



De l'ortie, du pin et du cyprès

Allergénicité des pollens



Pascal Poncet

PhD, chargé de recherche Institut Pasteur

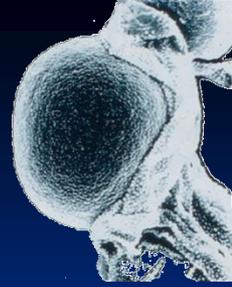
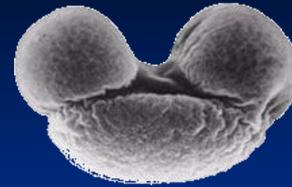


Institut Pasteur, C2RT, Paris

*Equipe de recherche « Allergie & Environnement »
Hôpital d'Enfant Armand Trousseau, Paris*

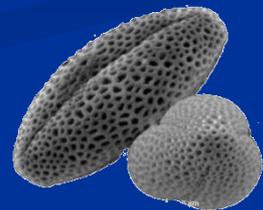
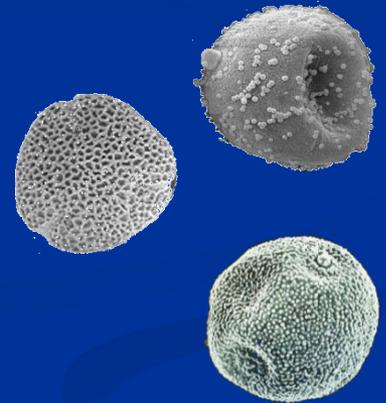


Pollen et allergénicité



Différents paramètres:

- Anémophilie
 - petite taille (20 à 30µm), aérodynamisme, degré de flottaison dans l'air
- Quantité de grains émis (*quoique ... quoique...*)
- Caractéristiques de surface (*collante ou lisse*)
- Facilité à libérer les allergènes (*quoique ... quoique...*)
- Facilité à libérer des sous-particules
 - granules, orbicules, fragmentation des grains,...
- Propriétés des allergènes libérés
 - fonction: enzymes, protéines de transport, protéines fixant le calcium,...
 - stabilité, hydrophilicité/hydrophobicité, réactivité croisée, ...
 - caractère pro-Th2, pro inflammatoire, ...
 - capacité à interagir avec les molécules du système immunitaire inné
- Cofacteurs de l'allergénicité



Pollen et allergénicité

Co-facteurs de l'allergénicité

➔ Liés à la source allergénique : adjuvants biogéniques

POLLEN

- NADPH oxydase → ROS (*Reactive Oxygen Species*) → IL1 β
- PALM (*pollen associated lipid mediators*) → chimiotactisme et activation des éosinophiles et des neutrophiles, \searrow IL12 des DC → \nearrow Th2

Traidl Hoffmann et al., Determinants of allergenicity J Allergy Clin Immunol 2009 ; 123 : 558-566

➔ Liés à l'environnement : adjuvants anthropogéniques

- La **pollution**, touche principalement les aéroallergènes, joue sur la végétation, sur les pollens, sur les allergènes eux-mêmes
 - **particulaire** : les particules de diesel, *in vitro* et *in vivo* (modèles animaux)
→ augmentation de la réponse Th2, ...
 - **gazeuse** : CO₂, O₃, SO₂, NO₂ → nitration des allergènes, ...
- Les molécules et organismes associées (LPS, virus, bactéries, ...)

Pollen et allergénicité

Potentiel allergisant d'un pollen: degré de sensibilisation (*donnée épidémiologique*) dans une région où l'exposition au pollen est optimale (*quantité d'arbre, de pollen, environnement, saison, ...*).

Risque allergique : donnée sanitaire d'effet sur la santé, dépend :

- du potentiel allergisant du pollen
- de la zone géographique d'émission
- de la quantité de pollen dans l'air (exposition)
- des conditions météorologiques
- des observations cliniques

Exemples:

- 1 - Pollen de bouleau a un potentiel allergisant de 5, mais risque allergique différent à Strasbourg (5/5) et Nice (1/5)
- 2 - Pollen de cyprès a aussi un potentiel allergisant de 5, mais risque allergique seulement à 1/5 à Strasbourg, 5/5 à Marseille.

Pollen et allergénicité

Potentiel allergisant

| | Fort | | Modéré | | Faible/Négligeable | |
|---------------------------|------------|--------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| ARBRES | Aulne | Cyprès de Provence | Érable | Troène | Charme-Houblon | Mûrier blanc |
| | Bouleau | Cyprès d'Arizona | Baccharis | Platane | Genévrier | Pin |
| | Charme | Cèdre du Japon | Hêtre | Saule | Thuya | Peuplier |
| | Noisetier | Cade | Chêne | Tilleul | Robinier | If |
| | Frêne | Mûrier à papier | | | Châtaignier | Orme |
| | Olivier | | | | Noyer | |
| HERBACEES SPONTANÉES | Ambroisie | Graminées | Chénopode | Plantain | Marguerite | |
| | Armoise | Pariétaire | Soude brulée | Oseille | Pissenlit | |
| | | | Mercuriale | | Ortie | |
| GRAMINEES ORNEMENTALES | Baldingère | Fétuque | Calamagrostis | Queue de lièvre | | |
| | Canche | Fromental élevé | Elyme des sables | Stipe géante | | |

Pollen et allergénicité

Potentiel allergisant

| | Fort | Modéré | Faible/Négligeable | |
|---------------------------|---|---|--|---|
| ARBRES | Aulne Bouleau Charme Noisetier Frêne Olivier | Cyprès de Provence Cyprès d'Arizona Cèdre du Japon Cade Mûrier à papier | Érable Troène Baccharis Platane Hêtre Saule Chêne Tilleul | Charme-Houblon Mûrier blanc Genévrier Pin Thuya Peuplier Robinier If Châtaignier Orme Noyer |
| HERBACEES SPONTANÉES | Ambroisie Armoise | Graminées Pariétaire | Chénopode Soude brulée Mercuriale | Marguerite Pissenlit Ortie |
| GRAMINEES ORNEMENTALES | Baldingère Canche | Fétuque Fromental élevé | Calamagrostis Elyme des sables | Queue de lièvre Stipe géante |

L'ortie - botanique (1)

- Herbacée de la famille des **Urticacées** (60 genres: ortie, pariétaire, ...)
- genre **Urtica** = **ortie** (environ 30 espèces)
- Pousent sur un sol riche en azote, phosphore et potassium
- envahissante, rudérale (décombres, abords de maison,...)

