



Les épitopes pour les nuls

Sandra Denery

► To cite this version:

Sandra Denery. Les épitopes pour les nuls. Rencontres francophones d'allergologie moléculaire, Allergie France., Nov 2016, Paris, France. hal-01603569

HAL Id: hal-01603569

<https://hal.science/hal-01603569>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



Les épitopes pour les nuls

Sandra DENERY



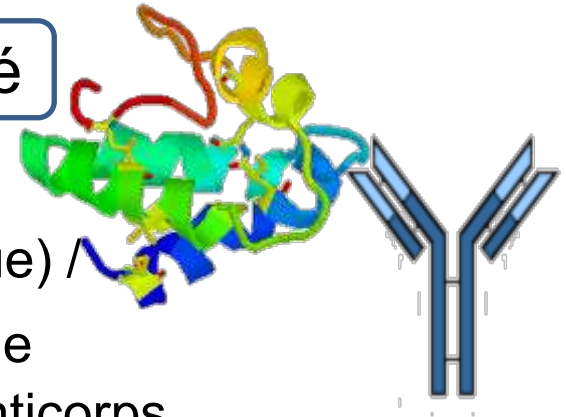
Unité BIA INRA Nantes
Equipe Allergie

Comment définit-on un épitope ?

Définition fonctionnelle – notion d'antigénicité

L'épitope B (déterminant antigénique) /
↔ interaction anticorps - antigène
zone reconnue par le paratope d'un anticorps

↔ Entité relationnelle



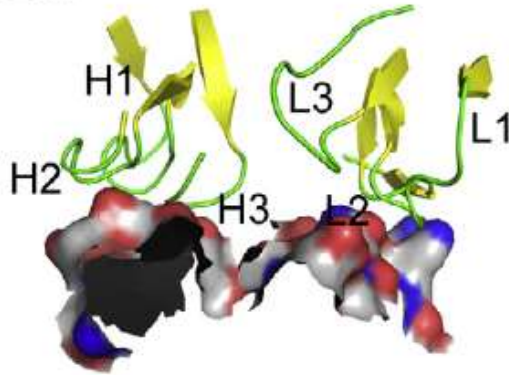
Ex : nombre d'épitopes d'une protéine dépend du nombre d'Ac que l'on peut produire

L'épitope T : peptide issu d'un clivage protéolytique d'un antigène qui interagit avec le récepteur d'un lymphocyte T (TCR)

Interface du complexe allergène / anticorps

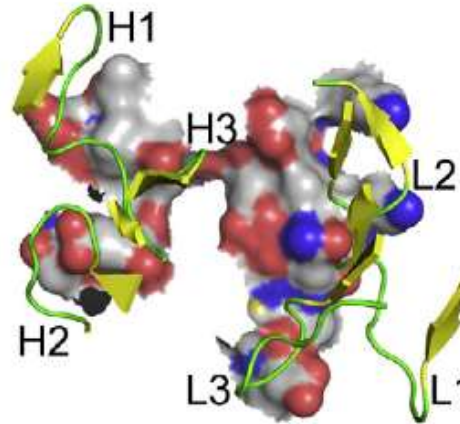
Exemple d'un épitope de la β -lactoglobuline

BLG



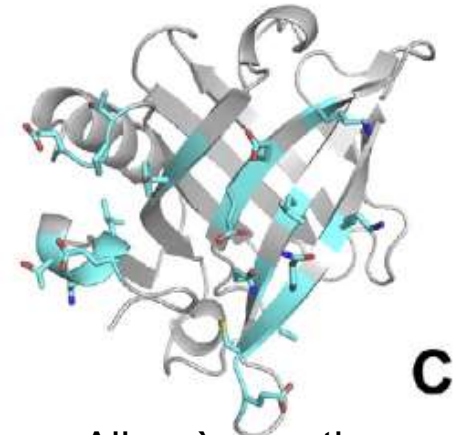
Vue de côté

A



Vue de dessus

B



Allergène entier
résidus épitopiques en bleu

C

Le site de liaison de l'Ac : 6 boucles hypervariables

- 1 Clé de liaison de 50-70 résidus
- Le paratope = les résidus en contact = 10-20 résidus
- Autres résidus contribuent au maintien de la conformation

F. Dall'Antonia et al. / Methods 66 (2014) 3–21

Epitope

- Patch d'acides aminés de antigène avec complémentarité structurale et chimique / Ac
- Liaisons hydrophobes, électrostatiques, complémentarité cavité / protrusion

