



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2013) xxx–xxx

Revue générale

Les défensines : des allergènes végétaux importants ?

Are defensins important plant allergens?

F. Bienvenu^{a,d}, A. Barre^{b,c}, S. Viel^a, L. Garnier^a, C. Guyon^a, C. Favre-Metz^{d,e},
G. Pauli^{d,e}, J. Bienvenu^a, P. Rougé^{b,*,c,d}

^a Laboratoire d'immunologie, hospices civils de Lyon, centre hospitalier Lyon-Sud, 165, chemin du Grand-Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France

^b UPS, UMR 152 Pharma-Dev, faculté des sciences pharmaceutiques, université Toulouse-3, 31062 Toulouse cedex 09, France

^c UMR 152 Pharma-Dev, institut de recherche pour le développement (IRD), 31062 Toulouse cedex 09, France

^d Groupe de travail « Allergènes Moléculaires » du CFA, 1, place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg, France

^e Université de Strasbourg, hôpital Civil, bâtiment ancienne ophtalmologie, 1, place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg, France

Reçu le 22 mars 2013 ; accepté le 17 juin 2013

Résumé

Les défensines sont des protéines de petite taille, riches en ponts disulfure, largement distribuées dans le règne végétal. Elles possèdent toutes un domaine « knottin » qui se caractérise par l'existence d'un nœud (entrelac) de ponts disulfure. Ce nœud est constitué d'un pont disulfure qui vient traverser une grande boucle constituée par deux autres ponts disulfure reliés au squelette peptidique. Cette organisation suppose que le pont disulfure traversant soit disposé perpendiculairement par rapport aux deux autres ponts disulfure constituant la boucle. Ce domaine « knottin » est relié à une longue queue C-terminale riche en hydroxyproline (défensines à longue chaîne d'environ 110 acides aminés) ou non (défensines à courte chaîne d'environ 50 acides aminés). L'allergène Art v 1 du pollen d'armoise (*Artemisia vulgaris*) est le prototype des défensines à longue chaîne, tandis que la plupart des défensines de Brassicacées sont des défensines à courte chaîne. À l'exception d'Art v 1 et de l'allergène Amb a 4 du pollen d'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*) qui sont des allergènes bien connus, l'allergénicité des autres défensines végétales est loin d'avoir été démontrée. Néanmoins, le fait que les plages électropositives (constituées de lysine et d'arginine) et électronégatives (constituées d'acides aspartique et glutamique) identifiées à la surface d'Art v 1 et d'Amb a 4 se retrouvent dans quelques autres défensines, suggère que d'autres défensines pourraient être allergéniques. Des investigations cliniques et biologiques seront bien sûr nécessaires pour justifier ce statut d'allergène.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Défensines ; Domaine knottin ; Art v 1 ; Amb a 4 ; Allergènes végétaux

Abstract

Defensins are small disulfide-rich proteins, which are widely distributed in plants. They all have a knottin domain with an abcabc topology, which is characterized by the existence of a knot interlaced with disulfide bridges. The knot is made up of a disulphide bridge, which is crossed by a loop formed by two other disulfide bridges connected to a peptide backbone. This structure denotes that the crossing disulfide bridge(s) is oriented perpendicularly to the two other disulfide bridges forming the loop. The knottin domain can be connected either by a long C-terminal tail rich in hydroxyproline (defensins with a long chain with about 110 amino acids) or by a short C-terminal chain (with about 50 amino acids). The Art v 1 allergen of mugwort (*Artemisia vulgaris*) pollen is the prototype of the long-chain defensins whereas defensins of the Brassicaceae essentially belong to the short-chain defensin group. Except for Art v 1 and the closely-related Amb a 4 allergen from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen, both of which are well-known allergens, the allergenicity of other plant defensins is far from being clinically demonstrated. Nevertheless, the fact that electropositive amino acid patches (with lysine and arginine) and electronegative patches (with aspartic and glutamic acids) which have been identified on the surface of both Art v 1 and Amb a 4 also exist in a few other defensins suggests that other defensins could also be allergenic. Further clinical and immunological investigations are necessary to ascertain the allergenicity of these putative defensin allergens.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Defensin; Knottin domain; Art v 1; Amb a 4; Plant allergen

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pierre.rouge@free.fr (P. Rougé).

