



HAL
open science

Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol

Jihana Achour

► **To cite this version:**

Jihana Achour. Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol. Immunologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5017 . tel-03917168

HAL Id: tel-03917168

<https://theses.hal.science/tel-03917168>

Submitted on 1 Jan 2023

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.

Université de Paris

École doctorale n°563 – Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie

Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire

Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol

Par **Jihana Achour**

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Dr **Stéphane Hazebrouck**

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2020

MEMBRES DU JURY

Pr Saadia Kerdine-Römer, PU, Université Paris-Saclay.....Rapporteuse
Dr Joana Vitte, MCU-PH, Université Aix-Marseille.....Rapporteuse
Pr Claire Gaudichon, PU, Université Paris-Saclay.....Examinatrice
Dr Christophe Junot, DR, Université Paris-Saclay.....Examineur
Pr Gabriel Mazzucchelli, AP, Université de Liège.....Examineur
Olivier Galet, Avril.....Membre invité

REMERCIEMENTS

Ces trois années de thèse ont représenté pour moi une véritable aventure scientifique et humaine. De nombreuses personnes m'ont aidé, à travers le partage de leur connaissance, à travers leurs encouragements et leur bonne humeur. J'ai mené à bien ce projet doctoral grâce à votre soutien.

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur KARINE ADEL-PATIENT, directrice du Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire. Merci Karine pour la confiance que tu m'as accordée, merci de m'avoir soutenu dans les moments difficiles, et merci pour tes précieux conseils.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur STEPHANE HAZEBROUCK, mon directeur de thèse. Merci Stéphane pour ta confiance, pour ta patience et tes conseils scientifiques.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Docteur HERVE BERNARD pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de co-encadrer ce travail doctoral. Hervé, tu représentes à la fois pour moi un mentor et un ami. Merci pour ton écoute, ta générosité, ta joie de vivre, ton humour inimitable et contagieux.

A Stéphane et Hervé, merci de m'avoir conseillé tout au long de la thèse, merci pour toutes nos discussions scientifiques et philosophiques... Merci pour tout !

J'aimerais également remercier les membres du jury de m'avoir accordé du temps et d'avoir partagé leur précieuse expertise. La pandémie de la Covid-19 aura coloré le paysage de notre travail et de nos échanges ! Merci au Pr SAADIA Kerdine-Römer, le Dr JOANA Vitte, le Pr Claire Gaudichon, le Pr Gabriel Mazzucchelli, le Dr Christophe Junot et monsieur Olivier Galet.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres du groupe Avril, le FASO pour leur contribution au financement de cette thèse, et les partenaires du projet PRODIAL. Des remerciements particuliers pour le Docteur Romain Kappel qui m'a fourni les isolats et pour le Docteur Romain Tessier qui m'a fourni les digestas jéjunaux et iléaux de volontaires.

A Elise Yang (mon Angry Bird), Victoria Dolange (Vicky), Emeline Rudelle (Mimi), et Anne Sophie Mierzala (la psychologue malgré-elle des thésards en détresse, tes sourires sont si contagieux) pour tout ce que nous avons partagé ensemble, pour le précieux soutien moral que vous m'avez accordé, votre sincère amitié et votre franc parlé... merci du fond du cœur !

Merci à mes colocataires du Bureau de l'Ambiance : Victoria Dolange, Stéphanie Gelhaye, Audrey Rouaix, et Marion Prost. Nous avons passé de très bons moments ensemble, à partager nos bêtises, nos émotions, nos bonbons et chocolats.

Merci à tous les membres du LI2A ! Merci notamment à Blanche Guillon et Céline Chapuis (pour la réactivation des splénocytes et la production de protéines recombinantes), à Marine Guinot (mon binôme en expé animal), et ce très cher Stéphane Nano (le pro de l'info et très grand poète).

Merci à tous les membres du LERI et LEEM que j'ai croisée durant ma thèse. Un merci particulier à Dominique Marcé (ton rire est un rayon de soleil), Alexandra Savatier, Mélanie Briard, Nicolas Gaïani (le nouveau disciple d'Hervé Bernard), Christelle Dubois, Hélène Cazier (pour le MALDI-TOF), Nell Hirt, Nihel Bekhti, et Jean-Charles Robillard pour ta bonne humeur, pour avoir pris soin de nos petites souris et pour m'avoir initié à la contention des souris « pour les gauchers » (il n'est pas du SPI ?).

Je remercie aussi mes amis, plus particulièrement Clara Arroyo Garcia et Sofiane Laifa, fidèles au rendez-vous, quelle que soit la durée de nos séparations !

Enfin, je remercie ma famille pour tout l'amour et le soutien que vous m'avez apportés durant ma thèse. Mes souvenirs émus s'attachent en particulier à ma petite sœur, Gilenn, qui nous a quitté trop tôt. Malgré les épreuves, ma petite sœur n'a jamais perdu de sa bonne humeur, ni de sa patience et de son courage : une petite lumière qui continuera à être ma plus grande source d'inspiration.

ABREVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase
AND	Amande de tournesol non délipidée
ARA	Arachide
BAT	Test d'activation des basophiles (Basophil Activation Test)
CICBAA	Cercle d'Investigateur Cliniques et Biologiques en Allergie Alimentaire
COST	European Cooperation in Science and Technology
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
DTT	Dithiothréitol
ED	Écaille de tournesol Délipidée
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
END	Écaille de tournesol Non Délipidée
FAO	Food Agriculture Organization
FcεRI	Récepteur de haute affinité des IgE
GT	Graine de Tournesol
i.p.	Intrapéritonéale
IEC	Chromatographie échangeuse d'ion
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ImpARAS	Improving Allergy Risk Assessment Strategy for New Food Proteins
IUIS	International Union of Immunological Society
K_D	Constante de dissociation
nsLTP	Non specific Lipid Transfert Protein
OMS (WHO)	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)
pI	Point Isoélectrique
PR	Pathogenesis Related
RP-HPLC	Chromatographie liquide à haute performance en phase inversée
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SESA	Sunflower Seed Albumin
SFA	Sunflower Albumin
SPT	Skin Prick-Test (test cutané)
TA	Température Ambiante
T_H	T helper cell (cellule T auxiliaire)
TPO	Test de Provocation Orale
v.o.	Voie orale
% MS	Matière sèche exprimée en pourcentage

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	13
A. La place de la graine de tournesol dans l'alimentation	14
I. Généralités	14
1. Historique de l'utilisation du tournesol.....	14
2. Production et consommation de graines de tournesol.....	15
II. Composition de la graine de tournesol et extraction des fractions d'intérêt	16
1. Description de la « fleur » de tournesol	16
2. Composition des écales.....	17
3. Composition de l'amande	17
a) Lipides et extraction d'huile de tournesol.....	18
b) Sous-produits de l'extraction	20
c) Les protéines	20
i. <i>Les principales familles de protéines végétales</i>	20
ii. <i>Composition protéique de l'amande de tournesol</i>	22
iii. <i>Les globulines 11S</i>	23
iv. <i>Les albumines 2S</i>	25
v. <i>Les nsLTP</i>	29
vi. <i>Production d'isolats protéiques à partir de tourteau déshuilé</i>	30
4. Valorisation des protéines de GT dans l'alimentation humaine	31
B. L'allergie alimentaire	32
I. Définitions.....	32
II. Epidémiologie	36
1. Prévalence	36
2. Les facteurs de risques	38
a) Les prédispositions génétiques.....	38
b) Les facteurs environnementaux.....	40
III. Les acteurs et mécanismes de l'allergie alimentaire	40
1. Les acteurs de l'allergie alimentaire	40
a) Les immunoglobulines.....	40
b) Les récepteurs des IgE	41
c) Les cellules présentatrices de l'antigène	43
d) Les lymphocytes T auxiliaires (ou T helper) et les lymphocytes B	43
e) Les mastocytes et les basophiles	46
2. Le passage des antigènes à travers la barrière intestinale	47
3. Les mécanismes de l'allergie alimentaire médiée par les IgE	48
a) Phase de sensibilisation immunitaire	49

b)	Phase de déclenchement et manifestations cliniques	49
4.	Les symptômes de l'allergie alimentaire.....	51
IV.	Le diagnostic de l'allergie.....	51
a)	Les tests cutanés (ou le <i>Skin Prick-Tests</i> , SPT)	52
b)	Le dosage sanguin des IgE spécifiques.....	52
c)	Le test d'activation des basophiles (<i>Basophil Activation Test</i> , BAT).....	53
d)	Les tests de provocation orale (TPO).....	55
5.	Les traitements	55
V.	Les principaux aliments responsables d'allergie alimentaire et leurs constituants allergéniques	56
a)	Le lait de vache	57
b)	L'œuf.....	57
c)	Les poissons et crustacés.....	58
d)	Les légumineuses	58
e)	Les fruits à coques.....	58
f)	Les graines	59
g)	Les fruits et les légumes.....	59
C.	L'allergie aux graines de tournesol	60
I.	Les cas d'allergie aux graines de tournesol.....	60
II.	Les allergènes connus et potentiels de la graine de tournesol.....	61
1.	Hel a 3	61
2.	Les albumines 2S	62
3.	Les hélianthinines (globulines 11S).....	63
4.	Les oléosines	63
D.	Evaluation de l'allergénicité des nouvelles sources protéiques alimentaires.....	64
I.	Contexte	65
II.	Les stratégies d'évaluation de l'allergénicité des OGM	65
III.	Les stratégies d'évaluation de l'allergénicité des nouveaux aliments et des nouvelles protéines.....	67
IV.	Les modèles souris dans l'évaluation de l'allergénicité des protéines.....	71
E.	Les objectifs de la thèse	73

Chapitre 1 : De la graine de tournesol aux protéines purifiées	74
---	-----------

A.	Extraction, purification et caractérisation des protéines de graines de tournesol	74
I.	Matériels et méthodes	74
1.	Extraction des protéines de graines de tournesol	75
a)	Délipidation des amandes	75
b)	Mise au point d'une méthode d'extraction protéique.....	75
2.	Séparation des protéines de graines de tournesol par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium	76

3.	Fractionnement des protéines par combinaisons chromatographiques sur colonnes échangeuses d'ions et en phase inversée.....	77
a)	Séparation des protéines issues du surnageant de précipitation.....	77
b)	Séparation des protéines issues du précipité.....	77
4.	Caractérisation des fractions protéiques isolées.....	78
a)	Par chromatographie d'exclusion stérique.....	78
b)	Par méthodes électrophorétiques.....	79
i.	<i>Electrophorèse 1D</i>	79
ii.	<i>Electrophorèse 2D</i>	79
5.	Identification des protéines purifiées.....	79
a)	Caractérisation des protéines natives par spectrométrie de masse.....	80
b)	Protéomique : procédures <i>sur gel</i> et « <i>in situ</i> ».....	80
i.	<i>Digestion trypsique sur gel et analyse de la carte peptidique par spectrométrie de masse</i>	80
ii.	<i>Digestion trypsique « en solution » et analyse de la carte peptidique par spectrométrie de masse</i>	81
II.	Résultats et discussion.....	81
1.	Détermination des conditions optimales pour l'extraction protéique.....	81
2.	Fractionnement des familles majoritaires de la graine de tournesol par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium.....	85
3.	Purification et caractérisation des protéines de graines de tournesol.....	89
a)	Purification des albumines 2S et des nsLTP.....	89
b)	Purification des sous-unités des globulines 11S.....	99
B.	Conclusions.....	103

<p><u>Chapitre 2 : Développement de modèles souris de sensibilisation aux protéines de la graine de tournesol..... 105</u></p>

A.	Développement d'un modèle de sensibilisation par voie intrapéritonéale.....	105
I.	Matériel et méthodes.....	105
1.	Préparation de l'extrait de protéique d'écaillés de graines de tournesol.....	105
2.	Protocole de sensibilisation.....	106
3.	Dosage des réponses IgE et IgG1 spécifiques.....	107
a)	Dosage des IgG1 spécifiques.....	107
b)	Dosage des IgE spécifiques.....	108
i.	<i>Couplage à la biotine des protéines de graines de tournesol.</i>	108
ii.	<i>Dosage des IgE spécifiques.</i>	108
4.	Réactivation <i>in vitro</i> des splénocytes.....	109
5.	Analyses statistiques.....	110
II.	Résultats.....	110
1.	Caractérisation des réponses humorales induites chez les souris sensibilisées.....	110

2.	Caractérisation des réponses cellulaires.....	113
III.	Conclusions.....	114
B.	Développement d'un modèle de sensibilisation par voie orale.....	114
I.	Matériels et méthodes.....	114
1.	Préparation des extraits protéiques de graines de tournesol.....	114
2.	Protocole de sensibilisation par voie orale.....	115
3.	Dosage des réponses IgE et IgG1 spécifiques.....	116
4.	Analyse de la réactivité croisée entre albumines 2S de GT.....	116
5.	Analyses statistiques.....	117
II.	Résultats.....	117
1.	Analyse des extraits protéiques.....	117
2.	Caractérisation de la réponse humorale de souris sensibilisées par voie orale.....	118
3.	Caractérisation de l'immunoréactivité IgE et IgG1 des différentes fractions de protéines de GT.....	119
4.	Analyse des réponses IgE et IgG1 spécifiques de SESA2-1, SESA20-2, SFA-8 et Hel a 3 123.....	124
5.	Analyse de la réactivité croisée au sein des albumines 2S de GT.....	124
6.	Caractérisation des réponses cellulaires.....	125
III.	Conclusions.....	127
C.	Comparaison du potentiel de sensibilisation de différents isolats de protéines de GT chez la souris.....	128
I.	Matériels et méthodes.....	129
1.	Extraits protéiques.....	129
2.	Protocole de sensibilisation des souris.....	130
3.	Réponses humorales.....	131
4.	Réponses cellulaires.....	131
5.	Analyses statistiques.....	131
II.	Résultats.....	132
1.	Réponses humorales induites chez les souris sensibilisées.....	132
2.	Analyse de la réactivité croisée au sein des albumines 2S de GT.....	134
3.	Réponses cellulaires.....	135
III.	Conclusions.....	138
D.	Conclusion et perspectives.....	139

<p>Chapitre 3 : Analyse du profil de sensibilisation de patients allergiques aux protéines de graines de tournesol..... 139</p>
--

A.	Matériels et méthodes.....	139
I.	Les sérums humains.....	139
II.	Allergènes et extraits protéiques.....	142
1.	Détection des IgE spécifiques sur allergènes immobilisés.....	142

2.	Détection des IgE spécifiques par capture des IgE	143
3.	Test de compétition de la liaison IgE.....	143
B.	Résultats.....	144
1.	Dosage des IgE sur allergènes immobilisés	144
2.	Dosage des IgE en format inverse.....	146
3.	Analyse de la réactivité croisée IgE entre les nsLTP de GT, d'arachide et de pêche.	148
4.	Analyse de la réactivité croisée entre les SESA.....	149
C.	Conclusions.....	153

<p>Chapitre 4 : Résistance des protéines de GT à la digestion gastroduodéale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></p>	154
---	------------

A.	Modèle de digestion gastroduodéale <i>in vitro</i>.....	154
I.	Matériels et méthodes	154
1.	Procédure de digestion gastroduodéale <i>in vitro</i>	154
2.	Suivi de la digestion gastroduodéale <i>in vitro</i> par SDS-PAGE et spectrométrie de masse	155
3.	Evaluation de l'immunoréactivité des protéines purifiées après digestion	156
a)	Compétition IgE-digestas à l'aide de sérums de souris sensibilisées aux GT.....	156
b)	Compétition IgE-digestas à l'aide de sérums de patients allergiques aux GT	156
II.	Résultats.....	156
1.	Analyse des digestions d'isolats et de protéines purifiées	156
a)	Digestion gastroduodéale des isolats	156
b)	Résistance des protéines purifiées Hel a 3, SFA-8 et SESA2-1 à la digestion gastroduodéale <i>in vitro</i>	159
2.	Analyse de l'immunoréactivité des digestas de protéines de graines de tournesol à l'aide de sérums de souris sensibilisées	162
3.	Analyse de l'immunoréactivité des digestas de protéines de GT à l'aide de sérums de patients allergiques.....	163
III.	Conclusions.....	165
B.	Détection de l'immunoréactivité des protéines de graines de tournesol dans des digestas jéjunaux et iléaux humains	166
I.	Matériels et méthodes	167
1.	Etude clinique	167
2.	Extraction des protéines du biscuit PRODIGE	167
3.	Inhibitions de la liaison IgE aux protéines de GT.....	168
II.	Résultats.....	168
1.	Analyse électrophorétique du contenu protéique des biscuits PRODIGE	168
2.	Vérification de l'immunoréactivité des biscuits « PRODIAL »	169
3.	Détection de l'immunoréactivité des protéines de graines de tournesol dans les digestas jéjunaux et iléaux	171
III.	Conclusion	172

<u>Conclusions générales et perspectives</u>	<u>173</u>
<u>Références bibliographiques</u>	<u>178</u>
<u>Listes de communications.....</u>	<u>196</u>
<u>Annexes</u>	<u>i</u>

Table des figures

Figure 1. Diagramme simplifié de la fleur de tournesol.	16
Figure 2. Procédé conventionnel de l'extraction de l'huile de GT combinant un pressage mécanique une extraction au n-hexane.	19
Figure 3. Schéma récapitulatif des principales familles de protéines des plantes.....	21
Figure 4. Comparaison de différentes variétés de GT.....	23
Figure 5. Structure 3D de l'hélianthinine.....	24
Figure 6. Schéma de la structure de l'hélianthinine en fonction de différents paramètres.	25
Figure 7. Schéma de la structure d'une albumine 2S.....	26
Figure 8. Séparation des albumines 2S de la GT par RP-HPLC.....	26
Figure 9. Structure 3D de SFA-8.	27
Figure 10. Schéma de la préalbumine SESA3 (ou SFA-8) : un simple précurseur.	27
Figure 11. Séparation et caractérisation des albumines 2S majoritaires de la GT.	28
Figure 12. Schéma de la préalbumine SESA2 : un double précurseur.	28
Figure 13. Structure 3D de Hel a 3 30	30
Figure 14. Classification des effets indésirables aux aliments..... 35	35
Figure 15. Prévalence de l'allergie alimentaire chez les moins de 18 ans dans le monde à partir de 2018. 36	36
Figure 16. Prévalence de l'allergie alimentaire chez des enfants de moins de 5 ans. 37	37
Figure 17. Prévalence de l'allergie alimentaire en fonction de l'âge et du sexe..... 38	38
Figure 18. Concept de la marche atopique..... 39	39
Figure 19. Schéma des immunoglobulines de classe G (IgG) et de classe E (IgE). 41	41
Figure 20. Représentation schématique du récepteur de haute affinité des IgE : FcεRI..... 42	42
Figure 21. Représentation schématique du récepteur de faible affinité : FcεRII (ou CD23). 43	43
Figure 22. La présentation des peptides antigéniques par les cellules dendritiques aux cellules T CD4 naïves. 44	44
Figure 23. Différenciation et fonction des cellules T auxiliaires. 45	45
Figure 24. Les différentes voies d'entrée des antigènes au niveau de la barrière intestinale et leur présentation au système immunitaire..... 48	48
Figure 25. Mécanisme général de l'allergie alimentaire médiée par les IgE 50	50
Figure 26. Principe du test d'activation des basophiles (BAT)..... 54	54
Figure 27. Fréquence des allergies alimentaires en fonction de la famille des trophallergènes impliqués et de l'âge..... 57	57
Figure 28. Analyse de la réponse IgE par immunoempreinte à 1D. 62	62
Figure 29. Schéma d'étude recommandé par l'EFSA pour l'évaluation du risque allergénique des nouvelles protéines issues d'aliments GM..... 66	66
Figure 30. Schéma récapitulatif des approches proposées pour l'évaluation de l'allergénicité des nouvelles sources de protéines ou des protéines purifiées. 68	68
Figure 31. Principaux facteurs pouvant influencer la conception du modèle animal. 72	72

Figure 32. Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des extractions protéiques effectuées à différents pH.	83
Figure 33. Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des extraits protéiques issus des différentes extractions.	84
Figure 34. Electrophorèses bidimensionnelles d'extraits protéiques.	85
Figure 35. Analyse électrophorétique des extraits protéiques issus de la précipitation à 20 %, 40 % et 60 % de sulfate d'ammonium.	86
Figure 36. Electrophorèse bidimensionnelle d'extraits protéiques issus de la précipitation à 40 % de sulfate d'ammonium.	87
Figure 37. Chromatographie d'exclusion stérique en conditions non dénaturantes.	88
Figure 38. Chromatogramme de la fraction protéique S40 par RP-HPLC.	89
Figure 39. Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des fractions protéiques issues de la RP-HPLC.	91
Figure 40. Chromatogramme « type » de l'extrait S40 sur colonne échangeuse de cations.	92
Figure 41. Chromatogrammes RP-HPLC des protéines du S40 issues d'une purification intermédiaire.	93
Figure 42. Analyse électrophorétique d'une sélection de protéines purifiées issues du S40.	94
Figure 43. Chromatogramme « type » de l'extrait P40 sur colonne échangeuse d'anions.	100
Figure 44. Chromatogramme des fractions protéiques du P40 issues de la purification successive par IEC et RP-HPLC.	101
Figure 45. Analyse électrophorétique d'une sélection de protéines purifiées issues du P40.	102
Figure 46. Protocole de sensibilisation des souris BALB/cByJ par voie i.p. à un extrait d'écailles de tournesol délipidées.	106
Figure 47. Dosage des IgG1 spécifiques sur antigènes immobilisés.	107
Figure 48. Dosage des IgE spécifiques en format inverse.	109
Figure 49. Analyse des réponses IgG1 spécifiques des protéines de GT induites chez les souris sensibilisées par injections intrapéritonéales.	111
Figure 50. Analyse des réponses IgE spécifiques des protéines de GT induites chez les souris sensibilisées par injections intrapéritonéales.	112
Figure 51. Sécrétion de cytokines par les splénocytes de souris sensibilisées par voie i.p. réactivés ex vivo par un extrait total de protéines de GT.	113
Figure 52. Protocole de sensibilisation des souris BALB/c par v.o. à différents extraits de protéines de GT.	115
Figure 53. Principe du test d'inhibition de la liaison des IgE sériques à un allergène marqué.	117
Figure 54. Analyse électrophorétique d'extraits protéiques issus de l'amande et d'écailles de GT. .	118
Figure 55. Réponses IgG1 et IgE spécifiques des protéines de GT et d'arachide	119
Figure 56. Etude de l'immunoréactivité des protéines de GT du S40.	121
Figure 57. Etude de l'immunoréactivité des protéines de GT du P40.	122
Figure 58. Réponses IgG1 et IgE spécifiques des protéines purifiées de GT.	123
Figure 59. Analyse de la réactivité croisée entre les SESA (test de compétition)	124

Figure 60. Sécrétion de cytokines par les splénocytes de souris sensibilisées par v.o. réactivés <i>ex vivo</i> avec un extrait total de protéines de GT.	126
Figure 61. Sécrétion de cytokines par les splénocytes de souris sensibilisées par v.o. réactivés <i>ex vivo</i> avec un extrait d'arachide	127
Figure 62. Analyse électrophorétique des isolats (SFA-WPI, SFS-IS, SFS-AS et SFS-IP)	130
Figure 63. Protocole de sensibilisation des souris BALB/c par v.o. à différents isolats.....	130
Figure 64. Réponses IgG1 spécifiques des protéines de GT chez les souris sensibilisées par v.o. aux différents isolats de GT.....	133
Figure 65. Réponses IgE spécifiques de des protéines purifiées de GT chez les souris sensibilisées par v.o. aux différents isolats de GT.....	134
Figure 66. Analyse de la réactivité croisée entre les SESA (test de compétition).	135
Figure 67. Sécrétion de cytokines par les splénocytes après réactivation <i>ex vivo</i>	137
Figure 68. Etude de l'inhibition de la liaison IgE à Hel a 3 (tests de compétitions).....	149
Figure 69. Etude de l'inhibition de la liaison IgE aux SESA (tests de compétitions).....	150
Figure 70. Etude de l'inhibition de la liaison IgE à SFA-8 (tests de compétitions).....	152
Figure 71. Etude de l'inhibition de la liaison IgE à SESA2-1 (tests de compétitions)	153
Figure 72. Analyse électrophorétique des digestions gastriques et gastroduodénales <i>in vitro</i> du lait de vache délipidé.	157
Figure 73. Analyse électrophorétique des digestions gastrique et gastroduodénales <i>in vitro</i> des isolats de GT.	158
Figure 74 Analyse électrophorétique des digestions gastrique et gastroduodénales <i>in vitro</i> de Hel a 3.	159
Figure 75. Analyse électrophorétique des digestions gastriques et gastroduodénales <i>in vitro</i> de SESA2-1.	160
Figure 76. Analyse par MS des digestas de SESA2-1	160
Figure 77. Analyse électrophorétique des digestions gastriques et gastroduodénales <i>in vitro</i> de SFA-8	161
Figure 78. Analyse pas MS des digestas de SFA-8.....	162
Figure 79. Inhibition de la liaison des IgE de souris à SFA-8 ou à SESA2-1 par les digestas des protéines correspondantes (tests de compétitions)	163
Figure 80. Inhibition de la liaison des IgE de trois patients à Hel a 3 par les digestas de Hel a 3 (tests de compétitions).....	164
Figure 81. Inhibition de la liaison des IgE de deux patients SFA-8 et SESA2-1 par les digestas des protéines correspondantes (tests de compétitions).....	165
Figure 82. Analyse électrophorétique du contenu protéique du biscuit « Prodige », du biscuit Lu® et de l'extrait d'isolat SFS-WPI.....	169
Figure 83. Etude de l'immunoréactivité de SESA2-1 et SFA-8 dans le biscuit « Prodige ».	170
Figure 84. Etude de l'immunoréactivité de Hel a 3 dans le biscuit « Prodige ».	171
Figure 85. Etude de l'inhibition de l'immunoréactivité de SESA2-1 dans les digestas jéjunaux et iléaux	172

Table des tableaux

Tableau 1. Homologies de séquence exprimées en pourcentage entre les albumines 2S de la GT.	29
Tableau 2. Classification des hypersensibilités.....	34
Tableau 3. Principaux symptômes des réactions allergiques alimentaire médiées par les IgE.....	51
Tableau 4. Réactivité croisée entre les protéines alimentaire d'origine végétale et le pollen.....	60
Tableau 5. Teneur en huile et protéine dans l'amande et l'écale de tournesol.	74
Tableau 6. Evaluation du rendement d'extraction en fonction du pH et de la composition du tampon.	82
Tableau 7. Analyse de l'influence du sel, détergent et agent chaotropique sur le rendement d'extraction protéique	83
Tableau 8. Analyse de l'influence du rapport masse traitée/volume tampon sur le rendement d'extraction protéique.	84
Tableau 9. Première identification des protéines majoritaires issues des fractions 1-9 de la RP-HPLC par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	90
Tableau 10. Identification des protéines de GT purifiées par combinaison de chromatographies échangeuse de cations et de RP-HPLC.	97
Tableau 11. Identification des sous-unités des globulines 11S purifiées par chromatographie échangeuse d'anion, suivie d'une RP-HPLC.....	103
Tableau 12. Données cliniques des patients allergiques espagnols.	141
Tableau 13. Données fournies par PlasmaLab sur les sérums étudiés.....	142
Tableau 14. Réponses IgE spécifiques des protéines de GT sur allergènes immobilisés	145
Tableau 15. Réponses IgE spécifiques des protéines de GT par capture des IgE.....	147

Introduction générale

L'allergie alimentaire est un véritable problème de santé publique. Elle est classée 4^{ème} maladie chronique par l'organisation mondiale de la santé (OMS) du fait de sa prévalence et de la gravité des symptômes qu'elle engendre. Dans des conditions physiologiques normales, le rôle du système immunitaire est d'induire une tolérance orale contre les protéines alimentaires. Dans le cas d'une allergie alimentaire, il y a absence ou rupture de cette tolérance orale, engendrant une réponse inappropriée du système immunitaire contre une protéine alimentaire normalement inoffensive pour l'organisme. L'allergie alimentaire dépend de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux étroitement liés (voie d'exposition, dose, maladie, âge, ...).

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire (LI2A) qui fait partie de l'UMR CEA INRAE du Département Médicament et Technologie de la Santé (DMTS/Institut Joliot) au CEA de Saclay. Ces travaux s'inscrivent dans un projet collaboratif PRODIAL soutenu par le Fond d'Action Stratégique des Oléoprotéagineux (FASO) de Sofiprotéol. Les graines de tournesol (GT) sont aujourd'hui vues comme une source de protéines, à incorporer comme nouvel ingrédient dans l'alimentation humaine. De ce fait, les protéines de GT doivent alors répondre aux recommandations des différentes autorités de sécurité alimentaire. Par ailleurs, des cas d'allergies aux GT ont été rapportés, notamment dans le pourtour du bassin méditerranéen. L'objectif de la thèse a donc été d'évaluer le potentiel allergénique des protéines de GT en purifiant les protéines de GT appartenant aux principales familles d'allergènes (Chapitre 1), en développant des modèles de sensibilisation allergique chez la souris afin de pouvoir comparer leur potentiel de sensibilisation (Chapitre 2), puis en analysant la spécificité des réponses IgE chez des patients allergiques aux GT (Chapitre 3), et enfin en étudiant l'immunoréactivité résiduelle des protéines de GT dans des digestas *in vitro* et *in vivo* (Chapitre 4).

A. La place de la graine de tournesol dans l'alimentation

I. Généralités

Le tournesol (*Helianthus annuus Linnaeus*) est une dicotylédone appartenant à la famille des Astéracées (*Asteraceae*), l'une des plus grandes familles d'angiospermes. Cette famille comprend un peu plus de 1600 genres et 24 000 espèces retrouvés à travers le monde, à l'exception de l'Antarctique [1]. Les Astéracées, qui représentent environ 10 % des plantes à fleurs, sont notamment cultivées pour l'ornement (*e.g.* dahlia, cosmos...), leurs vertus médicinales (*e.g.* camomille, calendula, arnica...), mais également pour l'alimentation humaine (*e.g.* artichaut, tomate, laitue...). Leur rôle dans la nutrition humaine peut aussi être illustré au travers de la production d'huile de tournesol.

D'un point de vue étymologique, le nom scientifique du tournesol, *Helianthus annuus* vient de deux noms grecs, *helios* pour « soleil » et *anthos* pour « fleur », qui associent la forme de la fleur à celle du soleil. Si les dénominations anglaise (sunflower) et allemande (Sonnenblumen) retranscrivent littéralement ces termes, celles française (tournesol) et espagnole (girasol) reflètent l'idée que la « fleur tourne avec le soleil ».

1. Historique de l'utilisation du tournesol

Des données archéologiques indiquent que la première domestication du tournesol date de près de 5000 ans avant JC en Amérique du Nord [2]. Certains archéologues suggèrent même que le tournesol a été consommé par les amérindiens avant le maïs. Durant la période de la découverte du Nouveau Monde, l'explorateur espagnol Monardes apporta en 1569 le tournesol en Europe [3]. Le tournesol fut pendant longtemps utilisé comme plante ornementale. Il fallut attendre un siècle pour que le tsar Pierre 1er le Grand, après une visite en Hollande, importe le tournesol en Russie afin de l'exploiter à des fins nutritionnelles. Puis, au 18^{ème} siècle, la culture du tournesol s'accroît en Europe pour différentes utilisations : les graines furent consommées comme friandise et la fleur fut utilisée comme plante ornementale. Vers la fin du 19^{ème} siècle, l'huile de tournesol entra progressivement dans l'alimentation humaine grâce à une variété de tournesol riche en lipides, la Mammoth Russian, qui fut largement répandue en Europe et aux Etats-Unis. Cette variété était également exploitée dans l'alimentation animale. Les tourteaux (résidus solides issus de l'extraction de l'huile d'oléagineux) étaient utilisés pour les poules,

tandis que les tiges et les feuilles séchées étaient intégrées dans le régime alimentaire des chevaux et des vaches. Le 20^{ème} siècle vit l'avènement, notamment en Russie, de nouvelles variétés de tournesol ayant pour caractéristiques de fortes teneurs en lipides, de plus grandes résistantes aux maladies, ainsi qu'une bonne adaptabilité à une diversité de sols et de climats [4]. Au début du 20^{ème} siècle, plus d'une vingtaine de variétés de tournesol particulièrement riches en lipides (environ 50 % de la matière sèche, %MS) ont été ainsi sélectionnées en Russie [5]. Les Etats-Unis et le Canada ont cultivé leurs propres variétés de tournesol, dans l'objectif de répondre à la demande européenne, conduisant à une forte concurrence avec la Russie dans les années 1970. Les collaborations entre l'Europe et les Etats-Unis ont alors permis de produire des variétés de tournesol plus résistantes aux maladies et adaptées aux sols et climats propres aux régions de chaque pays d'Europe [5]. Cette production répondait également à la demande accrue d'huile d'origine végétale : durant cette même période, l'utilisation de matières grasses d'origine animale dans l'alimentation humaine était remise en question, du fait de l'augmentation des maladies cardiovasculaires.

2. Production et consommation de graines de tournesol

D'après la *Food Agriculture Organization* (FAO), en 2018, la GT est la 5^{ème} oléagineuse la plus cultivée au niveau mondial. L'Ukraine (\approx 14 millions de tonnes) et la Russie (\approx 12 millions de tonnes) sont responsables à eux deux de plus de la moitié de la production mondiale. La part française de GT dans la production mondiale représente environ 2 %. Les GT sont principalement dédiées à l'alimentation humaine pour son huile, qui est également exploitée pour la production de biocarburant (biodiesel). Dans le monde, l'huile de tournesol est la quatrième huile la plus consommée après l'huile de palme, de soja et de colza (7,6 % de la consommation d'huile) [6]. En France, sa part représente près de 42 % de la consommation d'huile d'origine végétale [6].

Outre leurs cultures en vue de production huilière, certaines variétés de GT peuvent être directement consommées séchées, grillées et/ou salées. Dans différents pays notamment du bassin méditerranéen, les GT, comme d'autres graines et fruits à coques (*e.g.* graines de sésame, de courges et les pistaches) sont directement consommées comme collations et friandises (« *Pipas* »), ou mélangées aux plats et pâtisseries. Les GT peuvent également être consommées sous forme de beurre, comme aux Etats-Unis (Sunbutter®). Sa commercialisation

a pour but de permettre aux enfants allergiques à l'arachide de consommer un beurre ressemblant à celui issu de cacahuètes.

II. Composition de la graine de tournesol et extraction des fractions d'intérêt

1. Description de la « fleur » de tournesol

Le tournesol est caractérisé par la présence d'une inflorescence en capitule (15 – 40 cm), sur lequel on retrouve jusqu'à 2000 fleurs ligulées en périphérie, ressemblant à des pétales (fleurs femelles) et des fleurs tubuleuses formant un cœur au centre du capitule (fleurs hermaphrodites, **Figure 1**) [7]. Les fruits, les GT, sont en réalité des akènes. Il s'agit de fruits secs à une seule graine dont le péricarpe de couleur noire et blanche (écale) est non soudé et ne s'ouvre pas à maturité.

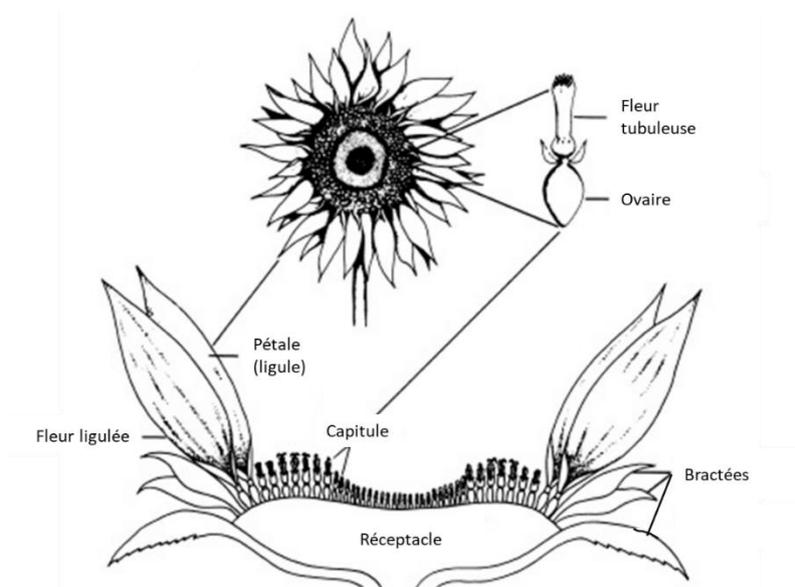


Figure 1. Diagramme simplifié de la fleur de tournesol.

Chaque inflorescence n'est pas une seule fleur, mais environ 1000-2000 fleurs individuelles réunies dans un réceptacle commun. Adaptée de [7].

L'écale et la graine (ou « amande » dans la suite du manuscrit) présentent de fortes divergences, notamment au niveau de leurs compositions lipidiques, protéiques et glucidiques. Si ces deux parties de la graine contiennent une diversité de constituants à valeur nutritionnelle, elles comprennent également, à des proportions variables, des composants dits « antinutritifs ».

2. Composition des écales

Les sucres complexes (cellulose et lignine) représentent environ de 50 % MS de l'écale, dont 7-15 % de cellulose-hémicellulose et 20-25 % de lignine. Outre ces constituants les plus abondants, les lipides représentent environ 5 % et les protéines environ 4 % [8]. Trop riches en fibres et du fait de leur faible contenu protéique, les écales de GT sont des sous-produits industriels peu valorisables. Les traitements industriels des GT (décorticage) permettent d'éliminer les écales. Différentes utilisations ont été recommandées, comme fertilisant ou supplément alimentaire pour les ruminants. Néanmoins, leur richesse en lignine rend les écales peu biodégradables et digestibles. Leur contenu en fibre et la présence de certains composants antinutritifs diminuent l'absorption des protéines et des nutriments et rendent difficile leur incorporation dans l'alimentation animale [9]. Les écales, comme d'autres sous-produits riches en lignine, sont traditionnellement brûlées pour produire de l'énergie ou incorporées dans les produits pour l'élaboration de résines, de mousses polyuréthanes ou de dispersants dans le domaine du bâtiment. Récemment, une équipe en Argentine a proposé l'utilisation des écales comme source nutritionnelle pour la production de certains champignons, notamment le basidiomycète *Pleurotus ostreatus*, qui est connu pour être un « agent » naturel de décomposition de certains feuillus riches en lignine [10].

3. Composition de l'amande

Outre une forte concentration en lipides (47 à 65 % MS), l'amande de tournesol comprend de nombreux constituants glucidiques et protéiques. La proportion de ces différents composants peut fluctuer en fonction de la variété de tournesol. Les teneurs en protéines peuvent ainsi varier entre 20 – 40 % MS de l'amande [11, 12]. De façon moins abondante, l'amande comprend également une diversité de composants d'intérêts nutritionnels (et de santé) tels que des caroténoïdes, des vitamines (*e.g.* E et B1), des sels minéraux, mais aussi des composants antinutritifs. Ces composants, ainsi dénommés du fait de leurs impacts négatifs sur les qualités nutritionnelles de l'amande, sont représentés essentiellement par des fibres, l'acide phytique et des composés phénoliques (*e.g.* acide chlorogénique) qui ont un rôle de défense de la plante. Les composés antinutritifs peuvent diminuer l'absorption et la valeur nutritionnelle des aliments en se fixant à certaines protéines au niveau de groupements fonctionnels, ou en altérer les qualités visuelles et gustatives [13, 14]. Ainsi, les composés phénoliques représentent un véritable défi dans la production et l'exploitation de tourteaux et d'isolat de GT : ces

composants apportent de l'amertume et une coloration peu appétissante aux tourteaux et aux isolats [15]. L'élimination des composés phénoliques permet de s'affranchir du brunissage et de l'amertume des isolats protéiques.

a) Lipides et extraction d'huile de tournesol

L'amande de tournesol présente un taux de lipides pouvant aller jusqu'à 65% MS [11]. Ces lipides sont dits « de réserve » du fait de leur fort apport en carbone, nécessaire au développement de l'embryon. La production de lipides est influencée par des facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux. Les composants majoritaires des lipides sont les acides oléique (15-37 % MS), linoléique (51-73 % MS), palmitique (5-7 % MS) et stéarique (2-6 % MS). De façon moins abondante, l'amande contient également des lipides de type acide arachidonique (0-0,3 % MS) ou linoléique (0,3 % MS) [11].

Le procédé conventionnel d'extraction de l'huile de GT est précédé de multiples étapes incluant une procédure de nettoyage, séchage des graines puis de trituration (aplatissage et cuisson, **Figure 2**).

Une première extraction mécanique de l'huile est réalisée par pressage à froid à l'aide d'une presse à vis (pressage en continu). Une des contraintes de ce procédé est l'augmentation de la température, due aux forces de frottements liées à la rotation de la presse à vis. Le coefficient de viscosité de l'huile augmente, facilitant ainsi son écoulement mais diminuant sa qualité. La température du système doit donc être strictement contrôlée et maîtrisée. Cette première voie d'extraction a fait, et fait encore, l'objet d'optimisation [16, 17]. Un raffinage des « huiles brutes de pression » est ensuite réalisé, permettant d'obtenir l'« huile de pression » (**Figure 2**). Cependant, le pressage mécanique ne permet pas un déshuilage complet des graines : moins de 20 % de l'huile sont extraits [16].

Une deuxième étape d'extraction sur le résidu de tourteau gras obtenu suite au pressage mécanique peut ensuite être menée à l'aide de solvants (**Figure 2**). Le n-hexane est utilisé pour l'extraction et le fractionnement des corps gras et procure un rendement d'extraction proche du 100 % [18]. L'utilisation de solvants dans l'industrie agro-alimentaire est contrôlée par des directives européennes. Deux types de solvants existent, les solvants « généraux » (*i.e.* éthanol) et les solvants avec des conditions d'utilisations particulières de sécurité alimentaire du fait de leur toxicité, et dont fait partie le n-hexane [18, 19].

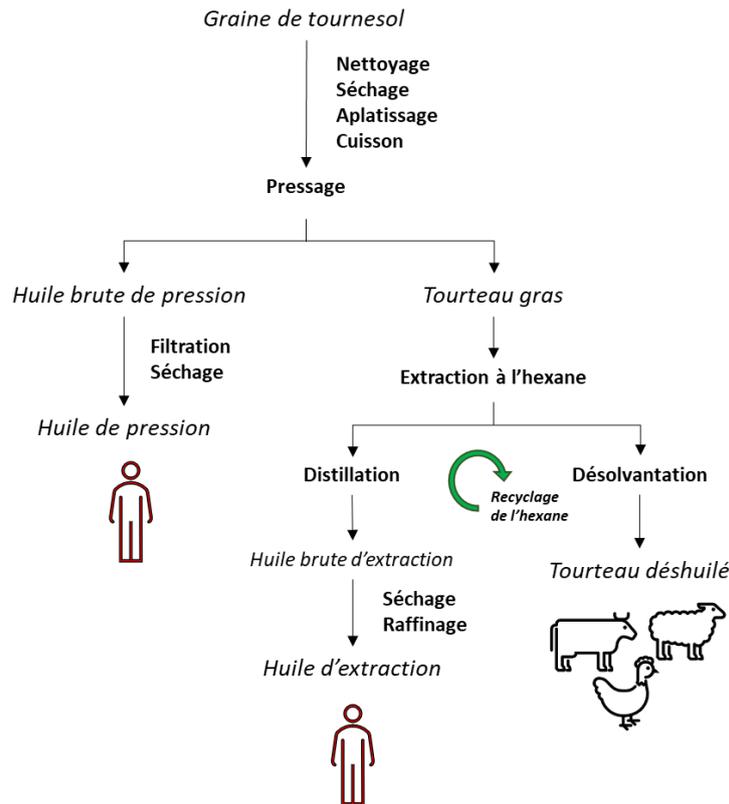


Figure 2. Procédé conventionnel de l'extraction de l'huile de GT combinant un pressage mécanique une extraction au n-hexane.

Ce procédé conventionnel (industriel) de production d'huile consiste dans une première étape à une trituration des graines (nettoyage, séchage, aplatissage, cuisson et pressage par une action mécanique de compression). L'huile brute de pression est alors filtrée et l'huile résiduelle contenue dans le tourteau gras est extraite au n-hexane. Après extraction, le tourteau appauvri subit une désolvantation et l'extrait d'huile dans le n-hexane subit une distillation, puis des étapes de raffinage. Adaptée de [20].

L'huile résiduelle, présente dans le tourteau gras est ainsi extraite par percolation au n-hexane et recyclage du n-hexane. La fraction n-hexane s'enrichit en huile et inversement, le tourteau s'appauvrit en huile. En fin de cycle, le solvant est éliminé de l'huile par distillation, et du tourteau par désolvantation. Ainsi, on obtient d'une part de l'huile, dite « huile d'extraction », et d'autre part, du tourteau déshuilé [18, 20, 21]. L'huile d'extraction est ensuite généralement raffinée et purifiée, afin d'en éliminer les impuretés (sédiments, pesticides et mycotoxines).

Des procédés alternatifs permettent de s'affranchir de l'utilisation de solvant. Par exemple, extraction de l'huile en milieux aqueux, dans des conditions acides ou basiques [22]. Cette extraction peut être précédée d'un traitement enzymatique [23]. L'utilisation d'enzymes (*e.g.* la cellulase) endommage la paroi cellulaire et favorise l'extraction de l'huile. Les rendements

d'extraction d'huile dépendent des graines d'oléoprotéagineux et de leur lignée. Ces rendements sont accrus lorsque le traitement en milieu aqueux est suivi d'un traitement mécanique, mais restent toutefois plus faibles que l'extraction en solvant [23].

Les huiles sont principalement exploitées dans l'alimentation humaine et dans la production de biocarburant, tandis que les tourteaux sont à ce jour principalement exploités dans l'alimentation animale.

b) Sous-produits de l'extraction

La production d'huile de tournesol génère des sous-produits valorisés dans les domaines du cosmétique, de l'oléochimie et de l'agroalimentaire (animaux et humains). Le sous-produit sur lequel nous allons porter le plus d'intérêt est le tourteau déshuilé principalement exploité dans l'alimentation animale à ce jour. Riche en protéines, le tourteau déshuilé fait, depuis quelques années, l'objet de nombreuses études portant notamment sur la valorisation de ces protéines dans l'alimentation humaine.

c) Les protéines

i. Les principales familles de protéines végétales

La caractérisation des protéines de graines végétales relève d'une première classification proposée par Osborne (1924), qui les répartit selon leurs critères de solubilité dans différents milieux [24]. Quatre groupes de protéines sont décrits : les albumines (solubles dans l'eau), les globulines (solubles en solution saline), les prolamines (solubles en eau additionnée de 70 % d'éthanol) et les glutélines (solubles à $\text{pH} > 11$).

Cette première classification a été affinée à l'aide d'autres caractéristiques physico-chimiques et plus particulièrement en fonction du coefficient de sédimentation des protéines, exprimé en Svedberg (S). Ce coefficient est calculé en divisant la vitesse de sédimentation (m/s) par l'accélération de la protéine dans un milieu donnée (m/s^2). Ce coefficient dépend de différents paramètres, dont la masse moléculaire et la conformation de la protéine. Trois groupes principaux se distinguent : les globulines 11S, les globulines 7S et les albumines 2S [25, 26].

Les **globulines 11S**, aussi appelées légumineuses, sont des protéines hexamériques, principalement retrouvées dans les graines de légumineuses, d'où leur nom. Ce sont des complexes protéiques d'environ 300 – 400 kDa, constitués de 6 sous-unités d'environ 60 kDa. Ces sous-unités, sont constituées d'une grande sous-unité acide ($\alpha \approx 40$ kDa) et d'une petite sous-unité basique ($\beta \approx 20$ kDa) maintenues par un pont disulfure.

Les **globulines 7S**, aussi appelées vicillines, sont des protéines trimériques d'environ 150-200 kDa, constituées de sous-unités de tailles variables (de 12 kDa à 70 kDa).

Le troisième grand groupe protéique est celui des **albumines 2S**. Ce sont des protéines de faible masse moléculaire et de structure compacte. Elles sont toutes synthétisées sous forme de pro-albumine qui engendre généralement, après des modifications post-traductionnelles, une petite sous-unité (4 – 5 kDa), et une grande sous-unité (9 – 10 kDa) reliées par des ponts disulfures. Généralement, deux ponts disulfures relient les deux sous-unités et deux autres ponts disulfures sont retrouvés au sein de la grande sous-unité.

Les globulines 11S, les globulines 7S et les albumines 2S font parties des « protéines de stockage » (**Figure 3**), du fait de leurs apports en carbone et azote nécessaires pour la croissance et le développement des plantes [27-29].

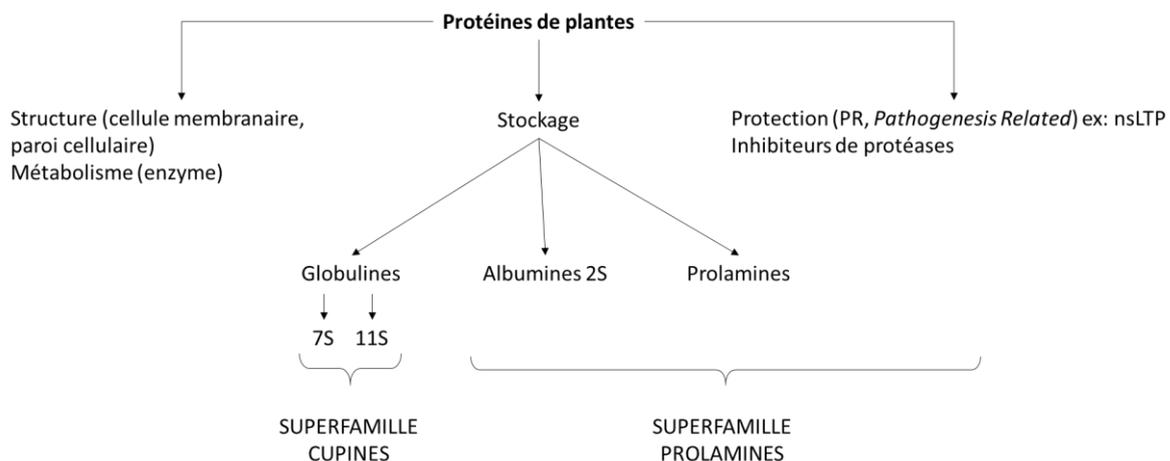


Figure 3. Schéma récapitulatif des principales familles de protéines des plantes.

Une première classification répartit les protéines de plantes selon leurs critères de solubilité dans différents milieux (les albumines, les globulines, les prolamines et les glutélines) [24]. Aujourd'hui, différentes caractéristiques physico-chimiques et leur coefficient de sédimentation exprimé en Svedberg (S) permettent de classer les protéines. Les protéines sont réparties en trois groupes principaux : les globulines 11S, les globulines 7S et les albumines 2S. Adaptée de [30].

La présence et la proportion de ces familles de protéines sont très variables entre graines de végétaux [25]. En effet, les albumines 2S sont des protéines ubiquitaires, tandis que les globulines 7S sont notamment retrouvées dans les légumineuses et les globulines 11S sont principalement abondantes dans les légumineuses et oléagineux. Les prolamines, riches en prolines et en groupements amines (d'où leur nom), ont une distribution plus restreinte : elles sont essentiellement présentes dans les graines de céréales (gliadines et glutélines du blé). Quelques autres familles minoritaires sont retrouvées dans les graines d'oléoprotéagineux et jouent un rôle de défense de la plante (PR, *pathogenesis related*), telles que les protéines de transport non spécifiques des lipides (nsLTP, ou PR-14), ou ont un rôle dans la structure des cellules telles que les oléosines.

ii. *Composition protéique de l'amande de tournesol*

Les amandes sont principalement constituées de globulines 11S (également nommées hélianthinines) et d'albumines 2S. Elles peuvent représenter respectivement 40 à 90 % et 10 à 30 % des protéines totales de l'amande [11]. Ces variations sont dues à différents facteurs, notamment les variations génétiques engendrant un polymorphisme protéique.

Quelques études ont permis de montrer que la présence et la quantité de protéines de GT varient d'une variété à l'autre. Anisimova *et al.* ont comparé plus d'une dizaine de variétés de tournesol [31, 32]. Leurs études ont montré, à partir d'amandes délipidées, des variations du contenu en albumines 2S sur gel d'électrophorèse (**Figure 4A**) et en chromatographie en phase inversée (RP-HPLC) (**Figure 4B**). Les auteurs ont montré que les variations dans l'intensité des bandes reflètent des variations dans les quantités relatives des albumines 2S dans ces lignées de tournesol (**Figure 4A**). Les études chromatographiques en phase inversée ont permis de collecter 13 fractions avec des concentrations protéiques variables d'une variété de tournesol à l'autre (**Figure 4B**). De même, Žilić *et al.* ont montré que les taux de globulines 11S varient en fonction de la variété de tournesol [12].

La structure et les propriétés physico-chimiques des globulines 11S et des albumines 2S de la GT ont été l'objet de nombreuses études, notamment pour leur propriétés émulsifiantes et gélifiantes [11, 33, 34]. La richesse des albumines 2S en acides aminés soufrés en fait un ingrédient intéressant pour améliorer la qualité nutritionnelle des tourteaux dédiés à l'alimentation animale.

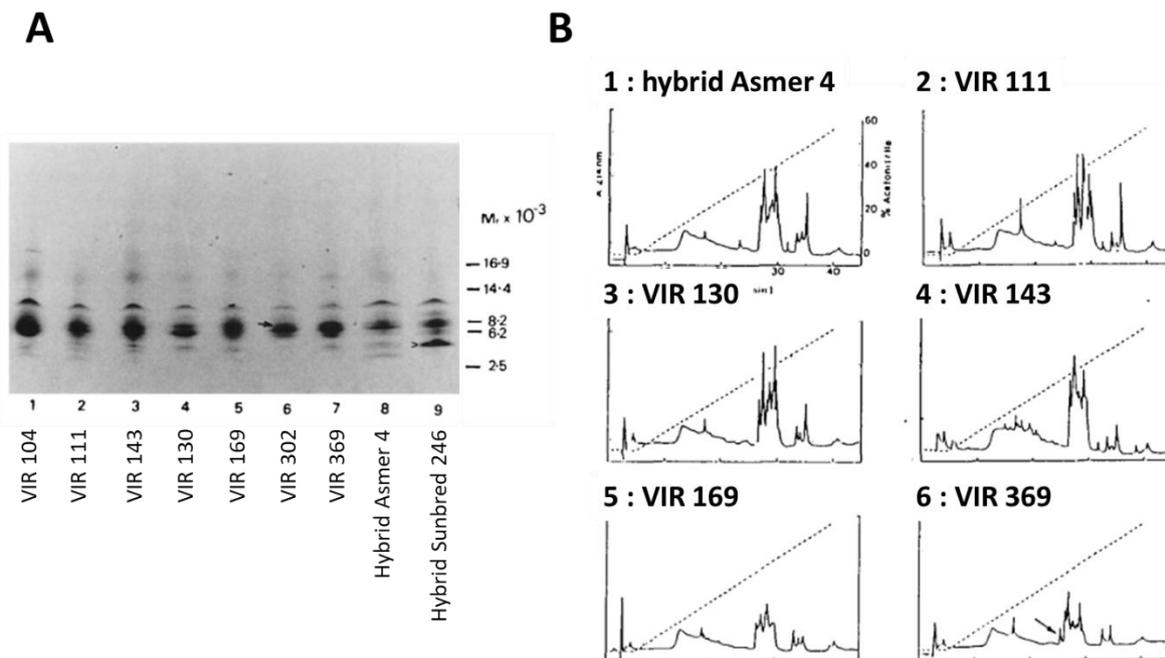


Figure 4. Comparaison de différentes variétés de GT

A gauche, le gel d'électrophorèse illustre la composition protéique de fractions enrichies en albumines 2S issues de neuf variétés de GT. Le gel a été réalisé dans en conditions non réductrices. Les flèches indiquent les albumines 2S étudiées par les auteurs, dont SFA-8 dans le puits 9 (A). A droite, les chromatographes montrent six profils de purification par RP-HPLC de fractions enrichies en albumines 2S de GT issues de six variétés de GT (B). Adaptée de [32].

iii. Les globulines 11S

La globuline 11S de la GT, ou hélianthinine, fait partie de la superfamille des cupines. Il s'agit d'un complexe protéique dont les monomères sont constitués de feuilletts β en couches antiparallèles. Leurs agencements forment une structure en tonneau. Le noyau est hydrophobe et les résidus polaires sont dirigés vers l'extérieur. La protéine mature est ainsi présente sous forme trimérique (≈ 150 kDa, association de 3 monomères de façon non covalente) ou hexamérique (≈ 300 - 350 kDa, association de 2 trimères sous forme globulaire (**Figure 5**)). Chaque monomère, d'environ 65 kDa, est constitué de 493 acides aminés avec une forte représentation en résidus glutamine et asparagine et une faible proportion en résidus cystéine et méthionine [35]. Le monomère est formé d'une sous-unité acide (2 chaînes α liées par un pont disulfure) et une sous-unité basique (2 chaînes β liées par un pont disulfure). Les sous-unités ont une masse moléculaire qui varie entre 32-44 kDa (α), et 21-27 kDa (β) du fait de la présence de nombreuses variations génétiques.

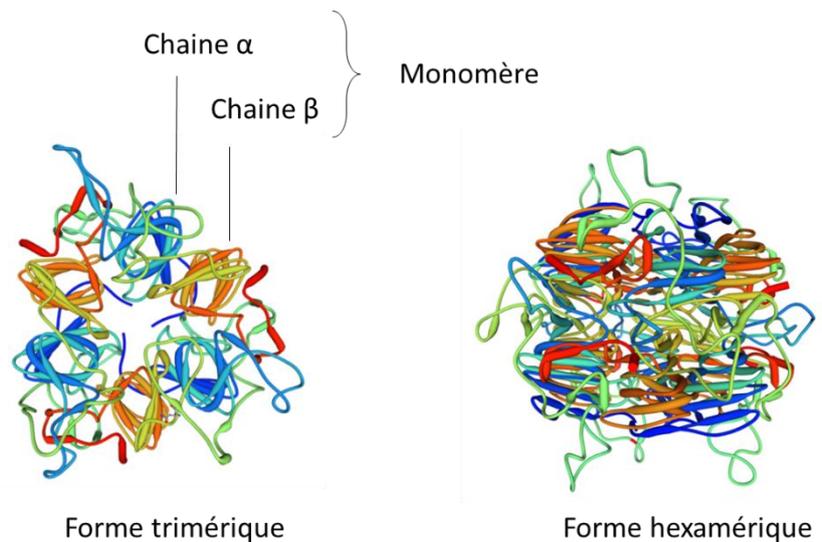


Figure 5. Structure 3D de l'hélianthinine.

A gauche est illustrée la structure 3D de l'hélianthinine révélant les feuillets- β organisés en tonneau, sous sa forme trimérique et à droite sous sa forme hexamérique. D'après ExPASy Swiss Model (UniProt ID : P19084).

Les sous-unités de l'hélianthinine peuvent s'associer pour s'agréger ou, à l'inverse, se dissocier [11, 36]. Ces phénomènes dépendent des paramètres « environnementaux », dont la concentration en protéines, la température, le pH et la force ionique du milieu. D'après la littérature, à partir de 80°C, sans variation de la force ionique et à pH 6-9, l'hélianthinine est principalement présente sous sa forme hexamérique (**Figure 6**). A pH basique (pH > 9), l'hexamère se dissocie progressivement pour se retrouver dans sa forme trimérique. A pH acide ($3 < \text{pH} < 7$), les trimères se dissocient progressivement pour se retrouver sous forme de protomère (3S). Dans certaines conditions, la forme hexamérique peut s'agréger, conduisant en la formation d'un nonamère ou décimère de très haute masse moléculaire (15S-18S).

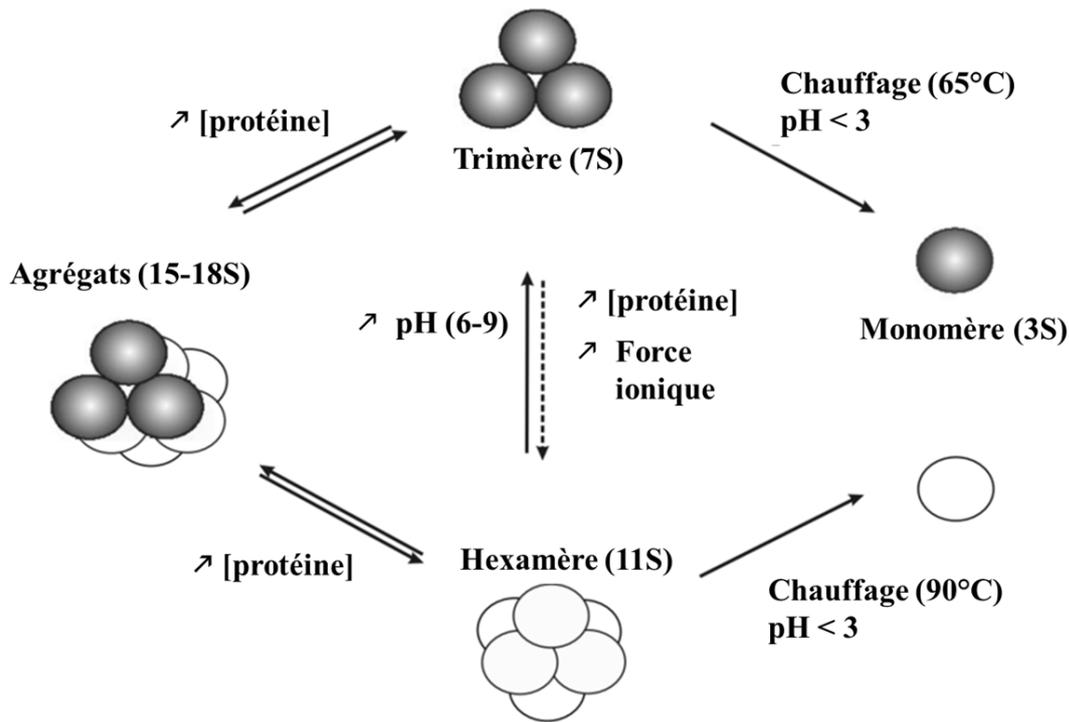


Figure 6. Schéma de la structure de l'hélianthinine en fonction de différents paramètres. Evolution de la structure de l'hélianthinine en fonction du pH, de la force ionique, de la concentration protéique ([protéine]) et de la température. ↗, augmentation. Adaptée de [11].

iv. Les albumines 2S

Il existe une multitude d'albumines 2S dans la GT. Les albumines 2S appartiennent à la superfamille des prolamines (voir **Figure 3**). Les protéines de cette superfamille ont en commun des groupes d'acides aminés homologues et partagent un motif conservé comportant 8 résidus cystéine : C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C (Xn correspond à un nombre variable d'acides aminés) [37]. Dans la plupart des graines, ces protéines sont synthétisées sous forme de simples précurseurs (pro-albumines) d'environ 18-21 kDa, qui subiront des modifications post-traductionnelles (clivage et formation de ponts disulfures) aboutissant à un large polypeptide (12-14 kDa), ou d'une grande et petites sous-unités maintenues par les ponts-disulfures (8-10 kDa et 3-4 kDa, respectivement) [38]. Les albumines 2S matures possèdent une structure compacte, avec un empilement de 5 hélices α dont les repliements sont stabilisés par 4 ponts disulfures fortement conservés (**Figure 7**). Une telle structure compacte leur confère une forte résistance à la dénaturation thermique, chimique et enzymatique.

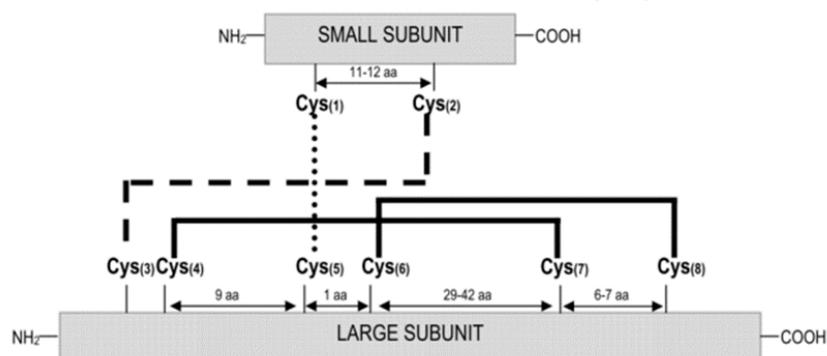


Figure 7. Schéma de la structure d'une albumine 2S.

Les pont-disulfures formés entre les huit résidus cystéines (Cys) fortement conservés dans les albumines 2S sont représentés. Tirée de [38].

Vers le début des années 1990, Kortt *et al.* séparent les albumines 2S de la GT en 8 fractions (**Figure 8**), nommées *sunflower seed albumins* (SFA-1 à 8) [39, 40]. La fraction SFA-8 s'est avérée être la fraction d'albumines 2S la plus abondante et la plus facile à isoler. Kortt *et al.* ont également montré que SFA-7 et SFA-8 possèdent des propriétés très proches, telles que leur mobilité sur gel d'électrophorèse et qu'elles sont composées d'autant d'acides aminés, avec 16 résidus méthionines.

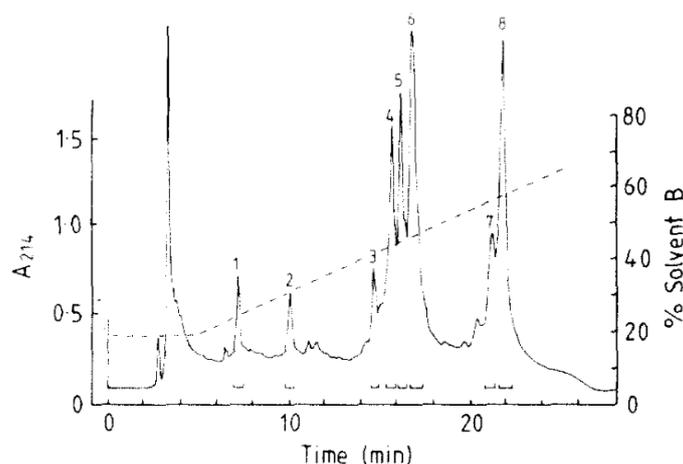


Figure 8. Séparation des albumines 2S de la GT par RP-HPLC.

Le chromatogramme est issu des travaux de Kortt *et al.* (1990) [40]. Huit fractions ont été collectées comme indiqué par les numéros.

Du fait de sa facilité à être isolée, de sa richesse en méthionine [40] et de ses propriétés moussantes [41], SFA-8 a été l'albumine 2S la plus étudiée de la GT (**Figure 9**).

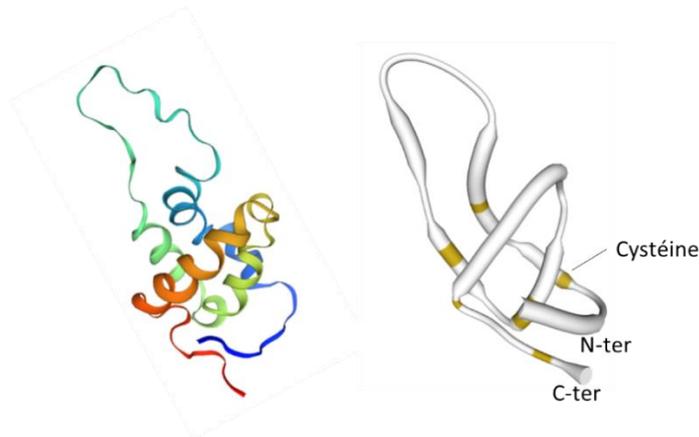


Figure 9. Structure 3D de SFA-8.

Sont illustrées les structures 3D de SFA-8 révélant le repliement des hélices α (à gauche) et les résidus cystéine (à droite, en jaune). D'après les données ExPasy Swiss Model (UniProt ID : P23110).

SFA-8 provient d'une protéine précurseur à un seul domaine, comme illustré **Figure 10**. Après modifications post-traductionnelles, un unique monomère est obtenu, constitué de 103 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire théorique de 12,147 kDa.

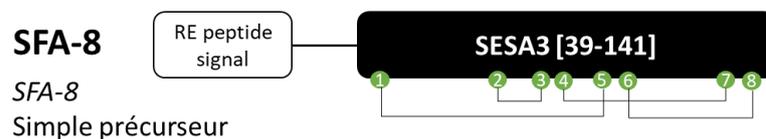


Figure 10. Schéma de la préalbumine SESA3 (ou SFA-8) : un simple précurseur.

Les ponts disulfures entre les résidus cystéines conservés sont représentés en vert. SESA3 code pour une seule albumine 2S. RE, réticulum endoplasmique. Adaptée de [42].

Plus récemment, Jayasena *et al.* et Franke *et al.* ont caractérisé plus finement plusieurs albumine 2S, dont les masses moléculaires varient entre 12 kDa et 18 kDa [43]. Les albumines 2S ont été nommées SESA (de l'anglais *Sunflower Seed Albumin*), suivie d'un chiffre. Une multitude de SESA a été retrouvée (**Figure 11**), mais uniquement 11 albumines 2S matures ont été identifiées, provenant principalement de quatre gènes (*HaG5*, *BA*, *SFA-8*, et *pHAO*) [42, 43]. Comme Kortt *et al.*, les travaux de Jayasena *et al.* et Franke *et al.* ont montré que les SESA3 (correspondant à SFA-8) et ses variantes (SESA3a, SESA3b, SESA3c) sont les albumines 2S les plus représentées de la GT (**Figure 11**).

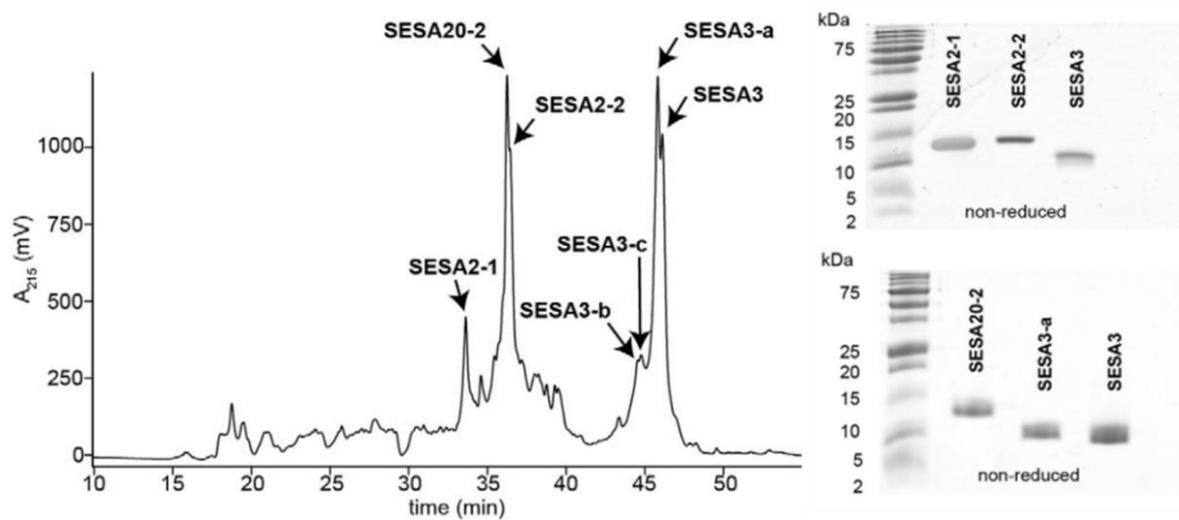


Figure 11. Séparation et caractérisation des albumines 2S majoritaires de la GT.

Le chromatogramme et les gels sont issus des travaux de Franke et al. (2016)[42]. Après purification par exclusion de taille, les auteurs ont séparé les albumines 2S de la GT par RP-HPLC. Après une étape supplémentaire de réduction et d'alkylation les protéines ont été caractérisées sur gel d'électrophorèse en conditions non réductrices et par LC-MS.

Jayasena *et al.* soulignent que les SESA autres que SFA-8 sont pour la plupart synthétisées sous la forme d'une protéine précurseur (nommée préalbumine), qui sera par la suite clivée en deux protéines matures, comme illustré dans la **Figure 12** pour le précurseur SESA2. Ce processus n'est pas commun aux autres plantes [43].

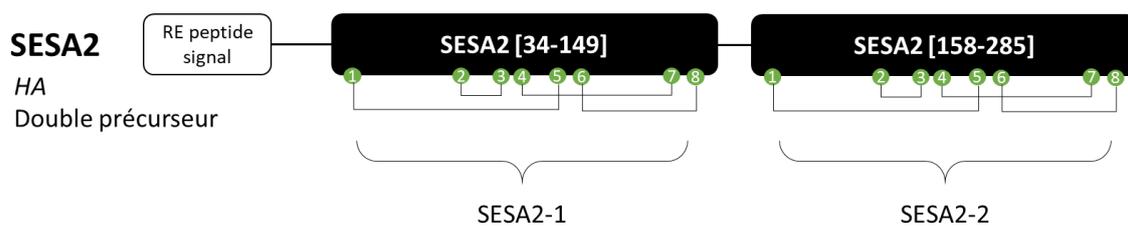


Figure 12. Schéma de la préalbumine SESA2 : un double précurseur.

Les ponts disulfures entre les résidus cystéines conservés sont représentés en vert. SESA2 est un double précurseur, en découle deux albumines 2S mature, les monomères SESA2-1 et SESA2-2. RE, réticulum endoplasmique. Adaptée de [42].

Lorsqu'une SESA (SESA_n) est produite sous forme de double précurseur, les protéines matures obtenues après clivage sont nommées SESA_n-1 et SESA_n-2. Des 11 albumines 2S identifiées, seule SFA-8 est synthétisées sous forme de simple précurseur.

De plus, comme on peut le voir sur les **Figure 11**, les SESA présentent des profils chromatographiques en RP-HPLC très proches. Elles forment un massif d'albumines 2S, tandis que SFA-8 et ses isoformes sont éluées plus tardivement. D'après Jayasena *et al.* les protéines majoritaires de la GT sont SFA-8, SESA2-1, SESA2-2, et SESA20-2 ainsi que leurs isoformes [43].

Les points isoélectriques (pI) des SESAn-1 et SESAn-2 varient entre 8,5 et 9,5 tandis que le pI de SFA-8 est de 5,91. De plus, les travaux de Berecz *et al.* sur la stabilité structurale des albumines 2S ont permis de montrer que SFA-8 est plus sensible à la digestion gastrique *in vitro* que les autres SESA [44]. Elle possède aussi des propriétés d'émulsion beaucoup plus intéressantes que les autres albumines 2S [41, 44].

Les SESA présentent des homologies de séquence variables (40 à 80 % entre les SESAn-1 et 40-92% entre mes SESAn-2). Les pourcentages d'homologies de séquence entre les SESAn-1 et les SESAn-2 n'excèdent pas 40 % (**Tableau 1**). Ils sont également relativement faibles entre SFA-8 et toutes les autres albumines 2S (moins de 30 %).

