



HAL
open science

Améliorer l'évaluation de l'allergénicité de nouvelles protéines alimentaires : quels outils pour le futur ?

Sandra Denery-Papini, Colette Larré, Virginie Lollier

► To cite this version:

Sandra Denery-Papini, Colette Larré, Virginie Lollier. Améliorer l'évaluation de l'allergénicité de nouvelles protéines alimentaires : quels outils pour le futur ?. Innovations Agronomiques, 2016, 52, pp.99-109. 10.15454/1.5135847882276418E12 . hal-01652908

HAL Id: hal-01652908

<https://hal.science/hal-01652908>

Submitted on 30 Nov 2017

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Améliorer l'évaluation de l'allergénicité de nouvelles protéines alimentaires : quels outils pour le futur ?

Denery-Papini S.¹, avec la collaboration de Larré C.¹ et Lollier V.¹

¹ UR 1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, INRA, F-44316 Nantes, France

Correspondance : sandra.denery@nantes.inra.fr

Résumé

De nouveaux ingrédients protéiques vont être mis sur le marché et nécessiteront une évaluation du risque d'allergie alimentaire. L'article mentionne les limites des méthodes actuelles pour prédire ce risque et présente des méthodes *in vitro* et des modèles cellulaires en cours de développement choisis sur la base des étapes clés de l'allergie. Une approche pertinente doit prendre en compte à la fois la propriété des protéines à déclencher des réactions allergiques chez les personnes déjà allergiques mais aussi et surtout la capacité à sensibiliser *de novo* des individus. Les allergènes alimentaires possèdent des caractéristiques structurales particulières et une stabilité vis-à-vis de la digestion. Cependant, ces paramètres ne permettent pas de prédire le risque. Le potentiel allergène d'une protéine repose aussi sur sa capacité à franchir l'épithélium intestinal sous une forme immunologiquement active et à activer des cellules de l'immunité innée et spécifique.

Mots-clés : Réseau européen, Allergie alimentaire, Potentiel allergène, Méthodes *in vitro*, Modèles cellulaires

Abstract: Improving allergenicity assessment for new food proteins : which tools for the future ?

New protein ingredients will be placed on the market and will require evaluating the risk of food allergy. The paper mentions the limitations of current methods of allergic risk assessment and presents *in vitro* methods and cell models being developed based on the key steps of allergy. A relevant approach must take into account the property of proteins to trigger allergic reactions in people already allergic but also most particularly, their ability to *de novo* sensitize individuals. Food allergens possess particular structural features and a resistance to digestive enzymes. However, these parameters are not sufficient for risk prediction. The allergen potential of a protein also depends on its capacity to cross the intestinal epithelium in an immunologically active form and to activate cells from innate and adaptive immunity.

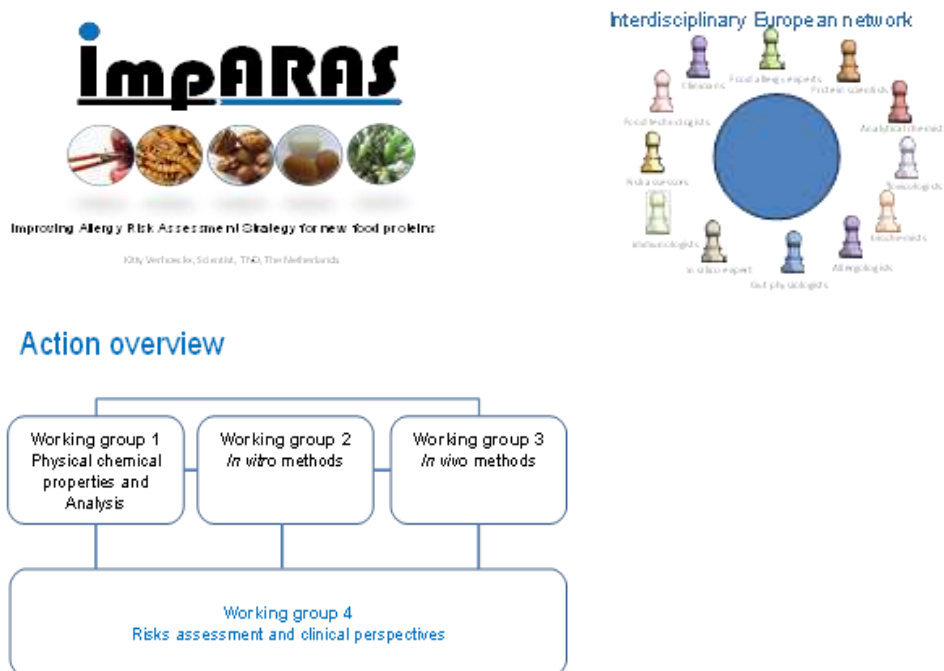
Keywords: European network, Food allergy, Allergen potential, *in vitro* tools, Cell models