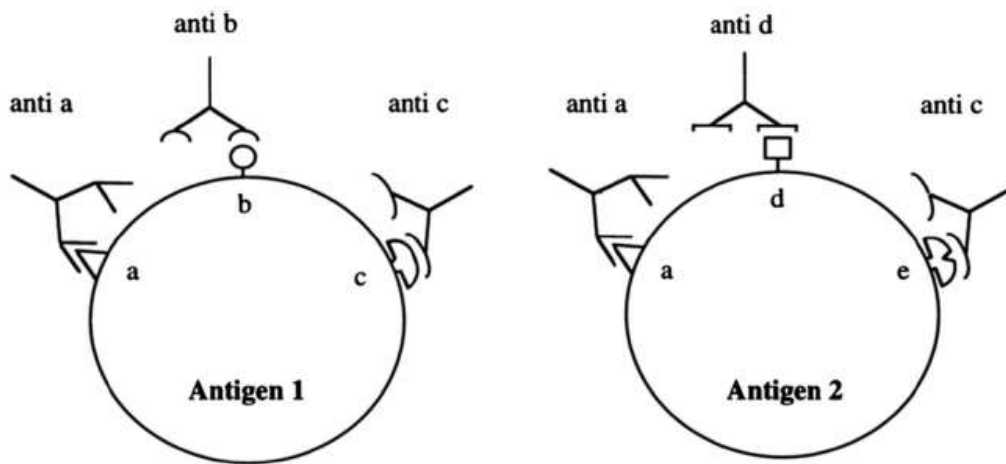
Définition fonctionnelle : Spécificité - Réaction croisée...

Pas d'épitope B sans paratope ↔ 1 épitope = 1 paratope - Définition stricte

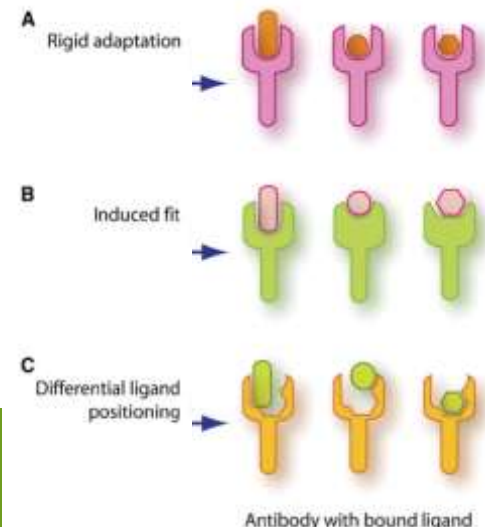
Relation 'souple'

- 1 épitope peut être reconnu par différents paratopes
- 1 Ac Mo peut se lier à des épitopes non identiques
 - **Réaction croisée** : homologues de structures
 - **Multi-réactivité** : plusieurs paratopes / site de liaison Ac

Réactions croisées

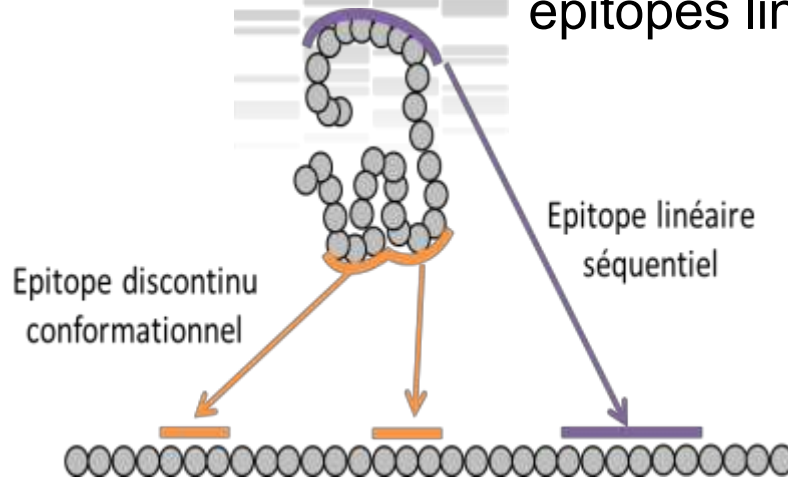


Multi-réactivité



Définition méthodologique

épitopes linéaires / conformationnels



Classification fortement liée aux techniques expérimentales

Epitope linéaire, séquentiel, continu (B et T) - Structure I

AA contigus dans la séquence primaire

Capacité de fragments peptidiques à se lier à des anticorps (anti-protéine)

Peptides d'environ 10 AA

Epitope conformationnel, discontinu (B) – Structures II et III (IV)

Plusieurs (2 à 5) courts segments dispersés dans la séquence mais proches dans l'espace

Repliement de la protéine

Recouvrent en général 15-20 AA

Définition méthodologique



Dichotomie artificielle



Allergène
(Antigène)

Epitope continu

- Fragment peptidique capable de lier l'Ac
- Mais tous les AA n'interagissent pas
- Les AA essentiels à la liaison

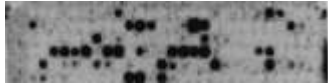
Epitope conformationnel

- Ne peut pas s'extraire de la protéine bien conformée
- Mais plusieurs stretches d'AA consécutifs dans la séquence

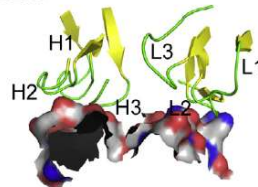
90% des épitopes sont conformationnels lors d'une
réponse immunitaire

Quid dans l'allergie alimentaire ?

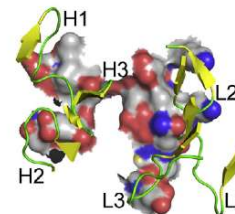
Comment identifier/localiser des épitopes ?