	SESA1-1																		
SESA1-2	30	SESA1-2																	
SESA2-1	80	21	SESA2-1																
SESA2-2	33	74	30	SESA2-2															
SFA-8	23	16	26	20	SFA-8														
SESA4-1	62	27	61	27	18	SESA4-1													
SESA4-2	26	42	31	42	20	28	SESA4-2												
SESA6-1	48	29	42	35	22	40	30	SESA6-1											
SESA6-2	32	41	28	30	19	34	38	37	SESA6-2										
SESA10	55	22	47	25	28	42	21	38	28	SESA10									
SESA20-2	33	78	31	92	18	29	41	35	31	26	SESA20-2								
SESA21-2	19	71	27	55	13	35	44	31	40	23	56								

Tableau 1. Homologies de séquence exprimées en pourcentage entre les albumines 2S de la GT.

v. *Les nsLTP*

Les nsLTP (ou PR-14) font partie de la superfamille des prolamines. Bien que ce soient des protéines découvertes depuis plus de 35 ans, les fonctions et rôles des nsLTP restent encore mal connus [45]. Les nsLTP permettent le transfert non spécifique de certains phospholipides du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. Ces protéines, fortement conservées au cours de l'évolution, sont aussi connues pour jouer un rôle de défense de la plante. Comme

les albumines 2S, les nsLTP présentent un motif comportant 8 résidus cystéine (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C), qui leur confèrent une très grande stabilité [46].

La nsLTP de la GT la plus décrite dans la littérature est Hel a 3, également appelée Ha-AP10 (*Helianthus annuus antifungal protein 10 kDa*). Hel a 3 est une petite protéine de 9,27 kDa (**Figure 13**) et elle jouerait un rôle de défense contre certains champignons [47-49]. Aucune étude n'a été réalisée sur sa stabilité structurale ou ses propriétés d'activité de surface, comme cela avait été fait pour une autre nsLTP de la GT, SDI-9 [41, 44]. SDI-9 est très résistante à la digestion gastrique et duodénale *in vitro*, mais s'est révélée moins que certaines nsLTP homologues dans d'autres espèces végétales telles que la nsLTP de pomme [41].

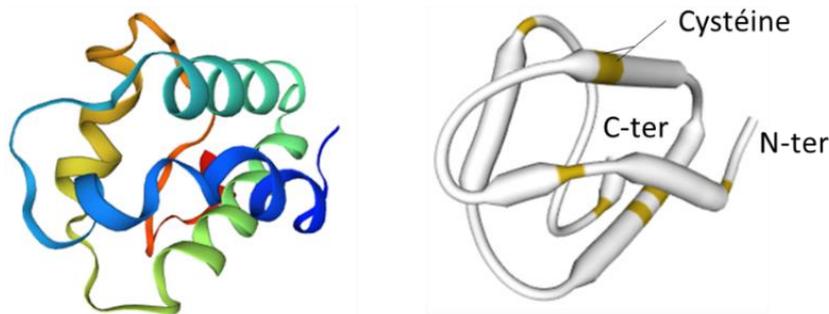


Figure 13. Structure 3D de Hel a 3

Sont illustrées les structures 3D de Hel a 3 révélant le repliement des hélices α (à gauche) et les résidus cystéine (à droite, en jaune). D'après les données d'ExPasy Swiss Model (UniProt ID : P82007).

vi. Production d'isolats protéiques à partir de tourteau déshuilé

Les protéines de GT sont extraites des tourteaux déshuilés selon différents protocoles. Nous nous intéresserons tout particulièrement à l'extraction des protéines par variation du pH. D'après la littérature, l'extraction des protéines des tourteaux déshuilés peut se faire à pH acide, basique et selon des conditions dites « aux pI » [14, 50-52].

L'extraction des protéines se fait en deux étapes. Pour les différentes conditions, la première étape consiste en une extraction solide/liquide durant laquelle le tourteau déshuilé est dispersé en milieu aqueux à un pH défini. La seconde étape permet d'isoler une fraction enrichie en protéines (jusqu'à 90 % de protéines) par centrifugation de la suspension [51].

En amont des trois méthodes d'extraction des protéines du tourteau de GT, celui-ci est d'abord repris en eau puis le mélange est filtré. Pour l'extraction en milieu basique, le pH est

ajusté par ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH) [52]. L'extraction en milieu basique permet d'obtenir un mélange de familles de protéines (principalement des albumines et globulines). L'extraction acide, réalisée en ajustant le pH à 4,5 à l'aide de l'acide chlorhydrique (HCl), permet d'obtenir un précipité enrichi en protéines hydrosolubles (albumines 2S) [52]. L'extraction « aux pI » se fait en deux étapes : à pH basique (pH 9), puis à pH acide (pH 4,5) [52]. Le précipité est enrichi en globulines, tandis que le surnageant est enrichi en albumines 2S. Ces extraits sont récupérés, puis séchés. D'après Lovatto *et al.* les extractions au pI permettent de récupérer de plus grandes fractions protéiques [52].

Dans une étude plus récente, Albe-Slabi *et al.* ont montré que l'extraction des protéines de GT à pH 7,4 et à une concentration de NaCl à 0,3 M permet une meilleure extraction des protéines totales, hydrosolubles (albumines 2S) et qu'elle limite les interactions phénol-protéines (*e.g.* interaction acide chlorogénique/protéines). Pour cela, le pH du mélange de la première étape d'extraction est ajusté à pH 7,4, puis est augmenté à pH 9 par ajout de NaOH [51]. Les auteurs ont pu obtenir un isolat avec une bonne solubilité (à des pH compris entre 5 et 8) et une couleur satisfaisante pour l'incorporer dans l'alimentation humaine.

4. Valorisation des protéines de GT dans l'alimentation humaine

Une augmentation de la consommation de protéines d'origine végétale en remplacement partiel des protéines animales, ou total comme pour les régimes végétaliens, est observée depuis une dizaine d'années. Parallèlement, la production d'huile végétale (et notamment d'huile de tournesol) a augmenté ces dernières années, entraînant davantage de sous-produits, tels que les tourteaux déshuilés riches en protéines. Face aux transitions alimentaires, une attention est portée sur la revalorisation des protéines présentes dans les tourteaux végétaux pour l'alimentation humaine. Les protéines de GT pourraient ainsi être intégrées dans l'alimentation humaine.

Notons que les protéines animales ne peuvent être entièrement remplacées par des protéines d'origine végétale. Les aliments d'origine animale constituent des sources de protéines et de nutriments essentiels pour la nutrition humaine. Les protéines animales exogènes permettent notamment l'apport d'acides aminés, dits « essentiels » (arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine) qui ne peuvent être synthétisés par l'homme. Les protéines exogènes seront dégradées en résidus constitutifs (acides aminés), qui pourront intégrer des voies métaboliques diverses, dont certaines

permettront leur réassemblage en protéines tout aussi complexes et avec des fonctions bien spécifiques. Dans la GT, l'acide aminé limitant est la lysine. Toutefois, d'après les travaux de Tessier *et al.*, les GT présentent une distribution équilibrée en acides aminés [53].

Les GT sont déjà consommées dans de nombreux pays : elles ne sont donc pas considérées comme nouvel aliment. Toutefois, elles peuvent être considérées comme « nouvel ingrédient » puisqu'elles seraient utilisées sous la forme d'isolats obtenus après différents procédés technologiques (fractionnement et isolement) et à des concentrations protéiques qui devraient dépasser celles correspondant à la simple consommation récréative de « pipas ». D'après les recommandations de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), avant d'incorporer de nouveaux ingrédients dans l'alimentation humaine, il est nécessaire de caractériser et d'identifier ces nouveaux aliments, dont leur allergénicité [54].

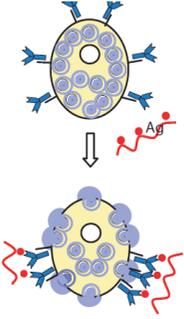
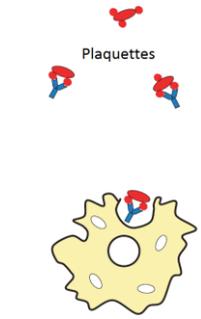
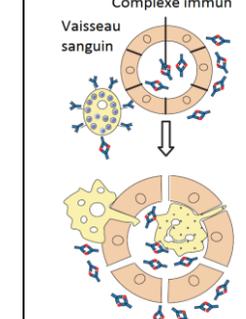
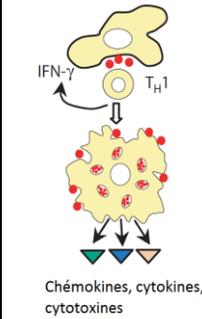
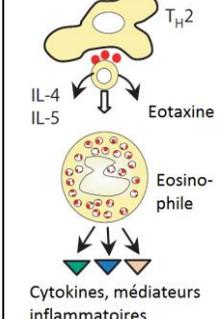
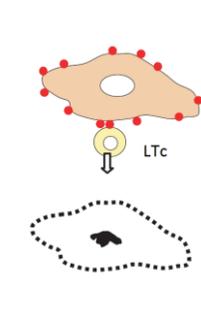
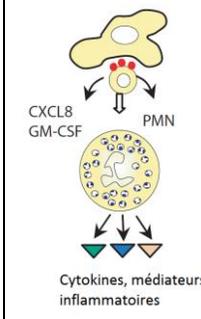
B. L'allergie alimentaire

I. Définitions

Au début du 20^{ème} siècle, les français Paul Portier et Charles Richet décrivirent pour la première fois une réaction d'hypersensibilité. En observant les réactions induites par des piqûres de méduses portugaises (*Physalia physalis*) sur des baigneurs, ils parvinrent à démontrer que l'agent « toxique » était une protéine. Par la suite, ils isolèrent la toxine et l'injectèrent à de faibles doses successives chez des chiens, afin d'en déterminer la dose préventive selon le principe de vaccination développé par Louis Pasteur. De façon inattendue, suite à une piqûre de rappel réalisée quelques semaines plus tard à la même dose que les doses préventives, les chiens réagirent immédiatement au venin par des symptômes tels que vomissements, diarrhées, voire asphyxie et décès. Ils nommèrent la réaction « anaphylaxie », du grec *ana* (en sens contraire) et *phulaxis* (protecteur). L'hypersensibilité fut définie comme une réponse immunitaire caractérisée par l'induction de symptômes cliniques après avoir été exposé à un stimulus normalement toléré. En 1906, Clemens von Pirquet montre que la réponse à un stimulus précis peut apporter une protection contre une maladie, comme pour la vaccination, ou au contraire engendrer des symptômes cliniques, comme pour l'hypersensibilité qu'il nommera « allergie », du grec *állos* (autre) et *érgon* (activité).

Différents types d'hypersensibilités ont été mis en lumière : des formes d'hypersensibilités immédiates, qui surviennent quelques minutes après le stimulus, et des formes retardées, qui surviennent plusieurs heures voire plusieurs jours après le stimulus. Les immunologistes Gell et Coombs proposent en 1963 une classification permettant de discriminer quatre types différents d'hypersensibilité (**Tableau 2**).

Tableau 2. Classification des hypersensibilités.

	Type I	Type II	Type III	Type IVa	Type IVb	Type IVc	Type IVd
Réactif immunitaire	IgE	IgG	IgG	IFN- γ , TNF- α (T _H 1)	IL-5, IL-4/IL-13 (T _H 2)	Perforine, granzyme B (LTc)	CXCL8, GM-CSF (LT)
Antigène	Antigène soluble	Antigène associé à la matrice extracellulaire ou membrane cellulaire	Antigène soluble	Antigène présenté aux cellules ou stimulation directe des LT	Antigène présenté aux cellules ou stimulation directe des LT	Antigène associé à la membrane cellulaire ou stimulation directe des LT	Antigène soluble présenté aux cellules ou stimulation directe des LT
Effecteurs	Activation des mastocytes	FcR/cellules cibles (phagocyte, NK)	FcR/cellules cibles Complément	Activation des macrophages	Eosinophiles	LT	Neutrophiles
							
Exemples de réaction d'hypersensibilité	Rhinite allergique, asthme, réaction anaphylactique	Maladie hémolytique du nouveau-né, thrombocytopénie (e.g. pénicilline)	Maladie sérique, réaction d'Arthus, maladie à complexes immuns	Hypersensibilité de type tuberculinique	Asthme chronique, exanthème maculopapuleux avec éosinophilie	Dermatite de contact, exanthème maculopapuleux et bulleuse, hépatites	Exanthème pustuleux aigu généralisé (AGEP)

T_H1, cellule T auxiliaire de type 1 ; *T_H2*, cellule T auxiliaire de type 2 ; *LTc*, cellule T cytotoxique ; *LT*, lymphocyte T ; *FcR*, récepteur Fc ; *NK*, cellules « natural killer » ; *Ag*, antigène ; *PMN*, cellules polymorphonucléaires. Adapté de [55].

Dans ce cadre, l'allergie alimentaire, est donc une réponse inappropriée du système immunitaire contre un antigène alimentaire normalement inoffensif. Elle résulte de l'absence ou de la rupture de la tolérance orale qui est normalement induite contre les protéines alimentaires dans des conditions physiologiques. L'hypersensibilité de type I, induite par les IgE, est la réaction la plus souvent impliquée dans le cas des allergies alimentaires. Toutefois, la classification des hypersensibilités allergiques aux aliments a été revue plus récemment afin de prendre en compte la caractérisation de nouvelles formes d'hypersensibilités non-IgE médiées telles que le syndrome d'entérocolite induite par les protéines alimentaires, ou mixte telles que l'œsophagite à éosinophiles (**Figure 14**) [56].

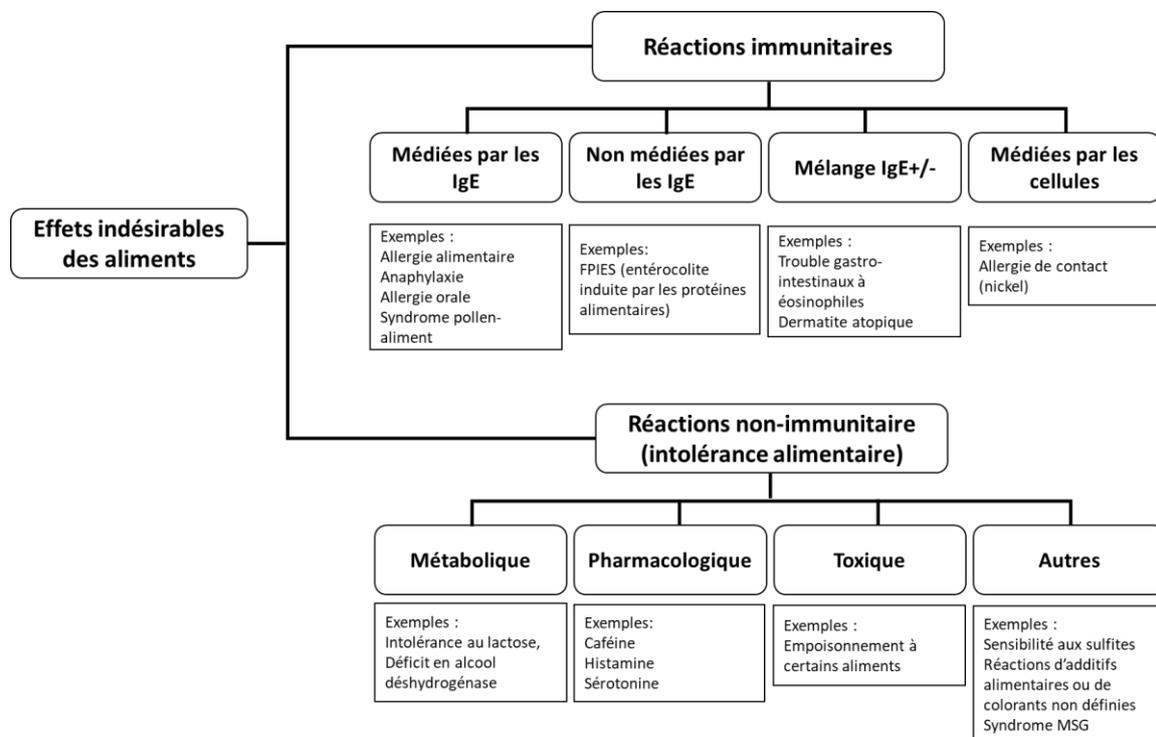


Figure 14. Classification des effets indésirables aux aliments.

Les effets indésirables peuvent être immunologiques ou non, avec des sous-types comme illustrés pour chacune de ces catégories. Adaptée de [56].

Dans le cadre de mon sujet de thèse, nous nous intéresserons uniquement à l'hypersensibilité médiée par les IgE.

II. Epidémiologie

1. Prévalence

L'OMS place les maladies allergiques (en incluant les allergies respiratoires et alimentaires) à la quatrième place des maladies chroniques, après le cancer, les maladies cardiovasculaires et le sida.

La prévalence réelle de l'allergie alimentaire est difficile à déterminer et doit prendre en compte différents paramètres tels que les populations étudiées, la méthodologie des enquêtes, la géographie, l'âge ou le régime alimentaire. Cependant, il est certain que durant ces deux dernières décennies, la prévalence à l'allergie alimentaire n'a cessé d'augmenter, notamment dans les pays industrialisés, comme illustré dans la **Figure 15**. La prévalence de l'allergie alimentaire peut ainsi atteindre jusqu'à 10% de la population infantile bien que de grandes disparités soient observées au niveau mondial [57]. Globalement, il est considéré que l'allergie alimentaire touche environ 5 % des adultes et 8 % des enfants [58].

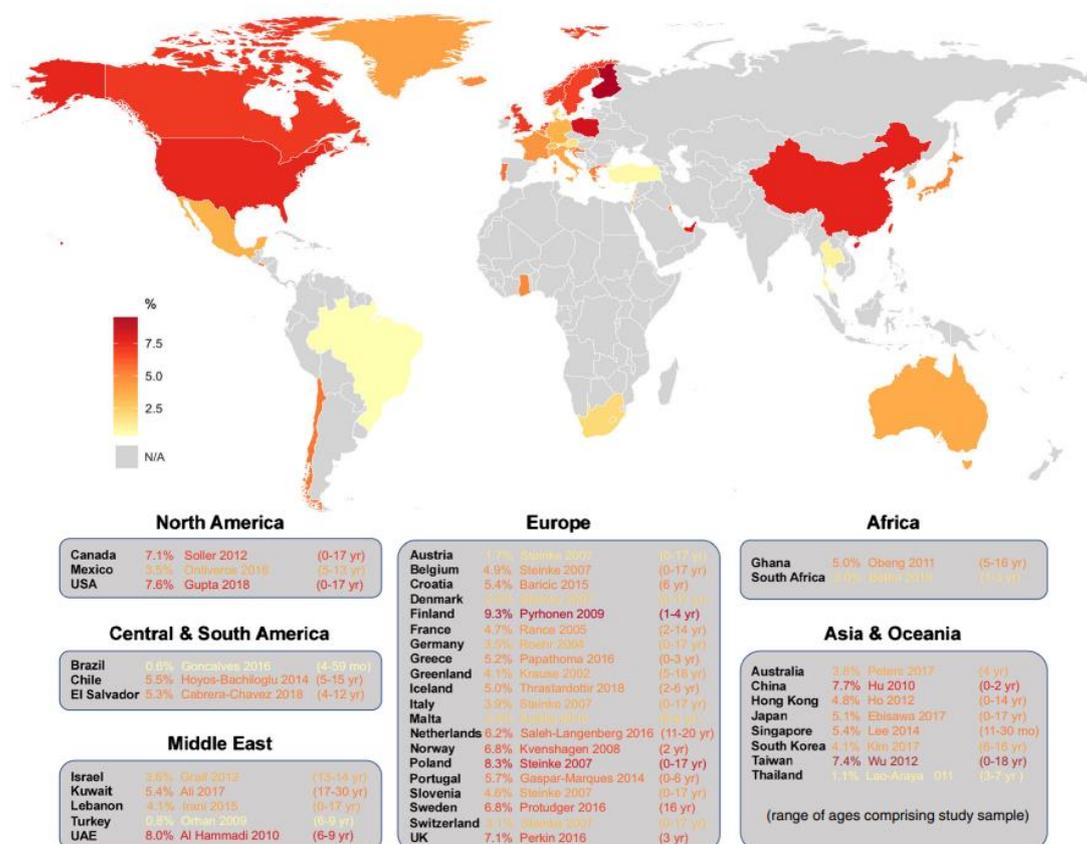


Figure 15. Prévalence de l'allergie alimentaire chez les moins de 18 ans dans le monde à partir de 2018.

Tirée de [59].

Prescott *et al.* rapportent que la prévalence de l'allergie alimentaire chez des enfants de moins de 5 ans peut atteindre 10 %, comme cela a été observé en Australie (**Figure 16**). En France, la prévalence est estimée à environ 5 %. Dans cette étude menée avec l'OMS, 51 pays sur les 89 participant ne possèdent aucune donnée sur la prévalence de l'allergie alimentaire chez l'enfant, et uniquement 9 pays possèdent des données de prévalence confirmées par des tests de provocation orale (TPO) [60]. En effet, la prévalence à l'allergie alimentaire est surestimée lorsque les déclarations d'allergie proviennent directement du patient ou de ses parents [60, 61]. Lyons *et al.* montrent ainsi que la prévalence de l'allergie alimentaire est 2 à 2,5 fois supérieure quand elle est autoévaluée par les patients que lorsque le diagnostic est réalisé par un médecin [61].

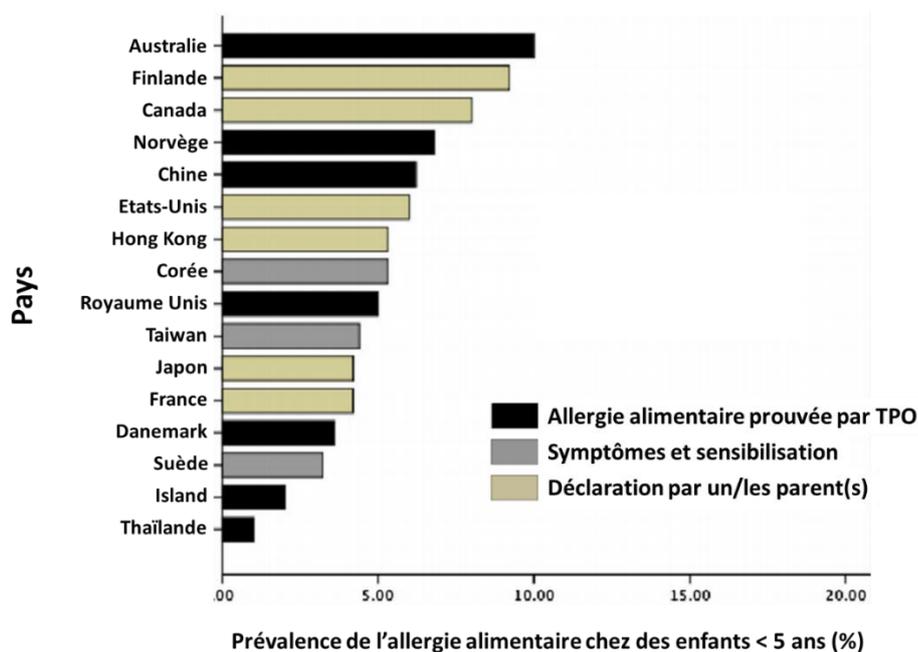


Figure 16. Prévalence de l'allergie alimentaire chez des enfants de moins de 5 ans.

L'histogramme est issu des travaux de Prescott et al. (2013) menés avec l'OMS [60]. La prévalence de l'allergie alimentaire dans le monde (89 pays participants) chez les enfants. Chez les enfants de moins de 5 ans, la prévalence des allergies alimentaires fondée sur les tests de provocation orale (TPO) varient entre 1 % (Thaïlande) et 10 % (Australie). La prévalence des allergies alimentaires fondée sur l'historique clinique et les tests IgE varient entre 3 – 5 % (Suède et Asie). Et la majorité des données sont basées sur des données de déclaration des parents, suggérant des taux de prévalence de l'allergie alimentaire de 7-8 % (Etats-Unis, Canada) et des valeurs similaires dans certains pays européens (e.g. France).

2. Les facteurs de risques

Différents facteurs peuvent influencer la sensibilisation et/ou le développement d'une allergie alimentaire : (1) des facteurs non modifiables : les prédispositions génétiques, le sexe et l'âge et (2) des facteurs modifiables (environnementaux) [57].

a) Les prédispositions génétiques

Le facteur génétique est le premier facteur qui va favoriser ou non le développement d'une allergie. Ainsi, le facteur de risque augmente lorsque l'enfant a des parents qui sont eux-mêmes allergiques [62]. Dans le cas de l'allergie à l'œuf et à l'arachide, le risque d'être allergique augmente de 40 % si l'enfant a un parent allergique et de 80 % si au moins deux membres (parents, fratrie) de sa famille sont allergiques [63].

D'après les données du Cercle d'Investigateur Cliniques et Biologiques en Allergie Alimentaire (CICBAA) en France, la prévalence de l'allergie alimentaire est également influencée par l'âge et le sexe (**Figure 17**). Sur 1127 patients ayant subi des TPO pour confirmation de leur allergie, la grande majorité des patients allergiques se situe chez les enfants âgés de 1 à 15 ans, avec une prévalence plus faible pour les filles. Après l'âge moyen de la puberté, la tendance s'inverse et les allergies alimentaires diminuent avec une prévalence plus forte chez les femmes. Cette tendance peut s'expliquer par l'influence des facteurs génétiques et hormonaux [64, 65].

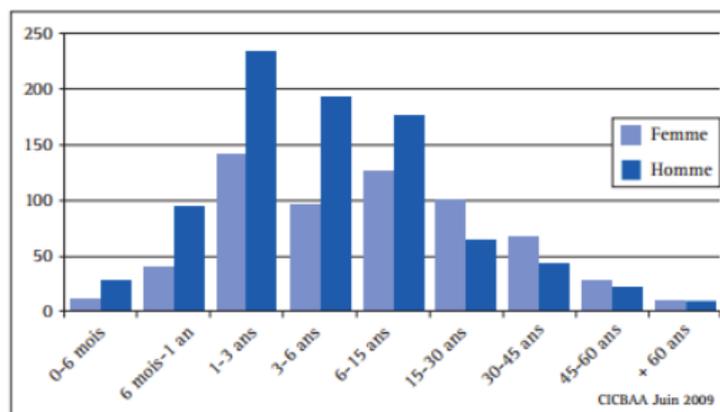


Figure 17. Prévalence de l'allergie alimentaire en fonction de l'âge et du sexe.

L'allergie alimentaire touche les enfants âgés de 1 à 15 ans avec une plus forte prévalence pour les hommes. Après l'âge moyen de la puberté, les allergies alimentaires diminuent avec une prévalence plus forte chez les femmes (n = 1127). Tirée du CICBAA 2009.

Un concept expliquant l'évolution, au cours de la vie d'un individu, des premières manifestations atopiques vers le développement de l'allergie alimentaire, de l'asthme et de la rhinite allergique a été proposé : la marche atopique. Ce concept suggère que la dermatite atopique précède le développement de l'allergie alimentaire, qui précède ensuite celui de l'asthme et de la rhinite allergique, comme illustré dans la **Figure 18** [66]. La dermatite atopique est une maladie inflammatoire de la peau qui touchent environ 20 % des enfants [60]. La dermatite atopique peut être associée à des facteurs génétiques tels qu'une mutation du gène codant pour la filagrine ou à des facteurs environnementaux comme un excès d'hygiène. La barrière cutanée fragilisée et l'inflammation locale qui en résulte peuvent favoriser la sensibilisation à certains allergènes alimentaires présents dans les poussières de maison, puis le développement de vraies allergies alimentaires. Une étude menée par du Toit *et al.*, confirme la relation entre la dermatite atopique et le développement de maladies allergiques [67]. Sur 321 enfants (0-6 ans) présentant une dermatite atopique, 76 % possèdent au moins une allergie et développent au cours du temps une allergie alimentaire (40 %), de l'asthme (18 %) et une rhinite allergique (54 %). Environ 4 % des enfants de plus de 5 ans souffrent de plusieurs maladies allergiques (dermatite atopique, allergie alimentaire, asthme et rhinite allergique) [67]. Cependant (et bien heureusement !), les enfants souffrant de dermatite atopique ne suivent pas tous la marche atopique [66].

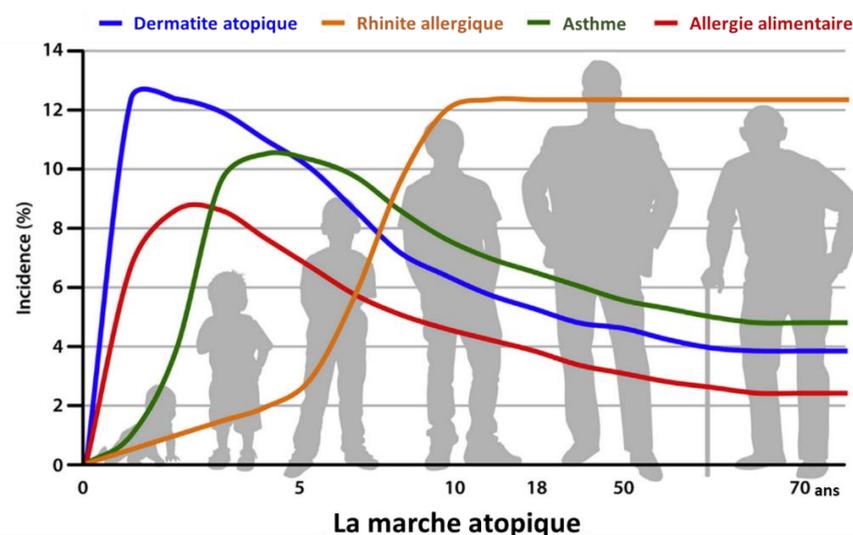


Figure 18. Concept de la marche atopique.

L'incidence de la dermatite atopique, l'allergie alimentaire, l'asthme et la rhinite allergique au cours du temps pour un individu (0 à 70 ans) est exprimé en pourcentage (%). Adaptée de [66].

b) Les facteurs environnementaux

Les facteurs génétiques ne peuvent pas expliquer à eux-seuls la rapide augmentation de la prévalence des maladies allergiques observée depuis 20-30 ans. L'intervention de facteurs environnementaux qui découlent de l'évolution rapide de nos modes de vies durant ces dernières décennies est aussi responsable de cette explosion des allergies [64]. Plusieurs facteurs ont ainsi été mis en avant : les modifications épigénétiques induites *in utero* [68], le mode d'accouchement [69], l'allaitement maternel [70, 71], la diversification alimentaire [72, 73], les standards d'hygiène [74-76] ou les traitements médicamenteux [77, 78]. Ces derniers facteurs pourraient en particulier affecter la composition du microbiote intestinal qui joue un rôle très important dans la maturation du système immunitaire du nourrisson [79-81]. L'existence de potentielles dysbioses dans la composition du microbiote intestinal pourrait ainsi affecter la bonne maturation du système immunitaire qui serait alors plus enclin à développer des réponses immunitaires inappropriées telles que les allergies [82].

III. Les acteurs et mécanismes de l'allergie alimentaire

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux mécanismes de l'allergie de type I, liée à la production d'IgE spécifiques. Elle se développe en deux phases. La première est la « phase de sensibilisation ». Durant cette phase, il y a production d'IgE spécifiques de l'antigène, qui devient, un allergène. Une ingestion ultérieure de l'allergène peut ensuite induire une réaction allergique ce qui correspond à la « phase de déclenchement ».

Nous présenterons tout d'abord les acteurs principaux puis les mécanismes de l'allergie alimentaire.

1. Les acteurs de l'allergie alimentaire

a) Les immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines sécrétées par les plasmocytes (dérivant des lymphocytes B). Ce sont des effecteurs de l'immunité spécifique humorale, qu'on appelle également anticorps. Il existe cinq classes d'immunoglobulines : les IgG, IgM, IgA, IgE et IgD [83]. Les immunoglobulines sont constituées de deux chaînes légères (V_L et C_L , L pour *light*)

et deux chaînes lourdes (V_H et C_H , H pour *heavy*) [84]. Comme illustré **Figure 19**, on distingue la région de l'anticorps (paratope) liant l'antigène (épitope), contenue dans la région Fab de l'anticorps (de l'anglais *antibody fragment region*) et qui contient les domaines variables des chaînes légères (V_L) et lourdes (V_H), et la région Fc (de l'anglais *crystalizable fragment region*), qui est la partie C-terminale des chaînes lourdes reconnues par les récepteurs cellulaires [83].

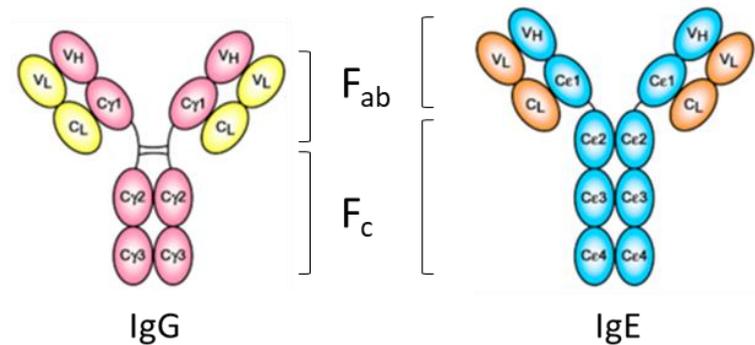


Figure 19. Schéma des immunoglobulines de classe G (IgG) et de classe E (IgE).

CL, chaîne légère et; C (ϵ ou γ) H, chaîne lourde des régions constantes; VL, domaine variable des chaînes légères ; VH, domaine variable des chaînes lourdes. Adaptée de [84].

Les IgE se distinguent des IgG par la présence de 4 domaines constants (de $C\epsilon_1$ à $C\epsilon_4$), soit un domaine constant supplémentaire par rapport aux IgG qui n'en comportent que 3 ($C\gamma_1$ à $C\gamma_3$) [84, 85]. Les IgE persistent dans l'organisme pendant 2 à 3 semaines lorsqu'elles sont présentes sur des récepteurs cellulaires (au niveau des mastocytes et des basophiles), mais leur demi-vie dans le plasma est d'environ 2,5 jours - contre en moyenne 23 jours pour les IgG [86]. La concentration des IgE est exprimée en unité internationale (UI) par mL de sérum, tel que 1 UI/mL correspond à 2,4 ng/mL d'IgE [83]. La concentration sérique des IgE chez l'humain varie en fonction de l'âge : elle est très faible en début de vie (< 4 kU/L) [83], puis augmente avec un pic vers 10-15 ans et décroît pour se stabiliser à l'âge adulte (< 120 kU/L) [86].

b) Les récepteurs des IgE

Il existe deux types de récepteurs aux IgE : $Fc\epsilon RI$ et $Fc\epsilon RII$ (ou CD23). L'affinité du récepteur $Fc\epsilon RI$ pour la partie Fc des IgE est très élevée, avec un K_D de l'ordre de 10^{-10} M [84]. Le récepteur $Fc\epsilon RI$ est un complexe protéique constitué de 4 chaînes transmembranaires, $\alpha\beta\gamma_2$

(**Figure 20**). Les extrémités C-terminales cytoplasmiques des chaînes γ se caractérisent par la présence de motifs d'activation ITAM (*immuno-tyrosine activation motif*). Ce motif ITAM est également retrouvé au niveau de la chaîne β et est nécessaire pour l'activation cellulaire [84, 87]. Le récepteur Fc ϵ RI est présent à la surface des mastocytes et des basophiles chez l'homme et la souris [88]. Une forme trimérique $\alpha\gamma_2$ peut aussi être observée chez l'homme à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), des éosinophiles et des plaquettes [88].

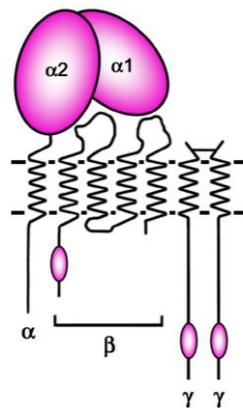


Figure 20. Représentation schématique du récepteur de haute affinité des IgE : Fc ϵ RI.

Le récepteur Fc ϵ RI est constitué de 4 chaînes transmembranaires $\alpha\beta\gamma_2$. La chaîne α présente deux domaines extracellulaire de type Ig, capable d'interagir directement avec les IgE. La co-expression de la chaîne β et γ (contenant trois motifs de signalisation ITAM) est essentielle pour l'expression du récepteur à la surface des cellules. Tirée de [84].

Le récepteur **Fc ϵ RII** est une protéine trimérique membranaire, avec un seul domaine transmembranaire (**Figure 21a**). Le récepteur possède une partie N-terminale cytoplasmique de petite taille. La partie C-terminale (extracellulaire) est constituée de trois domaines globulaires, suivis d'une triple hélice α en forme de tige enroulée sur elle-même (en anglais, *coiled-coil stalk*) [89]. Comme indiqué sur la **Figure 21b-c**, la liaison entre l'IgE et le CD23 se fait entre deux domaines globulaires de CD23 et la région Fc. Cette interaction asymétrique expliquerait la faible affinité du complexe IgE-CD23 ($K_D \approx 10^{-6}$ M) [84]. Ce récepteur est présent à la surface des lymphocytes T et B et des cellules épithéliales de l'intestin [89].

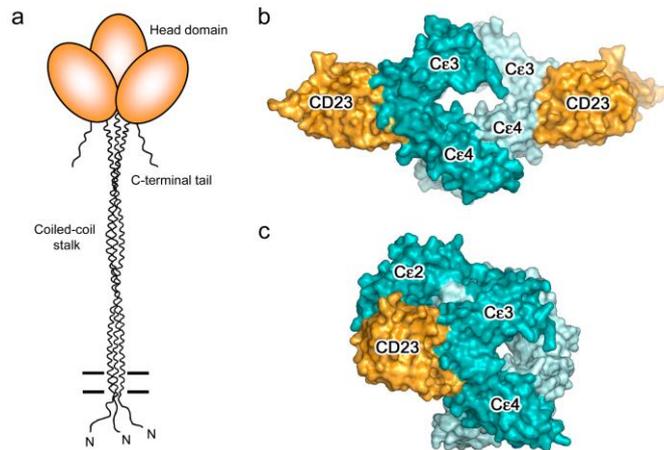


Figure 21. Représentation schématique du récepteur de faible affinité : FcεRII (ou CD23). *Le récepteur FcεRII est une protéine transmembranaire trimérique (a). Les représentations 3D du récepteur FcεRII (b et c) illustrent la liaison entre la partie C-terminale du récepteur (en jaune) et les domaines Cε2-Cε3-Cε4 de l'IgE (en vert foncé et clair pour les chaîne α et β). Tirée de [84].*

c) Les cellules présentatrices de l'antigène

Les cellules capables d'orienter la réponse immunitaire adaptative sont les CPA qui incluent les macrophages, les lymphocytes B et surtout les cellules dendritiques [90]. Les cellules dendritiques ont la capacité de capturer les éléments « étrangers » (antigènes) au niveau des muqueuses, de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants et de présenter ces antigènes sous forme de peptides aux lymphocytes T naïfs (**Figure 22**).

Les peptides exogènes sont présentés au lymphocytes T sous forme de complexes avec le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II, présent à la surface de la cellule dendritique et permettant leur présentation au lymphocyte T CD4+ [90]. Cette étape d'apprêtement et de présentation de l'antigène, constitue le premier signal nécessaire à l'induction d'une réponse spécifique du système immunitaire [91, 92].

d) Les lymphocytes T auxiliaires (ou T helper) et les lymphocytes B

Les lymphocytes T helper (T_H) sont caractérisés par la présence d'un récepteur d'antigène spécifique (TCR, de l'anglais *T cell receptor*) et de la glycoprotéine membranaire CD4. Les lymphocytes T naïfs interagissent directement avec les cellules dendritiques via la reconnaissance TCR-peptide exogène/CMH. Cette interaction spécifique, ainsi que des co-sigaux (reconnaissance CD28/CD80/86 et sécrétion de cytokines polarisantes par la DC

activée ; **Figure 22**) permettent l'induction d'une cascade de signalisation, dont l'expression de nombreux facteurs de transcription essentiels à la différenciation des cellules T naïves en différents sous-types, par exemple: T_H1 , T_H2 , T_H17 et T_{REG} [93].

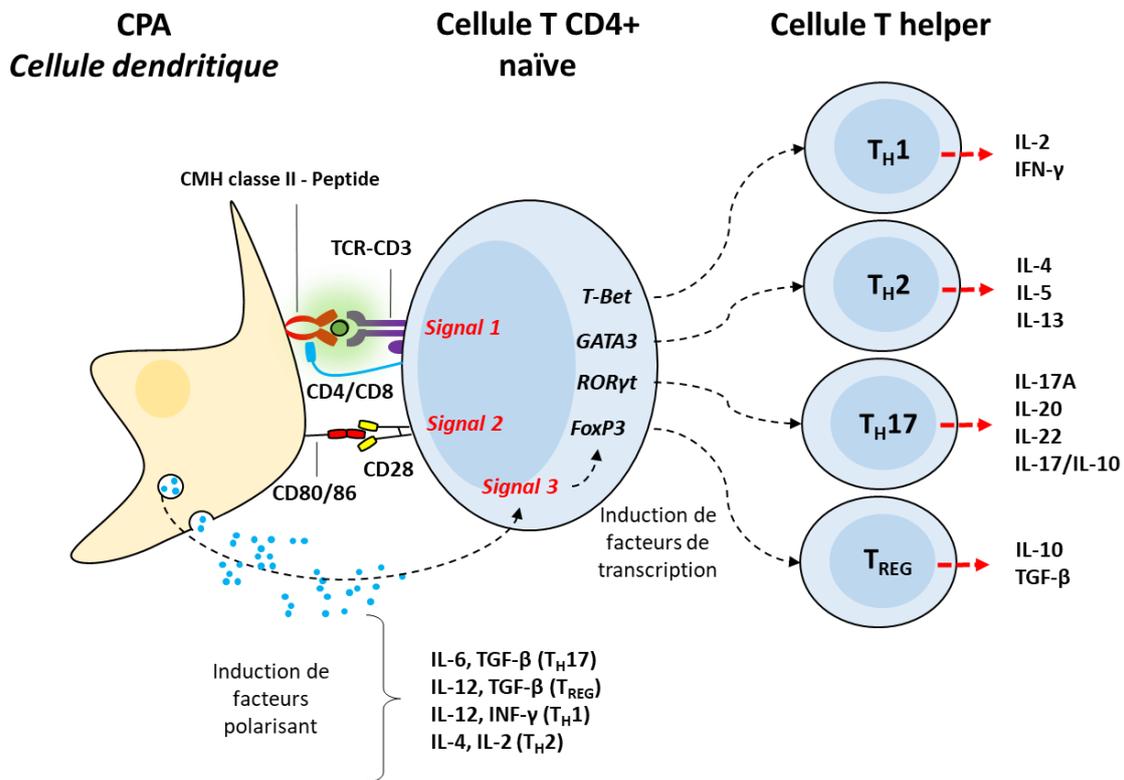


Figure 22. La présentation des peptides antigéniques par les cellules dendritiques aux cellules T CD4 naïves. Cette interaction oriente leur différenciation en différents profils spécifiques : T_H1 , T_H2 , T_H17 ou T_{REG} . D'après [92-95].

Chaque sous-type assure des fonctions spécifiques impliquées dans la tolérance immunitaire (T_{REG}) ou dans l'induction d'une immunité contre des agents pathogènes (T_H1 , T_H2 et T_H17 , **Figure 23**).

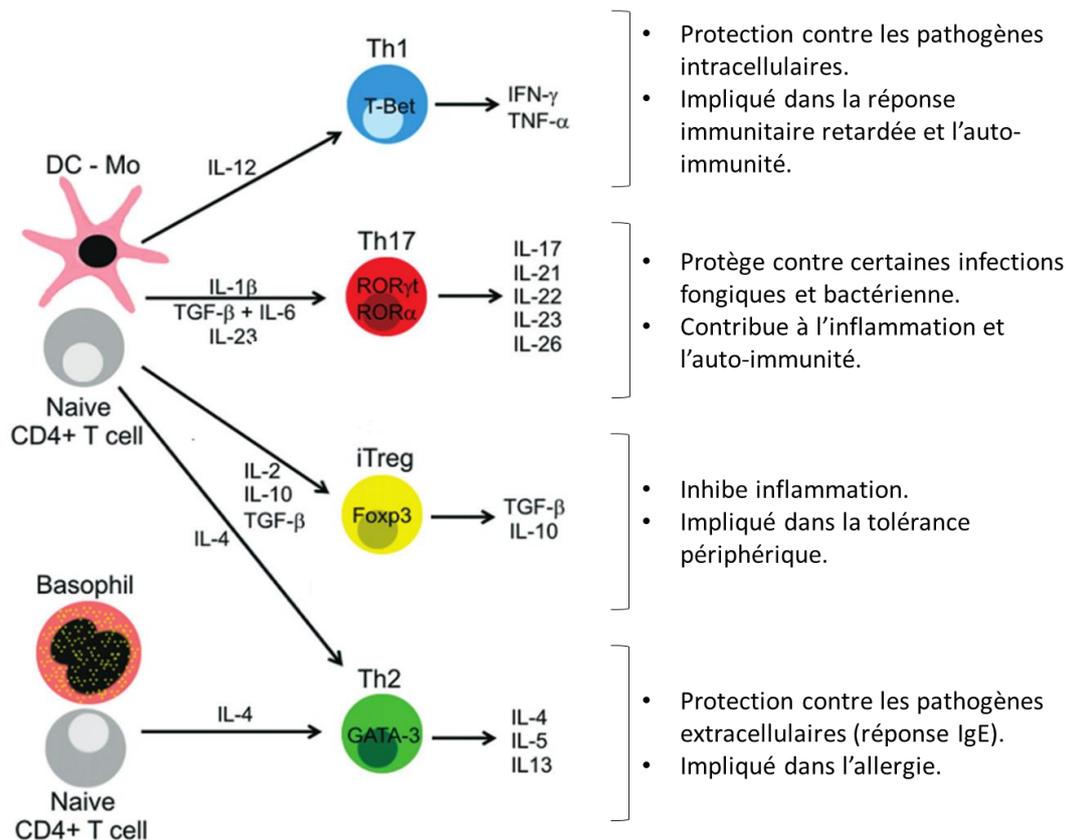


Figure 23. Différenciation et fonction des cellules T auxiliaires.

Les cytokines produites par les cellules dendritiques régulent la lignée des cellules T auxiliaires (T_H1 , T_H2 , T_H17 et T_{REG}), tandis que les basophiles régulent principalement la lignée des T_H2 . Chacune des cellules T auxiliaires présente un phénotype, un profil cytokinique et transcriptionnel unique et exerce différentes fonctions dans la réponse immunitaire. Adaptée de [92, 95, 96].

La polarisation des lymphocytes T naïfs en T_H1 se fait *via* l'activation du facteur de transcription *T-Bet* et la production d'IL-12 (**Figure 22**). Les T_H1 jouent un rôle dans la protection contre les pathogènes intracellulaires et sont impliqués dans la réponse immunitaire retardée et l'auto-immunité [97]. L'activation du facteur de transcription *GATA-3* induit la différenciation des cellules T naïves en T_H2 et s'accompagne de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 [97]. Les lymphocytes T_H2 jouent un rôle dans la protection contre les pathogènes extracellulaires (par exemple les helminthes) et sont également impliqués dans les maladies allergiques [92]. Les lymphocytes T_H17 sont impliqués dans des réponses de type inflammatoire et dans le développement de maladies auto-immunes. Ils sont caractérisés par l'activation du facteur de transcription *ROR- γ t* avec notamment la production de cytokines IL-17 [98]. D'autres cellules T impliquées dans l'inflammation ont été plus récemment décrites (T_H9 et T_H22) chacune caractérisée par l'activation du facteur de transcription (*PU-1* et *AhrR*,

respectivement) et par le type de cytokines qu'elles sécrètent (IL-9 et IL-22, respectivement) [93, 99].

A l'inverse des lymphocytes effecteurs, les cellules régulatrices (T_{REG}) ont pour fonction d'inhiber le développement des réponses inflammatoires et sont impliquées dans les mécanismes de tolérance immune [100]. Les lymphocytes T_{REG} expriment dans la plupart des cas le facteur de transcription *Foxp-3* (Forkhead box P3). Les cellules T_{REG} induites au niveau du thymus (T_{REG} naturel) permettent la tolérance face aux antigènes du soi, limitant ainsi la survenue de maladies auto-immunes. Les cellules T_{REG} périphériques sont induites dans les tissus périphériques, en particulier dans la muqueuse intestinale [100]. Leur rôle est d'inhiber la différenciation des lymphocytes T naïfs en T_H1 , T_H2 ou T_H17 et d'induire une tolérance orale contre, par exemple, les antigènes alimentaires. Les T_{REG} se caractérisent par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (Transforming Growth Factor- β) [101].

Les lymphocytes T auxiliaires vont par la suite quitter les ganglions lymphatiques et migrer afin d'activer les lymphocytes B, qui expriment un récepteur membranaire spécifique (BCR, B Cell Receptor) leur permettant d'interagir avec un antigène spécifique [102]. Les lymphocytes T auxiliaires produisent alors des cytokines qui vont provoquer la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques [102].

e) Les mastocytes et les basophiles

Les mastocytes se trouvent principalement dans la peau et les muqueuses pulmonaires et intestinales alors que les basophiles se trouvent dans la circulation sanguine. Ces deux types de cellules présentent à leur surface le récepteur Fc ϵ RI à haute affinité pour les IgE et sont ainsi impliqués dans l'initiation de la réaction allergique. L'interaction de plusieurs IgE avec un allergène induit un pontage et l'agrégation des récepteurs à la surface de la cellule, qui stimule une cascade de signalisation conduisant à l'activation de ces cellules et à leur dégranulation. Ces cellules possèdent des granules cytoplasmiques contenant des médiateurs préformés tels que l'histamine et des protéases (tryptase et chymase) [103]. Lors de la dégranulation, les mastocytes libèrent ces médiateurs et en génèrent de nouveaux tels que la prostaglandine D₂, des leucotriènes et le facteur d'activation des plaquettes ainsi que des cytokines (TNF- α , IL-5 et IL-13) et des chimiokines [103].

2. Le passage des antigènes à travers la barrière intestinale

L'intestin grêle, long d'environ six mètres, est constitué du duodénum, du jéjunum et de l'iléon. Il s'agit du plus grand organe en contact avec l'environnement. L'épithélium intestinal est constitué de 4 principaux types de cellules : les entérocytes, dont le rôle principal est l'absorption des nutriments, les cellules L (cellules endocrines), les cellules productrices de mucus (goblet cells) et les cellules M (de l'anglais *microfold*) (**Figure 24**). En plus d'assurer la digestion des aliments et l'absorption des nutriments, l'intestin doit assurer la protection de l'organisme contre les agents exogènes. L'intégrité de la barrière intestinale est renforcée par la sécrétion de mucus, les jonctions serrées entre les entérocytes, le renouvellement rapide des cellules épithéliales et la production d'IgA sécrétées dans la lumière intestinale qui vont permettre l'exclusion de certains antigènes ou pathogènes [104, 105].

En conditions physiologiques, la barrière intestinale est étanche aux macromolécules : seuls les ions, l'eau et certains peptides inférieurs à 600 Da peuvent passer par transport paracellulaire [106]. Une grande partie des protéines alimentaires sont dégradées au cours de la digestion gastroduodénale. Il en résulte des acides aminés, des peptides mais aussi des protéines ayant résisté à la digestion. Les acides aminés résiduels et les petits peptides vont pouvoir traverser la barrière intestinale par diffusion passive. Les antigènes particuliers ou agrégés sont pris en charge préférentiellement par les cellules M au niveau des plaques de Peyer. L'environnement des cellules M ne permet pas aux vésicules endosomales de se différencier en lysosome. Ainsi, par exocytose, les protéines antigéniques se retrouvent dans la *lamina propria* et seront rapidement pris en charge par les CPA sous-jacentes. Il existe également un passage transcellulaire *via* les entérocytes où les antigènes sont endocytosés, puis digérés dans les lysosomes ou sécrétés au niveau basal dans des exosomes [104, 106, 107]. Les antigènes peuvent être également captés directement dans la lumière intestinale par des « macrophages » exprimant le récepteur CX3CR1 [108, 109].

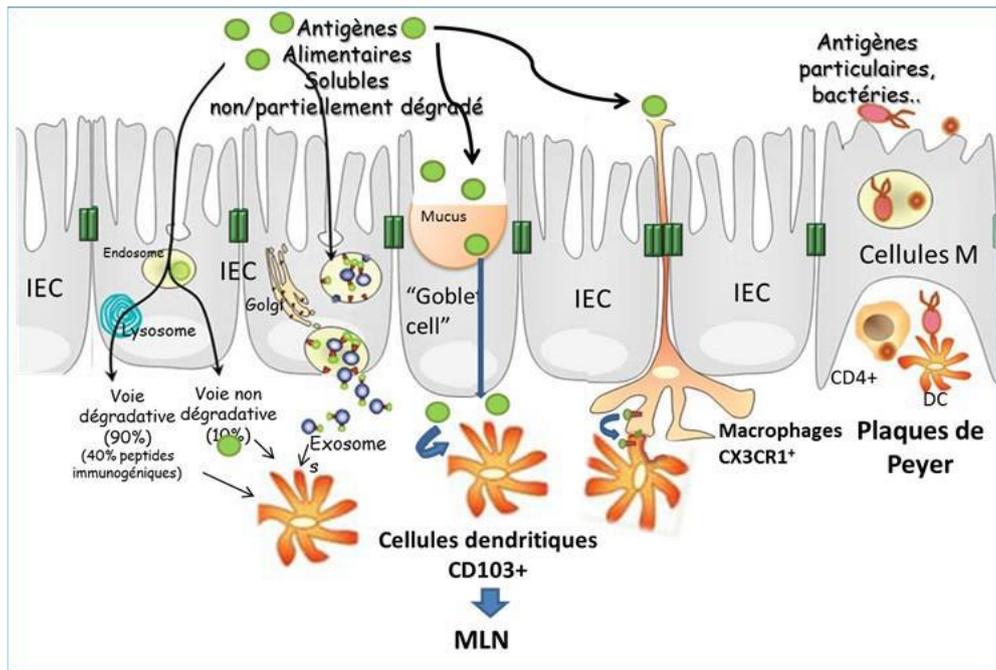


Figure 24. Les différentes voies d'entrée des antigènes au niveau de la barrière intestinale et leur présentation au système immunitaire.

Le passage transépithélial des antigènes solubles implique 3 voies différentes : un échantillonnage direct par les macrophages de la lamina propria via des protrusions dans la lumière intestinale ; une prise en charge par les cellules caliciformes (ou Goblet cells) ; une endocytose des antigènes par les cellules épithéliales puis présentations aux cellules T sous-jacentes ou la libération d'exosomes portant les peptides antigéniques associés aux molécules du CMH-II. La capture des antigènes particulaires est réalisée par les cellules M au niveau des plaques de Peyer.

Adaptée par K. Adel-Patient de [106 , 107].

Après le passage de la barrière intestinale, les antigènes alimentaires sont pris en charge par les cellules dendritiques [104 , 105]. Celles-ci migrent alors vers les ganglions mésentériques pour présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs et favoriser, dans des conditions physiologiques, leur différenciation en cellules T_{REG} qui vont permettre l'induction d'une tolérance orale. Dans le cas de l'allergie alimentaire, c'est la voie T_H2 qui va être induite.

3. Les mécanismes de l'allergie alimentaire médiée par les IgE

Le rôle du système immunitaire est de pouvoir induire une réponse protectrice contre les agents potentiellement pathogènes tout en tolérant les bactéries commensales (qui colonisent nos muqueuses au niveau de l'intestin, des poumons ou de la peau) et les antigènes alimentaires. La réaction physiologique normale du système immunitaire est donc d'induire une tolérance orale contre les protéines alimentaires. Dans le cas d'une allergie alimentaire, la

réponse du système immunitaire contre une protéine alimentaire est inappropriée et il y a induction d'une réponse humorale et cellulaire spécifiques.

a) Phase de sensibilisation immunitaire

Du fait des prédispositions génétiques de l'hôte et/ou d'un environnement cytokinique particulier (induit par certains facteurs de stress tels qu'une muqueuse lésée ou la présence de certains composés bactériens), les antigènes alimentaires sont pris en charges par les cellules dendritiques qui vont entraîner la polarisation des lymphocytes T naïfs vers un profil TH2 (**Figure 25, 1-2**) [110]. Les lymphocytes TH2, via principalement la production d'IL-4, vont ensuite induire la différenciation des cellules B en plasmocytes producteurs d'IgE spécifiques de l'antigène alimentaire qui devient dès lors un allergène (**Figure 25, 3**) [111 , 112].

Les IgE spécifiques vont par la suite circuler dans l'ensemble de l'organisme *via* la circulation sanguine. Les IgE spécifiques se fixent ensuite sur les mastocytes présents dans les tissus ou sur les basophiles circulants au niveau du récepteur FcεRI. (**Figure 25, 4**). Les mastocytes « sensibilisés » s'accumulent alors localement, prêt à engendrer une réponse immédiate lors d'un contact ultérieur avec l'allergène (**Figure 25, 5**). La phase de sensibilisation est dite « silencieuse », car aucun signe clinique n'est apparent. Un individu peut présenter des IgE spécifiques pour un aliment sans pour autant réagir cliniquement à un aliment [113 , 114].

b) Phase de déclenchement et manifestations cliniques

Lors d'un contact ultérieur avec l'allergène, ce dernier va être reconnu par les IgE spécifiques présentes à la surface des mastocytes. Le pontage des IgE va provoquer l'agrégation des récepteurs FcεRI et la dégranulation des mastocytes (**Figure 25, 6-7**). La libération des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la tryptase, les prostaglandines, les leucotriènes ou les cytokines pro-inflammatoires va induire des remodelages tissulaires localement observables, ainsi qu'une augmentation de la vasodilatation et de la perméabilité vasculaire [113 , 114]. Ces phénomènes donnent lieu à des manifestations cliniques variées, plus ou moins graves (**Figure 25, 8**) [115].

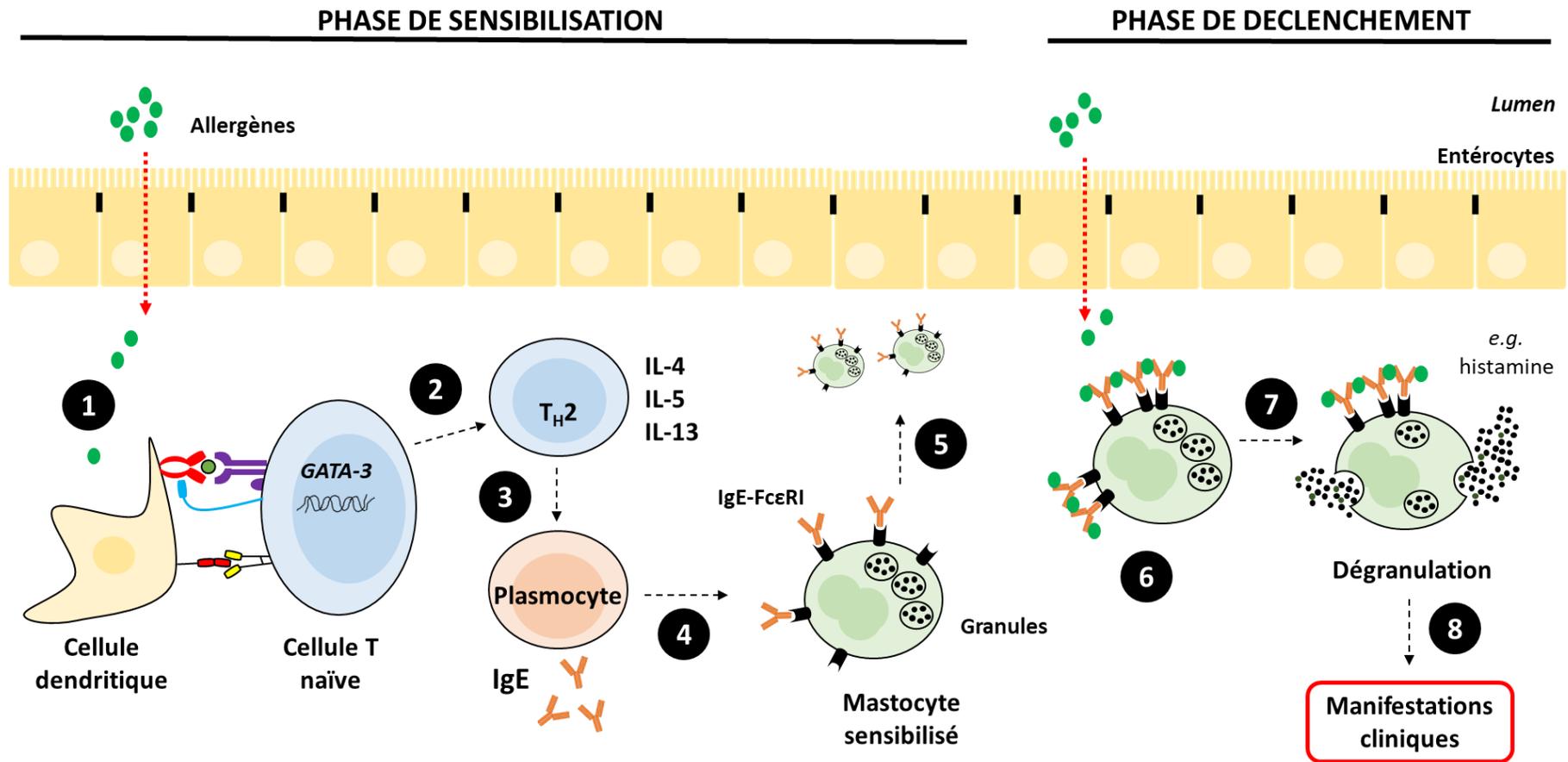


Figure 25. Mécanisme général de l'allergie alimentaire médiée par les IgE

L'allergie alimentaire se développe en deux étapes. La première correspond à la phase de sensibilisation au cours de laquelle l'allergène est pris en charge par les CPA (1) qui vont induire la polarisation T_H2 des cellules T naïves (2) et l'activation de plasmocytes producteurs d'IgE spécifiques de l'allergène (3). Les IgE se fixent ensuite au niveau des récepteurs de haute affinité (FcεRI) des mastocytes et des basophiles (4-5). La deuxième correspond à la phase de déclenchement, qui se produit lors d'un contact ultérieur avec l'allergène. Elle se traduit par l'activation des mastocytes via le pontage des IgE (6). La dégranulation des mastocytes conduit à la libération de médiateurs pro-inflammatoires (7), qui provoquent des symptômes cliniques (8).

4. Les symptômes de l'allergie alimentaire

Les signes cliniques de l'allergie alimentaire sont très divers et non spécifiques de l'aliment (*i.e.* un aliment peut induire différents types de symptômes, et un même symptôme peut être induit par des aliments différents). Les symptômes peuvent être oropharyngés, gastro-intestinaux, respiratoires, cutanéomuqueux et/ou généralisés (anaphylaxie). L'anaphylaxie traduit la rapidité d'apparition des symptômes [115]. Elle peut être de grade 1 à 4, en fonction du nombre et type d'organes touchés selon la classification de Ring et Messmer [116, 117]. Le **Tableau 3** résume les principaux symptômes de l'allergie alimentaire. Le choc anaphylactique est une réaction systémique, survenant rapidement (< 30 min) et qui touche plusieurs organes à la fois (dont les systèmes cardiaques et respiratoires), mettant en jeu le pronostic vital. Des médiateurs tels que l'histamine, les tryptases, les facteurs d'activation plaquettaire sont libérés massivement. Enfants et adultes sont concernés par cette manifestation clinique, dont la prise en charge doit être rapide (injection d'adrénaline à l'aide de kit auto-injectable).

Tableau 3. Principaux symptômes des réactions allergiques alimentaire médiées par les IgE.
Tiré de [118].

Type de signes	Principaux symptômes
Peau	Urticaire, angioœdème, érythème, prurit, dermatite atopique, lésions
Respiratoire	Œdème laryngé, rhinoconjonctivite, bronchospasme, congestion nasale, toux, douleur à la poitrine, sifflement, dyspnée
Gastrointestinale	Angioœdème (lèvres, langue, palet), prurit bouche, nausée, vomissement, douleur abdominale, diarrhée
Cardiaque	Présyncope/syncope, hypotension, tachycardie
Généralisée	Choc anaphylactique

IV. Le diagnostic de l'allergie

L'interrogatoire permet de retracer l'histoire clinique d'un patient : l'aliment qui a déclenché la réaction allergique, la voie de déclenchement, le délai avant les premiers symptômes, les symptômes cliniques, les antécédents familiaux, les facteurs aggravants tels que les médicaments (AINS), l'ingestion d'alcool ou un exercice physique [119]. L'identification de l'aliment en cause permet de mettre en place des régimes d'éviction, limitant le risque de

survenue des réactions allergiques. Il faut aussi identifier les aliments qui pourraient potentiellement induire des réactions allergiques par réactivité croisée. Etablir un diagnostic de l'allergie alimentaire peut s'avérer difficile dans la mesure où l'historique du patient est inexact et que le lien entre aliment/ingrédients et symptômes n'est pas toujours facile à établir.

Une fois les aliments en cause suspectés, différents tests sont réalisés pour confirmer le diagnostic : le test cutané, le dosage d'IgE spécifiques dans le sang, le TPO et le test d'activation des basophiles (BAT) [117 , 119].

a) Les tests cutanés (ou le *Skin Prick-Tests*, SPT)

Ce test permet de confirmer rapidement la présence d'IgE spécifiques d'un aliment donné (sensibilisation). Ces tests peuvent se faire dès le plus jeune âge au niveau de l'avant-bras ou dans le dos. Les tests cutanés sont pratiqués à partir d'extraits commerciaux standardisés, d'aliments frais et/ou d'allergènes purifiés. Après avoir déposé l'extrait sur la peau, celui-ci est introduit dans l'épiderme par micro-puncture épidermique à l'aide d'une lancette. La lecture du test se fait dans les 20 minutes suivantes. En cas de présence de mastocytes sensibilisés (*i.e.* revêtus d'IgE spécifiques), ceux-ci sont activés et induisent une réaction allergique localisée : apparition d'un érythème du fait de la vasodilatation des vaisseaux, puis augmentation de la perméabilité vasculaire qui aboutit à un œdème (papule). Le test cutané est positif si le diamètre de l'érythème est de 3 mm supérieur à celui du témoin négatif [117, 119, 120]. Toutefois ce test n'indique que la présence d'IgE spécifiques d'un aliment mais ne permet pas de déterminer si le patient va déclencher ou non une réaction après ingestion de cet aliment.

b) Le dosage sanguin des IgE spécifiques

Ce test repose sur la quantification des IgE spécifiques dans le sang. Ils sont aujourd'hui réalisés à l'aide de tests reprenant la technique de l'*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) [117, 119]. La quantité d'IgE spécifiques est exprimée en UI/mL ou kU/L. Ces tests *in vitro* sont sans risque pour le patient et permettent de vérifier si celui-ci est sensibilisé à un aliment, à un ou plusieurs allergènes. La détermination de la concentration en IgE spécifiques ne permet pas de déterminer la sévérité de l'allergie et ne signifie pas une allergie alimentaire

vraie à cet aliment (surtout pour les plus faibles concentrations d'IgE), mais donne des indications sur l'aliment et surtout les protéines potentiellement incriminées.

Dans le cas de l'ImmunoCAP™, le dosage des IgE spécifiques est quantitatif et il est spécifique d'un extrait ou d'un allergène. Il est réalisé à l'aide d'un kit de réactifs et d'un automate fourni par Phadia (Thermo Fischer Scientific). Plus de 650 allergènes différents sont disponibles pour ce test. Il est également possible de tester plusieurs centaines d'allergènes en une seule fois à l'aide de la technologie de l'ImmunoCAP ISAC™. Dans ce cas, le dosage (semi-quantitatif) des IgE spécifiques se fait à l'aide d'une « plateforme miniaturisée », ou puce ISAC. Le principe de l'ImmunoCAP ISAC™ repose sur le dosage des IgE spécifiques sur phase solide. Les allergènes sont immobilisés sur une biopuce qui est incubée avec le sérum à tester. Comme pour l'ImmunoCAP, les IgE non spécifiques sont éliminées par lavage, puis des anticorps anti-IgE marqués par fluorescence sont ajoutés pour détecter les réponses IgE spécifiques. Cette opération est suivie d'un scan de la biopuce. La concentration des IgE spécifiques est exprimée en unité ISAC standardisé (ISU). Ce dispositif permet la mesure simultanée des IgE contre plus d'une centaine de composants allergéniques avec seulement 30 µL d'échantillon. Une étude a récemment montré que la détection des IgE spécifiques est significativement améliorée lorsque les IgG sont spécifiquement retirées des échantillons de sérum [121]. L'élimination des IgG permet ainsi d'éviter la compétition entre la liaison des IgE et des IgG spécifiques aux allergènes qui sont présents en quantités limitées sur les biopuces. D'autres systèmes sont également disponibles tels que la puce ALEX Allergy Explorer (MacroArray Diagnostics GmbH) ou FABER (CAAM).

c) Le test d'activation des basophiles (*Basophil Activation Test, BAT*)

En complément du dosage des IgE, le test d'activation des basophiles est un test fonctionnel dont le but est de répliquer *in vitro* les réactions d'hypersensibilité de type I [117, 119]. Le test consiste à mettre en contact les basophiles d'un patient avec l'allergène. Dans le cas où les basophiles possèdent à leur surface des IgE spécifiques de l'allergène testé, la dégranulation est induite et leur état d'activation peut être suivi par cytométrie en flux. Le principe du BAT est présenté **Figure 26**. Les basophiles activés en présence de l'allergène possèdent un phénotype particulier, notamment la surexpression de certains marqueurs de surface tels que le CD63 [122]. Les basophiles ont une demi-vie estimée à environ moins d'une semaine et représentent moins de 1 % des cellules sanguines totales. Ainsi, les BAT se font généralement sur des

prélèvements fraîchement réalisés (idéalement moins de 4 h) [123]. D'après Hoffman *et al.* les BAT permettent d'obtenir un diagnostic plus précis que les tests cliniques habituels (*e.g.* SPT), avec une sensibilité comprise entre 77 % et 98 % et une spécificité comprise entre 75 % et 100 % [122]. Toutefois, comparé aux tests habituels, le BAT est une méthode plus laborieuse, non applicable en routine [124].

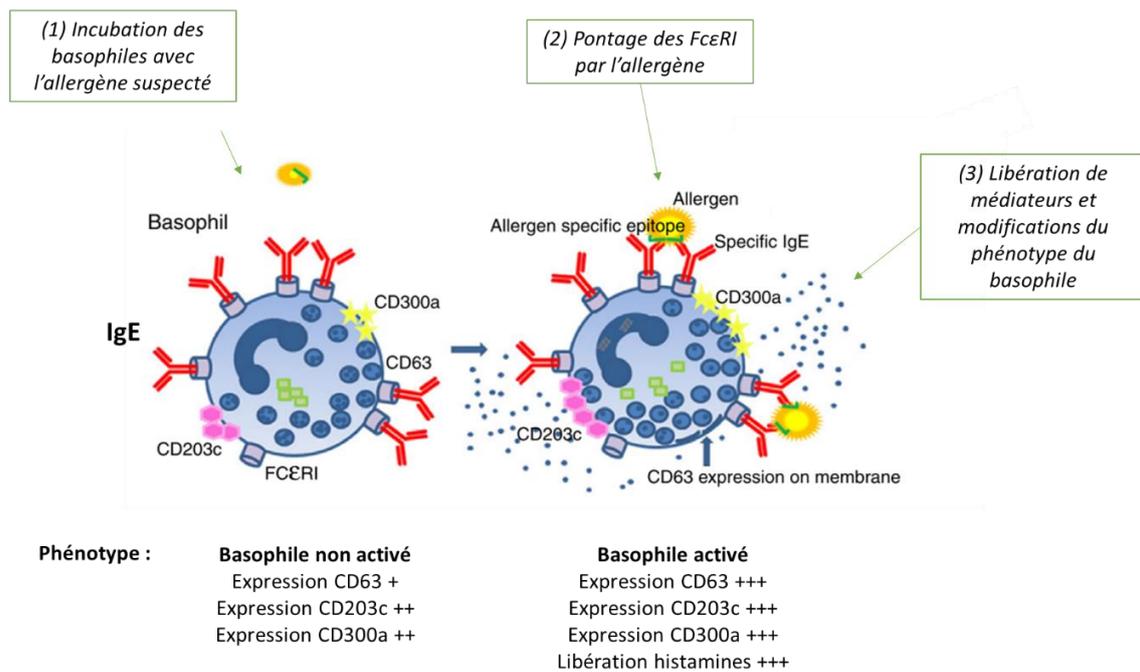


Figure 26. Principe du test d'activation des basophiles (BAT)

Le test consiste dans un premier temps à mettre en contact les basophiles d'un patient allergique avec l'allergène suspecté (1). Dans le cas où les basophiles possèdent à leur surface des IgE spécifiques de l'allergène testé, ils seront alors activés (2). L'activation des basophiles peut être suivie par le dosage de certains médiateurs de l'inflammation, ou la surexpression de certains marqueurs de surface tels que le CD63 (3). Adaptée de [124].

D'autres modèles de dégranulation *in vitro* ont été développés avec des lignées de cellules murines exprimant le récepteur FcεRI humain. Au laboratoire, Fanny Blanc a ainsi développé un modèle de dégranulation à l'aide de cellules RBL SX-38 qu'elle a appliqué à la caractérisation du potentiel de dégranulation des allergènes d'arachide, et qui est mis en œuvre dans différents projets visant à évaluer l'allergénicité des protéines [125].

d) Les tests de provocation orale (TPO)

Le TPO reste le test de référence pour diagnostiquer l'allergie alimentaire [117, 119]. Il permet d'une part de vérifier qu'un patient est bien allergique à l'aliment testé et d'autre part, de déterminer à partir de quelle quantité ingérée la réaction allergique est déclenchée (dose seuil). Ce test présente toutefois des risques pour le patient et doit être réalisé dans des conditions de sécurité particulière, en milieu hospitalier, afin de pouvoir traiter les symptômes dans le cas où le patient réagirait violemment au TPO. Les tests se réalisent en « ouvert » quand l'aliment est donné sous sa forme naturelle ou en simple ou double « aveugle » quand le patient et le médecin n'ont pas connaissance de l'aliment testé, qui est alors masqué dans une matrice neutre [120, 126].

5. Les traitements

Lors d'une réaction allergique, les médicaments administrés soulagent et traitent uniquement les symptômes, et en cas de choc anaphylactique, le traitement d'urgence repose sur la prise d'adrénaline [117]. D'autres médicaments, comme des antihistaminiques peuvent être donnés en préventif. Actuellement, le meilleur moyen de se préserver des risques de réactions allergiques est d'éviter l'ingestion des aliments incriminés [117, 119]. Le sujet allergique et ses proches apprennent à suivre un régime d'éviction et à réagir de manière appropriée en cas de réaction allergique. Toutefois, imposer un régime d'éviction peut parfois s'avérer fastidieux car le sujet allergique doit être capable d'identifier la présence des allergènes dans tous les produits alimentaires qu'il consomme. Ceci est normalement possible puisque les industriels doivent indiquer la présence de 14 allergènes à déclaration obligatoire. Toutefois, le patient allergique doit être également en mesure d'identifier les aliments qui pourraient donner lieu à une réactivité croisée avec l'aliment auquel il est allergique.

