

Concentration des LTP dans la peau et la pulpe des fruits

Localization and distribution of LTP allergens in the skin and pulp of fruits

A. Barre^{a,*}, C. Brulé^a, J.-P. Borges^a, R. Culerrier^a, A. Jauneau^a,
A. Didier^b, P. Rougé^{a,c}

^a UMR-CNRS 5546, surfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux, université Paul-Sabatier, université de Toulouse,
24, chemin de Borde-Rouge, BP 17, 31326 Castanet-Tolosan cedex, France

^b Clinique des voies respiratoires, centre hospitalier universitaire de Larrey, 24, chemin de Pouvoirville, 31059 Toulouse cedex 09, France

^c Faculté de pharmacie, 35, chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex 09, France

Disponible sur Internet le 4 mars 2009

Résumé

Les principaux allergènes des fruits de Rosacées (Prunoidées) correspondent à des protéines de défense (protéines *pathogenesis-related* [PR]) qui sont essentiellement exprimées en réponse à l'attaque de la plante par un champignon phytopathogène. Il s'agit des protéines de transfert des lipides (LTP), des 1,3 β -glucanases et des protéines *thaumatin-like* (TLP), qui appartiennent respectivement aux familles des protéines PR-14, PR-2 et PR-5. La LTP de pomme (Mal d 3) est principalement localisée dans la peau du fruit et la peau de certaines variétés de pomme (Granny Smith, Golden delicious, Fuji) est particulièrement riche en LTP. La chair du fruit en renferme beaucoup moins. La LTP de pêche (Pru p 3) s'accumule essentiellement dans les poils formant le revêtement duvetueux du fruit. En pratique, l'épluchage de ces fruits réduit considérablement l'apport de LTP aux personnes sensibilisées. En revanche, la cuisson des fruits n'offre aucun intérêt en raison de l'extrême résistance des LTP à la dénaturation thermique. Dans d'autres fruits, prune (Pru d 3) et abricot (Pru ar 3), les LTP sont aussi abondantes dans la peau que dans la chair et l'épluchage de ces fruits ne réduit en rien leur allergénicité. Des résultats préliminaires semblent indiquer que les fruits issus de l'agriculture biologique possèdent des teneurs en LTP supérieures à celles observées dans les fruits issus de l'agriculture traditionnelle. Dans les pays du pourtour Méditerranéen, l'Espagne et l'Italie en particulier, l'allergie à la pêche (Pru p 3) s'accompagne souvent de réactions anaphylactiques sévères.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Protéines de transfert des lipides (LTP) ; Mal d 3 ; Pru p 3 ; Localisation dans les fruits ; Teneur en LTP des fruits

Abstract

The principal allergens of Rosaceae (Prunoideae) fruit consist of Pathogenesis-Related proteins (PR proteins) which are essentially expressed in response to attacks on the plant by a phytopathogenic fungus. They include Lipid Transfer Proteins (LTP) of the PR-14 family, 1,3 β -glucanases of the PR-2 family, and Thaumatin-Like Proteins (TLP) of the PR-5 family. Apple LTP (Mal d 3) is mainly located in the skin of apple, including the skin of several apple cultivars, i.e., Granny Smith, Golden delicious, and Fuji, which are particularly rich in LTP; the pulp of this fruit contains much less LTP. The LTP of the peach, Pru p 3, essentially concentrates in the downy hairs covering the fruit. As a practical consequence, peeling this fruit reduces considerably the amount of LTP to which sensitized individuals would be exposed. Conversely, cooking the fruit is of no interest because of the extreme resistance of LTP to thermal denaturation. In other Prunoideae fruits, e.g., plum (Pru d 3) and apricot (Pru ar 3), the LTP content of the skin and pulp of these fruits is very similar, so that peeling them does not reduce their allergenicity. Preliminary results suggest that fruit produced in biological farming have a higher LTP content compared to fruit produced in conventional farming. In Mediterranean countries, especially Spain and Italy, allergy to peach (Pru p 3) is often responsible for severe anaphylactic reactions.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Fruit allergens; Lipid Transfer Protein; Skin; pulp; Mal d 3; Pru p 3

1. Introduction

L'allergie aux fruits de Rosaceae (Prunoidées) occupe une place particulièrement importante dans les allergies de l'enfant

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : barre@scsv.ups-tlse.fr (A. Barre).