Grande ortie: *Urtica dioica*

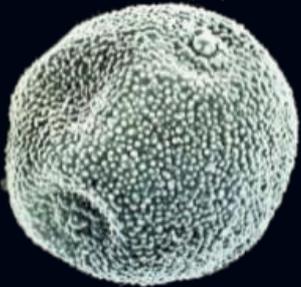


Ortie brûlante: *Urtica urens*

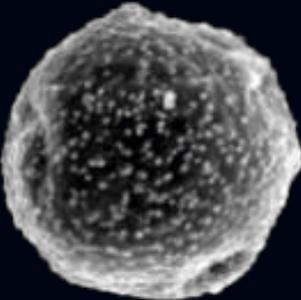


Le pollen d'ortie

Urtica dioica



Parietaria judaica

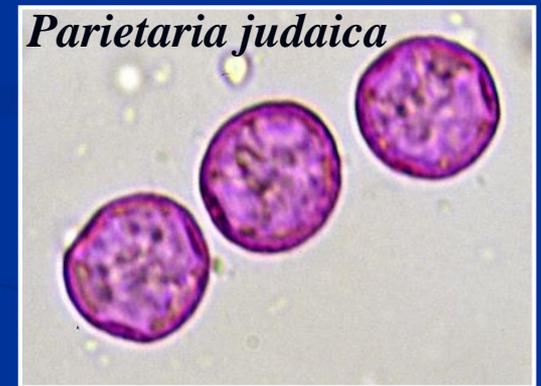


photos Gérard Sulmont

Urtica dioica



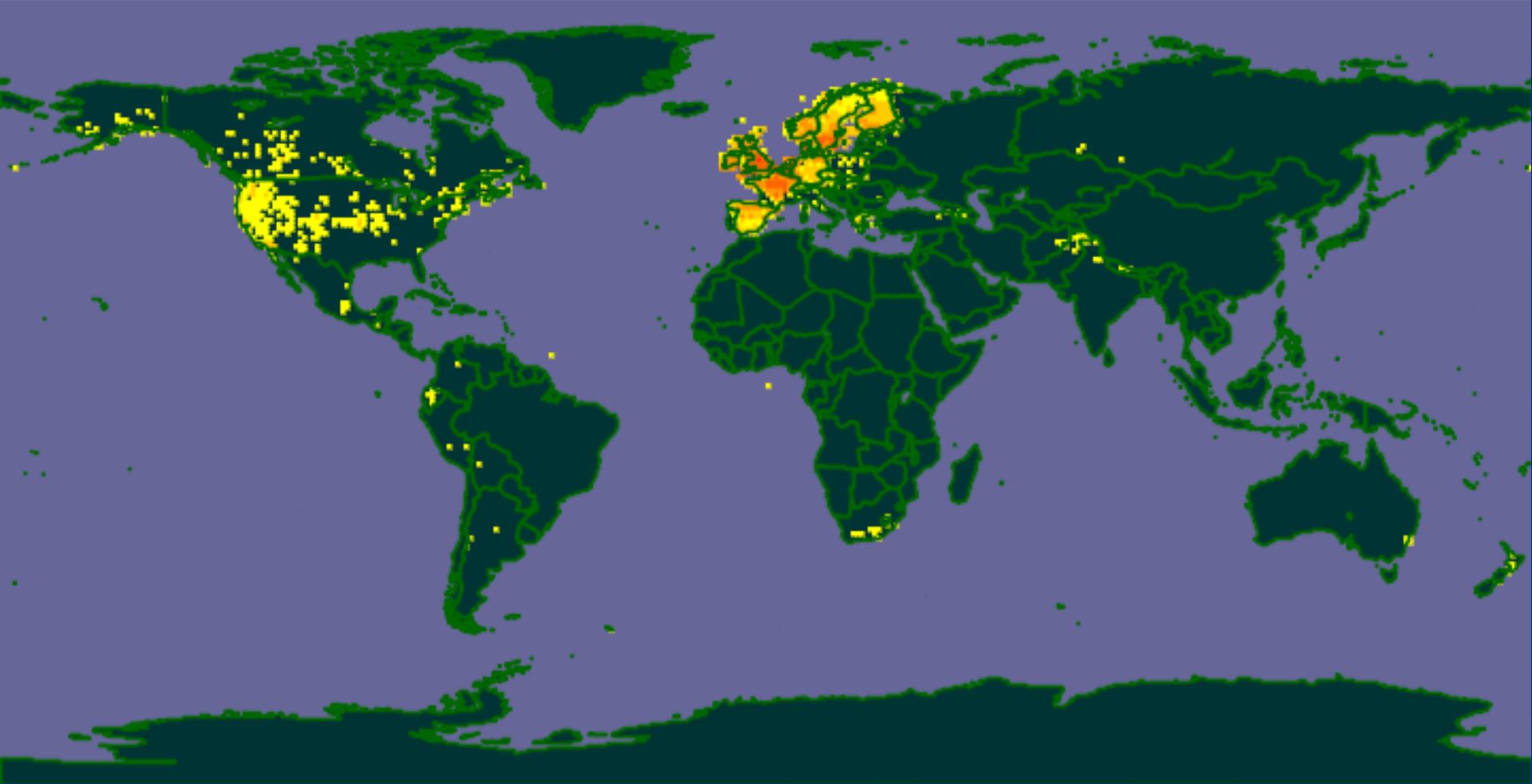
Parietaria judaica



photos Gérard Sulmont

Pollen « catapulté »!
(de mai à octobre)

L'ortie – distribution (1)



<http://www.omnilexica.com/?q=stinging+nettle>

L'ortie – distribution (2)



Le pollen d'ortie - allergénicité

Pariétaire

Ortie

Potentiel allergisant: ■ fort ■ modéré ■ faible

Allergènes

PARIETAIRE

ORTIE

kDa pI

judaiica

| | | | |
|------------|------------------------|-------|-----|
| Par j 1 | LTP | 15 | 8,9 |
| Par j 2 | LTP | 10-14 | 8,1 |
| Par j 3 | profiline | 14 | 4,5 |
| Par j 4 | polcalcine | 9 | 4,2 |
| Par j gluc | β -1,3 glucanase | 13 | 5,6 |

officinalis

| | | | |
|---------|-----|----|-----|
| Par o 1 | LTP | 15 | 8,9 |
|---------|-----|----|-----|

mauritanica

| | | | |
|---------|-----|----|-----|
| Par m 1 | LTP | 15 | 8,9 |
|---------|-----|----|-----|

?



