



**HAL**  
open science

## 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-01603569v1>**

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 CC BY 4.0 - Attribution - International License



# Les épitopes pour les nuls

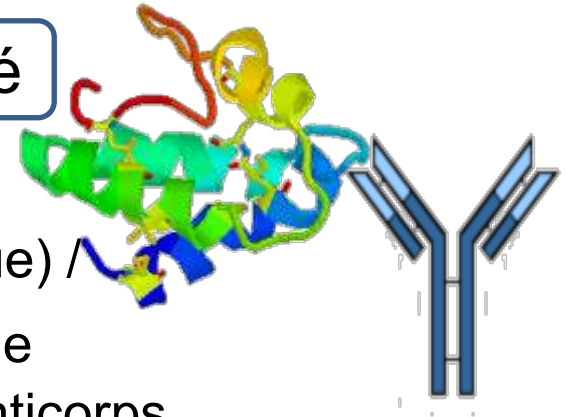
Sandra DENERY



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

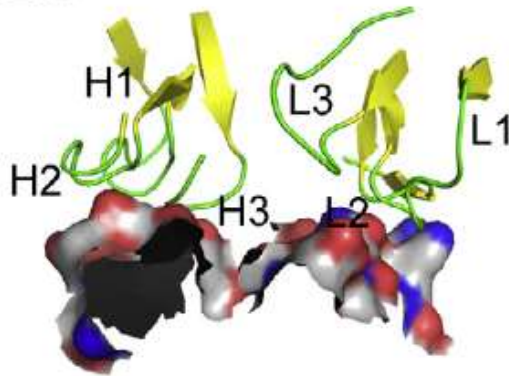
Ex : nombre d'épitopes d'une protéine dépend du nombre d'Ac que l'on peut produire

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

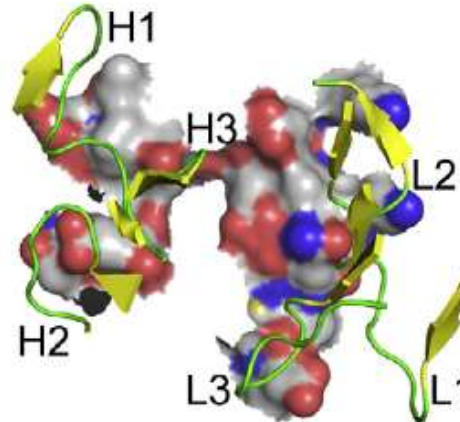
# Interface du complexe allergène / anticorps

*Exemple d'un épitope de la  $\beta$ -lactoglobuline*

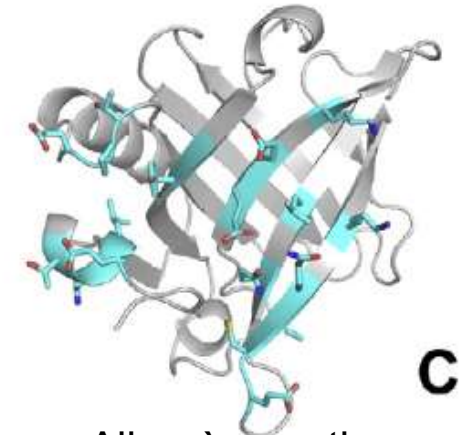
**BLG**



Vue de côté



Vue de dessus



Allergène entier  
résidus épitopiques en bleu

## 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

## Epitope

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

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

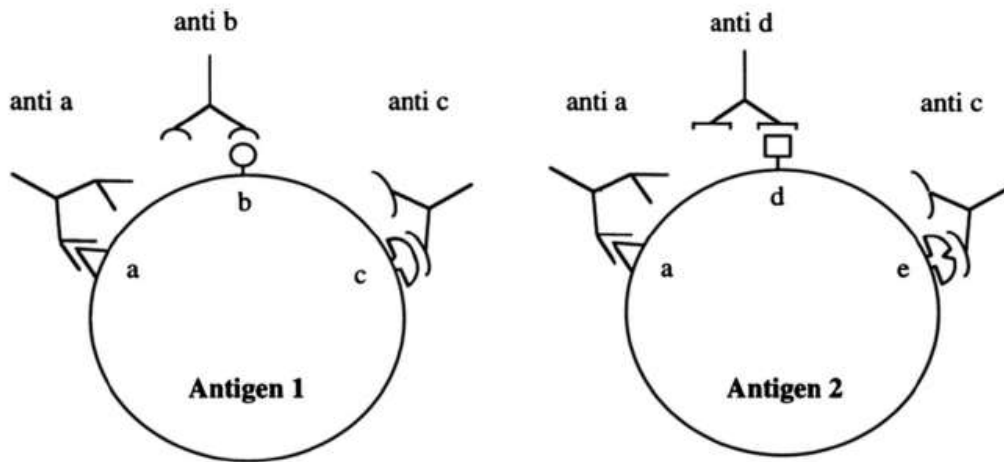
# Définition fonctionnelle : Spécificité - Réaction croisée...