Introduction

Dans un contexte d'accroissement de la demande mondiale en protéines pour l'alimentation, de nouvelles sources de protéines (insectes, algues...) ou une meilleure valorisation de fractions protéiques sont envisagées pour l'alimentation humaine. Les protéines végétales, par exemple, moins chères à produire que les protéines d'origine animale, peuvent répondre à la demande alimentaire croissante au niveau mondial dans un contexte d'agriculture durable. Cependant, leur incorporation dans des produits alimentaires peut nécessiter une fonctionnalisation permettant d'améliorer des propriétés de texture, goût, ... De plus, les protéines animales ou végétales sont souvent déjà consommées après transformation intensive et de nouveaux procédés de transformation sont attendus. De même, les pratiques agricoles se modifient et de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions climatiques seront cultivées. Les orientations stratégiques européennes prévoient donc que de

nouvelles sources protéiques, de nouveaux ingrédients et aliments vont être proposés aux consommateurs. Dans le cadre du défi bio-économie européenne durable, combler le fossé entre les nouvelles technologies et leur mise en application, l'évaluation de la sécurité alimentaire est une nécessité avant la mise sur le marché de nouveaux produits, comprenant à côté des risques microbiologiques et toxicologiques, l'évaluation du risque d'allergie alimentaire. L'industrie a donc besoin d'outils accessibles, peu coûteux et fiables pour évaluer le risque allergique de façon précoce au cours du développement d'un produit, de même que de méthodes de décision acceptées par les autorités. Depuis 2014, l'Europe soutient donc un réseau scientifique interdisciplinaire à travers l'action Cost FA1402 ImpARAS 'Améliorer la stratégie d'évaluation du risque allergique pour de nouvelles protéines alimentaires' (Figure 1). Les objectifs de cette action sont : d'utiliser les connaissances sur le potentiel allergène des protéines et les mécanismes de l'allergie pour améliorer les stratégies d'évaluation du risque ; d'acquérir des données sur l'effet des procédés de transformation non seulement au niveau de protéines purifiées mais aussi au niveau de matrices complexes et de prendre en compte leur impact sur l'allergénicité ; de générer des idées pour le développement de méthodes / outils plus prédictifs de l'allergénicité, incluant des modèles *in vitro* et *in vivo* ; de disséminer ces connaissances scientifiques vers les industries agro-alimentaires pour le développement de produits sains et vers les autorités européennes pour améliorer leurs stratégies d'évaluation du risque allergique.

Figure 1 : Organisation de l'action Cost FA1402 ImpARAS



Après avoir mentionné les limites des méthodes déjà existantes pour évaluer / prédire l'allergénicité, l'objectif de cet article est de décrire les connaissances actuelles sur les caractéristiques des allergènes alimentaires et comment elles peuvent être utilisées pour évaluer le potentiel allergène. L'article présente également des méthodes *in vitro* et des modèles cellulaires en cours de développement avec une visée prédictive sur la base de différentes étapes clés du mécanisme de l'allergie alimentaire.