Urtica dioica

Prévalence

unknown



Parietaria

officinalis judaica

Prévalence

- Espagne: 35%
- Italie du sud: 75%

Deux cas cliniques

| Sources allergéniques | | Allergènes | 1 | 2 |
|---|---------------------------|------------|-----------|------------|
| Apparition des symptômes | | | tardive | tardive |
| Domicile | | | Lorraine | Luxembourg |
| Mois des symptômes | | | Juil-Sept | Mai-Juin |
| Symptômes | Soupe d'ortie | | ? | CA |
| | Pollen d'ortie | | RC | RC |
| IgE Spécifiques (kU/L) | <i>Urtica dioïca</i> | Extrait | 9,84 | 20 |
| | <i>Parietaria judaïca</i> | Extrait | 0,1 | NF |
| | | rPar j 2 | 0,63 | NF |
| | <i>Phleum pratense</i> | rPhl p 1+5 | NF | 14 |
| | <i>Betula verrucosa</i> | rBet v 1 | NF | 0,7 |
| | | rBetv 2 | <0,1 | <0,1 |
| | <i>Olea europea</i> | nOle e 7 | <0,1 | NF |
| | <i>Prunus persica</i> | rPru p 3 | <0,1 | <0,1 |
| Test cutané ou "Prick to prick" (Diamètre de la papule mm) | Feuilles d'ortie | | 0 | 4 |
| | Pollen d'ortie | | 9 | 10 |
| | Pollen de graminées | | 0 | 6 |
| | Pollen de bouleau | | 0 | 5,5 |
| | Pollen de frêne | | 0 | 5 |
| | Pollen de plantain | | 0 | 5 |

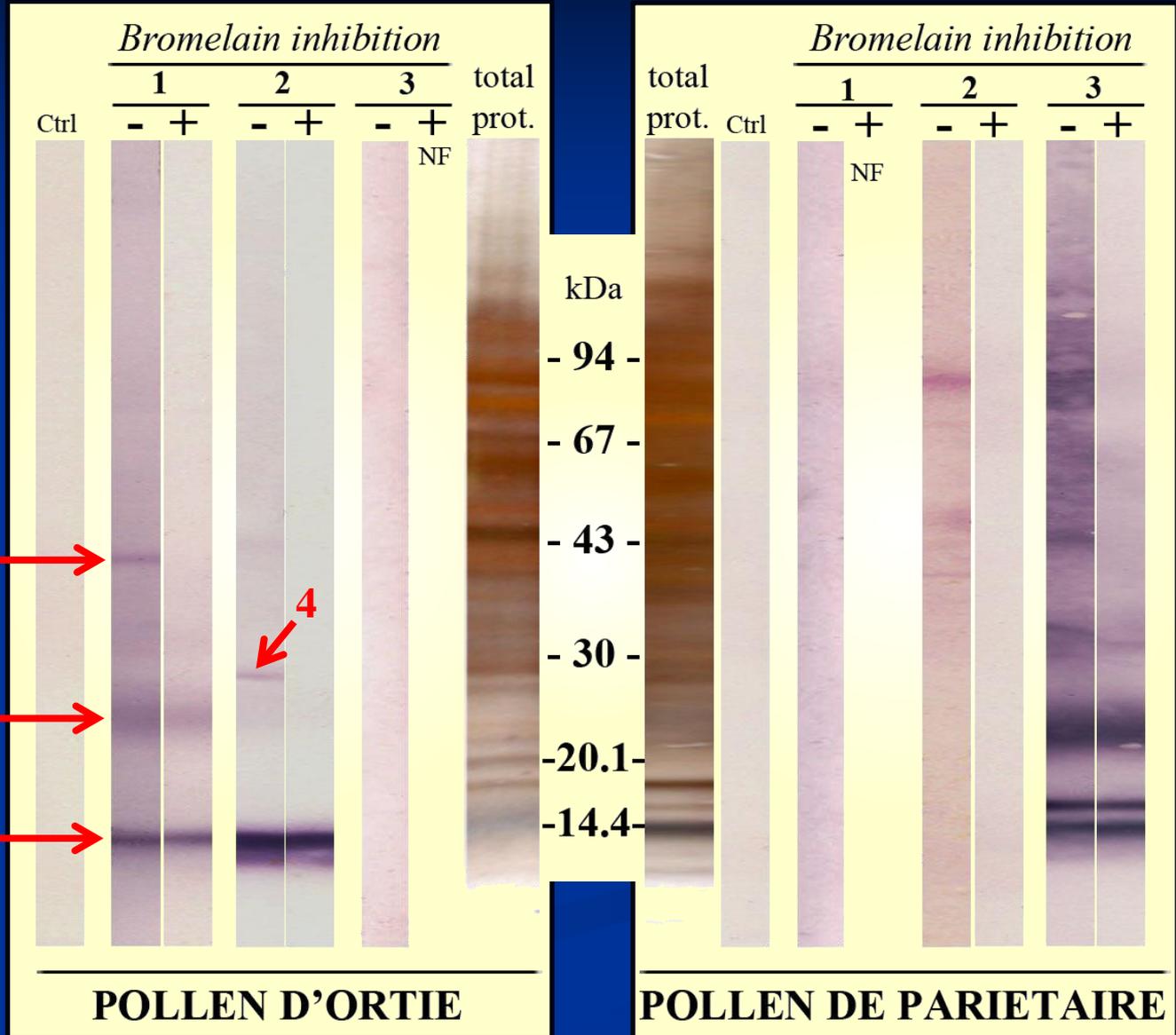
Exploration biologique - Immunoréactivité IgE

Immunoempreintes
sur nitrocellulose
après séparation en
SDS-PAGE d'extraits
de pollen d'**ortie** et
de **pariétaire**

Evaluation des
réactivités CCD par
inhibition de la
réactivité IgE par
la **bromélaïne**

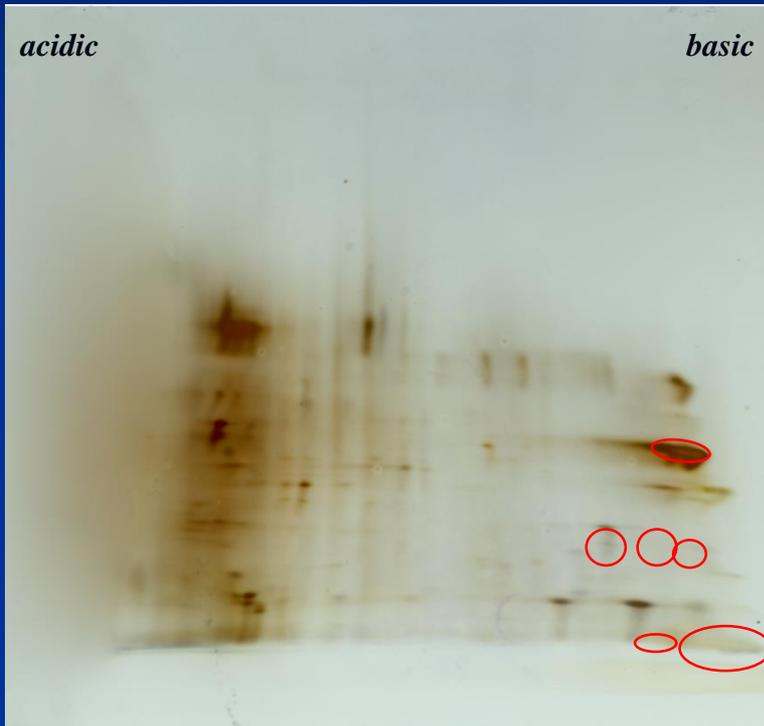
1 →
2 →
3 →

Patient 3
Allergique à
la pariétaire
(w19: 3,50)