L'immunothérapie spécifique (ou la désensibilisation), dans le cadre de l'allergie alimentaire, est un traitement prometteur, visant à atteindre un état de tolérance permanent chez les personnes sensibilisées, ou au moins à augmenter le seuil réactogène permettant ainsi de limiter le risque de réactions lors d'ingestions accidentelles. A l'aide de différentes voies d'administration (sous-cutanée, épicutanée, sublinguale et orale), le patient est exposé quotidiennement à des doses croissantes puis fixes (dose de maintenance) de l'aliment incriminé afin d'induire une immunosuppression spécifique et un état de désensibilisation

[127]. Ce traitement a en particulier pour objectif de stimuler une réponse T régulatrice spécifique de l'allergène. Toutefois ce traitement ne fonctionne pas chez tous les patients, et la désensibilisation potentiellement induite ne perdure pas systématiquement. Par exemple, dans le cadre d'une immunothérapie par voie orale au lait de vache, 37 % à 70% des patients qui ont pu aller au bout du traitement réagissent de nouveau au lait après six semaines d'arrêt du traitement [128].

V. Les principaux aliments responsables d'allergie alimentaire et leurs constituants allergéniques

Les allergènes sont depuis 1994 nommés selon une norme internationale imposée par un sous-comité reconnu par l'OMS et l'*International Union of Immunological Society* (IUIS) [129, 130]. Un allergène est nommé par les trois premières lettres du genre, suivies de la première lettre de l'espèce et d'un chiffre arabe. Un espace doit suivre les deux premiers éléments. Cette nomenclature suit un ordre chronologique de découverte des allergènes. La base de données de l'WHO/IUIS liste tous les allergènes connus [131].

A ce jour, 14 aliments en Europe sont à déclaration obligatoire, du fait de la fréquence et de la gravité des allergies associées : il s'agit du lait de vache, des œufs, du poisson, des crustacés, des mollusques, de l'arachide, des fruits à coques, des céréales contenant du gluten, du céleri, des graines de moutarde, du soja, des graines de sésame et du lupin [132]. En dehors de l'Europe, les aliments à déclaration obligatoire varient en fonction des réglementations nationales. Par exemple, au Canada et aux Etats-Unis, le céleri et le lupin ne font pas partie des aliments prioritaires, tandis qu'en Corée, la pêche, le porc et les tomates en font partie [132].

Bien qu'il existe des variations géographiques, les aliments responsables des allergies alimentaires les plus fréquentes sont : le lait de vache, l'œuf de poule, le poisson, les crustacés, l'arachide, les fruits à coques, le blé et le soja. Ces allergènes sont responsables de la majorité des réactions médiées par les IgE. Chez les enfants, l'allergie à des protéines d'origine animale (lait, œuf) est relativement importante tandis que pour les adultes, les allergies alimentaires sont principalement dues à des protéines d'origine végétale (**Figure 27**) [133].

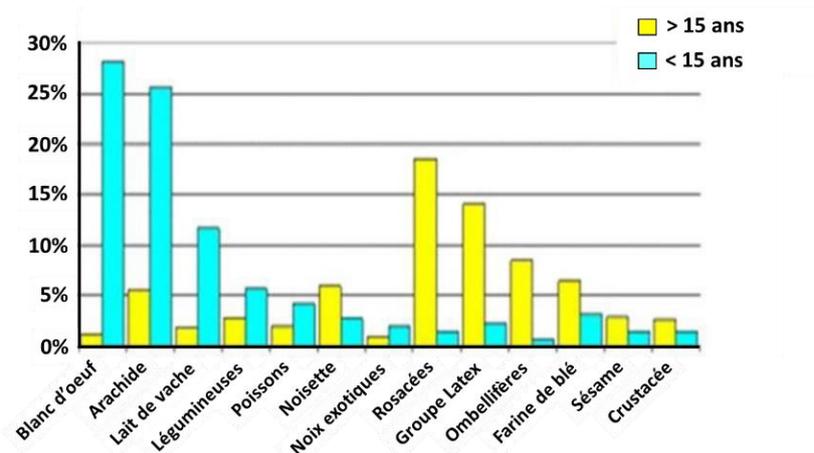


Figure 27. Fréquence des allergies alimentaires en fonction de la famille des trophallergènes impliqués et de l'âge

Les enfants sont plus sujets aux allergies alimentaires d'origine animale (œuf et lait) et l'arachide. A l'inverse, les aliments les plus incriminés chez les adultes sont d'origine végétale tels que les pommes, pêches, kiwi et céleri. D'après le CICBAA (2009).

a) Le lait de vache

Le lait de vache (*Bos dosmesticus*) est souvent le premier aliment à être introduit dans l'alimentation du nourrisson. Il est donc l'aliment le plus fréquemment impliqué dans les réactions d'allergie chez les très jeunes enfants. De 0,6 à 2,5 % des enfants de moins de six ans et 0,3% des adolescent souffrent d'une allergie au lait de vache [134] mais environ 85 % des enfants auront développer une tolérance à cet aliment aux alentours de 5 ans [133, 135]. Les allergènes majeurs du lait de vache sont les caséines α_{S1} (Bos d 8), α_{S2} (Bos d 9) et β (Bos d 10) et dans le lactosérum, l' α -lactalbumine (Bos d 4) et la β -lactoglobuline (Bos d 5).

b) L'œuf

Après le lait de vache, l'œuf de poule (*Gallus domesticus*) représentent le second aliment responsable des réactions allergiques chez les très jeunes enfants [136]. De 0,5 à 2,5 % des jeunes enfants et moins de 0,5 % des adultes souffrent d'une allergie à l'œuf [137]. Environ 80 % des enfants développent aux alentours des 5 ans une tolérance à l'œuf [133, 135]. Les allergènes majoritaires de l'œuf sont retrouvés dans le blanc d'œuf : l'ovumucoïde (Gal d 1) et l'ovalbumine (Gal d 5).

c) Les poissons et crustacés

D'après Francis *et al.*, les poissons les plus fréquemment impliqués dans les réactions allergiques sont la morue, le saumon et le thon, avec 50 % de risque de réactivité croisée avec un ou plusieurs poissons. La parvalbumine est le principal allergène des poissons. Les tropomyosines sont les principaux allergènes des crustacés [138].

d) Les légumineuses

Au sein des légumineuses, la principale source allergénique est l'arachide mais on y trouve aussi le soja, le pois chiche, la fève, la lentille et le lupin. Pour l'arachide, 16 protéines ont été identifiées comme des allergènes. Les allergènes majeurs sont les albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6), la globuline 7S (Ara h 1) et la globuline 11S (Ara h 3). La nsLTP (Ara h 9) peut être particulièrement allergénique au sein des patients qui sont sensibilisés à des nsLTP d'autres sources végétales (par exemple Pru p 3 de la pêche). L'allergie à l'arachide touche environ 1,9 % des enfants et persiste à l'âge adulte [57]. Seulement 20 % des enfants allergiques à l'arachide développent une tolérance à l'arachide en grandissant [135]. La réactivité croisée entre les allergènes de l'arachide et d'autres allergènes de légumineuses sont assez fréquentes. En effet, les IgE d'environ 80 % des patients allergiques à l'arachide reconnaissent les protéines du lupin et environ 80 % des patients allergiques aux lentilles réagissent au pois-chiche et/ou aux pois [135, 138].

e) Les fruits à coques

Les fruits à coques les plus fréquemment impliqués dans les réactions allergiques sont les noix, noisettes, noix de pécan, noix de cajou, pistaches et amandes. Environ 1 % de la population mondiale est allergique à des fruits à coques et cette allergie a également tendance à persister toute la vie [138]. Les albumines 2S, globulines 7S/11S et nsLTP sont les familles de protéines les plus fréquemment impliquées dans les réactions allergiques aux fruits à coques [138].

f) Les graines

Les graines les plus fréquemment impliquées dans les réactions allergiques sont les graines de sésames et les graines de moutarde [139]. Les prévalences d'allergies aux graines ne semblent pas être influencées par les variations géographiques. Les risques de réactivité croisée entre les graines et d'autres espèces végétales ont été observées, notamment avec l'arachide [138].

g) Les fruits et les légumes

Les réactions allergiques aux fruits et aux légumes sont des allergies plus fréquemment observées chez les adultes. Ainsi, 27 % des allergies de l'adulte sont dues aux rosacées (abricots, cerises, fraises, framboises, pêches, poires, pommes et prunes). Ensuite, 23 % des allergies sont induites par les fruits du groupe latex (bananes, avocats, châtaignes et kiwis) puis 18 % par les ombellifères (carottes, céleri, fenouil, persil et aneth) [140]. Ces allergies chez les adultes peuvent en partie s'expliquer par une allergie croisée du fait de structures homologues entre certaines protéines de pollens et alimentaires (syndrome pollen-aliment) [141] : les patients sont sensibilisés par voie respiratoire aux pneumallergènes présents dans le pollen, puis réagissent suite à l'ingestion d'un aliment contenant des protéines de structures proches de celles de l'allergène sensibilisant.

Les principaux pollens associés au syndrome pollen-aliment sont les pollens de bouleau, d'armoise et d'ambroisie [142]. Le **Tableau 4** illustre les réactivités croisées possible entre ces pollens et des fruits. Le syndrome pollen-aliment varie géographiquement, c'est-à-dire en fonction de la diversité endogène des pollens dans une région. Par exemple en Europe, dans les pays où le bouleau prospère (*e.g.* pays scandinaves, France, *etc.*), la prévalence de l'allergie au pollen de bouleau est très élevée avec une sensibilisation contre Bet v 1, une PR10 qui compte de nombreuses protéines homologues au sein de différents fruits et légumes (pomme, pêche, poire, cerise, carottes...) [141]. Il n'est donc pas rare de voir des allergiques au pollen de bouleau développer une réaction allergique suite à la consommation de ces fruits. Dans les pays méditerranéens, il est plus souvent observé une sensibilisation contre les nsLTP, avec aussi une forte réactivité croisée entre aliments. Chez 50 % des patients allergiques à la nsLTP de la pêche (Pru p 3), des réactions allergiques sont fréquemment observées avec d'autres fruits de la famille des Rosacées (pomme, cerise, prune, poire et abricot) [138].

Tableau 4. Réactivité croisée entre les protéines alimentaire d'origine végétale et le pollen
Les pollens, dans cet exemple, sont les allergènes sensibilisants. Adapté de [115, 143].

Pollen	Aliment
Bouleau	Abricot, pêche, nectarine, prune, cerise, pomme, poire, kiwi, carotte, céleri, persil, arachide, soja, amande, noisette, pomme de terre
Graminées	Tomate, pomme de terre, orange, farine de blé, melon, arachide
Fléoles des prés	Pêche, melon, orange, tomate, pomme de terre
Armoise	Poivron, brocoli, choux, chou-fleur, oignon, ail, persil, coriandre, cumin, piment, poivre, moutarde, blette
Ambroisie	Melon, pastèque, banane, concombre, pomme de terre, courgette

C. L'allergie aux graines de tournesol

I. Les cas d'allergie aux graines de tournesol

Du fait de sa forte consommation dans certains pays européens, la GT a été considérée par le projet EuroPrevall comme un aliment à surveiller prioritairement. La première étude publiée en 2010 rapporte ainsi que la sensibilisation aux protéines de GT peut atteindre jusqu'à 5 % de la population adulte dans certains pays européens, dont la France [141]. En Inde, la prévalence de sensibilisation atteint 8,7 % des adultes bien que la GT ne soit pas fréquemment consommée dans ce pays (à l'inverse de l'huile de tournesol) [144]. Heureusement, dans une très grande majorité des cas, cette sensibilisation ne s'accompagne pas d'une allergie clinique [145] et elle résulte très probablement de réactions croisées liées à la sensibilisation à un autre aliment phylogéniquement proche. Toutefois, plusieurs cas de vraie allergie aux protéines de GT ont été rapportés.

Des cas de réactions allergiques aux GT furent observés dès 1906 par le médecin allemand Dreyer [146]. Il décrit chez des prisonnières, dont l'une des corvées était de décortiquer des GT, des symptômes cliniques typiques d'une réaction allergique avec des démangeaisons et des conjonctivites. En 1979, aux Etats-Unis, Noyes *et al.* rapportent trois cas cliniques d'allergie aux GT [147]. Des cas d'allergie ont été observés chez des propriétaires d'oiseaux nourris avec des GT et les auteurs de ces études suggèrent que la sensibilisation serait due à une inhalation des poussières de maison contaminées avec des protéines de GT [146, 148, 149]. De même,

une sensibilisation professionnelle (chez un boulanger) se serait produite par inhalation de la poussière de GT [150]. Le cas d'un enfant d'abord allergique au pollen de tournesol, puis aux protéines de GT, a également été rapporté [151]. Des cas de sensibilisation dus à la consommation de beurre de GT et des cas de chocs anaphylactiques induits par la consommation de GT sous forme de produits de grignotage (snack) ont été récemment décrits [152-155]. Enfin, plus particulièrement dans le bassin méditerranéen où la consommation de GT est plus importante, une étude espagnole menée par Crespo *et al.* sur 355 enfants souffrant d'une allergie alimentaire rapporte que 15 d'entre eux étaient allergiques aux GT [156]. Des cas d'allergie alimentaire aux GT ont également été rapportés en Grèce [157]. A Athènes, les GT font partie des 3 aliments qui causent probablement le plus d'allergies alimentaires [61]. Enfin, une étude sur 43 patients portugais sensibilisés aux LTP, a montré que les GT sont impliquées dans 9 % des cas d'anaphylaxie [158].

II. Les allergènes connus et potentiels de la graine de tournesol

D'après Radauer *et al.*, seulement 2 % des protéines végétales connues sont allergéniques [159]. Les allergènes alimentaires d'origines végétales sont principalement des protéines de la superfamille des prolamines (albumines 2S et nsLTP) et des cupines (globulines 7S/11S) [159].

D'après les données disponibles dans la banque de donnée WHO/IUIS, les protéines reconnues comme étant des allergènes dans le tournesol sont des allergènes présents dans le pollen : Hel a 1 (34 kDa), Hel a 2 (profiline, 14,7 kDa) et Hel a 6 (pectase lyase, 42 kDa). Le seul allergène actuellement décrit dans la GT est la nsLTP Hel a 3.

1. Hel a 3

La prévalence de la sensibilisation aux nsLTP est plus élevée dans les pays du pourtour méditerranéen [160, 161]. Papageorgiou *et al.* ont ainsi rapporté au sein de patients grecs allergiques aux GT, une sensibilisation à Hel a 3 plutôt qu'à SFA-8 [162]. Yagami a également identifié une nsLTP (par immunoempreinte IgE et séquençage de la partie N-terminale de la bande d'intérêt) comme la protéine sensibilisante chez une patiente allergique aux GT [163]. Couto *et al.* et Ukleja-Sokolowska *et al.* rapportent également le cas d'une réaction allergique

aux GT chez des patients présentant un profil de polysensibilisation à différentes nsLTP, dont Hel a 3 [164, 165].

2. Les albumines 2S

A notre connaissance, seule l'allergénicité de SFA-8 (ou SESA3) a été étudiée. L'immunoréactivité IgE de SFA-8 fut décrite pour la première fois par Kelly *et al.* [166-168]. Les auteurs observent en particulier que les patients possèdent des IgE qui reconnaissent plusieurs protéines de la GT, avec un PM variant entre 5 kDa et 50 kDa (**Figure 28.**). Une reconnaissance par les IgE particulièrement forte est observée envers des protéines de masses moléculaires inférieures à 21 kDa. La protéine SFA-8 étant plus facile à purifier, elle a pu être testée séparément en immunoempreinte IgE. La réactivité IgE de SFA-8 a ainsi été démontrée mais il apparaît clairement qu'elle n'était pas la seule protéine reconnue par les IgE des patients, et sans doute pas avec la plus forte intensité.

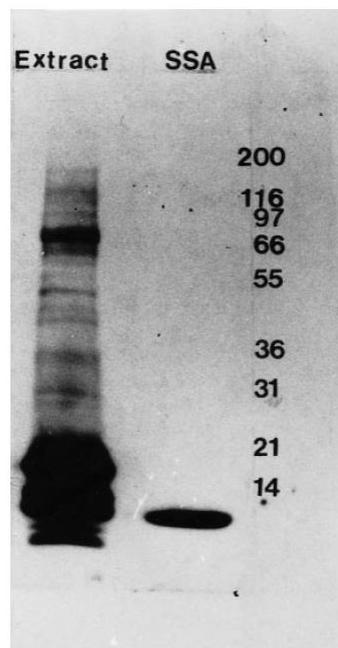


Figure 28. Analyse de la réponse IgE par immunoempreinte à 1D.

Les travaux de Kelly *et al.* (2000) démontrent bien la réactivité IgE de la protéine SFA-8 (nommée SSA dans cette étude) mais également celle de nombreuses autres protéines de GT [166].

Bien que ces données suggèrent fortement que les autres SESA de la GT sont au moins aussi allergéniques que SFA-8, la difficulté de purifier ces différentes SESA explique certainement que seul le potentiel allergénique de SFA-8 ait été étudié en détail. Pourtant, bien que SFA-8 soit toujours citée en exemple des albumines 2S de GT, cette protéine a plutôt été décrite comme ayant un faible potentiel allergénique, au moins en comparaison de l'allergène majeur de la noix du Brésil, Ber e 1. Une étude menée par Kean *et al.* a ainsi comparé la capacité de SFA-8 et de Ber e 1 à polariser les réponses immunes induites dans des cellules dendritiques ou dans des co-cultures avec des cellules T [169]. SFA-8 est ainsi capable d'induire la production d'IL-12 par les cellules dendritiques et seules les cellules T co-incubées avec des cellules dendritiques exposées à Ber e 1 produisent de l'IL-4 et de l'IL-5 (T_H2). Ces résultats indiquent ainsi un potentiel allergénique plus faible de SFA-8 par rapport à Ber e 1.

3. Les hélianthinines (globulines 11S)

Plusieurs études basées sur l'utilisation d'immunoempreintes IgE font état de bandes de hautes masses moléculaires (> 20 kDa) reconnues par les IgE de patients allergiques à la GT [168, 170]. Dans un abstract de congrès, Macias *et al.* évoquent que sur dix patients allergiques aux GT, six ont montré des réponses positives à un test de dégranulation de basophiles contre un extrait enrichi en globulines 11S [171]. Toutefois, les données sur l'allergénicité potentielle des globulines 11S restent très limitées.

4. Les oléosines

Les oléosines sont des petites protéines de 16 kDa à 25 kDa composées de trois domaines : une région hydrophile en partie N-terminale (\approx 30-60 aa) et C-terminale (\approx 70 aa) et une région hydrophobe fortement conservée au milieu. La région hydrophobe des oléosines interagit directement avec les corps lipidiques et s'agencent en alternance avec les phospholipides pour former une monocouche appelée oléosome. Du fait de leur forte hydrophobicité, il est particulièrement difficile de travailler sur ce type de protéines qui demande des protocoles d'extraction particulier. En effet, ces protéines sont pour l'essentiel perdues dans les protocoles classiques d'extraction en phase aqueuse.

Les oléosines ont récemment été décrites comme des allergènes mineurs pour le sésame [172]. Pour l'arachide, la sensibilisation aux oléosines n'a été observée que chez des patients avec une allergie sévère et qui présentaient donc un niveau de sensibilisation déjà élevé contre les autres allergènes majeurs d'arachide [173]. Deux études évoquent l'allergénicité potentielle des oléosines de GT. Macias *et al.* ont observé chez six patients allergiques aux GT (n=10) des réponses positives à un BAT contre une fraction enrichie en oléosines [171]. Enfin, Barbarroja-Escuredo *et al.* rapportent chez deux patients allergiques la présence de bandes réactives en immunoempreinte IgE dans une fraction de protéines liposolubles de GT de masse moléculaire pouvant correspondre à des oléosines [174].

D. Evaluation de l'allergénicité des nouvelles sources protéiques alimentaires

Dans le cadre d'une population mondiale en augmentation constante, nous devons faire face à une demande toujours plus importante de protéines alimentaires. Par ailleurs, dans le but de construire une alimentation plus durable, il est aussi envisagé d'introduire dans l'alimentation humaine de nouvelles sources de protéines en remplacement des protéines animales dont la production est considérée comme ayant un fort impact environnemental et énergétique. En amont, ces protéines doivent être évaluées pour leur qualité nutritionnelle et leur risque toxicologiques et allergéniques.

Face à cette évolution, l'industrie agro-alimentaire bénéficierait grandement de la mise en place d'outils fiables, faciles d'utilisation et le moins chers possible pour l'évaluation de l'allergénicité des protéines alimentaires. Ces outils permettraient en particulier d'évaluer les risques d'allergénicité dès le début du développement de nouveaux produits alimentaires. Malheureusement, aucune stratégie d'évaluation du risque allergénique n'est pour l'instant suffisamment prédictive pour pouvoir être acceptée par les autorités de régulation. Dans ce cadre, le COST (pour *European Cooperation in Science and Technology*) ImpARAS (pour *Improving Allergy Risk Assessment Strategy for New Food Proteins*) a permis à la communauté scientifique de se réunir pour discuter de cette thématique [175]. Ce COST a été une formidable opportunité pour moi de participer à différentes formations et conférences et il a abouti à la rédaction d'un nombre important d'articles sur lesquels se repose le présent chapitre.

I. Contexte

Avant d'introduire des nouvelles sources de protéines (ou des nouvelles protéines) dans l'alimentation humaine, la législation européenne requiert une évaluation complète au niveau de la valeur nutritionnelle, des risques microbiologiques, toxicologiques et allergiques (EC regulation No 258/97 and EU recommendation 97/618 EC; <http://eur-lex.europa.eu/>). Alors que l'évaluation des risques nutritionnels, microbiologiques et toxicologiques bénéficient de procédures validées et standardisées, ce n'est pas encore le cas pour l'évaluation du potentiel allergénique de nouvelles sources de protéines alimentaires telles que les insectes, les algues ou les nouvelles variétés végétales [176].

Actuellement, l'évaluation du risque allergique repose principalement sur les protocoles initialement mis en place pour l'évaluation de l'allergénicité des aliments génétiquement modifiés (GM). Ces directives ont été mises en place afin de prévenir le risque d'introduire un transgène qui pourrait directement coder pour un allergène connu et dangereux pour les personnes allergiques à la source du transgène, ou pour une protéine similaire à un allergène et qui poserait alors un risque d'allergie croisée pour certains patients.

II. Les stratégies d'évaluation de l'allergénicité des OGM

Comme illustré sur la **Figure 29**, l'évaluation de l'allergénicité des aliments génétiquement modifiés commence par l'étude de la source du transgène. Si le gène introduit provient d'un aliment allergénique, il faudra alors vérifier que le gène ne code pas pour un allergène. Dans les 2 cas, le risque de réactivité croisée doit être évalué en identifiant les homologies de séquence avec des allergènes déjà connus. Le risque de réactivité croisée est considéré élevé lorsque, sur une fenêtre de 80 acides aminés, la protéine transgénique présente 35 % d'identité de séquence avec un allergène déjà connu [177]. Si c'est le cas, des tests de liaison IgE doivent être réalisés avec une sélection appropriée de sérums de patients allergiques soit à la source du transgène, soit aux aliments contenant les allergènes présentant les plus fortes homologies de séquences. La liaison IgE-protéine permet de confirmer le potentiel de réactivité croisée de la protéine transgénique avec des allergènes déjà connus. S'il y a liaison IgE-protéine transgénique, alors l'aliment GM est considéré comme probablement allergénique. Dans le cas où les IgE spécifiques ne reconnaissent pas les protéines transgéniques, un test de résistance des protéines à la pepsine doit être réalisé. Dans le cas d'une forte résistance à la pepsinolyse,

la protéine est considérée comme potentiellement allergénique. Malheureusement, la résistance à la digestion gastrique n'est pas toujours corrélée au potentiel allergénique [178]. Ainsi de nombreux allergènes majeurs, tels que la caséine du lait de vache, ne sont pas très résistants à la digestion ou du moins pas plus résistants que d'autres protéines non allergéniques [179]. Le degré de résistance d'une protéine peut également varier en fonction des conditions expérimentales (pH, concentration en pepsine, pureté). De plus, les procédés de transformation tels que les traitements thermiques ou la composition de la matrice alimentaire peut également modifier complètement la propension d'une protéine à être digérée [176, 180, 181].

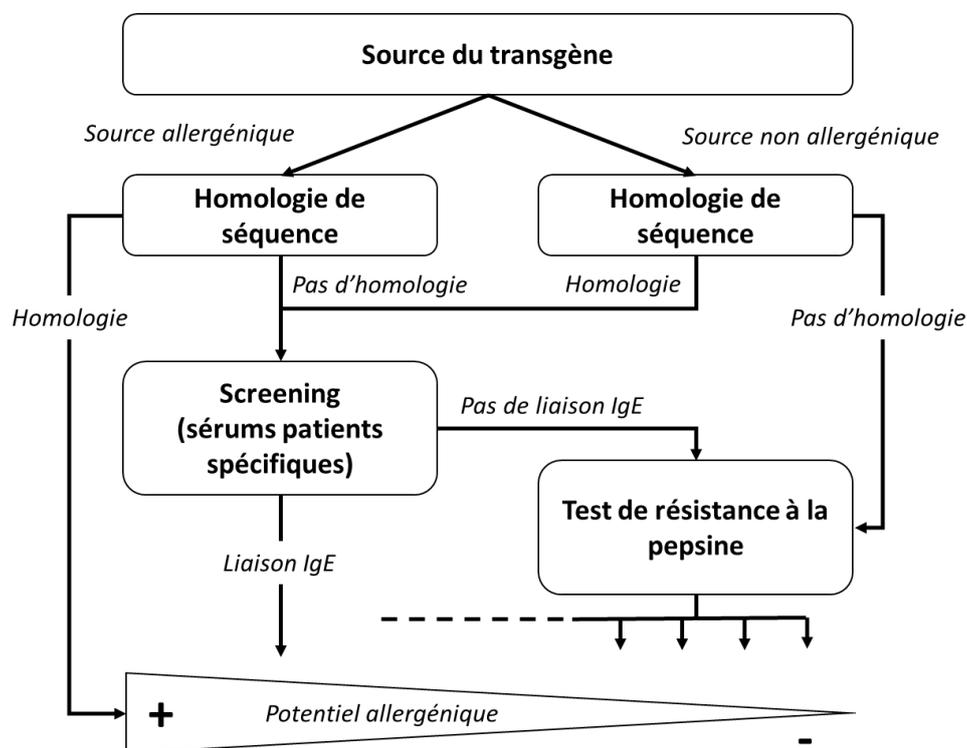


Figure 29. Schéma d'étude recommandé par l'EFSA pour l'évaluation du risque allergénique des nouvelles protéines issues d'aliments GM.

Adaptée de [176].

III. Les stratégies d'évaluation de l'allergénicité des nouveaux aliments et des nouvelles protéines

Les directives fixant l'évaluation du risque allergénique des aliments GM ne sont toutefois pas directement applicables aux nouvelles sources de protéines qui seraient consommées dans des quantités beaucoup plus importantes que la protéine transgénique et qui contiendraient potentiellement un nombre beaucoup plus élevé de nouvelles protéines. Dans ce cas, il semble impossible de tester les homologues de séquence potentielles entre plusieurs dizaines de protéines nouvelles. De plus, il n'est fait aucune mention d'autres facteurs qui pourraient influencer l'allergénicité, comme les procédés de transformations ou l'effet de la matrice alimentaire. Cet aspect est d'autant plus important que l'industrie alimentaire peut chercher à valoriser des isolats protéiques sous la forme d'ingrédients incorporés dans des produits alimentaires plus ou moins transformés. Comme aucune méthode n'est pour l'instant considérée comme suffisamment prédictive de l'allergénicité d'une protéine, les directives actuelles recommandent une approche fondée sur le « poids de la preuve » (« weight-of-evidence approach » ; **Figure 30**). Des ajustements et conseils ont ainsi été proposés par Verhoeckx *et al.* afin de proposer une stratégie d'évaluation du risque allergénique plus applicable aux nouvelles sources de protéines alimentaires non GM [176].

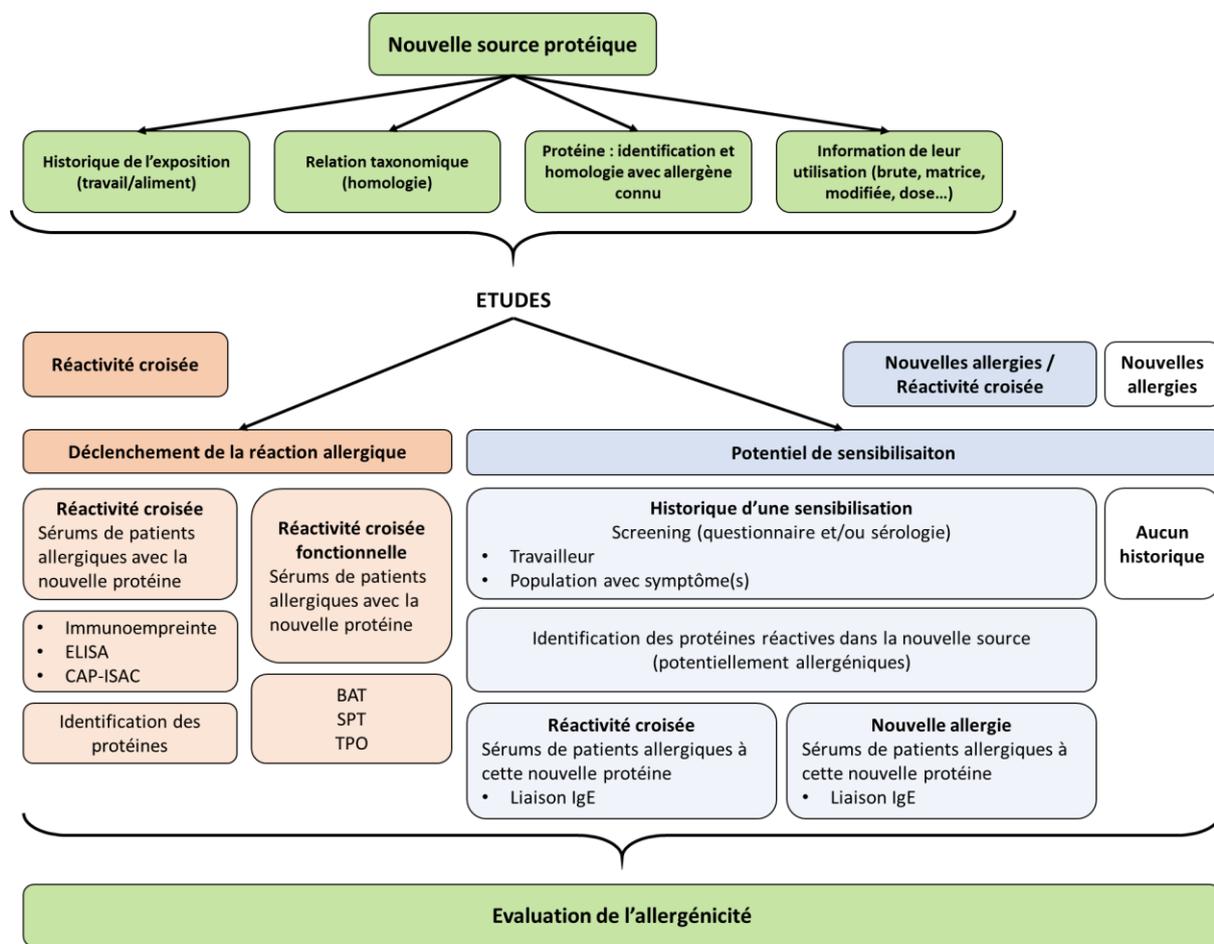


Figure 30. Schéma récapitulatif des approches proposées pour l'évaluation de l'allergénicité des nouvelles sources de protéines ou des protéines purifiées.

Adaptée de [176].

L'évaluation de l'allergénicité des nouvelles sources alimentaires commence par une enquête approfondie sur l'historique de leur utilisation dans les pays d'origine [182]. Toutefois, même si un aliment est consommé sans danger dans une partie du monde, cela n'exclut pas le risque d'allergénicité dans d'autres pays où cet aliment sera plus exotique. En parallèle, il faut enquêter sur les espèces végétales de la même famille et potentiellement allergéniques. Ces études ont pour objectif de mettre en relation des protéines homologues et de donner des indications sur les risques allergéniques des protéines et d'identifier les populations à risque [176, 182]. L'identification des nouvelles protéines (en particulier, si le génome de l'organisme source n'a pas encore été séquencé) pourra permettre de leur associer un potentiel risque allergénique si elles appartiennent à des familles déjà connues d'allergènes. Leur identification se fait généralement par une analyse LC-MS/MS des peptides obtenus par digestion des protéines à la trypsine et comparaison avec les bases de données. Les protéines et les peptides

sont séparés par RP-HPLC avant l'analyse de leur masse. L'identification des nouvelles protéines non présentes dans les bases de données est alors réalisée par rapprochement avec des protéines connues présentant des profils de digestion similaires, puis par homologie de séquence [176, 180].

Il est ensuite important de déterminer comment ces nouvelles protéines vont être utilisées dans les produits alimentaires (procédés de transformation, dose, matrice alimentaire). Ces différents paramètres vont ainsi affecter la solubilité et la digestibilité des protéines et ces données seront particulièrement importantes pour la réalisation des extraits protéiques qui seront caractérisés dans les différents modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*. Ces extraits doivent ainsi être le plus représentatifs du produit alimentaire final. La préparation des extraits (extraction des protéines, pH, traitement thermique et/ou enzymatique) peut très significativement influencer la capacité de reconnaissance par les IgE (test *in vitro*) ou de sensibilisation *in vivo* dans les modèles animaux. Les tests peuvent ainsi être appliqués à l'aliment entier, à un extrait protéique ou à des protéines purifiées individuelles. Tester l'aliment entier permet d'appréhender toutes les protéines au sein de la matrice alimentaire complexe (lipides, sucres et microorganismes inclus) qui pourraient moduler les propriétés intrinsèques des protéines potentiellement allergéniques. Les procédés d'extraction peuvent modifier la structure 3D des protéines et entraîner la perte de certaines protéines, par exemple les protéines hydrophobes lorsqu'une extraction en phase aqueuse est réalisée [176, 181, 182].

A partir de ces préparations, des études sur les risques de déclencher une réaction allergique et les risques de sensibilisation aux protéines de la nouvelle source alimentaire doivent être réalisées. Comme indiqué sur la **Figure 30**, ces études reposent principalement sur des tests de liaison IgE afin d'identifier les allergènes potentiels. Ces tests doivent être réalisés à l'aide d'une sélection appropriée de sérums d'individus qui sont allergiques à la source de nouvelles protéines (dans les pays où la source est plus couramment consommée) ou à des sources de protéines phylogénétiquement proches. Les tests classiques de liaison des IgE (ELISA, immunoempreintes) doivent être complétés par des tests plus fonctionnels comme les tests d'activation des basophiles, les tests cutanés voire des TPO si ceux-ci sont éthiquement envisageables. En effet, la mise en évidence d'une liaison IgE n'implique pas forcément un risque élevé de réactivité clinique chez un individu et la démonstration d'une réactivité croisée IgE de faible affinité avec des allergènes connus n'implique pas forcément un risque majeur de réaction allergique. Ces approches permettent donc de caractériser de manière assez efficace le risque de réactivité croisée entre les nouvelles sources protéiques et les allergènes déjà connus.

Elles répondent donc à la question d'identifier les populations à risques, déjà sensibilisées à des allergènes alimentaires et chez qui il faudra faire de la prévention pour qu'ils essaient (ou non) de consommer ces nouveaux aliments en prenant les précautions adéquates en cas de risque de réaction allergique [176, 182].

Toutefois, ces approches ne répondent pas à la question du risque de néosensibilisation qui pourrait donner lieu à l'émergence de nouvelles allergies alimentaires quelques années après l'introduction de ces nouveaux aliments dans l'alimentation humaine. Certaines données de sensibilisation peuvent être acquises selon l'historique de l'utilisation et de l'exposition des populations qui consomment déjà ces nouvelles sources. Les usines où sont produits les nouveaux aliments peuvent également être une source d'information importante si des employés y ont développé des allergies professionnelles (le plus souvent à cause d'une sensibilisation par inhalation des protéines manufacturées) [182].

Malheureusement, lorsqu'aucune information n'est disponible, prédire le risque de sensibilisation aux nouvelles protéines alimentaires devient très compliqué et aucun test *in vitro* ou *in vivo* n'existe à l'heure actuelle pour prédire une sensibilisation *de novo*. Toutefois, les études de la voie des effets indésirables ont permis de mettre en lumière certains événements clés et des biomarqueurs (moléculaires et cellulaires) sur la sensibilisation et le déclenchement des allergies alimentaires [183]. Ainsi, des modèles animaux ont été développés pour étudier les mécanismes de développement d'une allergie alimentaire et ces modèles sont aussi utilisés pour comparer l'immunogénicité et l'allergénicité des protéines. Dans la suite du manuscrit, nous porterons un intérêt particulier aux modèles d'expérimentation animale (souris). Et parallèlement aux modèles animaux, de nombreux modèles cellulaires ont été développés et permettent de prédire des informations sur le potentiel allergénique alimentaire de nouvelles protéines, cela dans l'objectif de réduire, voire remplacer les méthodes actuelles d'expérimentation animale [175].

IV. Les modèles souris dans l'évaluation de l'allergénicité des protéines

Différentes espèces animales ont été utilisées pour la recherche sur les allergies alimentaires : la souris, le rat, le cobaye, le lapin, le chien et le porc [184]. Ce chapitre ne traitera que du modèle souris car c'est l'espèce la plus utilisée dans le domaine et celui qui a été développé au laboratoire. En effet, la souris présente de nombreux avantages : elle est de petite taille, facile à manipuler, moins coûteuse à entretenir, de cycle de reproduction court et le développement de la phase de sensibilisation et de la réaction allergique ressemble à celui observé chez l'humain. Un autre avantage est que de nombreuses études ont été réalisées avec le modèle souris et, par conséquent, de nombreuses informations sont déjà disponibles (fond génétique bien défini, disponibilité de souches naturelles et transgéniques bien caractérisées et accessibilité à de nombreux réactifs et outils pour l'analyse de la réponse immunitaire).

Comme pour les humains, il peut y avoir de fortes disparités entre les différentes souches de souris utilisées dans les modèles expérimentaux. Ainsi, Smit *et al.* ont rapporté que la souche BALB/c produit des concentrations d'IgE spécifiques particulièrement élevées par rapport aux souches C57BL/6 et C3H/HeOuj [185]. A l'inverse, ces 2 dernières souches développent des réponses allergiques significatives après un challenge oral alors qu'aucun symptôme n'est observé chez la souris BALB/c [186, 187]. Cette étude et celle de Berin *et al.* rapportent également que les niveaux de sécrétions de cytokines après réactivation *ex vivo* de splénocytes sont plus élevés chez les souris BALB/c sensibilisées par rapport aux souris C3H/HeOuj [186, 188]. La souche BALB/c apparaît donc comme un modèle plutôt intéressant pour étudier la phase de sensibilisation alors que la souche C3H serait plus reconnue pour étudier la phase de la réaction allergique [187-190]. Toutefois, tant de facteurs peuvent intervenir dans le développement d'un modèle expérimental qu'il est impossible de réduire l'utilisation d'une souche de souris à une seule application (**Figure 31**).

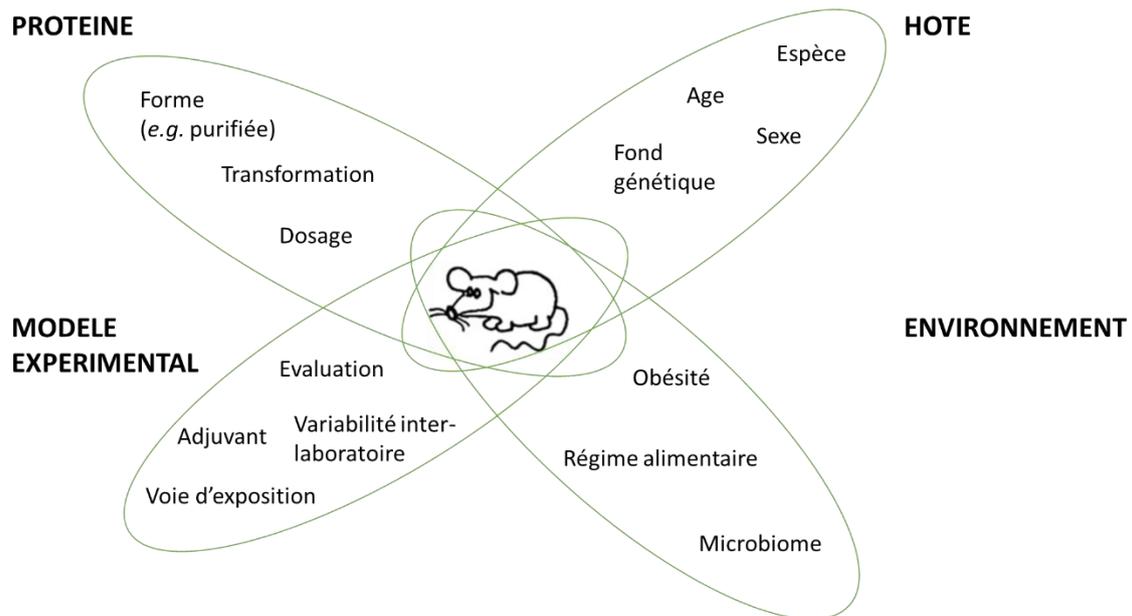


Figure 31. Principaux facteurs pouvant influencer la conception du modèle animal.
Adaptée de [191].

Plusieurs voies de sensibilisation peuvent également être envisagées et chacune d'elles vont influencer significativement sur le développement de la réponse immune.

La voie intrapéritonéale (i.p.) est une route systémique qui permet généralement d'induire de fortes réponses IgE contre les protéines injectées, en particulier lorsque des adjuvants comme l'alum ou l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) sont utilisés. Ainsi, beaucoup de modèles animaux utilisent la sensibilisation par voie i.p. en présence d'alum pour s'assurer d'un niveau de sensibilisation élevé. L'avantage de la voie i.p. est de pouvoir s'affranchir des mécanismes d'induction de la tolérance orale puisque les protéines testées n'entrent pas en contact avec la muqueuse gastrointestinale. Toutefois, cela peut aboutir à une surestimation de leur potentiel de sensibilisation puisque les protéines n'ont pas à passer l'étape de la digestion gastroduodénale et du passage de la barrière intestinale [182]. Plusieurs études ont utilisé cette voie de sensibilisation pour tenter de différencier les protéines allergéniques des protéines non allergéniques. Dearman et Kimber ont ainsi rapporté que l'injection i.p. (sans adjuvant) d'allergènes connus stimule la production d'IgE spécifiques alors que les protéines non allergéniques n'induisent que des réponses IgG [190, 192]. A l'inverse, cette voie d'administration n'a pas pu différencier les allergènes connus des protéines considérées comme non allergéniques lors d'une étude inter-laboratoires [193].

La voie orale (v.o.) est la route d'administration des antigènes alimentaires plus physiologique car elle permet de prendre en compte l'effet de la digestion et du passage de la barrière intestinale. Cette voie permet aussi de pouvoir étudier l'influence de la matrice alimentaire [194]. Toutefois, la réponse physiologique normalement induite après ingestion d'un aliment est la tolérance orale. Dans ces conditions, il devient alors nécessaire d'utiliser un adjuvant pour prévenir l'induction de cette tolérance orale et forcer le développement d'une réponse immune orientée vers le profil T_H2 . Dans ce cadre, l'adjuvant muqueux le plus souvent utilisé et le mieux caractérisé pour sensibiliser les animaux est la toxine cholérique (TC) produite par *Vibrio cholera*. La TC permet ainsi l'induction de facteurs de costimulation (activation et migration des cellules dendritiques CD11b), tout en orientant la réponse immunitaire vers la voie T_H2 [195, 196].

D'autres voies de sensibilisation existent, comme la voie nasale, la voie cutanée et sous-cutanée. Mais, à l'heure actuelle, les données de la littérature ne permettent pas d'établir la meilleure des voies pour l'évaluation du potentiel allergénique des protéines d'un aliment.

Différents modèles de sensibilisation chez la souris BALB/c ont été développés au sein du laboratoire [197, 198]. Ces différents modèles de sensibilisation aux protéines de l'arachide ou de lait de vache utilisent la voie i.p. (en présence d'alum ou d'AIF) ou orale (en présence de TC). C'est à partir de ces différents modèles que nous avons développé les modèles de sensibilisation aux protéines de GT.

E. Les objectifs de la thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans le projet PRODIAL (pour PROtéine, Digestion et ALLergie), dont l'objectif est d'évaluer le risque allergénique des protéines de graines d'oléoprotéagineux. Ce projet est soutenu par le Fonds d'Action Stratégique des Oléagineux-protéagineux (FASO) géré par la société de financement et de développement SOFIPROTEOL, filiale du groupe Avril. Il rassemble plusieurs partenaires, dont le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, CNRS), l'UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA, UMR INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay), l'UMR Biopolymères Interactions Assemblages (BIA, INRAE) et enfin l'UMR Médicaments et Technologie pour la Santé (MTS, UMR INRAE, CEA, Université Paris-Saclay) qui héberge en particulier le Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire (LI2A, INRAE), dont je fais partie.

Les études prospectives montrent que l'augmentation combinée de la population mondiale et du niveau de vie dans les pays émergents va rapidement et largement accroître la demande en protéines alimentaires. Cette demande ne pourra pas être complètement satisfaite, de façon durable, par une augmentation des productions animales. Les protéines végétales telles que le colza, le tournesol, le lin et le lupin sont donc des sources alternatives intéressantes pour répondre à ce besoin. L'évaluation des risques d'allergénicité induits par une plus forte exposition des populations à ces protéines d'oléoprotéagineux sont des éléments cruciaux à évaluer pour convaincre les parties prenantes de l'intérêt et de la sécurité d'utilisation de ces protéines dans l'alimentation humaine. Ces connaissances sont déterminantes afin de positionner ces protéines vis-à-vis des ressources végétales dominantes (blé, soja), ou d'autres en développement telles que les protéines d'insectes ou de microalgues dont les filières sont actuellement moins bien structurées.

Dans le cadre de mon projet de thèse, le projet PRODIAL doit plus précisément permettre d'évaluer de manière prospective le risque allergénique des protéines de tournesol. Afin de pouvoir comparer le potentiel allergénique de différentes familles protéiques présentes dans la GT, nous avons débuté l'étude en optimisant la purification des albumines 2S, particulièrement nombreuses dans cette plante, des nsLTP et des sous-unités de globulines 11S (Chapitre 1). En parallèle, nous avons développé différents modèles de sensibilisation expérimentale de la souris BALB/c aux protéines de GT (Chapitre 2). Ce développement nous a permis d'évaluer différentes voies d'administration associées à différents adjuvants et de tester l'impact du pressage mécanique et de la délipidation sur le potentiel de sensibilisation d'un extrait total de protéines de GT. La caractérisation fine du profil de sensibilisation des souris a ensuite permis d'identifier les protéines présentant le potentiel de sensibilisation le plus élevé chez l'animal (ce travail fait l'objet d'un manuscrit actuellement en cours d'évaluation au journal *Molecular Nutrition and Food Research*, présenté en annexe). Les outils mis en place pour cette étude ont ensuite permis de caractériser la spécificité des réponses IgE dans les sérums de patients espagnols allergiques aux protéines de GT, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Marta Reche Frutos (Chapitre 3). Finalement, nous avons testé la résistance des protéines de GT à la dégradation protéolytique dans un modèle de digestion *in vitro* et mesuré l'immunoréactivité résiduelle des digestas ainsi obtenus (Chapitre 4). Ces données sur la résistance des protéines de GT à la digestion ont ensuite été comparées à des études *in vivo* où une immunoréactivité liée à ces protéines a pu être détectée dans des prélèvements jéjunaux et iléaux réalisés chez des volontaires sains ayant consommé des biscuits enrichis en protéines de GT.

Chapitre 1 : De la graine de tournesol aux protéines purifiées

L'évaluation du potentiel allergénique des GT s'est notamment basée sur la caractérisation de l'immunoréactivité de leurs constituants protéiques les plus abondants. Outre la production d'extraits protéiques totaux, cet objectif a nécessité la purification de multiples représentants issus des albumines 2S, des globulines 11S et des nsLTP de tournesol.

Ces étapes préalables d'ordre biochimique ont alors constitué une grande partie de mon travail de thèse. Leurs déroulements se sont appuyés sur le développement de nombreuses méthodes de purification et de caractérisation. Elles ont ainsi fait appel à une diversité de techniques chromatographiques, électrophorétiques et de spectrométrie de masse (MS).

A. Extraction, purification et caractérisation des protéines de graines de tournesol

I. Matériels et méthodes

Les études ont été réalisées à partir d'amandes et d'écailles de GT fournies par OLEAD (Pessac, France), et produites en respectant une température de traitement inférieure à 60°C (un pressage à 55°C). Pour rappel, l'amande désigne la GT décortiquée. L'écaille désigne l'amande de GT mécaniquement délipidée.

Ces deux matrices présentent des proportions en protéines mais aussi en lipides très variables (**Tableau 5**). La présence parfois majoritaire de lipides qui peut fortement défavoriser l'extraction des protéines, a engendré une étape préalable de traitement de ces matrices. Cette dernière, qui repose sur l'extraction des lipides à l'aide de solvant, se rapproche ainsi d'un des processus industriels précédemment décrits. Elle a été initialisée sur la matrice « amande », qui présente le plus fort taux lipidique.

	Teneur en huile (% sur MTQ)	Teneur en protéine (% sur MTQ)
Amande	58,27	18,9
Ecaille	10,16	40,32

Tableau 5. Teneur en huile et protéine dans l'amande et l'écaille de tournesol. Les analyses ont été réalisées au laboratoire Terre Inovia. MTQ, matière telle quelle.

1. Extraction des protéines de graines de tournesol

a) Délipidation des amandes

10 g d'amandes de GT ont été broyés et mélangés progressivement à du n-hexane (50 mL) à l'aide d'un Ultra-Turrax (IKA® Ultra-Turrax® T18). L'ensemble a ensuite été centrifugé (3000 x g, 15 min, 4°C), et la phase organique éliminée. Les étapes d'ajout de n-hexane et de mélange sont répétées sur le culot de centrifugation. Après une nouvelle centrifugation, le second culot a été laissé sous sorbonne toute la nuit à température ambiante (TA) afin d'éliminer les résidus de n-hexane. Une fois séché, le broyat a été stocké à -20°C.

b) Mise au point d'une méthode d'extraction protéique.

L'objectif était de déterminer les conditions optimales pour l'extraction protéique et compatibles avec l'analyse de l'immunoréactivité des fractions obtenues. Les mises au point du protocole d'extraction incluant notamment la définition du pH du tampon utilisé, se sont appuyées sur les données de la littérature [32, 199] et l'expertise du laboratoire sur les protéines végétales. Différentes conditions d'extraction ont été testées avec pour objectif d'avoir une extraction efficace quantitativement (rendement d'extraction) et qualitativement (extraction représentative de l'ensemble des entités protéiques), tout en préservant une éventuelle immunoréactivité des protéines extraites (conditions relativement douces d'extraction).

Les conditions d'extraction évaluées diffèrent selon cinq paramètres : le pH et la composition du tampon d'extraction, la température et la durée d'extraction, ainsi que le rapport de la masse de matrice traitée sur le volume de tampon d'extraction. Suite à la phase d'extraction, les échantillons sont centrifugés et les surnageants prélevés sont dialysés avant analyse. Les concentrations protéiques ont été déterminées à l'aide d'une méthode colorimétrique (kit commercial BCA Pierce). La quantité protéique extraite a été estimée et comparée à celle théoriquement présente dans la masse traitée afin de déterminer un rendement d'extraction. Les profils protéiques des échantillons ont été analysés sur gel d'électrophorèse.

Dans un premier temps, l'impact du pH du tampon sur l'extraction protéique a été évalué. Une zone d'étude de pH de 7,4 à 10 a été définie en prenant en compte les caractéristiques physico-chimiques de différentes familles protéiques présentes, *i.e.* les globulines 11S et les albumines 2S. Lors de cette étape, les extractions ont été réalisées pendant 4 h sous agitation à TA, selon un ratio de 100 mg de broyat d'amandes délipidées pour 1 mL de tampon d'extraction

(rapport masse d'échantillon/volume d'extraction de 1/10). Six tampons d'extraction de pH compris entre 7,4 et 10 ont été testés. Les extraits ont été centrifugés (3000 x g, 15 min, 4°C) et les surnageants collectés pour analyse.

Dans un second temps, l'accroissement de la force ionique et l'addition de détergents et/ou d'agent chaotropique ont été testés en prenant comme référence un des tampons précédemment étudiés. Le détergent octyl- β -D- glucopyranoside préserve l'immunoréactivité des protéines et est compatible avec des analyses biochimiques et immunochimiques, notamment de type ELISA, utilisées pour l'analyse des extraits. De par ses caractéristiques (Concentration Micellaire Critique), ce détergent peut être éliminé par dialyse. Un second détergent, non dénaturant, d'ordre non ionique (tween), est également intervenu dans l'étude. Enfin, l'addition d'agent chaotropique (urée) a été évaluée.

A partir du tampon conférant le meilleur rendement, des extractions ont ensuite été menées en modifiant leurs durées mais aussi leurs conditions de température : 4°C, pendant 18 h ; 20°C pendant 30 min, 1 h, 2 h, et 4 h ; 40°C pendant 30 min, 1 h, 2 h, et 4 h. Enfin, différents ratios de masse d'amande délipidée sur le volume de tampon d'extraction ont été étudiés : 1/5 : 100 mg dans 500 μ l, 1/10 : 100 mg dans 1ml et 1/20 : 100 mg dans 2 ml. Ces études nous ont permis de définir les conditions optimales pour réaliser l'extraction nécessaire à la purification, la caractérisation des protéines et l'étude de leurs potentiels allergéniques.

2. Séparation des protéines de graines de tournesol par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Des précipitations ont été réalisées sur des extraits protéiques d'amande et d'écaille avec des concentrations croissances de sulfate d'ammonium : 20 %, 40 % et 60 %. Après agitation pendant 1 h à 4°C, les mélanges sont centrifugés (8000 x g, 30 min, 4°C) et les culots et surnageants collectés. Les culots sont repris en tampon phosphate de potassium 0,05 M, NaCl 0,5 M à pH 7,4 et les différentes fractions ont été dialysées à l'aide de membrane de porosité de 3,5 kDa. Après dosage protéique, ces différents dialysats sont analysés par chromatographie d'exclusion stérique et gel d'électrophorèse.

3. Fractionnement des protéines par combinaisons chromatographiques sur colonnes échangeuses d'ions et en phase inversée.

La séparation des fractions issues de la précipitation au sulfate d'ammonium a été poursuivie par des combinaisons de chromatographies échangeuses d'ions (IEC) et de chromatographie liquide à haute performance en phase inversée (RP-HPLC).

a) Séparation des protéines issues du surnageant de précipitation

Le fractionnement des protéines issues du surnageant de précipitation au sulfate d'ammonium a été poursuivi à l'aide d'un système chromatographique AKTA™ (Pharmacia) et d'une colonne échangeuse de cations. 4 M d'urée ont été ajoutés à un échantillon de surnageant dilué en tampon phosphate de sodium 0,02 M pH 7,4. Après filtration de l'échantillon (Millex® Syringe filters, 0,22 µm PES, Merck-Millipore), l'équivalent de 75 mg de protéines a été injecté sur une colonne Source 30S (Source 30S™ HR 10/16, GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon A (phosphate de sodium 20 mM pH 7,4). Après une étape de 8 min en tampon A, l'élution est réalisée selon un gradient de 0 à 25 % de tampon B (tampon A + NaCl 1 M) en 70 min à un débit de 4,0 mL/min. Le suivi de l'élution est effectué par mesure de l'absorbance à 220 nm, 230 nm et 280 nm.

La purification des différentes fractions protéiques obtenues sur système AKTA est achevée par chromatographie HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en phase inversée sur colonne Vydac C4 (214TP™, 300 Å, 10 x 250 mm) équilibrée en tampon A (H₂O/TFA 0,1 %). Les échantillons repris dans le tampon A sont élués à un débit de 2 mL/min dans des conditions de gradient dépendantes des caractéristiques protéiques de la fraction IEC injectée. Trois différents gradients linéaires ont été appliqués : de 10 à 60% B en 50 min, de 10 à 40 % B en 45 min et de 20 à 50 % B en 60 min (tampon B : acétonitrile (ACN)/TFA 0,04 %). Le suivi de l'élution se fait par mesure de l'absorbance à 220 nm, 230 nm et 280 nm. Les fractions collectées ont ensuite été lyophilisées.

b) Séparation des protéines issues du précipité

Une séparation intermédiaire par chromatographie d'échange d'anions a été réalisée à l'aide d'une colonne Source 30Q® (Source 30Q® HR10/10, GE Healthcare) et du système AKTA.

La colonne a été équilibrée avec du tampon A (tampon Tris 0,04 M, urée 4 M, dithiothréitol (DTT) 2 mM pH 8,0). 8 M d'urée et du β -mercaptoéthanol (1/100 V/V) ont été ajoutés à un aliquot de précipité dilué en Tampon A. Le mélange est incubé durant 60 min à 37°C, puis filtré (Millex® Syringe filters, 0,22 μ m, PES, Merck-Millipore) avant injection. L'élution a été réalisée selon un gradient linéaire de 0 à 50 % de tampon B (tampon A + 1 M NaCl) en 55 min et à un débit de 2,0 mL/min. Le suivi de l'élution se fait par mesure de l'absorbance à 230 nm et 280 nm.

Les fractions collectées ont été soumises à une purification par RP-HPLC dans des conditions analogues à celles appliquées pour le surnageant. Les seules modifications ont porté sur l'élution qui a été réalisée selon un gradient de 25 à 55 % de tampon B (ACN/TFA 0,04 %) en 60 min et à un débit de 2,0 mL/min. Les fractions collectées ont ensuite été lyophilisées.

4. Caractérisation des fractions protéiques isolées

a) Par chromatographie d'exclusion stérique

Cette analyse effectuée à l'aide du système AKTA a fait appel à une colonne Superdex200® HR 16/50 permettant de fractionner les protéines de masses moléculaires compris entre 10 000 Da et 600 000 Da (GE Healthcare). La colonne a été équilibrée dans du tampon A (borate de sodium 0,05 M, pH 9,0 + NaCl 0,4 M). Les extraits de GT étudiés ont été dilués dans le tampon A, puis filtrés (Millex® Syringe filters, 0,22 μ m, PES, Merck-Millipore) et injectés à raison de 1,5 à 3 mg de protéines par analyse. Les éluions ont été réalisées sur 1,5 volumes de colonne en tampon A selon un débit de 1 mL/min. Le suivi de l'élution se fait par mesure de l'absorbance à 230 nm et 280 nm. Les fractions ont été collectées et leurs contenus protéiques analysés (*e.g.* test BCA, SDS-PAGE). L'aldolase (\approx 158 000 Da, 1,2 mg/mL, GE Healthcare), l'albumine de sérum bovin (BSA, \approx 66 000 Da, 0,5 mg/mL, GE Healthcare), et la ribonucléase (\approx 13 700 Da, 0,5 mg/mL, GE Healthcare) ont été utilisées comme protéines étalons.

b) Par méthodes électrophorétiques

i. *Electrophorèse 1D*

Les analyses électrophorétiques 1D (SDS-PAGE) ont été réalisées sur des gels précoulés Bis-Tris 4-12 %, ou 12 % (NuPage™, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons ont été préparés selon la méthode de Laemmli [200], en conditions non réductrices et réductrices avec du DTT (Novex™ NuPAGE™, NP009). Les échantillons mélangés au DTT sont chauffés à 70°C pendant 10 min. Les extraits protéiques « totaux » de GT ont été déposés à raison de 10 µg/puits, tandis que les extraits purifiés de protéines de GT ont été analysés à raison de 0,5-3 µg/puits. Les migrations ont été réalisées en tampon MES (Novex™ BOLT™, NP0002) à 200V 120 mM pendant 35 – 40 min. Après lavage en eau distillée, les gels ont été colorés pendant 45 min à TA à l'aide du réactif Imperial™ (colorant à base de Coomassie, Thermo Fisher Scientific). Les gels ont été ensuite décolorés en eau sur toute la nuit à TA.

ii. *Electrophorèse 2D*

La première dimension est réalisée dans une cassette ZOOM™ selon les recommandations du fournisseur (ZOOM™ IPG Runner Mini-Cell, Thermo Fisher Scientific). Brièvement, les extraits de protéines ont été déposés à raison de 50 à 250 µg/bandelette (Zoom™ Bande IPG Novex™ pH 3 – 10 NL, Thermo Fisher Scientific), en présence de tampon de réhydratation (urée 8 M, ampholytes 3-10, CHAPS 2%, et de bleu de bromophénol 0,002 %). Après 18 h à TA, la migration des extraits protéiques a été menée à 500V 2W 5 mA pendant 4 h. Les bandelettes ont ensuite été équilibrées par trempage sous agitation dans deux bains différents : un bain réducteur (LDS (Novex™ NuPAGE™, NP0008) / DTT 10 min, 20°C), puis un bain alkylant (LDS / iodoacétamide (IAA) 0,125 M). Les bandelettes ont ensuite été rincées en tampon MES avant l'étape de séparation verticale (SDS-PAGE) dans des conditions identiques à celles précédemment décrites.

5. Identification des protéines purifiées

Ces caractérisations électrophorétiques ont été complétées par des approches de type protéomique. L'ensemble de ces analyses a été effectué à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (UltrafleXtreme™ MALDI TOF/TOF, Bruker Daltonics, GmbH).

a) Caractérisation des protéines natives par spectrométrie de masse

Une fraction lyophilisée de chaque protéine purifiée par RP-HPLC a été reprise dans un mélange d'eau et d'ACN en TFA 1 % selon un ratio 60/40 (% v/v). Une matrice d'acide sinapinique à 10 mg/mL repris dans un mélange d'eau, d'ACN en TFA 1% (ratio 60/40 (% v/v)) a été constituée. 1 µL d'échantillon et 1 µL de matrice sont déposés sur une plaque d'analyse (MTP 384 ground steel BC targets, Bruker Daltonics, GmbH). La calibration est réalisée à l'aide de standards externes commerciaux (Sequazyme™ Peptide Mass Standards kit, Applied Biosystems®, France). Après séchage des dépôts, l'analyse des spectres protéiques a été effectuée en mode linéaire.

b) Protéomique : procédures *sur gel* et « *in situ* »

i. *Digestion trypsique sur gel et analyse de la carte peptidique par spectrométrie de masse*

Les spots de protéines sont excisés du gel après la coloration à base de Coomassie R-250 (Imperial™, Thermo Fisher Scientific) et découpés en petits cubes. Les cubes sont nettoyés avec une solution d'ACN 50 % et bicarbonate d'ammonium 0,025 M pH 8,0 jusqu'à leur décoloration complète, puis déshydratés avec de l'ACN et séchés sous vide au SpeedVac. Une réduction a été effectuée dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,025 M pH 8 contenant 10 mM de DTT pendant 30 min à 56°C. Ils sont ensuite incubés dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,025 M pH 8 contenant 55 mM d'IAA pendant 1 h à 20°C et à l'abri de la lumière. Après ces étapes de réduction et de carbamidométhylation, les morceaux de gels sont lavés dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,025 M pH 8, déshydratés avec de l'acétonitrile et digérés par la trypsine (V5111, Promega) à 20 µg/mL pendant 18 h à 37°C. La matrice est constituée d'acide cyano-4-hydroxycinnamique à 10 mg/mL repris dans un mélange d'eau, d'ACN et TFA 1% avec un ratio 40/50/10 (% v/v/v). 1 µL de solution de digestion et 1 µL de matrice sont déposés dans un des puits d'une plaque en acier inoxydable (MTP AnchorChip Targets, Bruker Daltonics, GmbH). La calibration est réalisée à l'aide de standards externes commerciaux (Sequazyme™ Peptide Mass Standards kit, Applied Biosystems®, France). Après séchage des dépôts, l'analyse du spectre peptidique est réalisée par MS.

ii. *Digestion trypsique « en solution » et analyse de la carte peptidique par spectrométrie de masse*

La digestion enzymatique a également été effectuée plus directement sur les protéines purifiées sans étape préalable d'électrophorèse. Les digestions ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur (Pierce Trypsin Protease™, MS Grade, Thermo Fisher Scientific). Les fractions protéiques lyophilisées issues de la RP-HPLC ont été reprises dans une solution de tampon de bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0. Les échantillons ont été incubés dans une solution de DTT 0,02 M pendant 1 h à 60°C, puis avec du IAA 0,04 M pendant 30 min à 20°C et à l'abri de la lumière. Les protéines sont hydrolysées par la trypsine avec un ratio protéique de 1/20 (masse/masse) pendant 18 h à 37°C, sous agitation, puis séchées sous vide au SpeedVac. Les solutions de digestion ont été reprises dans une solution constituée d'eau, d'ACN et TFA 1% avec un ratio 60/40 (% v/v). Les analyses en MS ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites.

II. Résultats et discussion

1. Détermination des conditions optimales pour l'extraction protéique

Les études préliminaires d'extraction protéique ont été réalisées à partir de broyat d'amandes délipidées. L'influence de différents paramètres d'extraction sur les rendements et contenus protéiques a été évaluée par dosage BCA et par méthode électrophorétique.

Le dosage BCA effectué sur les surnageants d'extraction dialysés a permis d'estimer le rendement protéique en prenant en compte la quantité de protéines théoriquement présente dans les échantillons d'amandes délipidées (approximativement 38 % pour de la farine d'amandes après délipidation). Bien que cette référence quantitative soit toute relative, elle nous permet toutefois, de comparer les rendements protéiques estimés pour les différentes conditions d'extraction. Les résultats de l'étude sont exposés dans les **Tableau 6 à 8**.

Si une variation du pH (de 7,4 à 10) n'entraîne pas une augmentation de l'extractibilité des protéines, la composition du tampon à même pH pourrait influencer celle-ci. Le plus fort rendement d'extraction est alors obtenu avec le tampon constitué de borate de sodium 0,1 M pH 9 (**Tableau 6**).

Tableau 6. Evaluation du rendement d'extraction en fonction du pH et de la composition du tampon.

	Quantité extraite (mg)	Rendement %*
Phosphate 0,1 M pH 7,4	18	47
Tris 0,1 M pH 8	17	45
Carbonate ammonium 0,1 M pH 8,6	20	52
Carbonate de sodium 0,1 M pH 9	20	52
Carbonate de sodium 0,1 M pH 10	20	52
Borate de sodium 0,1 M pH 9	24	64

(*) Après prise en compte de la proportion théorique de protéines dans de l'amande délipidée (38 mg de protéines pour 100 mg d'amande délipidée).

Les analyses électrophorétiques obtenues avec les différents extraits montrent un profil similaire, indépendamment du tampon d'extraction (**Figure 32**). Dans des conditions non-réductrices, une diversité de bandes migrant entre 10 kDa et 110 kDa est observée. Après comparaison avec les travaux de Kortt *et al.*, Anisimova *et al.*, Gonzalez-Perez *et al.*, Molina *et al.*, Žilić *et al.* [12, 32, 40, 201-203], nous avons pu définir la présence des différents groupes protéiques, à savoir : les albumines 2S de masses moléculaires inférieures à 20 kDa et de multiples entités protéiques issues des globulines 11S migrant majoritairement à des masses supérieures à 50 kDa. Les profils observés en conditions réductrices diffèrent fortement de ceux obtenus en conditions non-réductrices. Plus particulièrement, les bandes protéiques de masses supérieures à 50 kDa disparaissent majoritairement, après réduction, au profit de nombreuses entités de masses moins élevées. Ce phénomène qui relève d'associations variées de sous-unités reliées par des ponts-disulfures, est une caractéristique des globulines 11S et notamment de celles retrouvées dans la GT [204, 205]. L'intensité des bandes apparaît conforme à la proportion des familles protéiques retrouvées dans la GT qui contient majoritairement des globulines 11S (nommées hélianthinines).

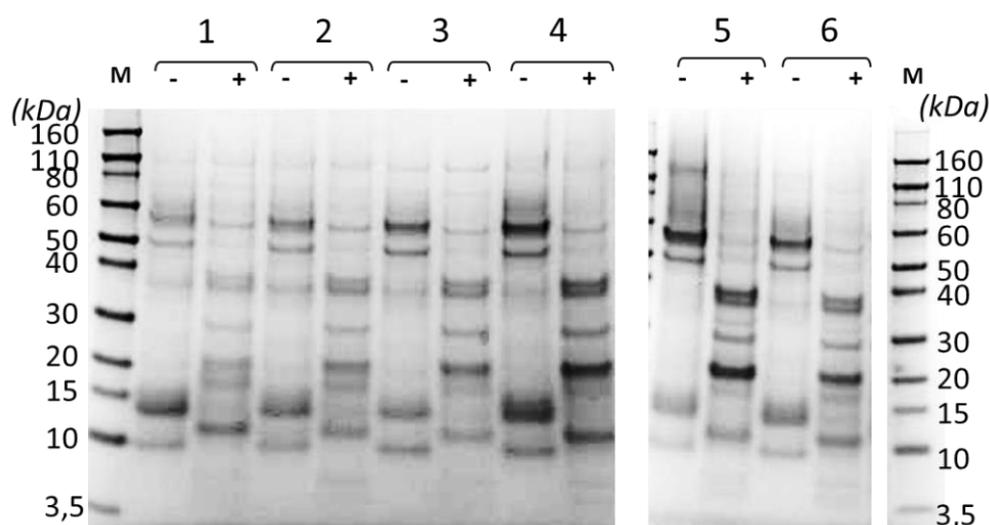


Figure 32. Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des extractions protéiques effectuées à différents pH.

Les extractions ont été réalisées en : tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (1) ; tris 0,1 M pH 8,0 (2) ; borate de sodium 0,1 M pH 9,0 (3) ; carbonate de sodium 0,1 M pH 9,0 (4) ; carbonate de sodium 0,1 M pH 10 (5) ; carbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,6 (6). M, marqueurs de masses moléculaires.

L'addition simultanée de sels et du détergent octyl- β -D-glucopyranoside permet d'augmenter le rendement qui reste toutefois inférieur à celui estimé avec la présence d'agent chaotrope dans le tampon (**Tableau 7**).

Tableau 7. Analyse de l'influence du sel, détergent et agent chaotrope sur le rendement d'extraction protéique

	Quantité extraite (mg)	Rendement %*
Borate 0,1 M pH 9	25	66
Borate 0,1 M pH 9 + NaCl 0,5 M	25	66
Borate 0,1 M pH 9 + NaCl 0,5 M + Tween 1%	25	66
Borate 0,1 M pH 9 + NaCl 0,5 M + octyl-β-D-glucopyranoside 0,9 %	28	74
Borate 0,1 M pH 9 + NaCl 0,5 M + octyl-β-D-glucopyranoside 0,9 % + urée 4 M	31	83

(*) Après prise en compte de la proportion théorique de protéines dans de l'amande délipidée (38 mg de protéines pour 100 mg d'amande délipidée).

L'addition de sels, de détergent et/ou d'agent chaotropique dans le tampon d'extraction ne modifie pas le profil électrophorétique obtenu en conditions réductrices (**Figure 33**).

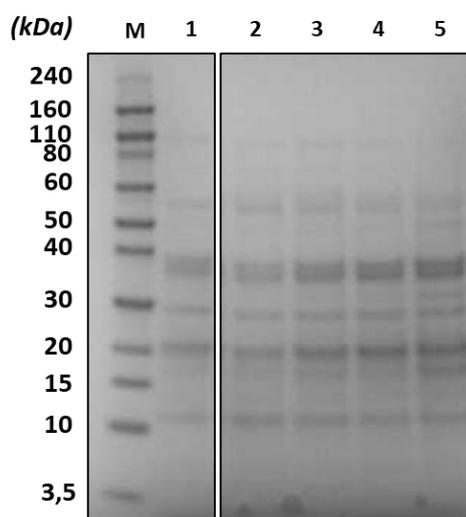


Figure 33. Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des extraits protéiques issus des différentes extractions.

Les extractions ont été réalisées : tampon borate 0,1 M pH 9 (1) ; tampon borate 0,1 M pH 9 NaCl 0,5 M (2) ; tampon borate 0,1 M pH 9 NaCl 0,5 M Tween 1% (3) ; tampon borate 0,1 M pH 9 NaCl 0,5 M octyl- β -D-glucopyranoside 0,9% (4) ; tampon borate 0,1 M pH 9 NaCl 0,5 M octyl- β -D-glucopyranoside 0,9% urée 4 M (5). M, marqueurs de masses moléculaires.

L'augmentation de la température et le prolongement de la durée de l'extraction n'ont que peu d'impact sur le rendement protéique. A l'inverse, le rendement protéique augmente considérablement lorsque le rapport masse d'amande délipidée traitée/volume de tampon d'extraction diminue (**Tableau 8**). Cette augmentation de rendement n'entraîne pas de modification du profil électrophorétique.

Tableau 8. Analyse de l'influence du rapport masse traitée/volume tampon sur le rendement d'extraction protéique.

	Quantité extraite (mg)	Rendement % *
1/5 (100 mg/500 μ L)	20	53
1/10 (100 mg/1 mL)	33	87
1/20 (100 mg/2 mL)	37	98

(*) Après prise en compte de la proportion théorique de protéines dans de l'amande délipidée (38 mg de protéines pour 100 mg d'amande délipidée).

Ces études préalables nous ont permis de définir les paramètres d'extraction protéique : une extraction en tampon borate 0,1 M pH 9, 0,5 M de NaCl, 0,9 % de octyl- β -D-glucopyranoside pendant 4 h à TA selon un ratio de masse traitée sur volume de tampon d'extraction de 1/20.

Ces conditions ont été appliquées pour l'extraction de 10 g d'amande et d'écaïlle afin d'en isoler leurs représentants protéiques majeurs. L'analyse électrophorétique des extraits d'écaïlle et d'amande a été menée par une technique en 2D afin de discerner d'éventuelles différences entre les deux extraits. Les deux extraits montrent un contenu protéique similaire (**Figure 34**). Les gels illustrent la grande diversité de protéines contenues dans les GT. En effet, nous pouvons observer une multitude de spots correspondant à des protéines et des sous-unités protéiques de masses moléculaires variées, de 3 kDa à 65 kDa pour des pI majoritairement compris entre 4 et 9.

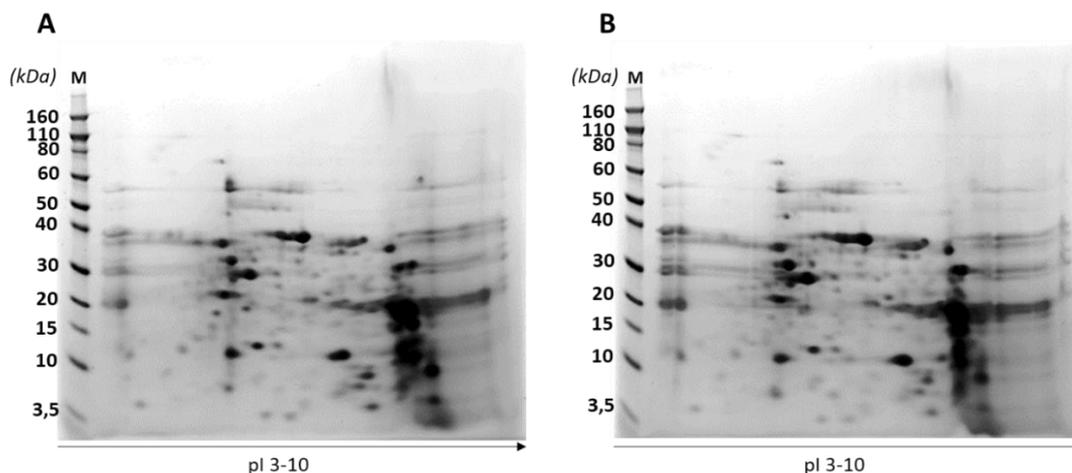


Figure 34. Electrophorèses bidimensionnelles d'extraits protéiques. Extraits protéiques d'amandes (A), et d'écaïlles (B). M, marqueurs de poids moléculaires.

