

Biologie d'Alternaria

Virginie LEDUC - Concepcion DE LINARES - Jordina BELMONTE

Journées RNSA – Metz 2012



Colza



Alternariose de la PdT



	Molecular mass (kDa)	Biological Function	Location	Prevalence (%)	Cross-Reaction	References
Alt a 1	30 (16.4 / 15)	Activité Phosphatase and esterase	protein secretion	80-90	Alt b 1	Saenz-Santamaria et al 2006
Alt a 2	45	Factor-2 α -kinase	---	61 -0	---	Bush et al 1999 Kurup & Banerjee 2000 Bush & Prochnau 2004 Asturias et al 2005
Alt a 3	85	Heat shock protein 70	Cytoplasmic housekeeping proteins	42	Asp f 12, Pen c 1, Cand a 1, Mala s 10	Achatz et al. 1995 Kurup & Banerjee 2000 Crameri et al 2008 Bush & Prochnau 2004
Alt a 4	57	Disulfide isomerase	---	37	---	Achatz et al. 1995
Alt a 5	30	Ribosomal protein P2	---	33	Cla h 5, Asp f 8, Fus c 1	Kurup & Banerjee 2000 Crameri et al 2008 Achatz et al. 1995
Alt a 6	53	Enolase	Cytoplasmic housekeeping proteins	15	Asp f 8, Asp f 22, Cla h 4, Cla h 6, Cur l 3, Pen c 22	Achatz et al. 1995 Kurup & Banerjee 2000 Crameri et al 2008 Sánchez & Bush, 2001 Bush & Prochnau 2004
Alt a 7	22	YCP4 or similar flavotoxins	Cytoplasmic housekeeping proteins	7	Cla h 5, Sac c enolase	Achatz et al. 1995 Kurup & Banerjee 2000 Sánchez & Bush, 2001 Denning et al 2006
Alt a 8	29	Mannitol dehydrogenase	---	7	---	Achatz et al. 1995 Simon-Nobbe et al. 2008
Alt a 9	42	---	---	5	---	Achatz et al. 1995 Kurup & Banerjee 2000
Alt a 10	53 (11)	Aldehyde dehydrogenase	Cytoplasmic housekeeping proteins	2	Cla h 3	Achatz et al. 1995 Kurup & Banerjee 2000 Sánchez & Bush, 2001 Bush & Prochnau 2004
Alt a 11	42-48	Enolase	---	---	---	Bush & Prochnau 2004
Alt a 12	12	Ribosomal protein P1	---	---	Cla h 12, Pen b 26	Crameri et al 2008
Alt a 13	26	GST (Glutathione-S-transferase)	---	83	---	Simon-Nobbe et al. 2008
Alt a NTF2	14	Nuclear transport factor 2	---	64	Cla h NTF2	Weichel et al, 2003

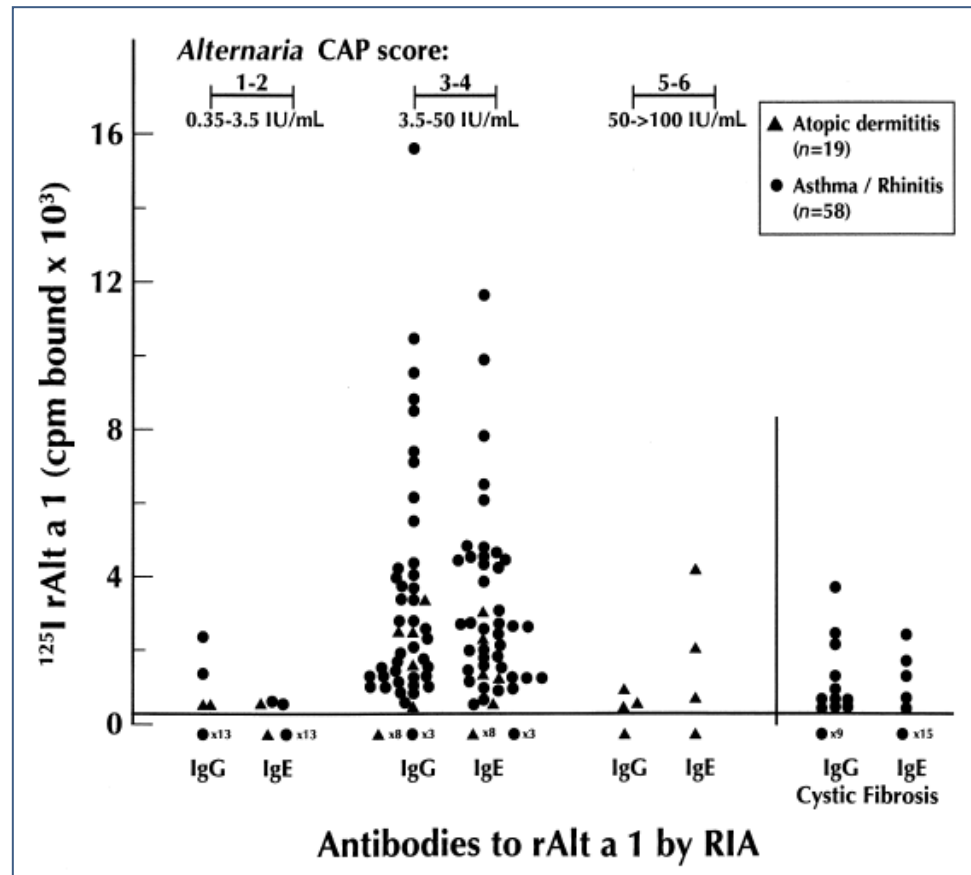
Etude américaine (2001)

- 58 patients rhinite / asthme
- 19 patients dermatite atopique
- CAP *Alternaria* positif

→ 93% des sérums ImmunoCAP > 3.5
présentent des IgE anti – Alt a 1.