Immunoréactivité IgE 2D du patient 1

Protéines totales



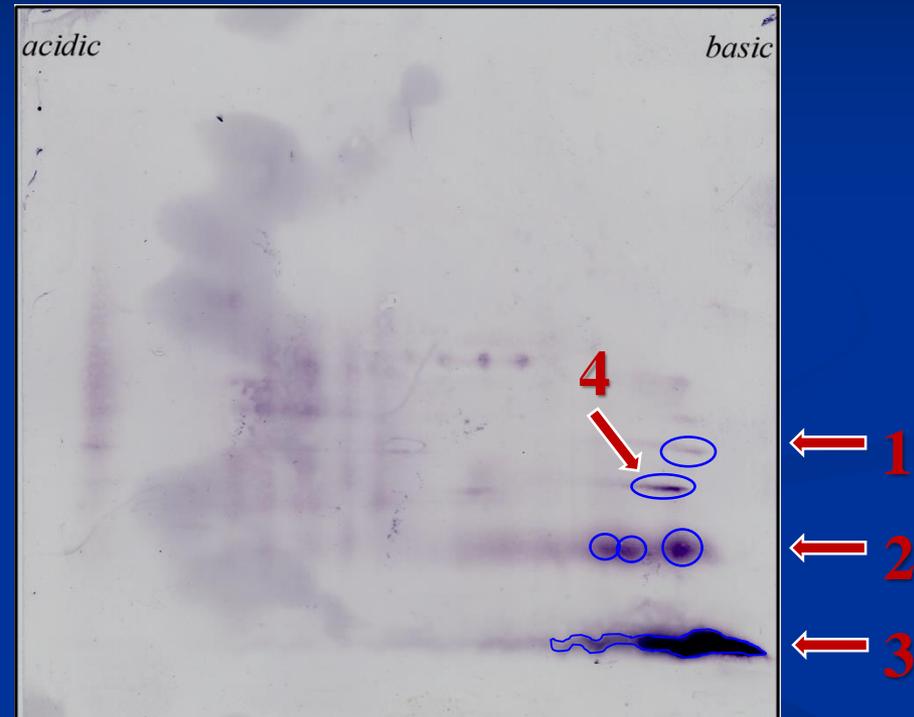
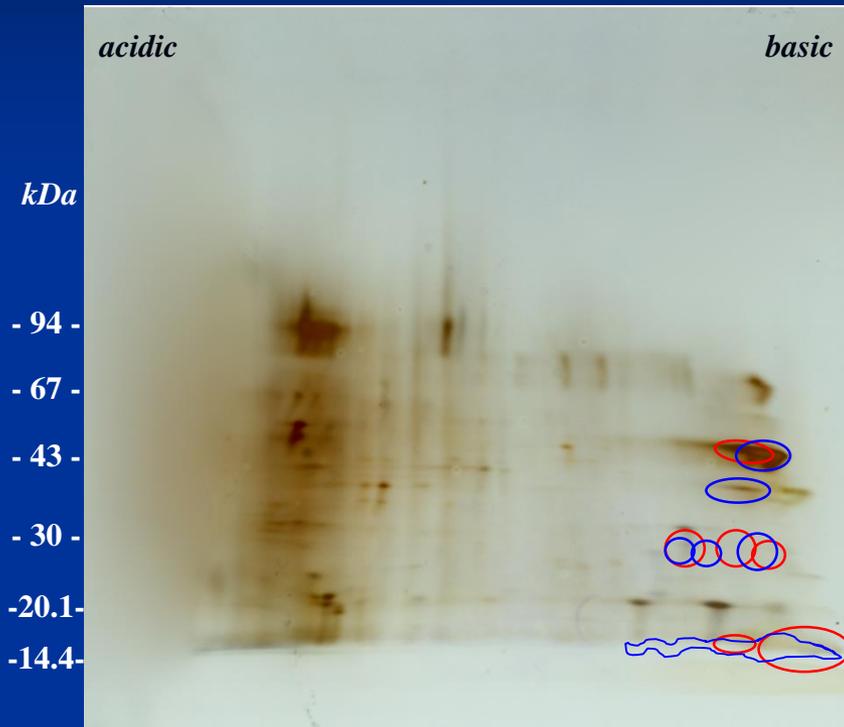
Immunoempreinte IgE



→ 3 groupes d'allergènes basiques (avec isoformes):
1 --> 43 kDa
2 --> 27 kDa
3 --> 14 kDa

Immunoréactivité IgE 2D

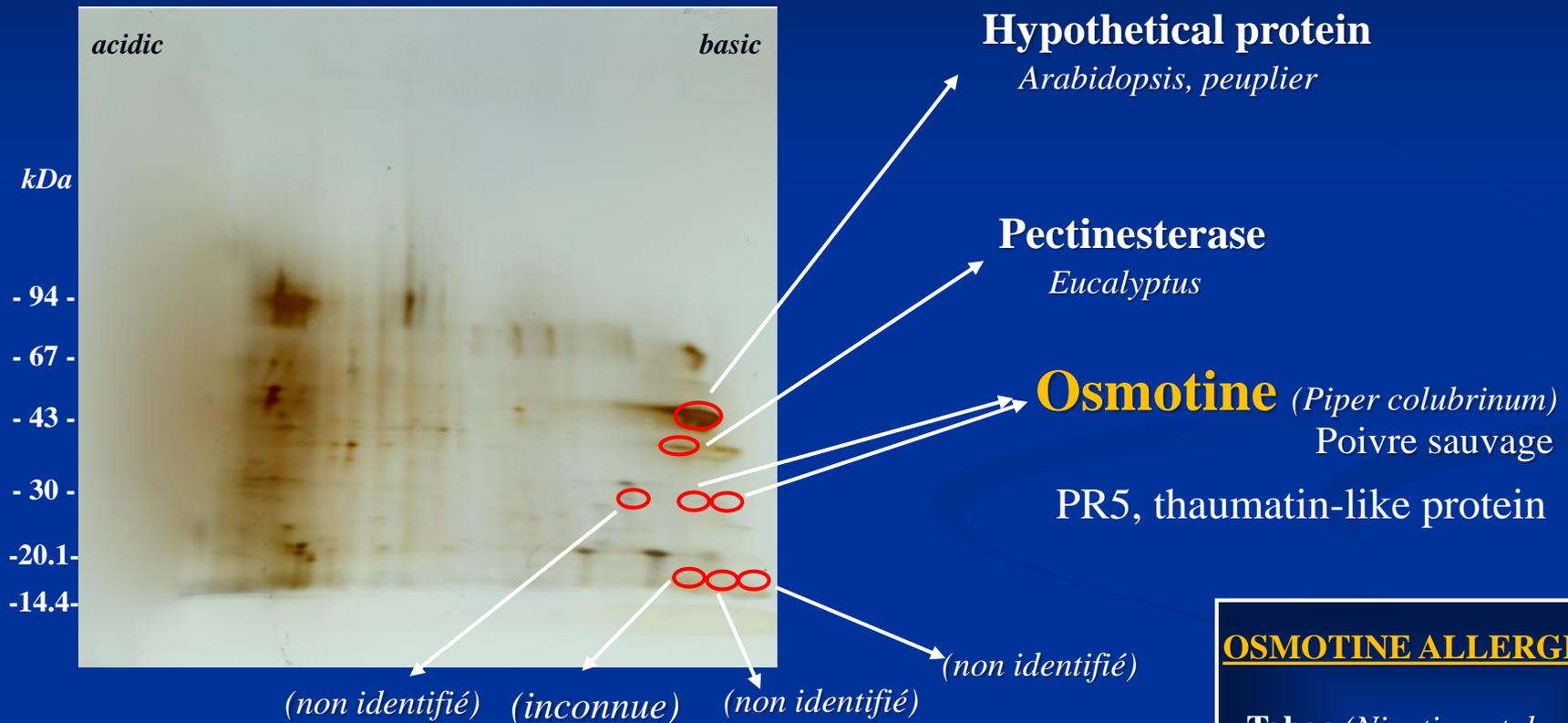
- Allergènes reconnus par le patient 1
- Allergènes reconnus par le patient 2