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

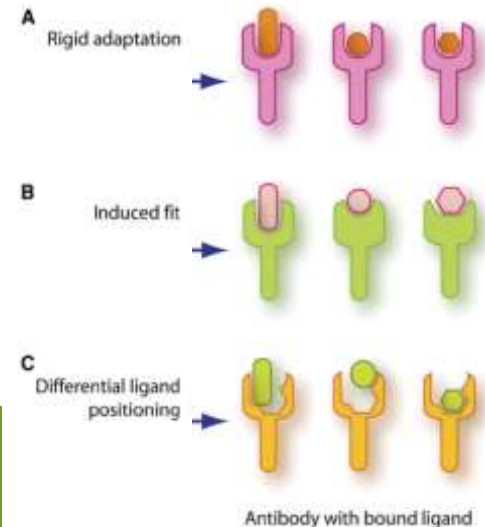
Relation 'souple'

- 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

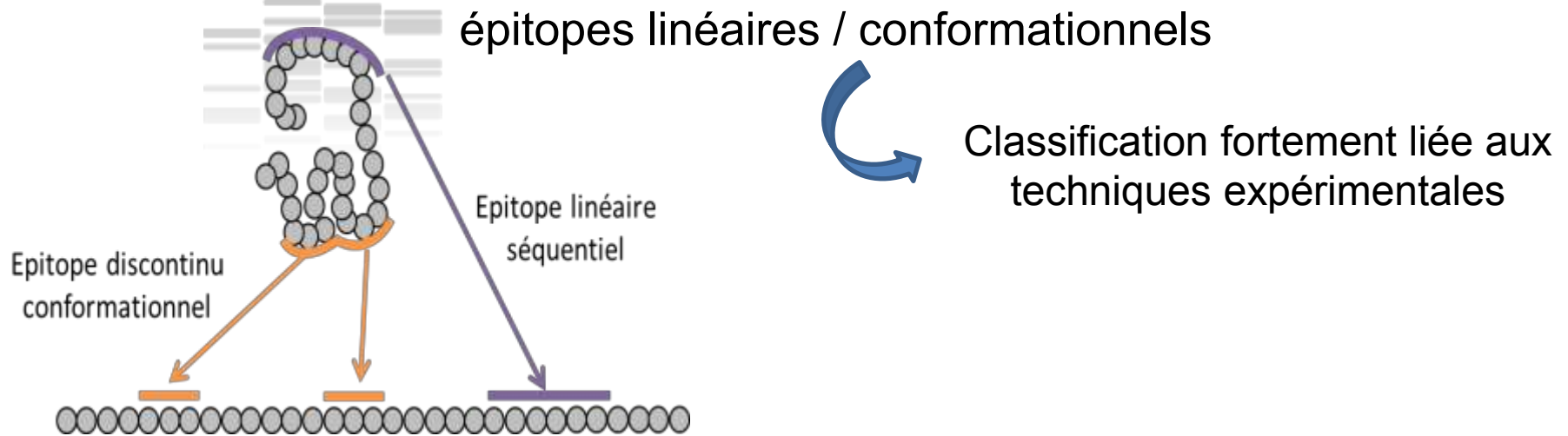
## Réactions croisées



## Multi-réactivité



# Définition méthodologique



## 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

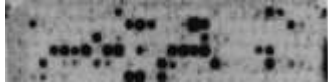
- Fragment peptidique capable de lier l'Ac
- Mais tous les AA n'interagissent pas
- Les AA essentiels à la liaison

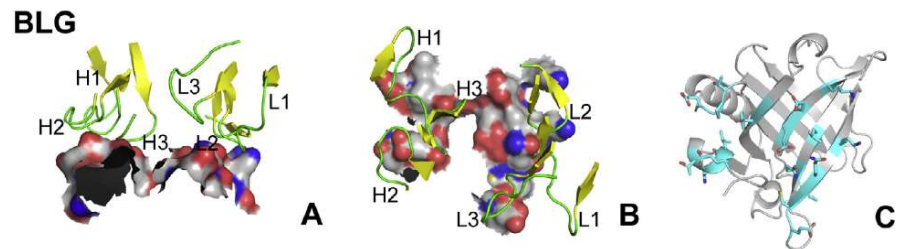
## Epitope conformationnel

- 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. Mutagenèse 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



