12e Congrès Francophone d'Allergologie
Paris, Palais des Congrès Porte Maillot
25 au 28 avril 2017

BP14, allergène du pollen de *Cupressus sempervirens* apparenté à la famille des snakin/gibberellin-regulated protein

All-19

Le « chaînon manquant » de la réactivité croisée avec la pêche et les agrumes?

H. SÉNÉCHAL[1], J. SANTRUCEK[2], M. MELCOVA[2], P. SVOBODA[2], J. ZIDKOVA [2], L. GUILLOUX[3], M-A. SELVA[1], Y. SHAHALI[4], T. AIZAWA[5], R. COUDERC[1], D. CHARPIN[6], et P. PONCET[1,7]

1: Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, AP-HP, Laboratoire de Biochimie, Allergie & Environnement, Paris; 2: Université de Chimie et de Technologie, Prague, République Tchèque; 3: Eurofins-Biomnis, Lyon, France, 4: Razi Vaccine and Serum Research Institute; AREEO, Karaj, Iran 5: Ecole Supérieure des Sciences de la Vie, Université d'Hokkaido, Sapporo, Japon; 6: Departement de Pneumonologie et d'Allergie, Hôpital Nord de Marseille et Inserm UMR 600, CNRS UMR 6212, Université d'Aix-Marseille, France; 7: Institut Pasteur, CITECH, Paris.

INTRODUCTION

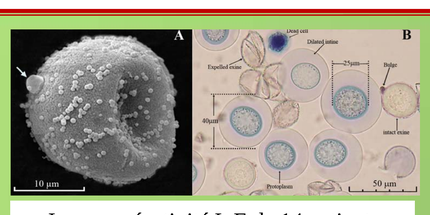
Pollinose au cyprès: 9 à 65 % des patients polliniques

Espèces de cyprès: *Cupressus sempervirens, Hesperocyparis arizonica, Cryptomeria japonica, Juniperus ashei*, etc...

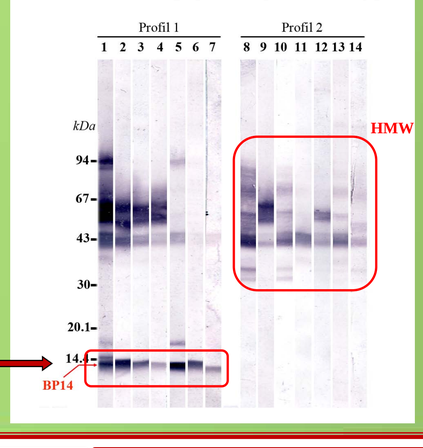
Allergènes de cyprès: groupe 1: pectate lyase
groupe 2: polygalacturonase
groupe 3: " thaumatin-like protein "
groupe 4: " Ca-binding protein "

et **BP14, un allergène de 14kDa basique**

Allergie au cyprès dans le monde



Immunoréactivité IgE de 14 patients sélectionnés allergiques au pollen de cyprès



Réactivités croisées décrites

Pêche

- *Hugues et al. (2006) Allergy*
- *Delimi et al. (2007) Rev Fr Allergol Clin Immunol*
- *Caimmi et al. (2013) Allergy*

Agrumes

- *Martinez et al. (2015) Rev Fr Allergol*
- *Martinez et al. (2015) CFA, EAACI*

BP14 : membre des snakin/Gibberellin-regulated protein

MS

PROTEINE					PEPTIDE
Accession	**Nom**	**Species**	**MW [kDa]**	**pI**	**Sequence**
P86888	Peamaclein	*Prunus persica*	6.9	8.6	K.YCGICCEK.C R.CLKYCGICCEK.C
A0A061FGF7	Gibberellin-regulated protein	*Theobroma cacao*	11.4	10.1	R.CLKYCGICCK.K

