Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 43 (2003) 53–55
REVUE FRANÇAISE D'ALLERGOLOGIE ET D'IMMUNOLOGIE CLINIQUE
www.elsevier.com/locate/revcli

Données récentes sur les allergènes

Peptides et protéines recombinantes modifiées de la PLA2 d'abeille

Modified peptides and recombinant proteins derived from the major bee venom allergen PLA2

B. Maillère *, C. Buhot, C. Texier, S. Pouvelle-Moratille, A. Ménez, D. Gillet

Département d'ingénierie et d'études des protéines, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Reçu le 2 octobre 2002 ; accepté le 21 octobre 2002

Résumé

Les récentes avancées sur les mécanismes de désensibilisation montrent que des molécules contenant des épitopes T mais qui seraient dépourvues de réactivité pour les IgE constitueraient d'excellents candidats pour la désensibilisation. C'est pourquoi nous avons entrepris de fabriquer des peptides et des protéines recombinantes dérivant de l'allergène majeur du venin d'abeille et possédant ces caractéristiques. Les épitopes T ont été localisés au moyen de tests de liaison sur une banque de protéines HLA II représentative de la diversité du système immunitaire des européens. Grâce à cette banque, nous avons pu montrer que 4 peptides de 18 résidus comportent l'essentiel des épitopes de cet allergène. Des formes recombinantes ont été conçues par addition successive de mutations ponctuelles et d'une délétion en dehors des parties épitopes T. Un mutant cumulant l'ensemble des modifications présente peu de réactivité pour les IgE de patients allergiques au venin d'abeille. En revanche, il est aussi bien reconnu par des lymphocytes T murins que la molécule native et induite chez la souris l'activation de cellules T reconnaissant les deux formes. Ce mutant possède une structure tridimensionnelle proche de celle de la molécule native mais présente une plus grande flexibilité. L'ensemble de ces résultats nous amène à proposer dans un même système allergénique des peptides et une protéine recombinante, comme candidats à la désensibilisation de patients allergiques au venin d'abeille.

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Recent advances in the understanding of the mechanisms of specific allergen immunotherapy have revealed that T cell epitopes containing molecules that are devoid of reactivity for specific IgE are suitable candidates for specific immunotherapy. This led us to design peptides and recombinant proteins derived from the major bee venom allergen PLA2 that possess such a characteristic. T cells epitopes have been delineated by means of a bank of HLA II proteins that are representative of the diversity of the immune system of the European population. Using this information, we demonstrate that four 18-residue peptides contain the majority of these T cell epitopes. Recombinant forms have been constructed by successive addition of restricted mutations and one deletion outside the T cell epitope-containing regions. One of these peptides containing all the modifications exhibited very little reactivity with IgE from bee venom-allergic patients. In contrast, this mutant peptide was recognized equally as well as the native form of the protein by murine T cells. Moreover, in the mouse it activates T cells specific for both forms. It displays a native-like 3D structure but is more flexible. Altogether, these results allow us to propose in this same allergenic system a set of peptides and one recombinant protein as candidates for specific immunotherapy of patients allergic to bee venom.

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Mots clés : Protéine recombinante ; Immunothérapie spécifique ; Abeille ; Venin

Keywords: Allergy; Bee venom; Allergen; Peptides; Recombinant protein; Immunotherapy

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : bernard.maillere@cea.fr (B. Maillère)
URL : http://www-dsv.cea.fr/hla2 (B. Maillère)

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.
PII: S 0 3 3 5 - 7 4 5 7 (0 2) 0 0 0 1 4 - X