IgE and IgG antibody responses to recombinant Alt a 1 as a marker of sensitization to *Alternaria* in asthma and atopic dermatitis

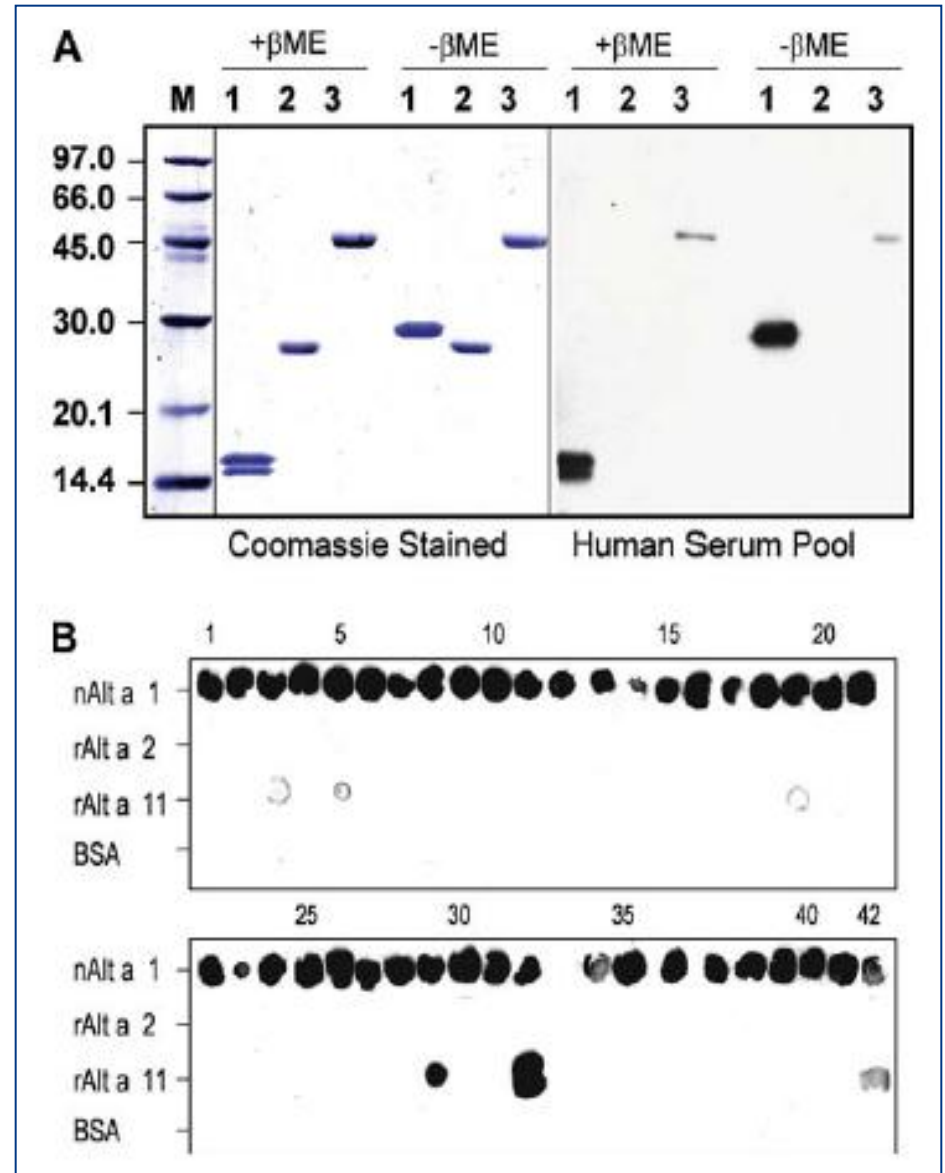
L. D. VAILES*, M. S. PERZANOWSKI*, L. M. WHEATLEY*†, T. A. E. PLATTS-MILLS* and M. D. CHAPMAN*



Etude espagnole (2005)

Asturias et al, JACI 2005;115:1210

- 42 patients (18F, 24M)
- âge moyen 20.5 ans [10-33 ans]
- Allergie *Alternaria*
 - Rhinite récurrente
 - SPT positif *Alternaria*
 - IgE positif *Alternaria* m6 (ImmunoCAP)
- Détection des IgE
 - nAlt a 1
 - rAlt a 2
 - rAlt a 11 (énoïase = Alt a 6)
- *Résultats*
 - nAlt a 1 = 98% (41)
 - rAlt a 2 = 0%
 - rAlt a 11 (énoïase) = 15% (6)