➔ Comme la peamacléine, l'allergène Pru p 7 de la pêche

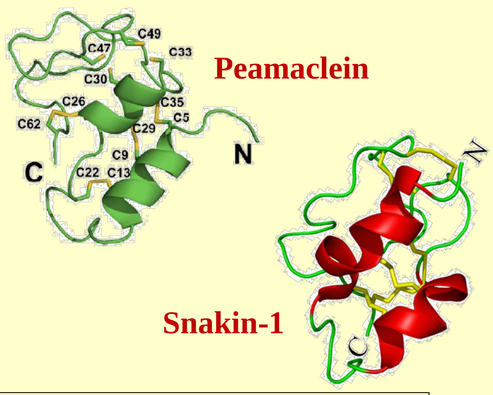
Alignement de séquences

```
   Pêche: Peamaclein (Pru p 7): ---------- ---------- -----GSSFC DSKCGVRCSK AGYQERCLKY 25
Grenade: Pommaclein (Pun g 7) : ---------- ---------- -----GSSFC DSKCAVRCSK AGVQD      15
      Pomme de terre: Snakin : ---------- ---------- -----GSSFC DSKCKLRCSK AGLADRCLKY 15
         Theobroma cacao: GRP: MKLILVTFLL VSLVLSSSFF EVSMAGSGFC DSKCKVRCSK AGAKDRCLKY 40
             Orange (Cit s 7): MKLGFATFLL VCLLLSSSVF EVTMAGSSFC DSKCGVRCSK AGYQERCLKY 40
    Abricot japonais (Pru m 7): confidentiel avant publication

   Pêche: Peamaclein (Pru p 7): CGICCEKCHC VPSGTYGNKD ECPCYRDLKN SKGNPKCP-- -----     63
Grenade: Pommaclein (Pun g 7):                     KD ECPCYRDAKN SKGXPKCX-- -----     63
      Pomme de terre: Snakin : CGICCEECKC VPSGTYGNKH ECPCYRDKKN SKGKSKCP-- -----     63
         Theobroma cacao: GRP: CGICCKKCKC VPSGTYGNKQ ECPCYRDMKN SKGQLALAGL NCTQR     95
             Orange (Cit s 7): CGICCEKCHC VPSGTYGNKD ECPCYRDLKN SKGNPKCP-- -----     88
```

La famille des snakin/GRP

- Petites protéines cationiques aux propriétés anti-microbiennes
- 12 cystéines, 6 ponts disulfures
- Résistantes à la trypsine
- Partie C-terminale conservée, partie N-terminale variable
- Présentes dans les fruits et les plantes
- Impliquées dans la maturation du pollen, la réponse de la plante au stress biologique (ex: parasite) ou autre (ex: pollution), la transmission de signaux hormonaux , l'équilibre redox, …
- La péamacléine partage 82% d'identité avec la snakin-1 de pomme de terre
- **4 GRP = allergènes dans des fruits:** Pru p 7: pêche (*Prunus persica*), Cit s 7: orange (*Citrus sinensis*), Pru m 7: abricot japonais (*Prunus mume*), Pun g 7: grenade (*Punica granatum*)



- *Tuppo et al. 2012, Clin Exp Allergy; 2014, Biopolymers; 2017, J Agric Food Chem*
- *Inomata et al. 2017, J Dermat*
- *Kuddus et al. 2016, Protein Expr. Purif*