La désensibilisation ou immunothérapie spécifique demeure le traitement de choix de l'allergie au venin d'abeille. Toutefois, bien que ce traitement soit reconnu comme efficace pour l'ensemble des allergies aux venins d'hyménoptère, il n'est pas sans danger et n'est donc proposé qu'aux personnes les plus allergiques. Un moyen d'améliorer ce traitement serait de procurer une totale innocuité aux préparations utilisées, en modifiant de manière adéquate les allergènes qui les composent. L'efficacité de la désensibilisation ne semble pas nécessiter de reconnaissance par les anticorps et en particulier par les IgE spécifiques [1]. Elle semble en effet résulter de la modification des profils de cytokines que produisent les lymphocytes T CD4+ spécifiques des allergènes. En particulier, la sécrétion accrue d'IL-10 qui possède des propriétés immunosuppressives, contribuerait à diminuer l'état d'activation des mastocytes et des basophiles ainsi que le taux d'IgE spécifiques [2]. Il est donc attendu qu'un allergène modifié de telle manière qu'il conserve les épitopes T CD4+ mais ne soit plus reconnu par les IgE, conserve ces propriétés de traitement mais induise moins d'effets secondaires [3,4]. La conception de cet allergène modifié est d'autant plus envisageable que les épitopes reconnus par les IgE (épitopes B) diffèrent des épitopes T reconnus par les lymphocytes T (épitopes T). Les lymphocytes T reconnaissent en effet l'allergène sous la forme de peptides que leur présentent les molécules HLA de classe II (HLA II) alors que les IgE reconnaissent généralement la forme native de la molécule. Cette stratégie de modification d'allergènes nécessite toutefois de localiser au préalable leurs épitopes.

La principale difficulté de localiser les épitopes T d'un allergène chez l'homme est qu'ils présentent une grande variabilité. Les épitopes T sont en effet des peptides d'une taille généralement comprise entre 13 et 25 acides aminés, qui se lient aux molécules HLA II. Comme chez l'homme, les molécules HLA II sont très polymorphes, les peptides que présentent ces molécules varient d'un individu à l'autre [5]. En fait, s'il existe dans le monde de nombreux allèles (la molécule HLA-DR possèdent à elle-seule plus de 250 allèles), dans une population donnée quelques molécules seulement couvrent l'essentiel de la population (Tableau 1). Ainsi, 10 molécules HLA-DR couvrent à elles-seules environ 85 % de la population européenne. Un ensemble de peptides issus d'un allergène et capables de se lier à ce nombre restreint de molécules devrait être efficace pour la majorité des personnes.

Tableau 1
Principales molécules HLA II utilisées pour les tests de liaison.
Les fréquences (Freq) exprimées sont les fréquences géniques observées en France. Les valeurs d'IC_{50} sont celles des peptides servant de référence. Elles sont exprimées en nM

HLA-DR	Freq.	IC_{50}	HLA-DP	Freq.	IC_{50}
DRB1*0101	9,3	31	DPB1*401	40	10
DRB1*0401	5,6	44	DPB1*402	11	10
DRB1*1101	9,2	38			
DRB1*0701	14,0	34			
DRB1*0301	10,9	100			
DRB1*1301	6,0	330			
DRB1*1501	8,0	14			
DRB5*0101	7,9	6,5			
DRB3*0101	9,2	5			
DRB4*0101	28,4	2			

C'est pourquoi, afin d'identifier de tels peptides dans l'allergène majeur du venin d'abeille qui est une PLA2, nous avons mis au point des tests de liaison sur l'ensemble des molécules HLA-DR les plus abondantes en Europe (Fig. 1 , Tableau 1) [6]. Nous avons synthétisé des peptides couvrant intégralement la séquence de cet allergène et évaluer la capacité de liaison de chacun de ces peptides vis-à-vis de chacune des molécules HLA-DR. Plusieurs zones dans la molécule apparaissent comme capables de se lier aux molécules HLA-DR mais d'une manière intéressante les séquences 76–106 et 111–134 recouvrent l'essentiel des zones d'interaction avec les molécules HLA-DR [6,7]. En accord avec ces résultats, nous avons observé que les cellules du sang périphériques de sujets allergiques au venin d'abeille prolifèrent préférentiellement contre des peptides couvrant ces séquences. En revanche, ils ne présentent pas de réactivité pour les IgE spécifiques (Texier et al., sous presse). Ces peptides sont en cours d'évaluation clinique pour leur capacité à traiter des patients allergiques au venin d'abeille.