1. Les défensines végétales

Les défensines sont des protéines de petite taille (environ 50 acides aminés), riches en cystéine (ponts disulfure), résistantes à la dénaturation, d'origine très variée, bactérienne, fongique, végétale, animale [6]. De structure quasi identique, elles constituent un groupe homogène de protéines qui peuvent se différencier par des fonctions variées mais surtout orientées vers la défense des organismes contre les parasites ou les prédateurs. Parmi les défensines, les défensines végétales constituent un groupe structuralement homogène de protéines PR-12. Les protéines *pathogenesis-related* (PR), sont des protéines impliquées dans la défense des plantes contre les microorganismes phytopathogènes, les champignons et les bactéries parasites [2,3]. Cette définition s'applique à des protéines dont l'expression est induite par l'infection de la plante par un microorganisme phytopathogène. Néanmoins, beaucoup de ces protéines PR préexistent dans la plante en dehors de toute infection, c'est le cas par exemple des protéines PR-5 *thaumatin-like proteins* (TLP) [4] ou des PR-14 *lipid-transfer proteins* (LTP) [5] de nombreux fruits (Rosacées/Prunoidées), dont la synthèse n'est qu'augmentée lors d'une infection de la plante. Les protéines PR-12 sont caractérisées par un domaine « knottin » ou « knottin fold » qui repose sur une disposition particulière des ponts disulfure qui rappelle celle d'un nœud [6]. Les γ -thionines des céréales (blé, orge) sont également des défensines [6].

2. Structure des défensines

Comme toutes les défensines, les défensines végétales se caractérisent par une structure typique, le domaine « knottin » ou « knottin fold » (de l'anglais knot, nœud). Ce domaine est constitué d'une hélice α reliée par des boucles à un feuillet β formé de trois brins β -antiparallèles (Fig. 1). Cette structure est stabilisée par trois ou quatre ponts disulfure dont la disposition rappelle celle d'un nœud : deux ponts disulfure reliant les différents composants de la chaîne peptidique constituent une boucle qui, à l'image d'un nœud, est traversée perpendiculairement par le(s) pont(s) disulfure restant. Il en résulte une structure rigide et extrêmement solide qui caractérise les défensines. Les défensines végétales à courte chaîne ou défensines stricto sensu, comme celles du pois ou du fenugrec, sont réduites au seul domaine « knottin ». Dans les défensines végétales à longue chaîne comme Art v 1 ou Amb a 4, qui correspondent en fait à des protéines *defensin-like* [7], ce domaine « knottin » est prolongé par une longue queue non structurée, flexible, riche en hydroxyproline (Fig. 2). Les défensines à longue chaîne sont *O*-glycosylées sur des résidus de proline par de l'arabinose ou des chaînes glycaniques polyarabinosyl complexes, constituées essentiellement d'arabinose α et β [8]. La partie *O*-glycanique d'Art v 1, localisée au voisinage d'un épitope identifié à la surface de la protéine, jouerait un rôle important dans la reconnaissance de l'allergène par les IgE [9]. Le domaine « knottin » se retrouve bien sûr dans toutes les défensines, quelle que soit leur origine [1]. À ce propos, la protéine édulcorante brazzéine, tirée du fruit d'un