et de l'adulte. Dans les pays du pourtour Méditerranéen, l'Espagne et l'Italie notamment, l'allergie à la pêche déclenche souvent des réactions anaphylactiques généralisées sévères [1]. En revanche, dans le Nord de l'Europe, ce type d'allergie s'accompagne généralement de réactions bénignes (picotement autour des lèvres) [2]. Les allergènes responsables correspondent à des protéines de défense que les plantes synthétisent en réponse à une agression par un champignon phytopathogène [3]. Ces protéines, appelées protéines *pathogenesis-related* (PR), sont essentiellement représentées par des protéines de transfert des lipides ou *lipid transfer protein* (LTP), des 1,3 β -glucanases et des protéines thaumatin-like ou TLP. Elles appartiennent respectivement aux groupes des protéines PR-14 (LTP), PR-2 (glucanases) et PR-5 (TLP) [4]. Parmi ces allergènes, les LTP sont certainement les allergènes les plus redoutables, responsables en particulier des réactions anaphy-

lactiques sévères observées dans l'allergie à la pêche. De nombreuses LTP ont été identifiées dans la pêche (Pru p 3), la pomme (Mal d 3), l'abricot (Pru ar 3), la cerise (Pru ar 3), la prune (Pru d 3) et la poire (Pyr c 3). Dans ces fruits, les LTP correspondent à des protéines constitutives (synthétisées continuellement) mais dont le taux augmente fortement en réponse à l'attaque de la plante par un champignon phytopathogène [5].

2. Les LTP se localisent essentiellement dans la peau des fruits

Dans la pomme, Mal d 3 se localise essentiellement dans les assises cellulaires superficielles du fruit [6] comme l'indiquent les immuno-empreintes effectuées sur des coupes de fruits à l'aide d'anticorps anti-Mal d 3 (Fig. 1A,B). Cette localisation