# Identifier/localiser des épitopes ?

## Les limites méthodologiques

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

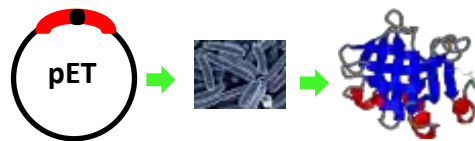
Ex allergènes du blé

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

#### Identification d'épitopes Pepscan (peptides synthétiques)



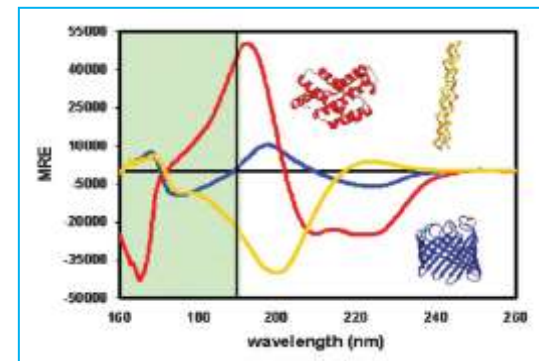
#### Mutagenèse dirigée



#### Activité fonctionnelle Activation de basophiles (RBL)

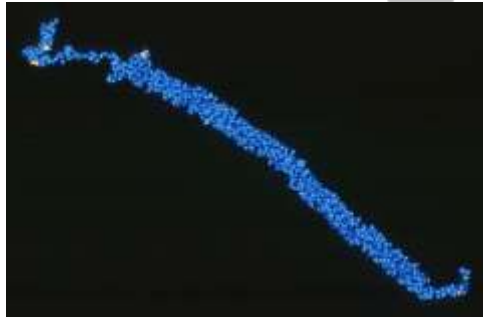
#### Structure

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



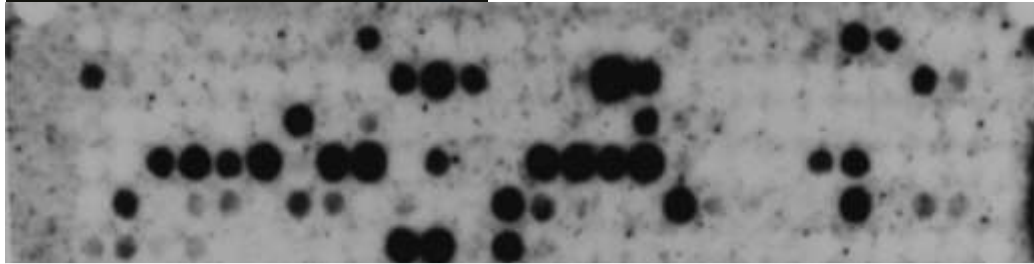
# Identifier/localiser des épitopes par Pepscan

Les protéines du gluten



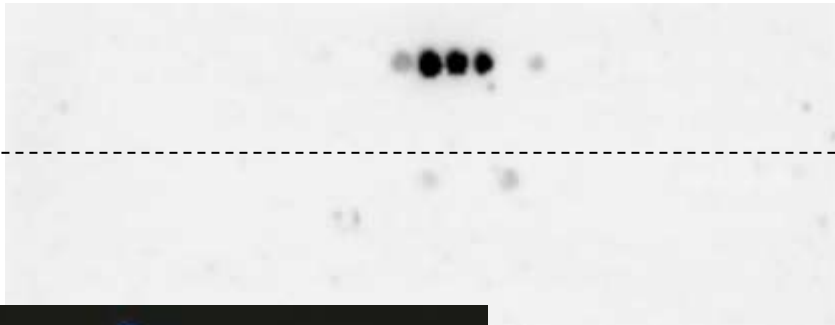
protéine à structure étendue et flexible (modélisation)

Peptides répétés



Intérêt du pepscan +++

$\omega$ 5-gliadine



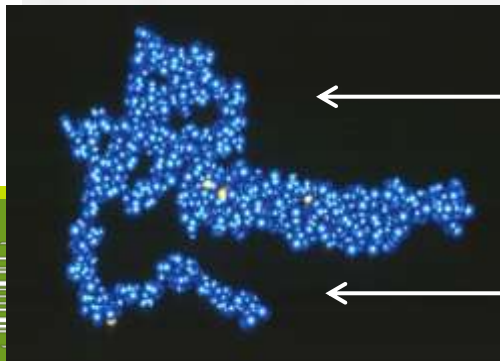
N-term

Intérêt du pepscan ++

Gluténine FPM

C-term ?