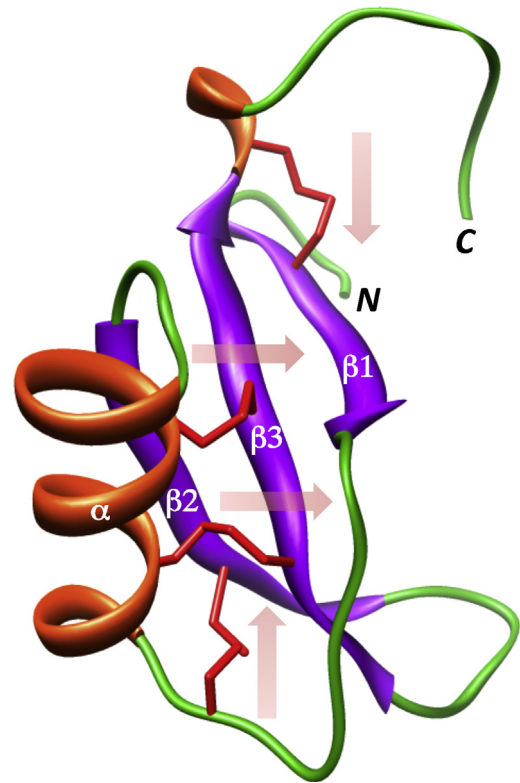


Fig. 1. Structure tridimensionnelle du domaine knottin de la défensine Art v 1. Les ponts disulfure sont figurés en rouge et les flèches rouges indiquent l'orientation des ponts disulfure. Les brins de feuillet β (β 1– β 3) et l'hélice α (α) sont indiqués. N et C indiquent les extrémités N- et C-terminales du domaine knottin.

arbuste africain (*Pentadiplandra brazzeana*) de la famille des Capparacées (Gabon, Congo, Nigéria, Cameroun) dont le pouvoir sucrant est 500 à 2000 fois supérieur à celui du saccharose, est une défensine typique dans laquelle quatre ponts disulfure décrivent un domaine « knottin » [10]. Les défensines à activité antimicrobienne des insectes [11] et les toxines de scorpions [12], présentent la même structure tridimensionnelle que celle des défensines végétales.

3. Activité biologique des défensines

Malgré des structures tridimensionnelles très voisines, les défensines végétales présentent des activités biologiques très disparates [13]. Ce sont essentiellement des protéines à activité antifongique et/ou insecticide par le biais d'activités inhibitrices variées : inhibiteurs de l' α -amylase (défensine de *Vigna radiata*) [14], inhibiteurs trypsiques (défensine d'*Arabidopsis thaliana*) [15], inhibiteurs de canaux ioniques (défensine Psd1 du pois) [16]. Elles sont également impliquées dans la réponse au stress de nombreuses plantes qui utilise de nombreuses voies de signalisation impliquant l'acide salicylique ou l'éthylène [13]. La brazzéine, isolée du fruit d'un arbuste africain (*Pentadiplandra brazzeana*), est une protéine à propriétés édulcorantes (*sweet-tasting protein*), qui ne diffère pas des défensines typiques malgré ses propriétés édulcorantes [6]. La présence des quatre ponts disulfure lui assure une