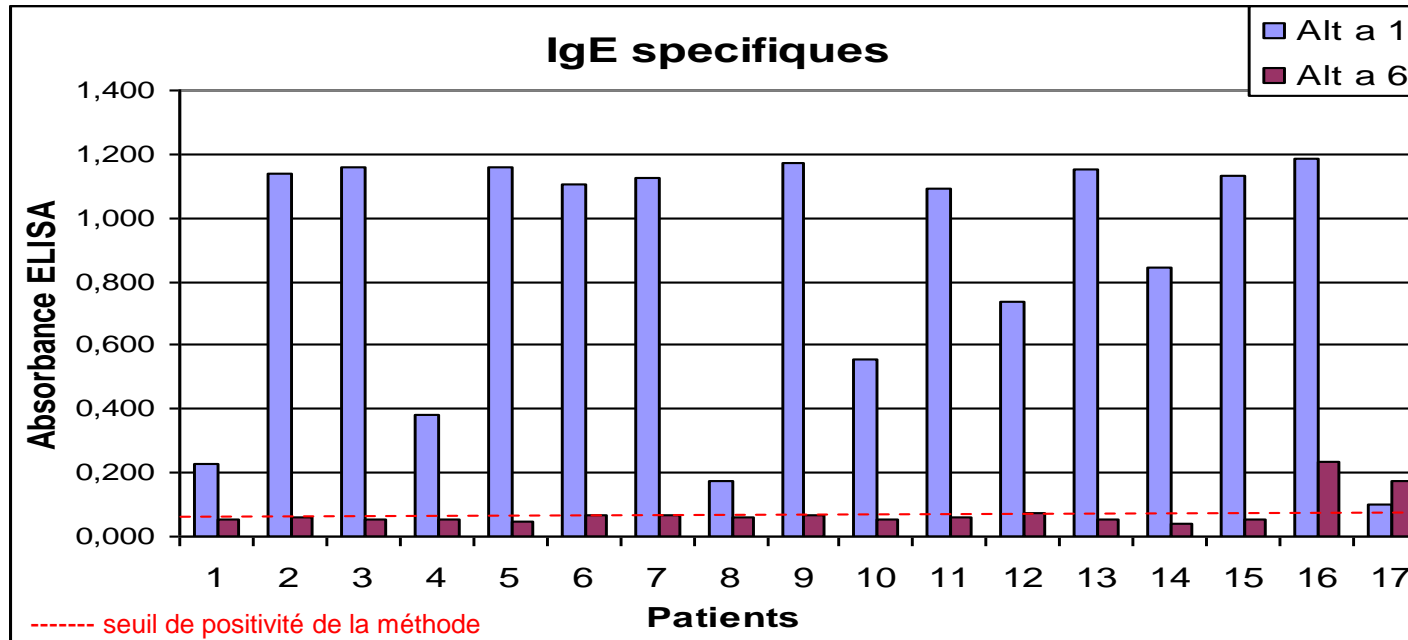
Etude de la sensibilisation de patients Français (Ile de France)

- 17 patients sensibilisés à *Alternaria* [8 M – 9 F] de 19 à 42 ans, inclus dans l'étude de standardisation *Alternaria*.
- Tests cutanés réalisés avec un extrait *Alternaria* (ALK FR)
- Dosage des IgE spécifiques ImmunoCAP m6, au seuil 0.35 kUI/L

Patients	Sexe	Age	Tests cutanés Ø moyen en mm	ImmunoCAP m6 kUI/L
1	M	19	5,0	0,47
2	M	22	11,7	10,2
3	F	22	8,1	68,2
4	M	32	8,4	1,01
5	F	28	6,6	13,8
6	M	29	6,3	14,8
7	F	42	7,0	10,3
8	F	26	6,2	< 0,35
9	F	29	6,6	11,9
10	M	31	5,9	2,72
11	F	26	5,4	5,82
12	F	24	5,6	0,79
13	M	37	6,3	17,7
14	M	40	5,9	3,62
15	F	32	4,9	8,27
16	F	25	4,4	26,6
17	M	20	4,9	< 0,35

Données internes ALK FR

Taux d'IgE spécifiques



- Fréquence de reconnaissance Alt a 1 >> Alt a 6 (énolase)
- Taux d'IgE spécifiques anti-Alt a 1 >> anti-Alt a 6

Caractérisation du Pool par ImmunoCAP

Alternaria alternata

m6 = 8.6 kUI/L

Alt a 1

m229 = 10 kUI/L

Données internes ALK FR

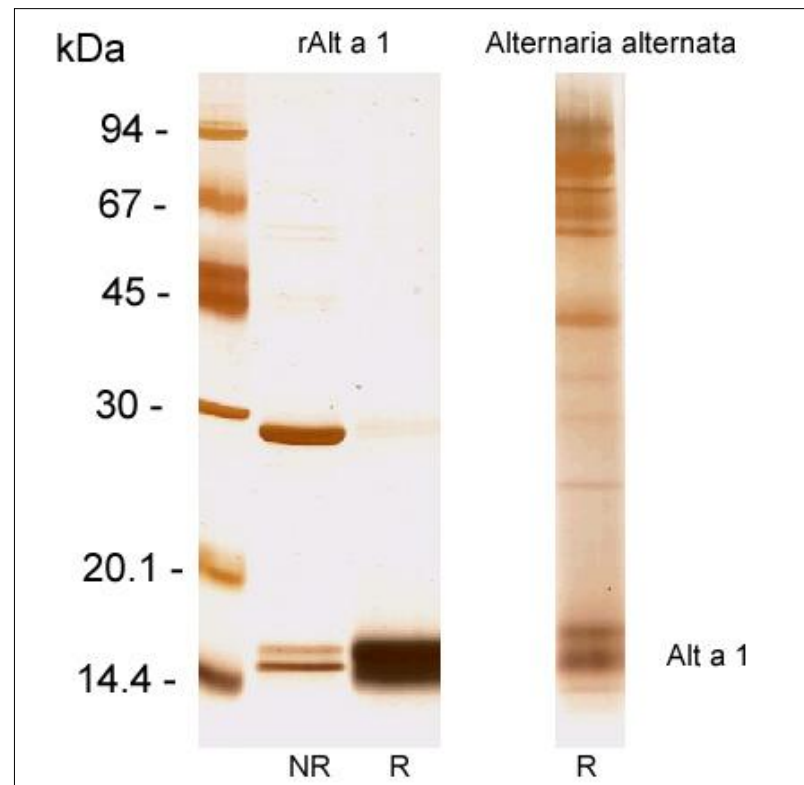
Allergène majeur - Alt a 1

- Homodimère de 30 kDa, formé de deux sous-unités identiques de 15 kDa, liées par un pont disulfure.
- La forme dimérique a un point isoélectrique de 4.2.
- Sa fonction biologique est toujours inconnue pour le moment