2. Fractionnement des familles majoritaires de la graine de tournesol par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium a été effectuée sur ces mêmes extraits. Le ratio du contenu protéique précipité/surnageant augmente graduellement en fonction de la concentration de sulfate d'ammonium utilisée pour la précipitation (de 20 % à 60 %). À 60 % de sulfate d'ammonium, la très grande majorité des protéines a alors précipité. L'analyse électrophorétique des différents culots et surnageants démontre également une évolution des

profils protéiques des deux phases en fonction de la concentration utilisée en sulfate d'ammonium (**Figure 35**). Son augmentation de 0 % à 40 % entraîne progressivement la seule précipitation des protéines de masse moléculaire supérieure à 30 kDa (**Figure 35A**). La précipitation en présence de 40 % de sulfate d'ammonium apparaît alors optimale pour séparer les différentes familles protéiques de GT : le surnageant (S40) comporte majoritairement des bandes protéiques migrant à des masses inférieures à 20 kDa (**Figure 35A**) pouvant notamment correspondre aux albumines 2S [12, 31, 40].

De façon complémentaire, des représentants des hélianthinines sont principalement retrouvés dans la fraction précipitée à 40 % de sulfate d'ammonium (P40). La majorité des protéines de cette fraction migrant à des masses supérieures ou égales à 50 kDa (**Figure 35A**) se retrouvent dissociées après réduction (**Figure 35B**). Dans des conditions réductrices, les bandes migrant entre 20 kDa et 40 kDa correspondraient aux différentes sous-unités des globulines 11S (hélianthinines) [12, 199, 201, 204, 205]. Par ailleurs, des représentants des hélianthinines seraient retrouvés à des masses supérieures à 50 kDa y compris en conditions réductrices [12, 205, 206].

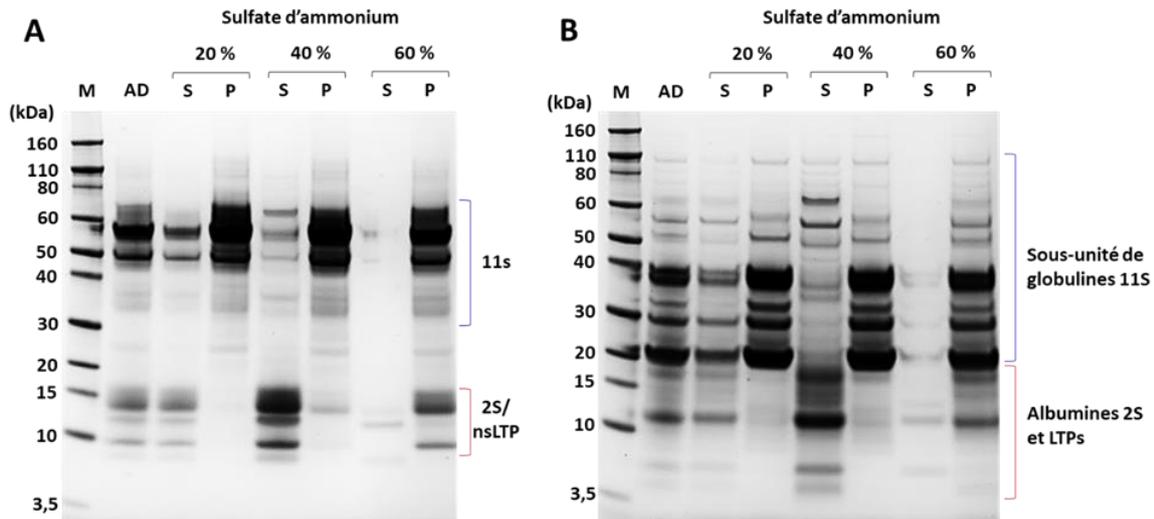


Figure 35. Analyse électrophorétique des extraits protéiques issus de la précipitation à 20 %, 40 % et 60 % de sulfate d'ammonium.

Analyse électrophorétique des extraits protéiques en conditions non réductrices (A) et réductrices (B). M, marqueurs de masses moléculaires ; S, surnageant ; P, précipité ; et AD, extrait d'amande délipidée.

Ces différences de contenu protéique observées pour les fractions S40 et P40 sont confirmées lors de l'analyse électrophorétique 2D (**Figure 36**). Le profil de la fraction précipitée P40 montre la présence de protéines de masses moléculaires supérieures à 20 kDa, dont les valeurs de pI, très hétérogènes, sont comprises entre 5 et 9. La majorité des spots pourrait correspondre à des sous-unités acides et basiques des globulines 11S (**Figure 36A**). A l'inverse, l'extrait protéique de la fraction soluble montre principalement la présence de spots protéiques de bases masses moléculaires (3-20 kDa), dont les valeurs de pI sont essentiellement basiques (**Figure 36B**).

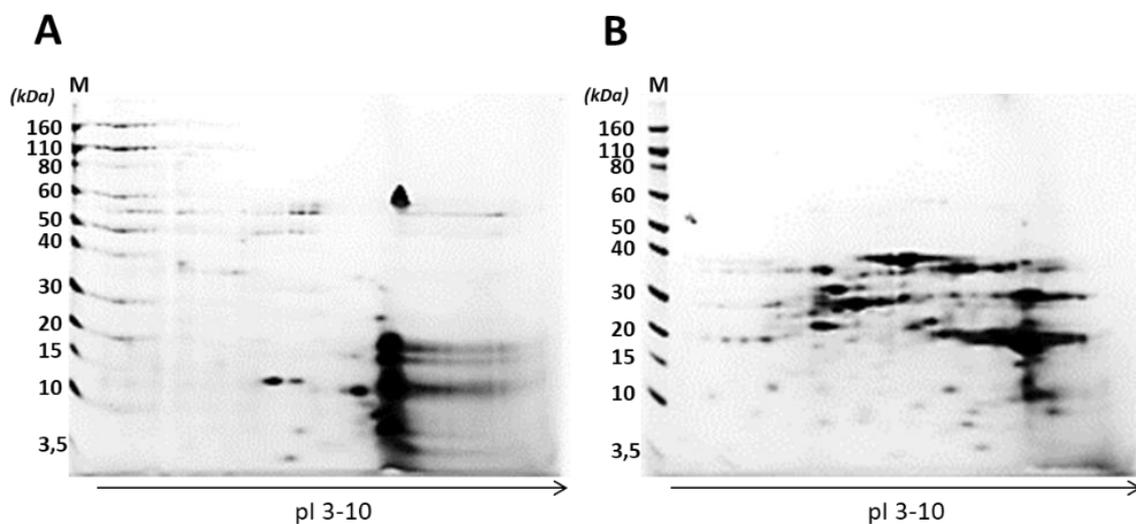


Figure 36. Electrophorèse bidimensionnelle d'extraits protéiques issus de la précipitation à 40 % de sulfate d'ammonium.

Extraits protéiques du surnageant, S40 (A) et du précipité, P40 (B) issus de la précipitation à 40 % de sulfate d'ammonium. M, marqueurs de masses moléculaires.

La caractérisation de ces différentes fractions protéiques S40 et P40 a été complétée par chromatographie d'exclusion stérique effectuée dans des conditions non dénaturantes. Leurs profils chromatographiques s'avèrent être très différents (**Figure 37B**). La fraction P40 présente un pic majeur constitué de protéines de masse moléculaire supérieure à celle de l'aldolase (158 kDa) utilisée comme étalon (**Figure 37A**). Ce profil chromatographique obtenu en conditions non dénaturantes corrobore les données des analyses électrophorétiques. Il suggère, pour cette fraction, l'existence de sous-unités des hélianthinines qui sont associées pour générer des structures polymériques de masse moléculaire importante, phénomène caractéristique des globulines 11S [201]. De façon complémentaire, le chromatogramme de la fraction S40, plus

hétérogène, est caractérisé par deux pics majeurs constitués de protéines de masses moléculaires inférieures à 20 kDa. En correspondance avec les analyses électrophorétiques et les données de la littérature, une diversité de protéines comprenant notamment des albumines 2S et nsLTP pourrait constituer la fraction S40 [12, 41, 42].

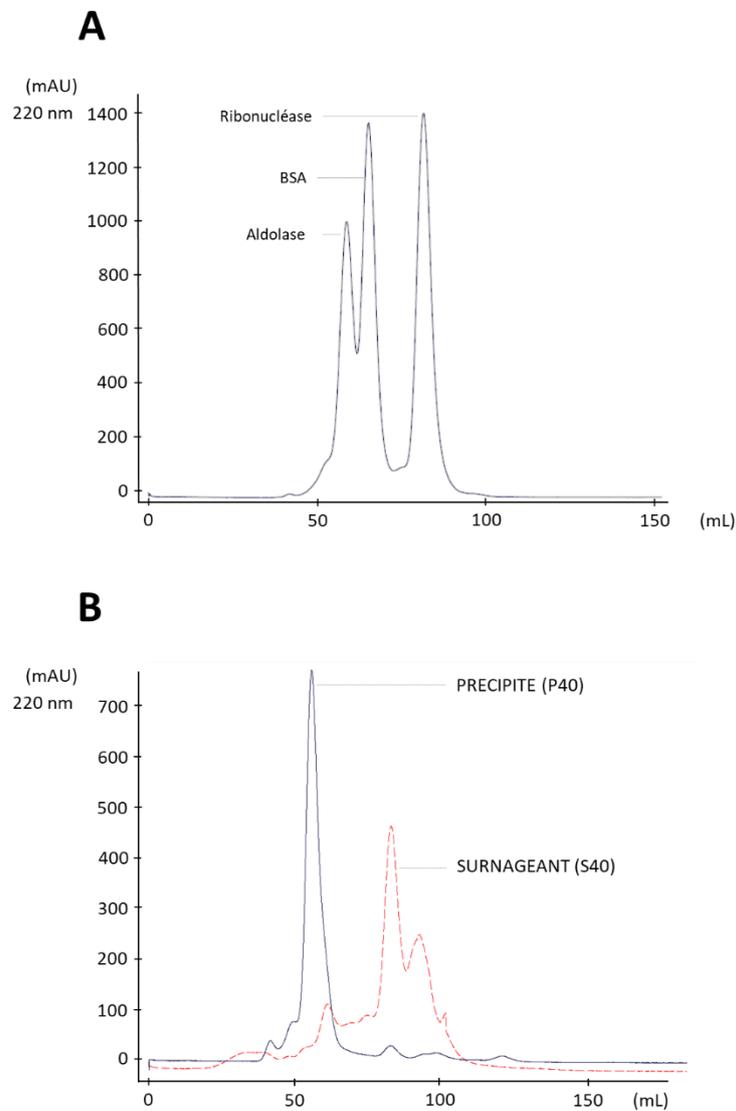


Figure 37. Chromatographie d'exclusion stérique en conditions non dénaturantes. Chromatogramme des étalons (A) et des fractions (S40 et P40) issues de la précipitation à 40 % de sulfate d'ammonium (B).

3. Purification et caractérisation des protéines de graines de tournesol

a) Purification des albumines 2S et des nsLTP

La fraction S40 a été analysée selon une seconde méthode chromatographique plus résolutive, en RP-HPLC. Cette approche a pour objectifs d'évaluer l'hétérogénéité protéique de cette fraction et de conduire à une première caractérisation des protéines ainsi séparées.

Notre profil chromatographique (**Figure 38**) offre de forts points communs avec les données de la littérature.

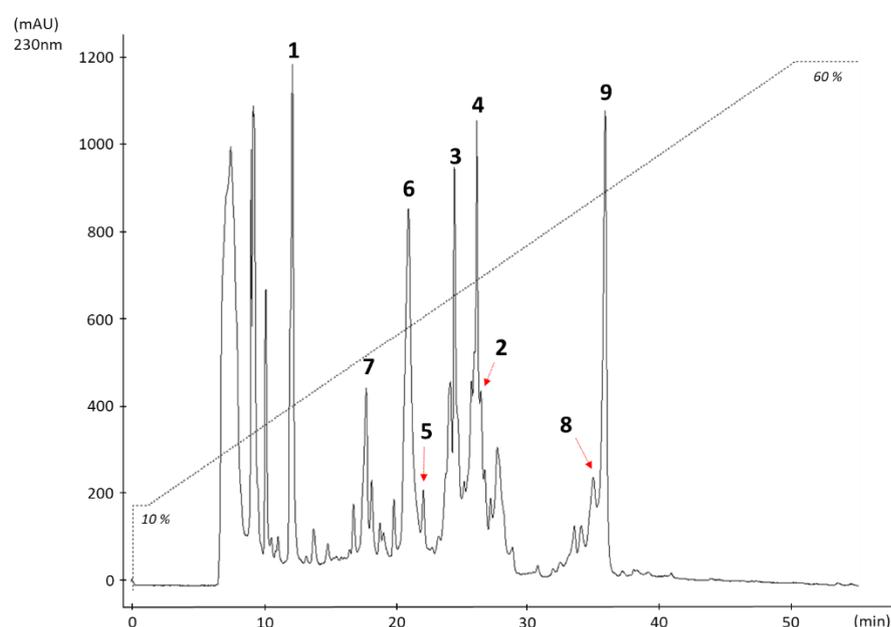


Figure 38. Chromatogramme de la fraction protéique S40 par RP-HPLC.

Cette étude comparative suggère que le pic isolé présentant le temps de rétention le plus fort (pic 9) correspondrait à l'élution d'une des albumines 2S les plus abondantes, SFA-8 (ou SESA3). La fraction voisine (pic 8) pourrait comprendre des isoformes de cette albumine 2S [42]. Par ailleurs, un groupe de pics et d'épaulements ayant des temps de rétentions intermédiaires entre 20 et 30 min (pics 2 à 4) contiendrait une diversité d'albumines 2S [31, 32, 42, 207].

L'analyse par spectrométrie de masse des fractions collectées conforte ces hypothèses (**Tableau 9**). L'identification de SFA-8 et de ses isoformes dans les pics respectifs 9 et 8 se trouve ainsi étayée par les masses observées. Par ailleurs, les pics 2 à 4 contiennent des protéines

dont les masses théoriques et/ou mesurées par Franke *et al.* peuvent être attribuées à SESA20-2, SESA2-2, SESA2-1, et SESA1-2 [42]. La masse associée au pic 7 pourrait être attribuée à un fragment de SESA21-2, dont la phase ouverte de traduction (ORF, *open reading frame*) n'est que partiellement identifiée [43]. Enfin, l'analyse par MS suggère que le pic 6 de notre séparation chromatographique pourrait comprendre une nsLTP en accord avec l'étude de Berecz *et al.* [41]. Toutefois, la masse mesurée dans notre fraction se rapproche plus de celle théorique estimée pour la nsLTP Hel a 3 (9,278 *versus* 9,277 kDa) que de celle observée par Berecz *et al.* et attribuée à une autre nsLTP, SDI-9 (référence Expasy : Q39950 – 8,984 kDa).

Tableau 9. Première identification des protéines majoritaires issues des fractions 1-9 de la RP-HPLC par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

Fractions collectées	Masses observées (en kDa)	Masses théoriques* ou observées par Franke <i>et al.</i> (en kDa)**	Identités possibles*
1	5,420	ND	ND
2	15,059	15,065**	SESA20-2
	15,287	15,292**	SESA2-2
3	13,612 + 13,712	13,616 + 13,717** (isoformes)	SESA2-1 (I, II)
	15,778	15,765 (P15461)*	SESA1-2
4	15,061	15,065**	SESA20-2
	15,288	15,292**	SESA2-2
5	9,274	9,278 (P82007)*	Hel a 3
	12,808	nd	nd
6	9,277	9,278 (P82007) *	Hel a 3
7	9,951	11,959 (Q8RW54)*	SESA21-2 (fragment)***
8	12,169	12,163**	SESA3c
	12,237	12,234**	SESA3b (I)
	12,249	12,249**	SESA3b (II)
9	12,146	12,147**	SFA-8 (SESA3)

(*) référence Expasy ; (**) d'après Franke *et al.*[42] ; (***) d'après Jayasena *et al.* [43] ; (nd) : non identifié.

La diversité des masses retrouvées dans certaines fractions reflète l'existence d'une multitude de protéines et notamment d'albumines 2S dans les fractions étudiées. Les profils électrophorétiques des différentes fractions corroborent une telle hétérogénéité. Ainsi si l'étude électrophorétique décrit la présence majoritaire d'une protéine dans certains pics (6 et 9), une multiplicité de bandes protéiques est observée dans les autres fractions (**Figure 39**).

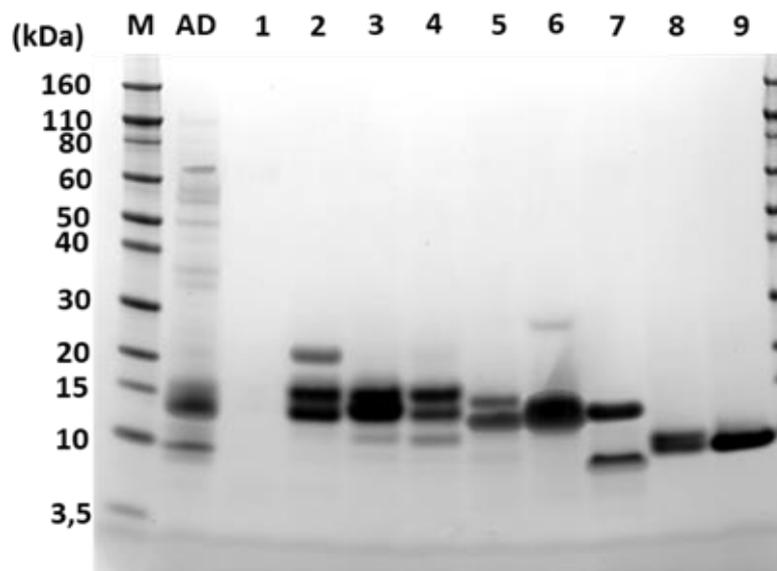


Figure 39. Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des fractions protéiques issues de la RP-HPLC.

M, marqueurs de masses moléculaire ; AD, extrait amande délipidée.

La très grande diversité protéique de la fraction S40 complexifie la séparation par le seul mode chromatographique en phase inversée, en dépit d'une éventuelle amélioration de sa résolution par des modifications de gradient, de changement de colonne ou des milieux chromatographiques. L'objectif a alors été de développer un mode chromatographique qui précéderait la purification par RP-HPLC.

Compte tenu des points isoélectriques basiques des protéines du S40 évalués lors des analyses électrophorétiques, le choix s'est porté sur une chromatographie échangeuse de cations. Les conditions chromatographiques ont été définies lors de tests initialement menés sur une colonne analytique (Mini S® 4,6/50 PE, GE Healthcare) en faisant varier le pH de travail de 5 à 7,4. La plus forte résolution était obtenue à l'aide de tampons chromatographiques constitués de 20 mM de phosphate de sodium pH 7,0 et d'une élution par un gradient de NaCl.

Ces conditions ont été adaptées à un mode chromatographique « semi préparatif » qui a permis de séparer des quantités protéiques significatives (75 mg d'extrait protéique issu du S40) après de multiples injections.

L'hétérogénéité du profil chromatographique nous a conduit à collecter 8 fractions distinctes, incluant notamment une partie protéique non retenue sur la colonne (Fraction A de la **Figure 40**) et des pics éluant tardivement à 100 % B (Fraction H de la **Figure 40**).

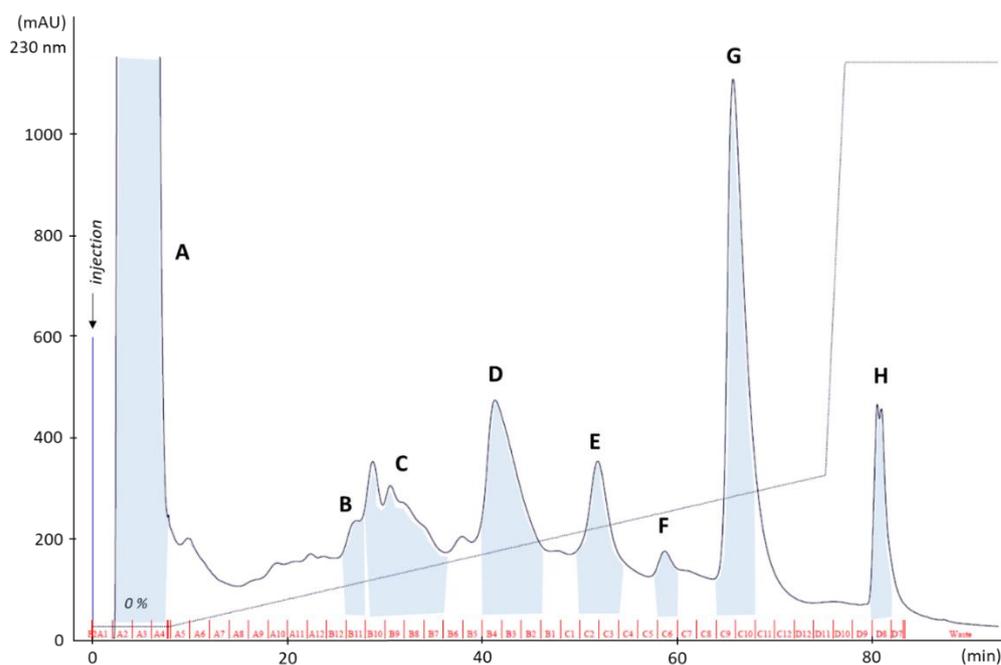
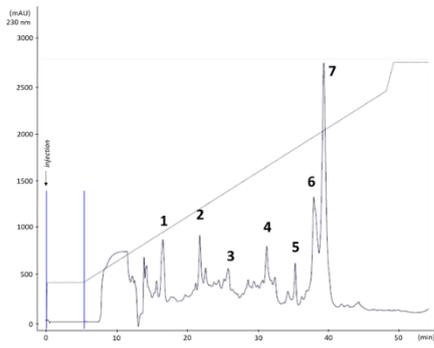


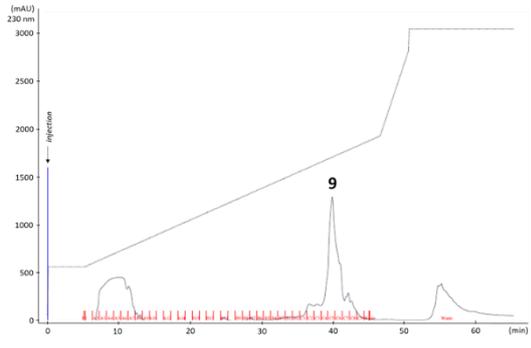
Figure 40. Chromatogramme « type » de l'extrait S40 sur colonne échangeuse de cations. Les fractions A à H apparaissant en gris ont été conservées pour purification supplémentaire.

La séparation des fractions protéiques issues de l'IEC a été finalisée par RP-HPLC selon des conditions décrites dans la partie « Matériels et Méthodes » (A. I. 3. a.). Le gradient a toutefois varié en fonction de la fractions IEC. La majorité de ces fractions présentaient en RP-HPLC un pic majeur souvent accompagné d'épaulements et/ou de pics mineurs (**Figure 41** et **42**). Seul le chromatogramme RP-HPLC de la fraction A « non retenue » en IEC apparaissait plus complexe avec une diversité de pics. Cependant, pour celui-ci, les éluions tardives des pics majeurs 6 et 7 étaient similaires à celles obtenues avec SFA-8 et ses isoformes lors de la première analyse RP-HPLC (**Figure 41**, IEC/A *versus* **Figure 38**).

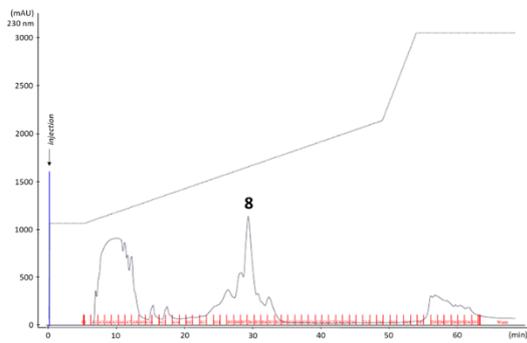
Fraction IEC/A



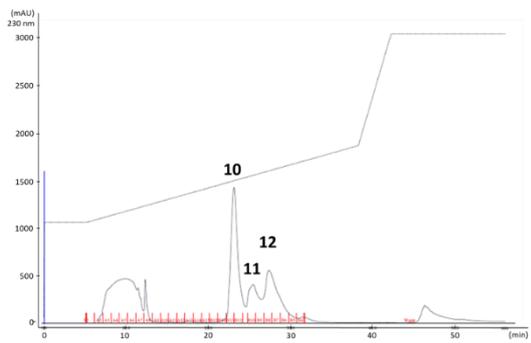
Fraction IEC/C



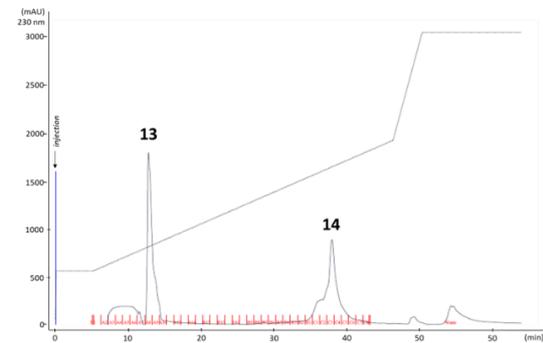
Fraction IEC/B



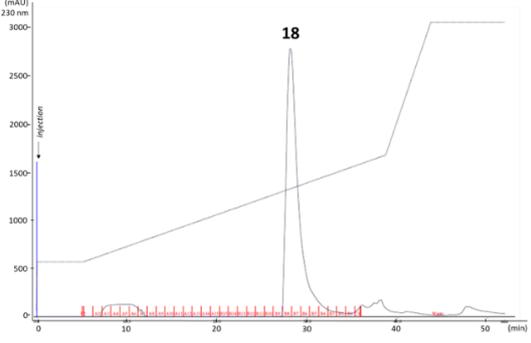
Fraction IEC/D



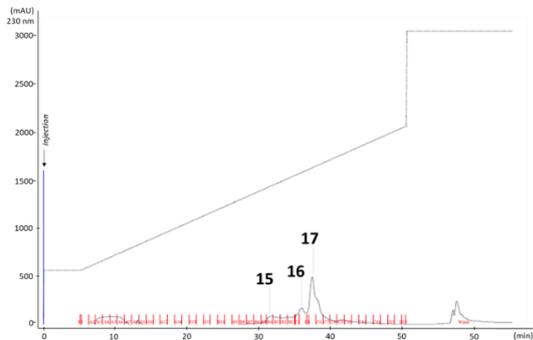
Fraction IEC/E



Fraction IEC/G



Fraction IEC/F



Fraction IEC/H

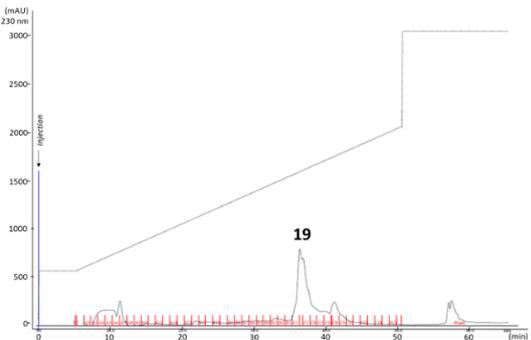


Figure 41. Chromatogrammes RP-HPLC des protéines du S40 issues d'une purification intermédiaire

Purification intermédiaire par IEC. 19 fractions de protéines ont été retenues (1-19).

13 des 19 fractions protéiques collectées (**Figure 41**) qui présentaient des critères de pureté et de quantité supérieur à 1 mg de protéines, ont été conservées pour des analyses ultérieures. En effet, le profil électrophorétique de chacune des fractions sélectionnées démontre la présence, sinon unique, au moins majoritaire d'une bande protéique dans des conditions non-réductrices (**Figure 42**).

Après réduction, le profil des fractions A/6 et E/14 est fortement modifié avec l'apparition de bandes supplémentaires, soulignant ainsi l'existence de structures polymériques associées par des ponts disulfures. L'ensemble des fractions analysées présente des protéines migrant à des masses inférieures à 20 kDa à l'exception de la fraction 13 qui comprend des entités de hautes masses moléculaires (supérieures à 50 kDa).

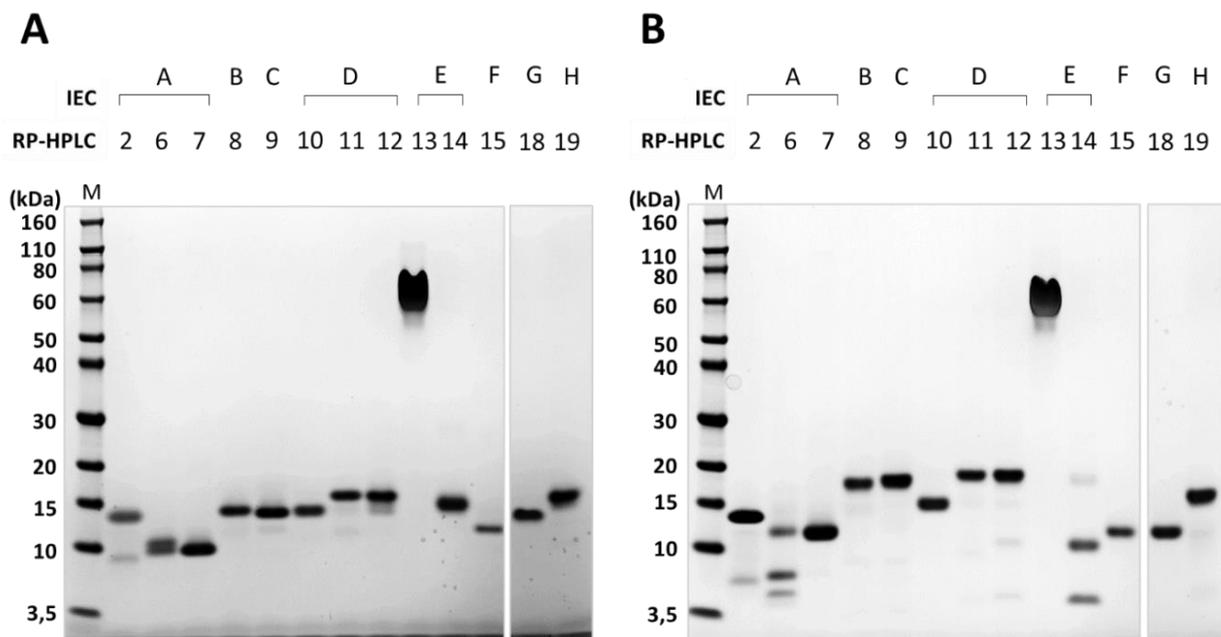


Figure 42. Analyse électrophorétique d'une sélection de protéines purifiées issues du S40. *Analyse électrophorétique en conditions non réductrices (A) et réductrices (B) d'une sélection de protéines du S40 purifiées par combinaison de chromatographies d'échange de cations et de RP-HPLC. M, marqueurs de masses moléculaires.*

La caractérisation de chacune de ces fractions a été poursuivie par une approche de protéomique à l'aide des profils électrophorétiques obtenus dans des conditions non-réductrices. Cette méthode a permis de déterminer la présence de certaines albumines 2S SESA1-2, SESA2-1 et SESA20-2 dans des fractions purifiées sans toutefois identifier l'intégralité des protéines dans les bandes électrophorétiques étudiées. L'approche de protéolyse trypsique et de caractérisation des peptides résultants par MS a été répétée, et ce, directement sur les fractions purifiées en solution (approche dite « *in situ* » sans étape électrophorétique). Au préalable, la masse des protéines natives purifiées a également été déterminée. L'ensemble de ces données nous a permis d'identifier une multitude d'albumines 2S et de nsLTP dans les fractions purifiées (**Tableau 10**).

Ainsi les albumines, SESA1-2, SESA2-1, SESA2-2, SFA-8 (ou SESA3), SESA3c (isoforme de SFA-8) et SESA20-2 ont été retrouvées dans des fractions pures avec des recouvrements de séquences de 50 à 94 % et des masses observées des protéines natives très proches de celles théoriques (et/ou mesurées lors d'études précédentes). Par ailleurs, une seule identité a été attribuée à la fraction A/6 (SFA-8c) en dépit de l'existence de plusieurs entités observées lors des analyses électrophorétiques en conditions réductrices (**Figure 42**). L'existence conjointe d'isoformes d'une même albumine 2S ayant subi ou non un processus hydrolytique est un phénomène déjà décrit pour des albumines d'autres sources végétales [208]. L'existence d'isoformes est également retrouvée dans la fraction D/10 où les deux masses mesurées, distinctes de 100 Da, correspondent à SESA2-1 (I) et SESA2-1 (II) (respectivement 13,616 kDa et 13,717 kDa). Cette différence de masse moléculaire correspond à l'ajout d'un résidu thréonine en C-terminal [42].

D'autres albumines 2S décrites par Jayasena *et al.* ont pu être également retrouvées dans nos fractions [43]. Il s'agit de SESA21-2 (fraction A/2), SESA1-1 (fractions D/12 et E/14) et SESA4-1 (fraction H/19). Leurs identifications (effectuées par protéolyse « *in situ* ») peuvent être parfois rendues complexes par la présence simultanée de différentes albumines 2S (fraction D/12) et par l'ambiguïté des masses observées pour des protéines natives (fraction E/14). L'analyse par MS de la fraction E/14 indique après trypsinolyse, la présence de peptides correspondant à SESA1-1 et de SESA 1-2. Cependant, les masses observées sur les protéines natives ne correspondent à aucune de ces albumines suggérant l'existence d'isoformes particulières constituées d'associations de sous-unités reliées par des ponts-disulfures conformément à l'image électrophorèse (**Figure 42**). L'identification de ces sous-unités reste à préciser en renouvelant une approche de protéomique sur gel.

Par ailleurs, nous avons également pu identifier différentes nsLTP. Hel a 3 (9,278 kDa) (Fraction G/18) qui a fait l'objet de nombreux travaux mais aussi une seconde nsLTP (fraction F/15), dont la masse et la séquence sont très proches de la référence Expasy (A0A251SK36 - 9,423). Il est à noter que ces deux protéines présentent de fortes homologues de séquences (68 %). Enfin, quelques peptides retrouvés dans la fraction 13 hydrolysée ont pu être attribués à des sous-unités acides et basique des globulines 11S.

Tableau 10. Identification des protéines de GT purifiées par combinaison de chromatographies échangeuse de cations et de RP-HPLC.

Fraction IEC/RP-HPLC	Protéine (référence Expasy)	Masses selon ** (en kDa)	Masses observées (en kDa)	Séquences des peptides tryptiques déterminés par spectrométrie de masse	Recouvrement (%) ***
A/2	SESA21-2 (Q8RW54)	15,109	9,949	DRPFGTGSQQCR ; ETEIR ; RPVGECRR ; RFVEQQMQQSPR ; RVMRQPQQQQQRR ; GQFGGQEMETARR	51
A/6	SFA-8c (P23110) (a)	12,164	12.164	TESGICYQQMEEAEMLNHCG MYLMK ; NLGER ; SQVSPR ; MREEDHK	41
A/7*	SFA-8 (P23110)	12,147	12.148	TESGICYQQMEEAEMLNHCG MYLMK ; NLGER ; SQVSPR ; MREEDHK ; QLCCMQLK ; MREEDHKQLCCMQLKNLDE K ; CMCPAIMMMLNPEMWIRM ; DQVMSMAHNLPIECNLMSQP CQM	94
B/8*	SESA20-2 (A0A161CT49)	15,065	15.063	IDIPFR ; DRPFGTGSQQCR ; ETEIQRPVSSQCQR ; RPGQQQPEPELQCCNELQN VK ; ECQCEAVQEVAR ; QPQQHQQQR ; GQFGGQEMDIAR	69
C/9	SESA2-2 (Q8GUD8)	15,289	15,291	IDIPFR ; DRPFGR ; SQQCSETEIQR SQQCSETEIQRPVSSQCQR ; RPGQQQPEPELQCCNQLQN VNR ; ECQCEAVQEVAR ; QPQQHQQQR ; GQFGGQEMDIAR ; RVIQNLPNQCDLEVQQCNIPY	83
D/10*	SESA2-1 (Q8GUD8)	13,616 (I) 13,717 (II)	13,614 13,715	PLSEQR ; QCSQQVQGQR ; LNQCR ; MFLQQGQR ; EAQQVQQQQGR ; QSVFPR ; SSQQTQQLK ; AQILPNVCNLQSR	60

(*) protéines sélectionnées pour les études d'immunoréactivité ; (**) d'après la masse observée par Franke *et al.* [42] ou la masse théorique (Expasy) ; (***) % de la séquence protéique recouverte par les peptides identifiés en spectrométrie de masse.

Tableau 10 (suite). Identification des protéines de GT purifiées par combinaison de chromatographies échangeuse de cation et de RP-HPLC.

Fraction IEC/RP-HPLC	Protéine (référence Expasy)	Masses selon ** (en kDa)	Masses observées (en kDa)	Séquences des peptides tryptiques déterminés par spectrométrie de masse	Recouvrement (%) ***
D/11*	SESA1-2 (P15461)	15,765	15,782	IDIPFR ; DRPFGTGSQQCR ; ETEIQRPVGECQR ; FVEQQMQQSPR ; STRPYQQR ; PGQQQQQQR ; GLQQQCCNELQNVK ; ECHCEAIQEVAR ; QPQQQQQQR ; GQFGGQEMETAR	80
D/12	SESA1-2 (P15461)	15,765	15,791	IDIPFR ; DRPFGTGSQQCR ; ETEIQRPVGECQR ; FVEQQMQQSPR ; STRPYQQR ; PGQQQQQQR ; ECHCEAIQEVAR ; QPQQQQQQR ; GQFGGQEMETAR	70
	SESA1-1 (P15461)	14,315	14,356	PISGQR ; IQGQR ; MFLQQGQNIPR ; EAQQQVQQQQR	28
E/13	Sous-unité α 11S	32,623	—	FFLAGNPQAQAQSQQQQQRQ PRQQSPQRQR ; QQQEQQQGRRGGWSN	17
	Sous-unité β 11S	30,967	--	RANEQGSRWVSFKTNDNAMI ANLAGR	14
E/14	SESA1-1 (P15461)	14,315	13,865 13,966	PISGQR ; QCSQR ; IQGQR ; MFLQQGQNIPR ; EAQQQVQQQQR ; QSVFPR ; RCEIGTITT	44
	SESA1-2 (P15461)	15,765		IDIPFR ; DRPFGTGSQQCR ; ETEIQRPVGECQR ; FVEQQMQQSPR ; STRPYQQR ; PGQQQQQQR ; QPQQQQQQR ; GQFGGQEMETAR	46

(*) protéines sélectionnées pour les études d'immunoréactivité; (**) d'après la masse observée par Franke *et al.* [42] ou la masse théorique (Expasy) ; (***) % de la séquence protéique recouverte par les peptides identifiés en spectrométrie de masse.

Tableau 10 (suite). Identification des protéines de GT purifiées par combinaison de chromatographies échangeuse de cation et de RP-HPLC.

Fraction IEC/RP-HPLC	Protéine (référence Expasy)	Masses selon ** (en kDa)	Masses observées (en kDa)	Séquences des peptides tryptiques déterminés par spectrométrie de masse	Recouvrement (%) ***
F/15	LTP9.4 (A0A251SK36)	9,423	9.422	ISCGELTNMLTPCLPYLR ; SCCDGAR ; KVQGATR ; VQGATR ; SSGPQLK ; VRPDLAGSLPGK	57
G/18*	Hel a 3 (P82007)	9,278	9,277	ITCNDVTGNLTPCLPYLR ; SGGKPTPACCAGAK ; KLLGATR ; LLGATR ; TQADR ; RTACKCAKTAAPQLK ; RTACKCAKTAAPQLK ; VRPDMASSLPBK ; CGISTSIPINPNVNCNTIP	100
H/19	SESA4-1 (Q39928)	13,963	13,954	PISEQR ; LNQCR ; MFLQQGQR ; AQILPNVCNLQSR ; RCEIESVR ; CEIESVR	31

(*) protéines sélectionnées pour les études d'immunoréactivité ; (**) d'après la masse observée par Franke *et al.* [42] ou la masse théorique (Expasy) ; (***) % de la séquence protéique recouverte par les peptides identifiés en spectrométrie de masse.

b) Purification des sous-unités des globulines 11S

La combinaison des deux modes de chromatographie (IEC+RP-HPLC) a également été appliquée pour la fraction précipitée en sulfate d'ammonium (P40) contenant principalement des hélianthinines. Les protéines du P40 ont été, dans un premier temps, séparées par chromatographie échangeuse d'anions. En dépit d'une faible résolution, six fractions ont été collectées séparément (**Figure 43**). Elles correspondent à des entités non retenues par la colonne (fraction A) ou à un groupe de pics et épaulements (Fractions B à F) éluant de fraction proche. Il est à noter que les changements de conditions chromatographiques, au niveau du pH de travail, n'ont pas apporté d'amélioration.

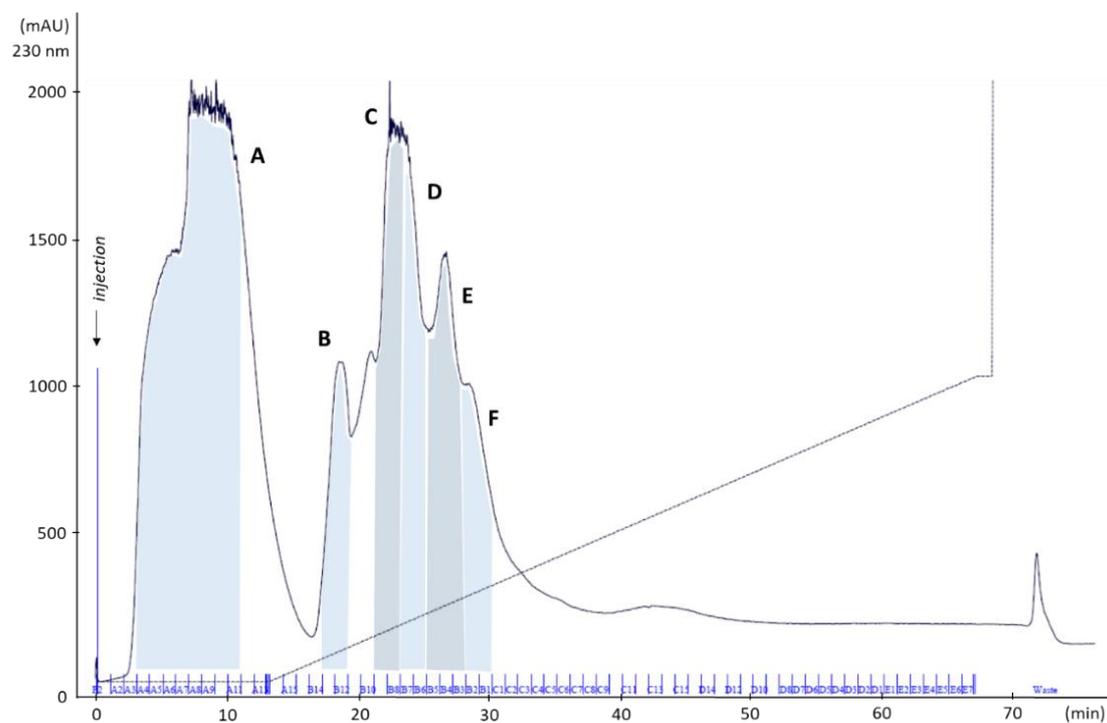


Figure 43. Chromatogramme « type » de l'extrait P40 sur colonne échangeuse d'anions. Les fractions A à F apparaissant en grisé ont été conservées pour purification supplémentaire.

La séparation supplémentaire de chaque fraction protéique d'IEC par RP-HPLC conduit à la collecte finale de 11 pics distincts (**Figure 44**).

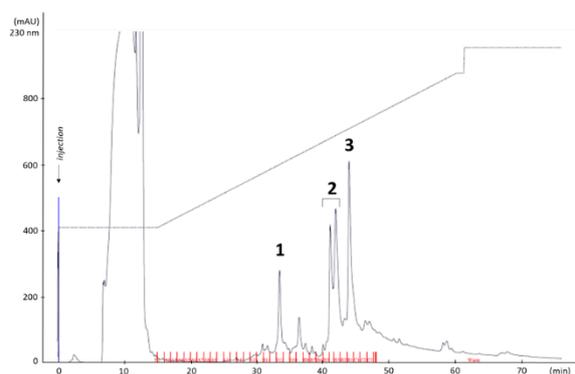
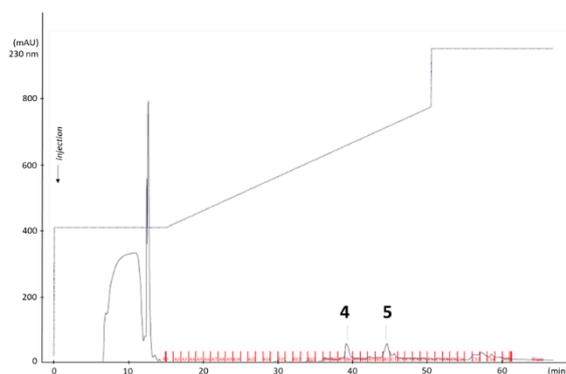
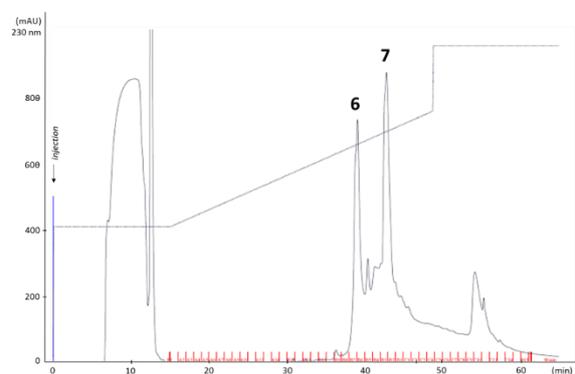
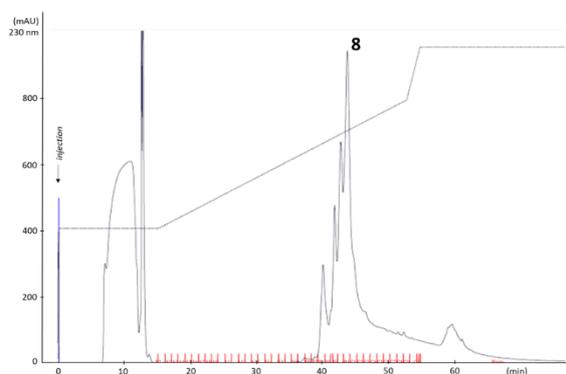
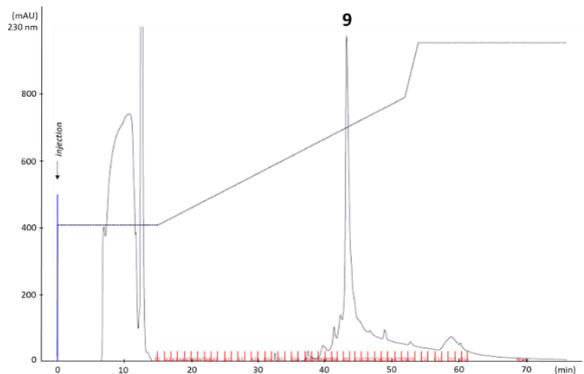
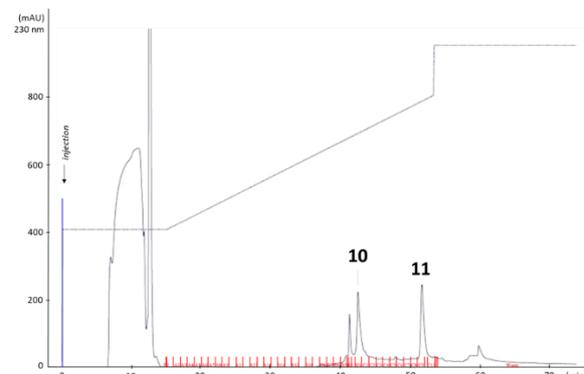
Fraction IEC/A**Fraction IEC/B****Fraction IEC/C****Fraction IEC/D****Fraction IEC/E****Fraction IEC/F**

Figure 44. Chromatogramme des fractions protéiques du P40 issues de la purification successive par IEC et RP-HPLC.

Cependant, l'analyse électrophorétique démontre l'absence de bande unique pour chacune des fractions issues de la combinaison chromatographique IEC+RP-HPLC (**Figure 45**). Les profils obtenus présentent une bande majoritaire, mais souvent accompagnée d'une multitude d'entités protéiques migrant à des masses comprises entre 10 et 100 kDa. Les fractions A/2 et A/3 dont les bandes protéiques majeures migrent à des masses proches de 20 kDa, semblent comprendre des sous-unités basiques des hélianthinines. Les protéines retrouvées dans les

fractions C/6 et C/7 et de masse approximative de 40 kDa, pourraient correspondre aux sous-unités acides. Une approche de protéomique réalisée à partir de 20 bandes d'électrophorèse, a permis de confirmer la présence de ces sous-unités acides et basiques, malgré des taux de recouvrement inférieurs à 50 % (**Tableau 11**). Ces données de protéomique concordent alors avec les migrations électrophorétiques déterminées pour les différentes sous-unités acides (α , 36 kDa et 38 kDa ; α' , 31 kDa) et basique (β , 25 kDa ; β' , 21 kDa) d'hélianthinines [12, 201, 206].

De façon étonnante, une albumine 2S est identifiée dans une des fractions chromatographiques (A/1). Celle-ci aurait pu co-précipiter avec les hélianthinines en présence de 40 % de sulfate d'ammonium.

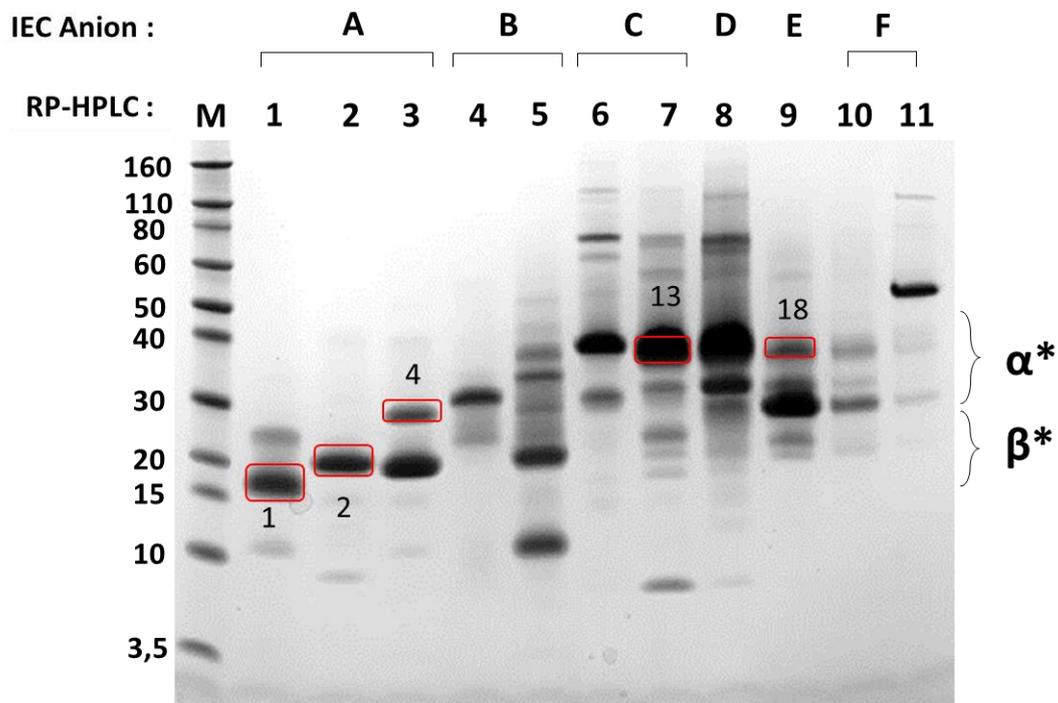


Figure 45. Analyse électrophorétique d'une sélection de protéines purifiées issues du P40. Analyse électrophorétique d'une sélection de protéines du P40 purifiées par combinaison chromatographiques d'échange d'anions et de RP-HPLC en conditions non réductrices. Les bandes prélevées pour les études de protéomique sont encadrées. M, marqueurs de poids moléculaires ; *, identification d'après Molina et al. et Žilić et al. [12, 36].

Tableau 11. Identification des sous-unités des globulines 11S purifiées par chromatographie échangeuse d'anion, suivie d'une RP-HPLC.

Fractions IEC/RP-HPLC	N° bande	Protéine (référence Expasy)	Masse estimée** (kDa)	Séquences des peptides détectés par spectrométrie de masse	Recou-vrement (%)‡
A/1	1	SESA2-2 (Q8GUD8)	15-16	GQFGGQEMDIAR ; QPQQHQQQQR ; ECQCEAVQEVAR ; IDIPFR	27
A/2	2	11S β (P19084)	25	VQIVDNQGNSVFDNELR, ETVLFAPSF SR, TNDNAMIANLAGR	22
A/3	4	11S β (P19084)	26-28	VQIVDNQGNSVFDNELR, ETVLFAPSF SR, FPILEHLR, TNDNAMIANLAGR	26
C/7*	13	11S α (P19084)	35-39	FFLAGNPQAQAQSQQQQQR, GHIVNVGQDLQIVRPPQDR, QQQEQQQGR, LQGQNDQR, QQQEQATSPREGVILPGCRR, EGVILPGCR	30
		11S β (P19084)		GVEETICSMKFK, GVEETICSMK	12
E/9*	18	11S α (P19084)	35	FFLAGNPQAQAQSQQQQQR, GHIVNVGQDLQIVRPPQDR, EGVILPGCR	17

(*) protéines sélectionnées pour les études d'immunoréactivité ; (**) masse moléculaire estimée par électrophorèse ; (***) % de la séquence protéique recouverte par les peptides identifiés en spectrométrie de masse.

B. Conclusions

Les conditions d'extraction protéique mises au point sur l'amande de tournesol permettent d'obtenir un rendement supérieur à 75 %. L'extrait présente alors un contenu protéique hétérogène, représentatif de différentes familles des protéines de la graine de tournesol, i.e. les albumines 2S, les nsLTP et les globulines 11S.

Une telle diversité a nécessité le développement de multiples méthodes biochimiques de purification faisant autant appel à une précipitation sélective qu'à des techniques chromatographiques d'échanges de cations, d'anions et de phase inversée. La caractérisation des fractions produites s'est fondée sur des techniques électrophorétiques et de MS.

Ces approches variées ont permis d'isoler et d'identifier de nombreuses albumines 2S et nsLTP de la GT qui présentent entre elles, des séquences parfois divergentes (moins de 30 % d'homologies de séquence). Si les proportions de ces protéines peuvent fluctuer d'une lignée à

l'autre [32], les différentes variétés de tournesol partagent les mêmes albumines 2S majoritaires: SESA2-1, SESA2-2, SESA20-2 et SFA-8 que nous avons pu isoler [42, 43]. De plus, outre la purification de Hel a 3, l'unique allergène reconnu de la GT, d'autres nsLTP ont pu être isolées. L'une de celles-ci (référence Expasy : A0A251SK36) qui partagent une forte homologie de séquence avec Hel a 3, n'avait pas été jusqu'à présent purifiée. L'identification de certaines protéines obtenues, isoformes d'albumines 2S et nsLTP, reste à être précisée par spectrométrie de masse (séquençage peptidique par fragmentation). Du fait des caractéristiques de polymorphisme et de structures des hélianthinines [6, 10, 12], la purification de ces différentes sous-unités de globulines 11S n'a pu être complète. Cependant, certaines fractions enrichies en sous-unité acide ou basique seront sélectionnées pour les études suivantes.

Chapitre 2 : Développement de modèles souris de sensibilisation aux protéines de la graine de tournesol

Pour mettre au point les modèles souris de sensibilisation aux protéines de GT, nous nous sommes inspirés des modèles qui avaient été précédemment développés au laboratoire sur la souris BALB/c afin d'étudier l'allergie au lait de vache et à l'arachide. Par exemple, des souris ont été sensibilisées par voie i.p. à la β -lactoglobuline [198] et par v.o. aux protéines de lait de vache et d'arachide [197, 209]. L'objectif de cette partie a été d'optimiser le protocole de sensibilisation des souris afin d'induire des niveaux élevés de production d'anticorps spécifiques des protéines de GT (en particulier IgE et IgG1). Outre la comparaison du potentiel de sensibilisation des différentes protéines de GT, les sérums de souris sensibilisées ont ensuite été utilisés pour mesurer l'immunoréactivité résiduelle des protéines de GT après digestion dans des modèles *in vitro*. Nous avons donc développé, en parallèle, des modèles de sensibilisation par voie i.p. et v.o. afin de déterminer la meilleure voie de sensibilisation des souris BALB/cByJ aux protéines de GT.

A. Développement d'un modèle de sensibilisation par voie intrapéritonéale

I. Matériel et méthodes

1. Préparation de l'extrait de protéique d'écailles de graines de tournesol

Les sensibilisations aux protéines de GT par voie i.p. ont été réalisées avec un extrait protéique obtenu à partir d'écailles de tournesol délipidées (ED). Après homogénéisation des écailles (10 g) à l'Ultra-Turrax et délipidation à l'hexane (voir chapitre 1), les protéines ont été extraites par incubation dans 100 mL de borate de sodium 0,05 M pH 9 pendant 4 h à 20°C et sous agitation rotative. L'extrait a ensuite été dialysé contre du tampon phosphate de potassium pH 7,4 à une concentration finale de 0,02 M.

2. Protocole de sensibilisation

Des souris BALB/cByJ femelles (n = 10/lot) ont été soumises à trois semaines d'intervalles (J1 et J22) à deux injections i.p. d'ED (200 µl/injection) à deux doses différentes (5 µg ou 50 µg) et en présence de 2 adjuvants différents : l'alum (hydroxyde d'aluminium, Alhydrogel® adjuvant 2%, Croda Danemark) et l'adjuvant incomplet de Freund (AIF, Difco™, Detroit, Michigan, USA). Pour la sensibilisation en présence d'alum, les protéines diluées dans du tampon PBS ont été adsorbées sur les particules d'alum, pendant 18 h à 4°C sous agitation. L'adsorption des protéines sur l'alum est non dénaturante ce qui permet de préserver la conformation de la protéine et va permettre la production d'anticorps spécifiques de la forme native des protéines. Dans le cas où les protéines sont émulsionnées à l'AIF, les protéines sont partiellement dénaturées ce qui va aussi permettre la production d'anticorps spécifiques d'épitopes linéaires. Un groupe de souris naïves (n = 10) a servi de contrôle (**Figure 46**). A J29, une semaine après la deuxième i.p., les souris sont anesthésiées sous isoflurane pour réaliser un prélèvement de sang au niveau du sinus rétro-orbitaire à l'aide d'une pipette Pasteur trempée dans du tampon EDTA (100 mM). Les prélèvements sanguins sont ensuite centrifugés (3000 x g, 20 min, 4°C), puis les sérums prélevés et conservés à -20°C. A J38, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les rates ont été prélevées en conditions stériles afin de réaliser des réactivations cellulaires *ex vivo*. Les expériences ont été réalisées avec l'accord du comité d'éthique local (CETEA, avis A16-079) et selon la réglementation européenne sur l'expérimentation animale.

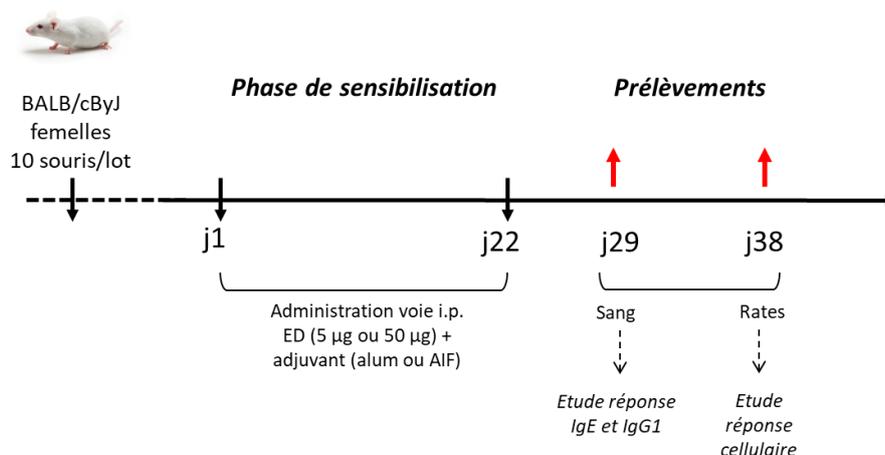


Figure 46. Protocole de sensibilisation des souris BALB/cByJ par voie i.p. à un extrait d'écailles de tournesol délipidées.

3. Dosage des réponses IgE et IgG1 spécifiques

Les réponses anticorps (IgE, et IgG) spécifiques des protéines de GT ont été analysées à l'aide de plusieurs tests immunoenzymatiques développés au laboratoire.

a) Dosage des IgG1 spécifiques

Le dosage immunoenzymatique des IgG1 spécifiques des protéines de GT est réalisé à l'aide du test connu sous l'acronyme EAST (*Enzyme Allergo Sorbent Test*) selon le principe exposé **Figure 47**.

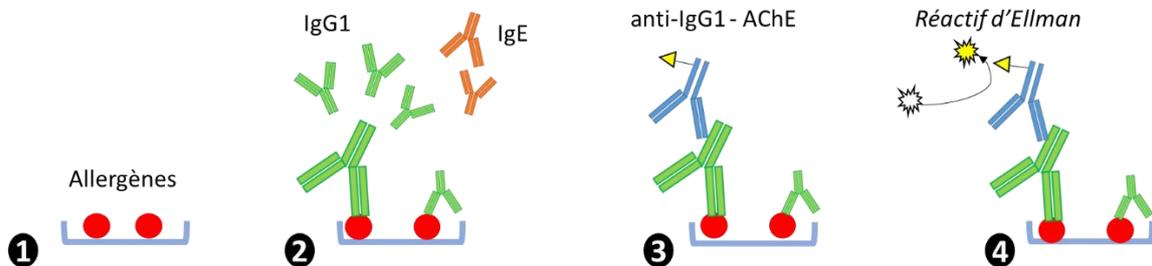


Figure 47. Dosage des IgG1 spécifiques sur antigènes immobilisés.

Immobilisation des antigènes (1), fixation des IgG1 spécifiques (2), détection des IgG1 à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-IgG1 de souris (3), révélation à l'aide du réactif d'Ellman et mesure de l'absorbance à 414 nm (4).

Dans un premier temps, les extraits protéiques ou les protéines purifiées de GT (2,5 µg/mL, tampon phosphate 50 mM, pH 7,4) sont adsorbés sur la phase solide des plaques de microtitration 96 puits (Maxisorp Nunc, Roskilde). Après une incubation sur la nuit à 4°C et un lavage avec un tampon phosphate de potassium (25 mM, pH 7,4, 0,05 % tween 20), les plaques sont saturées en tampon EIA (tampon phosphate 0,1 M, BSA 0,1 %, NaCl 0,15 M et azide à 0,01 %). Après lavage, les sérums préparés à des dilutions adéquates sont déposés. Après une incubation sur la nuit à 4°C, la détection des IgG1 spécifiques des protéines de GT est réalisée en ajoutant des anticorps polyclonaux de chèvre spécifiques des IgG1 de souris (Southern Biotechnology Ass. Inc.) qui ont été couplés à la forme tétramérique de l'acétylcholinestérase (AChE). Après 4 h d'incubation à TA et sous légère agitation, les puits sont lavés et l'activité enzymatique liée à la phase solide est révélée par ajout du réactif d'Ellman (200 µL/puits) [5]. Les valeurs d'absorbance sont mesurées à 414 nm (Epoch®, BioTek).

b) Dosage des IgE spécifiques

i. *Couplage à la biotine des protéines de graines de tournesol.*

La détection des IgE spécifiques des protéines de GT présents dans les sérums de souris a fait appel à un test ELISA dit de « capture des IgE ». La réalisation de ce test nécessite l'utilisation de protéines purifiées marquées, alors appelées protéines traceurs. En laboratoire, la biotine est utilisée pour sa capacité à se lier avec une forte affinité à la neutravidine couplée à une molécule d'acétylcholinestérase (AChE). Les protéines de GT (extraits et fractions purifiées) ont été « biotinylées » avec un excès molaire de 5 à 20 d'ester de biotine (ES Link NHS-PEG₄-Biotin, Thermo Scientifique), en fonction du nombre d'amines primaires disponibles pour chaque protéine. Brièvement, la NHS-PEG₄-Biotin a été dissoute dans 170 µL d'eau pure (200 mM finale), puis ajoutée à un volume adéquat dans les échantillons de protéines sélectionnées. L'ensemble est incubé 30 minutes à 2 heures à TA. Un suivi de la réaction de couplage est assuré par MS. L'arrêt de la réaction (addition de Tris 1 M pH 8) est alors déterminé par l'absence de protéine non couplée à la biotine.

ii. *Dosage des IgE spécifiques*

Le dosage des IgE spécifiques a été réalisé par capture préalable des IgE sériques via un anticorps monoclonal immobilisé sur la phase solide selon le principe exposé **Figure 48**. En effet, dans le sérum de souris, la concentration en IgE peut être jusqu'à 100 000 fois plus faible que celle en IgG1 [210]. Dans ce cas, les sérums étant relativement peu dilués pour doser les IgE (1/25), les antigènes immobilisés sur la phase solide peuvent être masqués par l'excès d'IgG1 spécifiques et donc inhiber la liaison des IgE spécifiques. Ainsi, pour s'affranchir de la liaison des IgG, nous avons utilisé un format de dosage qui inclue une étape de capture des IgE sériques.

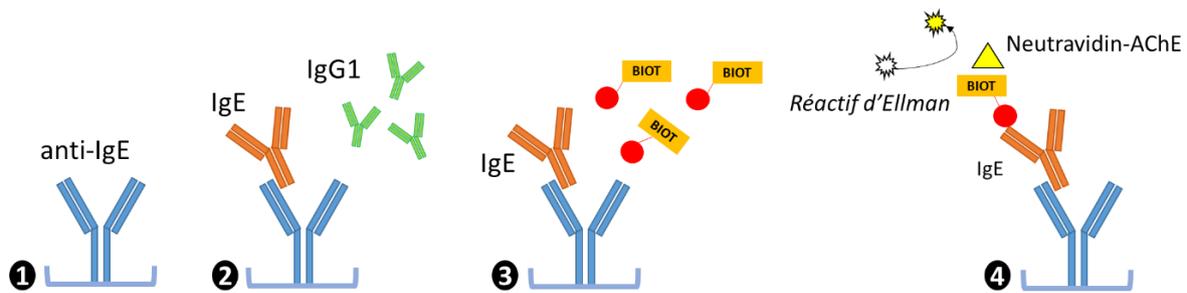


Figure 48. Dosage des IgE spécifiques en format inverse.

Immobilisation de l'anticorps monoclonal anti-IgE de souris (1), capture des IgE totales sériques (2), incubation avec des protéines marquées (traceurs) (3), révélation à l'aide du réactif d'Ellman et mesure de l'absorbance à 414 nm (4).

L'anticorps monoclonal de rat anti-IgE de souris (Clone LOME-3, AbD Serotec, Biorad, 2,5 µg/mL) est immobilisé sur la phase solide. Après saturation des puits avec du tampon EIA, les sérums de souris sensibilisées (1/25) sont incubés sur la nuit à 4°C. Les IgE spécifiques sont ensuite mises en contact avec les extraits protéiques (ED, S40 ou P40) ou les protéines purifiées (Hel a 3, SESA20-2 et SFA-8) biotinylées. La liaison des antigènes biotinylés par les IgE spécifiques est ensuite révélée par l'ajout de neutravidine marquée à l'AChE puis l'ajout de réactif d'Ellman. Les résultats sont exprimés en unité d'absorbance mesurée à 414 nm.

4. Réactivation *in vitro* des splénocytes

A la fin du protocole, les rates ont été prélevées en conditions stériles, rassemblées par paire (5 pools par lot de souris sensibilisées) et broyées mécaniquement (GentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, USA) dans du milieu de culture RPMI complet (RPMI 1640, L-glutamine 2 mM, pénicilline 100 U, streptomycine 100 µg/mL, 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté). Les suspensions cellulaires ont été filtrées sur un tamis cellulaire (70 µm, Dutscher), puis lavées avec du milieu RPMIc. Après la lyse des érythrocytes (dans du tampon Red Blood Cell Lysing Buffer Hybrid-Max™, Sigma-Aldrich) et deux lavages avec du RPMIc, les cellules viables ont été énumérées à l'aide d'un marquage au 7AAD (Interchim, Montluçon, France) et une acquisition des résultats sur cytomètre Novocyte (ACEA Biosciences). Les suspensions cellulaires ont ensuite été distribuées sur des plaques de 96 puits à raison de 10⁶ cellules par puits. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 60 h (5 % CO₂) en présence d'ED à la concentration finale de 100 µg/mL ou en présence de PBS comme témoin

négatif. De la polymyxine B sulfate (50 µg/mL, Sigma Aldrich) a été ajoutée afin de neutraliser les endotoxines. Les cultures ont ensuite été centrifugées (300 x g, 10 min, 4°C), les surnageants prélevés, puis placés à -80°C jusqu'au dosage des cytokines d'intérêts (IL-5, IL-13, IL-10 et IFN-γ). Le dosage des cytokines est réalisé à l'aide d'un kit commercial (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) selon les recommandations du fournisseur et en utilisant l'appareil Bioplex® 200.

5. Analyses statistiques

Les réponses humorales ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. Les données de sécrétions de cytokines ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4.3. La différence est considérée significative pour une valeur de $p < 0,05$.

II. Résultats

1. Caractérisation des réponses humorales induites chez les souris sensibilisées

Le dosage des réponses IgG1 spécifiques des protéines totales de GT montre que, sur les deux doses testées de protéines injectées, seule la plus élevée (50 µg) a permis d'induire une réponse humorale significative, quel que soit l'adjuvant considéré (**Figure 49**). Les réponses obtenues en présence d'AIF tendent à être plus élevées que celles en présence d'alum mais la différence n'est pas statistiquement significative. Les deux fractions contenant principalement les albumines 2S et les nsLTP (S40), et les globulines 11S (P40) présentent une immunogénicité comparable. Les réponses IgG1 spécifiques ont également été mesurées contre les deux allergènes reconnus de la GT, Hel a 3 et SFA-8, ainsi que contre l'une des SESA les plus abondantes, la SESA20-2. La réponse la plus élevée est observée contre SESA20-2 chez les souris sensibilisées en présence d'AIF. Les réponses IgG1 contre SFA-8 sont également significatives mais aucune réponse n'est détectée contre Hel a 3 (**Figure 49**).

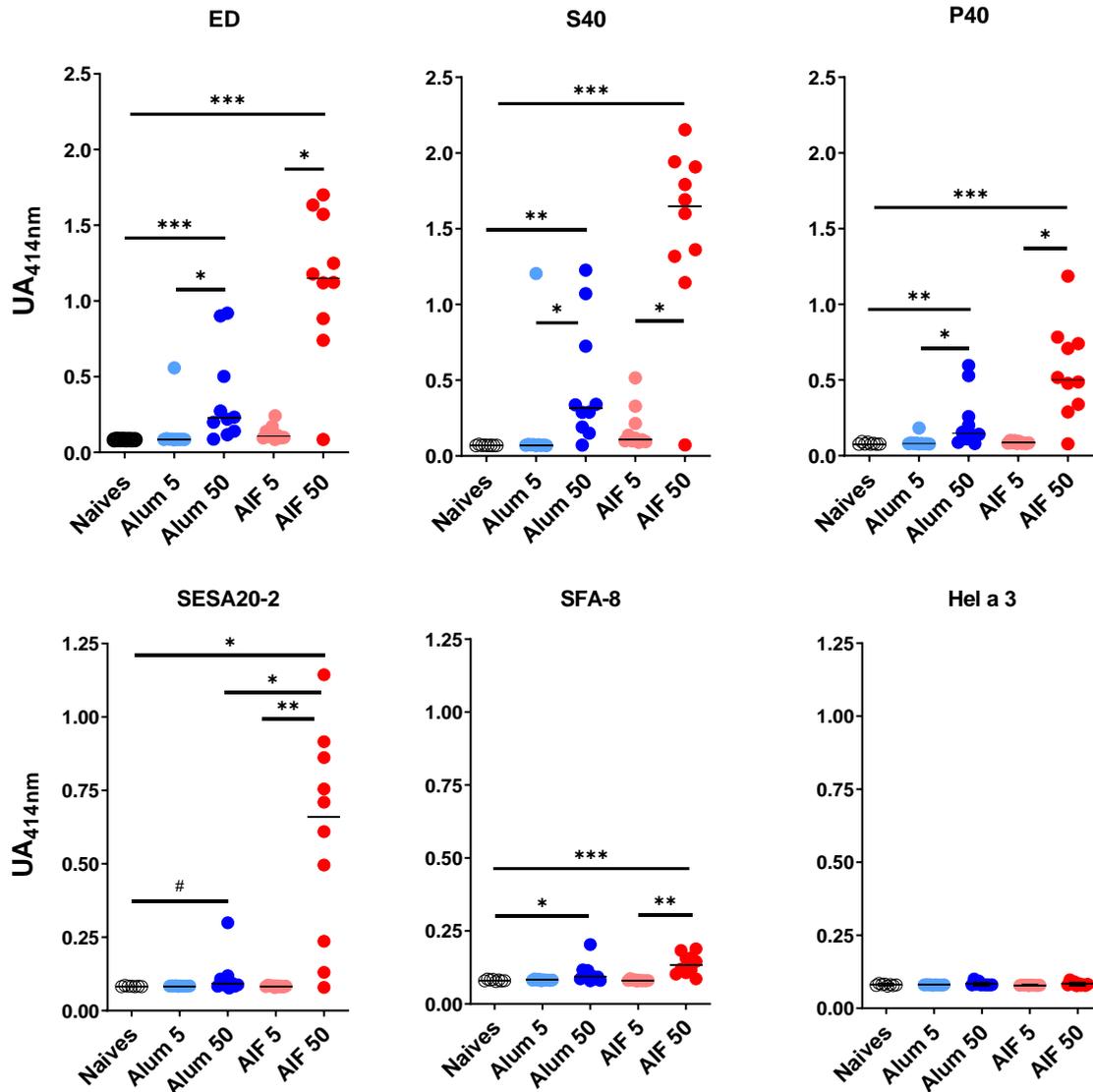


Figure 49. Analyse des réponses IgG1 spécifiques des protéines de GT induites chez les souris sensibilisées par injections intrapéritonéales.