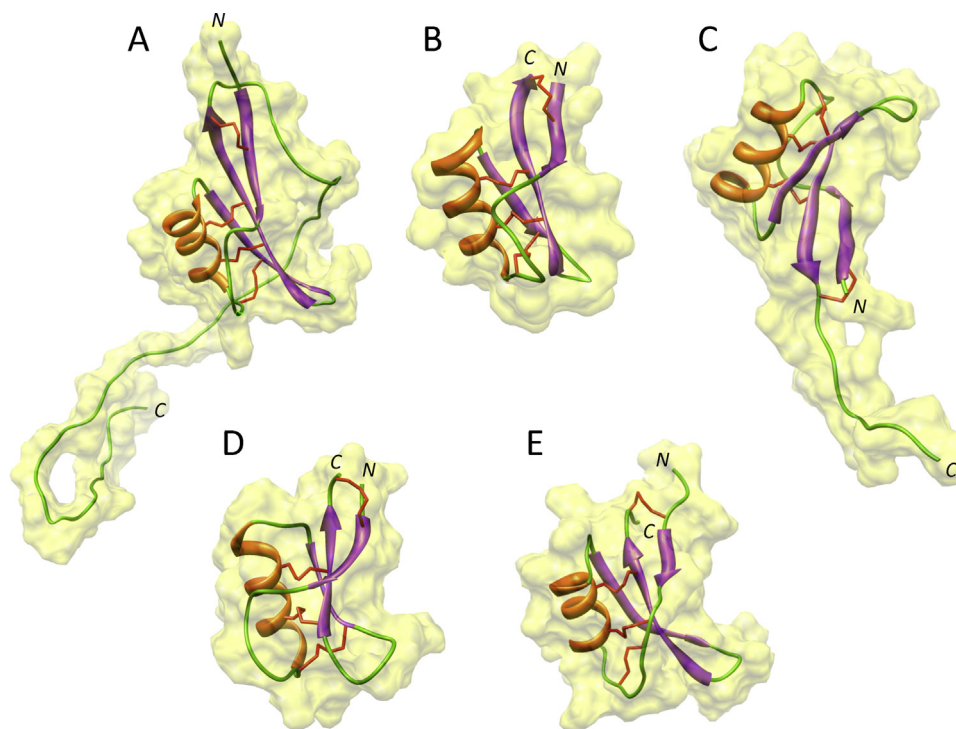


Fig. 2. Structures tridimensionnelles de diverses défensines : Art v 1 (A), γ -thionine de blé (B), Amb a 4 (C), défensine de *Nicotiana glauca* (D) et brazzéine (E). Le domaine knottin constitué d'une hélice α associée à un feuillet β -antiparallèles est prolongé (Art v 1, Amb a 4) ou non (γ -thionine, défensine du tabac, brazzéine) par une queue non structurée riche en hydroxyproline. N et C correspondent aux extrémités N- et C-terminales des chaînes peptidiques.

thermostabilité suffisante pour pouvoir l'utiliser comme édulcorant de boissons chaudes, café ou thé.

4. Allergénicité des défensines

Jusqu'à présent, seules les protéines *defensin-like* Art v 1 de l'armoise (*Artemisia vulgaris*) [7], et Amb a 4 de l'ambroisie (*Ambrosia artemisiifolia*) [8], toutes deux de la famille des Astéracées ou Composées, ont été identifiées comme des allergènes majeurs du pollen. Une étude détaillée de l'interaction d'Art v 1 avec les IgE correspondantes montre que plusieurs acides aminés chargés (lysine chargée positivement et acide glutamique chargé négativement) et hydrophiles (sérine), exposés sur la surface moléculaire de l'allergène, participent directement à l'interaction [17]. Ces acides aminés épitopiques forment des plages (*patches*) réparties sur les deux faces de l'allergène (Fig. 3). Une disposition assez similaire des plages électropositives et électronégatives se retrouve à la surface d'Amb b 4, l'allergène du pollen d'ambroisie (Fig. 3). Une répartition assez voisine des charges s'observe dans d'autres défensines, celles du tournesol (*Helianthus annuus*) et du pois (*Pisum sativum*) en particulier. En revanche, la répartition des charges est complètement différente dans d'autres défensines, celles du marronnier (*Aesculus hippocastanum*), du fenugrec (*Trigonella fœnum-græcum*), du radis (*Raphanus sativus*) ou du pétunia (*Petunia hybrida*), par exemple (Fig. 3). Cette répartition des charges suggère que d'autres défensines pourraient, à l'image d'Art v 1 et d'Amb a 4, développer des propriétés allergéniques. Ainsi, dans les allergies sévères au céleri (*Apium graveolens*), le sérum des patients réagit