Profil protéique par SDS-PAGE

(coloration Argent)

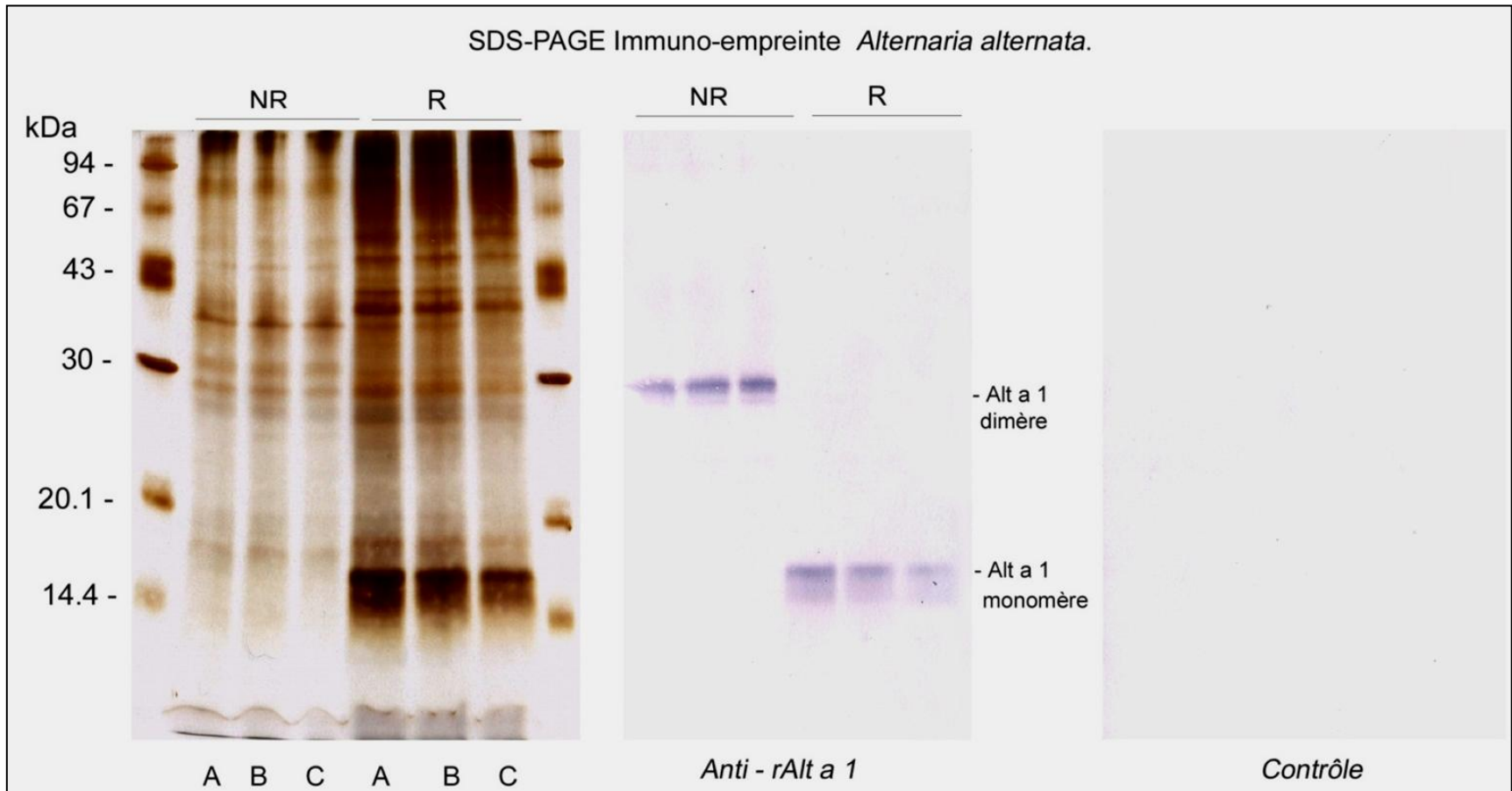
- rAlt a 1 sous forme non réduit (NR) et réduite (R),
- *Alternaria alternata* (R)



Données internes ALK FR

Analyse de la diversité protéique et allergénique

- Analyse de trois lots différents de matières premières *Alternaria alternata* par SDS-PAGE et Immuno-empreinte révélée avec un anticorps polyclonal anti-Alt a 1.