1. Pepscan : Capacité de peptides synthétiques de se lier à des anticorps dirigés contre des protéines – peptides d'environ 10 AA 
2. Création d'une librairie aléatoire de peptides (à la surface de phage) et sélection de mimotopes
3. Hydrolyse enzymatique, fragments protéine recombinante
4. Mutagénèse dirigée de l'antigène et mesure de l'affinité résiduelle
5. Compétition pour la liaison Antigène/Anticorps monoclonaux
6. Résolution de la structure 3D complexe antigène–anticorps
RMN – rayons X-cristallographie et déduction des points de contact atomiques

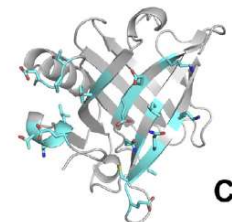
BLG



A



B



C

Identifier/localiser des épitopes ?

Les limites méthodologiques

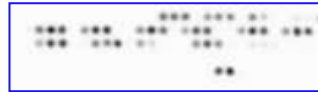
Relation avec les connaissances sur les structures 2D, 3D

Ex allergènes du blé

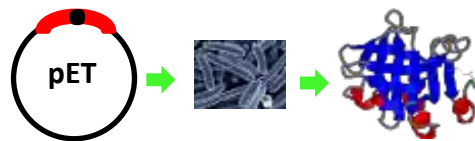
- Protéines du gluten : gliadines, gluténines
- Protéines solubles : serpine, LTP

Identification d'épitopes

Pepscan (peptides synthétiques)



Mutagenèse dirigée

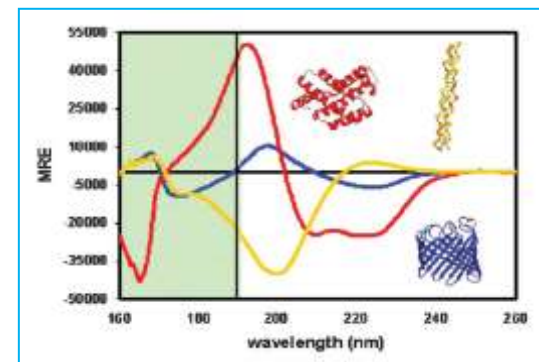


Activité fonctionnelle

Activation de basophiles (RBL)

Structure

Dichroïsme circulaire (SRCD)
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)
Cristallographie
Modélisation

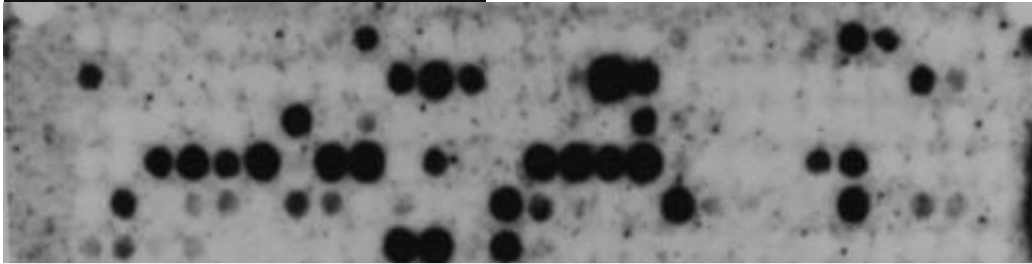
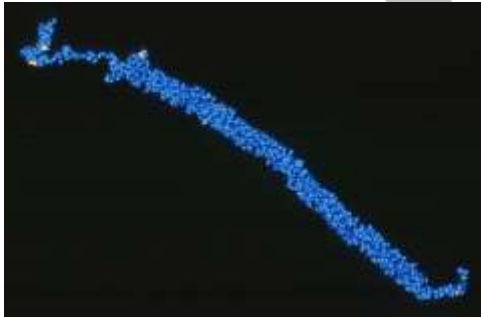


Identifier/localiser des épitopes par Pepscan

Les protéines du gluten

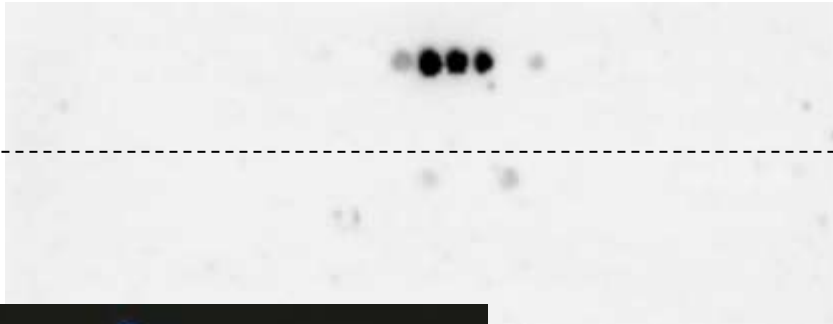
protéine à structure étendue et flexible (modélisation)

Peptides répétés



ω 5-gliadine

Intérêt du pepscan +++



N-term

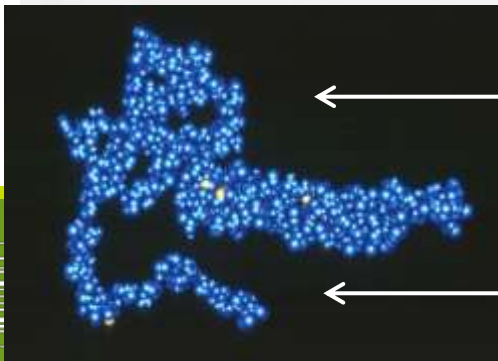
C-term ?