Données cliniques des patients

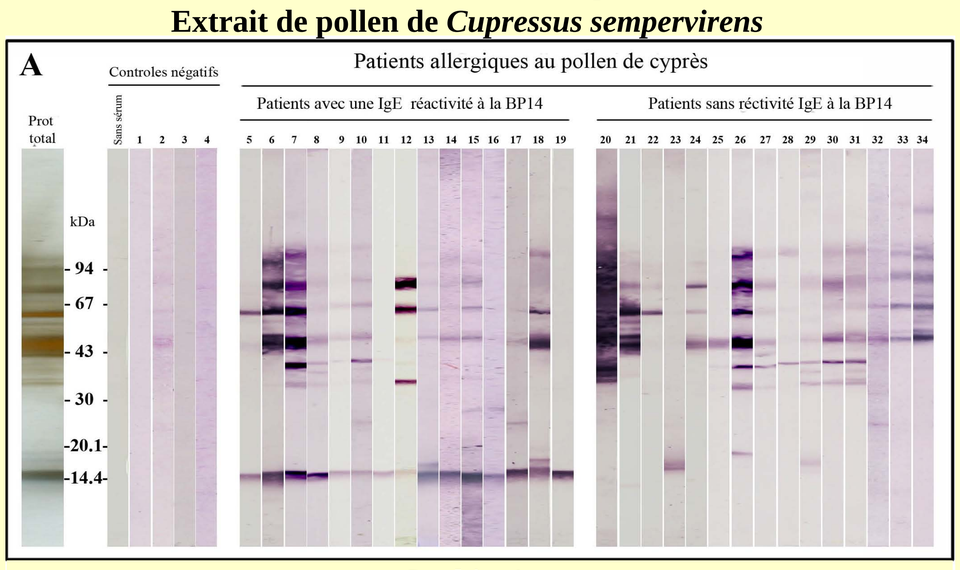
Serum #	Genre	Age	IgE spécifiques (kU/L)			
			Pollen de Cup s	pêche	Agrume	Autres sensibilisations
1	H	67	NF	NF	NF	contrôle negatif: non atopique, non allergique
2	H	4	0,35	1,8	NF	pomme de terre: 1,22
3	H	47	<0,10	NF	NF	pollen d'ortie: 9,84
4	F	26	<0,10	NF	NF	pollen de pin +
5	H	19	10,2	2,62	1,09	moutarde: 3,29; acariens<0,10
6	F	3	26	1,8	NF	graminée: 87,5; herbacée: 28,6; acariens: 0,23
7	H	3	6,99	14,7	3,08	pois: 4,4; lentille: 4,2
8	H	30	11,5	<0,10	0,14	Juniperus: 40,1; squame: 1,8; acariens: 0,3
9	H	14	2,27	0,29	<0,10	Juniperus: 13,6; citrouille: 9,8
10	F	17	4,89	0,6	0,55	herbacée: 3,2; olivier: 11,4
11	H	21	2,86	<0,10	<0,10	graminée: 1,8; olivier: 0,69; acariens: 17,0
12	H	44	4,33	0,11	<0,10	graminée: <0,10; herbacée: 0,16
13	F	31	5,82	NF	3,96	
14	F	17	8,39	0,41	0,43	graminée: 0,26
15	H	13	+	NF	+	
16	F	25	7,5	+	0,76	
17	F	31	10,9	NF	2,34	
18	F	39	59,8	<0,10	NF	C, arizonica: 36,7; J ashei>100; acariens 1,7
19	F	48	4,66	0,98	1,44	curry: 1,19; coriandre: 0,74; gluten: 0,49
20	H	42	23,1	21,7	15,6	graminée: 26,7; mimosa: 1,44; squame: 5,3
21	H	72	21,6	0,57	0,87	graminée: 2,21; squame: 5,96
22	H	10	8,15	0,18	0,29	graminée: 24,4
23	H	13	11,8	6,41	3,85	herbacée: 36,9; chêne: 35,5
24	H	19	8,15	<0,10	<0,10	graminée: 0,11
25	F	21	0,88	<0,10	<0,10	graminée: <0,10; squame: <0,10; acariens: 12,0
26	F	11	12,1	5,2	4,57	Ara h 8: 9,6; Ara h 9: 4,7; graminée: 8,2; olivier: 75,5; squame: 3,3; acariens 50,7
27	H	5	3,35	<0,10	<0,10	herbacée: 0,1; acariens: 0,3
28	H	41	1,54	<0,10	<0,10	mimosa: <0,10
29	H	11	8,8	4,69	8,15	pois, lentille, pois chiche>100; graminée: >100; olivier: 18,0; squame: 7,7
30	H	55	1,11	0,7	0,72	graminée: 1,4; herbacée: 4,8; acariens: 10,9
31	F	48	0,47	0,35	0,35	graminée: 0,48; acariens: 0,11
32	H	*inconnu*	51,36	<0,10	NF	NF
33	F	37	3,62	0,12	0,16	graminée: 0,18; herbacée: 0,16
34	H	21	13,7	0,49	0,45	graminée: 40,3; herbacée: 0,59
35	F	44	13,1	NF	<0,10	herbacée: 0,17; squame: 13,0; acariens: <0,10

NF: non fait +: évaluation qualitative

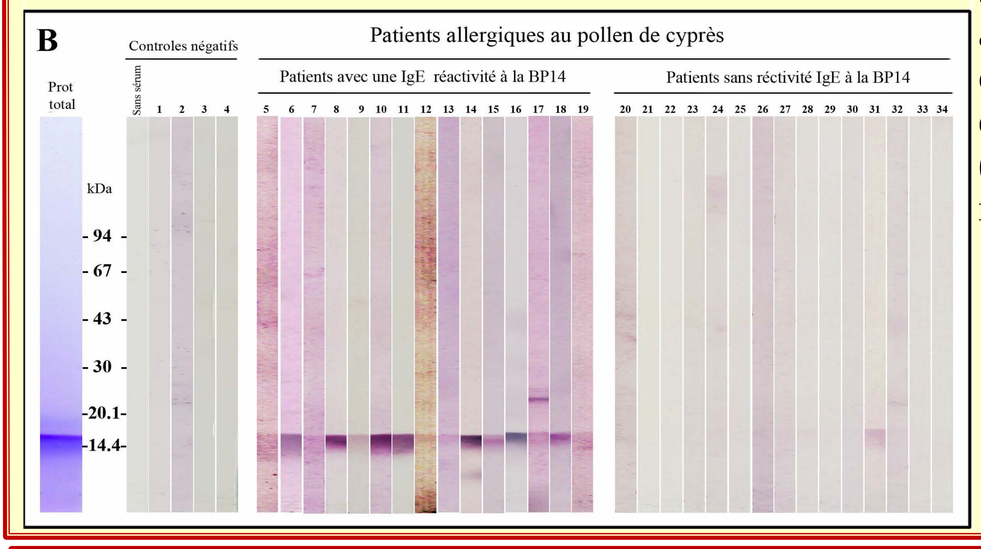
IMMUNORÉACTIVITÉS IgE

SDS-PAGE 8-18% + immunoempreintes

Extrait de pollen de *Cupressus sempervirens*



Snakin-1



30 sérums de patients allergiques au pollen de cyprès sont testés sur extrait de pollen de *C. sempervirens* (A) ou sur snakin-1 recombinante purifiée (B).