Même modèle de structure pour  $\alpha$ -gliadine

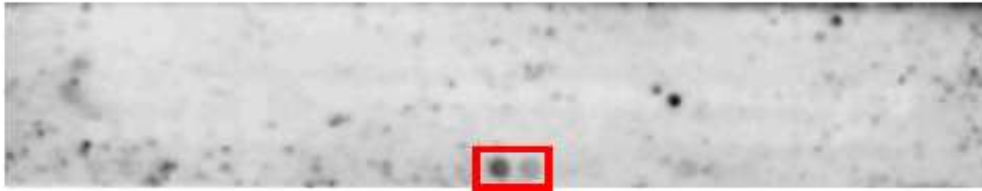


Domaine Non répété : C-term -  $\alpha$ -helix - compact

Domaine répété : N-term - étendu

# Identifier/localiser des épitopes par Pepscan

Serum #901

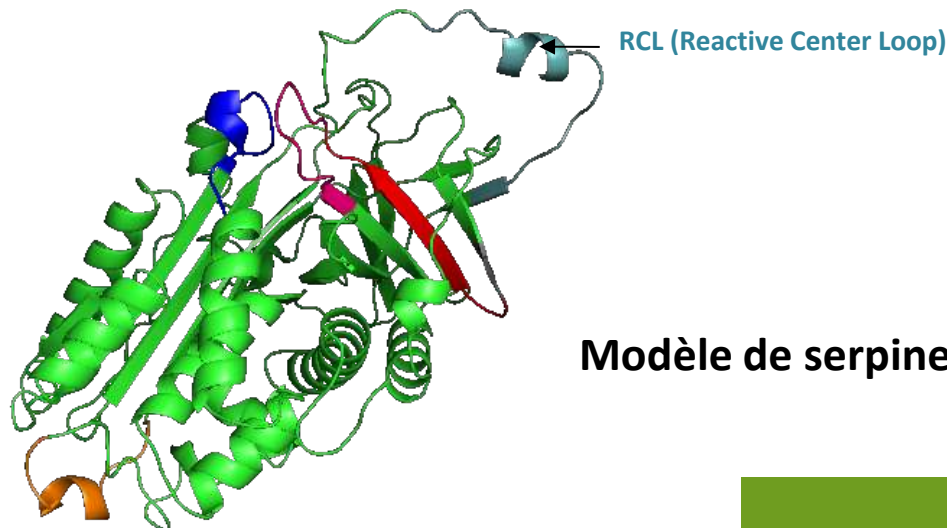


Serpine du blé

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<br>R | DSPMPQGLRI               |
|         |            |            |            |            |            | DGLKVLKLP<br>Y | SSDGLKVLKL<br>KQGGDKRQFS |

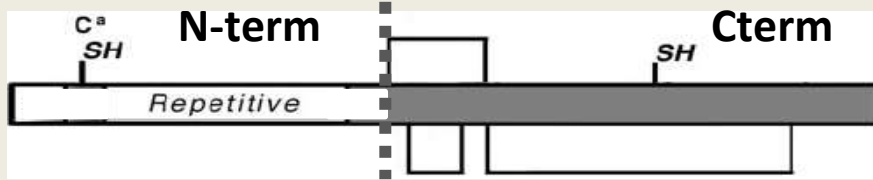


Modèle de serpine du blé (WSZ2b)