Gluténine FPM

Intérêt du pepscan ++

*Même modèle de
structure pour
 α -gliadine*

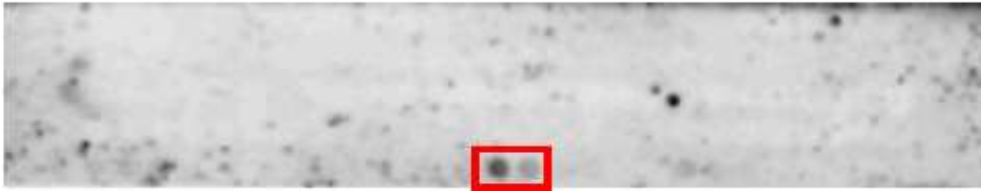
Domaine Non répété : C-term - α -helix – compact



Domaine répété : N-term - étendu

Identifier/localiser des épitopes par Pepscan

Serum #901

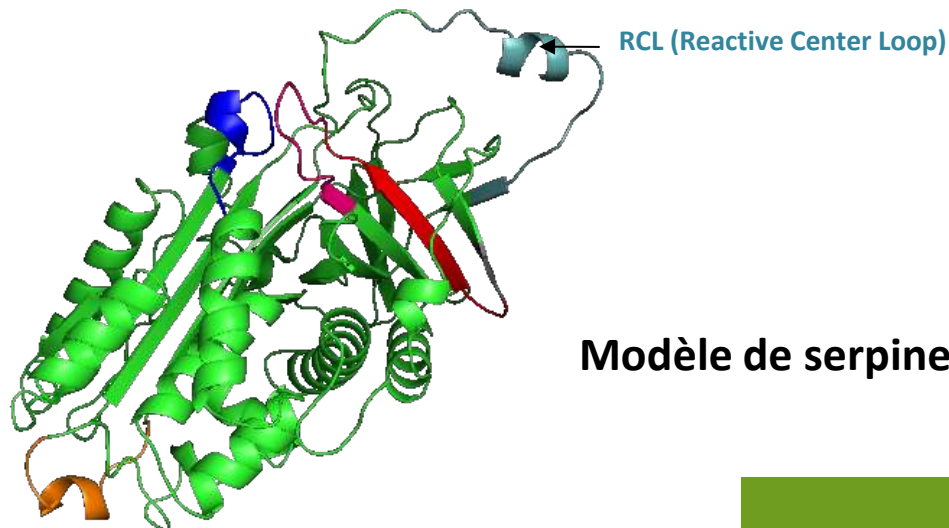


Serpine du blé

Intérêt du pepscan +

Serpin **WSZ2a**

n°sérum	18	458	584	633	585	626	901
Pepscan	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	DGLKVLKLPY	ADASYADSP R	DSPMPQGLRI SSDGLKVLKL KQGGDKRQFS

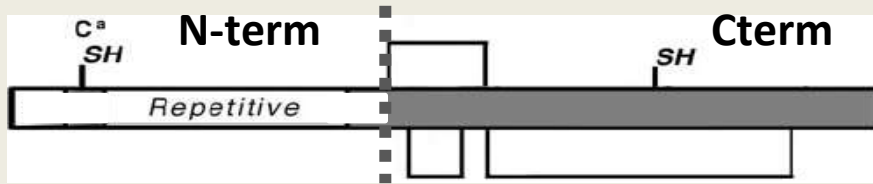


Modèle de serpine du blé (WSZ2b)