Analyse de la réponse IgG1 spécifiques d'un extrait d'écailles délipidées (ED), d'un extrait enrichi en albumines 2S et nsLTP (S40), d'un extrait enrichie en sous-unités de globulines IIS (P40) et d'extraits purifiés de graines de tournesol (SESA20-2, SFA-8 et Hel a 3). Les sérums ont été dilués au 1/100,000. « * », $p < 0,05$, « ** », $p < 0,01$ et « *** », $p < 0,001$ (test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn) ; « # », $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney).

Concernant les réponses IgE spécifiques, bien que le format de dosage par capture des IgE diffère de celui utilisé pour les IgG1, nous observons un profil de sensibilisation des souris similaire à celui observé pour les réponses IgG1 (**Figure 50**).

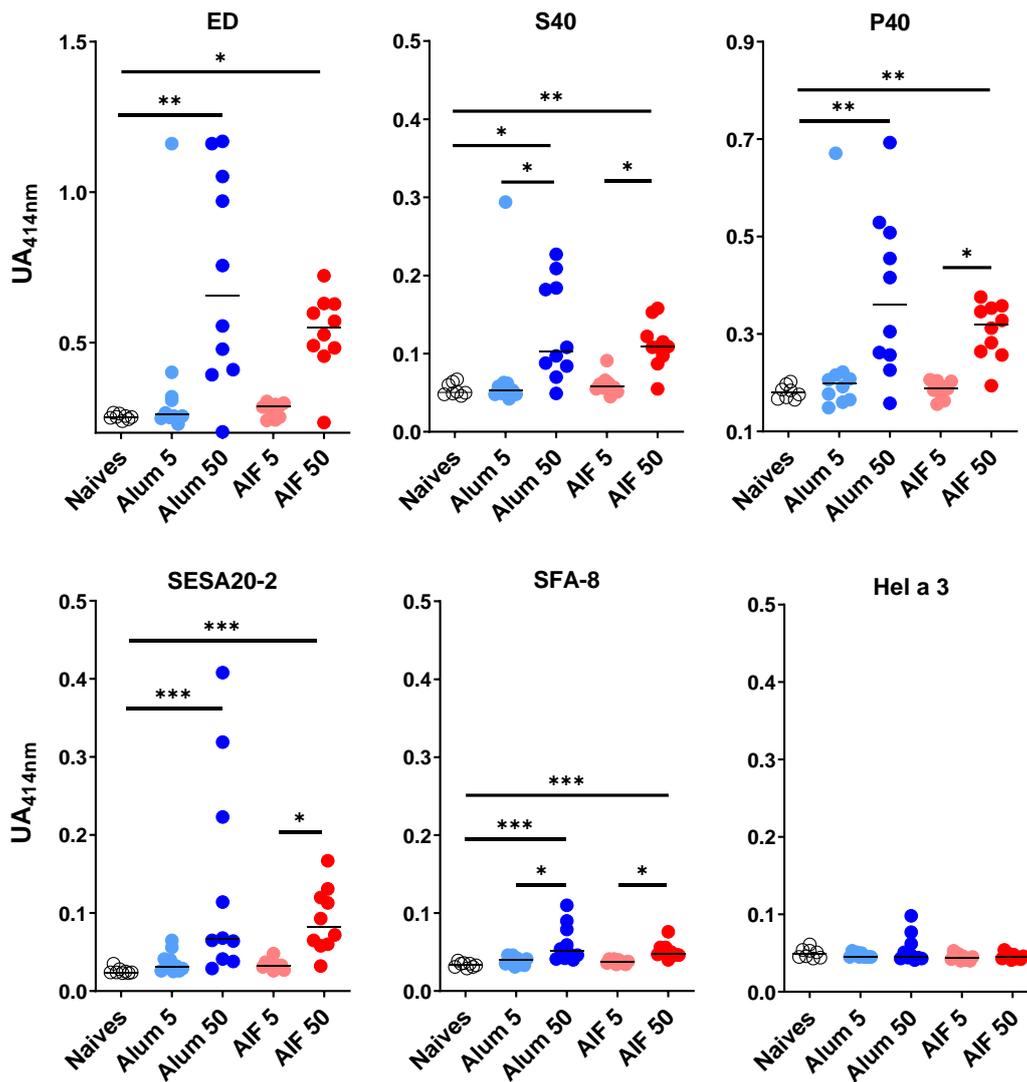


Figure 50. Analyse des réponses IgE spécifiques des protéines de GT induites chez les souris sensibilisées par injections intrapéritonéales.

Analyse de la réponse IgE spécifiques d'un extrait d'écaillés délipidées (ED), d'un extrait enrichi en albumines 2S et nsLTP (S40), d'un extrait enrichie en sous-unités de globulines 11S (P40) et d'extraits purifiés de graines de tournesol (SESA20-2, SFA-8 et Hel a 3). Les sérums ont été dilués au 1/25. « * », $p < 0,05$, « ** », $p < 0,01$ et « *** » et $p < 0,001$ (test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn).

Les IgE spécifiques des protéines de GT sont détectées chez les souris ayant reçu la plus forte dose de protéines (50 μ g). Néanmoins, les différences de réponses IgE entre les souris sensibilisées avec l'alum et celles sensibilisées avec l'AIF semblent moins marquées qu'avec les IgG1, en particulier pour la fraction S40, et SESA20-2. Ceci est peut-être dû au fait que pour le dosage des IgG1, l'adsorption des protéines sur une phase solide peut avoir un effet

partiellement dénaturant ce qui va favoriser la liaison des anticorps spécifiques des protéines dénaturées, plutôt induits chez les souris sensibilisées en présence d'AIF. A l'inverse, pour le dosage des IgE, l'utilisation d'allergènes biotinylés en solution peut favoriser la liaison des IgE spécifiques des allergènes natifs, dont la production est plutôt induite chez les souris sensibilisées en présence d'alum. Nous confirmons également l'absence de sensibilisation contre Hel a 3.

2. Caractérisation des réponses cellulaires

Les résultats présentés à la **Figure 51** montre que la réactivation des splénocytes par l'extrait ED confirme bien la sensibilisation des souris aux GT, avec une sécrétion plus importante de cytokines de type T_H2 (IL-5 et IL-13). Cette sécrétion est particulièrement plus importante chez les souris sensibilisées en présence d'alum et chez les souris sensibilisées à la plus forte dose de 50 μ g. A l'inverse, la sécrétion d'IL-10 et d'IFN- γ est très faible.

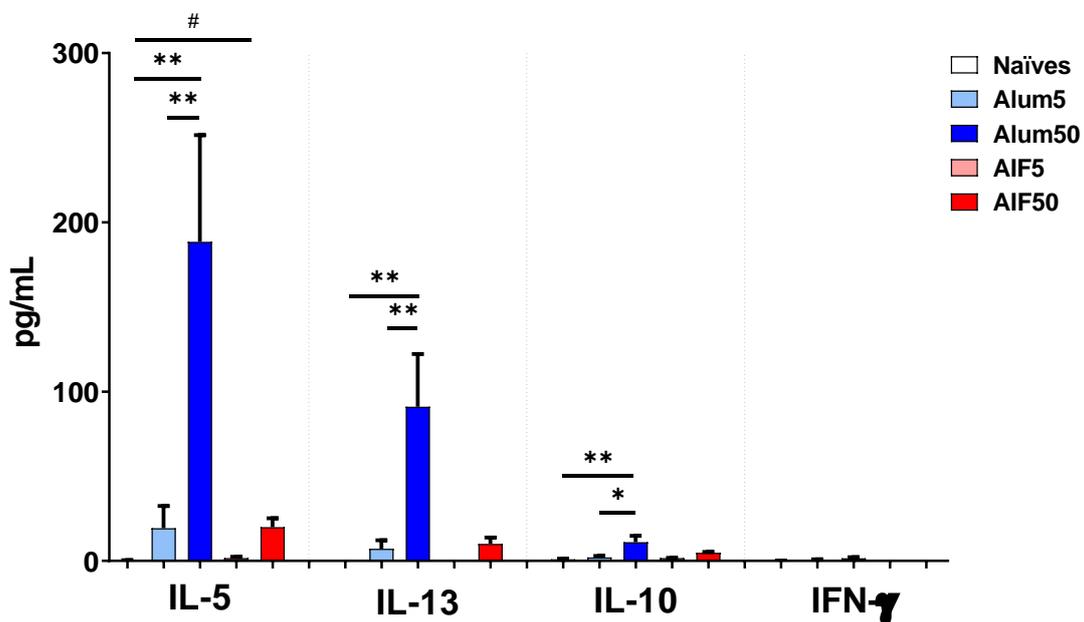


Figure 51. Sécrétion de cytokines par les splénocytes de souris sensibilisées par voie i.p. réactivés *ex vivo* par un extrait total de protéines de GT.

Les splénocytes ont été réactivés par l'extrait d'écaillés délipidées, ED. Les résultats sont exprimés en pg/mL sous forme de moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. « * », $p < 0,05$, « ** », $p < 0,01$ et « *** », $p < 0,001$. Et d'un test *t* non apparié. « # », $p < 0,05$.

III. Conclusions

La sensibilisation aux protéines de GT par voie i.p. avec l'alum ou avec l'AIF permet dans les deux cas d'induire la production d'IgE et d'IgG1 spécifiques. Bien que l'immunogénicité des protéines de GT semble un peu plus élevée en présence d'AIF, nous n'avons pas vu de différence significative entre les deux adjuvants pour l'induction des IgE spécifiques. L'utilisation de l'alum semble en revanche permettre l'induction de réponses cellulaires plus élevées. En conséquence, l'utilisation de l'alum serait sans doute à privilégier car il permettrait d'obtenir des anticorps plus spécifiques des formes natives des protéines de GT. Par ailleurs, ces premiers résultats suggèrent que d'autres SESA de la GT telles que SESA20-2, pourraient présenter un potentiel de sensibilisation au moins aussi élevé que celui de SFA-8. Toutefois, il est surprenant de ne pas avoir détecté de réponse anticorps contre Hel a 3 qui est le seul allergène de la GT officiellement reconnu. Nous avons donc testé un modèle de sensibilisation par v.o. afin d'utiliser une voie de sensibilisation plus physiologique.

B. Développement d'un modèle de sensibilisation par voie orale

En parallèle de la mise au point du modèle de sensibilisation par v.o., nous avons voulu également tester l'influence de certains paramètres, tels que la présence de lipides dans les échantillons ou l'impact du pressage mécanique pour l'extraction de l'huile. En suivant le protocole de sensibilisation mis au point au laboratoire pour l'allergie à l'arachide [197], nous avons donc tester différents extraits protéiques issus directement de l'amande de tournesol ou des écailles (obtenues après pressage à froid), avec ou sans délipidation préalable.

I. Matériels et méthodes

1. Préparation des extraits protéiques de graines de tournesol

Les sensibilisations aux protéines de GT par v.o. ont été réalisées à partir d'extraits d'amandes non délipidées (AND), d'écailles non délipidées (END) et d'écailles délipidées (ED). En comparaison, nous avons utilisé un extrait total d'arachide brute (AB). Les fractions protéiques ont été obtenues par extraction de 10 g d'amandes ou d'écailles de GT, préalablement délipidées ou non (voir chapitre précédent), dans 100 mL de borate de sodium

0,05 M pH 9,0 pendant 4 h à 20°C et sous agitation. Les trois échantillons ont ensuite été dialysés contre du tampon borate de sodium 50 mM à pH 9 (sur la nuit à 4°C), puis leurs contenus protéiques ont été analysés par SDS-PAGE. L'extrait d'arachide a été préparé dans des conditions d'extraction similaires à l'étude d'Adel-Patient *et al.* [197].

2. Protocole de sensibilisation par voie orale

A l'âge de 6 semaines, les souris BALB/c (n = 10/lot) ont été sensibilisées en réalisant 6 gavages intragastriques contenant chacun 5 mg d'extraits protéiques AND, END, ED ou ARA et 10 µg de TC à J1, J8, J15, J22, J29 et J36 (**Figure 52**). Pour l'extrait ED, nous avons également sensibilisé un lot de souris à la dose de 1 mg de protéines. Un lot contrôle de 10 souris a reçu du tampon PBS. Un prélèvement de sang a ensuite été réalisé à J43. A la fin du protocole, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale afin de prélever la rate pour réaliser des réactivations *ex vivo* de splénocytes. Les prélèvements sanguins et de rate sont traités dans les mêmes conditions que décrit précédemment.

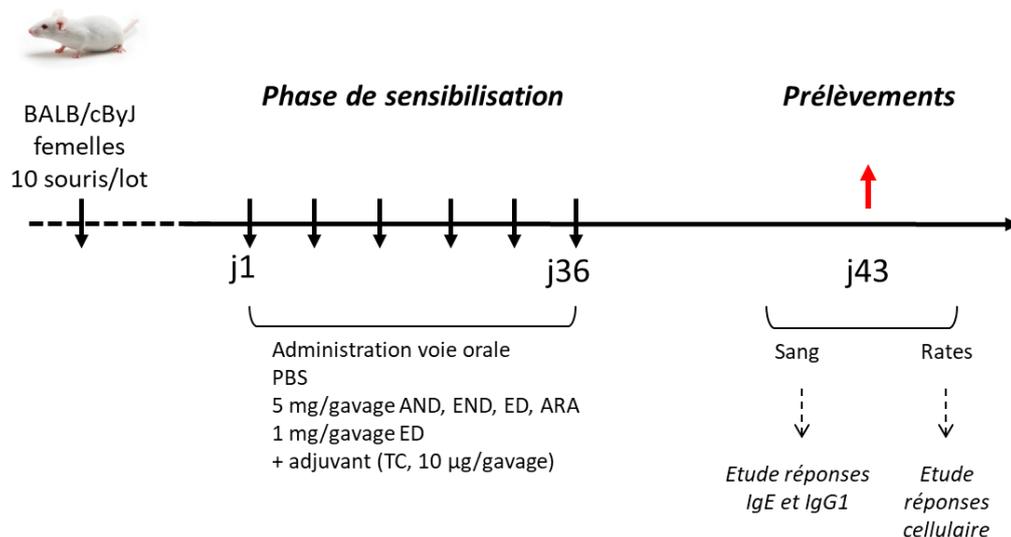


Figure 52. Protocole de sensibilisation des souris BALB/c par v.o. à différents extraits de protéines de GT.

3. Dosage des réponses IgE et IgG1 spécifiques

La réactivité de plusieurs fractions protéiques issues du S40 (10 fractions) et P40 (11 fractions) ont d'abord été étudié à l'aide de différents pools de sérums de souris sensibilisées aux GT. Pour ce screening, les réponses IgE et IgG1 ont été mesurées sur des microplaques où les différentes fractions protéiques (2,5 µg/mL) ont été adsorbées sur la phase solide. Nous avons ainsi mesuré les réponses IgG1 spécifiques sur allergènes immobilisés dans les mêmes conditions que précédemment décrites. La détection des IgE spécifiques a été réalisé à l'aide de l'anticorps monoclonal de rat anti-IgE de souris (Clone LOME-3) couplé à l'AChE. Après avoir sélectionné les fractions d'intérêts, celles-ci ont été biotinylées afin de pouvoir réaliser le dosage des IgE spécifiques en format inverse.

4. Analyse de la réactivité croisée entre albumines 2S de GT

La réactivité croisée est évaluée en réalisant des tests d'inhibition de la liaison IgE à une albumine 2S marquée à la biotine (le traceur) par différentes albumines 2S non marquées (les compétiteurs). Après avoir immobilisé sur plaque 96 puits l'anticorps monoclonal anti-IgE (clone LOME-3), un pool de sérums de souris sensibilisées à l'extrait d'écaille délipidée (dilué au 1/25^{ème}, 50 µl/puits) est incubé sur la nuit à 4°C. Après lavage, le test d'inhibition est réalisé en co-incubant le traceur (SESA20-2-Biot, SESA2-1-Biot ou SFA-8-Biot, 0,05 nmol/mL) avec des concentrations croissantes de compétiteurs (SESA1-2, SESA2-1, SESA2-2, SESA4-1, SESA20-2 ou SFA-8). Après 4 h d'incubation à TA sous agitation, la neutravidine-AChE est ajoutée pendant 15 min à TA sous agitation. Après lavage, la liaison IgE-traceur est révélée par ajout de réactif d'Ellman. Le principe du test d'inhibition par capture d'IgE est présenté dans la **Figure 53**. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison : B/B₀, tel que B₀ correspond à la liaison du traceur par les IgE immobilisés en l'absence de compétiteur et B correspondant à la liaison du traceur en présence de compétiteurs.

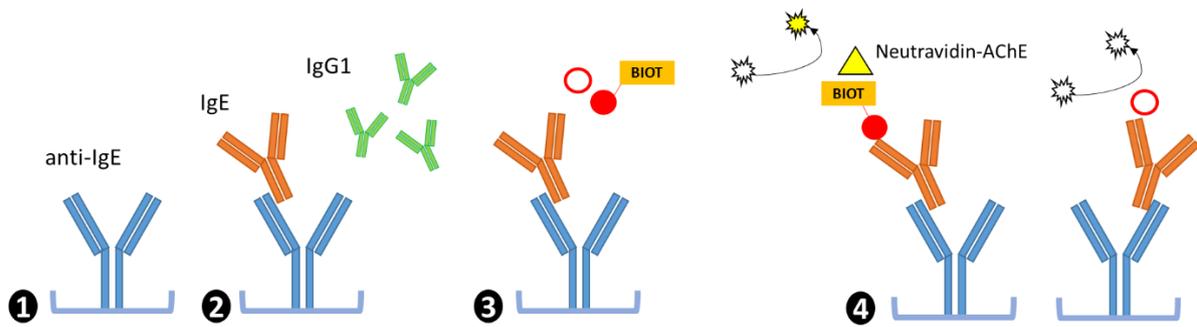


Figure 53. Principe du test d'inhibition de la liaison des IgE sériques à un allergène marqué. Après immobilisation de l'anticorps monoclonal anti-IgE de souris (1) et capture des IgE totales sériques (2), les protéines marquées (traceurs) sont co-incubées avec (ou non) des quantités croissantes de compétiteurs non marqués (3). Puis, les dosages sont révélés à l'aide du réactif d'Ellman et mesure de l'absorbance à 414 nm (4).

5. Analyses statistiques

Les réponses humorales ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. Les données de sécrétions de cytokines ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey ou de Dunnett (vs PBS). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4.3. La différence est considérée significative pour une valeur de $p < 0,05$.

II. Résultats

1. Analyse des extraits protéiques

Les différents extraits protéiques issus d'écaillés non délipidés (END), d'écaillés délipidés (ED) et d'amande non délipidée (AND) ont été comparés sur gel d'électrophorèse. L'analyse des profils électrophorétiques des extraits de protéines de GT ne met pas en évidence de différence significative entre les 3 extraits protéiques testés (**Figure 54**).

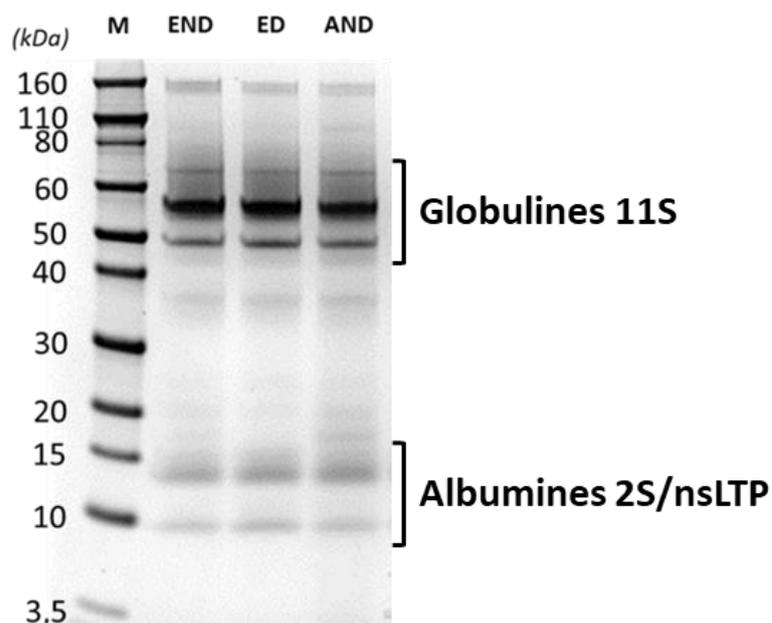


Figure 54. Analyse électrophorétique d'extraits protéiques issus de l'amande et d'écaillés de GT.

Analyse électrophorétique en conditions non réductrices des extraits protéiques d'écaillés non délipidés (END), d'écaillés délipidés (ED) et d'amandes non délipidés (AND). M, marqueurs de masses moléculaires

2. Caractérisation de la réponse humorale de souris sensibilisées par voie orale

Le niveau de sensibilisation des différents lots de souris a d'abord été évalué contre l'extrait total de protéines de GT (ED). Aucune différence significative n'est observée entre les différents lots de souris sensibilisées. Il apparaît également que les IgE et IgG1 induits chez les souris sensibilisées contre l'arachide ne reconnaissent pas les protéines de GT (**Figure 55A**). A l'inverse, seules les souris ARA produisent des IgE et IgG1 spécifiques des protéines d'arachide, ce qui suggère une faible réactivité croisée entre les protéines de GT et d'arachide (**Figure 55B**).

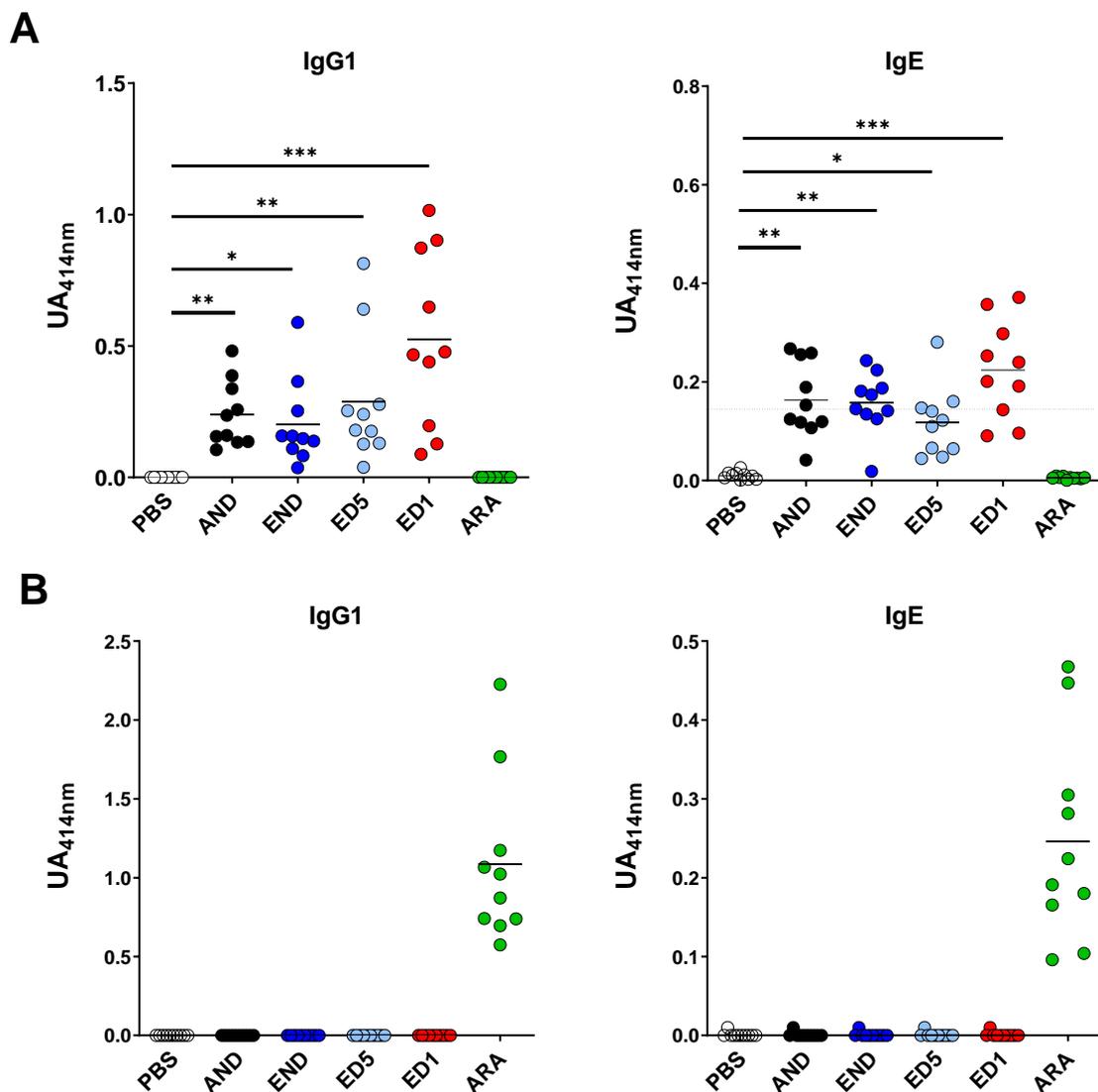


Figure 55. Réponses IgG1 et IgE spécifiques des protéines de GT et d'arachide .

Les réponses IgG1 et IgE spécifiques des protéines de GT (A) et d'arachide (B) ont été analysées chez les souris sensibilisées par v.o. à un extrait protéique d'amandes non délipidées (AND), d'écailles non délipidées (END), d'écailles délipidées (ED1 et ED5) et d'arachide (ARA). Les sérums ont été dilués au 1/25 pour le dosage des IgE et au 1/50 000 pour les IgG1. Les données ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. « * », $p < 0,05$, « ** », $p < 0,01$ et « *** », $p < 0,001$.

3. Caractérisation de l'immunoréactivité IgE et IgG1 des différentes fractions de protéines de GT

Avant d'étudier plus précisément la spécificité des réponses humorales, nous avons évalué l'immunoréactivité des différentes fractions protéiques isolées issues du S40 et du P40. Nous avons ainsi réalisé un pool de sérums de souris qui présentaient un niveau de sensibilisation

élevé, avec une réponse IgE supérieure à 0,15 UA_{414nm} (**Figure 56**). En parallèle, nous avons testé 2 pools de sérums de souris sensibilisées par voie i.p. aux protéines de GT en présence d'alum (lot alum 50) ou d'AIF (lot AIF 50), afin de comparer le niveau moyen de sensibilisation induit par les différentes voies d'administration. L'objectif de cette expérience était également d'identifier les protéines les plus abondantes et les plus immunoréactives afin de réaliser un panel de protéines de GT biotinylées. Ce panel a ensuite été utilisé pour réaliser les dosages d'IgE spécifiques dans les sérums de souris sensibilisées et pour effectuer les tests d'inhibition de la liaison aux IgE.

Parmi les 10 fractions protéiques étudiées et issues du S40, six présentent une immunoréactivité IgE relativement importante chez les souris sensibilisées par v.o. (**Figure 56A**). Ces fractions correspondent toutes à des albumines 2S : SESA20-2, SESA2-2, SESA2-1, SESA1-2, un mélange de SESA1-1 et SESA1-2 et SESA4-1. En comparaison, SFA-8 et Hel a 3 présentent une réactivité IgE assez faible (3 à 15 fois plus faible) alors que les fractions contenant SESA21-2 et la protéine de haute masse moléculaire (65 kDa) ne sont pas reconnues par les IgE.

Pour la réponse IgG1, le profil de sensibilisation est assez similaire (**Figure 56B**). Il est tout de même à noter que SFA-8 présente ici une réactivité IgG1 comparable à celles des autres SESA. Enfin, il apparaît clairement que la sensibilisation par v.o. a permis d'obtenir des niveaux de sensibilisation beaucoup plus élevés que ceux obtenus après sensibilisation par voie i.p.

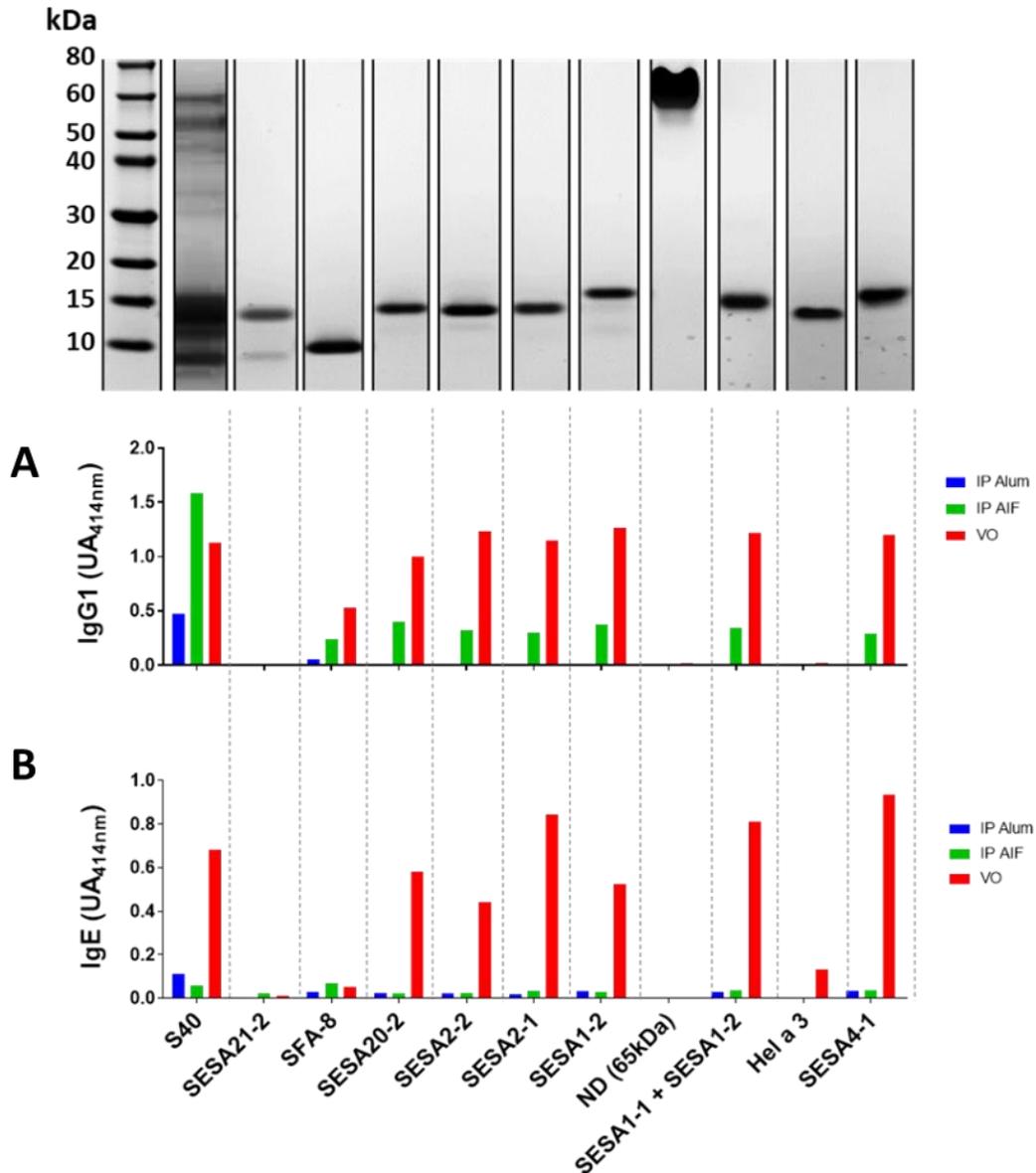


Figure 56. Etude de l'immunoréactivité des protéines de GT du S40.

Les réponses IgG1 (A) et IgE (B) spécifiques d'une sélection de protéines purifiées ont été mesurées à l'aide d'un pool de sérums de souris sensibilisées aux protéines de GT par i.p. en présence d'alum (en bleu) ou d'AIF (en vert) et par v.o. (en rouge). Les sérums ont été dilués au 1/25 pour le dosage des IgE et au 1/50 000 pour les IgG1. A chaque protéine purifiée est associée le puits du gel d'électrophorèse ayant permis sa caractérisation ; le gel est issu de la Figure 42A (voir chapitre 1).

Parmi les 11 fractions protéiques issues du P40, la réactivité IgE du P40 est portée uniquement par la fraction P40-1 (**Figure 57A**). Cette fraction contient une albumine 2S : SESA2-2 qui co-précipite avec le P40 (voir chapitre 1). Pour les autres fractions du P40 qui correspondent à diverses sous-unités des globulines 11S, l'immunoréactivité IgE n'est pas

significative. Les fractions P40-4 à P40-9 présentent néanmoins une réactivité IgG1, qui est reste 2 à 4 fois plus faible que celle observée pour la fraction P40-1 (**Figure 57B**).

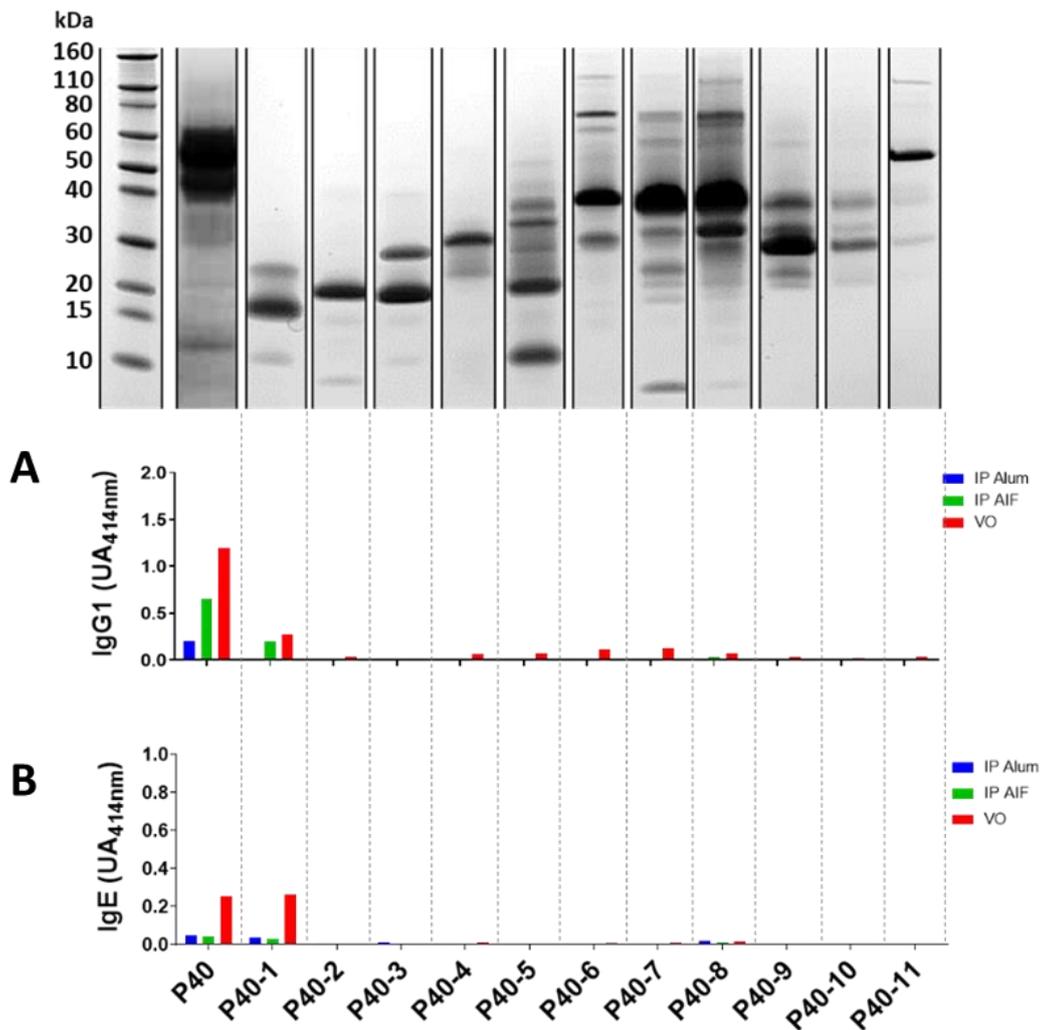


Figure 57. Etude de l'immunoréactivité des protéines de GT du P40.

Les réponses IgG1 (A) et IgE (B) spécifiques d'une sélection de protéines purifiées ont été mesurées à l'aide d'un pool de sérums de souris sensibilisées aux protéines de GT par i.p. en présence d'alum (en bleu) ou d'AIF (en vert) et par v.o. (en rouge). Les sérums ont été dilués au 1/25 pour le dosage des IgE et au 1/50 000 pour les IgG1. A chaque protéine purifiée est associée le puits du gel d'électrophorèse ayant permis sa caractérisation ; le gel est issu de la Figure 45A (voir chapitre 1).

En tenant compte de ces résultats et de la quantité de protéines purifiées pour chaque fraction, nous avons poursuivi la caractérisation des réponses humorales en se focalisant sur les protéines SFA-8 et Hel a 3 (déjà décrites comme allergéniques dans la littérature) et sur les protéines SESA2-1 et SESA20-2, qui permettent d'avoir un représentant des sous-unités SESAn-1 et SESAn-2 des protéines doubles précurseurs. Concernant les fractions protéiques issues du P40,

du fait de leur faible immunoréactivité, aucune fraction contenant des sous-unités de globuline 11S n'a été sélectionnée pour la suite de cette étude.

4. Analyse des réponses IgE et IgG1 spécifiques de SESA2-1, SESA20-2, SFA-8 et Hel a 3

Comme pour les réponses humorales mesurées contre l'extrait total de protéines de GT, nous ne mettons pas en évidence de différence significative entre les différents lots de souris sensibilisées pour les réponses IgG1 (**Figure 58A**) et IgE (**Figure 58B**) spécifiques de SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8.

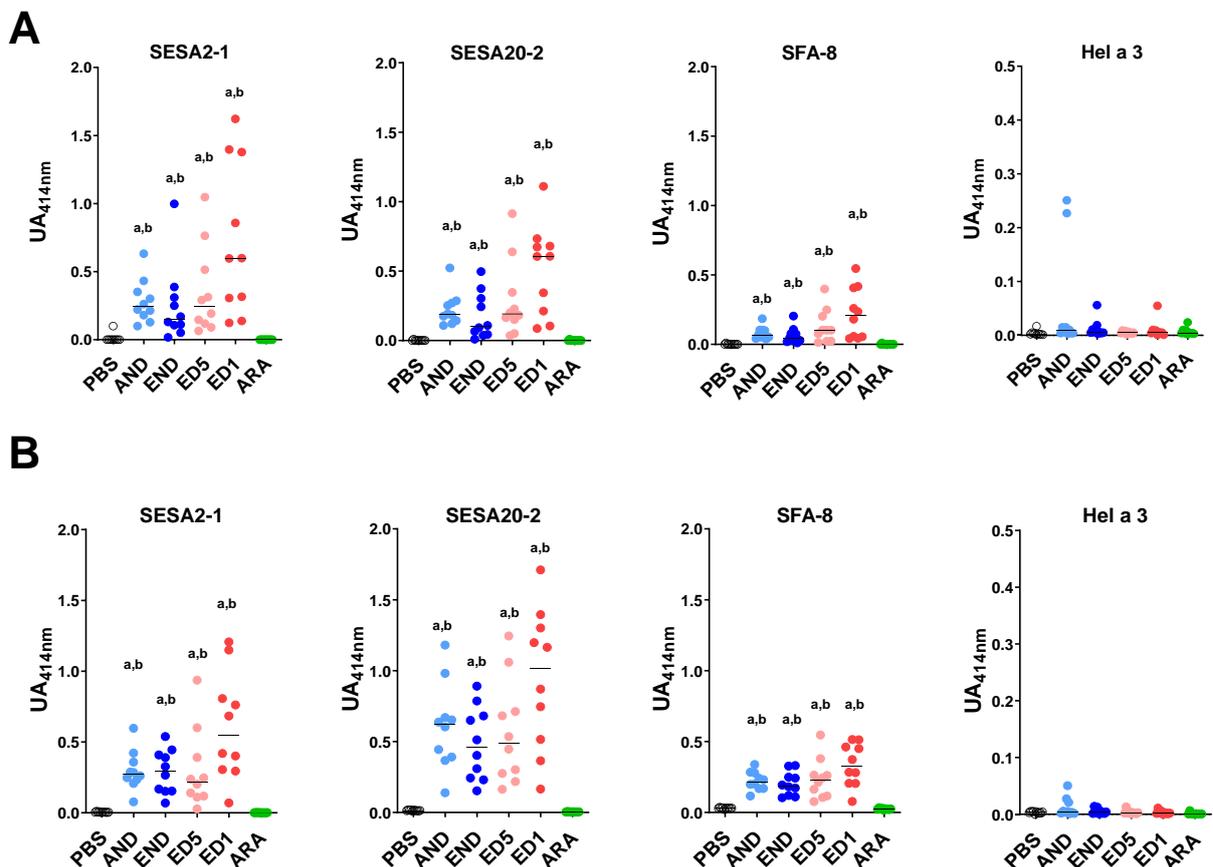


Figure 58. Réponses IgG1 et IgE spécifiques des protéines purifiées de GT

Les réponses IgG1 (A) et IgE (B) spécifiques de SESA2-1, SESA20-2, SFA-8 et Hel a 3 ont été mesurées chez les souris sensibilisées par v.o. à un extrait protéique d'amandes non délipidées (AND), d'écailles non délipidées (END), d'écailles délipidées (ED1 et ED5) ou d'arachide (ARA). Les sérums ont été dilués au 1/25 pour le dosage des IgE et au 1/1 000 000 pour les IgG1. Les données ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. « a », $p < 0,05$ vs PBS ; « b », $p < 0,05$ vs ARA.

L'immunoréactivité IgG1 de SESA2-1 et SESA20-2 est globalement 2 à 4 fois plus élevée que celle mesurée pour SFA-8, quel que soit le lot de souris considéré. Pour les réponses IgE, étant donné le format du dosage où le traceur utilisé est différent d'une SESA à une autre, il n'est pas possible de faire une comparaison directe entre les niveaux de réponses IgE.

Enfin, le niveau de sensibilisation contre Hel a 3 est extrêmement bas puisque seulement 4 souris sur 40 présentent une réponse anticorps significative contre la nsLTP. Aucune réponse spécifique des protéines de GT n'est observée chez les souris sensibilisées contre l'arachide.

5. Analyse de la réactivité croisée au sein des albumines 2S de GT

L'homologie de séquence entre les différentes SESA variant de 13 % à 92 % (**Tableau I, Introduction**), nous avons voulu caractériser la réactivité croisée entre albumines 2S. Des tests d'inhibition de la liaison IgE aux 3 principales SESA (SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8) ont ainsi été réalisés afin de déterminer la capacité inhibitrice de chacune des albumines 2S que nous avons pu isolées. Conformément à l'homologie de séquence entre les différentes SESA, nous observons une forte réactivité croisée entre celles-ci (**Figure 59**).

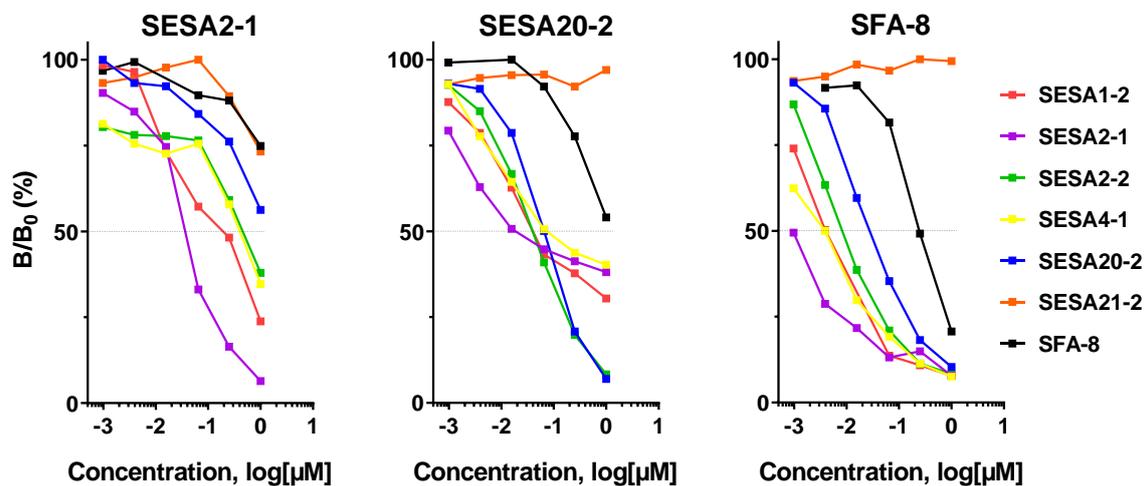


Figure 59. Analyse de la réactivité croisée entre les SESA (test de compétition)

La capacité des différentes albumines 2S à inhiber la liaison IgE à SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 a été évaluée à l'aide d'un pool de sérums de souris sensibilisées contre l'extrait protéique ED.

Pour la liaison IgE à SESA2-1, cette dernière est la seule à présenter une capacité inhibitrice maximale, mais certaines SESA peuvent inhiber jusqu'à 75 % de la liaison IgE. Pour la liaison IgE à SESA20-2, les albumines 2S SESA20-2 et SESA2-2 (partagent 92 % d'acides aminés identiques) présentent des capacités inhibitrices similaires. SESA2-1 ou SESA4-1 qui présentent une identité de séquence beaucoup plus faible de l'ordre de 30 % sont capables d'inhiber jusqu'à 50 % de la liaison IgE à SESA20-2. SESA21-2 ne présente aucune capacité inhibitrice, cela étant probablement dû au fait que cette protéine n'est qu'un fragment de 9,9 kDa, alors que la protéine mature entière devrait avoir une masse moléculaire théorique de 15,1 kDa. Enfin, SFA-8 présente une capacité inhibitrice toujours inférieure à celle des autres SESA, quelle que soit la liaison IgE inhibée, y compris celle à elle-même. Ces résultats suggèrent donc que la réactivité IgE de SFA-8 mesurée dans les tests précédents serait plutôt due à la liaison d'IgE spécifiques des autres SESA. L'affinité de ces IgE est donc probablement plus faible contre SFA-8 que contre les autres SESA ce qui explique la plus faible capacité d'inhibition de SFA-8.

6. Caractérisation des réponses cellulaires

La sécrétion de cytokines, en particulier d'IL-5 et d'IL-13 (profil T_H2) après réactivation *ex vivo* des splénocytes par l'extrait ED confirme bien la sensibilisation des souris qui ont reçu les extraits protéiques de GT par rapport à celles qui ont reçu le PBS ou l'extrait d'arachide (**Figure 60**). Comme pour les réponses humorales, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les lots de souris sensibilisées aux différents extraits protéiques de GT.

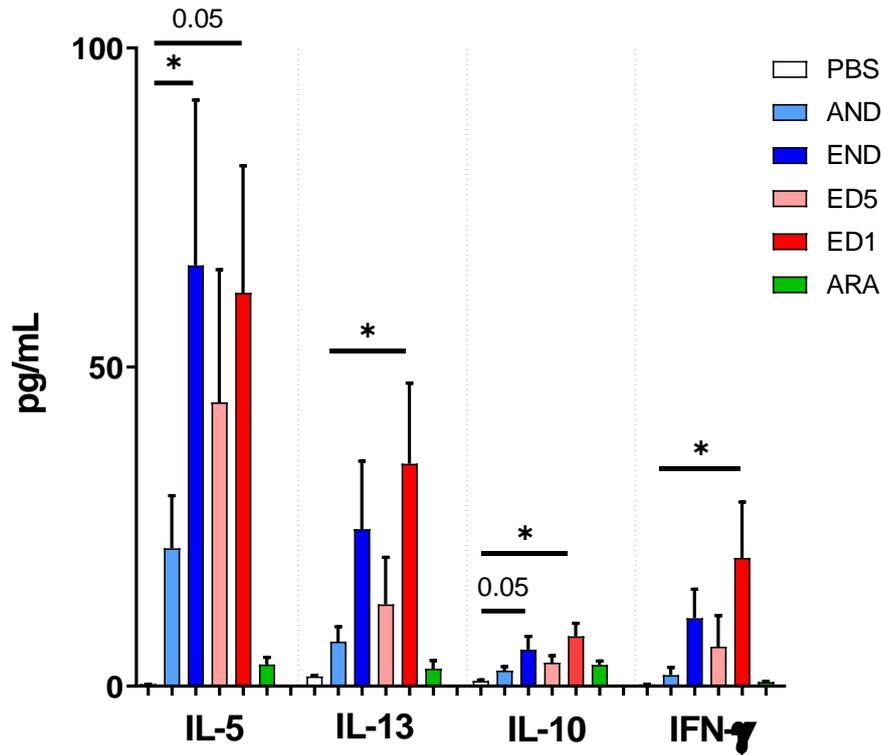


Figure 60. Sécrétion de cytokines par les splénocytes de souris sensibilisées par v.o. réactivés *ex vivo* avec un extrait total de protéines de GT.

Les splénocytes ont été réactivés par l'extrait d'écaillés délipidées, ED. Les résultats sont exprimés en pg/mL sous forme de moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett (vs PBS). « * », $p < 0.05$. AND, extrait d'amandes non délipidées ; END, écaillés non délipidées ; ED5 et ED1, écaillés délipidées ; ARA, d'arachide.

Enfin, nous confirmons la faible réactivité croisée potentielle entre les protéines de GT et les protéines d'arachide (**Figure 61**), puisque la réactivation des splénocytes par l'extrait d'arachide induit une sécrétion spécifique de cytokines uniquement chez les souris sensibilisées contre l'extrait ARA.

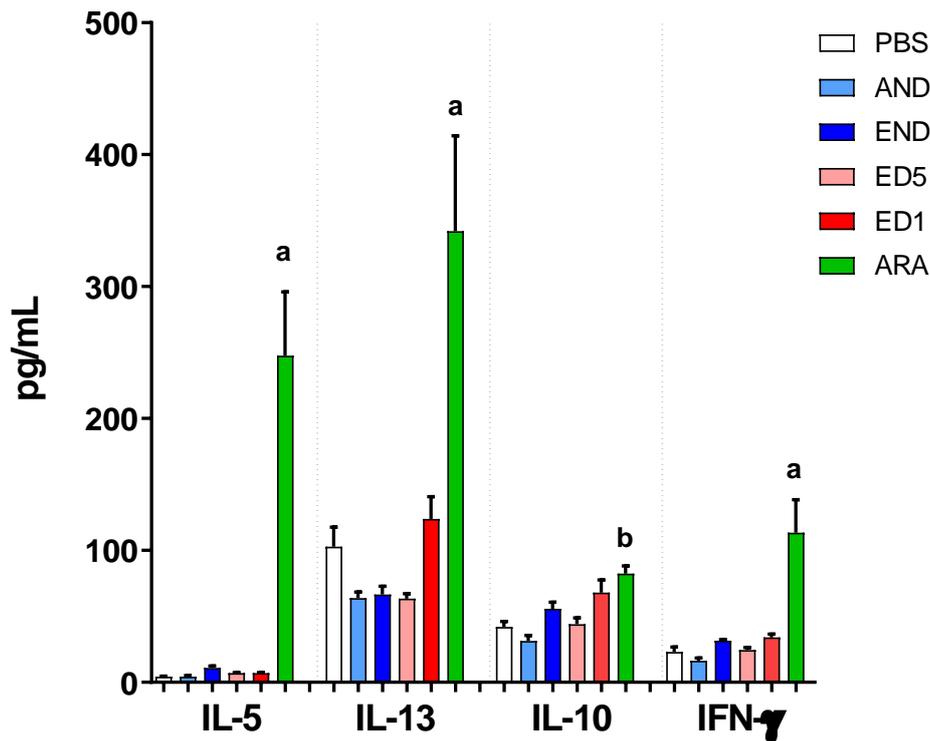


Figure 61. Sécrétion de cytokines par les splénocytes de souris sensibilisées par v.o. réactivés *ex vivo* avec un extrait d'arachide

Les splénocytes ont été réactivés par l'extrait de protéines totales d'arachide délipidé, ARA. Les résultats sont exprimés en pg/mL sous forme de moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. « a », significativement différent de PBS, AND, END, ED1 et ED5 ; « b », significativement différent de PBS, AND, END et ED5. AND, extrait d'amandes non délipidées ; END, écailles non délipidées ; ED5 et ED1, écailles délipidées ; ARA, d'arachide.

III. Conclusions

La sensibilisation par v.o. permet d'induire des réponses IgE et IgG1 plus élevées qu'en i.p., principalement dirigées contre les SESA. Les tests d'inhibition de la liaison des IgE aux protéines de GT ont montré que la réactivité IgE de SFA-8 est principalement due à une réactivité croisée avec les autres SESA (SESA1-2, SESA2-1, SESA2-2, SESA4-1, et SESA20-2). De ce fait, SFA-8 présente probablement un plus faible pouvoir sensibilisant que les autres SESA. Aucune réactivité croisée significative n'a été observée avec les protéines de GT et d'arachide. Hel a 3, qui est un allergène reconnu de la GT chez l'humain, apparaît comme peu immunogène dans le modèle souris. De même, comparées aux albumines 2S, les fractions du P40 contenant des sous-unités des globulines 11S apparaissent peu immunogènes et nous

n'avons pas mis en évidence de réponses IgE significatives. Nos résultats montrent que le pressage mécanique et la délipidation n'influe pas non plus sur le potentiel de sensibilisation des protéines de GT dans le modèle d'une sensibilisation orale. Nos résultats sont donc en accord avec l'étude de van Wijk *et al.* [211], qui montre, sur un modèle de souris C3H/HeOuJ sensibilisés à un extrait d'arachide délipidé ou non, que la présence des lipides n'influe pas sur le développement des réponses humorales (IgE, IgG1, IgG2a) et cellulaires spécifiques des protéines d'arachide. Les auteurs ont également testé deux doses différentes de protéines d'arachide délipidées par les gavages intragastriques (1 et 6 mg) et n'ont pas non plus observé de différence significative entre ces deux doses.

Pour la suite de l'étude sur le potentiel de sensibilisation d'isolats de GT, nous avons donc utilisé le modèle de sensibilisation par v.o. à la dose de 5 mg de protéines par gavage intragastrique et en présence de TC.

C. Comparaison du potentiel de sensibilisation de différents isolats de protéines de GT chez la souris

Le modèle de sensibilisation orale aux protéines de GT a été mis au point à l'aide de différents extraits protéiques générés au laboratoire afin de voir si la délipidation ou le pressage mécanique (écailles *vs* amandes) pouvait influencer sur le potentiel de sensibilisation des protéines de GT. Nous avons poursuivi l'étude en appliquant ce modèle souris à la comparaison du potentiel de sensibilisation de quatre isolats protéiques produits par le LRGP. Ces isolats correspondent à un extrait total de protéines de GT (SFS-WPI), à deux extraits enrichis en albumines 2S et en nsLTP (SFS-IS et SFS-AS) et à un dernier extrait enrichi en globulines 11S (SFS-IP). Cette étude a permis non seulement de comparer le potentiel de sensibilisation de différentes SESA et de vérifier la réactivité croisée IgE entre ces différentes SESA mais aussi de tester la résistance à la dégradation protéolytique des protéines de GT et de mesurer l'immunoréactivité IgE résiduelle des différents digestas. Les résultats de cette étude font l'objet d'un manuscrit actuellement soumis au *Journal of Molecular Nutrition and Food Research* (**Annexe**). Les données de sensibilisation des souris sont présentées dans ce chapitre alors que les données sur la digestibilité des protéines de GT seront présentées dans le Chapitre 4.

I. Matériels et méthodes

1. Extraits protéiques

Les isolats de protéines de GT ont été produits par le LRGP à partir d'écailles de tournesol selon le protocole décrit par Albe Slabi *et al.* [51]. Brièvement, l'extrait SFS-WPI (*whole protein isolate*) a été obtenu à partir d'un isolat total de protéines de GT. Les extraits SFS-IP (*isoelectric precipitate*) et SFS-IS (*isoelectric supernatant*) correspondent à des isolats obtenus après précipitation isoélectrique de l'extrait total de protéine de GT. L'extrait SFS-AS (*acidic supernatant*) correspond à un isolat contenant les protéines solubles après reprise des écailles en eau et acidification. Les protocoles du LRGP pour la préparation des différents isolats sont présentés plus en détail dans les annexes.

Afin de travailler dans des conditions homogènes pour les quatre isolats et pour faciliter l'administration par voie orale aux souris, les extraits des isolats ont été préparés en deux étapes afin d'optimiser la solubilisation des protéines. Dans un premier temps, les isolats ont été repris dans 20 volumes de tampon d'extraction (0,1 M borate de sodium pH 9 + 0,05 M NaCl + 0,9% n-Octyl- β -D-glucoopyranoside) pendant 4 h à TA, puis centrifugés (3000 x g, 20 min, 4°C). Le surnageant contenant les protéines solubles a été récupéré et le culot a été repris dans 10 volumes de tampon urée 4 M pour extraire les protéines moins solubles. Après centrifugation (3000 x g, 20 min, 4°C), le deuxième surnageant a été récupéré. Les deux surnageants ont ensuite été dialysés séparément contre du tampon phosphate de potassium 0,02 M pH 7,4 (3,5 kDa) puis mélangés et stockés à -20°C.

L'analyse électrophorétique des extraits confirme bien l'enrichissement de SFS-IS et SFS-AS en albumines 2S et en nsLTP ainsi que l'enrichissement de SFS-IP en globulines 11S par rapport à l'extrait total SFS-WPI (**Figure 62**).

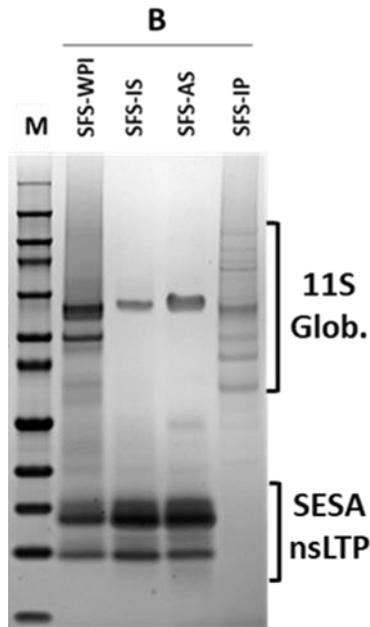


Figure 62. Analyse électrophorétique des isolats (SFA-WPI, SFS-IS, SFS-AS et SFS-IP)
 Le gel d'électrophorèse a été réalisé en conditions non réductrices. M, marqueurs de masses moléculaires.

2. Protocole de sensibilisation des souris

Le protocole de sensibilisation des souris aux différents extraits d'isolats est similaire à celui utilisé précédemment (**Figure 63**). Les souris ont reçu par sondage intragastrique 5 mg de protéines de GT et 10 µg de TC à J1, J8, J15, J22, J29 et J36.

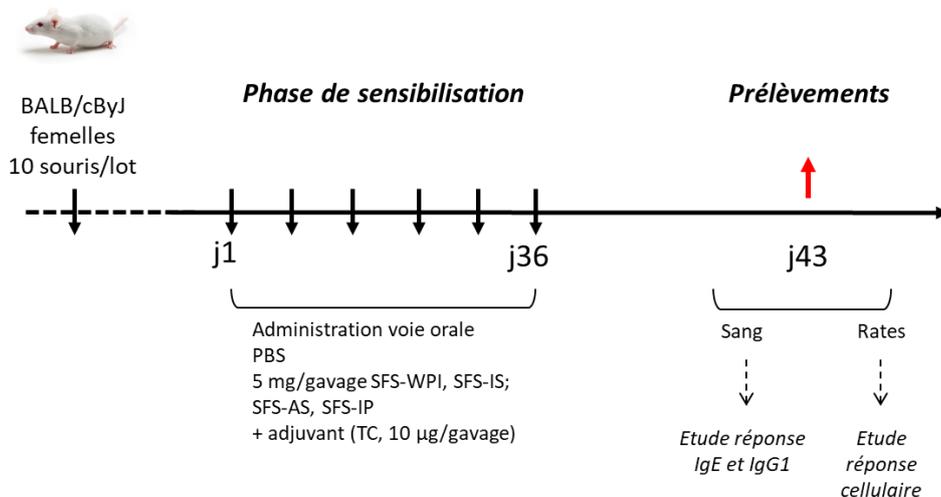


Figure 63. Protocole de sensibilisation des souris BALB/c par v.o. à différents isolats.

3. Réponses humorales

Le dosage des IgG1 spécifiques a été réalisé sur allergènes immobilisés, comme décrit précédemment. Le niveau des réponses IgG1 a été quantifié à l'aide d'un standard semi-quantitatif développé à l'aide d'un ELISA sandwich. Sur une plaque revêtue d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG/IgM de souris (Jackson Immuno Research, West Grove, PA), une courbe standard obtenue par dilution sériée d'une IgG1 de souris (clone 15H6, Southern Biotechnology Ass. Inc) a été déposée. La détection des IgG1 a ensuite été réalisée en parallèle des IgG1 spécifiques des protéines de GT en ajoutant des anticorps polyclonaux (Southern Biotechnology Ass. Inc.) de chèvre spécifiques des IgG1 de souris et couplés à l'AChE. Les données sont présentées en unités arbitraires (Ua).

Le dosage des IgE spécifiques a été réalisé à l'aide des traceurs SESA20-2, SESA2-1, SFA-8 et Hel a 3 biotinylées et comme décrit précédemment.

Les tests d'inhibition de la liaison IgE aux protéines de GT ont été réalisés dans les mêmes conditions que décrit précédemment. Outre les différentes protéines de GT, nous avons également testé un mélange équimolaire d'albumines 2S d'arachide, Ara h 2 et Ara h 6, qui ont été purifiées comme décrit précédemment [208, 212]. Les tests ont été réalisés à l'aide d'un pool de sérums des souris SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS.

4. Réponses cellulaires

La réactivation *ex vivo* des splénocytes a été réalisée dans les mêmes conditions que décrit précédemment. Les splénocytes ont été réactivés en présence d'ED (100 µg/mL), de SESA20-2, SESA2-1, SFA-8 ou Hel a 3 (20 µg/mL) ou de PBS comme témoin négatif. De la polymyxine B sulfate (50 µg/mL, Sigma Aldrich) a été ajoutée afin de neutraliser les endotoxines. Le dosage des cytokines sécrétées a été réalisé dans les mêmes conditions que décrit précédemment.

5. Analyses statistiques

Les réponses humorales ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. Les données de sécrétions de cytokines ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4.3. La différence est considérée significative pour une valeur de $p < 0,05$.

II. Résultats

1. Réponses humorales induites chez les souris sensibilisées

L'administration orale des différents isolats en présence de TC provoque bien l'induction d'une réponse humorale spécifique chez tous les lots de souris. En comparaison des souris SFS-IP, les souris ayant reçu les isolats contenant les plus fortes concentrations en albumines 2S, *i.e.* SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS, développent des niveaux de sensibilisation significativement plus élevés, quel que soit l'extrait protéique testé (**Figure 64A**). Les différences sont d'autant plus marquées que l'isolat est enrichi en albumines 2S, en particulier donc pour SFS-IS et SFS-AS. Ce profil de sensibilisation a été confirmé en mesurant les réponses IgG1 contre SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 où seuls les lots SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS développent des réponses IgG1 spécifiques de ces 3 albumines 2S (**Figure 64B**).

Il apparaît également que les souris qui ont reçu les isolats SFS-IS et SFS-AS produisent des niveaux significatifs d'IgG1 spécifiques de Hel a 3 (**Figure 64B**). Cette sensibilisation à Hel a 3 est également observée au niveau de la réponse IgE, bien qu'elle soit beaucoup plus faible que celles observées contre SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 (**Figure 65**).

Enfin, nous confirmons que les sous-unités des globulines 11S sont très faiblement immunogéniques par rapport aux albumines 2S puisque seule la réponse IgG1 contre la fraction P40-1, qui contient la SESA2-2, est comparable à celles dirigées contre les autres SESA (**Figure 64C**). Les réponses IgG1 spécifiques des fractions P40-2, P40-8 et P40-9 sont ainsi 20 à 100 fois plus faibles que celles observées contre les SESA.

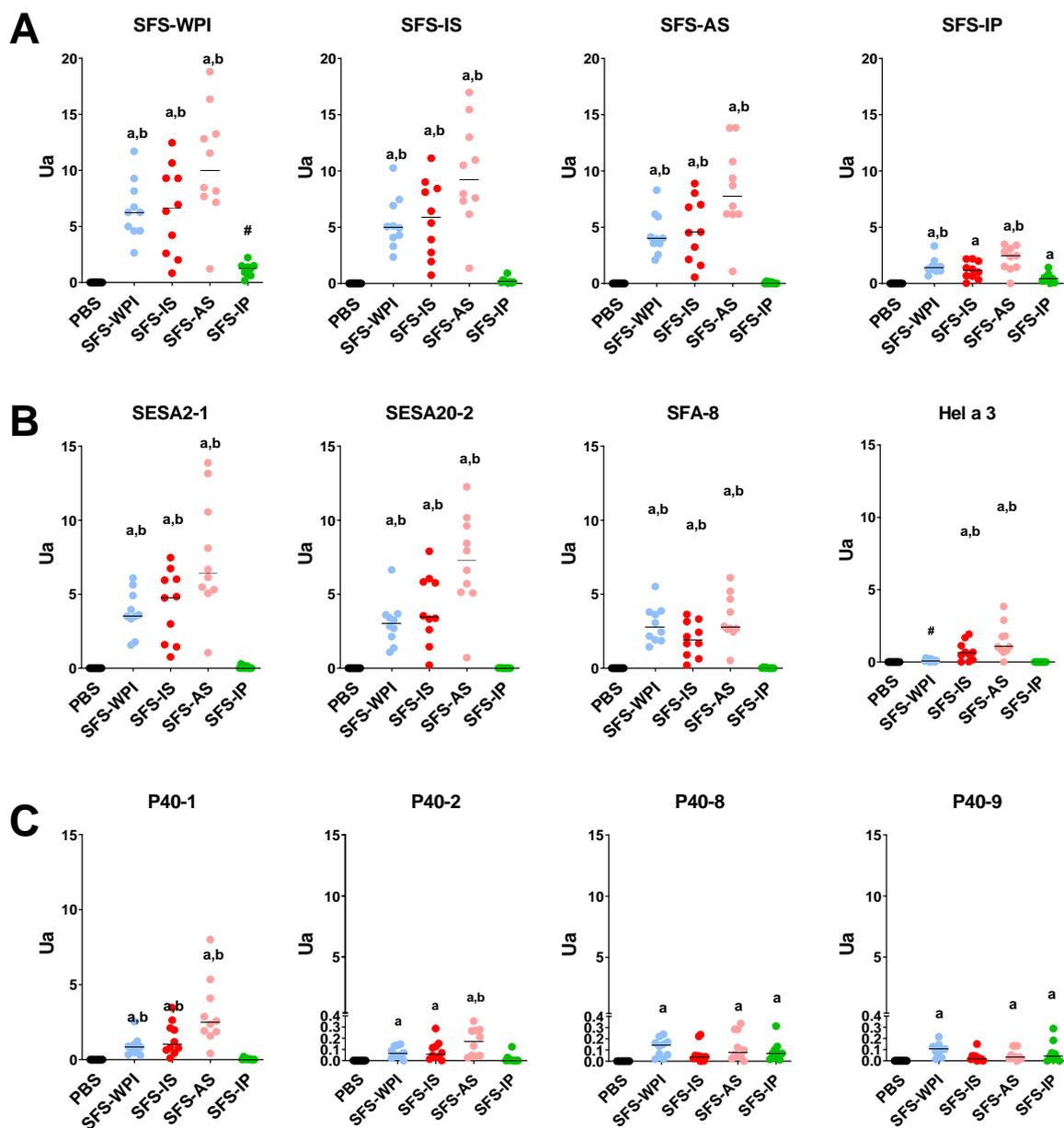


Figure 64. Réponses IgG1 spécifiques des protéines de GT chez les souris sensibilisées par v.o. aux différents isolats de GT.

Les réponses IgG1 spécifiques des extraits protéiques d'isolats (A), des albumines 2S SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 et de la nsLTP Hel a 3 (B) et de certaines fractions issues du P40 (C). Les sérums ont été dilués au 1/200,000. Les données ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. « a », $p < 0,05$ vs PBS ; « b », $p < 0,05$ vs SFS-IP.

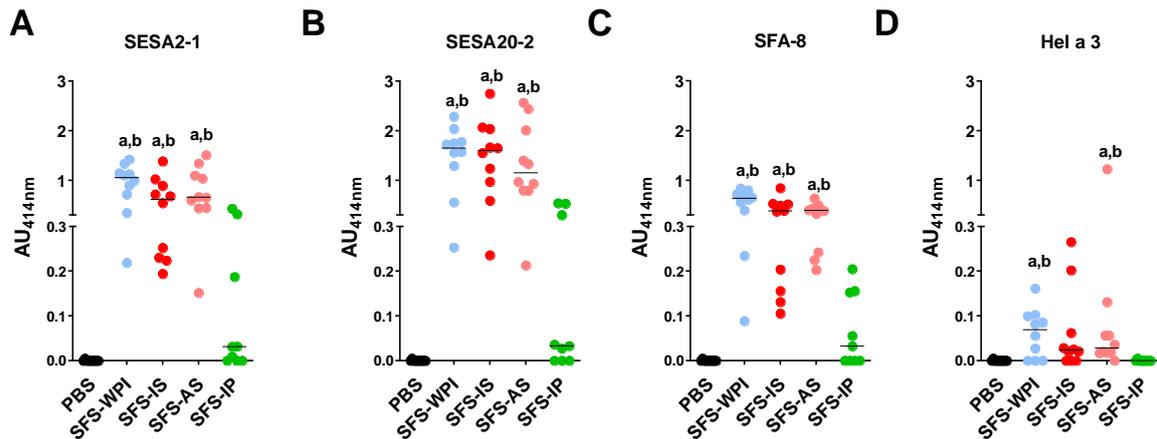


Figure 65. Réponses IgE spécifiques de des protéines purifiées de GT chez les souris sensibilisées par v.o. aux différents isolats de GT.

Les réponses IgE spécifiques des protéines purifiées SESA2-1 (A), SESA20-2 (B), SFA-8 (C) et Hel a 3 (D). Les sérums ont été dilués aux 1/25. Les données ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. « a », $p < 0,05$ vs PBS ; « b », $p < 0,05$ vs SFS-IP.

2. Analyse de la réactivité croisée au sein des albumines 2S de GT

Comme pour le protocole précédent, nous avons évalué la réactivité croisée IgE entre les différentes SESA (**Figure 66**). Les résultats obtenus avec le pool de sérums des souris SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS sont similaires à ceux précédemment obtenus avec le pool de souris ED. Nous confirmons donc la forte réactivité croisée entre les différentes SESA que nous avons observée avec les traceurs SESA2-1 et SESA20-2. Nous avons également testé le traceur biotinylé SESA1-2 et il apparaît que la plupart des SESA, à l'exception de SFA-8 et de SESA21-2, sont aussi capables d'inhiber plus de 50 % de la liaison IgE à SESA1-2. Comme précédemment, SFA-8 n'est capable d'inhiber de manière significative que la liaison à elle-même mais même dans ce cas, avec une efficacité plus faible que les autres SESA. Nous avons également testé la capacité inhibitrice d'un mélange d'albumines 2S d'arachide (Ara h 2 et Ara h 6) et en accord avec une très faible identité de séquence (moins de 25 %), nous n'observons pas de réactivité croisée significative entre les SESA et Ara h 2/6.

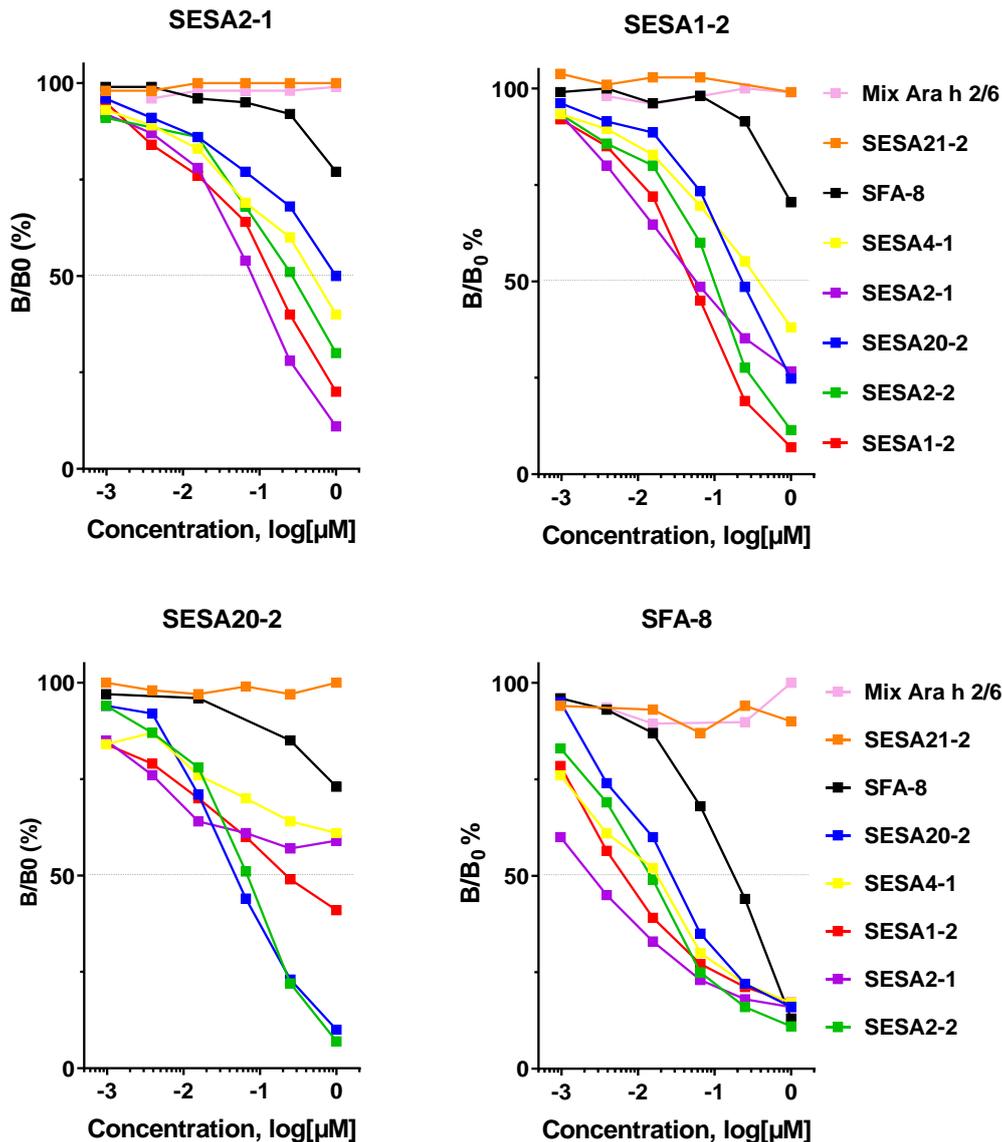


Figure 66. Analyse de la réactivité croisée entre les SESA (test de compétition). La capacité des différentes albumines 2S à inhiber la liaison IgE à SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 a été évaluée à l'aide d'un pool de sérums de souris sensibilisées contre SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS.