généralement à Art v 1, la défensine du pollen d'armoise : réaction croisée ou allergie croisée ? Dans une série de neuf patients présentant des réactions sévères d'allergie alimentaire au céleri, Guyon et al. [18] mettent en évidence, par réalisation d'une puce ISAC, que les allergènes constamment retrouvés dans ce groupe de patients sont la défensine de l'armoise nArt v 1 (huit patients sur neuf, les deux patients présentant les signes les plus graves étant monosensibilisés à Art v 1) associé ou non à nAmb a 1 (7/9). La majorité des patients ne présentent aucune IgE réactivité contre d'autres familles souvent évoquées dans cette allergie, comme les profilines, les PR-10 ou les LTP. L'allergène responsable de cette allergie alimentaire pourrait donc être une défensine qui serait absente de l'extrait céleri (f85) d'où la négativité (ou la très faible positivité) des IgE spécifiques vis-à-vis de l'extrait de céleri dans ces allergies sévères. L'intervention possible d'un allergène de type défensine dans ces allergies est accréditée par l'existence d'une défensine chez une autre Apiacée, celle de *Buplerum kaoi* [19] dont la répartition des charges de surface rappelle celles d'Art v 1 et d'Amb a 4 (résultat non publié). Dans la brazzéine, défensine à propriétés édulcorantes, la répartition des charges est assez semblable à celle observée dans Art v 1 ou Amb b 4 mais seulement sur une des deux faces de la protéine. Sur l'autre face, cette répartition est différente (résultat non publié).

5. Relations phylogénétiques

Les défensines végétales diffèrent davantage par leurs séquences que par leurs structures tridimensionnelles qui restent extrêmement conservées. Ces différences de