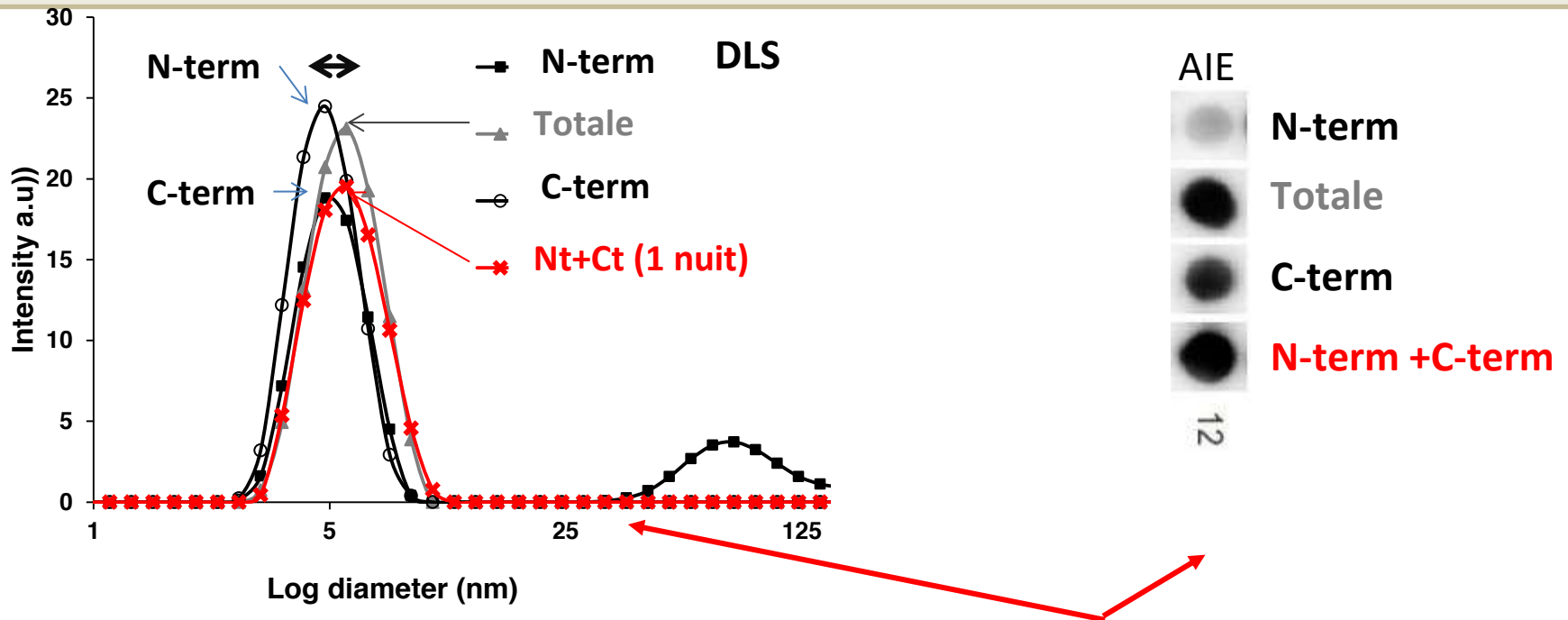
Mameri et al., 2012

Relation avec l'activité fonctionnelle

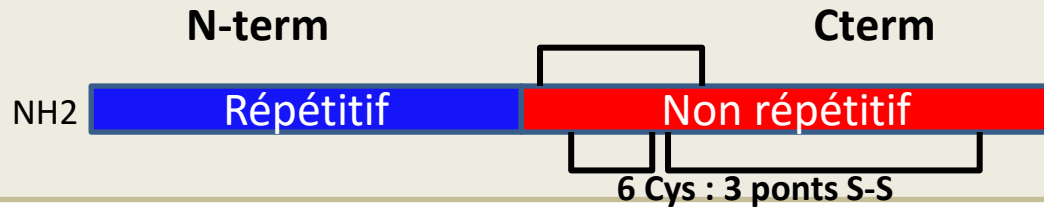
Gluténine FPM



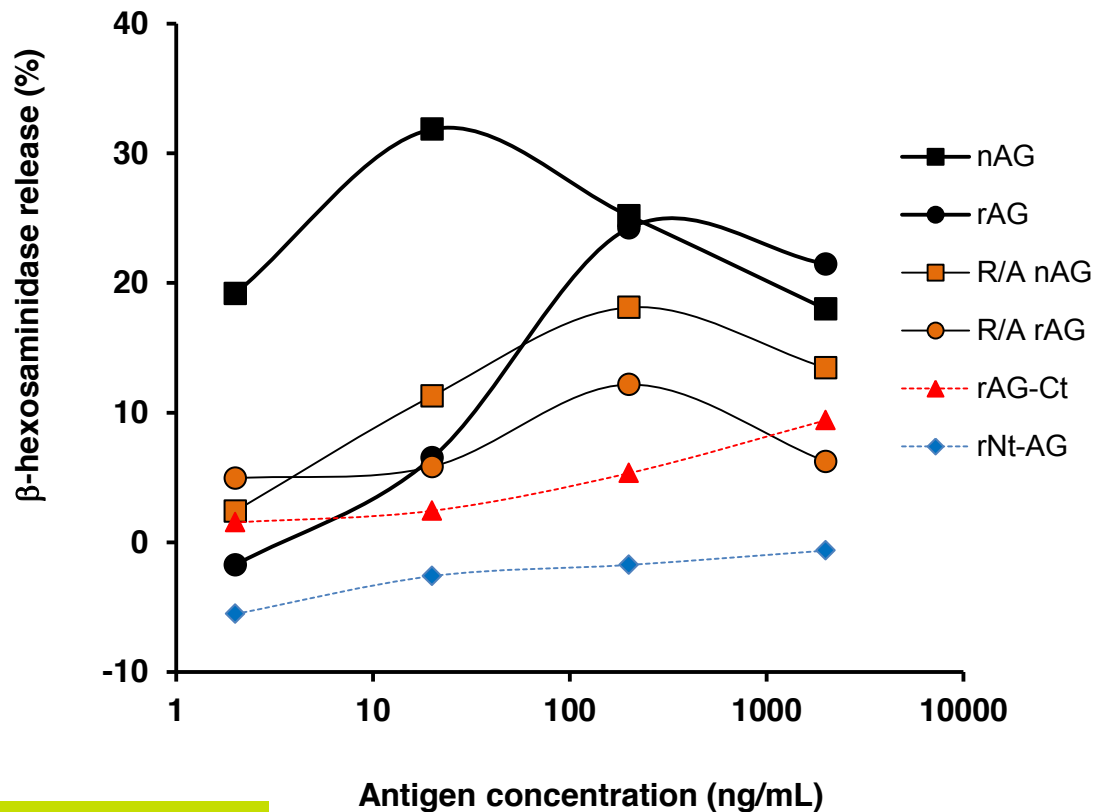
Production de protéine recombinante et domaines N-term et C-term



**Interactions structurales des domaines N-term et C-term
impact **certain** sur la réactivité IgE**



Protéine recombinante et domaines N-term et C-term



Activation de basophiles ?