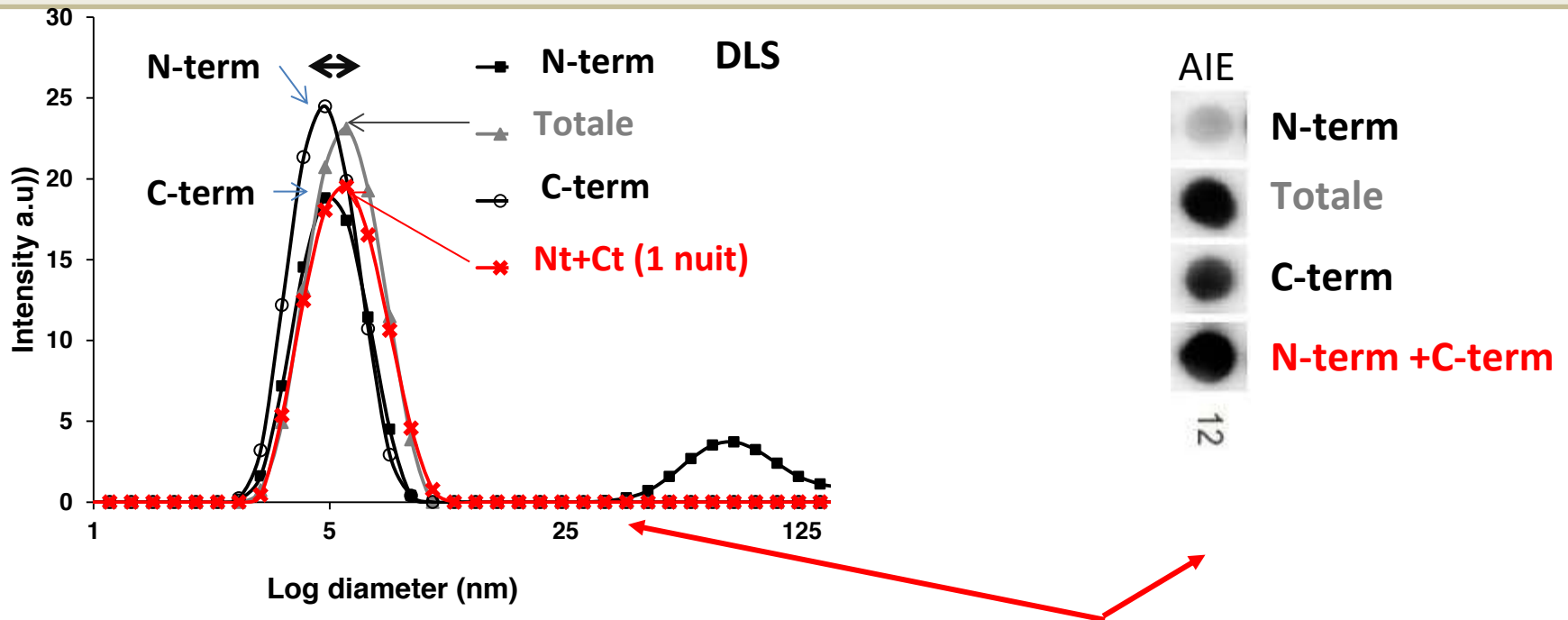
Mameri et al., 2012

# Relation avec l'activité fonctionnelle

## Gluténine FPM



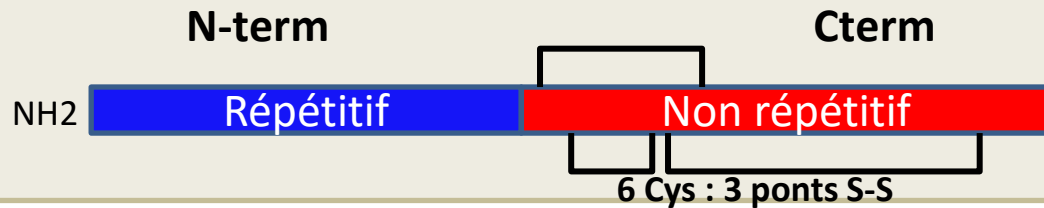
Production de protéine recombinante et domaines N-term et C-term



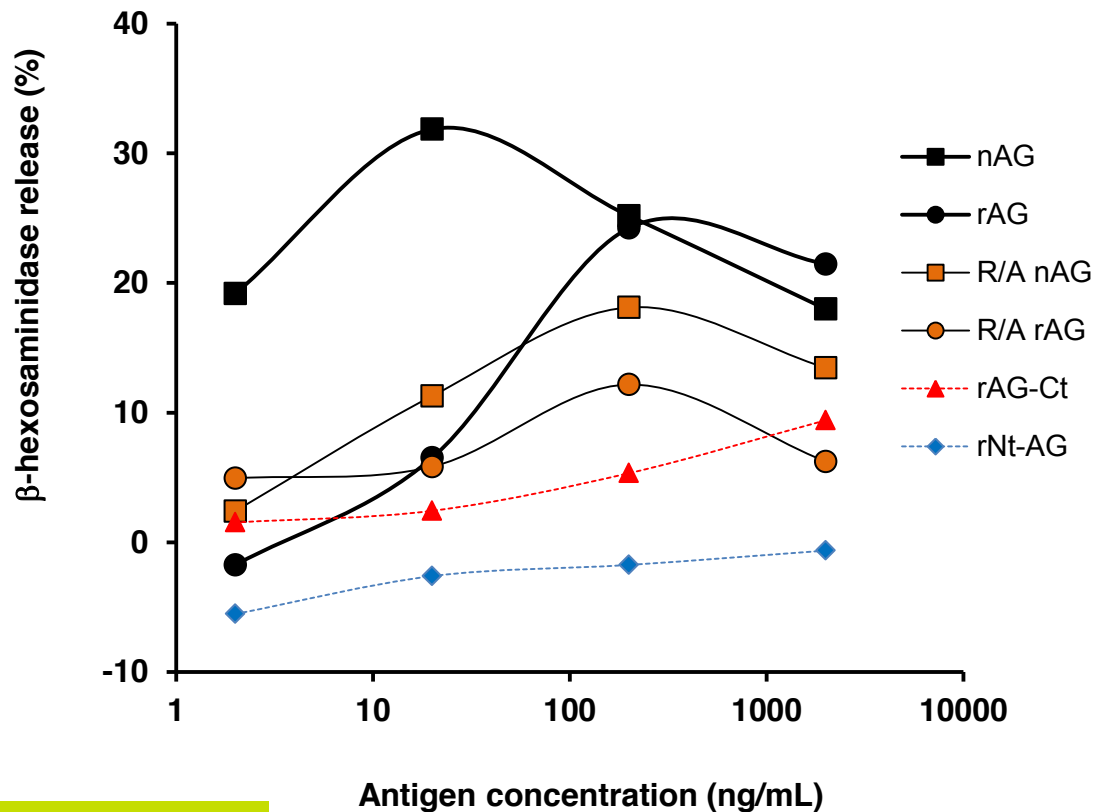
**Interactions structurales des domaines N-term et C-term  
impact **certain** sur la réactivité IgE**