Données internes ALK FR

Analyse de la diversité allergénique

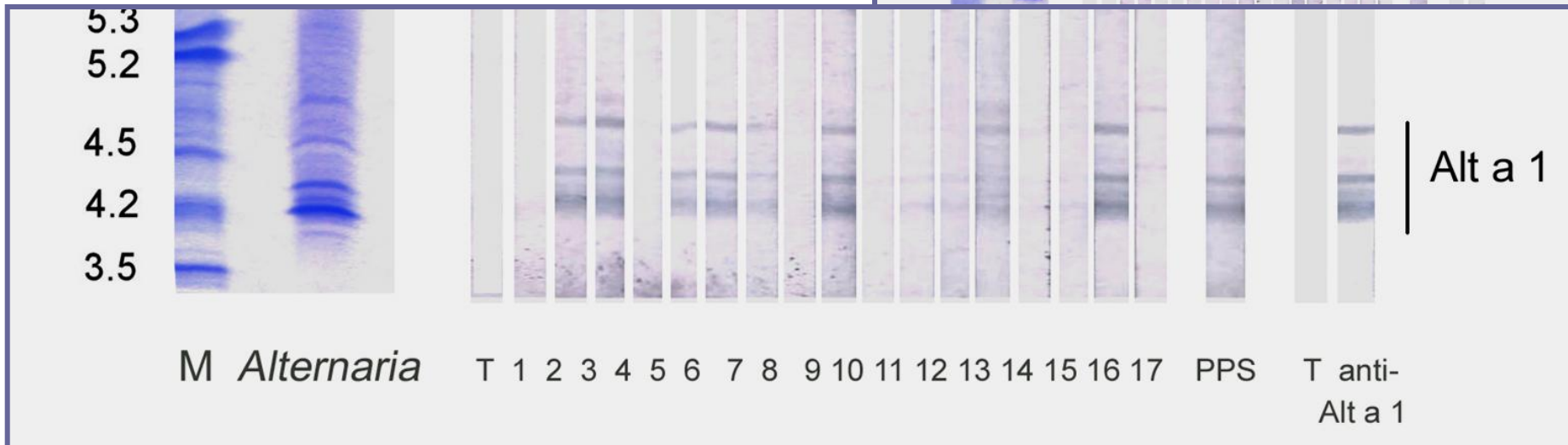
Prévalence de reconnaissance des allergènes individuels d'*Alternaria* dans cette population. (n=17)

Etude de la spécificité des IgE des 17 patients :

- - m6 ImmunoCAP **88,2% des patients IgE > 0.35 kUI/L**
- - **Extrait *Alternaria* (ALK)** **100% des patients IgE positifs***
- - Alt a 1 **100% des patients IgE positifs***
- - Alt a 6 (enolase) **11,8% des patients IgE positifs***

* Méthode interne au laboratoire.

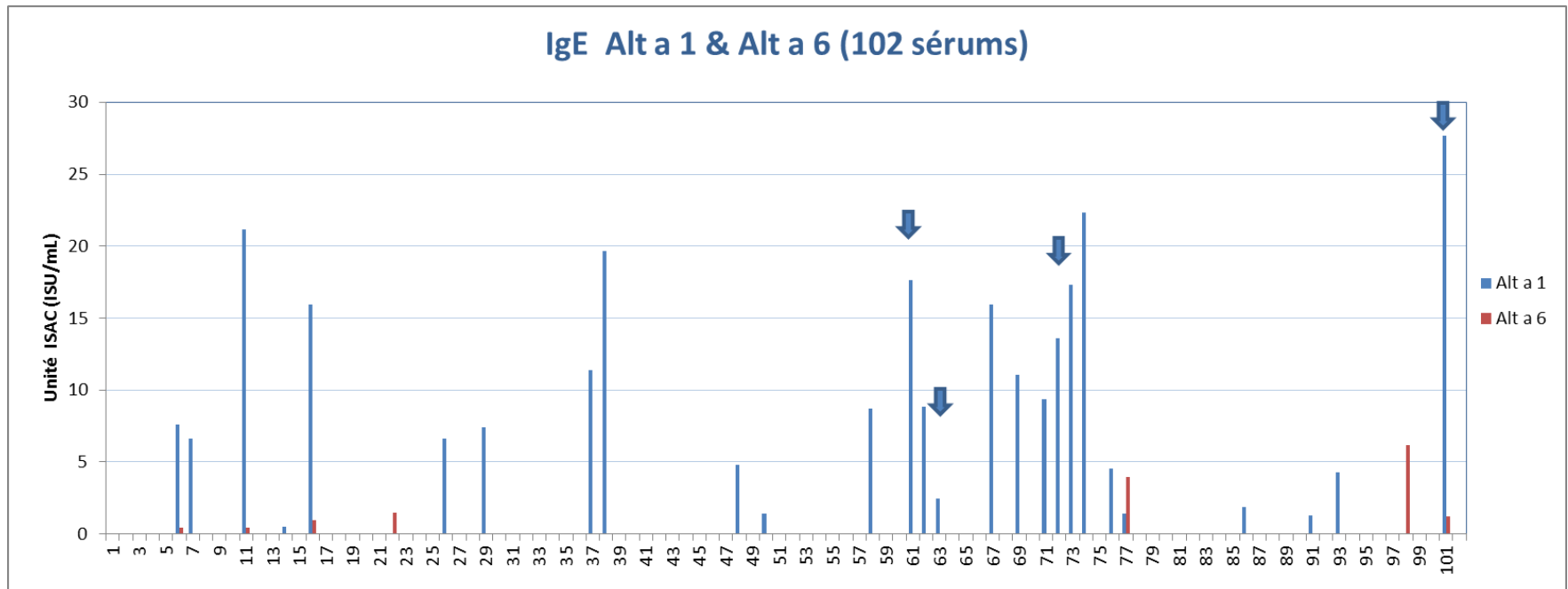
Y a t'il d'autres allergènes importants ?



Prévalence dans une population de sérums de patients allergiques (graminées, arbres, herbacées, acariens, phanères, moisissures..)