3. Réponses cellulaires

A la fin du protocole, les splénocytes ont été réactivés avec l'extrait total de protéines ED (**Figure 67A**) et avec les protéines purifiées SESA2-1 (**Figure 67B**), SESA20-2 (**Figure 67C**), SFA-8 (**Figure 67D**) et Hel a 3 (**Figure 67E**). En réponse à l'ED, les splénocytes des souris sensibilisées contre les isolats de protéines de GT sécrètent principalement de l'IL-5 et de l'IL-13 (T_H2) et plus faiblement de l'IL-10 et de l'IFN- γ . Aucune production spécifique de cytokines

n'a été observée chez les souris contrôles qui ont reçu le PBS. Les niveaux de sécrétions les plus élevés sont observés avec le lot de souris SFS-AS. Des profils similaires de sécrétion de cytokines ont été obtenus après réactivation des splénocytes avec les protéines purifiées. Comme pour les réponses humorales, les sécrétions de cytokines sont plus faibles avec Hel a 3 qu'avec les autres SESA. Enfin, le niveau de sécrétion d'IFN- γ est relativement faible avec SESA2-1, SESA20-2 et Hel a 3 mais il est plus élevé après réactivation avec SFA-8, à un niveau comparable à celui observé après réactivation avec l'ED et en particulier chez les souris SFS-IP.

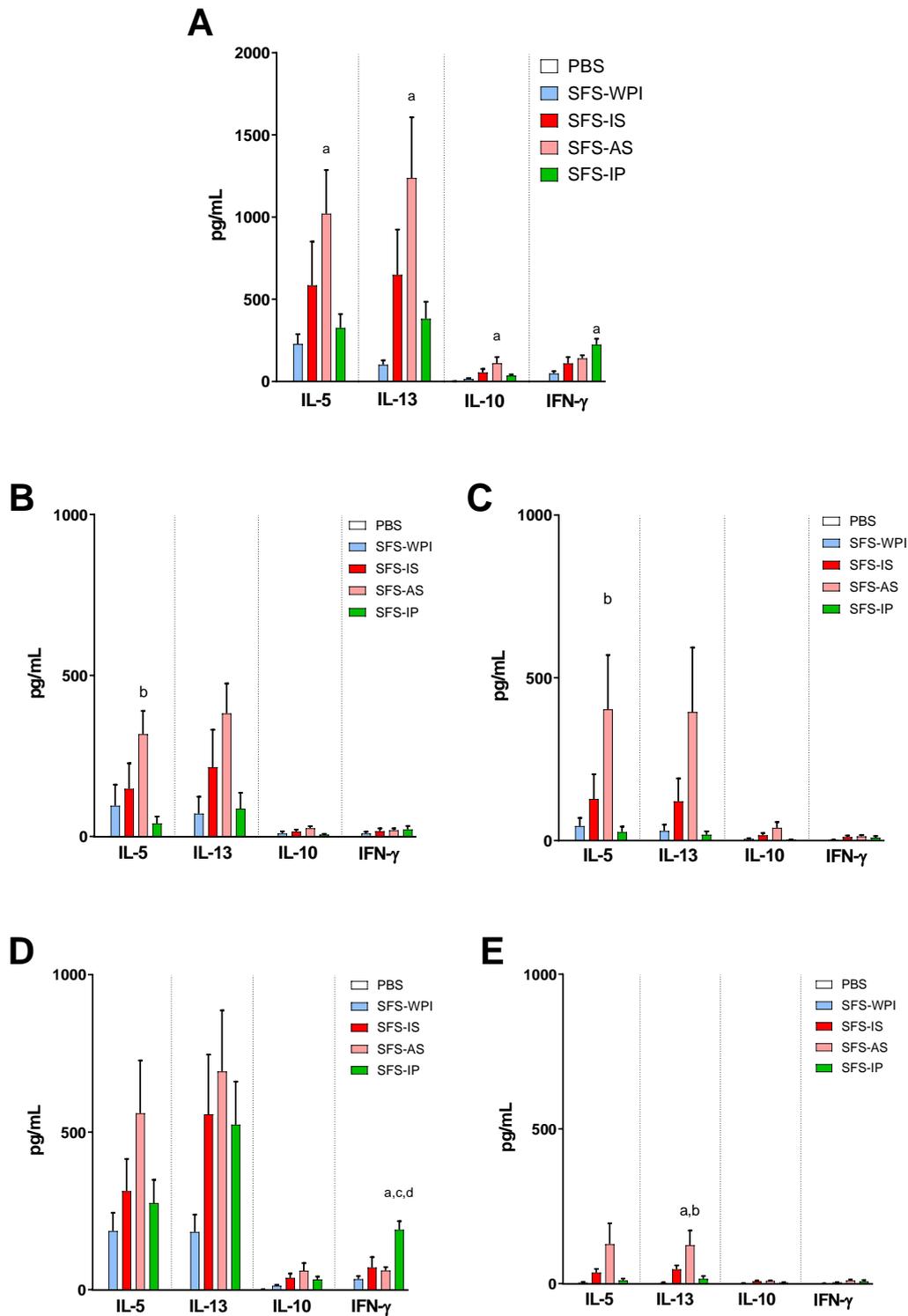


Figure 67. Sécrétion de cytokines par les splénocytes après réactivation *ex vivo*

Les splénocytes ont été réactivés *ex vivo* avec l'extrait de protéines totales ED (A), SESA2-1 (B), SESA20-2 (C), SFA-8 (D) et Hel a 3 (E). Les résultats sont exprimés en pg/mL sous forme de moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées à l'aide d'un test ANOVA suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. « a », significativement différent de SFS-WPI; « b », significativement différent de SFS-IP; « c », significativement différent de SFS-IS; « d », significativement différent de SFS-AS.

III. Conclusions

La caractérisation du potentiel de sensibilisation des isolats fournis par le LRGP a permis de confirmer nos résultats préliminaires obtenus lors de la sensibilisation orale des souris contre les extraits protéiques produits au laboratoire. Nous avons ainsi pu vérifier que le potentiel de sensibilisation des protéines de GT est principalement porté par les albumines 2S alors que les sous-unités de globulines 11S sont faiblement immunogéniques. De plus, une réponse IgE est bien induite contre SFA-8 mais, chez la souris, les autres SESA présentent un potentiel de sensibilisation beaucoup plus élevé. Ces résultats confirment donc ceux de l'étude de Kelly *et al.* qui montraient à l'aide d'immunoempreintes que des IgE de patients allergiques aux protéines de GT reconnaissaient bien d'autres protéines que SFA-8, avec une masse moléculaire variant entre 12kDa et 21 kDa [168]. Nous avons aussi mis en évidence la forte réactivité croisée entre les différentes SESA de GT et dans les deux protocoles de sensibilisation orale, SFA-8 présente une capacité inhibitrice de la liaison IgE toujours largement inférieure à celles des autres SESA. La réactivité IgE de SFA-8 est donc plutôt due à une réactivité croisée avec les autres SESA et ceci suggère que SFA-8 est sans doute une albumine 2S moins allergénique que les protéines homologues de GT. Ces résultats corroborent donc ceux de l'étude de Kean *et al.* qui indique également que SFA-8 a un plus faible potentiel allergénique que celui de l'albumine 2S de la noix du Brésil, Ber e 1 [169]. Dans cette étude, Kean *et al.* montrent en particulier que SFA-8 est capable d'induire, chez des cellules dendritiques murines, la production d'IL-12 et de TNF- α et de limiter ainsi le développement de réponses T_H2 au niveau des lymphocytes T. Même si notre modèle expérimental est assez éloigné, il est intéressant de noter que la réactivation par SFA-8 des splénocytes de souris sensibilisées aux protéines de GT induit des niveaux de sécrétion d'IFN- γ plus élevés que ceux obtenus après réactivation avec SESA2-1 ou SESA20-2. SFA-8 pourrait donc avoir certaines propriétés intrinsèques « pro-T_H1 » qui limiteraient son potentiel allergénique par rapport aux autres SESA. Ceci reste encore à être démontré au niveau des mécanismes cellulaires.

Contrairement au premier protocole de sensibilisation orale, les souris ayant reçu les isolats SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS ont cette fois développé une réponse humorale significative contre Hel a 3. Cette différence est très certainement due au fait que la concentration en Hel a 3 des différents isolats, en particulier SFS-IS et SFS-AS, est supérieure à celle présente dans nos premiers extraits protéiques. La réponse IgE contre Hel a 3 a été néanmoins trop faible pour pouvoir tester la réactivité croisée entre les différentes nsLTP isolées dans la GT ou provenant d'autres sources végétales. Cette faible réponse contre Hel a 3 est sans doute due à notre modèle

de sensibilisation par v.o. A notre connaissance, peu de modèles de sensibilisation contre une nsLTP ont déjà été publiés. Par exemple, un modèle murin de sensibilisation contre la nsLTP Pru p 3 (de la pêche) a récemment été décrit mais dans ce cas, les souris étaient sensibilisées contre la protéine pure, par voie intranasale et en présence de LPS comme adjuvant [213]. Finalement, l'utilisation de sérums de patients qui présentent un profil de polysensibilisation à différentes nsLTP, comme ceux observés dans les pays méditerranéens, reste sans doute la meilleure alternative, pour étudier la réactivité croisée entre Hel a 3 et les protéines structurellement homologues.

D. Conclusion et perspectives

En conclusion de ce chapitre sur le développement des modèles expérimentaux chez la souris, la voie de sensibilisation la plus efficace est la v.o. puisque la voie i.p. a abouti à de très faibles niveaux de sensibilisation. Ceci est certainement due à des doses de protéines injectées trop faibles. Toutefois, la voie orale de sensibilisation donnant de très bons résultats, il n'a pas été jugé utile de poursuivre le développement d'une autre voie d'administration.

Le modèle de sensibilisation par v.o. a donc confirmé le potentiel allergénique des deux allergènes de GT actuellement reconnus : Hel a 3 et SFA-8. Toutefois, de manière assez surprenante, ces deux protéines présentaient un potentiel de sensibilisation très inférieur à celui des autres SESA, telles que SESA2-1, SESA1-2 ou SESA20-2. Il devenait donc particulièrement intéressant de vérifier si le même phénomène pouvait être observé chez des patients allergiques aux protéines de GT. Dans cette optique, le principal apport du développement des modèles souris a donc été la mise en place des différents outils nécessaires à la caractérisation de la spécificité des réponses IgE, les sérums humains étant disponibles en trop faibles quantités pour effectuer ce type de mise au point. La production de fractions homogènes des différentes SESA, à notre connaissance pour la première fois, nous a permis de produire des traceurs biotinylés nécessaires à l'étude détaillée, chez la souris, des réponses IgE et de la réactivité croisée potentielle entre ces différentes entités. Alors que le modèle souris procure un modèle assez simple où l'animal n'est sensibilisé qu'à une seule source alimentaire, nous avons ensuite appliqué ces différents outils à la caractérisation de sérums de patients allergiques aux protéines de GT qui sont pour la plupart polysensibilisés à différents aliments.

Chapitre 3 : Analyse du profil de sensibilisation de patients

allergiques aux protéines de graines de tournesol

L'évaluation du potentiel allergénique des protéines de GT s'appuie notamment sur la caractérisation des réponses IgE de patients allergiques à cette source. Cette allergie étant rare en France, nous avons développé une collaboration avec une clinicienne allergologue espagnole : le Dr Marta Reche Frutos (Madrid), afin de pouvoir caractériser le profil de sensibilisation de certains de ses patients allergiques aux GT. Les volumes de sérums obtenus étant assez limités, nous avons également inclus dans cette étude des sérums commerciaux de la société PlasmaLab qui avaient été précédemment étudiés au laboratoire dans le cadre d'études portant sur l'allergie à l'arachide, la fève et d'autres sources de protéines végétales. Ces sérums commerciaux nous ont également permis de finaliser les tests de dosage des réponses IgE chez l'Homme.

A. Matériels et méthodes

I. Les sérums humains

Le Dr Marta Reche Frutos nous a envoyé les sérums de 33 patients espagnols, dont 19 sont allergiques aux GT. Le **Tableau 12** présente les données cliniques des patients. Il apparaît que la plupart des patients sont polysensibilisés et qu'ils présentent pour une très grande majorité d'entre eux une allergie aux fruits à coques. En comparaison, 14 sérums de patients tolérant les protéines de GT présentent également une allergie aux fruits à coques ou à la pêche. L'âge des patients varie entre 4 et 68 ans. Parmi les personnes allergiques aux protéines de GT, 52,6 % sont des hommes et sur toute la cohorte, 57,5 % sont des femmes. La plupart des patients présentent comme symptômes de l'urticaire, un syndrome oral et 4 ont fait une anaphylaxie. La sévérité des symptômes induits après l'ingestion des GT est légère dans 52,6 % des cas (10/19), modérée dans 15,8 % des cas (3/19) et sévère dans 31,6 % des cas (6/19). Cette sévérité n'est pas corrélée au niveau de la réponse IgE contre un extrait protéique total de GT (ImmunoCAP k84). Sur les 19 patients allergiques aux GT, 8 présentent une réponse IgE inférieure à 1 kU/L et parmi les 7 patients présentant une réponse IgE supérieure à 8 kU/mL, la symptomatologie

est légère pour 3 d'entre eux, modérée pour 2 autres et sévère pour les 2 derniers. Cette étude a été réalisée avec l'accord du comité d'éthique de l'hôpital Universitaire de La Paz (Madrid).

Au sein des sérums récupérés auprès de PlasmaLab (Everett, WA, Etats-Unis), les données de sensibilisation IgE indiquent que les donneurs sont tous polysensibilisés à différentes sources végétales (**Tableau 13**). Pour 2 échantillons (38 et 39), une sensibilisation aux protéines de GT est indiquée. Les sérums 34, 35 et 37 ont été précédemment impliqués dans une étude portant sur la réactivité croisée entre les protéines d'arachide et de fève. Les sérums 36 et 40 proviennent de patients sensibilisés aux protéines d'arachide et de soja. Ces sérums ont été sélectionnés en raison des réponses IgE que nous avons pu mesurer contre différents extraits de protéines de GT lors de screening préliminaires (données non montrées).

Tableau 12. Données cliniques des patients allergiques espagnols.

N° sérums	Age (ans)	Sexe	Symptômes*	Sévérité	Autres allergies connues	Test cutané positif	IgE (kU/L)**
1	58	H	AS	légère	Fruits à coque	Pollens	39,5
2	68	H	U	sévère	-	Pollens	0,4
3	40	F	U	sévère	Fruits à coque, fruits	Pollens	5,6
4	41	H	U	légère	Fruits à coque, fruits	Pollens	0,7
5	33	F	AN	sévère	Moutarde	Pollens de graminées	0,6
6	43	F	U	modérée	Fruits à coque	Pollens	0,6
7	29	H	U	légère	Fruits à coque, fruits	Pollens, chat, chien, acariens	1,3
8	6	H	U	légère	Fruits à coque, fruits, légumineuses	Fruits à coque, fruits, légumineuses, chat	27,2
9	8	H	U	légère	Fruits à coque, poisson	Pollens, fruits à coque, poisson	3,7
10	53	F	AN	sévère	Laitue	Pollens, chat	0,1
11	64	H	U	légère	-	Pollens, graines de tournesol	0,1
12	10	H	SO	légère	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque	2,2
13	46	H	SO	légère	Moutarde	Pollens, moutarde	0,8
14	29	H	AN	sévère	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque	8,9
15	15	F	U	modérée	Fruits à coque, pêche	Pollens, fruits à coque, laitue, pêche, cerise	11,4
16	5	F	U	modérée	Fruits à coque, fruits	Pollens, fruits à coque, fruits	45,1
17	14	F	AN	sévère	Fruits à coque, fruits, fruits de mer	Pollens, acariens	100
18	34	F	SO	légère	Fruits à coque, fruits, tomate, laitue	Pollens, chat, acariens	0,6
19	10	F	DA	légère	Fruits à coque, fruits	Pollens, fruits à coque, fruits	9,5
20	14	F	-	-	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque, chat	7,3
21	36	F	-	-	Fruits à coque, fruits	Pollens	0
22	6	F	-	-	Fruits à coque	Fruits à coque	0
23	12	F	-	-	Noisette	Pollens, noisette	0
24	11	F	-	-	Fruits à coque, pêche	Pollens, fruits à coque, pêche	0,5
25	9	H	-	-	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque	4,3
26	4	F	-	-	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque, chat, chien	0
27	15	H	-	-	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque, poisson, chat, acariens	0
28	8	F	-	-	Fruits à coque	Pollens, fruits à coque, œuf	0
29	6	H	-	-	Fruits à coque	Noix de cajou, pistache, saumon	0
30	45	H	-	-	Fruits à coque, moutarde	Pollens, fruits à coque, moutarde, chat,	0
31	11	F	-	-	Fruits à coque, noisette	Pollens, noisette, chat, chien	nd
32	5	F	-	-	Fruits à coque, pêche, lentille	Pollens, fruits à coque, lentille, pêche	0
33	34	F	-	-	Pêche	nd	nd

(*) symptômes après ingestion de GT ; (**), dosage ImmunoCAP contre un extrait de GT (k84) ; (H) Homme ; (F) Femme ; (An) Anaphylaxie ; (As) Asthme ; (U) Urticaire ; (SO) Syndrome oral ; (DA) Dermatitis atopique ; (nd) non déterminé.

Tableau 13. Données fournies par PlasmaLab sur les sérums étudiés

N° de sérum	N° PlasmaLab	Sexe/Âge	Sensibilisation rapportée
34	20247-LA	F/41	Blé, soja, arachide, fruits à coque, carotte, laitue, pomme, fève
35	20770-MH	H/23	Sésame, arachide, soja, carotte, fève, maïs, pin, noix de pécan
36	19392-CS	H/39	Soja, arachide, lait, blé, maïs, sésame
37	17006-RM	H/50	Sésame, arachide, soja, fruits à coque, blé, maïs, moutarde, fève, carotte
38	26885-AB	H/29	Soja, Fruits à coque, graine de tournesol, céleri
39	17025-NN	F/34	Arachide, lentille, pois chiche, pois, soja, noisette, graine de tournesol
40	30061-JZ	F/51	Arachide, fruits à coque, soja

(H) Homme; (F) Femme

II. Allergènes et extraits protéiques

Les réponses IgE ont été mesurées contre les albumines 2S purifiées SESA1-2, SESA2-1, SESA2-2, SESA20-2 et SFA-8, contre les nsLTP purifiées Hel a 3 et nsLTP9,4 et contre les sous-unités des globulines 11S contenues dans les fractions P40-7 et P40-9 (Chapitre 1).

Pour les tests d'inhibition de la liaison IgE, différentes protéines d'arachide et de pêche ont été testées sous forme naturelle ou recombinante. Les albumines 2S Ara h 2 et Ara h 6 ont été purifiées à partir d'arachide crue comme précédemment décrit [208, 214]. La nsLTP d'arachide Ara h 9 a été produite sous forme recombinante dans *Escherichia coli* au laboratoire par Céline Chapuis et Blanche Guillon et selon les conditions décrites précédemment pour la production d'Ara h 2 recombinante [215]. La nsLTP de pêche Pru p 3 a été produite sous forme recombinante dans *Pischia pastoris* et a été fournie par le Dr Araceli Diaz-Perales [216]. Les extraits protéiques de fève et de pois ont été réalisés au laboratoire dans des conditions similaires à celles décrites pour les extractions de protéines de GT (Chapitre I).

1. Détection des IgE spécifiques sur allergènes immobilisés

La concentration des IgE spécifiques a été dosée à l'aide d'un test EAST avec immobilisation des allergènes sur des plaques de microtitration (2,5 µg/mL). Après saturation en tampon EIA, les plaques ont été incubées avec 2 dilutions de sérums de patients (1/5 et 1/20) et incubées sur la nuit à 4°C. La présence d'IgE fixées à l'allergène est révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-IgE humaine (clone BS17) marqué à l'ACHé, incubé 4 h à TA et

sous agitation. Après ajout du réactif d'Ellman, les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 414 nm. Les concentrations d'IgE spécifiques sont déterminées de manière semi-quantitative à l'aide d'une courbe standard d'IgE humaine déposée sur une plaque recouverte d'un anticorps de capture anti-IgE humaine (clone LE27) et révélée avec l'anticorps marqué BS17-AChE [217]. Les concentrations sont exprimées en UI/mL.

2. Détection des IgE spécifiques par capture des IgE

Le dosage des IgE spécifiques a également été réalisé par capture préalable des IgE sériques *via* un anticorps monoclonal immobilisé sur la phase solide selon le même principe présenté au Chapitre 2. A. 4. L'anticorps monoclonal anti-IgE humaine (clone LE27) a été immobilisé sur la phase solide des plaques de microtitration (2,5 µg/mL). Après saturation en tampon EIA, des dilutions appropriées de sérum (entre 1/5 et 1/40) ont été déposées et incubées sur la nuit à 4°C. Après lavage, 0,05 nmol/mL de protéines purifiées marquées à la biotine ont été déposées pendant 4 h à TA. Après lavage, les plaques ont été incubées pendant 15 min avec de la neutravidine couplée à l'AChE, et après ajout du réactif d'Ellman, les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 414 nm.

3. Test de compétition de la liaison IgE

La réactivité croisée entre albumines 2S ou entre nsLTP a été évaluée à l'aide d'un test d'inhibition de la liaison IgE, selon le principe présenté au chapitre 2 et dans les conditions décrites précédemment [212]. Après avoir immobilisé sur plaque de microtitration l'anticorps monoclonal LE27 (2,5 µg/mL), des dilutions appropriées de sérum (entre 1/10 et 1/100) ont été incubées sur la nuit à 4°C. Après lavage, le test d'inhibition est réalisé en co-incubant le traceur biotinylé (0,05 nmol/mL en concentration finale) avec des concentrations décroissantes de compétiteurs (de 1 nmol/mL à 0,9 pmol/mL pour les protéines purifiées et de 10 µg/mL à 0,9 ng/mL pour les extraits protéiques). Les plaques sont incubées pendant 4 h à TA et sous légère agitation. Après lavage et ajout de neutravidine-AChE, la liaison IgE-traceur est révélée en ajoutant le réactif d'Ellman et les valeurs d'absorbance sont mesurées à 414 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison : B/B0, avec B0 correspondant à la liaison du traceur reconnu par les IgE immobilisées en l'absence de compétiteur et B correspondant à la liaison du traceur en présence de compétiteurs.

B. Résultats

1. Dosage des IgE sur allergènes immobilisés

Les réponses IgE spécifiques sont présentées dans le **Tableau 14**. Nous ne détectons des IgE spécifiques que pour 9 patients allergiques sur les 19 testés. Une réponse IgE contre Hel a 3 et/ou la nsLTP9,4 est observée pour 7 patients : 1, 3, 8, 15, 16, 17 et 19 et une réponse IgE contre une des SESA pour 6 patients : 1, 8, 9, 14, 16 et 17. Les réponses IgE contre les sous-unités de globulines 11S P40-7 et P40-9 ne sont observées que pour 4 patients et nous pouvons remarquer que dans ce cas, les patients sont aussi sensibilisés contre SFA-8.

Pour les patients tolérants, 5 cas de sensibilisations sont également observés mais à des niveaux qui restent relativement faibles ($< 1\text{UI/mL}$). Pour les sérums de PlasmaLab, les sensibilisations sont plutôt observées contre les nsLTP (sérums 36, 38 et 39) ou contre SFA-8 et P40-7/9 (sérums 34, 35, 37 et 40).

Ce format de dosage semble donc être relativement peu sensible puisque nous n'avons détecté des réponses IgE significatives que pour ceux présentant une réponse IgE en ImmunoCAP supérieure à 5 kU/mL . Cela tient du fait d'une part que beaucoup de patients présentent des niveaux d'IgE spécifiques très bas, voire à la limite de la significativité, même avec le dosage ImmunoCAP. D'autre part, ce faible niveau des réponses IgE nous a obligé à travailler avec des dilutions de sérums relativement faibles (1/5) ce qui augmente le risque de générer un signal non-spécifique élevé et d'être confronté au masquage des allergènes immobilisés par les IgG spécifiques. Nous avons donc utilisé un autre format de dosage qui passe par la capture des IgE totales et la détection des IgE spécifiques en utilisant des allergènes biotinylés.

Tableau 14. Réponses IgE spécifiques des protéines de GT sur allergènes immobilisés
Les réponses IgE spécifiques des protéines de GT sont exprimées en UI/mL.

n° sérum	IgE (kU/L)**	nsLTP		Albumines 2S					Globulines 11S	
		Hel a 3	nsLTP 9,4	SESA1-2	SESA2-1	SESA2-2	SESA20-2	SFA-8	P40-7 (s.u. 11S)	P40-9 (s.u. 11S)
1*	39,5	1,2	7,1	9,1	7,7	8,2	7,1	2,0	--	--
2*	0,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3*	5,6	3,5	1,7	--	--	--	--	--	--	--
4*	0,7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
5*	0,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6*	0,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
7*	1,3	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8*	27,2	5,4	1,2	--	0,4	0,5	0,7	2,1	0,8	0,4
9*	3,7	--	--	--	--	--	--	1,1	0,8	--
10*	0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11*	0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
12*	2,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13*	0,8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
14*	8,9	--	--	--	--	--	--	1,6	0,8	--
15*	11,4	5,6	3,8	--	--	--	--	--	--	--
16*	45,1	34,4	21,2	--	--	0,4	0,6	0,7	0,6	--
17*	100	--	0,7	46,6	33,6	49,2	41,4	9,6	3,3	3,0
18*	0,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
19*	9,5	3,2	1,8	--	--	--	--	--	--	--
20	7,3	--	--	--	--	--	--	0,5	0,8	0,5
21	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
22	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
23	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
24	0,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
25	4,3	--	--	--	--	--	--	0,8	0,7	--
26	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
27	0	--	--	--	--	0,4	--	--	--	--
28	0	--	--	--	--	--	0,7	--	--	--
29	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
30	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
31	nd	--	--	--	--	--	--	--	0,5	--
32	0	--	--	--	--	--	--	--	--	--
33	nd	--	--	--	--	--	--	--	--	--
34	nd	--	--	--	--	--	--	2,2	2,0	0,6
35	nd	--	--	--	--	--	--	4,2	2,6	0,8
36	nd	2,9	2,2	--	0,5	--	--	--	0,6	2,4
37	nd	--	--	--	--	--	--	1,6	1,9	1,5
38	nd	4,8	2,8	--	--	--	0,5	--	--	--
39	nd	12,5	4	--	--	--	--	--	--	--
40	nd	--	--	--	--	--	--	0,9	1	0,5

(*) patients espagnols diagnostiqués allergiques aux GT ; (**) fourni par le Dr Reche Frutos ; (--) < 0,39 UI/mL ; nd, non déterminé.

2. Dosage des IgE en format inverse

Pour ce format de dosage (**Tableau 15**), nous avons testé les 2 nsLTP isolées dans la GT (Hel a 3 et nsLTP 9,4) ainsi que SESA1-2, SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8. Ce test apparaît nettement plus sensible que le précédent puisque nous mettons en évidence une sensibilisation contre au moins une de ces protéines pour chacun des 18 patients allergiques aux GT (par manque de sérum, le sérum n°11 n'a pas pu être testé). Ainsi, 55,5 % des patients allergiques (10/18) présentent des IgE dirigées contre une nsLTP et 94,4 % d'entre eux (17/18) présentent des IgE dirigées contre au moins une des SESA de GT. A l'exception du sérum 17, le niveau de sensibilisation contre Hel a 3 est plus élevé que celui contre la nsLTP9,4 qui présente 68 % d'acides aminés identiques. Pour les SESA, 7 patients (1, 5, 6, 13, 15, 16 et 17) sont sensibilisés contre plusieurs SESA alors que 10 sérums présentent une sensibilisation contre une seule SESA. Une réponse IgE est détectée contre SESA2-1 uniquement pour les sérums 2, 3, 7 et 19, contre SFA-8 uniquement pour les sérums 8, 9, 12, 14 et 18 et contre SESA 20-2 pour le sérum 10. Il faut néanmoins reconnaître que pour les patients 2, 4, 10 et 12, le niveau de sensibilisation reste particulièrement faible.

Pour les sérums 36, 38 et 39 de PlasmaLab, dont la sensibilisation aux GT était bien indiquée pour les 2 derniers, nous observons également un profil de sensibilisation assez large, dominé par les réponses IgE contre Hel a 3. Les sérums 34, 35, 37 et 40 présentent une monosensibilisation contre SFA-8. Enfin sur 3 sérums de patients tolérant les GT, les sérums 31 et 33 sont négatifs et le sérum 25 présente une faible sensibilisation contre SFA-8, comme cela avait été déjà observé dans le dosage précédent.

L'objectif de ce dosage par capture des IgE était également d'identifier les sérums qui allaient permettre d'étudier les phénomènes de réactivité croisée IgE. Ainsi, ceux présentant les réponses les plus élevées contre Hel a 3 et les différentes SESA ont été sélectionnés pour réaliser les tests d'inhibition de la liaison IgE.

Tableau 15. Réponses IgE spécifiques des protéines de GT par capture des IgE
Les réponses IgE spécifiques des protéines de GT sont exprimées en mUA_{414nm}.

Patients n°	Hel a 3	nsLTP 9,4	SESA1-2	SESA2-1	SESA20-2	SFA-8
1*	++	++	+++	+++	+++	+++
2*	-	-	-	+/-	-	-
3*	++	+	-	+/-	-	-
4*	+/-	-	-	-	-	-
5*	-	-	+	++	++	-
6*	-	-	+	++	++	-
7*	++	+	-	+	-	-
8*	-	-	-	-	-	+
9*	-	-	-	-	-	+
10*	-	-	-	-	+/-	-
12*	-	-	-	-	-	+/-
13*	+	-	+	+	+	-
14*	+	-	-	-	-	+++
15*	+++	+++	++	++	+	+
16*	+++	++	++	++	+	+
17*	-	++	+++	+++	+++	+++
18*	+/-	-	-	-	-	+/-
19*	+++	+	-	+/-	-	-
25	-	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	+++
35	-	-	-	-	-	++
36	+++	+	-	+	+	++
37	-	-	-	-	-	+
38	+++	+	+/-	+	-	-
39	+++	+++	+	++	+/-	-
40	-	-	-	-	-	+++

(*) sérums de patients déclarés allergiques aux protéines de GT ; (-), [0-29] mAU ; (+/-), [30-49] mAU ; (+), [50-149] mAU ; (++) , [150-449] mAU ; (+++) [>450] mAU.

3. Analyse de la réactivité croisée IgE entre les nsLTP de GT, d'arachide et de pêche.

Les sérums 3, 15, 16 et 19 (patients allergiques aux GT) et les sérums 38 et 39 (PlasmaLab) présentaient, en format inverse, des réponses IgE suffisamment élevées contre Hel a 3 pour réaliser les tests d'inhibition.

Sur la **Figure 68**, nous mettons bien en évidence une réactivité croisée IgE d'une part entre les 2 nsLTP de GT et d'autre part entre Hel a 3, Ara h 9 et Pru p 3. Toutefois, ces phénomènes de réactivité croisée varient d'un patient à l'autre. Dans tous les cas, la nsLTP9,4 présente une capacité inhibitrice soit similaire, soit inférieure à celle de Hel a 3, en accord avec une identité de séquence entre les 2 protéines assez élevée de 68 %. Pour les sérums 3, 16 et 38, la liaison IgE à Hel a 3 est inhibée plus efficacement par Ara h 9 que par Hel a 3 elle-même. Ainsi, pour ces patients, la réactivité IgE de Hel a 3 est principalement due à la réactivité croisée induite par une sensibilisation primaire contre Ara h 9 (qui présente 48 % d'identité de séquence avec Hel a 3) ou une autre nsLTP plus homologue à Ara h 9 qu'à Hel a 3. Pour le sérum 38, nous avons pu tester Pru p 3 qui présente une capacité d'inhibition inférieure à celle d'Ara h 9 et similaire à celle de Hel a 3. Pour le sérum 15, Hel a 3 présente la plus forte capacité d'inhibition tandis que pour les sérums 19 et 39, Hel a 3 et Ara h 9 ont des profils d'inhibition similaires. Dans ces derniers cas, la sensibilisation à Hel a 3 n'est donc probablement pas le seul résultat d'une réactivité croisée avec une autre nsLTP. Pour le sérum 39, il apparaît aussi que Pru p 3 n'est pas capable d'inhiber totalement la liaison IgE à Hel a 3.

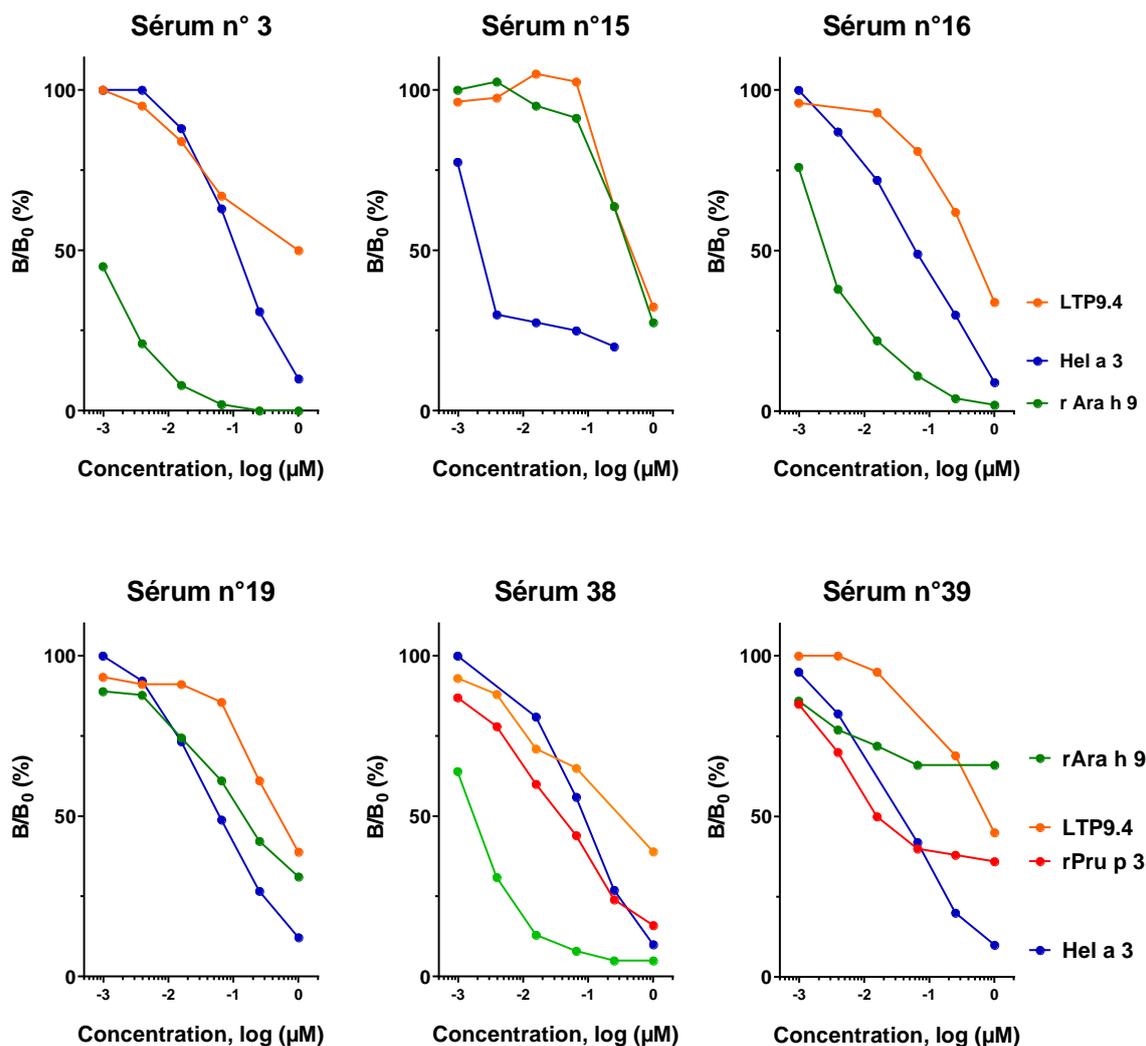


Figure 68. Etude de l'inhibition de la liaison IgE à Hel a 3 (tests de compétitions)
 La capacité des différentes nsLTP à inhiber la liaison IgE à Hel a 3 a été évaluée à l'aide de sérums de patients présentant de fortes réponses IgE spécifiques de Hel a 3 (voir Tableau 15).

4. Analyse de la réactivité croisée entre les SESA

Seuls les sérums 1 et 17 présentaient, comme dans le modèle souris, une forte sensibilisation aux 4 SESA testées : SESA1-2, SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 (**Figure 69**). Comme dans le modèle souris, les tests de compétition révèlent une forte réactivité croisée entre les différentes SESA. Nous observons ainsi une très forte réactivité croisée entre les SESA1-2, SESA2-1 et SESA20-2 alors que SFA-8 présente une capacité d'inhibition quasi-nulle pour l'inhibition de la liaison IgE à SESA2-1 et SESA1-2 et beaucoup plus faible dans le cas d'une inhibition contre elle-même. Les résultats du sérum 17 sont un peu plus complexes car ils révèlent la présence

de deux « populations » d'IgE : des IgE spécifiques de SFA-8 et des IgE spécifiques des autres SESA. Ainsi, une partie de la liaison à SFA-8 n'est sans doute pas due à de la réactivité croisée. Toutefois, dans ce cas, la liaison IgE résiduelle à SFA-8 apparaît de beaucoup plus faible affinité que celle due aux autres SESA. Comme dans le modèle souris, aucune réactivité croisée n'est observée avec les albumines 2S d'arachide.

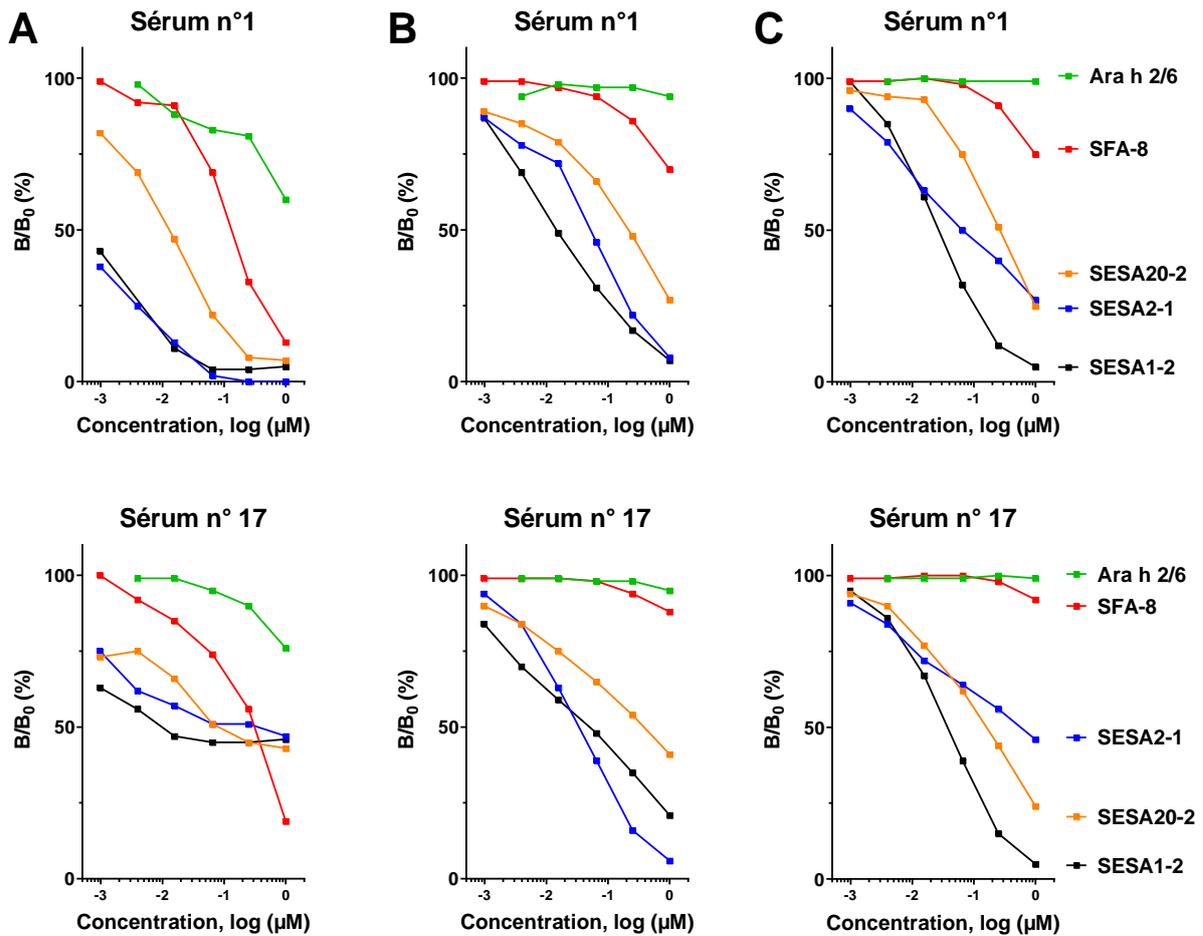


Figure 69. Etude de l'inhibition de la liaison IgE aux SESA (tests de compétitions)

La capacité des différentes albumines 2S à inhiber la liaison IgE à SESA2-1, SESA20-2 et SFA-8 a été évaluée à l'aide de sérums de patients présentant de fortes réponses IgE spécifiques des SESA (voir Tableau 15).

Dans le cas d'une monosensibilisation à SFA-8, la réactivité IgE de SFA-8 ne peut donc pas être imputée à une réactivité croisée avec les autres SESA. Parmi les patients allergiques aux GT, seul le sérum 14 présente un fort niveau de sensibilisation à SFA-8 sans réponse IgE détectée contre les autres SESA (pour les sérums 8, 9, 12 et 18, la réponse IgE contre SFA-8

étaient trop faibles pour réaliser des tests d'inhibitions fiables). Ce type de profil a également été observé avec les sérums PlasmaLab 34, 35, 37 et 40 dont la sensibilisation aux protéines de fève avait été démontrée précédemment pour 3 d'entre eux. Nous avons donc testé la capacité d'un extrait protéique de fève à inhiber la liaison IgE à SFA-8.

Dans la **Figure 70**, nous mettons en évidence que SFA-8 et l'extrait protéique de fève sont bien capable d'inhiber 100 % de la liaison à SFA-8 pour les sérums 14, 34, 35 et 40. A l'inverse, pour ces sérums, un extrait protéique de pois ou les SESA1-2 et SESA2-1 ne présentent aucune capacité inhibitrice. Nous vérifions aussi que, pour les sérums 1 et 17 où la réactivité IgE de SFA-8 est due à la réactivité croisée avec les SESA, l'extrait de fève n'est pas capable d'inhiber la liaison IgE à SFA-8. Ces résultats suggèrent donc que la réactivité IgE de SFA-8, dans les cas de « monosensibilisation », est sans doute due à une réactivité croisée induite par une protéine homologue présente dans l'extrait de fève mais pas dans l'extrait de pois.

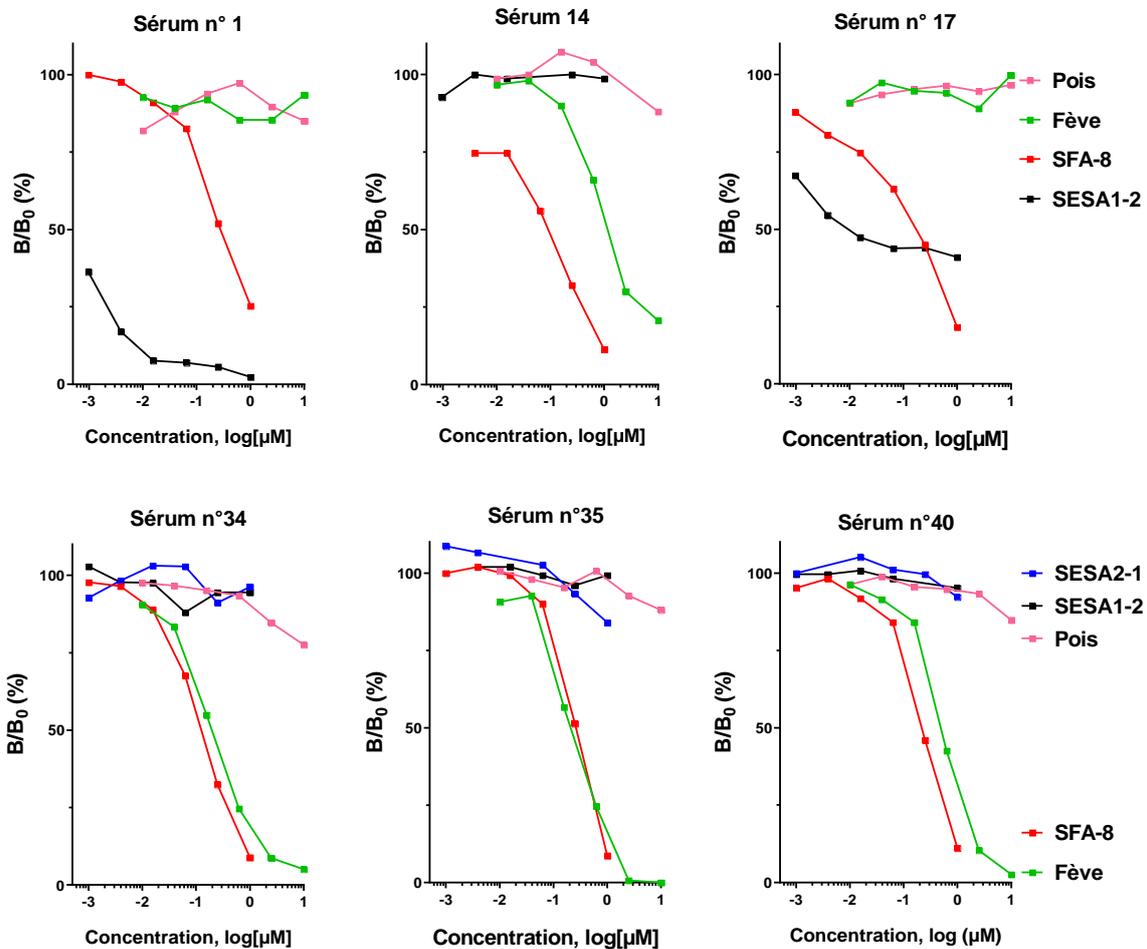


Figure 70. Etude de l'inhibition de la liaison IgE à SFA-8 (tests de compétitions)

La capacité des différentes albumines 2S et extraits totaux à inhiber la liaison IgE à SFA-8 a été évaluée à l'aide de sérums de patients présentant des réponses IgE spécifiques des SFA-8 (voir Tableau 15). Les concentrations sont données en log [μM] pour les protéines purifiées et en log [μg/mL] pour les extraits protéiques de fève et de pois.

Nous vérifions également que les extraits de fève et de pois, ainsi que SFA-8, ne sont pas capables d'inhiber la liaison IgE à SESA2-1 chez les patients allergiques aux GT 5, 6 et 16 (**Figure 71**). Ces résultats confirment donc que la réponse IgE contre SESA2-1 chez ces patients est probablement le résultat d'une sensibilisation dirigée spécifiquement contre cette SESA et pas le résultat d'une réactivité croisée avec une protéine d'une autre source végétale.

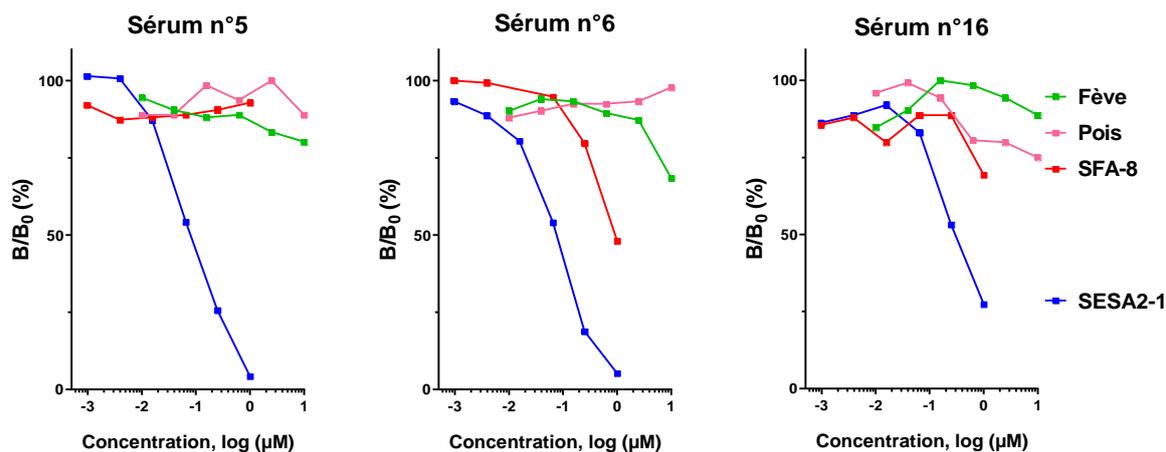


Figure 71. Etude de l'inhibition de la liaison IgE à SESA2-1 (tests de compétitions)
Nous avons étudié la compétition de la liaison IgE aux protéines purifiées marquées SESA2-1 par des quantités croissantes de compétiteurs (SFA-8, SESA2-1, et les extraits totaux de pois et de fève). L'ajout de compétiteur inhibe la liaison IgE aux protéines marquées. La capacité des différentes albumines 2S et extraits totaux à inhiber la liaison IgE à SESA2-1 a été évaluée à l'aide de sérums de patients présentant des réponses IgE spécifiques des SESA (voir Tableau 15). Les concentrations sont données en log [μM] pour les protéines purifiées et en log [$\mu\text{g/mL}$] pour les extraits protéiques de fève et de pois.

C. Conclusions

Les niveaux de sensibilisation IgE étant relativement très bas pour la majorité des patients, le dosage classique des IgE sur allergènes immobilisés s'est avéré assez peu sensible. Nous avons donc dû utiliser un système de dosage par capture des IgE pour pouvoir caractériser les réponses IgE spécifiques des allergènes de GT. Ce système a permis ainsi de mettre en évidence la sensibilisation des patients contre au moins une nsLTP ou une albumine 2S. Dans ce format, nous n'avons pas pu tester l'allergénicité des sous-unités de globulines 11S du fait de la difficulté de purifier ces entités à un niveau satisfaisant et à des quantités suffisantes. Comme cela était prévisible, les profils de sensibilisation IgE aux protéines de GT de patients polyallergiques sont beaucoup plus variables que ceux observés chez les souris monosensibilisées à un seul extrait protéique. Toutefois, bien que le nombre de patients ($n = 19$) soit relativement limité, il nous semble possible de discerner 3 catégories de patients en fonction de leurs réponses IgE.

Le premier groupe ($n = 7$) présente un profil dominé par une sensibilisation à Hel a 3 et il inclut les patients 3, 4, 7, 11, 15, 16 et 19. Pour ces patients, nous avons observé une forte

réactivité croisée entre les nsLTP de GT, d'arachide et de pêche. Etant donné que nous avons reçu tardivement Pru p 3, l'étude sera prochainement complétée pour évaluer la réponse IgE contre cet allergène chez tous les patients allergiques aux GT. Pour ces patients, l'allergie aux GT est donc probablement la résultante d'un profil de sensibilisation plus globalement dirigée contre les nsLTP, comme cela est fréquemment observé dans les pays du pourtour méditerranéen comme l'Espagne.

Le deuxième groupe (n = 7) présente un profil dominé par une sensibilisation à une ou plusieurs SESA (y compris SFA-8 dans certains cas) et il inclue les patients 1, 2, 5, 6, 10, 13 et 17. Les niveaux de sensibilisation ne sont pas forcément très élevés et nous n'avons pu tester la réactivité croisée entre les SESA que pour les sérums 1, 5, 6 et 17. Ce profil de sensibilisation se rapproche plus de celui observé dans notre modèle expérimental chez la souris. En effet, nous avons mis en évidence une forte réactivité croisée entre les différentes SESA et la réactivité IgE de SFA-8 (lorsqu'elle est observée) est alors due à la réactivité croisée avec les autres SESA. Ces résultats suggèrent donc que les patients de ce groupe se sont spécifiquement sensibilisés contre les protéines de GT et que leur allergie aux GT n'est donc probablement pas le résultat d'une réactivité croisée avec un autre aliment.

Enfin, un troisième groupe (n = 4) présente un profil de sensibilisation dominé par une réponse IgE contre SFA-8 et il inclue les patients 8, 9, 12 et 14. Dans ce cas, la réactivité IgE de SFA-8 ne peut être attribuée à la réactivité croisée avec les autres SESA mais elle pourrait être due à la réactivité croisée avec un autre allergène qui est présent dans l'extrait protéique de fève. Ce résultat est aussi confirmé par le fait qu'il était plus fréquent d'observer une faible réactivité IgE de SFA-8 lors des *screenings* préliminaires réalisés sur des sérums commerciaux de PlasmaLab, que contre les autres SESA. Dans ce cas, l'affinité des IgE de patients semble de plus forte affinité pour SFA-8, ce qui pourrait expliquer la réactivité clinique de ces patients. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir confirmer ces résultats par des tests de dégranulation de basophile ou de mastocytes murins humanisés (RBL SX-38) pour confirmer ces résultats. Malheureusement, ce type d'étude nécessite des volumes de sérums relativement importants que nous n'avons pas pour l'instant.

Chapitre 4 : Résistance des protéines de GT à la digestion

gastroduodéal *in vitro* et *in vivo*

A. Modèle de digestion gastroduodénale *in vitro*

La résistance d'une protéine alimentaire aux dégradations digestives est considérée comme un caractère prédictif de son allergénicité [176, 218, 219]. En accord avec les recommandations de l'EFSA [220], cette résistance estimée par des modèles de digestion *in vitro* est un des critères contribuant à l'évaluation du risque allergénique de nouvelles sources de protéine. Cette approche a été ici adoptée pour les protéines de GT et renforcée par l'étude de l'immunoréactivité des produits de dégradation résultant de ces digestions *in vitro*. Effectué à l'aide d'isolats et de protéines purifiées de GT, le modèle appliqué s'appuie sur le protocole de digestion *in vitro* développé par Mandalari *et al.* [221]. Il s'agit d'un modèle mimant la digestion des protéines dans un milieu gastrique mais aussi duodéal. L'immunoréactivité des différents digestas a été estimée à l'aide de sérums de souris sensibilisées aux GT (voir Chapitre II), et de sérums de patients allergiques.

I. Matériels et méthodes

1. Procédure de digestion gastroduodénale *in vitro*

Ce modèle de digestion *in vitro* est constitué de deux phases : la digestion gastrique basée sur une dégradation pepsique et la digestion duodénale mimée par des protéolyses à l'aide de l' α -chymotrypsine et de la trypsine.

La phase gastrique est initiée par la dilution de l'extrait protéique à 1 mg/mL dans un milieu simulant le fluide gastrique (NaCl 0,15 M pH 2,5). Après ajustement éventuel du pH à 2,5 à l'aide d'HCl, l'échantillon est pré-incubé à 37°C pendant 10 min. La pepsine (Porcine gastric mucosa pepsin, EC 3.4.23.1, Sigma, activity: 3300 U/mg) est ensuite ajoutée à raison de 182 U par mg de substrat protéique et l'échantillon est maintenu à 37°C sous agitation (300 rpm) pendant 60 min. Des aliquots sont prélevés avant ajout de la pepsine (T0) et à différents temps de la digestion gastrique (T1, 2, 5, 10, 20, 40 et 60 min). Le pH de chaque prélèvement est

immédiatement remonté à 8 par l'ajout de bicarbonate d'ammonium (0,5 M pH 8) afin d'arrêter la protéolyse pepsique et les aliquots sont immédiatement congelés et conservés à -20°C.

Après 60 min de digestion gastrique, la phase duodénale est débutée par l'ajustement du pH de l'échantillon à pH 6,5 à l'aide de NaOH 0,1 M et par les ajouts d'une solution de sels biliaires (4 mM final de sodium taurocholate et sodium glycodeoxycholate, 25 mM final de Bis-Tris à pH 6,5) et des enzymes de digestion, l' α -chymotrypsine (0,44 afin d'U/mg) et la trypsine (34 U/mg). L'ensemble est maintenu à 37°C sous agitation (300 rpm) et des aliquots sont prélevés à 1, 2, 5, 10, 20 et 30 min. La digestion de chaque prélèvement est arrêtée par addition d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (P8340, Sigma Aldrich). Les prélèvements sont conservés à -20°C.

Ces tests *in vitro* de digestion gastroduodénale ont été réalisés sur les différents isolats (l'extrait total de protéines de GT, SFS-WPI ; deux extraits enrichis en albumines 2S et en nsLTP, SFS-IS, SFS-AS et un dernier enrichi en globulines 11S, SFS-IP), ainsi que des protéines purifiées, deux albumines SFA-8, SESA2-1 et la nsLTP Hel a 3. Un extrait de protéines de lait de vache a également été incorporé dans l'étude en tant que contrôle.

2. Suivi de la digestion gastroduodénale *in vitro* par SDS-PAGE et spectrométrie de masse

Les digestas issus des isolats de GT ou du lait de vache ont été analysés sur gel Bis-Tris 4-12 % (NuPAGE™, Thermo Fisher Scientific) en conditions réductrices. Ceux issus de protéines purifiées ont été analysés sur gel d'électrophorèse Bis-Tris 12% en conditions réductrices et non-réductrices.

L'analyse des digestas des protéines purifiées SFA-8 et SESA2-1 a été complétée par MS (MALDI-TOF). Les analyses ont été réalisées sur des échantillons de digestion préalablement non réduits ou réduits avec du β -mercaptoéthanol avec un ratio 1/20 (% v/v). Les échantillons réduits ont été purifiés et concentrés sur des pointes de pipette ZipTip® C18 (Merck Millipore) selon les recommandations du fournisseur.

3. Evaluation de l'immunoréactivité des protéines purifiées après digestion

a) Compétition IgE-digestas à l'aide de sérums de souris sensibilisées aux GT

Les tests d'inhibition de la liaison IgE aux protéines de GT ont été mis en œuvre selon le principe et la méthodologie précédemment décrits (Chapitre 3). Ils ont été réalisés à l'aide du pool de sérums de souris sensibilisées aux isolats SFS-WPI, SFS-IS et SFS-AS. L'objectif était ici d'évaluer la capacité des différents digestas de SFA-8 et SESA2-1 à inhiber la liaison des IgE de souris à ces albumines. Dans ce cadre, les digestas obtenus à différents temps de la digestion gastrique (T0, T5, T20 et T60) et duodénale (T1, T5 et T30) ont été utilisés en tant que compétiteurs.

b) Compétition IgE-digestas à l'aide de sérums de patients allergiques aux GT

Ces tests ont été également appliqués afin de caractériser la réactivité IgE de digestas des protéines purifiées, SFA-8, SESA2-1 et Hel a 3, à l'aide de sérums de patients allergiques. Ils reprennent la méthodologie définie dans le Chapitre III. A. I. 3. b.

II. Résultats

1. Analyse des digestions d'isolats et de protéines purifiées

a) Digestion gastroduodénale des isolats

L'analyse électrophorétique des digestas de lait utilisés en tant que contrôle présentent les profils attendus (**Figure 72**) : la fraction protéique majeure du lait est composée de caséines, protéines très sensibles aux protéolyses. Lors de la phase gastrique de notre test, les caséines sont très rapidement dégradées et leurs bandes électrophorétiques (migrant à des masses proches de 30 kDa) disparaissent complètement dès la première minute de digestion. A l'inverse, la β -lactoglobuline, autre protéine abondante du lait, voit sa bande électrophorétique (migrant à 18 kDa) maintenue au cours de la digestion gastrique. En accord avec les données de la littérature, cette protéine s'avère être peu sensible à la protéolyse par la pepsine mais se trouve être progressivement dégradée lors de la phase duodénale [222, 223].

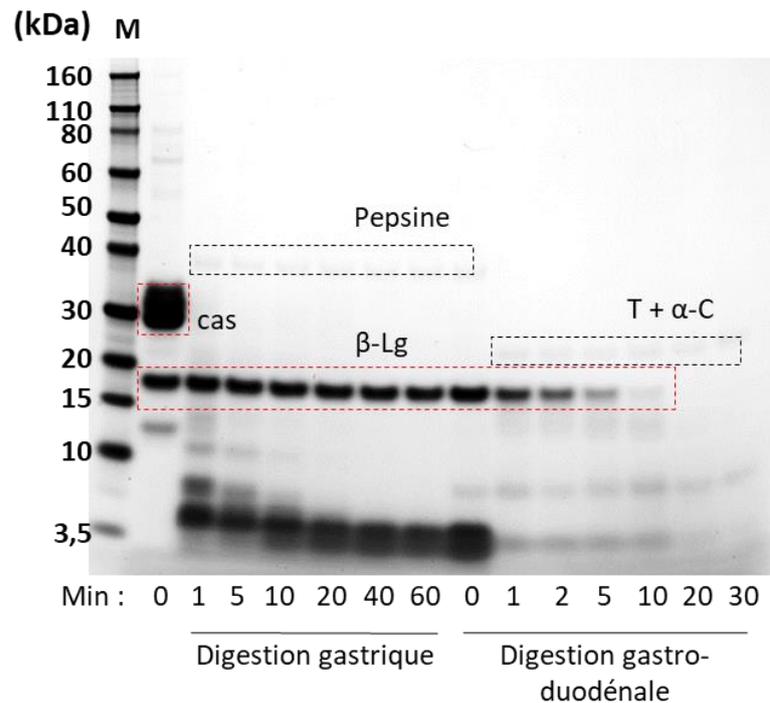


Figure 72. Analyse électrophorétique des digestions gastriques et gastroduodénales *in vitro* du lait de vache délipidé.

Analyse électrophorétique des digestas issus de la digestion gastroduodénale *in vitro* en conditions réductrices. β -Lg, β -lactoglobuline ; β -cas, β -caséine ; T, trypsine ; α -C, α -chymotrypsine et M, marqueurs de masses moléculaires.

Les digestas issus des isolats de tournesol présentent des évolutions variables de profils électrophorétiques, reflétant ainsi des résistances contrastées des différentes familles protéiques de GT aux dégradations digestives (**Figure 73A à D**). L'isolat SFS-WPI comprenant l'intégralité des familles protéiques voit ses composants de masses supérieures à 30 kDa disparaître très rapidement, à l'exception d'une bande mineure de 60 kDa (**Figure 73A**). Par contre, les entités de masse inférieure à 20 kDa sont maintenues lors de la phase gastrique mais sont en partie dégradées lors de la phase duodénale. Ces résultats suggèrent la bonne digestibilité gastrique des protéines extraites de l'isolat contenant principalement des globulines 11S, et la résistance à la pepsinolyse des isolats enrichis en albumines 2S et nsLTP. L'étude des trois autres isolats confortent ces hypothèses : l'isolat SFS-IP qui contient essentiellement des globulines 11S présente une disparition rapide des bandes correspondant à leurs différentes sous-unités dès la phase gastrique (**Figure 73B**). Au contraire, les isolats composés d'albumines 2S (SFS-IS et SFS-AS) n'ont pas ou peu de modifications de leurs profils électrophorétiques durant cette première phase (**Figure 73C et D**). Cependant la digestion duodénale a un impact

plus important sur la dégradation du contenu protéique de ces deux isolats. La sensibilité de leurs protéines apparaît variable avec une disparition rapide des composants de masses supérieures ou égales à approximativement 14 kDa. Parallèlement, il est à noter l'apparition conjointe de deux bandes entre 3,5 kDa et 10 kDa. Enfin, l'intensité d'une bande protéique migrant à une masse proche de 10 kDa évolue peu au cours de la dégradation duodénale.

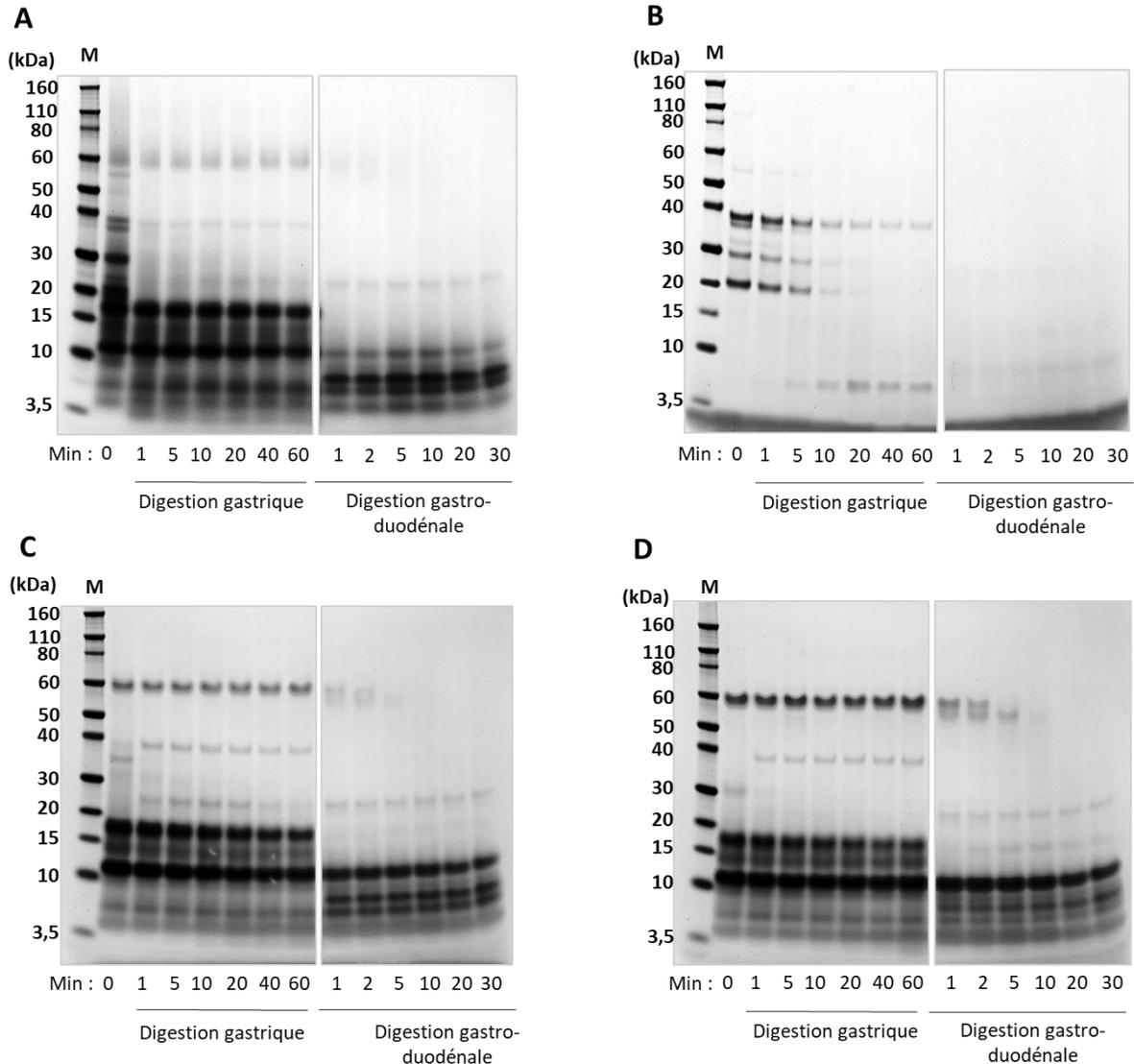


Figure 73. Analyse électrophorétique des digestions gastrique et gastroduodénale *in vitro* des isolats de GT.

Analyse électrophorétique des digestas issus de la digestion gastroduodénale des isolats SFS-WPI (A), SFS-IP (B), SFS-AS (C) et SFS-IS (D) en conditions réductrices. M, marqueurs de masses moléculaires.

b) Résistance des protéines purifiées Hel a 3, SFA-8 et SESA2-1 à la digestion gastroduodénale *in vitro*

Cette sensibilité différentielle aux dégradations gastroduodénales est retrouvée entre les différentes nsLTP et albumines 2S purifiées.

En effet, le suivi électrophorétique des digestas de Hel a 3, mené en conditions non-réductrices comme réductrices, ne montre aucune évolution de profil (**Figure 74**). La bande correspondant à Hel a 3 est maintenue au cours des différentes phases, gastrique et gastro-duodénale, soulignant, en cela, la forte résistance de cette nsLTP aux dégradations digestives.

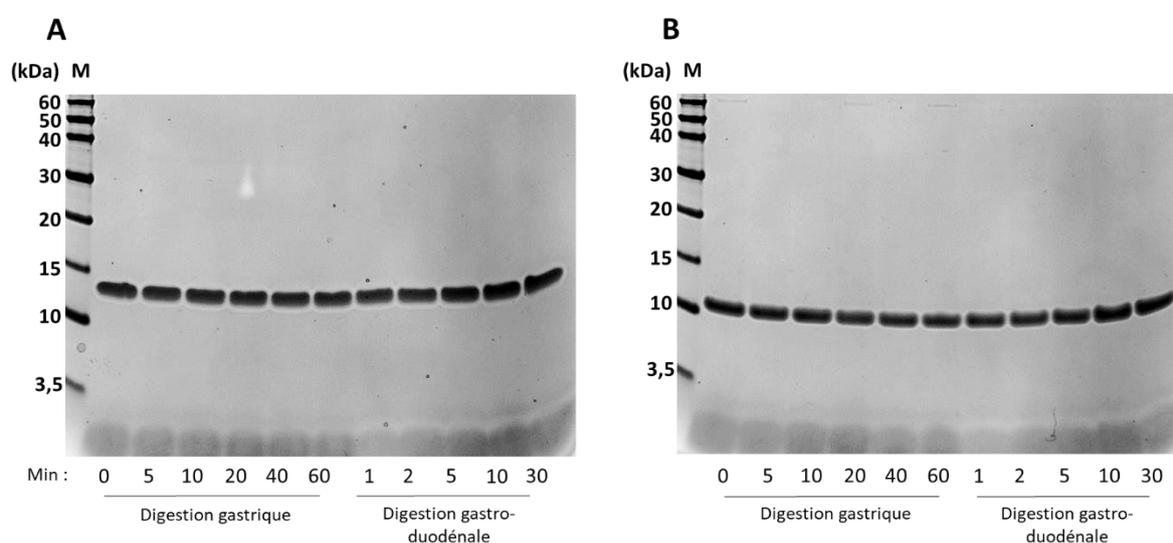


Figure 74 Analyse électrophorétique des digestions gastrique et gastroduodénale *in vitro* de Hel a 3.

Analyse électrophorétique des digestas issus de la digestion gastroduodénale de Hel a 3 en conditions non réductrices (A) et non réductrices (B). M, marqueurs de masses moléculaires.

Cette résistance, bien qu'amoindrie, reste importante avec SESA2-1. L'analyse électrophorétique effectuée, dans des conditions non réductrices, sur les différents digestas permet d'observer une seule bande pouvant correspondre à la forme non dégradée de SESA2-1 (**Figure 75**). En conditions réductrices, si cette bande unique est conservée durant la digestion gastrique, elle disparaît au profit de deux bandes migrant à des masses proches de 4,5 et 8 kDa lors de la phase gastro-duodénale. L'ensemble de ces profils observés indiquerait une dégradation ménagée de SESA2-1.

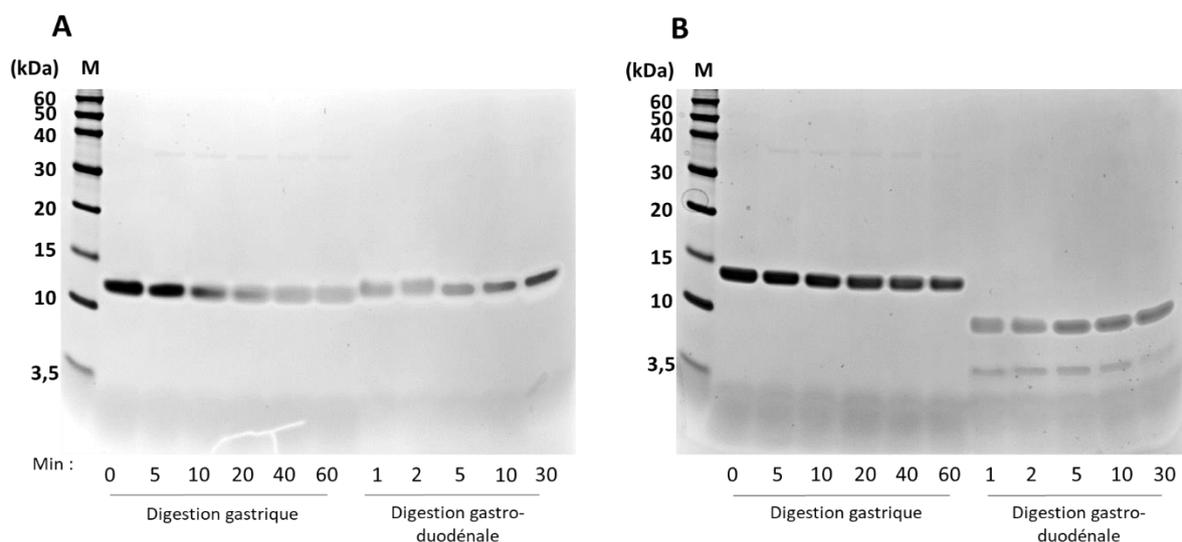


Figure 75. Analyse électrophorétique des digestions gastriques et gastroduodénales *in vitro* de SESA2-1.

Analyse électrophorétique des digestas issus de la digestion gastroduodénale de SESA2-1 en conditions non réductrices (A) et non réductrices (B). M, marqueurs de masses moléculaires.

Les spectres de masse de la protéine avant (T0) et après 60 min de digestion gastrique, confirment l'absence de dégradation importante de l'albumine SESA2-1 (**Figure 76**). Les spectres présentent des masses identiques correspondant aux différentes isoformes I et II de cette albumine 2S.

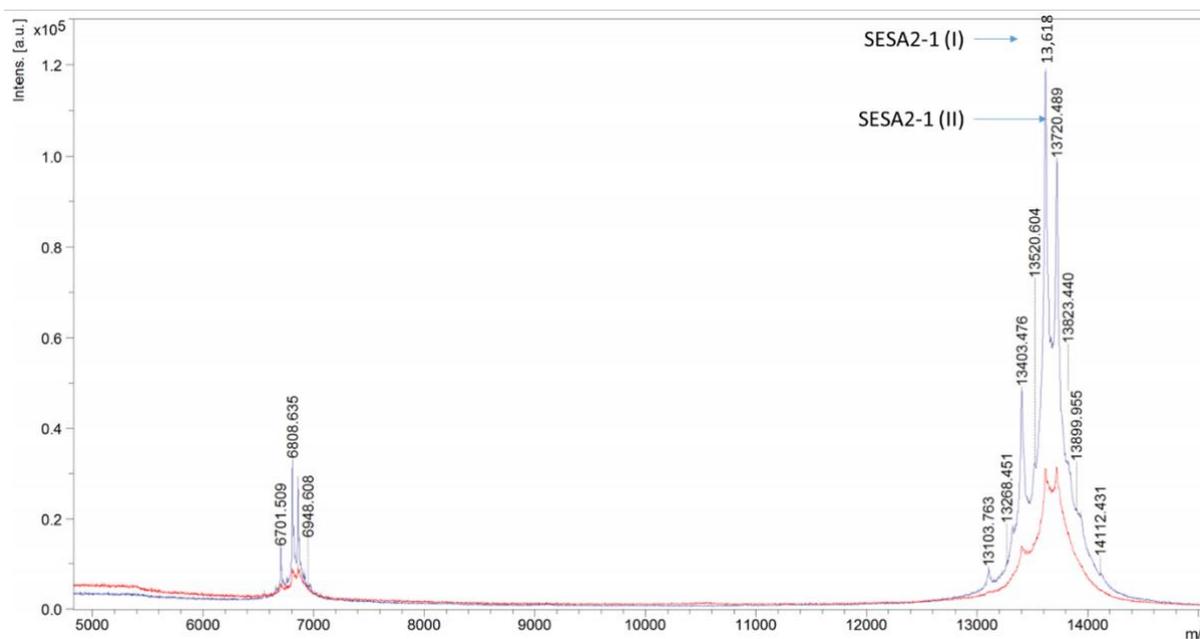


Figure 76. Analyse par MS des digestas de SESA2-1

Analyse par MS (MALDI-TOF) de SESA2-1 avant digestion (en bleu) et après 60 min de digestion gastrique (en rouge) en conditions non réductrices.