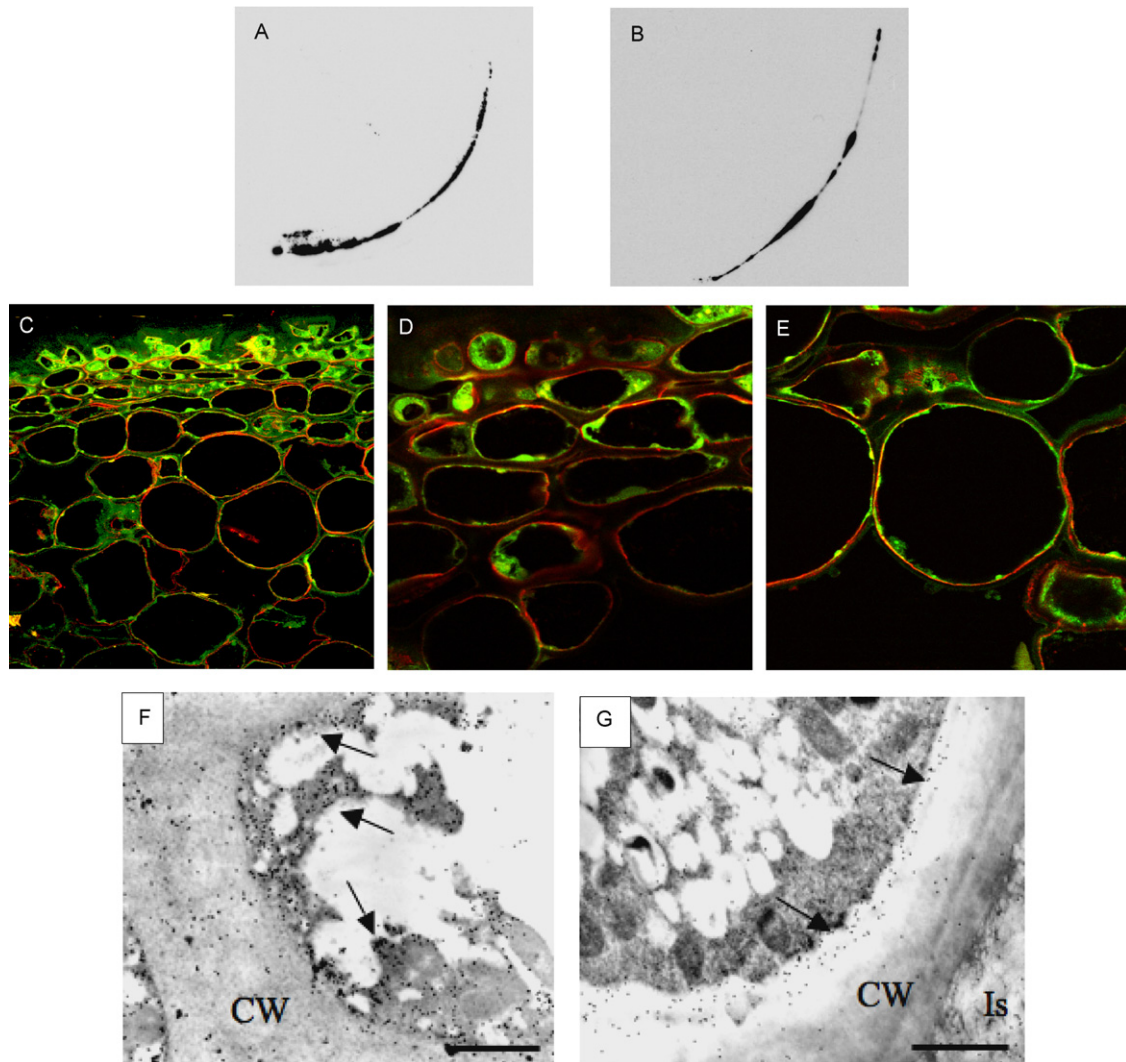


Fig. 1. A, B. Localisation de Mal d 3 dans la peau de pomme Pink Lady (A) et Golden delicious (B) par immuno-empreinte à l'aide d'anticorps anti-Mal d 3. C, D, E. Localisation en immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-Mal d 3 marqués de Mal d 3 dans une coupe de fruit (C), une coupe effectuée au niveau des assises superficielles du fruit (D) et dans une coupe effectuée au niveau de la pulpe (chair) du fruit (E). La fluorescence est rouge, l'auto fluorescence est verte. F, G. Localisation en microscopie électronique de Mal d 3 dans le cytoplasme (flèches) et dans la paroi (*cell wall* [CW]) des cellules (flèches) de la peau (F) et de la pulpe (G) du fruit. L'anticorps anti-Mal d 3 est révélé à l'aide d'une antiglobuline couplée à l'or colloïdal (10 nm). Les grains d'or denses aux électrons (granules sombres sur les photos) indiquent la localisation de Mal d 3 dans le fruit.

Tableau 1

Teneur en LTP (exprimée en µg/g de tissu frais) de la peau et de la pulpe de fruits. Les résultats indiqués correspondent à des moyennes mesurées sur trois lots de fruits différents.

Fruit	LTP/peau (µg/g)	LTP/pulpe (µg/g)	Rapport peau/pulpe
Granny Smith	17,3	0,5	34,6
Golden delicious	12	0,9	13,3
Chanteclerc	12,4	1,2	10,3
Fuji	9	1,1	8,2
Pink Lady	7,9	1,1	7,1
Reinette Canada	2	0,5	4
Bertanne	2	0,6	3,3
Royal Gala	3,3	1,2	2,8
Red Chief	3,4	1,8	1,9
Pêche jaune ^a	8,4	3,4	2,5
Pêche jaune ^b	5,2	3,2	1,6
Abricot	1,8	1,6	1,1
Prune jaune	1,5	1,7	0,9
Prune rouge	1,5	1,7	0,9

Dosages effectués avant lavage (^a) et après lavage à l'eau (^b) de la peau.

préférentielle dans la peau du fruit est confirmée par un examen en microscopie de fluorescence à l'aide d'anticorps anti-Mal d 3 et d'antiglobulines couplées à un fluorochrome (Fig. 1C,D). Cet examen révèle également la présence de Mal de 3 dans la pulpe (Fig. 1E). L'examen de coupes de fruits en microscopie électronique après marquage avec des antiglobulines couplées à des particules d'or colloïdal (10 nm) montre que la LTP est excrétée par les cellules de la peau et de la pulpe et se localise contre la paroi cellulaire (Fig. 1F,G). On observe une localisation très voisine dans la pêche mais, dans ce cas, Pru p 3 s'accumule principalement dans les poils qui constituent le revêtement duvetoux du fruit. La pulpe renferme beaucoup moins de LTP.