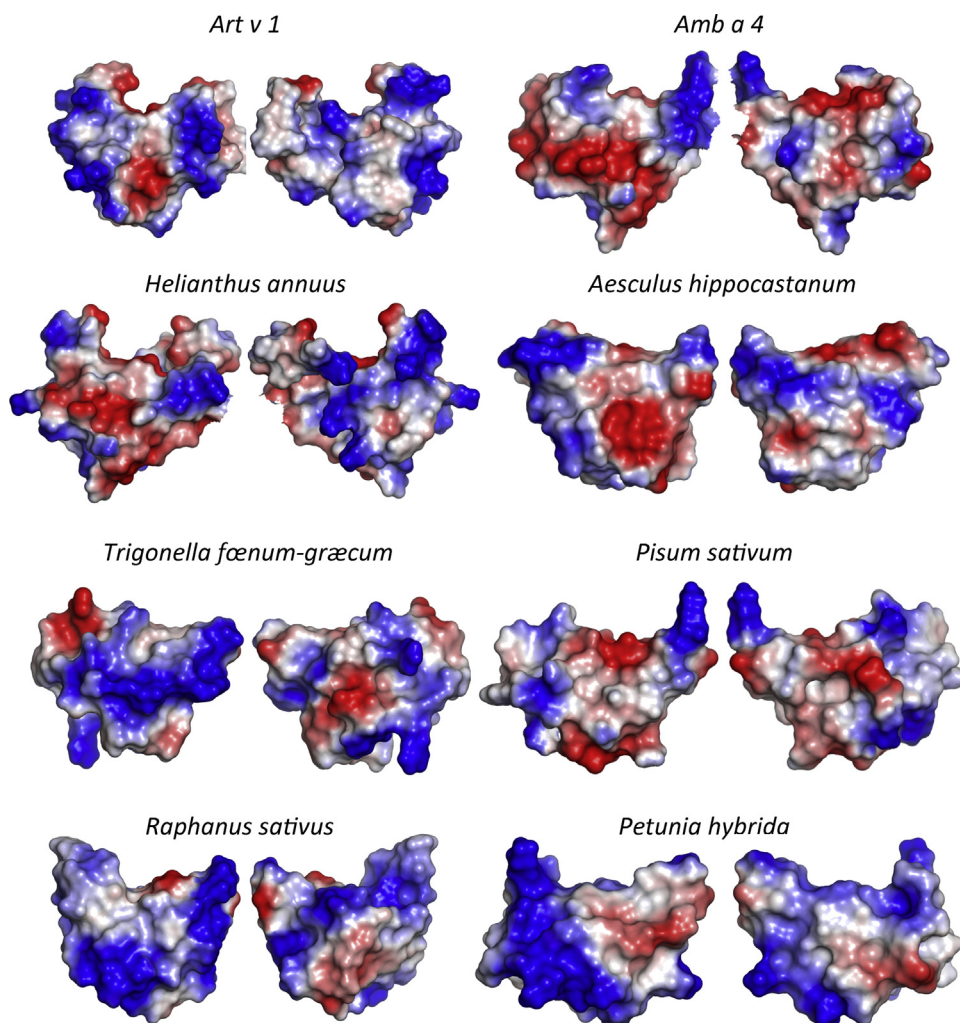


Fig. 3. Localisation des plages électropositives (colorées en bleu) et des plages électronégatives (colorées en rouge) sur les deux faces de la surface moléculaire de diverses défensines. Les régions neutres sont en blanc.

séquences sont moins marquées entre défensines appartenant à des espèces végétales voisines de sorte que, en dehors de quelques exceptions comme les défensines des céréales ou thionines [10] qui se distribuent dans deux groupes de Poacées, la plupart des défensines végétales se regroupent dans des ensembles homogènes correspondant aux grandes familles botaniques (Fig. 4). Les homologies de séquence et de structure observées au sein des défensines sont le reflet des parentés phylogénétiques existant entre les espèces végétales. En d'autres termes, les défensines végétales sont de bons marqueurs phylogénétiques.

6. Analyse bio-informatique

Les alignements de séquences ont été effectués avec CLUSTAL-X [20] et le cladogramme (arbre phylogénétique) correspondant a été réalisé à partir de ces alignements selon la méthode du « neighbour joining » et visualisé avec TreeView [21]. Cette approche, qui prend en compte la vitesse d'évolution des différentes branches de l'arbre phylogénétique, fournit un arbre non enraciné (*unrooted tree*) dans lequel

les séquences protéiques sont d'autant plus proches que leurs relations phylogénétiques sont plus étroites. Les structures tridimensionnelles des défensines disponibles à la RCSB *protein data bank* (PDB) ont été visualisées avec Chimera [22]. Les modèles moléculaires des défensines d'ambrosie (Amb a 4), de tournesol (*Helianthus annuus*) et de fenugrec (*Trigonella fœnum-græcum*) ont été réalisés avec le logiciel YASARA Structure [23] sur MacIntosh 2,3 GHz Intel core duo i5. Dans cette approche de modélisation par homologie qui utilise le champ de forces YASARA-NOVA, la minimisation d'énergie fait appel à la dynamique moléculaire dans un boîte d'eau. Des modèles hybrides ont été construits à partir des coordonnées RMN de plusieurs défensines différentes. La qualité géométrique des modèles (angles dièdres, rotamères, diagramme de Ramachandran) a été vérifiée avec PROCHECK [24] et ANOLEA [25]. Les potentiels électrostatiques de surface des structures et des modèles ont été calculés avec GRASP [26] et visualisés avec PyMol (W.L. DeLano, <http://pymol.sourceforge.net>). Cette méthode de résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann, permet de visualiser les potentiels électrostatiques générés par les atomes électropositifs (colorés