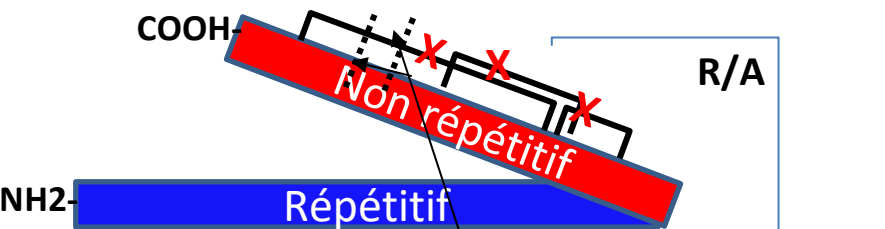
- Protéines entières : Oui +++
- Protéines réduites : Oui +
- Dom C-term : NON
- Dom N-term : NON

Activation de basophiles de rat humanisés (RBL) sensibilisés avec un pool sérums de patients

Identifier/localiser des épitopes par Pepscan ?

Impact des caractéristiques structurales

ω , α -, γ -gliadines et SG-FPM



R/A

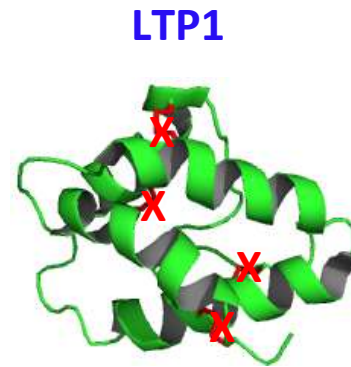
Structures II^R
similaires

Structures III^R
différentes

+++ épitopes
continus

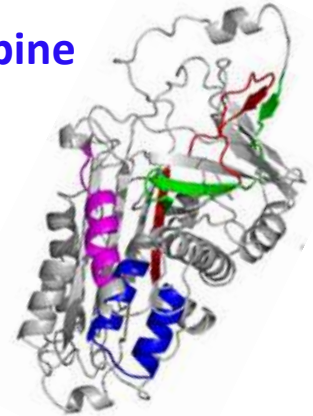
Pepscan Informatif

Interactions structurales



LTP1

Serpine



Peu d'épitopes continus

Pepscan pas adapté

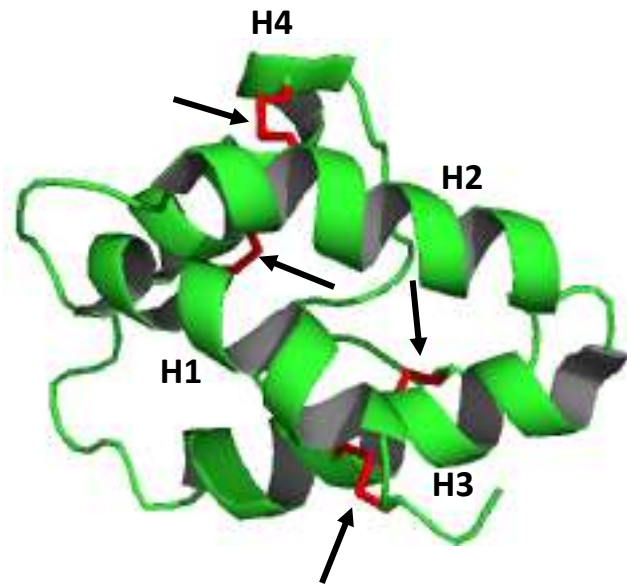
Epitopes
conformationnels

+++ épitopes conformationnels dans l'allergie alimentaire

Les protéines de structure 3D compacte : ex LTP de blé

Identification/localisation des épitopes par mutagenèse dirigée

Code (1GH1.pdb)



LTP1:

Protéine globulaire 90 aa

9 kDa

4 ponts disulfures

4 hélices alpha

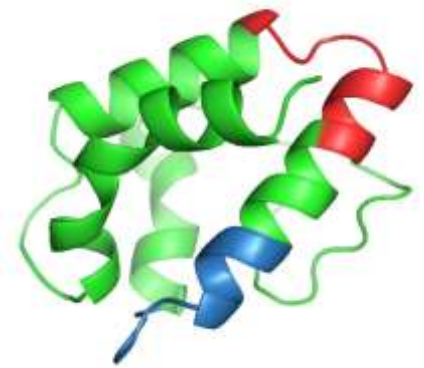
➤ **Rôle +++ des ponts disulfure dans liaison IgE**