➔ plusieurs groupes d'allergènes sont reconnus par le patient 2 dont, principalement, **les basiques reconnus par le patient 1**

Immunoréactivité IgE 2D

Identification par spectrométrie de masse



PROTÉINE BASIQUE de 14 kDa

LTP? Anti-LTP de pêche ou blé → NEG
Pru p 3 et Ole e 7 → NEG
MS → NEG

OSMOTINE ALLERGENES

Tabac (*Nicotiana tabacum*)
Nic t osm

Poivron, *Capsicum annuum*
Cap a 1

Pollen et allergénicité

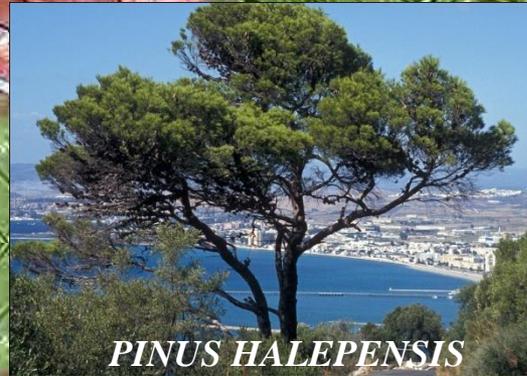
Potentiel allergisant

| | Fort | | Modéré | | Faible/Négligeable | |
|---------------------------|------------|--------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| ARBRES | Aulne | Cyprès de Provence | Érable | Troène | Charme-Houblon | Mûrier blanc |
| | Bouleau | Cyprès d'Arizona | Baccharis | Platane | Genévrier | Pin |
| | Charme | Cèdre du Japon | Hêtre | Saule | Thuya | Peuplier |
| | Noisetier | Cade | Chêne | Tilleul | Robinier | If |
| | Frêne | Mûrier à papier | | | Châtaignier | Orme |
| | Olivier | | | | Noyer | |
| HERBACEES SPONTANÉES | Ambroisie | Graminées | Chénopode | Plantain | Marguerite | |
| | Armoise | Pariétaire | Soude brulée | Oseille | Pissenlit | |
| | | | Mercuriale | | Ortie | |
| GRAMINEES ORNEMENTALES | Baldingère | Fétuque | Calamagrostis | Queue de lièvre | | |
| | Canche | Fromental élevé | Elyme des sables | Stipe géante | | |

Pollen de pin: allergénicité spécifique et/ou réactivités croisées ?



PINUS PINEA



PINUS HALEPENSIS



PINUS SYLVESTRIS



PINUS RADIATA



PINUS NIGRA



Famille : Pinacées

Genre : pinus

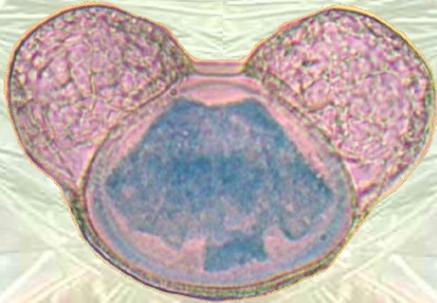
111espèces

Résineux à feuilles en aiguilles groupées en faisceaux par 2, 3 ou 5

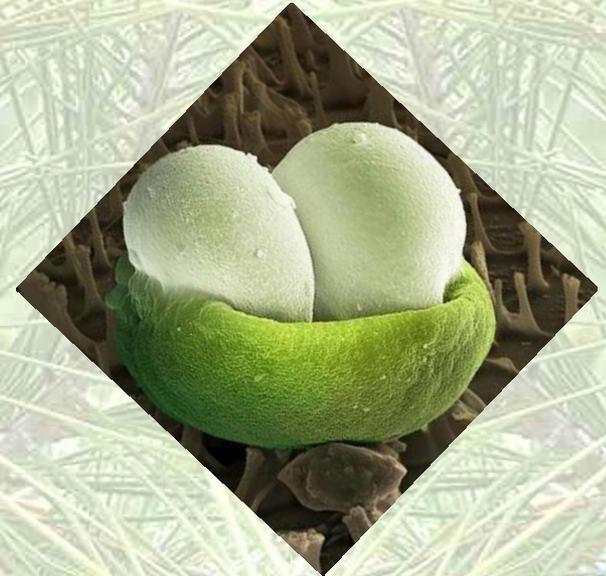
Fruits : cônes constitués d'écailles

Graines : aux aisselles des écailles

Pollen : à ballonnets



40 à 80 μm



Allergénicité du pollen de pin

- **Faible** si ce n'est inexistante: **1,5 à 6%** → 16 références de 1921 à 2016
➤ (Walker 1921; Rowe 1939; Cansen 1946; Charpin et Aubert 1963; Newmark et Itkin 1967; Kinnas 1971; Harris et German. *Ann Allergy* 1985, Kalliel et Settupane *N Engl Reg Allergy Proc.*, 1988, Hosen 1990; Armentia et al. *Ann Allergy* 1990, Fountain et Cornford. *Grana* 1991, Freeman *Ann Allergy* 1993, Antepara et al. *Allergy* 1995, Marcos et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001, Esch et Bush 2003, Gastaminza et al. *Clin Exp Allergy*, 2009, Dominguez-Ortega et al. *Allergy Rhinol.* 2016)
- 1 co-sensibilisation aux pignons de pin
- Réactivités croisées avec l'ivraie (*Lolium perenne*), mais... des IgE spécifiques du pollen de pin
- Co-sensibilisations aux Cupressacées



Pourquoi?