102 sérums testés par ISAC (103 allergènes)

↓ = sérums sélectionnés *IgE Alternaria*



- Alt a 1 : 26 sérums (~ 25%) positifs, teneurs en IgE élevées
dont 22 positifs Alt a 1 uniquement
- Alt a 6 (énolase) : 7 sérums (~ 7 %), teneurs en IgE faibles
 - Dont trois sérums avec IgE Alt a 6 > Alt a 1

Données internes ALK FR

Homologues d'Alt a 1

- *Alternaria sp*
 - 52 espèces d'*Alternaria* testées
 - toutes contiennent un gène codant pour un homologue d'Alt a 1
- *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Pleospora*

→ Alt a 1 = marqueur des *Pleosporaceae*

```

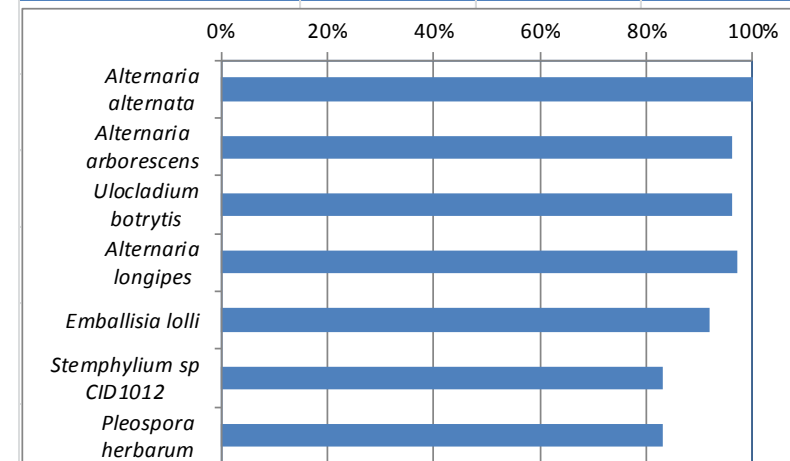
1  MQFTTIASLFAAAGLAAAAPLESRQDTASCPVTEGDYVWKISEFYGRKPEGTYYNLSLGF 60  Q71SP0
1  -----SLFAAAGLAAAAPLESRQDTASCPVTTKGDYVWKISEFYGRKPEGTYYNLSLGF 53  I3VLQ6
1  -----LAAAAPLESRQDTASCPVSTQGDYVWKISEFYGRKPEGTYYNLSLGF 46  A6N2F2
1  -----SLFAAAGLAAAAPLESRQDTASCPVTEGDYVWKISEFYGRKPEGTYYNLSLGF 53  Q5E295
1  -----SLFAAAGLAAAAPLESRQDNASCPTTEGDYVWKISEFFGRKPKQGTYYNSLGF 53  G9HQP4
1  -----LAAAAPFEARQADASCVPSTQGDYVWKISEFSGRKPEGTYYNLSLGF 46  A7L842
1  -----ALFAAAGLAAAAPFEARQADASCVPSTQGDYVWKISEFSGRKPEGTYYNLSLGF 53  Q5E2C2
      *****.*:** *****.*:***** *****.*:*****.*

61  NIKATNGGTLDFTCQAQADKLEDHKWYSCGENSFMDFSFDSDRSGLLLKQKVSDDITYVA 120  Q71SP0
54  NIKATNGGTLDFTCQAQADKLEDHKWYSCGENSFMDFSFDSDRSGLLLKQKVSDDITYVA 113  I3VLQ6
47  NIKATNGGTLDFTCQAQADKLEDHKWYSCGENSFMDFSFDSDRSGLLLKQKVSDDITYVA 106  A6N2F2
54  NIKATNGGTLDFTCSSADKLEDHTWYSCGENSFMDFSFDSDRSGLLLKQKVSDDITYVA 113  Q5E295
54  NIQATNGGTLDFTCSSADKLEDHKWYSCGENSLMDFSFDSDRNGLLLRQKVSDDITYVG 113  G9HQP4
47  NIKATNKGTLDFTCQAQADKLEDDKFYSCGENSFMSFAFQSDRNGLLFRQDVSDEITYVA 106  A7L842
54  NIKATNKGTLDFTCQAQADKLEDDKFYSCGENSFMSFAFQSDRNGLLFRQDVSDEITYVA 113  Q5E2C2
      **:** ***** .*****.:*****.* **:** *****.*:*****.*

121  TATLPNYCRAGNGPKDFVCQGVADAYITLVTLPKSS 157  Q71SP0
114  TATLPNYCRAGNGAKDFVCQGVA----- 137  I3VLQ6
107  TTLPNYCRAGNGPKDFVCQGVSDAYITLV----- 137  A6N2F2
114  TATLPNYCRAGNGPKDFVCQGVA----- 137  Q5E295
114  TATLPNYCRAGNGPQDFVCQGVA----- 137  G9HQP4
107  TATLPNYCHAGNGPKDFVCQGVSDAYFTLV----- 137  A7L842
114  TATLPNYCHAGNGPKDFVCQGVSDAYFTLV----- 137  Q5E2C2
      *:*****:***** :*****:

```

	Séquence	Séquence	% Identité avec
		UNIPROT	Alt a 1
Nbre acides aminés	123-140 aa		
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1	Q71SP0	100%
<i>Alternaria arborescens</i>	Alt ar 1	I3VLQ6	96%
<i>Ulocladium botrytis</i>	Ulo b 1	Q5EZ82	96%
<i>Alternaria longipes</i>	Alt l 1	Q5EZ95	97%
<i>Emballisia lolli</i>	Emb l 1	G9HQP4	92%
<i>Stemphylium sp CID1012</i>	Sta 1	A7L842	83%
<i>Pleospora herbarum</i>	Ple h 1	Q5E2C2	83%



• Production d'Alt a 1

Espèce dépendante

Table 1 Alt a 1 concentrations in culture filtrates of different allergenic mould species.