1. Sur quelles bases prédire l'allergénicité ? Les mécanismes de l'allergie alimentaire

Les allergies alimentaires sont des réponses aberrantes de notre système immunitaire dirigées contre des molécules de notre alimentation qui devraient normalement être tolérées. Elles conduisent à des symptômes dans les minutes ou les heures qui suivent l'ingestion. L'allergie est une maladie

multifactorielle, influencée par le patrimoine génétique de l'individu, des facteurs environnementaux, et par la modification des barrières physiques et de l'immunité à ces surfaces. Les allergies alimentaires sont également favorisées par les caractéristiques physico-chimiques de certaines protéines alimentaires. En effet, malgré une exposition à une multitude de protéines alimentaires, les réactions d'allergie sont dirigées contre un nombre restreint de protéines.

La réponse allergique (Johnston et al., 2014) est initiée lors d'une phase de sensibilisation, au cours de laquelle, les allergènes qui sont ingérés et digérés partiellement parviennent à être absorbés au niveau de l'épithélium intestinal sous une forme immunologiquement active. Ils sont alors capables de modifier le microenvironnement cellulaire et sont capturés par des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques (CD). Les cellules dendritiques migrent des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques où l'allergène sera présenté à des lymphocytes T naïfs ; c'est l'étape d'initiation de la réponse immunitaire spécifique. Elle se poursuit par l'activation et à la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices puis à l'activation et à la maturation de lymphocytes B en plasmocytes capables de produire des anticorps de type IgE spécifiques de l'allergène. Ceux-ci seront alors fixés par des récepteurs à la surface des cellules effectrices présentes au niveau de la peau et des muqueuses (mastocytes) ou dans la circulation (basophiles). Lors de la réintroduction de l'allergène, la "phase de déclenchement" conduit à la libération de médiateurs pro-inflammatoires par ces cellules et aux manifestations symptomatiques. La libération des granules (dégranulation) des cellules effectrices est induite par la liaison de l'allergène aux anticorps IgE sur la surface cellulaire; ce phénomène nécessite la liaison simultanée de l'allergène par différents IgE (Figure 2).