- **Taille/masse** : 40 - 80 μm , dispersion anémophile abondante, **lourd**
- **Enrobage** : couche hydrophobe, peu de protéines extraites



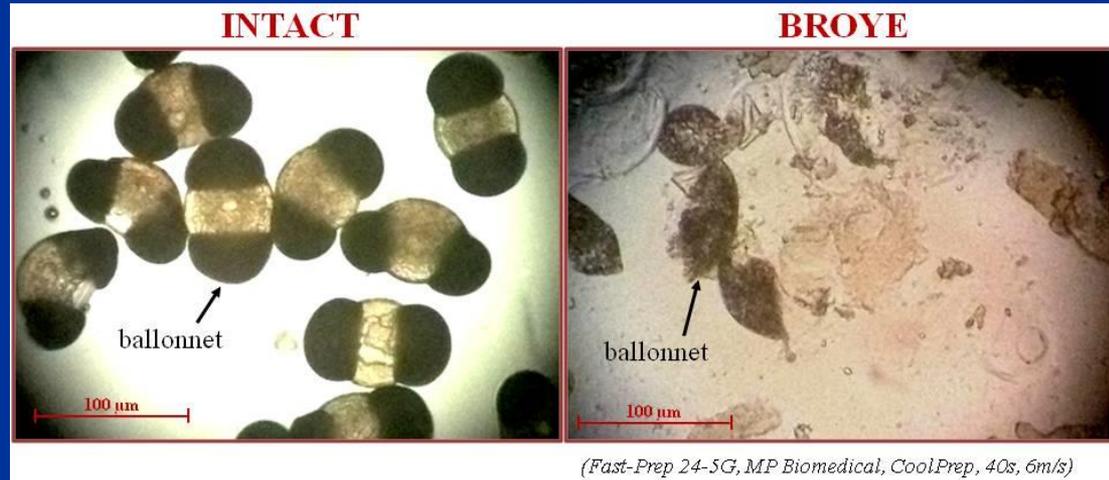
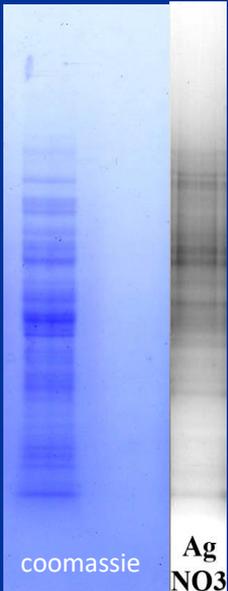
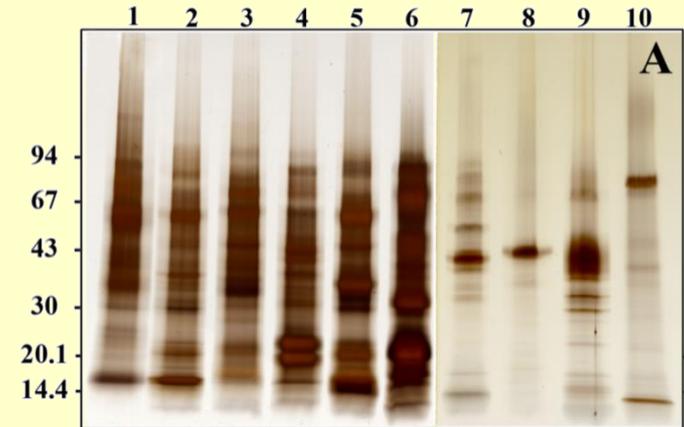
Allergénicité du pollen de pin

➤ **Contenu en protéine:** pauvre? → méthodes d'extraction

Broyage
Multidirectionnel
MPBio

« Conventionnelle »
Incubation des grains en
conditions aqueuses

1. Mais
2. Dactyle
3. Blé
4. Fléole
5. Frêne
6. Bouleau
7. Cyprès de Provence
8. Cyprès d'Arizona
9. Cèdre du Japon
10. Pin sylvestre



➔ 50 à 20 fois plus de protéines extraites

Allergénicité du pollen de pin

- **Faible** si ce n'est inexistante: **1,5 à 6%** → 16 références de 1921 à 2016
➤ (Walker 1921; Rowe 1939; Cansen 1946; Charpin et Aubert 1963; Newmark et Itkin 1967; Kinnas 1971; Harris et German. *Ann Allergy* 1985, Kalliel et Settupane *N Engl Reg Allergy Proc.*, 1988, Hosen 1990; Armentia et al. *Ann Allergy* 1990, Fountain et Cornford. *Grana* 1991, Freeman *Ann Allergy* 1993, Antepara et al. *Allergy* 1995, Marcos et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001, Esch et Bush 2003, Gastaminza et al. *Clin Exp Allergy*, 2009, Dominguez-Ortega et al. *Allergy Rhinol.* 2016)
- 1 co-sensibilisation aux pignons de pin
- Réactivités croisées avec l'ivraie (*Lolium perenne*), mais... des IgE spécifiques du pollen de pin
- Co-sensibilisations aux Cupressacées



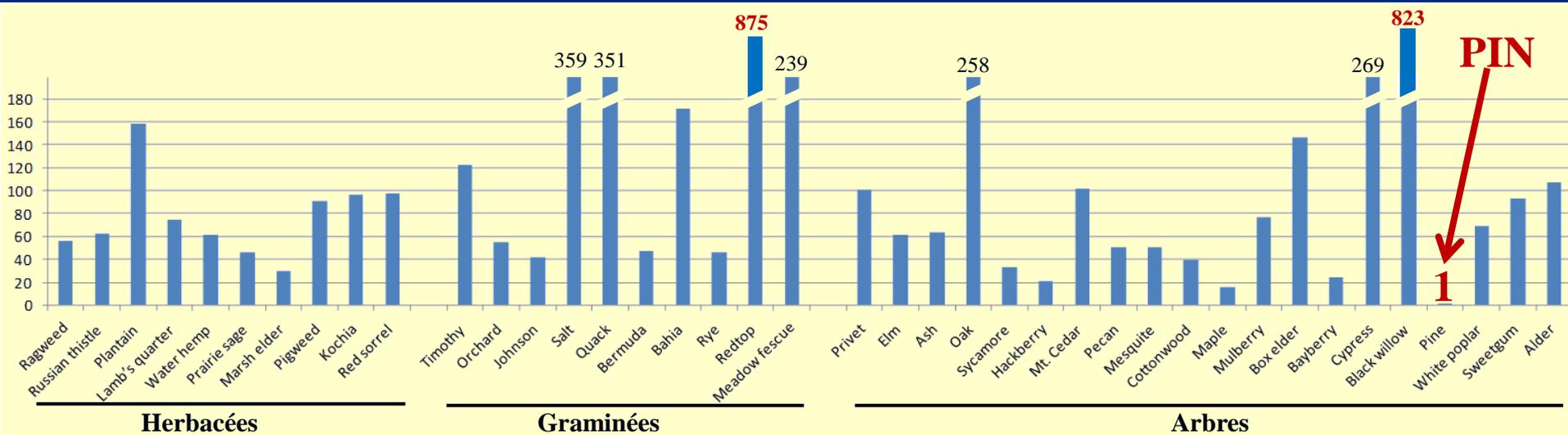
Pourquoi?

