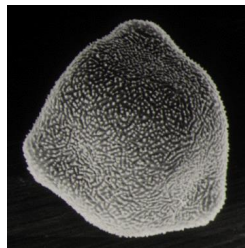
- Espèces cultivées
- Espèces sauvages
- Coordonnées GPS
- Récolteurs définis / qualifiés
- Identification macroscopique de la plante



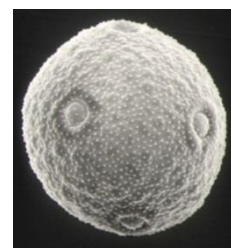
ALK France

Contrôles à réception

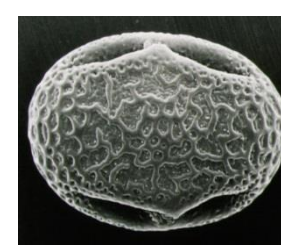
- Identification microscopique des pollens
- Pureté (spores, éléments et pollens étrangers)
- Microbiologie
- Pesticides / métaux lourds
- Vérification de la qualité allergénique du lot (extraction du pollen) - spécifications
 - SDS-PAGE
 - Activité allergénique
 - Teneur protéique
 - Allergène majeur (Bet v 1, Phl p 5, Ole e 1, Amb a 1....)
- Conformité au CDC



Betula



Plantago



Fraxinus

Form
FRM328-5.0
Signature OnFile
Valid from: 19 Nov 2017

Certificate of Analysis - Pollen



Pollen	SCIENTIFIC NAME	Juniperus ashei		LOT NUMBER	0003141082
	COMMON NAME	Mountain Cedar		CATALOG NUMBER	1039158
Growth and Collection Information	SPECIFICATION NUMBER	SPECIG2517.0		SUPPLIER NUMBER	124249
	Origin - Wild	Country - USA	State - Oklahoma	Approximate GPS -	Available Upon Request
Manufacturing	Dates Collected - 04-26 Jan 2018		Collection Method - Cut Flowers		
	Manufacture Date(s) - 23 May 2018		Field Chemicals - The field chemical application history is unknown		
Characteristic Appearance	Defatted - Yes, with acetone per ASM PF standard procedure	Additional Processing - Sieved			
	Final Drying - Hot air oven under vacuum at 40-41°C for 119 hours	Cleaning - Not chemically washed			
Identity	Test Method	Specification	Result	Specification	Result
	WIN935	Free Flowing Powder	Free Flowing Powder	Color	Yellow to tan
Purity	SOP9944 using Magnification 400X	Size (diameter)	21-34 µm	Pores	0
		Furrows	0	Exins	Verrucate
Moisture (LOD)		Target Pollen Grains Counted	2250	Fields Examined	50
	References indicate that, due to the natural diversity in pollen characteristics within a single species, the reference description should not be used as a taxonomic tool, but should be used only as a general reference in the identification of a pollen species. Species confirmation performed to herbarium specimen by Quality Control.				
Water Content (KF)	SOP9944	Foreign Pollen ≤ 0.5% Single and ≤ 1.0% Mixed	None Seen Single, None Seen Mixed	Spores ≤ 1.0%	0.3
		Soil ≤ 1.0%	None Seen	Other ≤ 1.0%	<0.1
Residual Tartrachloroethylene		Plant Parts ≤ 5.0%	2.1	Immature Pollen ≤ 9.0%	1.5
	SOP6567	Residual Solvents	Per SOP9322, Record % (Calculated LOD-NF)	None Detected	
Bioburden	SOP6322	Record %	5.8	Potency (RD)	Per SOP9590, Record
	SOP6255	Pass/Fail	Not Applicable	Record	Not Applicable
Storage	WIN6184	Record CFU/g	Bacterial CFU/g: 1.10 x 10 ⁶ Fungal CFU/g: 1.70 x 10 ⁵		
QC Prepared by	This material is certified to be true to label and identity. This product is for in vitro diagnostic use or for further manufacturing, processing, repackaging or other intermediate use. Do not dispense or administer for human use in current form.				
Date					
QC Reviewed by					
Date					
QA Approved by					
Date					



This product is packaged in a HDPE container with a HDPE lid. A LDPE inner seal may or may not be present.

02/11/18

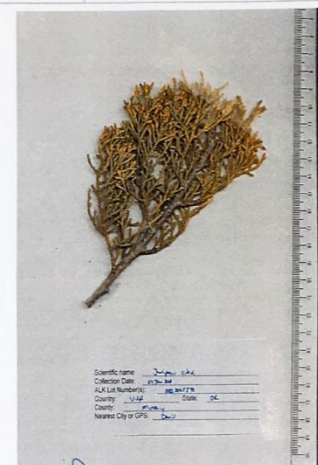
Form
FRM328-3.0
Signature OnFile
Valid from: 21-Nov-2016

Certificate of Analysis - Plant Sample



Plant Sample

SCIENTIFIC NAME	Juniperus ashei	BATCH NUMBER	0003141082
COMMON NAME	Mountain Cedar	MATERIAL NUMBER	1039158
SUPPLIER NUMBER	124249		



Scientific name: Juniperus ashei
Collection Date: 04-26-18
ALK Lot Number: 1039158
Country: USA
State: OK
County: McClain
Nearest City or GPS: Lawton

QC Prepared by: [Signature]
QC Reviewed by: [Signature]
QA Approved by: [Signature]

Date: 28 Aug 2018
Date: 28 Aug 2018
Date: 29 Aug 2018

02/11/18

Monographie “Pollens pour produits allergènes”

- Pharmacopée Française
 - Révisée en 2009
- PhFR = décrivaient précisément les méthodes d’analyse (essais d’identification et pureté, ...) basées sur les techniques des deux laboratoires Français.
- 2017 jan → Eur Pharmacopeae
 - Méthodes ne sont plus décrites
 - bcp plus de laboratoires en Europe → méthodes divergent
 - Monographie plus générale

Je vous remercie de votre attention ...