L'analyse par MS des digestas gastro-duodénaux (après réduction des échantillons au β -mercaptoéthanol), démontre l'existence de plusieurs groupes peptidiques hétérogènes, comprenant notamment des masses de 4,619 à 4,851 kDa et de 9,450 à 9,630 kDa (spectre non montré).

La seconde albumine 2S étudiée, SFA-8, présente là encore une sensibilité limitée aux dégradations digestives, comme l'attestent les analyses électrophorétiques. En conditions non réductrices, la bande électrophorétique pouvant correspondre à SFA-8 non digérée (migration à une masse proche de 9 kDa) persiste lors de l'intégralité des protéolyses gastro-duodénales (**Figure 77A**). Une seconde bande de masse légèrement supérieure apparaît progressivement au cours de la digestion gastrique et reste maintenue lors de la phase gastro-duodénale.

En conditions réductrices, l'intensité de la bande correspondant à la forme non-dégradée de SFA-8 diminue progressivement au cours de la digestion gastrique (**Figure 77B**). De façon concomitante, l'intensité d'une bande d'environ 4,5 kDa s'accroît. L'étude de la phase duodénale dans ces conditions électrophorétiques, démontre l'absence d'entités protéiques proches de 10 kDa et l'apparition rapide de deux bandes migrant approximativement à des masses de 4 et 6 kDa. Ces deux groupes peptidiques persistent tout au long de la dégradation gastro-duodénale.

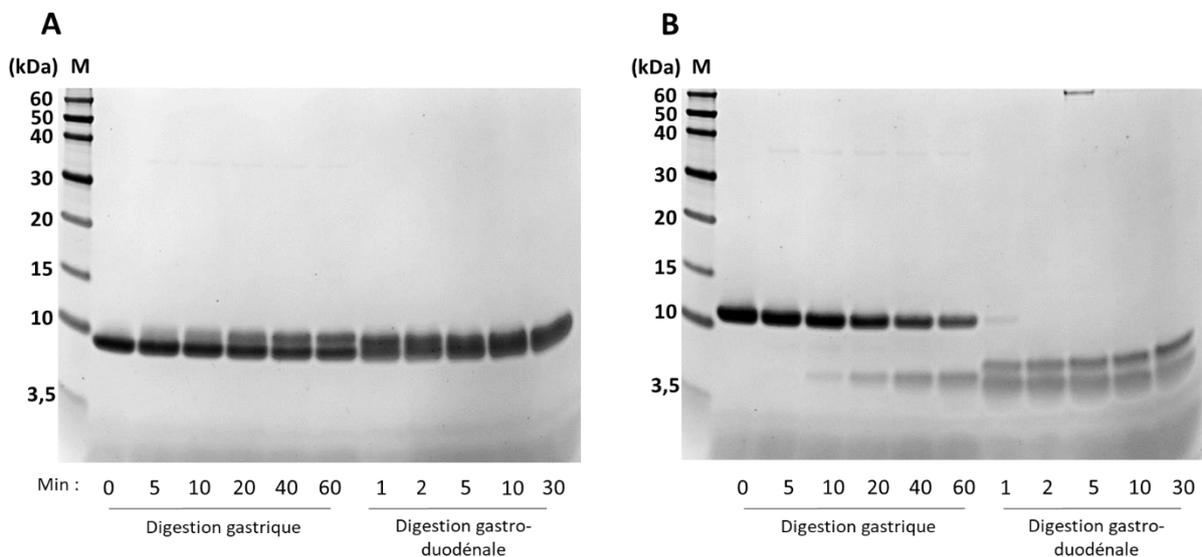


Figure 77. Analyse électrophorétique des digestions gastriques et gastroduodénales *in vitro* de SFA-8

Analyse électrophorétique des digestas issus de la digestion gastro-duodénales de SFA-8 en conditions non réductrices (A) et non réductrices (B). M, marqueurs de masses moléculaires.

L'analyse des digestas gastriques par spectrométrie de masse atteste de cette dégradation ménagée qui est visualisée par la conservation du pic à 12,148 kDa de la forme non dégradée de SFA-8 (**Figure 78A**). De plus, seuls des produits d'hydrolyse avec des masses importantes (8200 à 10150 Da) sont observés après 60 min de digestion trypsique. Par contre, les fragments issus de la digestion gastro-duodénale, visualisés après réduction des échantillons, présentent notamment des masses de 3350, 3557 et 4624 Da (**Figure 78B**).

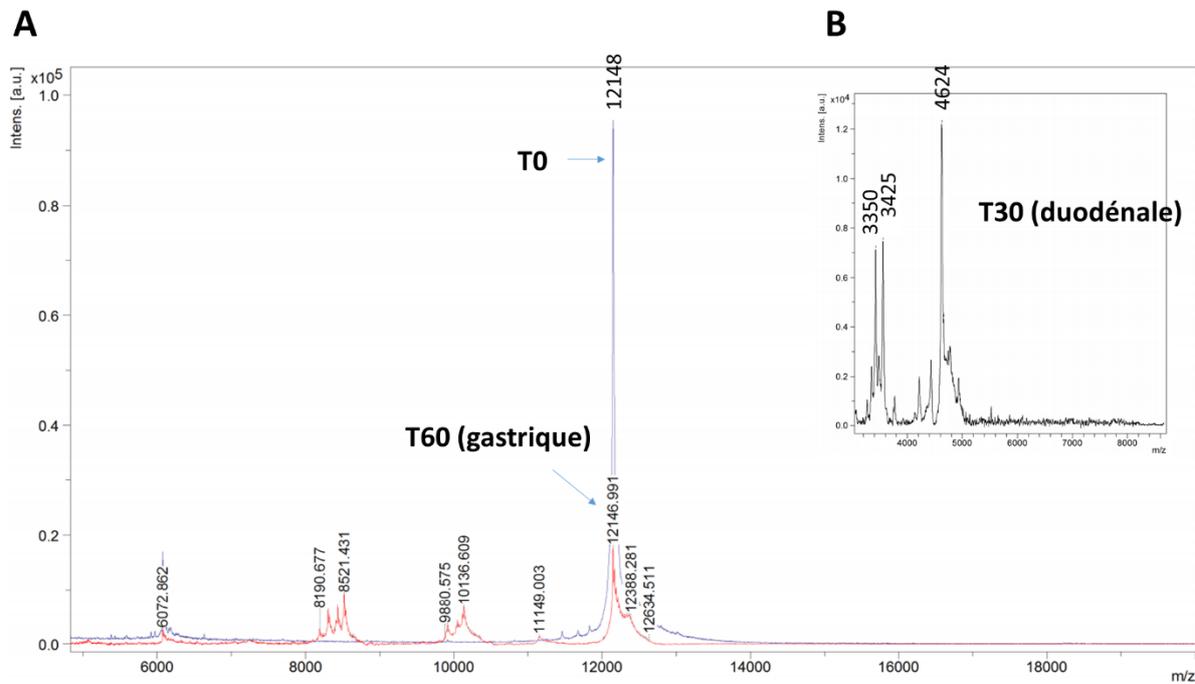


Figure 78. Analyse pas MS des digestas de SFA-8

Analyse par MS (MALDI-TOF) de SFA-8 avant digestion (en bleu) et après 60 min de digestion gastrique (en rouge) en conditions non réductrices (A) ; et des produits de la digestion gastro-duodénale (après 30 min) après réduction de l'échantillon (B). Les masses moléculaires sont exprimées en Da.

2. Analyse de l'immunoréactivité des digestas de protéines de graines de tournesol à l'aide de sérums de souris sensibilisées

L'immunoréactivité des digestas de SFA-8 et SESA2-1 a été évaluée à l'aide de tests d'inhibition de la liaison des IgE de souris aux protéines correspondantes SFA-8 et SESA2-1 (**Figure 79**). Pour chaque cas, les digestas gastriques et gastro-duodénaux présentent une capacité d'inhibition équivalente à celle observée avec la protéine native. Les courbes d'inhibition obtenues avec les différents compétiteurs se recouvrent fortement aussi bien lors de l'étude de la liaison des IgE à SFA-8 (**Figure 79A**) que de celle des IgE à SESA2-1 (**Figure 79B**).

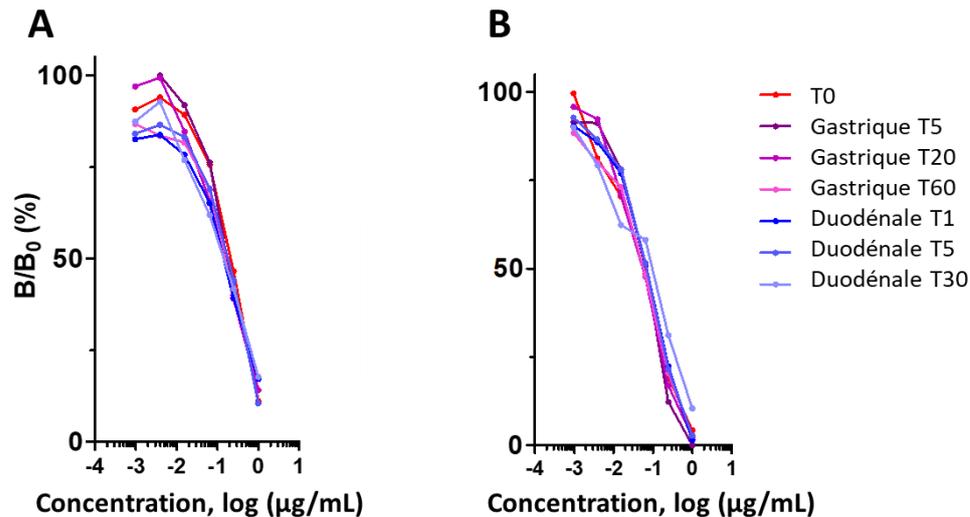


Figure 79. Inhibition de la liaison des IgE de souris à SFA-8 ou à SESA2-1 par les digestas des protéines correspondantes (tests de compétitions)

Inhibition de la liaison des IgE de souris (pool de souris sensibilisées aux protéines de GT) à SFA-8 (A) ou à SESA2-1(B) par les digestas gastriques et gastroduodénaux des protéines correspondantes.

3. Analyse de l'immunoréactivité des digestas de protéines de GT à l'aide de sérums de patients allergiques

L'immunoréactivité des digestas des protéines purifiées, Hel a 3, SFA-8 et SESA 2-1 a ensuite été évaluée à l'aide de sérums de patients allergiques. La sélection de ces sérums a été effectuée en fonction de leurs teneurs en IgE spécifiques et de leurs volumes disponibles pour mener à bien les tests.

L'inhibition de la liaison des IgE à Hel a 3 avec les digestas correspondants a pu être réalisée avec le sérum de trois patients allergiques (**Figure 80**). Pour chaque test, les courbes d'inhibition obtenues après les phases gastrique et duodénale, sont équivalentes à celle observée avec Hel a 3 non-digérée. Une telle conservation de l'immunoréactivité après digestion est conforme à la résistance de cette nsLTP aux protéolyses digestives *in vitro*.

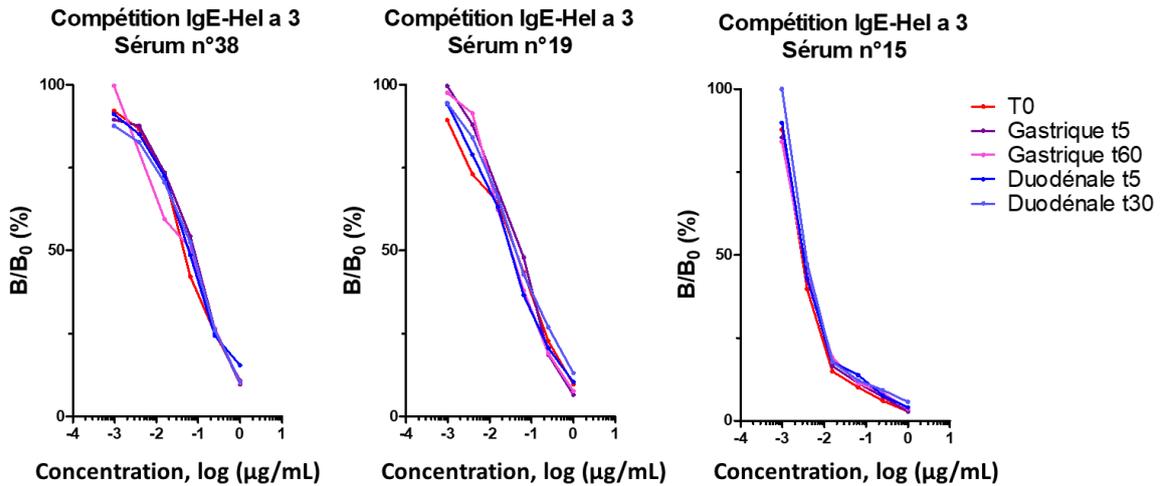


Figure 80. Inhibition de la liaison des IgE de trois patients à Hel a 3 par les digestas de Hel a 3 (tests de compétitions)

Inhibition de la liaison des IgE de trois patients qui possèdent des IgE spécifiques à Hel a 3 (voir Tableau 15) par les digestas gastriques et gastroduodénaux de Hel a 3.

Les tests d'inhibition de la liaison des IgE à SESA2-1 ou SFA-8 ont impliqué, pour chaque cas, deux sérums de patients allergiques (**Figure 81A, B et C**).

Les courbes d'inhibition obtenues avant et après dégradations gastroduodénales se recouvrent, attestant du fait que les digestas de SESA2-1 et SFA-8 conservent de fortes capacités à se lier aux IgE spécifiques. Toutefois, pour le patient n°34, la réactivité IgE des digestas de SFA-8 est sensiblement moindre que celle observée avec la protéine non digérée. La structure des épitopes reconnue par les IgE du patient n°34 pourrait avoir été partiellement impactée lors de la digestion gastroduodénale (**Figure 81D**).

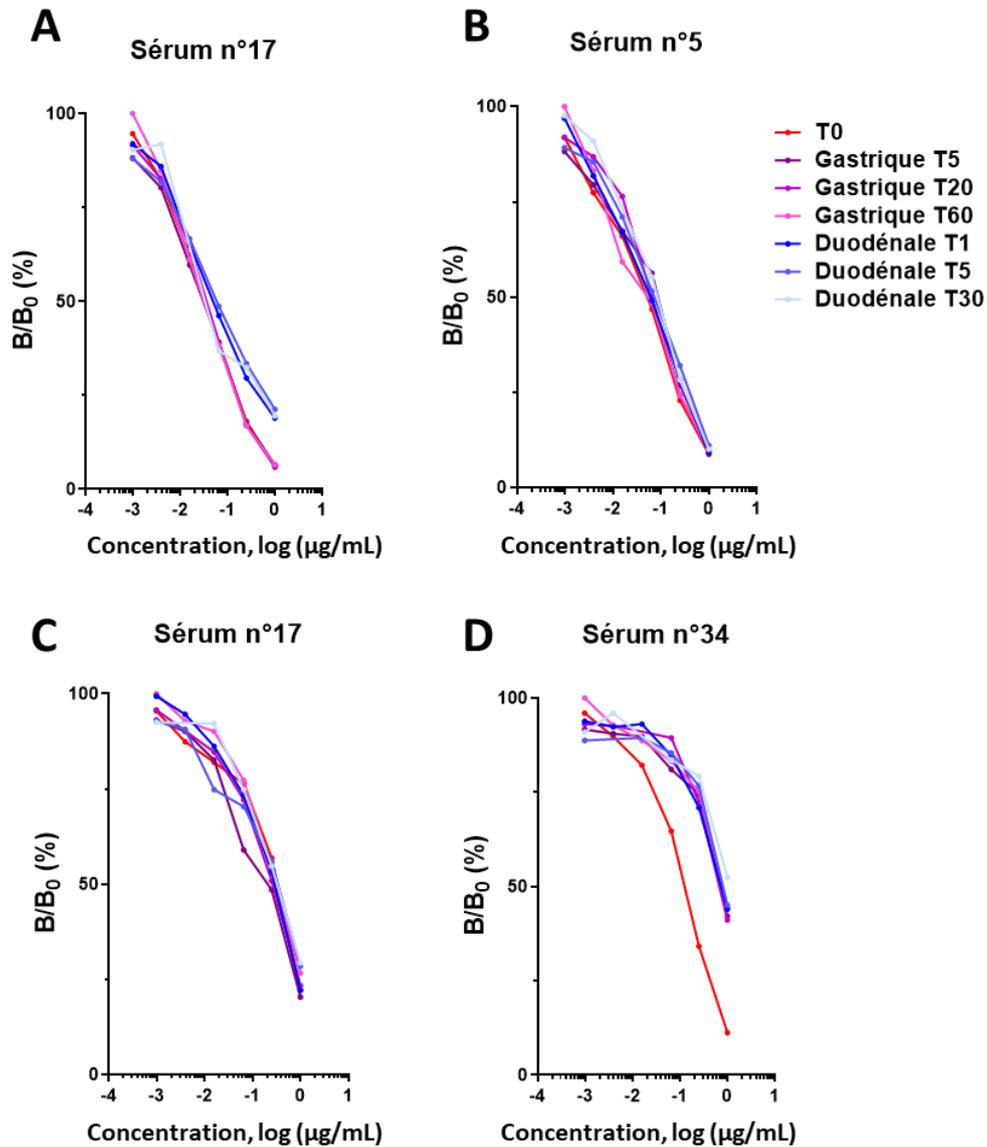


Figure 81. Inhibition de la liaison des IgE de deux patients SFA-8 et SESA2-1 par les digestas des protéines correspondantes (tests de compétitions)

Inhibition de la liaison des IgE de deux patients à SESA2-1 (A, B) ou SFA-8 (C, D) par les digestas gastriques et gastroduodénaux de SFA-8 et SESA2-1.

III. Conclusions

Les tests de digestion effectués aussi bien sur les isolats que sur des protéines purifiées démontrent des résistances diverses aux protéolyses gastriques et duodénales. Les globulines 11S sont peu résistantes à une digestion gastrique. La phase duodénale qui intensifie leurs dégradations, pourrait ainsi fortement limiter leur potentiel allergénique. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que les hélianthinines étaient peu immunoréactives dans le

modèle souris de sensibilisation aux GT ou lors de la mesure des IgE spécifiques chez des patients allergiques.

A l'inverse, la forte résistance de Hel a 3 aux dégradations digestives pourrait contribuer à son potentiel allergénique observé lors des dosages des IgE spécifiques chez des patients allergiques. L'étude des digestas de SESA2-1 et SFA-8 semble confirmer la relation entre résistance aux dégradations gastroduodénales et potentiel allergénique, en dépit de protéolyses significatives observées dans notre modèle *in vitro*. Ces deux albumines présentent des digestibilités différentes en accord avec les travaux de Berecz *et al.* [44]. Toutefois, pour ces deux protéines, les dégradations apparaissent suffisamment limitées pour conserver une certaine structure sous forme hétéropolymérique avec des sous-unités restant liées par des ponts disulfures. Ces sensibilités limitées de SESA2-1 et SFA-8 aux protéases digestives et la conservation d'une structure fortement immunoréactive correspondent à celles observées pour des albumines 2S d'autres sources végétales. A titre d'exemple, pour les albumines de l'arachide, de nombreux travaux décrivent la conservation d'une structure compacte immunoréactive et résistante aux dégradations protéolytiques [208, 224-226]. La caractérisation de telles structures allergéniques présentes dans SESA2-1 et SFA-8, reste à être précisée, notamment par l'identification précise des peptides impliqués.

B. Détection de l'immunoréactivité des protéines de graines de tournesol dans des digestas jéjunaux et iléaux humains

Le modèle de digestion gastroduodénale *in vitro* est à ce jour, la technique la plus largement utilisée pour évaluer le potentiel allergénique de protéines alimentaires. Cependant, les modèles de digestion *in vitro* ne miment pas avec exactitude les conditions physiologiques de digestion *in vivo* chez l'humain, ainsi que leurs variabilités inter-individuelles. Les études de digestion *in vivo* chez l'humain doivent répondre à des critères fondamentaux d'éthique. Elles demandent la mise en place de méthodologies invasives, telle que l'introduction de sonde chez des volontaires sains pour le prélèvement de digestas ou chez des patients avec iléostomie (dans le cadre d'une intervention chirurgicale) [219]. Si ces études de digestion *in vivo* sont logiquement difficiles à mettre en œuvre, elles représentent un atout majeur dans la compréhension des processus physiologiques humains, et en ce qui nous concerne, dans l'étude du devenir des allergènes au cours de la digestion.

Dans le cadre du projet PRODIGE portant sur l'évaluation de la digestibilité des protéines d'oléoprotéagineux, une étude clinique a été mise en place. Nous avons pu bénéficier de digestas jéjunaux et iléaux de volontaires ayant ingéré des protéines de GT, afin d'en étudier l'immunoréactivité lors d'un processus *in vivo*.

I. Matériels et méthodes

1. Etude clinique

Cette étude a été pilotée par le laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (UMR INRAE/AgroParisTech/PNCA) et le service de chirurgie bariatrique et métabolique du CHU Avicenne. Des volontaires (N = 8) ont ingéré un total de 25 g de protéines de GT incorporées dans des biscuits (chauffage à 180°C). Brièvement, les biscuits (biscuits « Prodiges ») ingérés sont constitués d'environ 29,2 % de farine de blé, 20 % d'amidon de maïs, 16 % de SFS-WPI et 6 % de pépites de chocolat. Après une première ingestion de 52 g de biscuit (correspondant à 8,3 g de SFS-WPI), des prises successives de 13g de biscuit (2 g de SFS-WPI) ont été effectuées toutes les 30 min. Les digestas jéjunaux et iléaux des volontaires ont été récupérés par sonde naso-jéjunale et naso-iléale, toutes les 30 min pour une durée de 8 h. Un prélèvement préalable a été réalisé une demi-heure avant la prise du premier repas (T0 correspond au temps « basal »).

Pour notre étude, nous avons pu disposer des digestas jéjunaux de deux volontaires (n°3 et n°7), et des digestas iléaux de deux autres volontaires (n°1 et n°2), sous forme lyophilisée. Les digestas (10 mg) ont été repris dans du tampon PBS 1 M pH 7,4 en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (référence P8340, Sigma-Aldrich).

2. Extraction des protéines du biscuit PRODIGE

Le contenu protéique du biscuit « Prodiges » a été au préalable analysé et comparé avec des extraits protéiques contrôle : l'extrait SFS-WPI et un second obtenu à partir d'un biscuit commercialisé enrichi en protéines de blé (biscuit Thé® LU). Ainsi, 1g de biscuit (Prodige ou Thé® LU) a été mis en suspension dans 10 mL de tampon borate de sodium 0,01 M pH 9,0 en présence de NaCl 0,5 M à l'aide de l'UltraTurrax Tube Dispercer™ (IKA). Après agitation rotative pendant 4 h à 20°C, le mélange a été centrifugé (3000 x g, 20 min, 4°C) et le surnageant

(S1) a été collecté et dialysé contre du tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,4. Le culot a été repris dans de l'urée 4 M à TA, agité pendant 1 h et centrifugé (3000 x g, 20 min, 4°C). Le surnageant (S2) collecté est, à son tour, dialysé et rassemblé avec S1.

Les extraits ont été quantifiés à l'aide d'un test BCA, puis leur profil protéique a été analysé sur gel d'électrophorèse Bis-Tris 4-12 % (NuPAGE™, Thermo Fisher Scientific) en conditions non réductrices.

3. Inhibitions de la liaison IgE aux protéines de GT

Ces tests ont été appliqués afin de caractériser la réactivité IgE des extraits de biscuits « Prodige », Thé® et l'extrait SFS-WPI à l'aide de sérums de patients allergiques. Ils reprennent la méthodologie définie dans le Chapitre 3. A. II. 2. Ces mêmes tests sont également intervenus pour détecter une éventuelle réactivité IgE de protéines de GT dans les digestas jéjunaux et iléaux. Ces derniers utilisés en tant que compétiteurs sont dilués de façon croissante dans le tampon EIA.

II. Résultats

1. Analyse électrophorétique du contenu protéique des biscuits PRODIGE

L'analyse électrophorétique de l'extrait protéique du biscuit « Prodige » présente un profil proche du contenu protéique de SFS-WPI et différent de celui issu d'un biscuit contenant uniquement des protéines de blé (Thé®) (**Figure 82**). Des bandes protéiques visibles dans l'extrait SFS-WPI sont retrouvées dans l'extrait protéique du biscuit « Prodige ». Plus en détail, ces bandes pourraient correspondre aux sous-unités des globulines 11S (30– 65 kDa), ainsi qu'à des albumines 2S et nsLTP de la GT (de masses inférieures à 20 kDa).

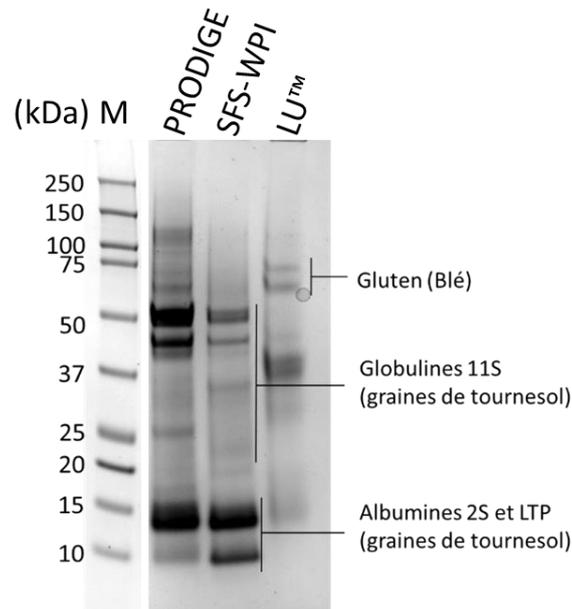


Figure 82. Analyse électrophorétique du contenu protéique du biscuit « Prodige », du biscuit Lu® et de l'extrait d'isolat SFS-WPI

Le gel d'électrophorèse a été réalisé dans des conditions non réductrices. M, marqueurs de masses moléculaires.

2. Vérification de l'immunoréactivité des biscuits « PRODIAL »

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'immunoréactivité des protéines de GT du biscuit PRODIGE par des tests de compétition. Les sérums n°1 et n°17 ont permis d'étudier la compétition de liaison IgE aux albumines 2S (SFA-8, SESA1-2 et SESA2-1), et le patient n°41 à Hel a 3. Les résultats sont présentés dans les **Figure 83** et **84**.

Contrairement à l'extrait protéique du biscuit contrôle, celui issu du biscuit « Prodige » inhibe significativement les liaisons IgE-SESA2-1 et IgE-SFA-8 (**Figure 83A** et **B**). Ces inhibitions se rapprochent de celles observées avec l'extrait SFS-WPI.

Dans ces cas, il apparaît difficile de comparer quantitativement la réactivité IgE des protéines de SFS-WPI, à celle observée pour un extrait de biscuit « Prodige », compte tenu d'un éventuel impact du traitement thermique (180°C lors de l'obtention du biscuit) sur l'immunoréactivité des protéines de GT. De plus, la proportion des albumines 2S par rapport aux autres protéines pourrait être plus forte dans le biscuit prodige du fait de leurs possibles extractions sélectives. Nous pouvons toutefois souligner la forte réactivité IgE liées aux albumines 2S, SESA2-1 et SFA-8 dans le biscuit « Prodige ».

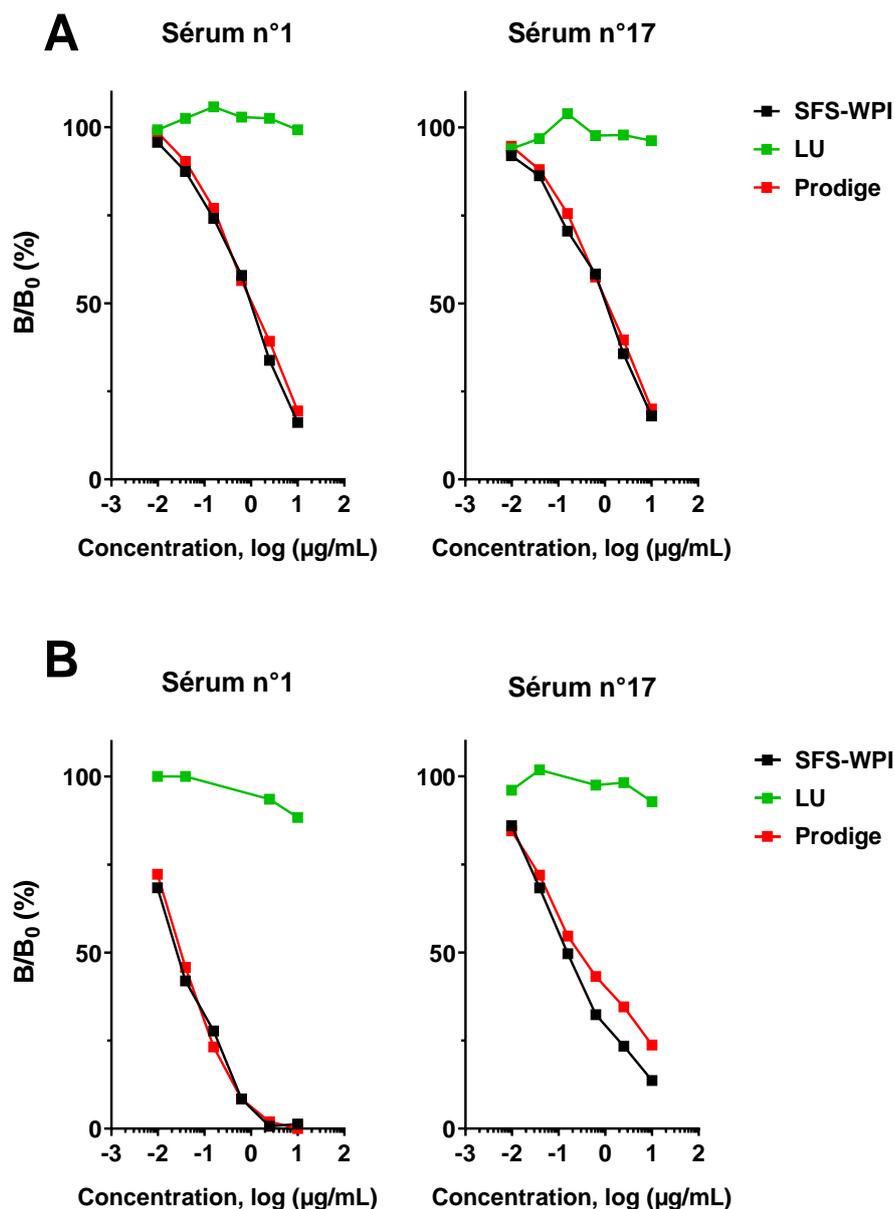


Figure 83. Etude de l'immunoréactivité de SESA2-1 et SFA-8 dans le biscuit « Prodige ». La capacité des différents extraits à inhiber la liaison IgE à SESA2-1 et SFA-8 a été évaluée à l'aide de sérums de patients présentant des réponses IgE spécifiques des SESA (voir Tableau 15).

Enfin, bien que significative, la réactivité IgE liée à Hel a 3 apparaît très faible pour l'extrait du biscuit Prodige ou encore pour son composant SFS-WPI (**Figure 84**). La nécessité d'utiliser de fortes concentrations protéiques de ces compétiteurs pour inhiber la liaison des IgE à Hel a 3 n'est pas compatible avec la détection d'une immunoréactivité liée à cette nsLTP dans des digestas humains.

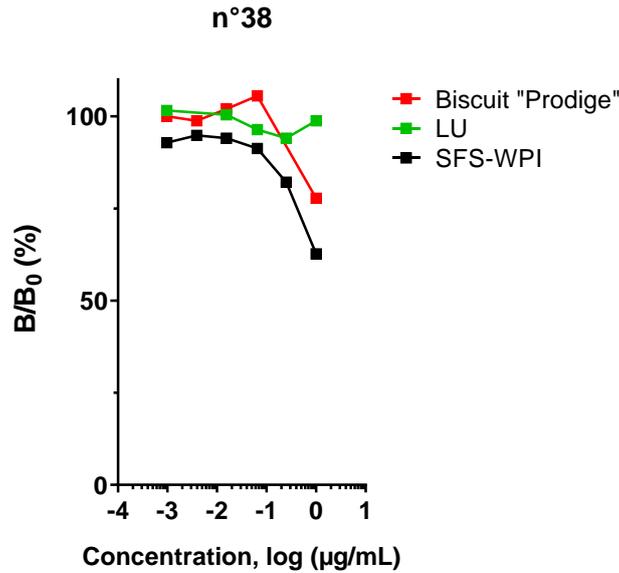


Figure 84. Etude de l'immunoréactivité de Hel a 3 dans le biscuit « Prodige ».

La capacité des différents extraits à inhiber la liaison IgE à Hel a 3 a été évaluée à l'aide d'un sérum de patients présentant des réponses IgE spécifiques de Hel a 3 (voir Tableau 15).

3. Détection de l'immunoréactivité des protéines de graines de tournesol dans les digestas jéjunaux et iléaux

Les différents résultats obtenus nous ont orienté à étudier la capacité des digestas humains à déplacer la liaison des IgE à SESA2-1 (**Figure 85**). Malgré une légère inhibition observée avec les prélèvements obtenus avant ingestion du biscuit « Prodige » (T0), une immunoréactivité liée à SESA2-1 peut être distinguée dans les digestas jéjunaux et iléaux après les différentes prises de repas. La prise en compte des ingestions répétées de biscuits ne nous permet pas de définir précisément l'évolution de cette immunoréactivité en termes de cinétique de digestion. Cependant, il est intéressant de noter que pour les digestas jéjunaux, l'inhibition la plus forte est obtenue après la première prise de repas comprenant la plus grande quantité de protéines de GT. Les plus faibles inhibitions sont générées 4 h après le dernier repas (T8). Les inhibitions avec les digestas iléaux montrent des capacités à inhiber la liaison moins importante pour les premiers temps de digestion, T1 et T2. Progressivement, ces capacités sont accrues en cours de digestion. De telles données pourraient indiquer une immunoréactivité significative liée à une albumine 2S de tournesol qui évolue au cours de la digestion et de ses phases.

Ces résultats soulignent que la digestion gastro-intestinale *in vivo* ne semble pas avoir impactée l'immunoréactivité de SESA2-1.

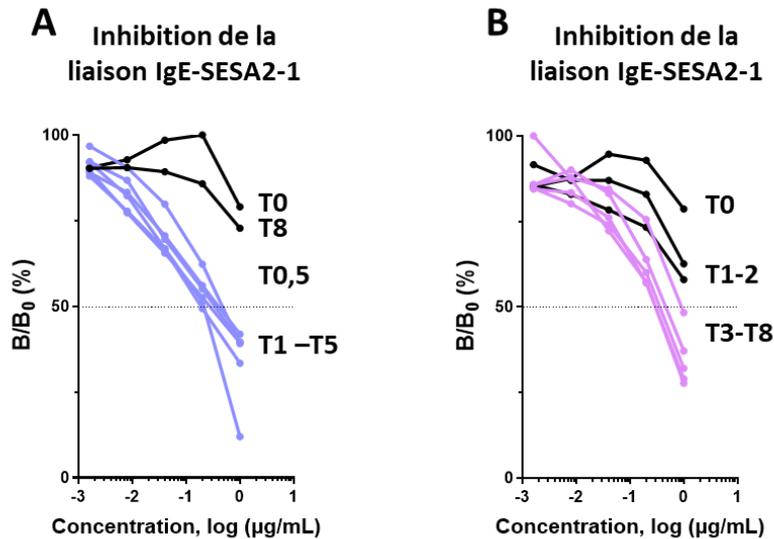


Figure 85. Etude de l'inhibition de l'immunoréactivité de SESA2-1 dans les digestas jéjunaux et iléaux

Etude de l'inhibition de l'immunoréactivité de SESA2-1 dans les digestas jéjunaux (A) et iléaux (B) du volontaire 1 (A) et 3 (B).

III. Conclusion

L'opportunité d'avoir des prélèvements jéjunaux et iléaux nous donnait une occasion unique de pouvoir tester l'immunoréactivité des protéines de GT au cours de la digestion chez l'humain. Le protocole fondé sur des ingestions séquentielles de biscuits, était adapté à la caractérisation de la biodisponibilité et de l'absorption des protéines de GT mais ne nous permettait pas d'évaluer la persistance des protéines de GT dans le tractus digestif après l'ingestion d'une dose unique de protéines. Toutefois, ce protocole nous a permis de vérifier la présence de protéines immunoréactives de GT jusque dans l'iléon, confirmant ainsi les données *in vitro* d'extrême résistance des SESA à la digestion gastroduodénale. Nous espérons également pouvoir mettre en évidence la présence de Hel a 3 mais la concentration initiale de cette nsLTP dans les biscuits Prodiges était sans doute trop faible pour pouvoir la détecter dans de bonnes conditions. La résistance des SESA à la digestion semble également confirmer les travaux de thèse de Romain Tessier décrivant une plus faible digestibilité des protéines de GT chez l'homme que celle attendue en comparaison des résultats précédemment obtenus dans un modèle de rat nourri avec un aliment contenant 12 % de protéines de l'isolat SFS-WPI [53].

Conclusions générales et perspectives

En raison d'une population mondiale qui ne cesse d'augmenter et de l'intensification de la pression sur les ressources agricoles, les industriels cherchent à intégrer de nouvelles sources de protéines alimentaires dans l'alimentation humaine et à concevoir et développer de nouvelles techniques de transformation des aliments. Cette démarche doit également répondre au besoin de développer une alimentation plus durable, plus respectueuse de l'environnement et moins coûteuse en ressources comme peut l'être la production des protéines animales. Dans ce cadre, la diversification des protéines d'origine végétale dans l'alimentation humaine constitue une réelle alternative mais cette évolution peut se heurter à l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques. En effet, ces allergies sont souvent induites par des allergènes d'origine végétale comme les allergies respiratoires induites par les pollens et les allergies alimentaires, qui peuvent être la conséquence directe des allergies respiratoires (avec le syndrome pollen-aliment) ou des modifications de nos habitudes alimentaires. A titre d'exemple, le nombre de cas d'allergie au sarrasin augmente parallèlement à la fréquence de sa consommation du fait de son incorporation dans des barres de céréales ou dans des pâtes alimentaires et de son utilisation grandissante en tant que céréale sans gluten. Les allergies pourraient donc être un frein au développement de ces nouvelles ressources alimentaires : la plus grande crainte des autorités ou des industriels étant d'assister à l'émergence d'une nouvelle allergie alimentaire aussi « dangereuse » que celle à l'arachide. D'un autre côté, il faut aussi avoir conscience qu'il est peu probable qu'une source de protéines végétales n'induisse aucune allergie alimentaire puisque l'émergence des allergies est directement proportionnelle à l'exposition des populations aux allergènes potentiels.

De ce fait, les différentes organisations de sécurité alimentaire recommandent des études prospectives sur les risques allergéniques des nouvelles sources alimentaires et les risques de réactivités croisées. A ce jour, aucune stratégie du risque allergénique n'est suffisamment prédictive mais les études dans ce domaine doivent tout de même permettre de mieux cerner le développement d'une allergie spécifique à un aliment et d'identifier quelles protéines, ou quelle famille de protéines présentent un risque allergénique supérieure aux autres. Pour cette étude portant sur l'évaluation du risque allergénique des protéines de la GT, nous avons également bénéficié de notre participation au COST ImpARAS qui nous a permis de côtoyer les meilleurs scientifiques du domaine afin d'améliorer la stratégie d'évaluation de l'allergénicité des

nouvelles protéines alimentaires, d'harmoniser les critères de décision et par exemple de proposer un classement des protéines en fonction de leur pouvoir allergénique [227].

Les protéines de GT ont été principalement étudiées pour leur propriétés émulsifiantes et gélifiantes, avec pour objectif de les intégrer dans l'alimentation humaine. Malgré plusieurs cas d'allergie aux GT, très peu d'études ont cherché à caractériser l'allergénicité des protéines de GT : Hel a 3 étant le seul allergène de la GT reconnu par le sous-comité de la WHO/IUIS responsable de la nomenclature des allergènes et SFA-8 étant la seule albumine 2S considérée comme allergénique.

Pour mon projet de thèse, nous nous sommes donc concentrés sur les principales familles d'allergènes d'origine végétale : les albumines 2S, les nsLTP et les globulines 11S [228]. L'extraction des protéines de GT à partir d'amandes de tournesol a ainsi nécessité la combinaison de multiples méthodes biochimiques de purification (précipitations sélectives, chromatographies échangeuse d'ions et en phase inversée), et de caractérisation (techniques électrophorétiques et de spectrométrie de masse). Nous avons pu ainsi isoler plusieurs albumines 2S et leurs isoformes : SESA1-2, SESA2-1 (I et II), SESA2-2, SESA3 ou (SFA-8), SESA3c, SESA4-1 et SESA20-2. Deux nsLTP ont été identifiées, Hel a 3 et une nsLTP de 9,4 kDa. Le fractionnement des sous-unités de globulines 11S s'est heurté à leurs forts polymorphismes et à leurs structures complexes ce qui n'a pas permis d'obtenir des entités sous une forme aussi homogène que pour les albumines 2S et les nsLTP. Ceci était attendu car la même difficulté a été rencontrée pour d'autres plantes telles que l'arachide. L'expérience du laboratoire sur les globulines d'arachide est qu'il est particulièrement difficile de les purifier avec des protocoles suffisamment doux pour respecter leur conformation native. De plus, leur nature un peu plus hydrophobe implique que les fractions purifiées de globulines 11S restent souvent contaminées par d'autres protéines telles que les albumines 2S. Dans notre cas, nous avons ainsi co-purifié de la SESA2-2 dans la fraction P40. Une solution envisageable serait de les produire sous forme recombinante mais au risque de perdre une partie de l'immunoréactivité lors du repliement des protéines pendant les différentes étapes de production. Différents représentants des albumines 2S (SESA1-2, SESA2-1, SESA2-2, SESA4-1, SESA2-2 et SFA-8), nsLTP (Hel a 3) et fractions de globulines 11S de GT ont ensuite été sélectionnés pour évaluer leur potentiel allergénique à l'aide de modèles souris sensibilisées par voie i.p. et v.o., ainsi qu'à l'aide de sérums de patients allergiques aux GT et/ou à d'autres aliments.

Les modèles souris de sensibilisation aux protéines de GT ont particulièrement mis en évidence le potentiel allergénique des albumines 2S. Nous avons en particulier montré que

SFA-8 était un plus faible allergène que les autres SESA et que sa réactivité IgE était due à la réactivité croisée avec les autres SESA qui, elles, induisent de fortes réponses IgE spécifiques. En comparaison, le niveau de sensibilisation contre Hel a 3 est beaucoup plus faible et contrairement aux albumines 2S où nous n'avions pas vu d'effet de la dose ingérée (1 mg *versus* 5 mg par gavage), la réponse humorale contre Hel a 3 n'a été observée qu'avec les isolats du LRGP qui sont plus concentrés en Hel a 3 que les extraits produits au laboratoire. Concernant les globulines 11S, celles-ci présentent un potentiel immunogénique beaucoup plus faible que les albumines 2S ou les nsLTP. Tout en gardant bien en mémoire qu'aucun modèle animal n'est actuellement prédictif de la situation chez l'humain, le niveau de sensibilisation des souris aux SESA apparaît assez remarquable au vue des résultats du laboratoire concernant la sensibilisation des souris aux protéines d'arachide. En effet, dans ce cas, il est beaucoup plus difficile d'obtenir de fortes réponses IgE contre les albumines 2S Ara h 2 et Ara h 6 et la sensibilisation est alors principalement dirigée contre les globulines 7S/11S Ara h 1 et Ara h 3 [197]. Cette sensibilité particulière des souris au potentiel de sensibilisation des albumines 2S de GT pourrait néanmoins être mis à profit par exemple sous forme de test pour s'assurer de l'absence de contaminations en SESA dans différents isolats ou préparations industrielles. Ces études dans la souris montrent également la difficulté de mesurer, voire prédire, le potentiel allergénique d'une protéine alimentaire puisque dans le cas de SFA-8, nous avons bien une protéine reconnue par des IgE alors qu'elle semble présenter un potentiel de sensibilisation bien inférieur à celui des autres SESA. Un développement possible serait donc de tester isolément la protéine SFA-8 dans le modèle souris, en comparaison avec d'autres SESA purifiées pour pouvoir comparer leur potentiel de sensibilisation intrinsèque, sans avoir l'effet de la matrice alimentaire.

La mise au point des modèles souris et le développement des outils nécessaires à la caractérisation des réponses humorales nous ont ensuite permis d'analyser la spécificité des réponses IgE chez des patients allergiques aux GT. Pour cette étude en collaboration avec le Dr Marta Reche Frutos, le format de dosage des IgE sur allergènes immobilisés s'est révélé assez peu sensible, ce qui nous a amené à utiliser le format inversé de dosage par « capture des IgE » en utilisant les traceurs biotinylés générés pour le modèle souris. Ce test nous a permis de mettre en évidence des profils de réponses IgE spécifiques plus hétérogènes que ceux observés chez les souris « monosensibilisées » aux protéines de GT. Malgré le nombre limité de patients allergiques (n = 19), nous avons distingué trois groupes de profils de sensibilisation IgE : (1) un profil similaire à celui observé dans le modèle souris avec des réponses IgE principalement

portées par les SESA et où la réactivité IgE de SFA-8 est induite par de la réactivité croisée ; (2) un profil avec des réponses IgE principalement portée par Hel a 3, avec une forte réactivité croisée avec d'autres nsLTP comme Pru p 3 et Ara h 9 . Et (3) un profil de réponses IgE principalement portée par SFA-8, qui pourrait être aussi le résultat d'une réactivité croisée induite par la polysensibilisation à d'autres aliments tels que la fève. Dans ce cas, des études complémentaires sont encore nécessaires pour identifier quelles protéines présentes dans l'extrait de fève sont capables d'inhiber la liaison IgE à SFA-8 et déterminer si ce sont aussi des albumines 2S. Parmi les perspectives, nous devons encore caractériser les réponses IgE des patients allergiques contre Pru p 3 que nous avons reçu tardivement et que la situation avec la COVID-19 ne nous pas encore permis de tester. Il serait également intéressant de comparer le potentiel de dégranulation des différentes SESA et nsLTP dans des tests *in vitro* (RBL SX 38 ou BAT) afin de le relier avec la réactivité clinique des patients et d'établir l'importance des réactivités croisées que nous avons établies avec les tests d'inhibitions de la liaison IgE. Pour ce type d'expérience, nous avons besoin de plus de volumes d'échantillons sanguins et nous essayons de voir s'il est possible d'en récupérer plus.

Enfin, la résistance des protéines de GT à la digestion gastroduodénale *in vitro* a été évaluée. Ces études ont été réalisé en nous fondant sur le protocole développé par Mandalari *et al.* Nous avons ensuite mesuré l'immunoréactivité résiduelle de ces digestas *in vitro* à l'aide des sérums de souris sensibilisées et ces résultats ont ensuite été confirmés avec les sérums de patients allergiques aux GT. Ces études ont mis en évidence la faible résistance des globulines 11S à la digestion gastrique, ce qui pourrait en partie expliqué leur faible immunogénicité dans le modèle souris et la faiblesse des réponses IgE dans les sérums de patients allergiques aux GT. A l'inverse, Hel a 3 est extrêmement résistante à la dégradation gastrique et duodénale, et son immunoréactivité n'est pas impactée. Enfin, SFA-8 apparaît un peu moins résistante que SESA2-1 à la digestion gastrique mais cela n'affecte pas significativement l'immunoréactivité IgE des digestas. Cette résistance à la dégradation protéolytique a été confirmé par la caractérisation de contenu jéjunaux et iléaux prélevés chez des volontaires sains où nous avons pu mettre en évidence une forte immunoréactivité résiduelle liée à SESA2-1.

Sur un plan plus personnel, ces trois années de thèse ont été une expérience scientifique et humaine très enrichissante. Ce projet m'a permis de m'initier à différentes techniques de biochimie des protéines, de spectrométrie de masse, d'immunologie et d'expérimentation animale. Il m'a également permis de participer à un projet de recherche qui répond à la demande mondiale de diversification des sources protéiques dans l'alimentation humaine. Grâce à ce

projet, j'ai pu me rendre compte des difficultés auxquelles nous pouvons être confrontés lors de l'évaluation du risque allergénique des nouvelles sources alimentaires. Ce projet a été l'occasion de participer à deux formations organisées par le COST Action ImpARAS en lien avec mes travaux de thèse (voir « Liste de Communication »). Mes résultats ont été communiqués (posters et communications orales) à de nombreuses occasions en Europe (voir « Liste de Communication »). Ces différentes formations, congrès et communications m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes d'intérêts.

Références bibliographiques

1. Funk V, *et al.*, Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Proceedings of a Symposium on Plant Diversity and Complexity Patterns*, 2005. **55**: p. 343-373.
2. Smith BD, Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103(33)**: p. 12223-12228.
3. Heiser CB, The domesticated sunflower in old Mexico? *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1998. **45(5)**: p. 447-449.
4. Gontcharov S. *Hybrid Sunflower Breeding in VNIIMK (Russia)*. in *18th International Sunflower Conference*. 2012. Mar-del-Plata (Argentina)
5. Vear F, Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *OCL*, 2016. **23(2)**.
6. Fine F, *et al.*, Food losses and waste in the French oilcrops sector. *OCL*, 2015. **22(3)**: p. A302.
7. McClure A, *et al.* *Sunflower: An Alternative Crop for Tennessee Producers - Production Guidelines and Tennessee Hybrid Trials*. Sunflower: An Alternative Crop for Tennessee Producers - Production Guidelines and Tennessee Hybrid Trials Available from: https://trace.tennessee.edu/utk_agexcrop/56.
8. Cancalon P, Chemical composition of sunflower seed hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1971. **48(10)**: p. 629.
9. Canibe N, *et al.*, Chemical composition, digestibility and protein quality of 12 sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999. **79(13)**: p. 1775-1782.
10. Curvetto N, *et al.*, Sunflower seed hulls as an alternative substrate for shiitake. *Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation*, 2005: p. 119-124.
11. González-Pérez S, *et al.*, Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007. **87(12)**: p. 2173-2191.
12. Žilić S, *et al.*, Characterization of sunflower seed and kernel proteins. *Helia*, 2010. **33(52)**: p. 103-113.

13. Sosulski F, *et al.*, Chemical, functional, and nutritional properties of sunflower protein products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1977. **54(2)**: p. 100-104.
14. González-Pérez S, *et al.*, Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002. **50(6)**: p. 1713-1719.
15. Sabir MA, *et al.*, Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1974. **22(4)**: p. 575-578.
16. Bogaert L. *Étude et modélisation du pressage continu des graines oléagineuses*. Université de Technologie de Compiègne. **2017**. p. 167.
17. Bogaert L, *et al.*, Characterization of oilseeds mechanical expression in an instrumented pilot screw press. *Industrial Crops and Products*, 2018. **121**: p. 106-113.
18. Pagès-Xatart-Parès X, *Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales)*. *Techniques de l'ingénieur*, 2008.
19. Fine F, *et al.*, Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 2013. **20(5)**: p. A502.
20. Evon P, *et al.*, La technologie d'extrusion bi-vis, une solution originale et performante pour le bioraffinage du tournesol plante entière. *OCL*, 2010. **17**: p. 404-417.
21. Evrard J, *et al.*, Procédés d'obtention et compositions nutritionnelles des huiles de tournesol, olive et colza. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2007. **42**: p. 13-23.
22. Rosenthal A, *et al.*, Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996. **19(6)**: p. 402-420.
23. Domínguez H, *et al.*, Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chemistry*, 1994. **49(3)**: p. 271-286.
24. Osborne TB, *The vegetable proteins*. By Thomas B. Osborne. 2nd edition. Monographs on Biochemistry. London: Longmans green and Co. 1924. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 1924. **43(17)**: p. 440-440.
25. Guéguen J, *et al.*, Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2016. **51(4)**: p. 177-185.
26. Shewry PR, *et al.*, Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 1995. **7(7)**: p. 945-956.

27. Ferjani E, *et al.*, Etude de la globuline des graines de Tournesol (*Helianthus annuus* L.) accumulation au cours de la maturation et localisation intracellulaire. *Biologia Plantarum*, 1990. **32(6)**: p. 429-435.
28. Mazhar H, *et al.*, Synthesis of storage reserves in developing seeds of sunflower. *Phytochemistry*, 1998. **48(3)**: p. 429-432.
29. Shewry PR, Plant storage proteins. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 1995. **70(3)**: p. 375-426.
30. Mills CEN, *et al.*, Plant Food Allergen. *1st ed.* 2004: Blackwell. 248.
31. Anisimova IN, *et al.*, Polymorphism and inheritance of methionine-rich 2S albumins in sunflower. *Euphytica*, 2002. **129**: p. 99-107.
32. Anisimova IN, *et al.*, Genotypic variation and polymorphism of 2S albumins of sunflower. *Euphytica*, 1995. **83**: p. 15-23.
33. González-Pérez S, *et al.*, Emulsion properties of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53(6)**: p. 2261-2267.
34. Sánchez AC, *et al.*, Gelation of Sunflower Globulin Hydrolysates: Rheological and Calorimetric Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. **45(7)**: p. 2407-2412.
35. Vonder Haar RA, *et al.*, Organization of the sunflower 11S storage protein gene family. *Gene*, 1988. **74(2)**: p. 433-443.
36. Molina MI, *et al.*, Effect of pH and Ionic Strength Modifications on Thermal Denaturation of the 11S Globulin of Sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52(19)**: p. 6023-6029.
37. José-Estanyol M, *et al.*, The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiology and Biochemistry* 2004. **42(5)**: p. 355-365.
38. Moreno FJ, *et al.*, 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The Open Biochemistry Journal*, 2008. **2**: p. 16-28.
39. Kortt AA, *et al.*, Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S protein from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Biochemistry* 1991. **195(2)**: p. 329-334.
40. Kortt AA, *et al.*, Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. *Phytochemistry*, 1990. **29(9)**: p. 2805-2810.

41. Berecz B, *et al.*, Structural stability and surface activity of sunflower 2S albumins and nonspecific lipid transfer protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010. **58(10)**: p. 6490-6497.
42. Franke B, *et al.*, Mature forms of the major seed storage albumins in sunflower: A mass spectrometric approach. *Journal of Proteomics* 2016. **147**: p. 177-186.
43. Jayasena AS, *et al.*, A tripartite approach identifies the major sunflower seed albumins. *Theoretical and Applied Genetics* 2016. **129(3)**: p. 613-629.
44. Berecz B, *et al.*, Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 2013. **138(4)**: p. 2374-2381.
45. Salminen TA, *et al.*, Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*, 2016. **244(5)**: p. 971-997.
46. Edstam MM, *et al.*, Evolutionary History of the Non-Specific Lipid Transfer Proteins. *Molecular Plant*, 2011. **4(6)**: p. 947-964.
47. Regente M, *et al.*, A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *Journal of Plant Physiology*, 2003. **160(2)**: p. 201-203.
48. Regente M, *et al.*, Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum*, 2000. **110**: p. 158–163.
49. Regente MC, *et al.*, The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology*, 2005. **40(3)**: p. 183-189.
50. González-Pérez S, *et al.*, Physicochemical properties of 2S albumins and the corresponding protein isolate from sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Food Science*, 2005. **70(1)**: p. C98-C103.
51. Albe Slabi S, *et al.*, Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal. *Food Chemistry*, 2020. **317**: p. 126423.
52. Lovatto N, *et al.*, Crambe (*Crambe abyssinica*) and sunflower (*Helianthus annuus*) protein concentrates: Production methods and nutritional properties for use in fish feed. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2017. **89**.
53. Tessier R, *et al.*, ¹⁵N and ²H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *Journal of Nutrition*, 2020. **150(3)**: p. 450-457.

54. EFSA/2015/2283, Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 2016. **14(i11)**: p. 4594.
55. Pichler W, Drug Hypersensitivity Reactions: Classification and Relationship to T-Cell Activation, in Drug Hypersensitivity, *W.J. Pichler, Editor*. 2007, Karger: Bern. p. 168-189.
56. Cox AL, *et al.*, Classification of adverse food reactions. *Journal of Food Allergy*, 2020. **2(1)**: p. 3-6.
57. Sicherer SH, *et al.*, Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018. **141(1)**: p. 41-58.
58. Sicherer SH, *et al.*, Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014. **133(2)**: p. 291-307.
59. Warren C, *et al.*, Epidemiology and Burden of Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2020. **20(6)**.
60. Prescott S, *et al.*, A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *The World Allergy Organization journal*, 2013. **6**: p. 21.
61. Lyons SA, *et al.*, Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2019. **7(6)**: p. 1920-1928 e11.
62. Cochrane S, *et al.*, Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy*, 2009. **64(9)**: p. 1246-1255.
63. Koplin JJ, *et al.*, The impact of family history of allergy on risk of food allergy: a population-based study of infants. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2013. **10(11)**: p. 5364-77.
64. Campbell DE, *et al.*, Mechanisms of allergic disease – environmental and genetic determinants for the development of allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 2015. **45(5)**: p. 844-858.
65. Laffont S, *et al.*, Sex Differences in Asthma: A Key Role of Androgen-Signaling in Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Frontier Immunology*, 2017. **8**: p. 1069.

66. Davidson W, *et al.*, Report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Workshop on “Atopic Dermatitis and the Atopic March: Mechanisms and Interventions”. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2019. **143**.
67. Du Toit G, *et al.*, Food allergy: Update on prevention and tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018. **141(1)**: p. 30-40.
68. Prescott S, *et al.*, The role of epigenetic dysregulation in the epidemic of allergic disease. *Clinical Epigenetics*, 2011. **2(2)**: p. 223-232.
69. Koplin J, *et al.*, Is caesarean delivery associated with sensitization to food allergens and IgE-mediated food allergy: A systematic review. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2008. **19(8)**: p. 682-687.
70. Sausenthaler S, *et al.*, Early diet and the risk of allergy: what can we learn from the prospective birth cohort studies GINIplus and LISApplus? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011. **94(6)**: p. 2012-2017.
71. Gamboni SE, *et al.*, Infant feeding and the development of food allergies and atopic eczema: An update. *Australasian Journal of Dermatology*, 2013. **54(2)**: p. 85-9.
72. Boyle RJ, *et al.*, Hydrolysed formula and risk of allergic or autoimmune disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2016. **352**: p. i974.
73. Lerodiakonou D, *et al.*, Timing of Allergenic Food Introduction to the Infant Diet and Risk of Allergic or Autoimmune Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 2016. **316(11)**: p. 1181-1192.
74. Yazdanbakhsh M, *et al.*, Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science*, 2002. **296**: p. 490-4.
75. Rook GAW, Hygiene Hypothesis and Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2012. **42(1)**: p. 5-15.
76. Hanski I, *et al.*, Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109(21)**: p. 8334-8339.
77. Nassiri M, *et al.*, Ramipril and metoprolol intake aggravate human and murine anaphylaxis: Evidence for direct mast cell priming. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015. **135(2)**: p. 491-499.
78. Love BL, *et al.*, Antibiotic prescription and food allergy in young children. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2016. **12**: p. 41.

79. Paparo L, *et al.*, The influence of early life nutrition on epigenetic regulatory mechanisms of the immune system. *Nutrients*, 2014. **6(11)**: p. 4706-4719.
80. Martino D, *et al.*, Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. *Epigenetics*, 2014. **9(7)**: p. 998-1006.
81. Savage JH, *et al.*, A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy*, 2018. **73(1)**: p. 145-152.
82. Belkaid Y, *et al.*, Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, 2017. **46(4)**: p. 562-576.
83. Platts-Mills TAE, *et al.*, The discovery of IgE 50 years later. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2016. **116(3)**: p. 179-182.
84. Sutton B, *et al.*, IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies*, 2019. **8**: p. 19.
85. Sutton B, *et al.*, The human IgE network. *Nature*, 1994. **366**: p. 421-8.
86. Lawrence MG, *et al.*, Half-life of IgE in serum and skin: Consequences for anti-IgE therapy in patients with allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017. **139(2)**: p. 422-428.e4.
87. Wurzburg BA, *et al.*, Structure of the Human IgE-Fc Cε3-Cε4 Reveals Conformational Flexibility in the Antibody Effector Domains. *Immunity*, 2000. **13(3)**: p. 375-385.
88. Kraft S, *et al.*, New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 2007. **7(5)**: p. 365-378.
89. Acharya M, *et al.*, CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *Clinical & Experimental Immunology*, 2010. **162(1)**: p. 12-23.
90. Wiczorek M, *et al.*, Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**: p. 292-292.
91. Gutcher I, *et al.*, APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. **117(5)**: p. 1119-1127.
92. Lee H-G, *et al.*, Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020. **52(8)**: p. 1255-1263.

93. Zhu J, *et al.*, Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, 2010. **20(1)**: p. 4-12.
94. Owen JA, *et al.*, Immunologie 7ème édition. *Dunod ed.* 2014, New York: Freeman W.H. and Compagny.
95. Zhang X, *et al.*, Follicular Helper T Cells: New Insights Into Mechanisms of Autoimmune Diseases. *Ochsner journal*, 2013. **13**: p. 131-139.
96. Guedes, *et al.*, Molecular markers for clinical forms of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)*, 2009. **42**: p. 55-60.
97. Farrar JD, *et al.*, T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *The Journal of clinical investigation*, 2002. **109(4)**: p. 431-435.
98. Manel N, *et al.*, The differentiation of human TH17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nature Immunology*, 2008. **9(6)**: p. 641-649.
99. Rutz S, *et al.*, IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Reviews*, 2013. **252(1)**: p. 116-32.
100. Curotto de Lafaille MA, *et al.*, Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 2009. **30(5)**: p. 626-635.
101. Akdis CA, *et al.*, Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. *Journal of Clinical Investigation*, 2014. **124(11)**: p. 4678-80.
102. Cyster JG, *et al.*, B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*, 2019. **177(3)**: p. 524-540.
103. da Silva EZ, *et al.*, Mast cell function: a new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2014. **62(10)**: p. 698-738.
104. Reitsma M, *et al.*, Protein transport across the small intestine in food allergy. *Molecular nutrition & food research*, 2014. **58**: p. 194-205.
105. Schulz O, *et al.*, Antigen sampling in the small intestine. *Trends in Immunology - Cell Press*, 2013. **34(4)**: p. 155-61.
106. Ménard S, *et al.*, Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunology*, 2010. **3(3)**: p. 247-259.

107. Price D, *et al.*, Nuts 'n' guts: transport of food allergens across the intestinal epithelium. *Asia Pacific Allergy*, 2013. **3(4)**: p. 257-65.
108. Niess JH, *et al.*, CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005. **307(5707)**: p. 254-8.
109. Lelouard H, *et al.*, Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology*, 2012. **142(3)**: p. 592-601.e3.
110. Sampson HA, *et al.*, Mechanisms of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018. **141(1)**: p. 11-19.
111. Kopf M, *et al.*, Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 1993. **362(6417)**: p. 245-248.
112. Fallon PG, *et al.*, IL-4 Induces Characteristic Th2 Responses Even in the Combined Absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity*, 2002. **17(1)**: p. 7-17.
113. Johnston LK, *et al.*, The Immunology of Food Allergy. *The Journal of Immunology*, 2014. **192(6)**: p. 2529-2534.
114. Brough HA, *et al.*, Epicutaneous sensitization in the development of food allergy: What is the evidence and how can this be prevented? *Allergy*, 2020. **75(9)**: p. 2185-2205.
115. Varshney P, *et al.*, Clinical manifestations of immunoglobulin E-mediated food allergy, including pollen-food allergy syndrome. *Journal of Food Allergy*, 2020. **2(1)**: p. 22-25.
116. Ring J, *et al.*, Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*, 1977. **1(8009)**: p. 466-9.
117. Anvari S, *et al.*, IgE-Mediated Food Allergy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2019. **57(2)**: p. 244-260.
118. Wasserman S, *et al.*, Food allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2011. **7(1)**: p. S7.
119. Schuler CF, *et al.*, Immunoglobulin E-mediated food allergy diagnosis and differential diagnosis. *Journal of Food Allergy*, 2020. **2(1)**: p. 26-30.
120. Kowalski ML, *et al.*, Risk and safety requirements for diagnostic and therapeutic procedures in allergology: World Allergy Organization Statement. *The World Allergy Organization journal*, 2016. **9(1)**: p. 33-33.

121. Sereme Y, *et al.*, IgG removal significantly enhances detection of microarray allergen-specific IgE reactivity in patients' serum. *Allergy*, 2020.
122. Hoffmann HJ, *et al.*, The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 2015. **70(11)**: p. 1393-1405.
123. Hemmings O, *et al.*, Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* 2018. **18(12)**: p. 77.
124. Broekman HCH, *et al.*, IgE – the main player of food allergy. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2015. **17-18**: p. 37-44.
125. Blanc F, *et al.*, Capacity of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay: Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors. *Clinical & Experimental Allergy*, 2009. **39(8)**: p. 1277-1285.
126. Assa'ad AH, Oral food challenges. *Journal of Food Allergy*, 2020. **2(1)**: p. 31-34.
127. Mousallem T, *et al.*, Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: immunotherapy for food allergy. *Clinical and Experimental Immunology*, 2012. **167(1)**: p. 26-31.
128. Villa C, *et al.*, Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018. **17(1)**: p. 137-164.
129. Chapman MD, *et al.*, Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. **119(2)**: p. 414-420.
130. Pomés A, *et al.*, WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular Immunology*, 2018. **100**: p. 3-13.
131. IUIS. *WHO/IUIS Allergen Nomenclature*. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Available from: <http://www.allergen.org/>.
132. Yeung J, *et al.*, Challenges and Path Forward on Mandatory Allergen Labeling and Voluntary Precautionary Allergen Labeling for a Global Company. *Journal of AOAC International*, 2019. **101(1)**: p. 70-76.
133. Sampson HA, Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004. **113(5)**: p. 805-19; quiz 820.
134. Hochwallner H, *et al.*, Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 2014. **66(1)**: p. 22-33.

135. Skolnick HS, *et al.*, The natural history of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001. **107(2)**: p. 367-74.
136. Du Toit G, *et al.*, Prevention of food allergy - Early dietary interventions. *Allergology International*, 2016. **65(4)**: p. 370-377.
137. Rona RJ, *et al.*, The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. **120(3)**: p. 638-646.
138. Francis O, *et al.*, Common food allergens and cross-reactivity. *Journal of Food Allergy*, 2020. **2**: p. 17-21.
139. Patel A, *et al.*, Hypersensitivities to sesame and other common edible seeds. *Allergy*, 2016. **71(10)**: p. 1405-13.
140. Rancé F, *et al.*, Chapitre 18 - Allergies alimentaires, in *Nutrition clinique pratique*, J.-L. Schlienger, *Editor*. 2011, Elsevier Masson: Paris. p. 215-223.
141. Burney P, *et al.*, Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy*, 2010. **65(9)**: p. 1182-1188.
142. Egger M, *et al.*, Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy*, 2006. **61(4)**: p. 461-476.
143. Rancé F, *et al.*, Allergie alimentaire chez l'enfant. *Allergy, ed. M.E. Médecine & Hygiène*. 2000, Genève: Vigot. 210.
144. Mahesh PA, *et al.*, Prevalence of food sensitization and probable food allergy among adults in India: the EuroPrevall INCO study. *Allergy*, 2016. **71(7)**: p. 1010-1019.
145. Guerrero AA, *et al.*, Subjects Sensitized to Sunflower Seed (*Helianthus annuus*) Are Tolerant in a High Proportion of Cases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013. **131(2)**: p. AB87.
146. Axelsson IGK, *et al.*, Anaphylactic reactions to sunflower seed. *Allergy*, 1994. **49**: p. 517-520.
147. Noyes JH, *et al.*, Anaphylaxis to sunflower seed. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1979. **63(4)**: p. 242-4.
148. Asero R, *et al.*, Airborne allergy to sunflower seed. *Journal of Investigation, Allergology and Clinical Immunology*, 2004. **14(3)**: p. 244-6.

149. Palma-Carlos AG, *et al.*, Allergy to sunflower seeds. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 2005. **37(5)**: p. 183-6.
150. Vandenas O, *et al.*, Occupational asthma caused by sunflower-seed dust. *Allergy*, 1998. **53(9)**: p. 907-8.
151. Uysal P, *et al.*, Sunflower seed allergy in a child developing after sensitization to sunflower pollen or dust. *Clinical and Translational Allergy*, 2011. **1(1)**: p. P110.
152. Lavine E, *et al.*, Allergy to sunflower seed and sunflower butter as proposed vehicle for sensitization. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2015. **11(1)**: p. 2.
153. Caubet JC, *et al.*, Snack seeds allergy in children. *Allergy*, 2010. **65(1)**: p. 136-7.
154. Hsu DC, *et al.*, Is “nut-free” sunflower seed butter safe for children with peanut allergy? *Medical Journal of Australia*, 2007. **187(9)**: p. 542-543.
155. Hungness SI, *et al.*, Sunflower Seed Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006. **117(2)**: p. S46.
156. Crespo JF, *et al.*, Frequency of Food Allergy in a Pediatric Population from Spain. *Pediatric Allergy and Immunology*, 1995. **6(1)**: p. 39-43.
157. Pantoja-Uceda D, *et al.*, Solution Structure of a Methionine-Rich 2S Albumin from Sunflower Seeds: Relationship to Its Allergenic and Emulsifying Properties. *Biochemistry*, 2004. **43(22)**: p. 6976-6986.
158. Mota I, *et al.*, Anaphylaxis caused by lipid transfer proteins: an unpredictable clinical syndrome. *Allergologia et Immunopathologia*, 2018. **46**.
159. Radauer C, *et al.*, Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008. **121(4)**: p. 847-852.e7.
160. Mailhol C, *et al.*, Le syndrome LTP, une entité méditerranéenne? *Revue Française d'Allergologie*, 2012. **52**: p. S7-S9.
161. Basagana M, *et al.*, Clinical Profile of Lipid Transfer Protein Syndrome in a Mediterranean Area. *Journal of Investigation, Allergy and Clinical Immunology*, 2018. **28(1)**: p. 58-60.
162. Papageorgiou PS, Shewry, P. R., Fido, R. J., Papadopoulos, N. G., Tassios, I. K. and Tatham, A. S. *Identification of lipid transfer protein (LTP) as a major sunflower seed food allergen in sunflower seed-induced systemic reactions.* in *Greek National Meeting on Allergy and Clinical Immunology*. 2003. Athens

163. Yagami A, Anaphylaxis to lipid transfer protein from sunflower seeds. *Allergy*, 2010. **65(10)**: p. 1340-1.
164. Couto M, *et al.*, Anaphylaxis to sunflower seed. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 2012. **20(2)**: p. 139-43.
165. Ukleja-Sokolowska N, *et al.*, Sunflower seed allergy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2016. **29(3)**: p. 498-503.
166. Kelly JD, *et al.*, 2S methionine-rich protein (SSA) from sunflower seed is an IgE-binding protein. *Allergy*, 2000. **55(6)**: p. 556-60.
167. Kelly JD, *et al.*, IgE-binding epitopes in the 2S methionine-rich albumin (SSA) of sunflower seed. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000. **105(1, Part 2)**: p. 135.
168. Kelly JD, *et al.*, Identification of Sunflower Seed IgE-Binding Proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2000. **121(1)**: p. 19-24.
169. Kean DE, *et al.*, Differential Polarization of Immune Responses by Plant 2S Seed Albumins, Ber e 1, and SFA8. *The Journal of Immunology*, 2006. **177(3)**: p. 1561-1566.
170. Asero R, *et al.*, Allergenic similarities of 2S albumins. *Allergy*, 2002. **57(1)**: p. 62-63.
171. Macias ML, *et al.*, Basophil Response To Storage Proteins and Oleosins From Sunflower Seed. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014. **133(2)**: p. 111.
172. Ehlers AM, *et al.*, Sesame oleosins are minor allergens. *Clinical and Translational Allergy*, 2019. **9(1)**: p. 32.
173. Schwager C, *et al.*, Peanut oleosins associated with severe peanut allergy—importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017. **140(5)**: p. 1331-1338.e8.
174. Barbarroja-Escudero J, *et al.*, Identification of Lipoproteins From Sunflower Seeds in 2 Monosensitized Anaphylaxis Patients. *Journal of Investigation, Allergology and Clinical Immunology*, 2018. **28(5)**: p. 334-336.
175. Verhoeckx K, *et al.*, COST Action ‘ImpARAS’: what have we learnt to improve food allergy risk assessment. A summary of a 4 year networking consortium. *Clinical and Translational Allergy*, 2020. **10(1)**: p. 13.
176. Verhoeckx K, *et al.*, Allergenicity assessment strategy for novel food proteins and protein sources. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2016. **79**: p. 118-124.

177. WHO. *Codex ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology*. Joint FAO/WHO Food Standards Program. Yokohama: World Health Organization. Codex ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology. Joint FAO/WHO Food Standards Program. Yokohama: World Health Organization. Available from: www.codexalimentarius.net.
178. Moreno FJ, Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2007. **61(1)**: p. 50-60.
179. Fu TJ, *et al.*, Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50(24)**: p. 7154-60.
180. Mazzucchelli G, *et al.*, Current (Food) Allergenic Risk Assessment: Is It Fit for Novel Foods? Status Quo and Identification of Gaps. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018. **62(1)**.
181. Verhoeckx KCM, *et al.*, Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 2015. **80**: p. 223-240.
182. Remington B, *et al.*, Approaches to assess IgE mediated allergy risks (sensitization and cross-reactivity) from new or modified dietary proteins. *Food and Chemical Toxicology*, 2018. **112**: p. 97-107.
183. van Bilsen JHM, *et al.*, Application of the adverse outcome pathway (AOP) concept to structure the available in vivo and in vitro mechanistic data for allergic sensitization to food proteins. *Clinical and translational allergy*, 2017. **7**: p. 13-13.
184. Bogh KL, *et al.*, Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of food allergens in animal models. *Clinical and Translational Allergy* 2016. **6(21)** .
185. Smit J, *et al.*, Evaluation of the sensitizing potential of food proteins using two mouse models. *Toxicology Letters*, 2016. **262**: p. 62-69.
186. Smit JJ, *et al.*, Contribution of classic and alternative effector pathways in peanut-induced anaphylactic responses. *PLoS One*, 2011. **6(12)**: p. 28917.
187. Morafo V, *et al.*, Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. **111(5)**: p. 1122-1128.
188. Berin MC, *et al.*, Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. *Allergy*, 2006. **61(1)**: p. 64-71.