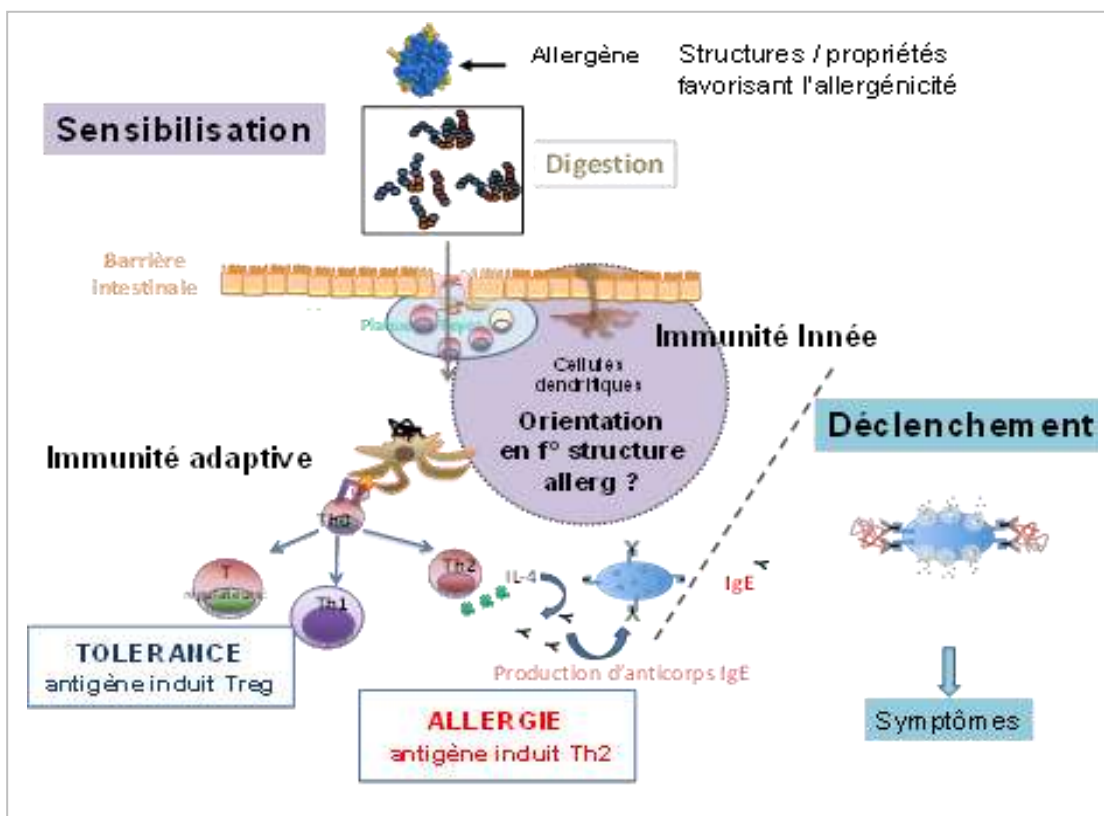


Figure 2 : Les mécanismes de l'allergie alimentaire

Tous les individus qui sont sensibilisés (qui ont produit des IgE) à un allergène donné ne deviendront pas allergiques. La phase symptomatique nécessite des conditions particulières, parmi les facteurs connus, le franchissement de l'épithélium par l'allergène sous une forme active et en quantité suffisante et une quantité suffisante d'IgE spécifiques. De plus, toutes les réactions allergiques ne sont pas

dépendantes des IgE, et les autres mécanismes en cause, à l'exception de ceux impliqués dans la maladie cœliaque, sont très mal connus.

Le potentiel allergène d'une protéine va donc refléter sa capacité à activer ces différentes étapes de la réponse allergique et notamment les deux étapes clés :

- Le passage d'un épithélium sous une forme immunogène, antigénique, immunologiquement active,
- Sa prise en charge par les cellules présentatrices d'allergène.

Les mécanismes de la sensibilisation allergique et ceux à l'origine de l'apparition des symptômes ne sont pas totalement élucidés tant du point de vue physiologique et que sur le plan des allergènes. Aujourd'hui, aucun modèle *in vitro* n'est validé pour prédire la capacité des protéines alimentaires à activer ces différentes étapes de la phase de sensibilisation ou du déclenchement.

2. Les limites des méthodes disponibles actuellement

2.1 Les stratégies recommandées pour l'évaluation des plantes génétiquement modifiées (GM)

Actuellement, à cause du manque de méthodes *in vitro* fiables et accessibles, il n'y a pas d'évaluation systématique et précoce du risque allergique lié à un produit aux cours des étapes de son développement. Récemment, en Europe et au Japon (Denery-Papini et al., 2012 ; Chinuki et Morita, 2012), des allergies inattendues, liées à l'utilisation de protéines végétales modifiées ont été décrites, avec des conséquences en termes de santé mais aussi économiques pour l'industrie agro-alimentaire. Une modification par hydrolyse acide des protéines de blé a en effet créé de nouveaux-épitopes et entraîné la sensibilisation de personnes tolérant le blé. Les produits ont été retirés du marché.

Il n'y a pas non plus actuellement de stratégie d'évaluation du risque allergique harmonisée. Les stratégies recommandées par le Codex (2009) et l'EFSA (2011) pour l'évaluation des plantes génétiquement modifiées (GM) intègrent un ensemble de tests *in silico* et *in vitro* et d'éléments issus de la littérature. Elles sont basées dans un premier temps, sur la connaissance de l'allergénicité de la source du gène cible, l'évaluation de la résistance à la digestion et la recherche d'homologies de séquences avec des allergènes déjà connus ou de motifs structuraux. Dans un deuxième temps, si les résultats convergent vers un potentiel allergénique, l'analyse de réactions croisées potentielles avec d'autres allergènes peut confirmer ce risque. Cette étape nécessite l'accès à des banques de sérums de patients bien caractérisés. Ces méthodes *in silico* et *in vitro* recherchant des homologies ou des réactions croisées avec des allergènes déjà caractérisés sont intéressantes pour évaluer la possibilité de déclencher des symptômes chez des personnes déjà allergiques à une source allergénique proche. Elles ne permettent cependant pas d'évaluer des ingrédients nouveaux et sans proximité structurale avec des allergènes recensés, ni leur capacité à sensibiliser un individu.