Species	Strain	Alt a 1 concentration in culture filtrate (ng mL ⁻¹)
<i>Alternaria alternata</i>	IMIM 93039	0.45
<i>Alternaria tenuisima</i>	FMR5813	1.93
<i>Stemphylium botryosum</i>	FMR3952	3.22
<i>Ulocladium botrytis</i>	FMR5819	11.26
<i>Curvularia lunata</i>	FMR5790	0.2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF54	ND
<i>Cladosporium herbarum</i>	CBS 134.31	ND
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PC4	ND

ND, non-detectable (<0.05 ng ml⁻¹).

Souche dépendante

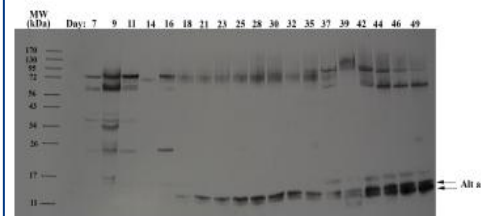


Figure 1. Immunoblot showing the IgE-binding profile in DW of strain A during cultivation. The two subunits of the major allergen Alt a 1 are marked by two arrows in the figure. Exposure time was 60 minutes.



Figure 3. Immunoblot showing the IgE-binding profile in DW of strain C during cultivation. The two subunits of the major allergen Alt a 1 are marked by two arrows in the figure. Exposure time was 60 minutes.

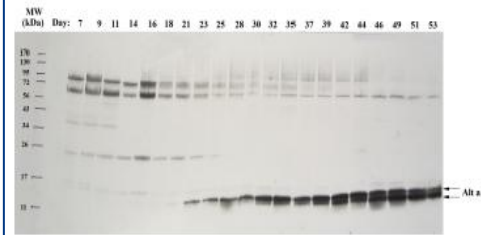


Figure 2. Immunoblot showing the IgE-binding profile in DW of strain B during cultivation. The two subunits of the major allergen Alt a 1 are marked by two arrows in the figure. Exposure time was 60 minutes.

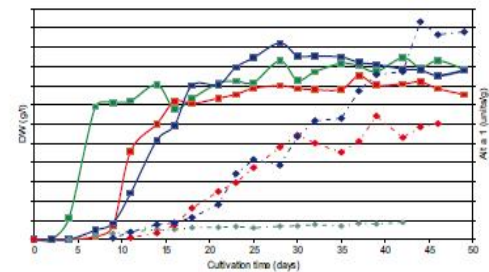


Figure 4. Changes of the dry weight (DW) per litre of culture medium of three strains of *Alternaria alternata* during growth (squares and solid lines) and the corresponding concentration of the major allergen Alt a 1 in DW (diamonds and dashed lines). Strain A (red), strain B (blue) and strain C (green).

Cinétique de culture de 3 souches ≠ d'*Alternaria*

Conclusions ...

- *Alt a 1 = excellent marqueur d'une sensibilisation à Alternaria*
- *Présent dans d'autres Pleosporacées = Stemphilium, Ulocladium*
- *IgE Alt a 1 sont présents chez plus de 95 % des patients sensibilisés à Alternaria.*
- *Alt a émolase et autres allergènes: peu représentés (fréquence et concentration) dans les sensibilisations à Alternaria,*
- *Émolase est un allergène croisant présent dans diverses moisissures...*
- *Diagnostic in vitro disponible*
 - *m6 Alternaria alternata*
 - *m227 Alt a 1*
 - *ISAC : Alt a 1, Alt a 6*

La teneur en Alt a 1 des extraits Alternaria standardisé est donc un contrôle pertinent pour assurer la sécurité, fiabilité du diagnostic et de l'immunothérapie à Alternaria.

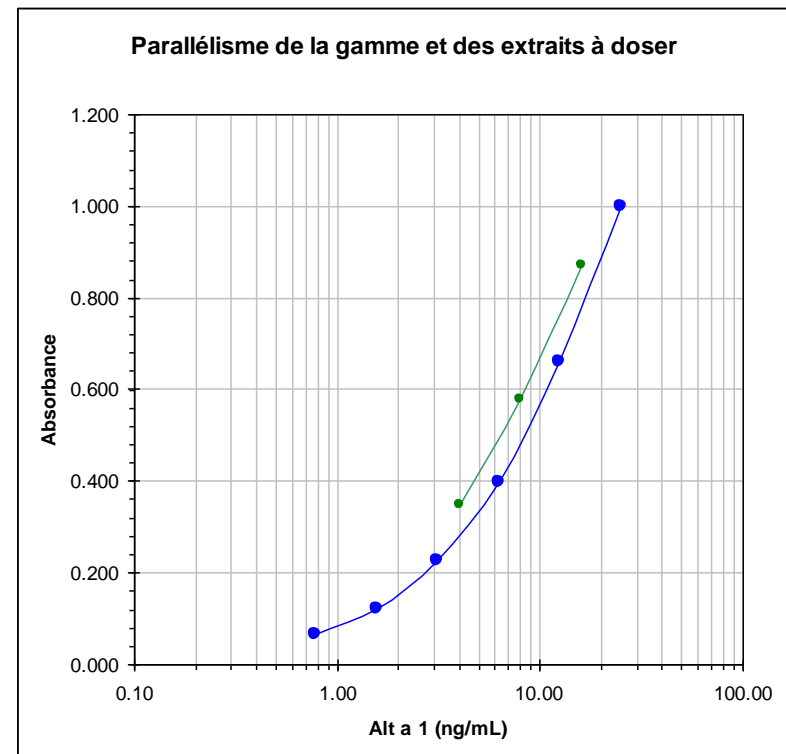
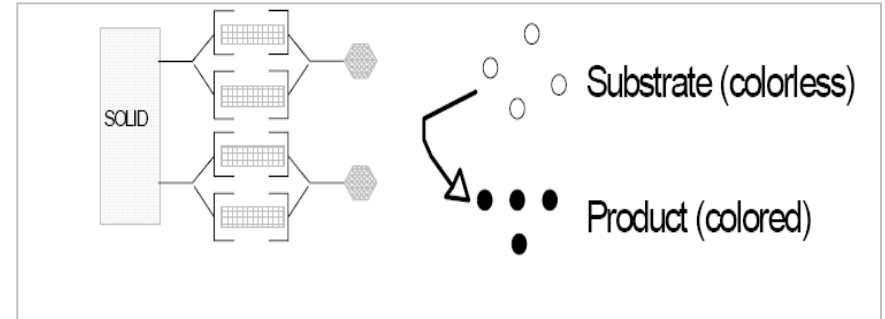
Merci de votre attention