- **Taille/masse** : 40 - 80 μm , dispersion anémophile abondante, **lourd**
- **Enrobage** : couche hydrophobe, peu de protéines extraites
- **Co-facteur de l'allergénicité**
 - Potentiel Redox
 - teneur en protéases



Allergénicité du pollen de pin

➤ **Activité redox**, liée au contenu en NADPH oxydase, pro-inflammatoire, co-facteur d'allergénicité. (Boldogh et al. *J Clin Invest.* 2005)



➤ **Contenu en protéases et inhibiteurs de protéases** : moins diversifié dans le pin pris comme un prototype de pollen peu allergénique comparativement au bouleau pris comme un pollen très allergénique

- *Pinus sylvestris* → 7 familles de protéases et inhibiteurs de protéases
- *Betula verrucosa* → 53 familles

Fait en séquençage de mRNA de pollen (Höllbacher et al., *Int J Mol Sci.* 2017)

ALLERGÈNES DU POLLEN DE PIN

-Rien dans les banques de données, ni à l'IUIS, ni chez Allergome ... pour le pollen

| Allergène | FAMILLE DE PROTEINE | kda |
|---|----------------------|-----|
| Pin (<i>Pinus pinea, sylvestris, halepensis, koraiensis, </i>) | | |
| Pin p 1 | 2S albumine (pignon) | 13 |
| Pin k 2 | 7S Vicilin (pignon) | 46 |
| Pin p vicil | 7S Vicilin (pignon) | |
| Pin p 17kd | (pignon) | 17 |

- Etude en **immunoempreinte** → 5 à 6 zones de réactivité IgE

- *Fountain et Cornford. Grana, 1991.*

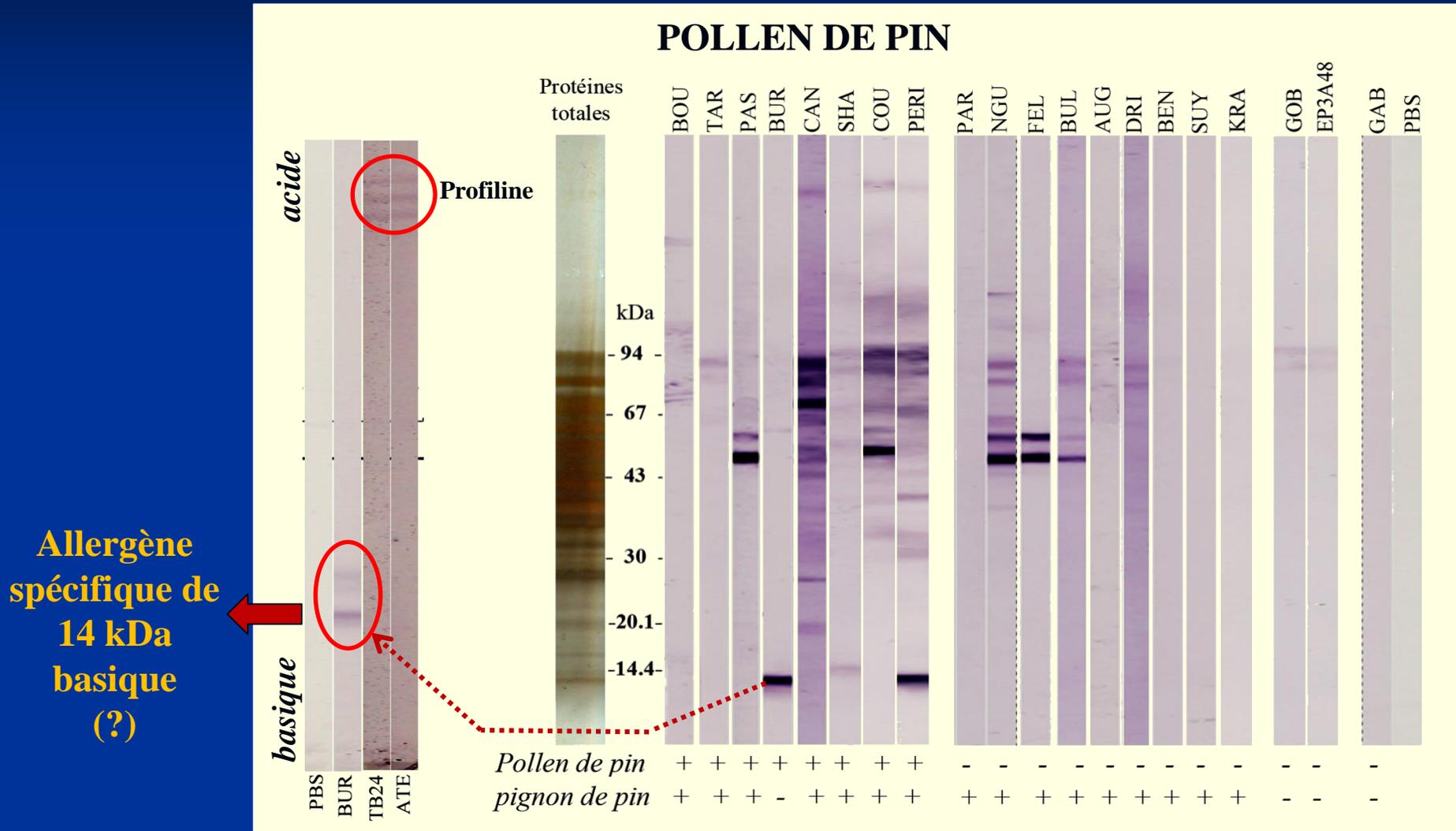
- *Gastaminza et al. Clin Exp Allergy, 2009.*

→ Réactivité croisées avec les Graminées, ... essentiellement dues aux **profilines** et aux **Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD)**

→ mais aussi des **IgE spécifiques** du pollen de pin

Allergènes spécifiques du pollen de pin

Etude de l'immunoréactivité IgE de 8 patients diagnostiqués allergiques au pollen de pin



Allergène spécifique de 14 kDa basique (?)