Identification/localisation des épitopes par mutagénèse dirigée

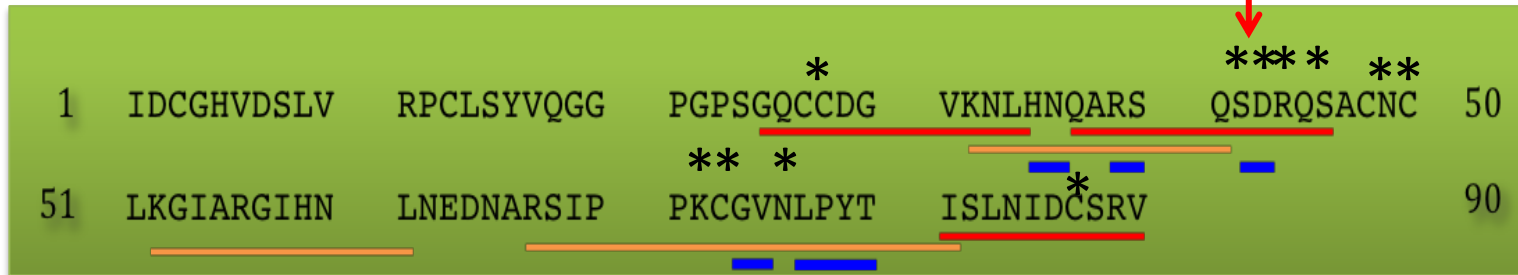
I. Produire la LTP1 recombinante sauvage

II. Muter la LTP1 recombinante

- Choix des mutations
 - Ponts disulfure
 - Études pepscan
 - Résultats Mimotopes



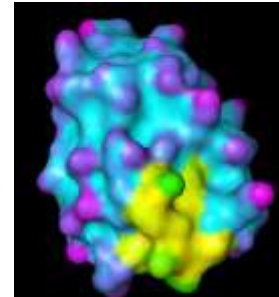
Épitope : 37-46 boucle entre H2 et H3



D'après Denery-papini et al. 2011, Tordesillas et al. 2009

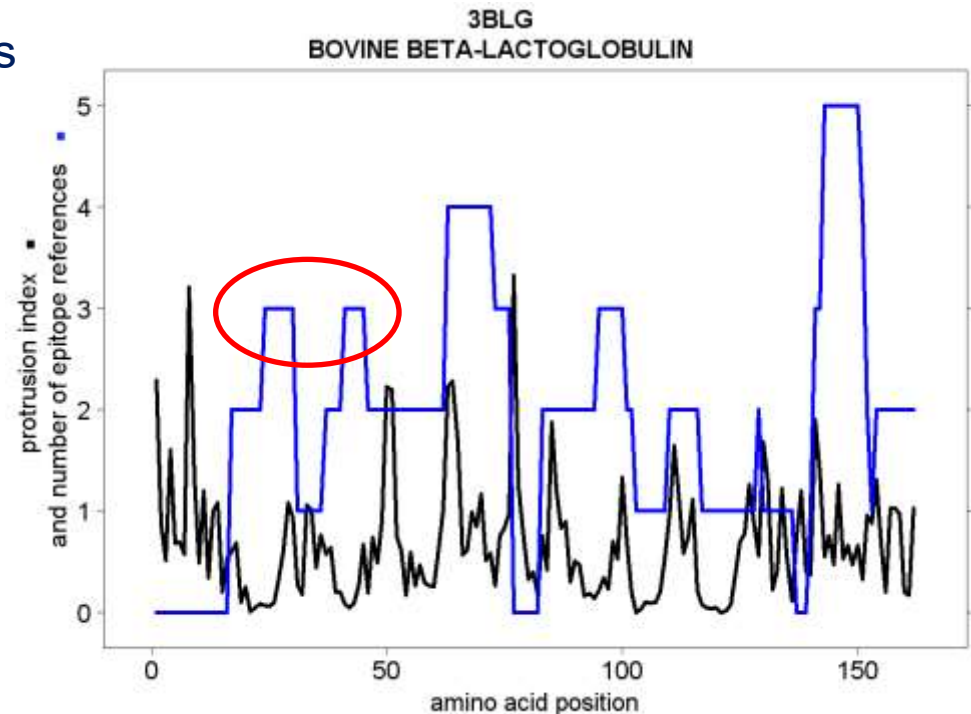
Bases de données sur les épitopes et prédiction ?

Exposition en surface = critère généralement accepté pour localiser les épitopes B



Analyse de l'exposition en surface des épitopes sur base de données IEDB
60 molécules et 950 épitopes

- ❖ pas de différences significatives entre AA épitope / non épitope
- ❖ Pas de correspondance systématique épitope / exposition en surface

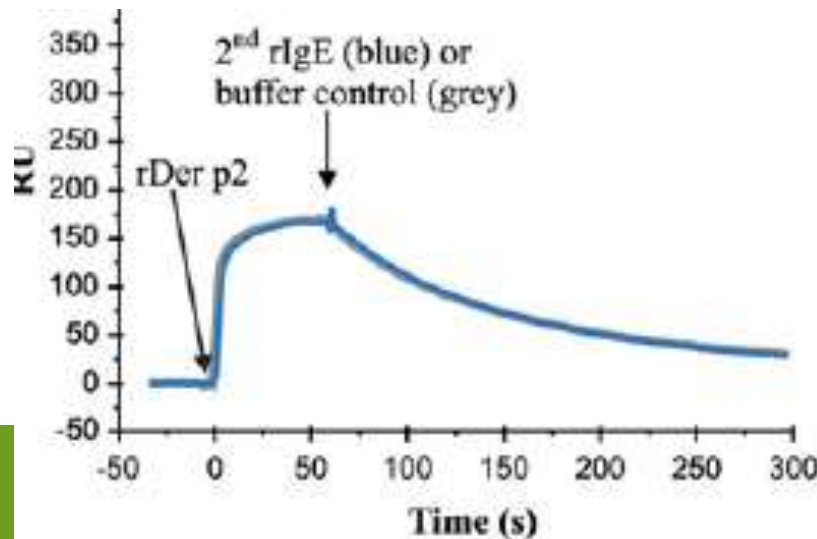


- ❖ Pas de confirmation exposition en surface pour les épitopes
- ❖ Hétérogénéité des données ?