En termes de perspectives, des modèles *in vivo*, chez la souris ou le rat, ont également été proposés pour estimer l'allergénicité de protéines alimentaires, ou pour les classer en fonction de paramètres mesurés sur l'animal (Ahrens et al., 2014). Outre l'absence de consensus sur leur valeur prédictive, l'utilisation de modèles animaux est de plus en plus contrainte et limitée pour des raisons éthiques. En 2016, l'EFSA devrait proposer de nouvelles recommandations pour ce qui concerne l'évaluation *in vitro* de l'allergénicité de molécules (test de digestibilité, mesure des allergènes endogènes) et du potentiel de peptides à engendrer la maladie cœliaque.

2.2 Les outils de bio-informatique

Les outils bio-informatiques ont fait l'objet de très nombreux travaux. Ils constituent une première étape pour rechercher d'éventuelles réactions croisées lorsqu'une nouvelle protéine peut être comparée à des

protéines allergènes déjà connues, sur la base des caractéristiques de séquence en acides aminés ou de surface de la protéine (Ladics et al., 2011). Les méthodes basées sur la recherche d'homologies entre des séquences entières de protéines, ou entre des segments de séquences, sont controversées en raison d'un taux de faux positifs très élevé mais aussi de résultats parfois aléatoires (Mirsky et al., 2013). De plus, ces méthodes sont difficilement applicables pour évaluer des changements induits par une étape du procédé de transformation en aliment ou par une fonctionnalisation délibérée qui conduit néanmoins à la modification des protéines de façon très hétérogène. Les méthodes de prédiction à partir de la structure 3D des protéines analysent les propriétés physico-chimiques de la surface moléculaire, telles que l'hydrophilicité, la flexibilité, l'accessibilité, les charges et le type de structure secondaire (boucle, hélice). Elles reposent notamment sur l'hypothèse que les zones de liaison des anticorps sur une protéine sont exposées en surface afin de garantir leur accessibilité. Cependant, elles sont limitées par la possibilité d'obtenir la structure 3D de la protéine à évaluer ou de la modéliser. Il faut également noter que différentes études remettent en cause ces outils de prédiction. En effet, il n'a pas été possible de mettre en évidence des catégories de structures secondaires ou tertiaires typiques des allergènes. Des règles communes pour les principaux sites de liaison allergène-IgE ne peuvent pas être déduites des propriétés structurales d'allergènes connus (Dall'Antonia et al., 2014). Par ailleurs, en analysant de façon systématique et sur une large base de données d'antigènes (allergènes, virus, bactéries...) les caractéristiques des acides aminés appartenant ou non à une zone épitopique (liaison d'un anticorps IgE ou IgG), il n'est pas possible d'établir un lien entre ces zones épitopiques et des propriétés d'accessibilité et de proéminence (Lollier et al., 2011). D'un antigène à l'autre, ou d'un épitope à l'autre sur le même antigène, les caractéristiques des acides aminés des épitopes peuvent être opposées i.e. très accessibles ou enfouis. Autre résultat surprenant, certains allergènes (qui ont fait l'objet de nombreux travaux) sont presque entièrement recouverts d'épitopes au fur et à mesure qu'ils sont étudiés par différentes techniques de laboratoire et sur plusieurs populations (Figure 3) (Lollier et al., 2014). La qualité des bases de données utilisées pour construire des systèmes de prédiction est à mettre en cause. Si l'utilisation de techniques différentes reste intéressante pour des approches de data-mining, on note cependant une grande hétérogénéité dans l'expression des résultats d'identification des épitopes qui alimentent les bases de données. L'absence de standardisation de ces données est donc un frein important à la construction d'un système de prédiction fiable. Cependant, ces approches *in silico* restent particulièrement attractives et toujours en développement. Les travaux récents proposent une intégration et une hiérarchisation de différents outils, par exemple d'analyse de séquence, de caractéristiques biochimiques, physico-chimiques et de fonctionnalité.