3. Des teneurs en LTP très disparates suivant les fruits

Cette disparité entre les teneurs en LTP de la peau et de la pulpe est confirmée par le dosage des LTP dans la peau et la pulpe de pomme et de pêche (Tableau 1). Elle atteint des valeurs très élevées dans certains cultivars de pomme comme la Granny Smith (34 fois plus de LTP dans la peau que dans la pulpe), la Golden Delicious (13 fois plus de LTP dans la peau que dans la pulpe), la Fuji (huit fois plus de LTP dans la peau que dans la pulpe) ou la Pink Lady (sept fois plus de LTP dans la peau que dans la pulpe). Dans les autres cultivars de pomme ces disparités sont plus atténuées. Cette disparité concerne également la pêche dont la peau renferme deux à trois fois plus de LTP que la pulpe (Tableau 1). En revanche, les teneurs en LTP de l'abricot (Pru ar 3) et de la prune (Pru d 3) sont équivalentes (Tableau 1). Cette disparité entre peau et pulpe a été confirmée pour différents cultivars de pomme par d'autres équipes [7–11].

Ces résultats, obtenus sur des fruits issus de la grande distribution (fruits achetés dans des supermarchés locaux), doivent être confirmés sur d'autres échantillons de différentes provenances. Ils sont également susceptibles de varier en

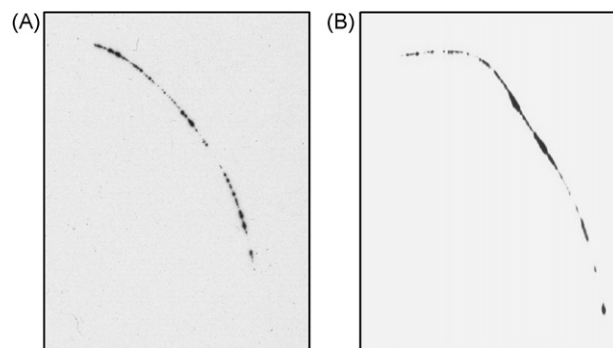


Fig. 2. Immuno-empreintes de pomme Fuji « non Bio » (A) et « Bio » (B) réalisées à l'aide d'anticorps anti-Mal d 3.

fonction de l'état physiologique des fruits (maturation) [12], des traitements subis par les arbres fruitiers avant récolte (pesticides, insecticides) et du conditionnement des fruits après récolte (maturation accélérée, conservation en chambre froide) [13]. Tous ces paramètres pourraient avoir une incidence sur la teneur finale en allergènes des fruits délivrés au consommateur.

4. Les fruits issus de l'agriculture biologique plus riches en LTP ?

L'engouement actuel pour les produits issus de l'agriculture biologique nous a incité à étudier la teneur en LTP de fruits « Bio », dans la mesure où la teneur en LTP est susceptible d'augmenter dans des fruits davantage soumis à des attaques fongiques que ne le sont les fruits issus de la grande distribution a priori mieux protégés (pesticides) contre ce type d'attaque. Des résultats préliminaires d'immuno-empreintes (Fig. 2) et de dosage Elisa des LTP de fruits « Bio » et « non Bio » (Tableau 2), montrent un enrichissement en LTP de certains fruits « Bio » (pomme, prune) tandis que d'autres fruits « Bio » (pêche, nectarine) ont des taux de LTP identiques à ceux des fruits « non Bio ». Les disparités observées dépendent manifestement des conditions de culture (attaque plus ou moins importante par des phytopathogènes, variations climatiques plus ou moins propices à cette attaque) auxquelles sont soumis les fruits « Bio » avant récolte.

Tableau 2

Teneur en LTP (exprimée en µg/g de tissu frais) de la peau et de la pulpe de fruits « Bio » et « non-Bio ».

Fruit	Culture	LTP/peau (mg/g)	LTP/pulpe (mg/g)	Rapport peau/pulpe
Royal Gala	Bio	5	1,2	4,1
	Non Bio	3,3	1,2	2,8
Prune rouge	Bio	4,7	1	4,7
	Non Bio	1,5	1,7	0,9
Pêche jaune	Bio	0,3	0,1	3
	Non Bio	0,3	0,1	3
Nectarine jaune	Bio	0,3	0,1	3
	Non Bio	0,2	0,08	2,5

Les résultats indiqués correspondent à des moyennes mesurées sur trois lots de fruits différents.