Comment définit-on un épitope ?

Notion opérationnelle Interaction = phénomène dynamique

- Définition de l'épitope basée sur les contacts réels entre les atomes Ag / Ac
- Détermination par la structure d'un cristal Ag / Ac = représentation statique
- D'une condition dynamique
- Contribution probable de différents résidus à la phase d'association (ex AA chargés interactions longue distance) et à celle d'équilibre
- Cinétiques d'association / dissociation – constante d'affinité



Dans l'allergie : activité fonctionnelle

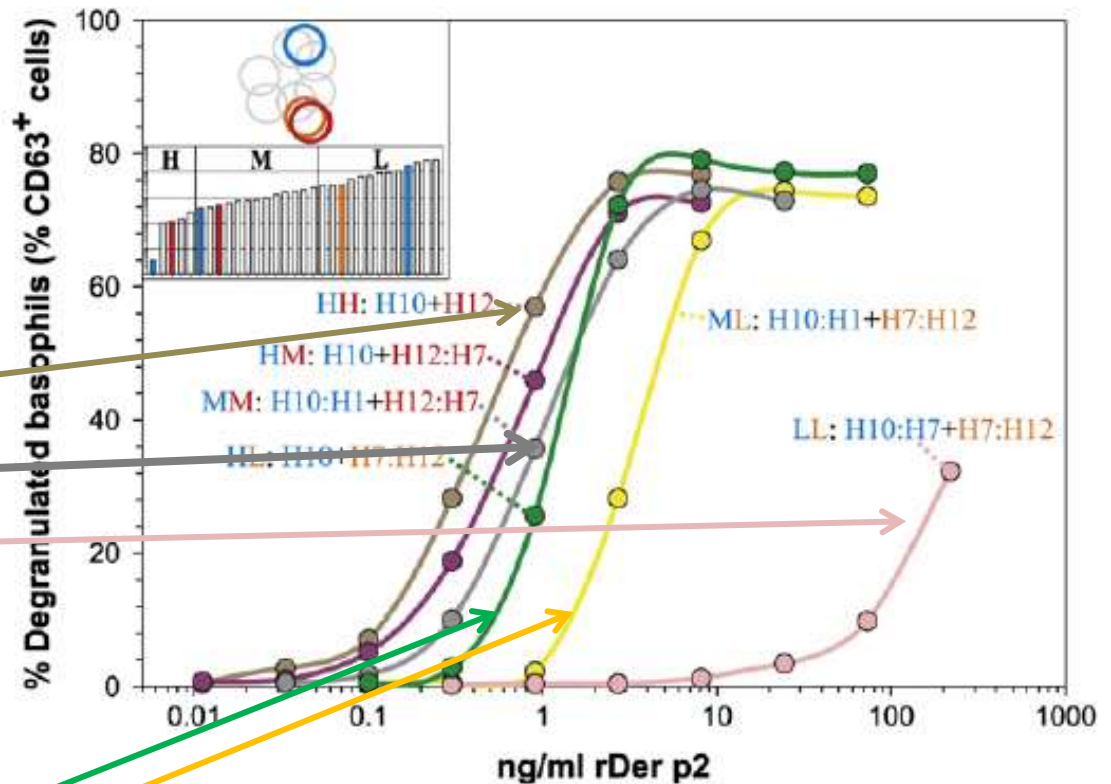
Activation de basophiles in vitro

Systèmes modèles : Basophiles + IgE chimériques monoclonales

→ Influence de l'affinité des IgE / épitopes

Dégranulation des Basophiles
IgE d'affinités différentes :

- Forte ($k < 10^{-9}$ M)
- Moyenne ($k < 10^{-8}$ M)
- Faible



→ Coopération entre interactions d'affinités faibles et fortes/moyennes

Conclusion

Les épitopes dans l'allergie (alimentaire)

- ❖ **Plusieurs critères pour définir un épitope**
- ❖ Au-delà des types continu et discontinu, le terme épitope B peut désigner:
 - ❖ Les acides aminés réellement en contact avec les anticorps
 - ❖ Des résidus contribuant +/- directement à l'interaction (épitopes fonctionnels)
- ❖ **Prédiction *In silico* des épitopes B ?** ↔ Composition des bases de données
- ❖ Plus on étudie les épitopes d'une protéine plus on en trouve : notion d'épidémiologie à inclure
- ❖ **Dans l'allergie alimentaire**
 - impact des procédés de transformation et de la digestion sur la conformation des allergènes ↔ importance des épitopes conformationnels