Nous avons également entrepris d'utiliser ces séquences épitopes T pour concevoir une protéine modifiée de cet aller-

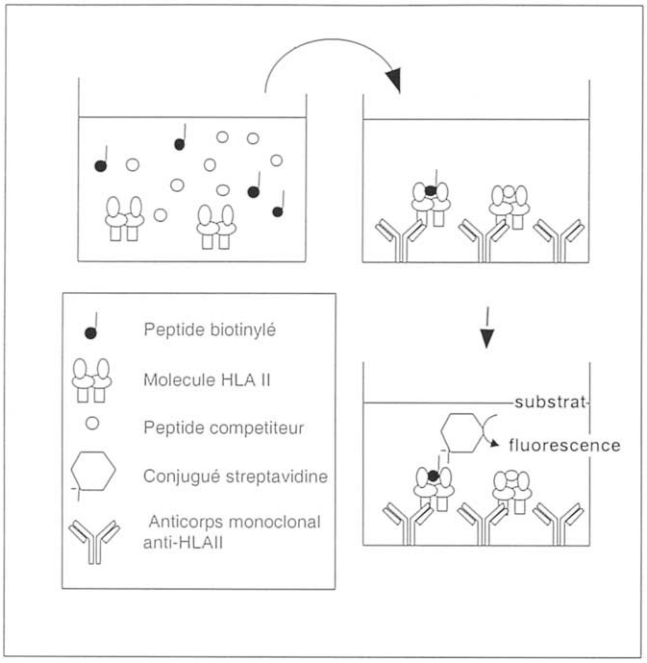

Fig. 1. Principe du test de liaison sur les molécules HLA II. Les molécules HLA II sont immunopurifiées à partir de cellules homozygotes exprimant les molécules HLA II. Le test de liaison est un test en compétition qui fonctionne en plaques 96 puits (Elisa). Les molécules sont incubées en présence d'un peptide biotinylé et de peptides à tester pendant 24 à 72 h. Les complexes sont ensuite capturés sur des plaques ayant préalablement adsorbées des anticorps monoclonaux anti-HLA II. La révélation des complexes se fait grâce à un conjugué streptavidine-phosphatase et un substrat fluorescent.

gène qui soit dépourvue de réactivité pour les IgE. De manière à trouver une telle molécule, plusieurs mutants de la PLA2 ont été construits. Ces mutations ont été introduites en dehors des zones épitopes T chez l'homme et dans des zones à la surface de la protéine. Ces molécules ont été exprimées, repliées in vitro, purifiées et leur conformation a été contrôlée par dichroïsme circulaire. Parmi ces protéines, une forme comportant 24 mutations et une délétion de 10 acides aminés présente une faible réactivité vis-à-vis d'IgE et d'IgG de patients allergiques au venin d'abeille. En revanche, ce mutant stimule in vitro des lymphocytes T polyclonaux et monoclonaux, spécifiques de l'allergène natif. Son injection en présence d'adjuvants chez la souris Balb/c recrute des lymphocytes T spécifiques, capables d'être stimulés par l'allergène natif. Elle induit également la production d'anticorps spécifiques. Cette réponse humorale est aussi forte que celle induite par la protéine non mutée mais les réactions croisées sont faibles. Compte tenu de l'ensemble de ces propriétés, cette molécule constitue également un candidat intéressant pour l'immunothérapie spécifique de l'allergie au venin d'abeille (Buhot et al., soumis).

Il est probable que des peptides ou des protéines modifiées seront utilisés dans le futur pour remplacer les moyens conventionnels de désensibilisation basés sur l'emploi d'extraits bruts d'allergènes. Ils devraient permettre une meilleure maîtrise des réactions secondaires mais également faciliter la standardisation des produits injectés. En proposant des candidats peptidiques et une protéine dans un même système allergénique, nous espérons contribuer à cette amélioration future des traitements contre l'allergie.

Remerciements

Nous remercions très chaleureusement le Pr F. Leynadier et le Dr C. Pecquet (hôpital Tenon, Paris) pour leur collaboration et le don de prélèvements sanguins de patients allergiques.

Références

[1] Akdis CA, Akdis M, Blesken T, et al. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. J Clin Invest 1996;98:1676–83.

[2] Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest 1998;102: 98–106.

[3] Muller U, Akdis CA, Fricker M, et al. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. J Allergy Clin Immunol 1998;101:747–54.

[4] Oldfield WL, Larche M, Kay AB. Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomised controlled trial. Lancet 2002;360: 47–53.

[5] Charron D, Fauchet R, Albert E, et al. Genetic diversityof HLA, functional and medical Implication. XIIth International Histocompatibility Workshop and conference, Paris, France, 1997 EDK.

[6] Texier C, Pouvelle S, Busson M, et al. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. J Immunol 2000;164: 3177–84.

[7] Texier C, Pouvelle-Moratille S, Busson M, Charron D, Menez A, Maillere B. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. Eur J Immunol 2001;31:1837–46.