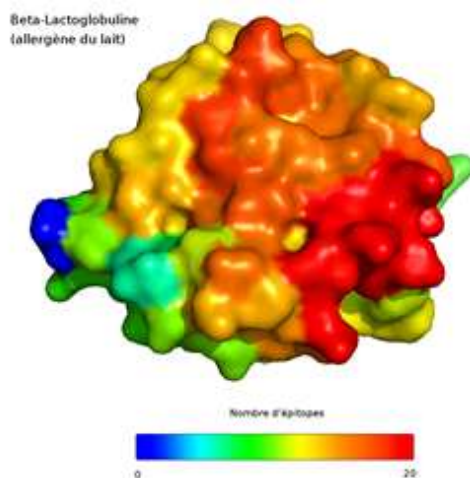


Figure 3 : Exemple d'un allergène du lait : la bêta-lactoglobuline. Si l'on compile les résultats issus de nombreux travaux d'identification des zones de liaison des anticorps IgE (épitopes) sur cet allergène majeur, on observe une couverture presque totale de la protéine – Les pics d'identification qui correspondent à des régions fréquemment impliquées dans l'immunogénicité de la protéine représentent néanmoins des zones d'intérêt dans l'étude de la réaction allergique.

3. Les caractéristiques physico-chimiques des allergènes alimentaires en lien avec l'allergénicité et les méthodes *in vitro* de caractérisation

Une approche pertinente doit prendre en compte à la fois la capacité des protéines à déclencher des réactions allergiques chez les personnes déjà allergiques à la source de protéines mais aussi et surtout la capacité à sensibiliser de novo des individus. Pour développer de nouveaux outils, il est donc indispensable de prendre en compte les événements clés de la phase de sensibilisation de l'allergie alimentaire :

- Les conditions d'exposition à l'allergène, le plus souvent par ingestion, la concentration, l'état de l'allergène i.e. sa structure modifiée ou non par des procédés
- La digestion : la stabilité protéolytique de l'allergène, les conditions physiologiques de la digestion et l'influence d'une matrice alimentaire
- L'absorption de l'allergène et son effet sur la barrière intestinale
- Les événements cellulaires conduisant à l'activation de l'immunité innée et spécifique

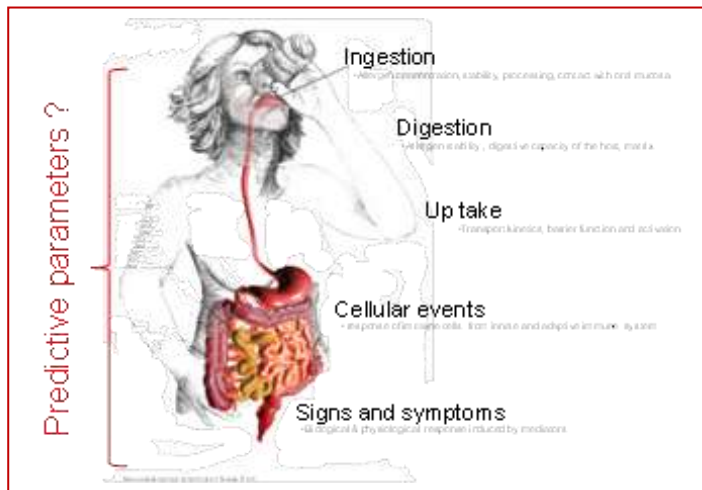


Figure 4 : Evènements clés de l'allergie alimentaire (d'après K. Verhoeckx, Cost FA1402 ImpARAS)