# Relation avec l'activité fonctionnelle

## $\alpha$ -gliadine



Protéine recombinante et domaines N-term et C-term



### Activation de basophiles ?

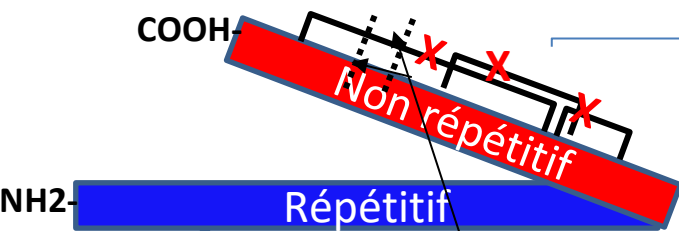
- Protéines entières : Oui +++
- Protéines réduites : Oui +
- Dom C-term : NON
- Dom N-term : NON

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

# Identifier/localiser des épitopes par Pepsican ?

## Impact des caractéristiques structurales

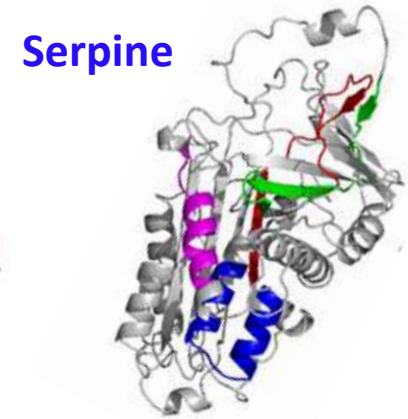
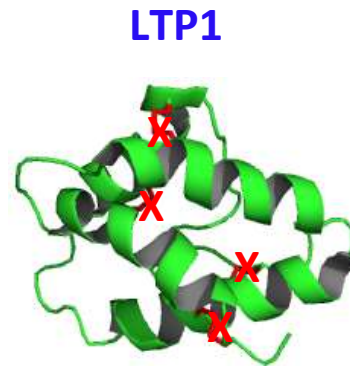
$\omega$ ,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -gliadines et SG-FPM



R/A

Structures II<sup>R</sup>  
similaires

Structures III<sup>R</sup>  
différentes



Peu d'épitopes continus

Pepsican pas adapté

+++ épitopes  
continus

Pepsican Informatif

Interactions structurales

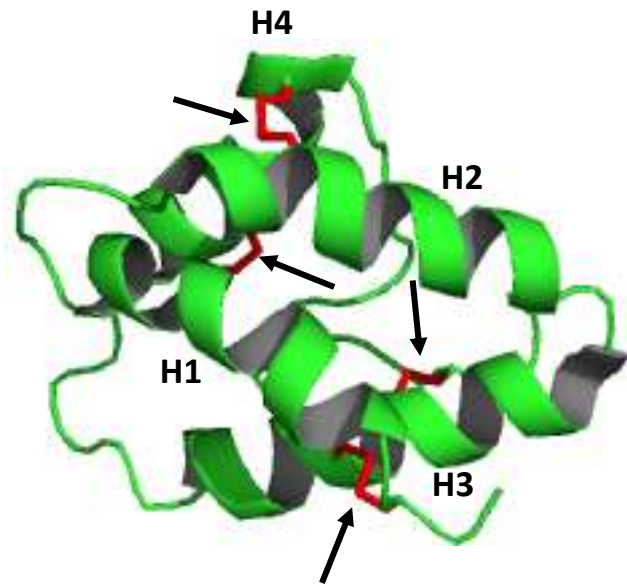
**Epitopes  
conformationnels**

+++ épitopes conformationnels dans l'allergie alimentaire

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

## Identification/localisation des épitopes par mutagénèse dirigée

Code (1GH1.pdb)



LTP1:

Protéine globulaire 90 aa

9 kDa

4 ponts disulfures

4 hélices alpha

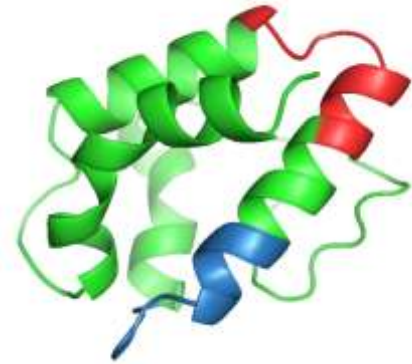
➤ **Rôle +++ des ponts disulfure dans liaison IgE**

# Identification/localisation des épitopes par mutagénèse dirigée

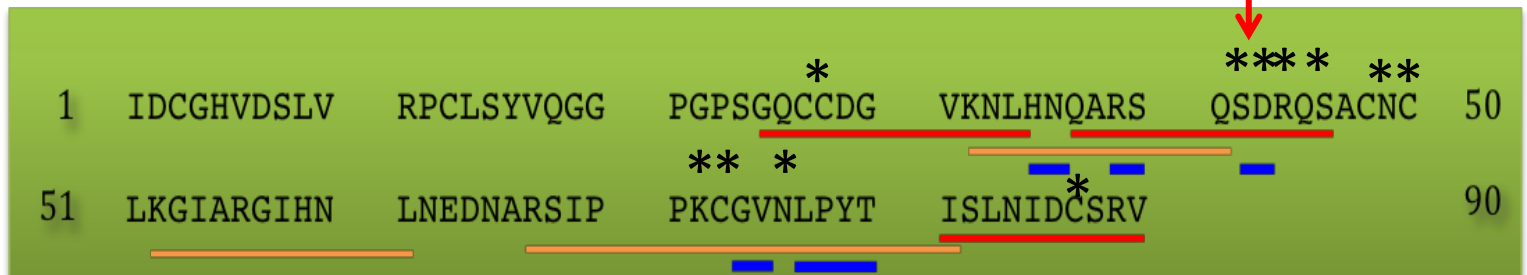
I. Produire la LTP1 recombinante sauvage

II. Muter la LTP1 recombinante

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



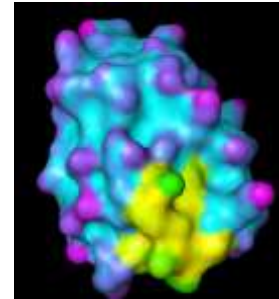
**Épitope : 37-46 boucle entre H2 et H3**



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

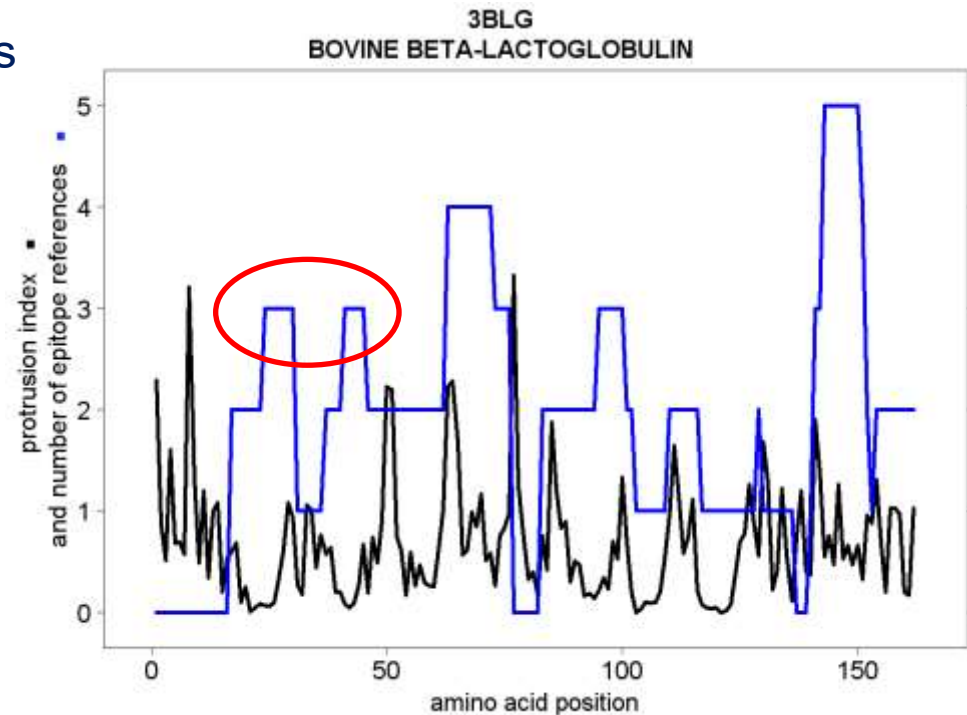
# Bases de données sur les épitopes et prédiction ?