- *Dias en plus...*

Dosage de l'allergène majeur Alt a 1 dans les extraits *Alternaria alternata*

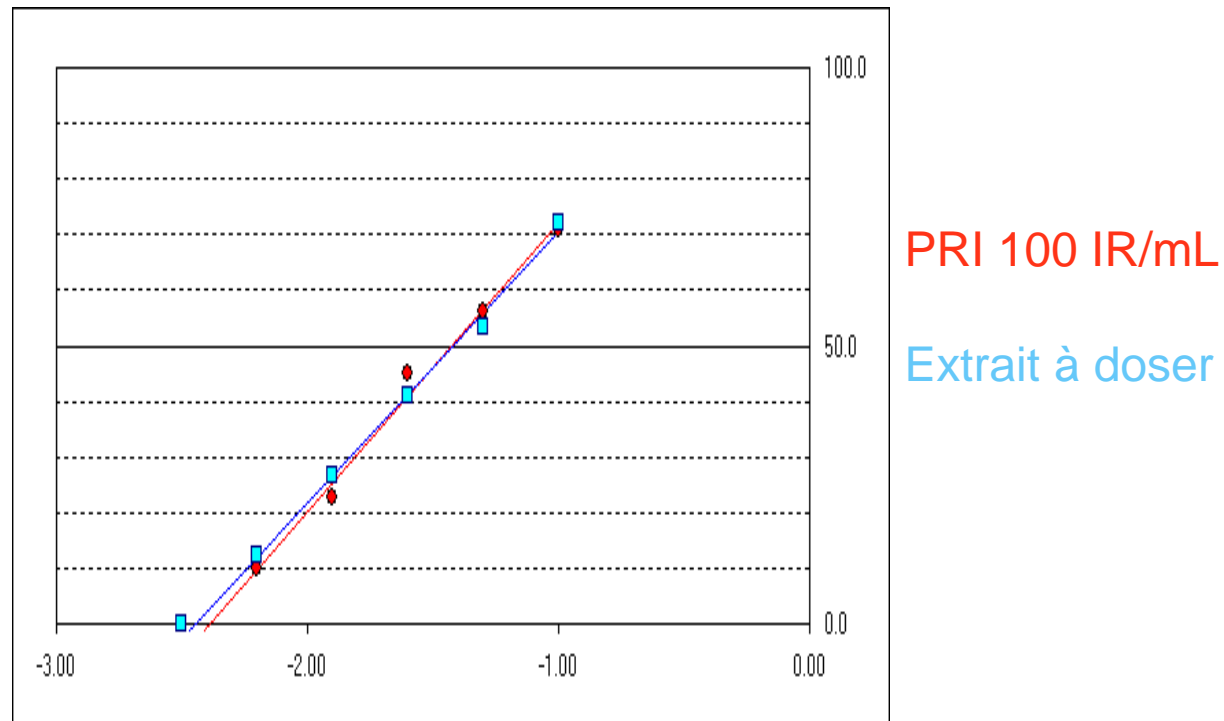
• ELISA de type sandwich

- Ac monoclonal anti-Alt a 1 capture l'allergène
- Ac polyclonal anti-Alt a 1 le détecte
- Un traceur (Ac-enzyme) détecte l'anticorps polyclonal
- L'enzyme est détectée par un substrat
 - Substrat incolore → Produit coloré.
- Parallélisme de la gamme et des extraits dosés...
- Etalon interne, ne permettant pas de comparer les teneurs en $\mu\text{g/mL}$ entre des laboratoires différents.



Mesure de l'activité allergénique mesurée par IgE-inhibition

- Référence interne (PRI) dont l'activité 100 IR/mL est définie *in vivo*
- Pool de Sérums humains avec teneur en IgE minimale (!)
- IgE spécifiques des allergènes de l'extrait
- Développement et validation de la méthode d'IgE-inhibition par ELISA
- Parallélisme des pentes, corrélation et IC50%



Corrélation entre activité allergénique et teneur en Alt a 1.

Teneur en Alt a 1 exprimée en pourcentage de la valeur cible interne pour 100 IR/mL.