5. Conclusion

Les LTP des fruits de Rosacées correspondent à des allergènes de surface qui se localisent à l'extérieur des cellules. Dans la pomme (Mal d 3) et la pêche (Pru p 3), les LTP s'accumulent principalement dans la peau des fruits au détriment de la pulpe dont la teneur en LTP reste beaucoup plus faible. Cette disparité entre la peau et la pulpe peut être très importante dans certaines variétés comme la Granny Smith, la Chanteclerc ou la Fuji. L'épluchage de ces fruits avant consommation est à recommander aux sujets modérément sensibilisés. En revanche, dans d'autres fruits (prune ou abricot), les teneurs en LTP de la peau et de la pulpe sont équivalentes et l'épluchage des fruits n'offre ici aucun intérêt. En raison de l'extrême résistance des LTP à la dénaturation thermique [14,15], la cuisson préalable des fruits n'entraîne aucune réduction de leur teneur en allergènes actifs.

En raison de leur implication dans la défense des plantes en tant que protéines PR, les LTP s'accumulent davantage dans les fruits infectés par des champignons phytopathogènes que dans les fruits sains. Ce comportement explique les teneurs en LTP plus importantes observées dans des fruits issus de l'agriculture biologique mais cette accumulation dans les fruits « Bio » n'est pas systématique et dépend vraisemblablement des conditions de culture et des conditions climatiques auxquelles ces fruits ont été soumis durant leur maturation. Malgré tout, la consommation de fruits « Bio » (de prunes en particulier) n'est pas à conseiller aux personnes allergiques.

Enfin, au-delà des teneurs en LTP mesurées dans les fruits de Rosacées, il faut noter que ces allergènes correspondent à des pan-allergènes très conservés d'une espèce à l'autre. Les LTP de Rosacées possèdent en particulier des épitopes B consensuels susceptibles de générer de nombreuses réactions croisées [16]. Cette propriété des LTP est à prendre en compte lorsqu'il s'agit d'établir un régime d'éviction dans les cas d'allergie sévère, à la pêche par exemple.

Remerciements

Ce travail a bénéficié (A.B.) du soutien financier de la SFAIC.

Références

- [1] Fernández-Rivas M, González-Mancebo E, Rodríguez-Pérez R, Benito C, Sánchez-Monge R, Salcedo G, et al. Clinically relevant peach allergy is

related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:789–95.

- [2] Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:481–8.
- [3] Fritig B, Heitz T, Legrand M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* 1998;10:16–22.
- [4] Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002;30:930–5.
- [5] Kader JC. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996;47:627–54.
- [6] Borges JP, Jauneau A, Brulé C, Culerrier R, Barre A, Didier A, et al. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol Biochem* 2006;44:535–42.
- [7] Carnés J, Fernández-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A, Cuesta-Herranz J. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy* 2002;57:1071–5.
- [8] Marzban G, Puerhinger R, Dey R, Brynda S, Ma Y, Martinelli A, et al. Localization and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci* 2005;169:387–94.
- [9] Asero R, Mistrello G, Amato S, Roncarolo D, Martinelli A, Zaccarini M. Peach fuzz contains large amounts of lipid transfer protein: is this the cause of the high prevalence of sensitization to LTP in Mediterranean countries? *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;38:118–21.
- [10] Ahrazem O, Jimeno L, López-Torrejón G, Herrero M, Espada JL, Sánchez-Monge R, et al. Assessing allergen levels in peach and nectarine cultivars. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99:42–7.
- [11] Sancho AI, van Ree R, van Leeuwen A, Meulenbroek BJ, van de Weg EW, Gilissen LJ, et al. Measurement of lipid transfer protein in 88 apple cultivars. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:19–26.
- [12] Brenna OV, Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Pompei C. Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. *J Agric Food Chem* 2004;52:7997–8000.
- [13] Sancho AI, Foxall R, Rigby NM, Browne T, Zuidmeer L, van Ree R, et al. Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a non-specific lipid transfer protein. *J Agric Food Chem* 2006;54:5098–104.
- [14] Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel Moncin M, Retzek M, Hartz C, et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:900–7.
- [15] Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S, et al. The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy* 2005;60:1262–8.
- [16] Borges J-P, Barre A, Culerrier R, Granier C, Didier A, Rougé P. Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:685–90.