189. Li XM, *et al.*, A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000. **106(1 Pt 1)**: p. 150-8.
190. Dearman RJ, *et al.*, Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicology Letter*, 2001. **120(1-3)**: p. 181-6.
191. Schulke S, *et al.*, Mouse Models for Food Allergies: Where Do We Stand? *Cells*, 2019. **8(6)**.
192. Dearman RJ, *et al.*, A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods*, 2007. **41(1)**: p. 91-8.
193. Ladics GS, *et al.*, Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2010. **56(2)**: p. 212-224.
194. Oyoshi MK, *et al.*, Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014. **133(2)**: p. 309-317.
195. Marinaro M, *et al.*, Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *Journal of immunology research*, 1995. **155(10)**: p. 4621-9.
196. Mattsson J, *et al.*, Cholera toxin adjuvant promotes a balanced Th1/Th2/Th17 response independently of IL-12 and IL-17 by acting on G α in CD11b⁺ DCs. *Mucosal Immunology*, 2015. **8(4)**: p. 815-827.
197. Adel-Patient K, *et al.*, Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, 2005. **60(5)**: p. 658-664.
198. Adel-Patient K, *et al.*, Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clinical & Experimental Allergy*, 2003. **33(3)**: p. 376-385.
199. Dalgarrondo M, *et al.*, Sunflower Seed Proteins: Characterization and Subunit Composition of the Globulin Fraction. *Journal of Experimental Botany*, 1984. **35(160)**: p. 1618-1628.
200. Laemmli UK, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227(5259)**: p. 680-685.

201. Molina MI, *et al.*, Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004. **52(19)**: p. 6023-9.
202. González-Pérez S, *et al.*, Conformational states of sunflower (*Helianthus annuus*) Helianthinin: effect of heat and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. **52(22)**: p. 6770-6778.
203. González-Pérez S, *et al.*, Formation and stability of foams made with sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53(16)**: p. 6469-6476.
204. Anisimova IN, *et al.*, Polymorphism and Inheritance of Seed Storage Protein in Sunflower. *Russian Journal of Genetics*, 2004. **40(9)**: p. 995-1002.
205. Duca M, *et al.*, Polymorphism of Helianthinin Polypeptides from Various Sunflower Genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2008. **22(4)**: p. 897-900.
206. Raymond J, *et al.*, 11 S seed storage proteins from *Helianthus* species (Compositae): Biochemical, size and charge heterogeneity. *Plant Systematics and Evolution*, 1995. **198(3)**: p. 195-208.
207. Guéguen J, *et al.*, Functionality of the 2S Albumin Seed Storage Proteins from Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996. **44(5)**: p. 1184-1189.
208. Bernard H, *et al.*, Identification of a New Natural Ara h 6 Isoform and of Its Proteolytic Product as Major Allergens in Peanut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55(23)**: p. 9663-9669.
209. Adel-Patient K, *et al.*, Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clinical & Experimental Allergy*, 2005. **35(4)**: p. 539-546.
210. Jönsson F, *et al.*, Mast Cells and Company. *Frontiers in Immunology*, 2012. **3(16)**.
211. van Wijk F, *et al.*, The Effect of the Food Matrix on In Vivo Immune Responses to Purified Peanut Allergens. *Toxicological Sciences*, 2005. **86(2)**: p. 333-341.
212. Hazebrouck S, *et al.*, Variable IgE cross-reactivity between peanut 2S-albumins: The case for measuring IgE to both Ara h 2 and Ara h 6. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019. **49(8)**: p. 1107-1115.
213. Rodriguez MJ, *et al.*, LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Scientific Reports*, 2017. **7(1)**: p. 40449.

214. Wavrin S, *et al.*, Cutaneous or respiratory exposures to peanut allergens in mice and their impacts on subsequent oral exposure. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2014. **164(3)**: p. 189-99.
215. Bernard H, *et al.*, Allergenicity of peanut component Ara h 2: Contribution of conformational versus linear hydroxyproline-containing epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015. **135(5)**: p. 1267-1274.e8.
216. Díaz-Perales A, *et al.*, Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. **111(3)**: p. 628-33.
217. Bernard H, *et al.*, Serological characteristics of peanut allergy in children. *Allergy*, 2003. **58(12)**: p. 1285-1292.
218. Astwood JD, *et al.*, Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*, 1996. **14(10)**: p. 1269-73.
219. Mills CEN, *et al.*, Literature review: 'in vitro digestibility tests for allergenicity assessment'. *EFSA Supporting Publications*, 2013. **10(12)**: p. 529E.
220. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms, *et al.*, Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 2017. **15(6)**: p. 4862.
221. Mandalari G, *et al.*, In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009. **55(3)**: p. 372-81.
222. Reddy IM, *et al.*, Structural and conformational basis of the resistance of beta-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988. **36(4)**: p. 737-741.
223. Lisak K, *et al.*, Chymotrypsin selectively digests β -lactoglobulin in whey protein isolate away from enzyme optimal conditions: potential for native α -lactalbumin purification. *J Dairy Res*, 2013. **80(1)**: p. 14-20.
224. Koppelman SJ, *et al.*, Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010. **54(12)**: p. 1711-21.
225. Lehmann K, *et al.*, Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochemistry journal*, 2006. **395(3)**: p. 463-72.

226. Suhr M, *et al.*, Isolation and characterization of natural Ara h 6: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004. **48(5)**: p. 390-9.
227. Klueber J, *et al.*, Homologous tropomyosins from vertebrate and invertebrate: Recombinant calibrator proteins in functional biological assays for tropomyosin allergenicity assessment of novel animal foods. *Clinical & experimental allergy*, 2020. **50(1)**: p. 105-116.
228. Radauer C, *et al.*, Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. **120(3)**: p. 518-25.

Listes de communications

Publication (en soumission)

Achour J, Guinot M, Guillon B, Kapel R, Galet O, Adel-Patient K, Hazebrouck S, Bernard H. “Assessment of the sensitization potency of sunflower seed proteins in a mouse model: is 2S-albumin SFA-8 really allergenic?” *Molecular Nutrition and Food Research*. Oct 2020.

Communication écrites (poster)

- “Allergy risk assessment of sunflower seed proteins” - **4th International Conference on Allergenicity risk assessment of new and modified proteins in food (COST ImpaRAS)**, Naples (Italy) – Juin 2018
- « Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol » – **Département R&D Avril**, Bruz, (France) – Décembre 2018
- « Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol » – **14^{ème} Congrès Francophone d’Allergologie (CFA)**, Paris (France) – Avril 2019
- “Investigation of the sensitization potential of sunflower seed proteins in a mouse model” – **Congrès Annuel de l’Académie Européenne d’Allergie et d’Immunologie Clinique (EAACI)**, Lisbonne (Portugal) – juin 2019

Communication orale

- « Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol » – **Département R&D Avril**, Bruz, (France) – Décembre 2018
- Journée des doctorants INRAE, **INRAE**, Jouy-en-Josas (France) – Juin 2018
- Journée des doctorants DMTS, **CEA Centre de Paris-Saclay**, Gif-Sur-Yvette (France) – Décembre 2019

Formation COST ImpARAS

- “The use of Proteomics and Mass Spectrometry analysis to improve allergenicity risk assessment strategies” – **Université de Liège**, Liège (Belgium)
- “Animal models of food allergy” – **Université de Médecine de Vienne**, Vienne (Autriche)

Annexes

Manuscrit soumis au journal : Molecular Nutrition and Food Research

Assessment of the sensitization potency of sunflower seed proteins in a mouse model: is 2S-albumin SFA-8 really allergenic?

ACHOUR Jihana¹, GUINOT Marine¹, GUILLON Blanche¹, KAPEL Romain², GALET Olivier³, ADEL-PATIENT Karine¹, HAZEBROUCK Stéphane^{1*} and BERNARD Hervé^{1*}

¹ CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS)/ Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France.

² Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Université de Lorraine, CNRS, LRGP, Nancy, France

³ Avril SCA, 11/13, rue de Monceau, Paris, France.

*These authors share senior authorship.

Corresponding author: Stéphane Hazebrouck, UMR CEA INRAE DMTS, CEA de Saclay, bât. 136, RTE DP 36, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

Email: stephane.hazebrouck@cea.fr; Fax: +33 (0)169085907

Abbreviations

SFS: Sunflower Seed, SESA: Seed Storage 2S-Albumin, AChE: acetylcholinesterase, nsLTP: non-specific lipid transfer protein, MS: Mass spectrometry, PE: peanut extract

Keywords

Sunflower, 2S-albumin, nsLTP, allergen, cross-reactivity

Running title

Sunflower seed allergens

Abstract

Scope: Sunflower seed (SFS) protein is a good candidate to diversify protein sources for sustainable human nutrition. Food allergy to SFS is not frequent and only nsLTP Hel-a-3 was officially recognized as a food allergen. Out of the eleven seed storage 2S-albumins (SESA) evidenced in SFS, only SFA-8 allergenicity has been investigated. We thus developed a mouse model to compare SFS protein allergenicity, in particular that of SESA.

Methods and results: The most abundant SESA and nsLTP were purified through a combination of chromatographic methods. Their sensitization potencies were compared in BALB/c mice orally sensitized to different SFS isolates. Allergenicity of SFA-8 and Hel-a-3 was confirmed but mice were also highly sensitized to other SESA such as SESA2-1 or SESA20-2. Furthermore, competitive inhibition of IgE-binding revealed that SFA-8 IgE-reactivity was due to cross-reactivity with other SESA. 11S-globulins were weakly immunogenic as suggested by their rapid degradation during in vitro gastroduodenal digestion. In contrast, Hel-a-3, SESA2-1 and SFA-8 were highly resistant to proteolysis and gastroduodenal digestion did not affect their IgE-reactivity.

Conclusions: SFA-8 was a less potent allergen than SESA2-1 or SESA20-2 in our mouse model. Allergenicity of these SESA must be now assessed in food-allergic patients.

1. Introduction

Sunflower seeds (*Helianthus annuus*, SFS) have been consumed as early as 3000-5000 BC by native Americans as a source of flour for bread [1]. Nowadays, sunflower is one of the most widely cultivated plant for oil production. The residual oil cake is also used for livestock feeding because of its high content in protein. Introduction of SFS protein into human nutrition appears as a good candidate to diversify protein sources for safe and sustainable human consumption in response to a steadily growing population.

Use of SFS proteins as food ingredient requires the production of affordable protein isolates of good nutritional quality. In this regard, SFS proteins exhibit a relatively well-balanced composition in amino acids with a slightly limiting content in lysine and high content in methionine and cysteine [2]. The seed contains two main types of storage proteins: the 11S-globulins (or helianthinins) and the seed storage 2S-albumins (SESA). 2S-albumins are water-soluble and can represent 20% to 60% of the total storage protein [3, 4]. At the protein level, 11 different SESA have been identified in SFS but SESA2, SFA-8 (or SESA3) and SESA20-2

are predominant [5]. In contrast to the single monomeric SFA-8, some SESA such as SESA2 encode heterodimeric preproalbumins leading after maturation to SESA2-1 and SESA2-2. SFA-8 also differs from the other SESA by an unusual amount of 16 methionine residues in addition to the 8 conserved cysteine residues characteristic of the 2S-albumins [4, 6]. Because of its good emulsification properties, SFA-8 has been previously studied for food industry application [7-9]. In contrast, the other SESA have been rarely investigated because of the difficulty to obtain sufficient amount of single homogeneous components [5, 7].

Although SFS are consumed all over the world and have not been assigned for mandatory allergen labelling in the EU, the use of SFS protein isolate as food ingredient requires allergenic risk assessment. In this regard, seeds are generally considered as a potential source of food allergens with a risk for anaphylaxis. Therefore, SFS were considered by the EuroPrevall project as priority food, because of its frequent consumption and potential to cause food allergy reactions [10]. In this study, prevalence of sensitization to SFS reached up to 5% of adults in European countries while seroprevalence reached 8.7% in India [11]. Fortunately, subjects sensitized to SFS have been described as tolerant, *i.e.* not developing clinical symptoms after ingestion, in a high proportion of cases [12]. Nevertheless, several cases of anaphylactic reaction after ingestion of SFS have been reported [13-16]. Crespo *et al.* reported that 56% of Spanish patients allergic to vegetables other than legumes were allergic to SFS [17]. SFS belonged to the three foods most commonly causing probable food allergy in Athens [18].

So far, allergic reactions to SFS have been attributed to two proteins: the non-specific lipid transfer protein (nsLTP) Hel a 3 [16, 19] and SFA-8 [20]. Although SFA-8 has been reported as an IgE-binding protein, it has been also considered as a weak allergen in comparison with other 2S-albumins such as Ber e 1 from Brazil nut [21]. To our knowledge, no investigation about the allergenic potency of other SESA has been reported. Cross-reactivity between SFS proteins and other food allergens is also expected. For example, Comstock *et al* reported a possible co-sensitization to SFS in peanut-allergic patients [22], and Ukleja-Sokolowska *et al* reported a partial IgE cross-reactivity between Hel a 3 and peanut nsLTP Ara h 9 [19].

In the present work, we aimed to develop a mouse model of oral sensitization to SFS proteins to compare the sensitization potency of different SFS protein isolates and to characterize SESA allergenic properties. For this purpose, we produced homogenous fractions of the most abundant 2S-albumins. We also investigated the potential cross-reactivity between SFS and peanut allergens. Finally, we evaluated the impact of *in vitro* gastroduodenal digestion on the IgE-immunoreactivity of SFS proteins.

2. Materials and Methods

2.1. SFS protein extraction

SFS cold press meal obtained after oil extraction (OLEAD, Pessac, France) was ground with an Ultra-Turrax® homogenizer and defatted (see Supporting Information). After resuspension of defatted sample in 20 volumes of extraction buffer (100 mM sodium borate pH 9.0, 500 mM NaCl, 0.9% n-Octyl- β -D-glucopyranoside) for 4h at RT and centrifugation at 3000 x g for 30 min at 4°C, the supernatant containing soluble proteins was collected and the pellet was resuspended in 4 M urea for 2h at RT and centrifuged for extraction of insoluble protein. The two collected supernatants were separately dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, 3.5 kDa cut-off) and then pooled. The resulting whole SFS protein extract (SFS-WP) was stored at -20°C.

2.2. Protein fractionation, purification and biotinylation

SFS-WP proteins were first fractionated using 40% ammonium sulfate precipitation (see Supporting Information). After centrifugation, the supernatant (S40) and the precipitate (P40) were dialyzed against 20 mM sodium phosphate pH 7.4 buffer (3.5 kDa cut-off). Protein fractionation from S40 was carried on by performing ion exchange chromatography followed by RP-HPLC (see Supporting Information). Final fractions were freeze-dried before characterization.

Biotinylation of purified SFS protein was performed with EZ-link® NHS-PEG4-biotin according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific) and was followed by mass spectrometry (MS) analysis.

2.3. Protein characterization

SDS-PAGE analysis was performed with precast gel (NuPage™ 4-12% Bis-Tris gels). Purified proteins were characterized by MS using an Ultraflex MALDI TOF/TOF apparatus (Bruker Daltonics, GmbH). Proteomic analysis were performed following *in-gel* [23] or *in-solution* digestion procedures (Pierce Trypsin Protease™, MS Grade, Thermo Fisher Scientific). Mass spectra were analyzed by using Peptide Analysis® software (Bruker Daltonics, GmbH), and protein identification was carried on by using Peptide Mass (ExPASy server) [24], and a custom-built database.

2.4. SFS isolates

SFS isolates were produced from the cold press meal (OLEAD, Pessac, France) as previously described with minor modifications [25]. Protein was then extracted as described in section 2.1. The SFS-WPI extract corresponded to a whole protein isolate. The SFS-IP and SFS-IS extracts were generated from isolates obtained after isoelectric precipitation: SFS-IP contained precipitated proteins and SFS-IS contained soluble proteins. The SFS-AS extract contained soluble proteins obtained after acidification of the cold press meal mixed with water (see Supporting Information).

2.5. Sensitization of mice to SFS protein

Female BALB/cByJ mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed under standard breeding conditions and were acclimated for 2 weeks. All experiments were performed according to the European Community rules on animal care and the study design was approved by the local ethics committee CETEA (Ethical approval number: A16-079). Seven-week-old mice (n=10/group) were orally sensitized to SFS-WP, SFS-IS, SFS-AS or SFS-IP on day 1, 8, 15, 22, 29 and 36 by intragastric administrations (300 μ L/mouse) of 5 mg of protein mixed with 10 μ g of cholera toxin (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). A control group (n=10) received saline buffer (PBS). Blood samples were collected on day 43 from the retro-orbital venous plexus on mice anesthetized with isoflurane (Belamont, Nicholas Piramal Limited, London, UK). After blood collection, mice were euthanized by cervical dislocation to collect spleens for splenocytes reactivation. In order to evaluate IgE cross-reactivity between SFS and peanut proteins, another group of mice (n=10) were orally sensitized to a whole protein extract from roasted peanut (PE) following the same protocol of intragastric administrations as described above [26].

2.6. Humoral responses

Specific IgG1 levels to SFS proteins were measured using a direct enzyme allergosorbent test with proteins (2.5 μ g/mL) passively adsorbed on microtiter plates [27]. After ON incubation at 4°C with diluted sera (1:200,000), IgG1 binding was revealed by the addition of acetylcholinesterase (AChE)-labeled anti-mouse IgG1 monoclonal antibody. Ellman's reagent was then used to determine AChE activity and absorbance was measured at 414 nm.

SFS-specific IgE levels were determined by using a reverse enzyme allergosorbent test that measures the binding of biotinylated allergens by serum IgE antibodies captured by a specific monoclonal antibody immobilized on the solid phase. Briefly, rat anti-mouse IgE antibody (Clone LOME-3, AbD Serotec, Biorad) was adsorbed on microtiter plates (2.5 μ g/mL). After ON incubation with diluted sera (1:25), biotinylated SFS proteins were added (0.05 nmol/mL)

for 4h at RT. After washing, AChE-labeled neutravidin was added before revelation with Ellman's reagent.

For competitive inhibition of IgE-binding, a pool of sera from mice sensitized to SFS-WPI, SFS-IS and SFS-AS was used. After ON incubation with 50 μ L/well of diluted serum (1/25), 25 μ L of inhibitors (*i.e.* increasing concentration of SFS protein) were mixed with 25 μ L of biotinylated SFS protein, and incubated at RT for 4h. IgE-binding was then revealed as described above. Results were expressed as B/B₀, B and B₀ representing the amount of labeled SFS protein bound to immobilize IgE antibodies in the absence or presence of a known concentration of inhibitor, respectively.

2.7. Splenocyte reactivation and cytokines secretion

Spleens were pooled by pairs (5 pools/group) and were mechanically homogenized (GentMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, USA). After lysis of red blood cells with lysing buffer (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybrid-Max™, Sigma-Aldrich), splenocytes were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U penicillin and 100 mg/mL streptomycin. Cells (10^6 cells/well) were incubated for 60h at 37°C (5% CO₂) in 96-well culture plates in the presence of SFS protein (20 μ g/mL), SFS-WP (100 μ g/mL) or PBS. Polymyxin B sulfate salt (50 μ g/mL, Sigma-Aldrich) was added to each activator for endotoxin neutralization. Cytokines secretion (IL-5, IL-10, IL-13 and INF- γ) was measured in collected supernatants by using Bioplex® 200 System and commercial multiplexed kits according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

2.8. In vitro gastroduodenal digestion

According to Mandalari *et al.*, proteins extract (10 mg) or purified proteins (1 mg) were resuspended into simulated gastric fluid (0.15 M NaCl, pH 2.5) [28]. Samples were incubated at 37°C during 10 min and gastric digestion was started by adding pepsin (182 U/mg). Aliquots (200 μ L) were collected at 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, and 60 min. Gastric digestion was stopped after 60 min by adding 0.5 M ammonium bicarbonate at pH 8. Duodenal digestion was then performed by adjusting pH to 6.5 with simulated duodenal fluid (0.15 M NaCl, pH 6.5). A simulated bile salt solution buffer (4 mM taurocholate sodium, 4 mM sodium glycodeoxycholate, 25 mM Bis-Tris buffer, 0.44 U/ mg α -chymotrypsin, and 34 U/ mg trypsin, pH 6.5) was then added at 37°C. Aliquots (200 μ L) were collected at 0, 1, 2, 5, 10, 20, and 30 min. Reactions were stopped by adding protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich).

2.9. Statistical analysis

Data on humoral responses were analyzed using nonparametric tests (Kruskall-Wallis test with Dunn's multiple comparison test). Data on cytokine secretions from splenocytes were analyzed using one-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8.01 software and $p < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Fractionation of SFS proteins

After precipitation of SFS-WP with 40% ammonium sulfate, the supernatant (S40) contained predominantly proteins of low MW (< 30 kDa) corresponding mainly to 2S-albumins and nsLTPs proteins (Figure 1). In contrast, the precipitate (P40) contained high MW proteins (> 30 kDa) that corresponded mostly to 11S-globulin acidic and basic subunits. Additional 2D electrophoresis showed that 2S-albumins and nsLTPs presented homogeneous physicochemical properties, with a basic pI varying between 7.5 and 8. In contrast, 11S-globulins displayed a wider range of pI varying between 5 and 9 (Figure S1).

3.2. 2S-albumins purification and identification

Proteins from S40 were first fractionated by ion-exchange chromatography and then further separated by RP-HPLC. Finally, fourteen well-resolved fractions were obtained and corresponded to several isoforms of SFS proteins purified near to homogeneity for most of them (Figure 2). Protein identification was performed by MS analysis of purified protein and corresponding tryptic peptides (Table S1). Although SFS 2S-albumins share close physicochemical properties, we succeeded to isolate the most abundant ones: SESA1-2, SESA2-1, SESA2-2, SFA-8, and SESA20-2. Several other isoforms were purified such as SESA3c, an isoform of SFA-8. Of note, SESA2-1 was purified as a mix of 2 isoforms that differ by one threonine residue at the C-terminus, as previously reported [6]. Purified SFA-8, SESA2-1, SESA20-2 and nsLTP Hel a 3 were then used in the following experiments to characterize immune responses induced in mice sensitized to SFS proteins.

3.3. Sensitization potency of SFS protein

Compared to the whole protein isolate (SFS-WPI), SFS-IP was highly enriched in 11S-globulins while SFS-IS and SFS-AS were highly enriched in 2S-albumins (Figure 1).

Oral sensitization to the different isolates induced humoral responses specific to SFS proteins in all groups of mice (Figure 3A). Compared to mice sensitized to SFS-IP, mice sensitized to protein extracts containing 2S-albumins, i.e. SFS-WPI, IS and AS, developed higher levels of specific IgG1 (Figure 3A). A similar profile was observed with IgG1 and IgE responses specific to purified 2S-albumins and nsLTP (Figure 3B and 4). Indeed, mice sensitized to SFS-WPI, IS and AS developed high IgG1 and IgE levels to SESA2-1, SESA20-2, SFA-8 and, to a lesser extent, to Hel a 3. In contrast, humoral responses to 2S-albumins and Hel a 3 were not significant in mice sensitized to SFS-IP. We also measured levels of specific IgG1 to some purified fractions of 11S-globulin subunits but they were about 50 to 100-fold lower than those measured against SESA, with no significant differences between mice groups (data not shown).

Finally, splenocytes reactivation was performed at the end of the sensitization protocol to assess cellular responses and cytokine secretions in the different group of mice. Expected. In line with the humoral responses, splenocytes reactivated with SFS proteins secreted high levels of Th2 cytokines IL-5 and IL-13 and low levels of IL-10 and IFN- γ (Figure 5). The highest levels of Th2 cytokine secretion were observed with mice sensitized to SFS-AS. Comparable profiles of cytokine secretion were observed after cell reactivation with purified SESA2-1, SESA20-2 and SFA-8 while reactivation with Hel a 3 led to lower levels of cytokine secretion (Figure S2, Supporting Information).

3.4. IgE cross-reactivity between SESA

As shown on Figure 6, competitive inhibition of IgE-binding revealed a high level of cross-reactivity between SESA. According to a sequence identity of 92% between SESA2-2 and SESA20-2, the two SESA displayed similar inhibitory capacities (Figure 6A). Nevertheless, a partial cross-reactivity of about 50% was also observed between SESA2-1 and SESA20-2, which share a sequence identity of only 31 % (Figure 6A and 6B). More surprisingly, SFA-8 exhibited the lower inhibitory capacity, even for inhibiting IgE-binding to it-self (Figure 6C), thus indicating that IgE-binding to SFA-8 was not due to IgE antibodies primarily specific to SFA-8 but rather to the cross-reactivity with IgE antibodies specific to other SESA.

We also investigated cross-reactivity between SFS and peanut protein. When testing sera from SFS-sensitized mice, no significant IgG1 and IgE responses against peanut proteins were detected (Figure S3A, Supporting Information). Accordingly, no significant IgG1 and IgE responses against SFS proteins were observed in sera from peanut-sensitized mice (Figure S3B, Supporting Information).

3.5. *In vitro* gastroduodenal digestion

The isolate SFS-IP exhibited a low resistance to proteolytic digestion, as evidenced by partial or total disappearance of high MW proteins and the persistence, after 60 min of gastric digestion, of small peptides around 5 kDa, which disappeared rapidly after 1 min of duodenal digestion (Figure 7A). In contrast, SFS-AS exhibited a very strong resistance to gastroduodenal digestion with a very limited impact of gastric digestion and the persistence of large resistant peptides (> 10kDa) after duodenal digestion (Figure 7B). This was further confirmed by submitting purified Hel a 3, SFA-8 and SESA2-1 to gastroduodenal digestion. Hel a 3 appeared to be totally resistant to gastroduodenal digestion (Figure 7C). Only a shift to slightly higher MW could be observed for SFA-8 when performing SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions. However, under reducing conditions, a peptide at around 5 kDa appeared during gastric digestion while two resistant peptides (at 4 and 6 kDa) could be observed throughout duodenal digestion of SFA-8 (Figure 7D). For SESA2-1, only duodenal digestion led to the production of two fragments of around 4 kDa and 8 kDa (Figure 7E). However, this limited proteolytic degradation of both SESA did not affect their IgE-immunoreactivity as shown by competitive inhibition of IgE-binding to SFA-8 and SESA2-1 by corresponding digested proteins (Figure 8).

4. DISCUSSION

Introduction of novel food ingredients into human nutrition requires to improve the strategy of allergy risk assessment. Therefore, there is a continued interest in the development of suitable animal models that could provide a more holistic approach, in particular for evaluating *de novo* sensitization [29]. Such models would be even more useful when history of exposure is unknown or when rare cases of allergy toward homolog allergens would suggest an allergenic potential of the assessed proteins. So far, SFS food allergens have been rarely investigated and only one allergen, Hel a 3, is actually considered as a food allergen by the WHO/IUIS [30]. It is still unclear whether SFA-8 is a food allergen although it has been shown to be an IgE-binding protein. In the present work, we aimed to compare in a mouse model the allergenic potential of SFS proteins including SFA-8 and other SESA, nsLTP and 11S-globulins. The mouse model of sensitization to SFS proteins was also intended to evaluate the residual IgE-reactivity of digested SFS proteins.

First, we purified the most abundant SFS proteins, including several 2S-albumins. Previous characterization of the different SESA was impaired by the difficulty to produce homogenous

preparations of each 2S-albumin. Jayasena *et al* purified minute amount of SESA to perform MS analysis [5], while Berez *et al* characterized three mixtures differentially enriched in SESA [7]. Here, several isoforms of 2S-albumins were purified near to homogeneity and the most abundant and the most homogenous fractions were used to develop immunoassays. Of note, in addition to Hel a 3, another nsLTP (Uniprot assessing number: A0A251SK36) was also isolated but SDI-9 (Q39950), which was previously described by Berez *et al.*, was not detected [7].

Oral administrations of different SFS isolates to mice emphasized the sensitization potency of sunflower 2S-albumins and the low immunogenicity of 11S-globulin subunits. Indeed, the lowest levels of IgG1 and IgE to SFS proteins were observed in mice sensitized to SFS-IP mostly composed of 11S-globulins. In contrast, the highest levels of specific IgG1 and IgE were detected in mice sensitized to extracts enriched in 2S-albumins. We then confirmed the IgE-immunoreactivity of SFA-8. However, it appeared that other 2S-albumins such as SESA2-1 and SESA 20-2 displayed a higher sensitization potency. This is in agreement with Kelly *et al* who showed by immunoblotting assay that IgE from SFS-allergic patients recognized not only SFA-8 but also several other proteins with a higher MW, ranging from 12 kDa to 21 kDa [20]. Moreover, competitive inhibition of IgE-binding revealed that IgE-reactivity of SFA-8 mostly resulted from the binding of cross-reactive IgE antibodies primarily specific to other SESA. In this regard, sensitization to SFA-8 was probably due to structure similarities with other SESA. Interestingly, Kean *et al* also suggested that, compared to the Brazil nut 2S-albumin, SFA-8 was a weak allergen because it could promote a Th1 response and/or reduce the Th2 bias of the T cell response [21]. In line with that study, it can be noted that, in our experimental model, the highest levels of IFN- γ secretion were obtained in splenocytes reactivated with SFA-8 (Figure S2). However, underlying cellular mechanisms remain to be elucidated.

Potential Ig cross-reactivity between SFS and peanut proteins was also investigated but no significant IgG1- and IgE-reactivity to peanut proteins was detected in SFS-sensitized mice. However, IgE cross-reactivity between Hel a 3 and Ara h 9, which are 48% identical, could not be investigated since Hel a 3 exhibited an allergenic potency significantly lower than that of SESA in the present mouse model. Low levels of IgG1 and IgE to Hel a 3 could be due to various parameters of our experimental model such as the oral route of sensitization, the use of SFS isolates and of cholera toxin as adjuvant. In comparison, Rodriguez *et al* previously obtained an efficient sensitization of mice to Pru p 3, a nsLTP homolog to Hel a 3, by performing intranasal administrations of purified Hel a 3, in presence of LPS as adjuvant [31]. Cross-reactivity between Hel a 3 and Ara h 9 would be then more adequately investigated in patients co-sensitized to several nsLTP, as observed in the Mediterranean area [32].

Finally, sensitization potency of SFS proteins could be only partially related to their resistance to proteolysis. Indeed, 11S-globulins subunits were quickly degraded during gastroduodenal digestion and accordingly, mice sensitized to SFS-IP developed significantly lower levels of specific IgG1 and IgE antibodies. In contrast, 2S-albumins, which were highly resistant to proteolytic degradation, were the most allergenic SFS proteins. Nevertheless, among 2S-albumins, we showed that sensitization occurred primarily against SESA20-2 or SESA2-1 rather than to SFA-8. This difference of potency between 2S-albumins could be due to the slightly lower resistance of SFA-8 to gastroduodenal digestion, as previously described [33]. However, digestion of SFA-8 remained limited since SFA-8 immunoreactivity was not affected by proteolysis, as shown by competitive inhibition with sera from sensitized mice. Furthermore, Hel a 3 was totally resistant to digestion but remained less allergenic than the SESA. The level of resistance to proteolysis failed then to explain the weaker allergenic potency of SFA-8 and Hel a 3.

To conclude, our mouse model of oral sensitization to SFS protein revealed that IgE sensitization was primarily directed against SFS 2S-albumins such as SESA2-1 or SESA20-2 and that IgE-binding to SFA-8 was mostly due to IgE-cross-reactivity. This study illustrates particularly the difficulty to assess the allergy risk of a food protein since SFA-8 appeared as a weak allergen despite being an IgE-binding protein. The panel of SFS proteins purified in this study will be now used to establish the sensitization profile of patients allergic to SFS protein.

Acknowledgement/funding

This project received financial support from SOFIPROTEOL as part of FASO PRODIAL project. JA, SH and KAP participated actively to the COST Action FA1402 – IMPARAS (Improving Allergy Risk Assessment Strategy for New Food Proteins). We thank Sara Albe-Slabi and Odile Mesieres from LRGP and Mbalo Ndiaye from AVRIL for the production of SFS isolates. We thank Victoria Pineau for management of the PRODIAL project.

Author contributions

JA, MG, BG, HB and SH performed the experiments. HB, KAP and SH designed the study. RK provided SFS isolates. OG supervised the PRODIAL project. HB, KAP, OG and SH supervised the study. JA, HB and SH wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

- [1] A. A. Schneiter, American Society of Agronomy., Crop Science Society of America., Soil Science Society of America., *Sunflower technology and production*, American Society of Agronomy : Crop Science Society of America : Soil Science Society of America, Madison, Wis. **1997**.
- [2] R. Tessier, N. Khodorova, J. Calvez, R. Kapel, A. Quinsac, J. Piedcoq, D. Tome, C. Gaudichon, 15N and (2)H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *J Nutr* **2020**, *150*, 450-457.
- [3] I. N. Anisimova, R. J. Fido, A. S. Tatham, P. R. Shewry, Genotypic variation and polymorphism of 2S albumins of sunflower. *Euphytica* **1995**, *83*, 15-23.
- [4] A. A. Kortt, J. B. Caldwell, Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2805-2810.
- [5] A. S. Jayasena, B. Franke, J. Rosengren, J. S. Mylne, A tripartite approach identifies the major sunflower seed albumins. *Theor Appl Genet* **2016**, *129*, 613-629.
- [6] B. Franke, M. L. Colgrave, J. S. Mylne, K. J. Rosengren, Mature forms of the major seed storage albumins in sunflower: A mass spectrometric approach. *J Proteomics* **2016**, *147*, 177-186.
- [7] B. Berez, E. N. C. Mills, L. Tamas, F. Lang, P. R. Shewry, A. R. Mackie, Structural Stability and Surface Activity of Sunflower 2S Albumins and Nonspecific Lipid Transfer Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 6490-6497.
- [8] S. Gonzalez-Perez, G. A. van Koningsveld, J. M. Vereijken, K. B. Merck, H. Gruppen, A. G. Voragen, Emulsion properties of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J Agric Food Chem* **2005**, *53*, 2261-2267.
- [9] J. Guéguen, Y. Popineau, I. N. Anisimova, R. J. Fido, P. R. Shewry, A. S. Tatham, Functionality of the 2S Albumin Seed Storage Proteins from Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 1184-1189.
- [10] P. Burney, C. Summers, S. Chinn, R. Hooper, R. van Ree, J. Lidholm, Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* **2010**, *65*, 1182-1188.
- [11] P. A. Mahesh, G. W. Wong, L. Ogorodova, J. Potts, T. F. Leung, O. Fedorova, A. D. Holla, M. Fernandez-Rivas, E. N. Clare Mills, I. Kummeling, S. A. Versteeg, R. van Ree, M. Yazdanbakhsh, P. Burney, Prevalence of food sensitization and probable food allergy among adults in India: the EuroPrevall INCO study. *Allergy* **2016**, *71*, 1010-1019.
- [12] A. A. Guerrero, M. L. Macias, F. Gomez, N. Blanca-López, E. Seoane, G. Canto, M. Osorio, C. Gomez-Casado, A. Diaz-Perales, M. Blanca, Subjects Sensitized to Sunflower Seed

(*Helianthus annuus*) Are Tolerant in a High Proportion of Cases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2013**, *131*, AB87.

[13] J. C. Caubet, M. F. Hofer, P. A. Eigenmann, J. Wassenberg, Snack seeds allergy in children. *Allergy* **2010**, *65*, 136-137.

[14] E. Lavine, M. Ben-Shoshan, Allergy to sunflower seed and sunflower butter as proposed vehicle for sensitization. *Allergy Asthma Clin Immunol* **2015**, *11*, 2.

[15] J. H. Noyes, G. K. Boyd, G. A. Settipane, Anaphylaxis to sunflower seed. *J Allergy Clin Immunol* **1979**, *63*, 242-244.

[16] A. Yagami, Anaphylaxis to lipid transfer protein from sunflower seeds. *Allergy* **2010**, *65*, 1340-1341.

[17] J. F. Crespo, C. Pascual, A. W. Burks, R. M. Helm, M. M. Esteban, Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol* **1995**, *6*, 39-43.

[18] S. A. Lyons, P. G. J. Burney, B. K. Ballmer-Weber, M. Fernandez-Rivas, L. Barreales, M. Clausen, R. Dubakiene, C. Fernandez-Perez, P. Fritsche, M. Jedrzejczak-Czechowicz, M. L. Kowalski, T. Kralimarkova, I. Kummeling, T. B. Mustakov, A. F. M. Lebens, H. van Os-Medendorp, N. G. Papadopoulos, T. A. Popov, A. Sakellariou, P. M. J. Welsing, J. Potts, E. N. C. Mills, R. van Ree, A. C. Knulst, T. M. Le, Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *J Aller Cl Imm-Pract* **2019**, *7*, 1920-+.

[19] N. Ukleja-Sokolowska, E. Gawronska-Ukleja, M. Zbikowska-Gotz, Z. Bartuzi, L. Sokolowski, Sunflower seed allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2016**, *29*, 498-503.

[20] J. D. Kelly, S. L. Hefle, 2S methionine-rich protein (SSA) from sunflower seed is an IgE-binding protein. *Allergy* **2000**, *55*, 556-560.

[21] D. E. Kean, H. S. Goodridge, S. McGuinness, M. M. Harnett, M. J. Alcocer, W. Harnett, Differential polarization of immune responses by plant 2S seed albumins, Ber e 1, and SFA8. *J Immunol* **2006**, *177*, 1561-1566.

[22] S. S. Comstock, C. Kath, S. S. Teuber, Sunflower Seed Food Allergy as a Co-allergy With Peanut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2007**, *119*, S116.

[23] H. Bernard, L. Mondoulet, M. F. Drumare, E. Paty, P. Scheinmann, R. Thai, J. M. Wal, Identification of a new natural Ara h 6 isoform and of its proteolytic product as major allergens in peanut. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, 9663-9669.

[24] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, H. Stockinger, ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, W597-603.

[25] S. Albe Slabi, C. Mathe, M. Basselin, X. Framboisier, M. Ndiaye, O. Galet, R. Kapel, Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal. *Food Chem* **2020**, *317*, 126423.

- [26] H. Bernard, S. Ah-Leung, M. F. Drumare, C. Feraudet-Tarisse, V. Verhasselt, J. M. Wal, C. Creminon, K. Adel-Patient, Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice. *Allergy* **2014**, *69*, 888-897.
- [27] B. Guillon, H. Bernard, M. F. Drumare, S. Hazebrouck, K. Adel-Patient, Heat processing of peanut seed enhances the sensitization potential of the major peanut allergen Ara h 6. *Mol Nutr Food Res* **2016**, *60*, 2722-2735.
- [28] G. Mandalari, K. Adel-Patient, V. Barkholt, C. Baro, L. Bennett, M. Bublin, S. Gaier, G. Graser, G. S. Ladics, D. Mierzejewska, E. Vassilopoulou, Y. M. Vissers, L. Zuidmeer, N. M. Rigby, L. J. Salt, M. Defernez, F. Mulholland, A. R. Mackie, M. S. J. Wickham, E. N. C. Mills, In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regul Toxicol Pharm* **2009**, *55*, 372-381.
- [29] K. L. Bogh, J. van Bilsen, R. Glogowski, I. Lopez-Exposito, G. Bouchaud, C. Blanchard, M. Bodinier, J. Smit, R. Pieters, S. Bastiaan-Net, N. de Wit, E. Untersmayr, K. Adel-Patient, L. Knippels, M. M. Epstein, M. Noti, U. C. Nygaard, I. Kimber, K. Verhoeckx, L. O'Mahony, Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of food allergens in animal models. *Clin Transl Allergy* **2016**, *6*.
- [30] A. Pomés, J. M. Davies, G. Gadermaier, C. Hilger, T. Holzhauser, J. Lidholm, A. L. Lopata, G. A. Mueller, A. Nandy, C. Radauer, S. K. Chan, U. Jappe, J. Kleine-Tebbe, W. R. Thomas, M. D. Chapman, M. van Hage, R. van Ree, S. Vieths, M. Raulf, R. E. Goodman, WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular Immunology* **2018**, *100*, 3-13.
- [31] M. J. Rodriguez, A. Aranda, T. D. Fernandez, N. Cubells-Baeza, M. J. Torres, F. Gomez, F. Palomares, J. R. Perkins, J. Rojo, A. Diaz-Perales, C. Mayorga, LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Sci Rep-Uk* **2017**, *7*.
- [32] I. Lauer, N. Dueringer, S. Pokoj, S. Rehm, G. Zoccatelli, G. Reese, M. S. Miguel-Moncin, A. Cistero-Bahima, E. Enrique, J. Lidholm, S. Vieths, S. Scheurer, The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut. *Clin Exp Allergy* **2009**, *39*, 1427-1437.
- [33] B. Berez, E. N. C. Mills, I. Paradi, F. Lang, L. Tamas, P. R. Shewry, A. R. Mackie, Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem* **2013**, *138*, 2374-2381.

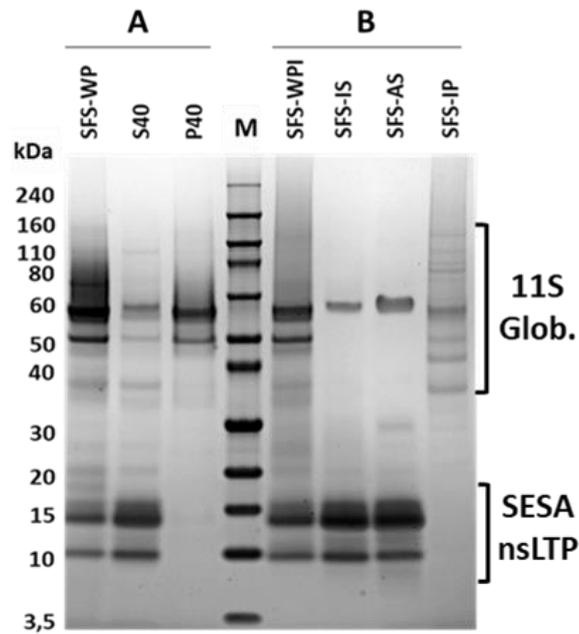


Figure 1. SDS-PAGE analysis of SFS protein extracts. (A) SFS-WP and corresponding fractions obtained after precipitation with 40% ammonium sulfate: supernatant S40 and precipitate P40. (B) SFS isolates. Under non-reducing conditions.

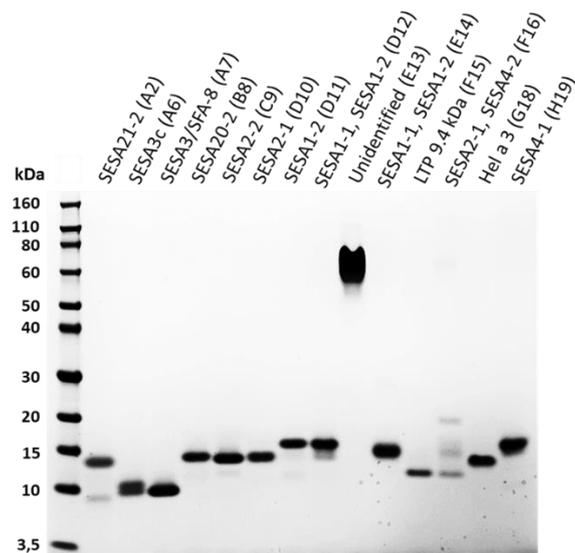


Figure 2. SDS-PAGE analysis of purified SFS fractions obtained after IEC (A-H) and RP-HPLC. Corresponding fraction identification number are indicated (Table S1, Supporting information). Under non-reducing conditions.

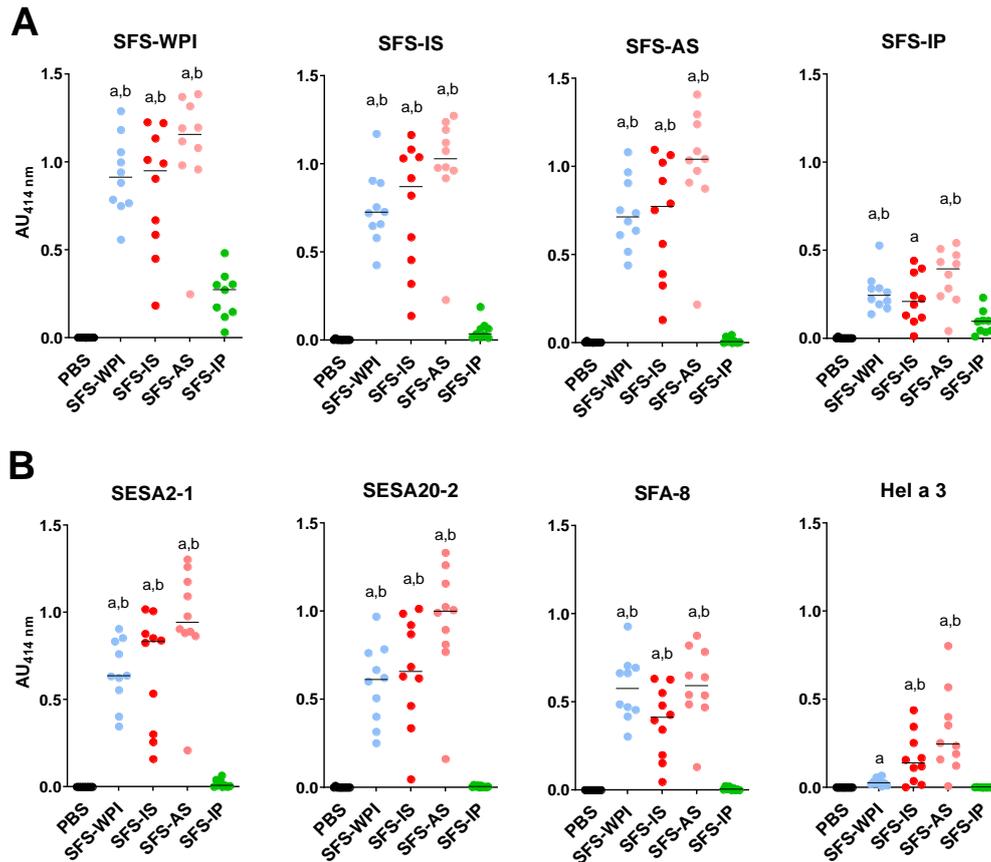


Figure 3. Specific IgG1 responses to SFS isolates (A) and purified proteins (B) in mice orally sensitized to SFS-WPI, SFS-IS, SFS-AS and SFS-IP. Results are reported in absorbance units (AU) at 414 nm. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison post-test. Median is indicated. “a”, significantly different from PBS group; “b”, significantly different from SFS-IP group.

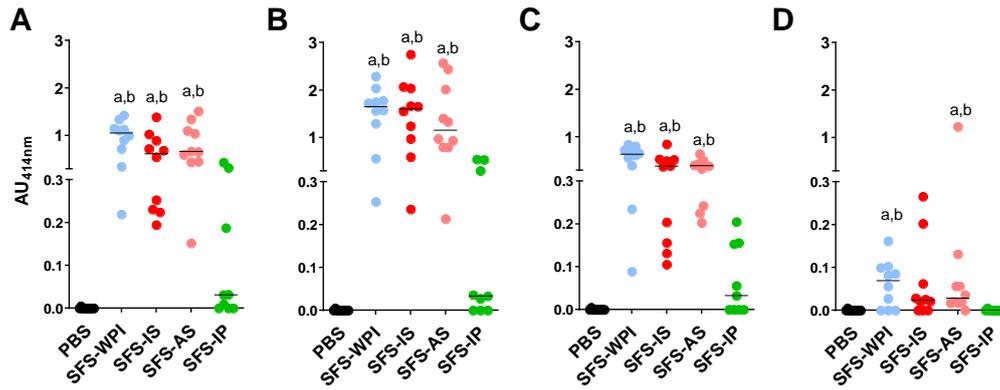


Figure 4. Specific IgE responses to SESA2-1 (A), SESA20-2 (B), SFA-8 (C) and Hel a 3 (D), in mice orally sensitized to SFS-WPI, SFS-IS, SFS-AS and SFS-IP. Results are reported in absorbance units (AU) at 414 nm. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison post-test. Median is indicated. “a”, significantly different from PBS group ; “b”, significantly different from SFS-IP group.

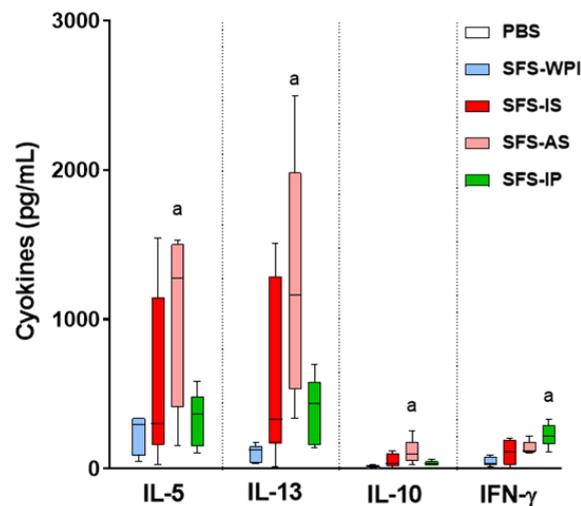


Figure 5. Cytokines secretion by splenocytes reactivated with SFS total protein from mice orally sensitized to SFS-WPI, SFS-IS, SFS-AS and SFS-IP. Results are represented as cytokine secretions (pg/mL) in supernatant of reactivated splenocytes after subtraction of cytokines assayed in supernatants of PBS-reactivated splenocytes, thus corresponding to specific production. No significant secretion of cytokines was detected in PBS group. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey multiple comparison test. “a”, significantly different from SFS-WPI group.

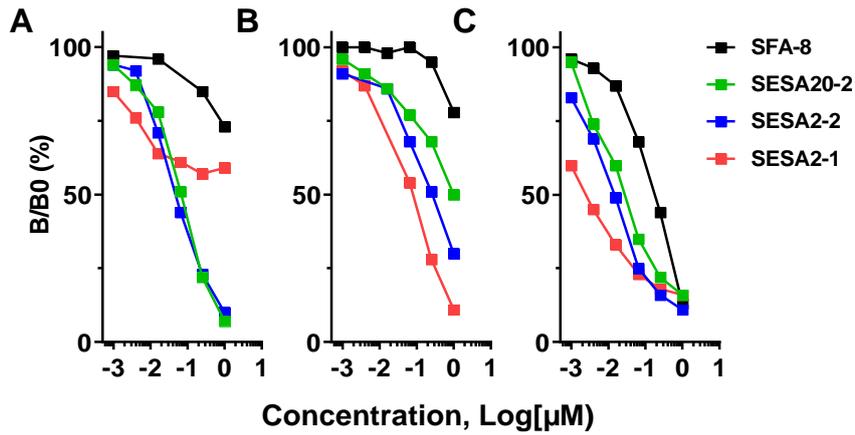


Figure 6. Competitive inhibition of IgE-binding to SESA20-2 (A), SESA2-1 (B) and SFA-8 (C) by SESA2-1, SESA2-2, SESA20-2 and SFA-8. Cross-reactivity between SESA was evaluated with a pool of sera from mice sensitized to SFS 2S-albumins (see Methods).

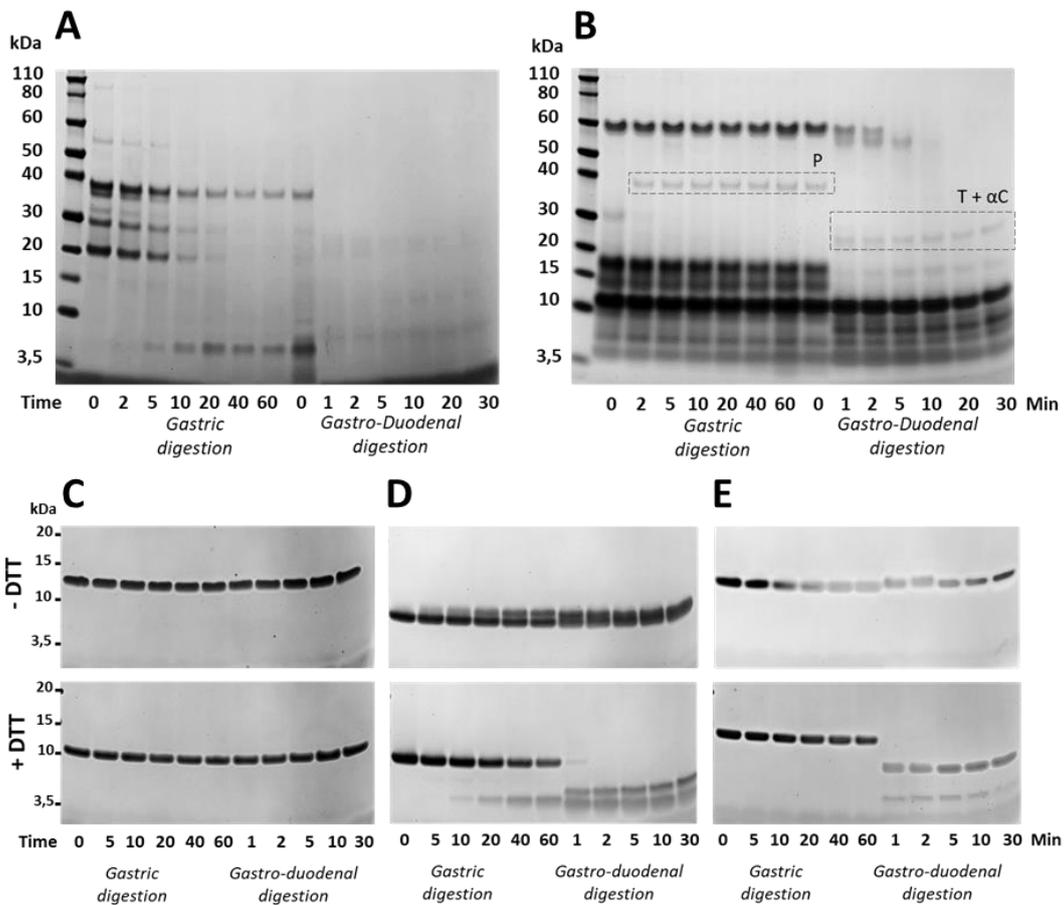


Figure 7. SDS-PAGE analysis of gastroduodenal digestion of SFS proteins. Digestion of SFS-IP (A) or SFS-AS (B) were analyzed under reducing conditions. Digestion of Hel 3 (C), SFA-8 (D) and SESA2-1 (E) were analyzed under non-reducing (- DTT) and reducing (+ DTT) conditions. Time of sample collection is indicated. P, pepsin; T, trypsin; α C, α -chymotrypsin.

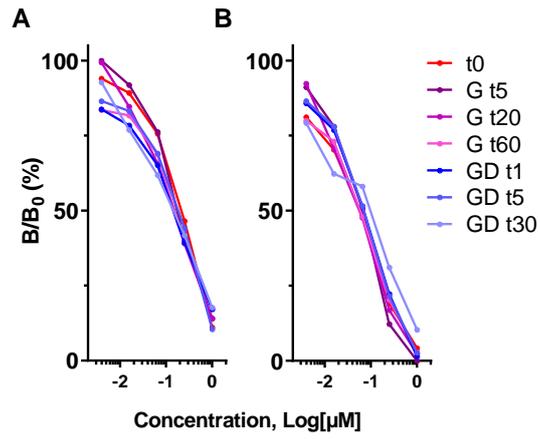


Figure 8. IgE-immunoreactivity of digested SESA2-1 (A) or SFA-8 (B). Competitive inhibition of IgE-binding to SESA2-1 or SFA-8 by corresponding digested protein obtained after 0, 5, 20 and 60 min of gastric digestion (G) and 1, 5 and 30 min of gastroduodenal digestion (GD, see Methods).

Supporting information

Supporting Information Methods

- Protein fractionation and purification

SFS-WP proteins were first fractionated using 40% ammonium sulfate precipitation. After centrifugation (8000 x g, 30 min, 4 °C), the pellet (P40) was resuspended in 50 mM potassium phosphate pH 7.4 buffer. The supernatant (S40) and P40 were dialyzed against 20 mM sodium phosphate pH 7.4 buffer (3.5 kDa cut-off). After addition of 4 M urea pH 7.4, S40 fraction was filtered (Millex® Syringe filters, 0.22 µm, PES, Merck-Millipore) and submitted to a cation exchange chromatography using a Source 30S column (HR16/10, GE Healthcare), equilibrated with Buffer A (20 mM sodium phosphate pH 7.4). Elution was performed with the following gradient : 0-10 min buffer A and a 0-90 min 0-50% of Buffer B (Buffer A + 1 M NaCl) at a flow rate of 4 mL/min. Collected fractions were further submitted to RP-HPLC using a Vydac C4 column and an AKTA purifier system (GE Healthcare). Elution was performed using a linear gradient from 15% to 60% of solvent B (acetonitrile/ trifluoroacid (TFA) 0.04%) in solvent A (H₂O/ TFA 0.1%) at a flow rate of 2 mL/min. Collected fractions were freeze-dried before characterization.

- SFS isolates production

Production of total whole protein isolate from sunflower seed was performed according to procedures of Albe Slabi *et al.* with minor modifications [1]. SFS cold press meal was first mixed with 0.3 mol.L⁻¹ NaCl solution respecting the solid/liquid ratio of 1:9 (w/v). The pH was adjusted to 7.3 (±0.05). The slurry was stirred at 600 rpm during 30 min at RT and centrifuged at 15 000 x g at 20 °C during 30 min. The supernatant was partly clarified on a Whatman filter paper (17-30 µm of pore size, 190 x 0.17 mm) to get liquid extract. Purification step was composed of microfiltration (µF) and ultrafiltration (UF). For µF, Millipore Proscale Unit system coupled with Pellicon XL Durapore (0.22 µm, 0.1 m²) supplied by Millipore (Burlington, MA, USA) was used. The 4L of liquid extract was first concentrated by 4 volumetric reduction factor (VRF) and then diafiltrated for 2 diafiltration volume (DV) using 0.2 mol.L⁻¹ NaCl solution. The resulting permeate was then subjected to UF performed on Akta Flux® 6 system using 3 kDa cut-off 4 800 cm² hollow fiber cartridge, all from GE Healthcare (Chicago, IL, USA). For this purpose, µF permeate was diafiltrated by 0.2 mol.L⁻¹ NaCl solution during 6 DV. The pH of retentate was then adjusted to 9 and the retentate was

additionally desalted by 4 DV of ultra-pure water. Transmembrane pressure and feed flow rate were maintained at 1.5 bars and 1 L.min⁻¹ during all process, respectively. In the end, the retentate was collected and freeze-dried.

Production of SFS-IP and SFS-IS isolates was performed by isoelectric precipitation. Immediately after clarifying the slurry by a 17-30 µm filter pore size (as described above), pH of the liquid extract was adjusted to 3.5 (±0.05). The suspension was stirred for 30 min at RT and centrifuged (15 000 x g, 30 min, 20 C°). The precipitate was washed twice with ultrapure water (15 000 x g, 30 min, 20 C°). The resulting pellet (SFS-IP) was collected and freeze-dried. The supernatant was subjected to UF on Aka Flux® as described above. For this purpose, supernatant was first concentrated by 4 VRF then diafiltrated with 8 DV of ultra-pure water. Transmembrane pressure and feed flow rate were maintained at 2 bars and 1 L.min⁻¹ during all process, respectively. Finally, the retentate (SFS-IS) was collected and freeze-dried.

For the production of SFS-AS, sunflower cold press meal was mixed with ultra-pure water respecting the solid/liquid ratio of 1:9 (w/v). The pH was adjusted to 3.0 (±0.05). The suspension was stirred for 30 min at RT and centrifuged (15 000 x g, 30 min, 20 C°). The supernatant was partly clarified on a Whatman filter paper (17-30 µm of pore size, 190 x 0.17 mm) to get liquid extract. Purification step was composed of microfiltration and ultrafiltration. For microfiltration Millipore Proscale Unit system coupled with Pellicon XL Durapore (0.22 µm, 0.1 m²) supplied by Millipore (Burlington, MA, USA) was used. The liquid extract was first concentrated by 8 VRF. Then, the permeate was subjected to ultrafiltration performed on Akta Flux® 6 system using 3 kDa cut-off 4 800 cm² hollow fiber cartridge, all from GE Healthcare (Chicago, IL, USA). The microfiltration permeate was first concentrated by 4 VRF and then diafiltrated with 8 DV of ultra-pure water. Transmembrane pressure and feed flow rate was maintained at 1 bars and 1 L.min⁻¹, respectively, during all process. In the end, the retentate (SFS-AS) was collected and freeze-dried.

[1] S. Albe Slabi, C. Mathe, M. Basselin, X. Framboisier, M. Ndiaye, O. Galet, R. Kapel, Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal. *Food Chemistry* 2020, 317, 126423.

Supporting Figures and Table

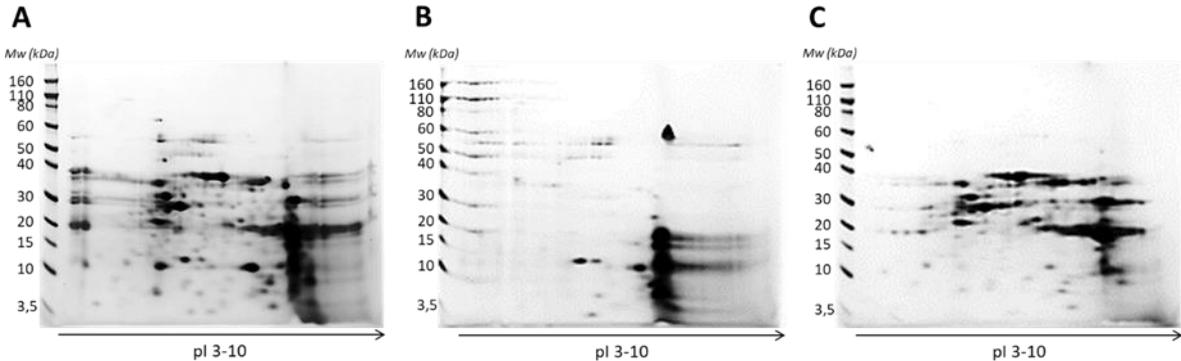


Figure S1. 2D SDS-PAGE analysis of protein extract from SFS-WP (A), S40 (B) and P40 (C).

Table S1. Identification of SFS proteins

Fraction n°	Identified protein (UniProt assessing n°)	Theoretical (kDa)	MW	Measured (kDa)	MW	Sequence coverage (%) ^a
A2	SESA21-2 (Q8RW54)	15.109		9.949		51
A6	SESA3c (P23110) ^b	12.164		12.164		41
A7*	SESA3/SFA-8 (P23110)	12.147		12.148		94
B8*	SESA20-2 (A0A161CT49)	15.065		15.063		69
C9	SESA2-2 (Q8GUD8)	15,289		15.291		83
D10*	SESA2-1 (I, II) (Q8GUD8) ^{b,c}	13.616, 13,717		13.614, 13.715		60
D11	SESA1-2 (P15461)	15.765		15.782		80
D12	SESA1-2 (P15461)	15.765		15.791		70
	SESA1-1 (P15461)	14.315		14.356		28
E13	Unidentified	-		-		-
E14	SESA1-1 (P15461)	14.315		13.865, 13.966		44
	SESA1-2 (P15461)	15.765				46
F15	nsLTP (A0A251SK36)	9,423		9.422		57
F16	SESA2-1 (I, II) (Q8GUD8)	13.616, 13,717		13.617,13.728		52
	SESA4-2 (A0A161CKQ7)	19.200		13.832, 13.932		51
G18*	Hel a 3 (P82007)	9,278		9.277		100
H19	SESA4-1 (Q39928)	13,963		13.954		31

^a, percentage of the protein sequence covered by peptides obtained after trypsinolysis and identified by MALDI-TOF analysis; ^b, according to Franke *et al.*, 2016; ^c, SESA2-1 (I) and (II) were purified as a mix of 2 isoforms that differ by one threonine residue at the C-terminus; *, proteins selected for analysis of humoral and cellular responses induced in mice.

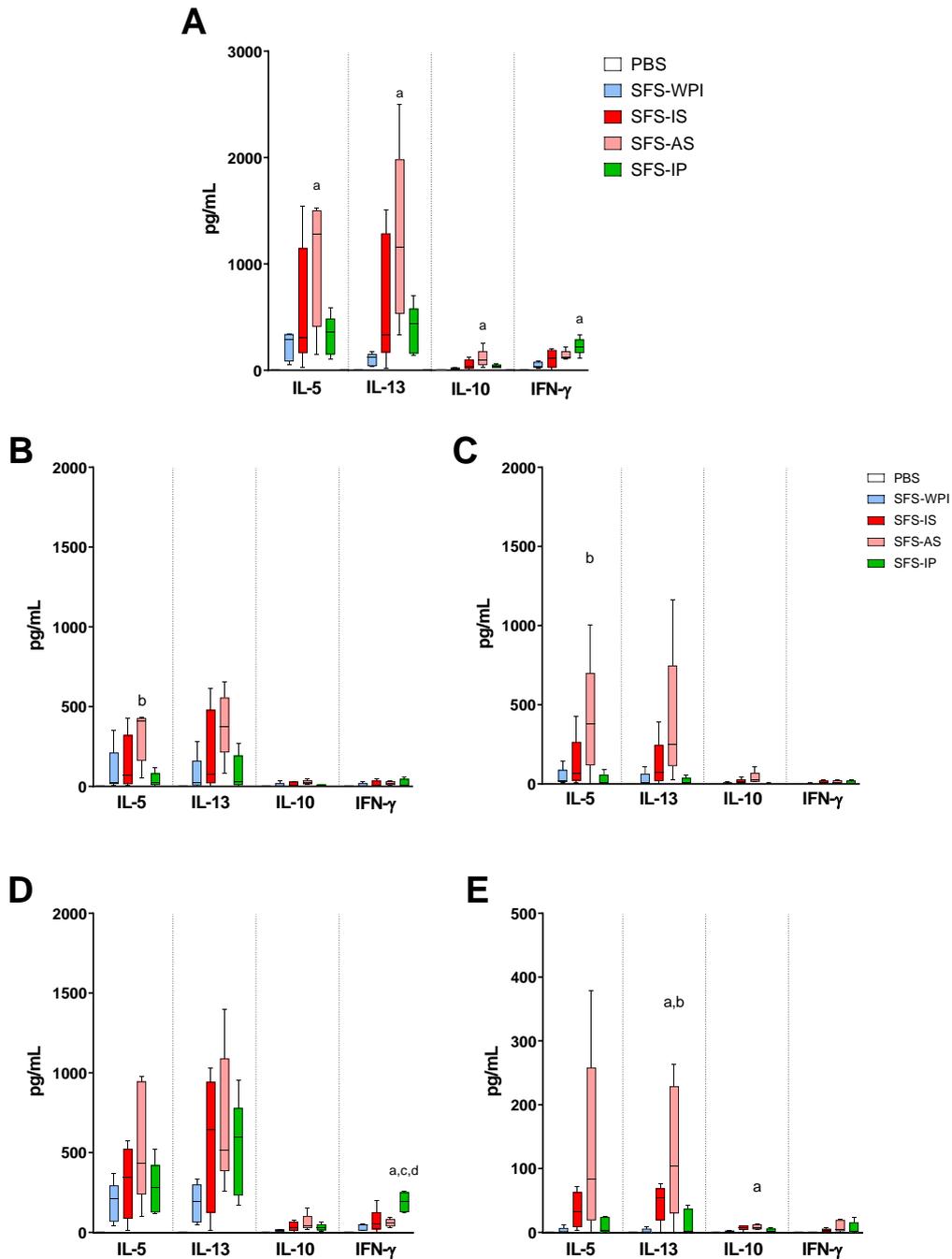


Figure S2. Cytokines secretion by splenocytes reactivated with purified SFS proteins from mice orally sensitized to SFS-WPI, SFS-IS, SFS-AS and SFS-IP. Splenocytes were reactivated by SESA2-1 (A), SESA20-2 (B), SFA-8 (C) or Hel 1 3 (D). Results are represented as cytokine secretions (pg/mL) in supernatant of reactivated splenocytes after subtraction of cytokines assayed in supernatants of PBS-reactivated splenocytes, thus corresponding to specific production. No significant secretion of cytokines was detected in PBS group. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey multiple comparison test. “a”, significantly different from SFS-WPI group; “b”, significantly different from SFS-

IP group; “c”, significantly different from SFS-IS group; “d”, significantly different from SFS-AS group.

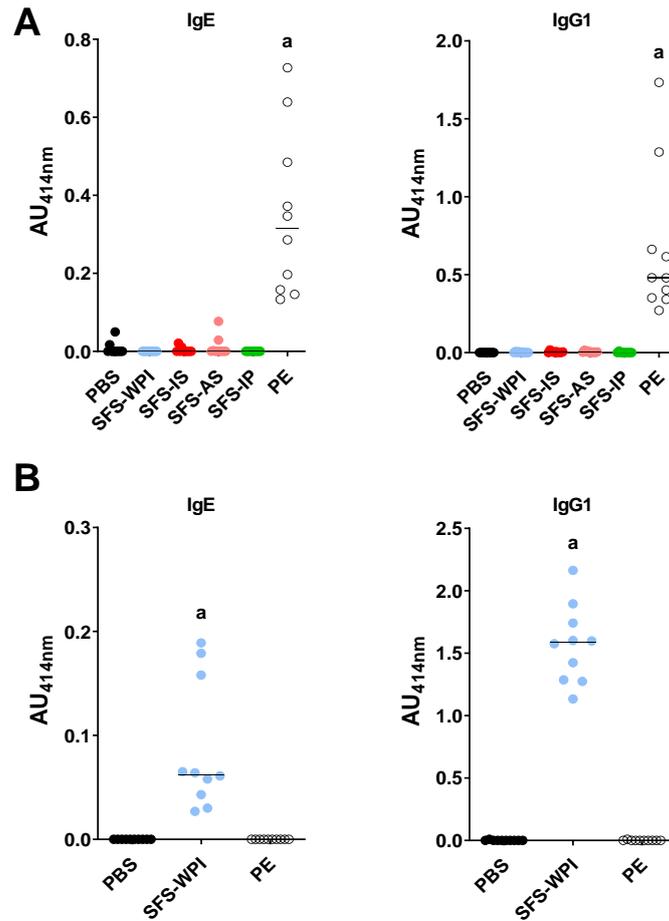


Figure S3. Specific IgG1 and IgE responses to a total peanut protein extract or total SFS protein extract in mice orally sensitized to peanut proteins (A) or to SFS-WPI (B). Sera were diluted in 1:25 and 1:200,000 for IgE and IgG1 measurements, respectively. Results are reported in absorbance units (AU) at 414 nm. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison post-test. Median is indicated. “a” significantly different from all other groups.

RESUME

Evaluation du risque allergénique des protéines de graines de tournesol

Dans le contexte de la gestion durable des ressources alimentaires, des sources protéiques alternatives aux protéines animales sont recherchées. Les protéines de la graine de tournesol (GT) pourraient être ainsi valorisées dans l'alimentation humaine. Bien que les cas d'allergie aux protéines de GT sont rares, il est nécessaire d'évaluer le potentiel allergénique des protéines de GT. Actuellement, la protéine de transfert de lipides non spécifiques (nsLTP) Hel a 3 est la seule officiellement reconnue en tant qu'allergène alimentaire. Au sein des onze albumines 2S identifiées dans la GT, seule SFA-8 a été étudiée mais son potentiel allergénique n'est pas encore clairement établi. Dans le cadre du projet PRODIAL, diverses globulines 11S, albumines 2S et nsLTP ont été isolées en combinant différentes méthodes de précipitation sélective et de chromatographies. Leurs potentiels de sensibilisation ont ensuite été comparés dans un modèle de souris BALB/c sensibilisées, par voie orale, à différents isolats protéiques. Si l'allergénicité de SFA-8 et de Hel a 3 a été confirmée, celle des albumines 2S SESA2-1 et SESA20-2 apparaît supérieure. De plus, du fait de structures similaires, la réponse IgE observée contre SFA-8 est principalement due à la réactivité croisée avec les autres SESA. En parallèle, les protéines purifiées de GT nous ont permis de caractériser les réponses IgE spécifiques dans les sérums de patients allergiques aux protéines de GT (n=19). Les patients allergiques sont ainsi tous sensibilisés à Hel a 3 et/ou à des albumines 2S de GT. Une immunoréactivité croisée est également observée entre les différentes albumines 2S de GT mais aussi entre Hel a 3 et des nsLTP provenant d'autres sources végétales telles que Ara h 9 (arachide) ou Pru p 3 (pêche). Par contre, un tel phénomène n'est pas mis en évidence entre les albumines 2S de GT et d'arachide. Par ailleurs, les études de digestion gastro-intestinale *in vitro* démontrent une résistance à la protéolyse faible pour les globulines 11S et forte pour les albumines 2S et Hel a 3, qui conservent dès lors leur immunoréactivité IgE. Ces données sont corroborées par des études *in vivo* où une immunoréactivité liée à ces allergènes est détectée dans des prélèvements jéjunaux et iléaux réalisés chez des volontaires sains ayant consommé des biscuits enrichis en protéines de GT. Le potentiel allergénique des protéines de GT apparaît donc essentiellement porté par les albumines 2S et les nsLTP.

Mots clés : tournesol, IgE, albumines 2S, nsLTP, réactivité croisée, souris

ABSTRACT

Allergy risk assessment of sunflower seed proteins

Sunflower seed (SFS) protein is a good candidate to diversify protein sources for sustainable human consumption. Although food allergy to SFS is rare, the allergenic risk of SFS ingredients still needs to be assessed. To date, only the non-specific lipid transfer-protein (nsLTP) Hel a 3 was recognized as a food allergen. Out of the eleven seed storage 2S-albumins (SESA) evidenced in SFS, only SFA-8 allergenicity has been investigated but its actual potency still needs to be established. In the frame of the PRODIAL project, the most abundant 11S-globulins, 2S-albumins and nsLTP from SFS were purified through a combination of selective precipitation and chromatographic methods. Their sensitization potencies were then compared in BALB/c mice orally sensitized to SFS isolates. Allergenicity of SFA-8 and Hel a 3 was confirmed but mice were also highly sensitized to other SESA such as SESA2-1 or SESA20-2. Because of structural similarities between SFS 2S-albumins, IgE-reactivity of SFA-8 was mostly due to cross-reactivity with other SESA. In parallel, the panel of purified SFS protein was used to characterize specific IgE responses in sera from SFS-allergic patients (n=19). In this study group, all patients were sensitized to Hel a 3 and/or SESA. High IgE cross-reactivity between SESA was again evidenced. IgE cross-reactivity also occurred between Hel a 3 and other nsLTP such as Ara h 9 (peanut) or Pru p 3 (peach). In contrast, no IgE cross-reactivity was detected between SFS and peanut 2S-albumins. Furthermore, 11S-globulins were rapidly degraded during *in vitro* gastro-duodenal digestion. In contrast, Hel a 3 and SESA were highly resistant to proteolysis and gastro-duodenal digestion did not affect their IgE-reactivity. Accordingly, immunoreactive SFS proteins were detected in jejunal and ileal contents from healthy volunteers who ingested cookies enriched in SFS proteins. The allergenic potential of SFS proteins appeared then to be mainly supported by 2S-albumins and nsLTP.

Keywords: sunflower, IgE, 2S-albumins, nsLTP, cross-reactivity, mice