Electrophorèse
2x1D inverse

1D: SDS-PAGE 8-18%

Analyse 2D des protéines extraites du pollen de pin

acide

basique



kDa

- 94 -

- 67 -

- 43 -

- 30 -

-20.1-

-14.4-

Protéine 14 kDa cationique

3 isoformes

Réminiscentes de la protéine
BP14 du pollen de cyprès



Pollen et allergénicité

Potentiel allergisant

| | Fort | | Modéré | | Faible/Négligeable | |
|------------------------|------------|---------------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| ARBRES | Aulne | Cyprès de Provence | Érable | Troène | Charme-Houblon | Mûrier blanc |
| | Bouleau | Cyprès d'Arizona | Baccharis | Platane | Genévrier | Pin |
| | Charme | Cèdre du Japon | Hêtre | Saule | Thuya | Peuplier |
| | Noisetier | Cade | Chêne | Tilleul | Robinier | If |
| | Frêne | Mûrier à papier | | | Châtaignier | Orme |
| | Olivier | | | | Noyer | |
| HERBACEES SPONTANÉES | Ambroisie | Graminées | Chénopode | Plantain | Marguerite | |
| | Armoise | Pariétaire | Soude brulée | Oseille | Pissenlit | |
| | | | Mercuriale | | Ortie | |
| GRAMINEES ORNEMENTALES | Baldingère | Fétuque | Calamagrostis | Queue de lièvre | | |
| | Canche | Fromental élevé | Elyme des sables | Stipe géante | | |

POLLEN DE CYPRÈS (*Cupressus sempervirens*)

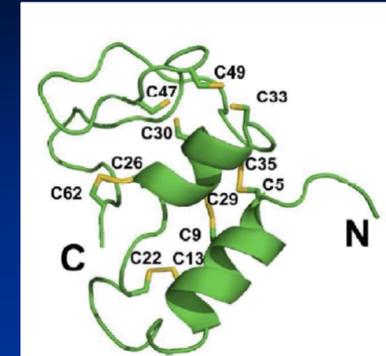


| | <u>Contenu en BP14</u> |
|--|------------------------|
| USA: <i>Juniperus ashei</i> | ++ |
| Japon: <i>Cryptomeria japonica</i> | + |
| Italie: <i>Hesperocyparis arizonica</i> | +/- |
| France: <i>Cupressus sempervirens</i> | +++ |

- Thermostabilité
- Épitopes IgE conformationels
- Épitopes IgE peptidiques

La famille des GRP

Péamacléine



- Petites protéines cationiques aux propriétés **anti-microbiennes**
- **12** cystéines, **6** ponts disulfures
- **Résistantes** à la trypsine et à la chaleur
- Partie N-terminale **variable**, partie C-terminale **conservée**
- Présentes dans les **fruits** et les **plantes**
- Impliquées dans la maturation de la plante, du fruit et aussi du **pollen**, la réponse de la plante au stress biotique (parasite, ...) ou abiotique (froid, sécheresse,...), la transmission de signaux hormonaux , l'équilibre redox, ...
- 4 allergènes de fruits de la famille des GRP



Pru p 7

Péamacléine
Pêche



Pru m 7

Abricot japonais
(Umeboshi)



Cit s 7

Orange
(agrumes)



Pun g 7

Pommacléine
Grenade

- **...et un allergène de pollen : BP14 dans le cyprès**

Sénéchal et al. J Allergy Clin Immunol. 2018. Allergy Asthma Immunol Res. 2019

- Pisoschi et al. Eur J Med Chem, 2018.
- Nahirnak et al. Plant Signal Behav 2012.
- Tanaka et al. Mol Genet Genomics, 2004.
- Kuddus et al. 2016, Protein Expr. Purif

- Tuppo et al. 2013, Clin Exp Allergy;2014, Biopolymers;
2017, J Agric Food Chem
- Inomata et al. 2014,Ann Allergy Asthma Immunol.2016, 2017,
J Dermat, 2018, Clin Exp Allergy, 2017, Immun Inflamm Dis

CONCLUSION

- Une analyse **allergomique** (immunoprotéomique appliquée à l'allergie) à partir **d'extraits optimisés** (broyage multidirectionnel) permet de mettre en évidence des sensibilisations particulières et **spécifiques** vis-à-vis de pollen à fort ou faible potentiel allergisant.
- **Pin**: de nombreuses réactions croisées, dues principalement aux profilines et aux CCD.
- **Ortie**: absence totale de réactivités croisées avec la pariétaire, une plante à fort potentiel allergisant de la même famille botanique.
- Dans les trois cas, des allergènes de la famille des **GRP** sont soit fortement soupçonnés (ortie, pin) ou démontrés (cyprès). Cette famille d'allergènes est impliquée dans les **syndromes pollen/aliment**.
 - Ortie: patient 2 → choc anaphylactique à la soupe d'ortie
 - Pin: Fortes homologues de séquences entre des oléosines de **pignon** et de **pollen de pin**
(*Pasaribu et al. Plant Physiol Biochem. 2017*)
- - Les **gibbérellines** = famille de phytohormones (110) diterpéniques tétracycliques. Parmi les protéines qu'elles régulent se trouvent des **allergènes** (*Tanaka et al. Mol Genet Genomics, 2004*). L'activité des gibbérellines dépend de la température et une faible augmentation de température augmente leur activité (*Patrick Achard, Strasbourg, communication personnelle*). Effet sur la production de GRP? Effet de la **pollution** sur l'activité des gibbérellines?

REMERCIEMENTS



Equipe de recherche « Allergie & Environnement »

Hélène SENECHAL
Marie-Ange SELVA

Sanaz KEYKHOSRAVI
Mahdokht MOSSALAEI

Rémy COUDERC

Jean-Pierre SUTRA
Olga RIVERA
Cyril LONGE
Maxime ALTER
Noémie GIRARD
Margaux ALLAIN
Alexis GOMES
Juliette ANDRIEU

Youcef SHAHALI
Andrea BRAZDOVA
Meng-Yu LI
Kimberley DINARD
Maxime DUBAIL
Oumsaad NAAS
Daniele GOMES

Jocelyne JUST

Nos collègues français,
italiens, tchèques,
japonais, luxembourgeois

Les **massistes** de
Chatenay Malabry, de
Cochin, de l'ESPCI, de
l'Institut Pasteur

Les **cliniciens** de France
(Paris et Province) et
d'Italie

Les **biologistes** de France
(Paris et Province)



TROUSSEAU
LA ROCHE-GUYON