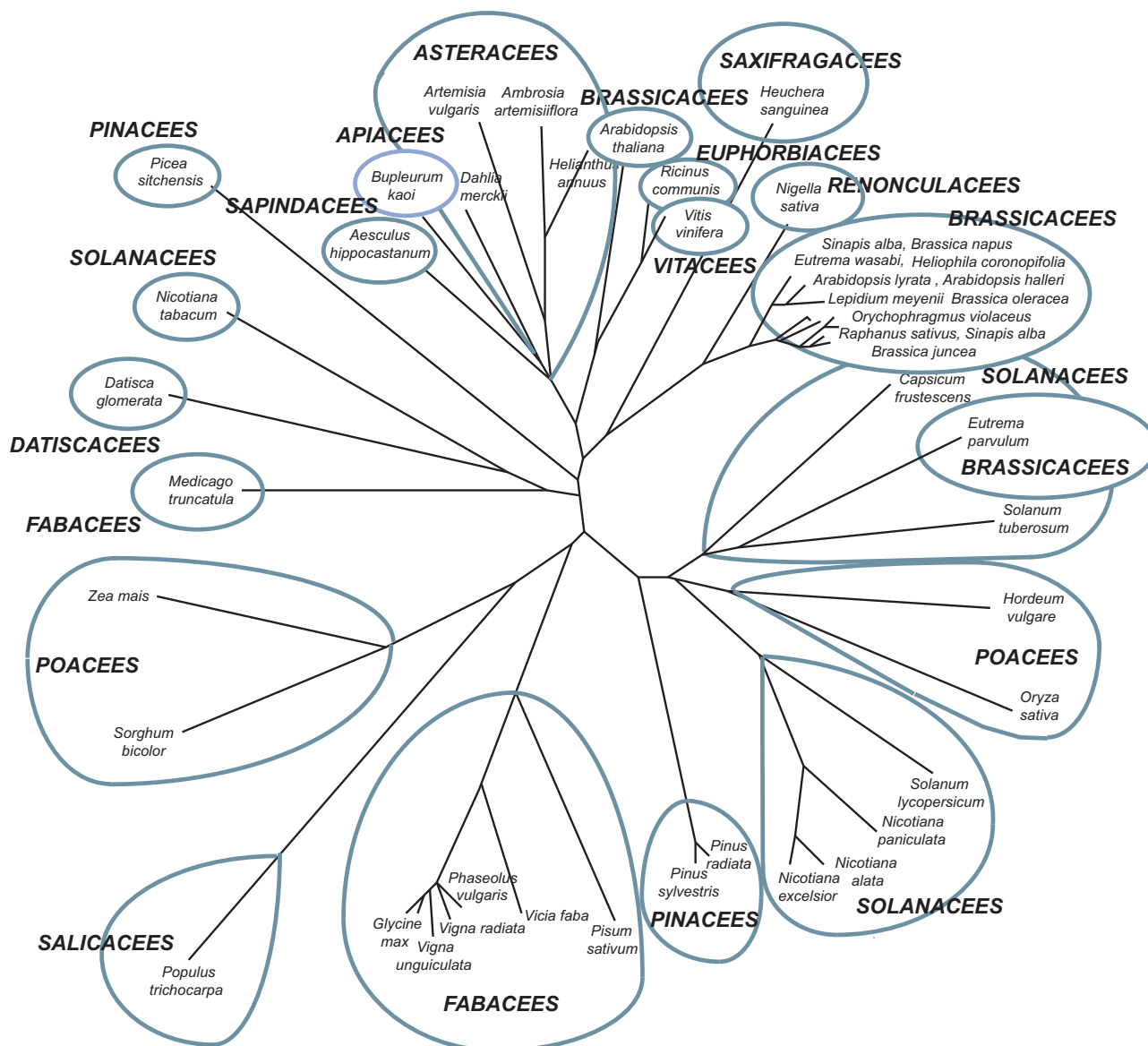


Fig. 4. Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'acides aminés du domaine knottin des défensines végétales. Les membres d'une même famille botanique sont entourés d'un trait épais.

en bleu) et électro-négatifs (colorés en rouge) sur la surface moléculaire des protéines.

7. Conclusion

Les défensines végétales, protéines caractérisées structuralement par un domaine « knottin » dont la disposition des ponts disulfure rappelle celle d'un nœud, correspondent à un groupe de protéines PR, les PR-12. Cette famille de protéines ubiquitaires regroupe des allergènes avérés comme Art v 1 de l'armoise (*Artemisia vulgaris*) ou Amb a 4 de l'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*), mais également d'autres protéines d'origine variées qui s'apparentent à Art v 1 et Amb a 4 par une répartition très similaire des charges de surface. L'implication des défensines (Art v 1 ?) dans les allergies sévères au céleri (*Apium graveolens*) paraît démontrée [18], mais l'allergénicité potentielle d'autres

protéines PR-12 d'origine différente n'a jamais été vérifiée et reste à démontrer.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêt en relation avec cet article.