15 serums BP14+ (5 à 19) et 15 sérums BP14- (20 à 34)

➔ **Tous les patients BP14+ sont snakin+**

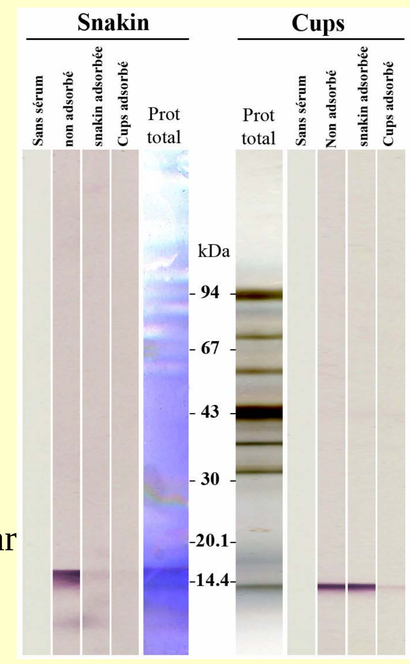
Protocole d'inhibition

Inhibitions croisées réalisées par adsorption (déplétion) de sérum de patient allergique sur:

1 - extrait de pollen de *C. sempervirens* (Cups) ou snakin-1 « dotté » sur nitrocellulose

2 - BP14 ou snakin-1 séparées par électrophorèse et transférées sur nitrocellulose

INHIBITIONS CROISÉES



➔ **BP14 inhibe la réactivité sur snakin-1 mais la snakin-1 n'inhibe pas la réactivité sur BP14**

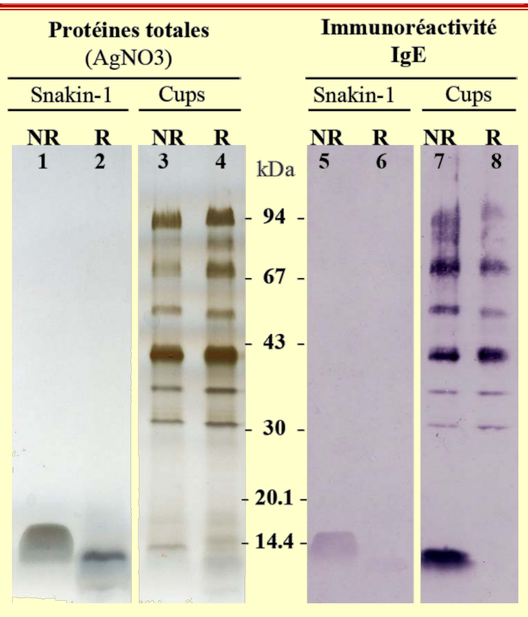
Sérum #	Réactivité IgE sur:	Immunoadsorbant utilisé: snakin-1	Immunoadsorbant utilisé: extrait de pollen de cyprès
5	snakin-1	+	+
	BP14 dans fraction basique	-	+
12	snakin-1	+	+
	BP14 dans fraction basique	-	+
14	snakin-1	+*	+†
	BP14 dans extrait total	-	+
	BP14 dans fraction basique	-*	+†
16	snakin-1	NF	NF
	BP14 dans fraction basique	-	+
19	snakin-1	+	+
	BP14 dans fraction basique	-	+

Réultats identiques obtenus avec le sérum adsorbé soit sur *:snakin ou †: BP14 transférées sur nitrocellulose; NF: non fait

La réduction (β-mercapto éthanol) de la snakin-1 diminue sa masse moléculaire apparente et abolie la réactivité IgE… comme pour BP14.

R : réduit, NR : Non réduit,
Cups :*C. sempervirens*
Sérum utilisé N° 7

➔ **Les repliements de la protéine dus aux ponts disulfures conditionnent des épitopes IgE conformationnels**



CONCLUSION: Nous montrons, pour la première fois, qu'un **allergène de pollen** appartient à la famille des **snakin/GRP** et présente une réactivité croisée avec d'autres membres de cette famille de protéines se trouvant dans les végétaux et les fruits. Ces résultats pourraient expliquer les syndromes décrits **cyprès/pêche** et **cyprès/agrumes** en impliquant Pru p 7 et Cit s 7, deux allergènes de la famille des snakin/GRP décrits respectivement dans la pêche et l'orange. Ainsi, la famille de protéine snakin/GRP correspondrait à une nouvelle famille de protéine impliquée dans les **syndromes allergiques pollen/aliment** *(Charpin et al. 2017, Clin Rev Allergy Immunol).*