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

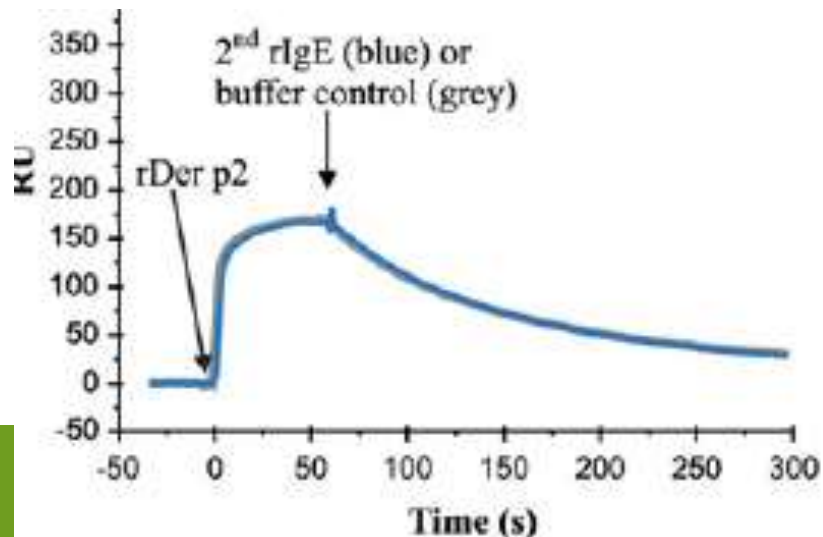


- ❖ Pas de confirmation exposition en surface pour les épitopes
- ❖ Hétérogénéité des données ?

# 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

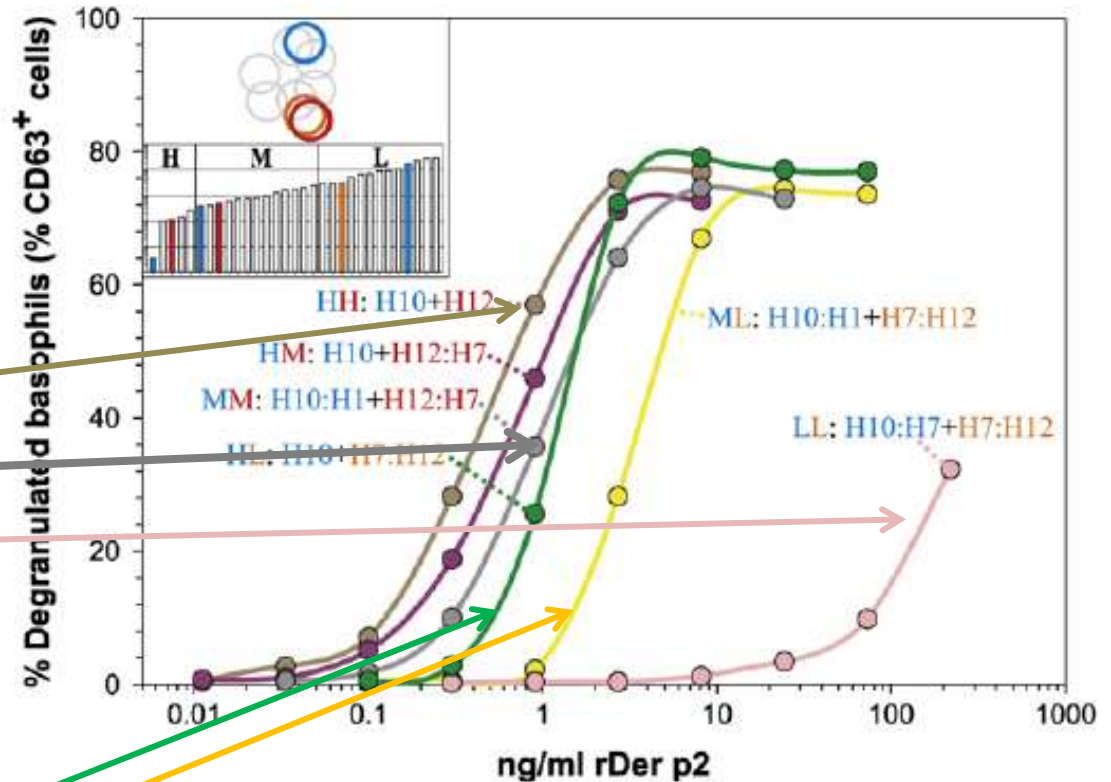
## Activation de basophiles in vitro

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