Références

- [1] Gracy J, Le-Nguyen D, Gelly JC, Kaas Q, Heitz A, Chiche L. KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucl Acids Res* 2008;36:D314-9.
- [2] Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999;55:85-97.
- [3] da Silva Conceição A, Broekaert WF. Plant defensins. In: Datta SK, Muthukrishnan S, editors. *Pathogenesis-related proteins in plants*. London, New York, Washington DC: CRC Press, Boca Raton; 1999p. 247-60.

- [4] Rougé P, Borges JP, Culerrier R, Brulé C, Didier A, Barre A. Les allergies alimentaires aux fruits. *Rev Fr Allergol* 2009;49:S23–7.
- [5] Rougé P, Borges JP, Culerrier R, Brulé C, Didier A, Barre A. Les protéines de transfert des lipides : des allergènes importants des fruits. *Rev Fr Allergol* 2009;49:58–61.
- [6] Caldwell JE, Abildgaard F, Dzakula Z, Ming D, Hellekant G, Markley JL. Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nat Struct Biol* 1998;5:427–31.
- [7] Himly M, Jahn-Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altmann F, et al. Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 2003;17:106–8.
- [8] Léonard R, Wopfner N, Pabst M, Stadlmann J, Petersen BO, Duus JØ, et al. A new allergen from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) with homology to Art v 1 from mugwort. *J Biol Chem* 2010;285:27192–200.
- [9] Pol-Fachin L, Verli H. Structural glycobiology of the major allergen of *Artemisia vulgaris* pollen Art v 1: O-glycosylation influence on the protein dynamics and allergenicity. *Glycobiology* 2012;22:817–25.
- [10] Bruix M, Jimenez MA, Santoro J, Gonzalez C, Colilla FJ, Mendez E, et al. Solution structure of gamma 1-H and gamma 2-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 1993;32:715–24.
- [11] Bonmatin JM, Bonnat JL, Gallet X, Vovelle F, Ptak M, Reichhart JM, et al. Two-dimensional 1H-NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *J Biomol NMR* 1992;2:235–56.
- [12] Fontecilla Camps JC, Habersetzer-Rochat C, Rochat H. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7443–7.
- [13] Carvalho Ade O, Gomes VM. Plant defensins and defensin-like peptides – biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des* 2011;38:4270–93.
- [14] Lin KF, Lee TR, Tsai PH, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC. Structure-based protein engineering for α -amylase inhibitory activity of plant defensin. *Proteins* 2007;68:530–40.
- [15] Zhao Q, Chae YK, Markley JL. NMR solution structure of ATTP, an *Arabidopsis thaliana* trypsin inhibitor. *Biochemistry* 2002;41:12284–96.
- [16] Almeida MS, Cabral KM, Kurtenbach E, Almeida FC, Valente AP. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J Mol Biol* 2002;315:749–57.
- [17] Razzera G, Gadermaier G, de Paula V, Almeida MS, Egger M, Jahn-Schmid B, et al. Mapping the interactions between a major pollen allergen and human IgE antibodies. *Structure* 2010;18:1011–21.
- [18] Guyon C, Frappaz A, Garnier L, Seydou A, Bérard F, Bienvenu F. Profil de sensibilisation moléculaire de patients allergiques au céleri. *Rev Fr Allergol* 2012;52:257.
- [19] Liu WY, Chiou SJ, Ko CY, Lin TY. Functional characterization of three ethylene response factor genes from *Bupleurum kaioi* indicates that BKERFs mediate resistance to *Botrytis cinerea*. *J Plant Physiol* 2011;168:375–81.
- [20] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res* 1997;15:4876–82.
- [21] Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;12:357–8.
- [22] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF-Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605–12.
- [23] Krieger E, Koraimann G, Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA – a self-parameterizing force field. *Proteins* 2002;47:393–402.
- [24] Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemistry of protein structures. *J Appl Cryst* 1993;26:283–91.
- [25] Melo F, Feytmans E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J Mol Biol* 1998;277:1141–52.
- [26] Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins Struct Funct Genet* 1991;11:281–96.