3.1 Caractéristiques structurales et biochimiques

Parmi le grand nombre de protéines animales et végétales, seul un petit nombre est recensé comme allergène et de nombreux allergènes possèdent des caractéristiques structurales ou des fonctions particulières (Radauer et al., 2008). Par exemple, les familles structurales de type 'prolamines' et 'cupines' regroupent de nombreux allergènes des graines de céréales, de légumineuses et oléagineux. Les prolamines sont des protéines qui sont en totalité ou en partie très compactes à cause de liaison intramoléculaires conservées tandis que les protéines de type cupines s'organisent en forme de tonneau. De nombreux allergènes sont donc des protéines relativement petites, bien structurées, voir compactes. Mais on trouve également parmi les allergènes quelques exemples de protéines non structurées telles que les caséines du lait. Avec un nombre croissant de structures 3D d'allergènes identifiées et leur variété, il est devenu assez clair, qu'il n'y avait pas de 'structure caractéristique d'un allergène' mais plutôt un ensemble de structures 3D qui favoriseraient le caractère allergène.

D'autres propriétés des protéines telles que leur aptitude à s'agrèger ou leur capacité à lier certains ligands, ou certains récepteurs de l'immunité innée ou une activité protéasique sont reconnues comme des paramètres en lien avec leur caractère allergène (Scheurer et al., 2015).

Cependant, on ne sait pas encore complètement expliquer pourquoi seul un petit nombre de protéines provoque des réponses immunitaires aberrantes. Aucune des caractéristiques structurales, de taille, de charge, de solubilité ne peuvent être directement liées au potentiel allergène d'une protéine. La connaissance des points critiques des interactions entre les allergènes et les événements physiologiques et immunologiques d'une réaction allergique doit encore être améliorée.

Les objectifs du groupe de travail 1 de l'action COST Imparas sont donc de passer en revue les propriétés physico-chimiques des protéines qui pourraient influencer leur allergénicité et être des paramètres pertinents de prédiction.

Les paramètres à considérer incluent :

- L'obtention ou la vérification des séquences protéiques
- La vérification de la pureté des protéines testées et de la présence de contaminants
- La caractérisation des isoformes
- L'analyse des structures secondaires et tertiaires et de leur stabilité lors du chauffage
- La capacité à purifier l'allergène à partir d'un produit complexe plus ou moins transformé sans dénaturer ses propriétés physico-chimiques
- La capacité à prendre en compte l'influence de contaminants (exemple : LipoPolySaccharides) sur l'activité biologique
- La caractérisation de l'état de polymérisation ou d'agrégation
- La recherche d'activité biologique telle que la liaison de ligands (lipidiques...) ou une activité enzymatique
- La présence de modifications liées aux procédés et à la formulation (agrégation, glycation)

3.2 Nécessité d'avoir un set d'allergènes de référence pour le développement et la validation des modèles

Dans la construction d'une stratégie d'évaluation du risque allergique, il est important de mettre en place un jeu d'allergènes de référence. Ces protéines seront utilisées 1/ comme protéines standards afin d'évaluer et de valider la capacité de méthodes *in vitro* à discriminer des allergènes forts et faibles. 2/ pour une évaluation comparative de nouvelles protéines sans équivalents connus déjà consommés.

Cet ensemble de protéines de référence devra être établi sur différentes bases :

- Connaissances à la fois sur l'aliment/source d'allergènes et la protéine isolée
- Données sur la prévalence des allergies à ces aliments et éventuellement aux protéines allergènes ; et sur la sévérité des réponses
- En incluant des sources d'allergènes responsables des allergies alimentaires fréquentes et sévères (arachide, soja) et plus rares et moins sévères (pois)
- Connaissances du potentiel allergène des protéines sur la base d'observations chez l'homme et/ou dans des modèles souris de sensibilisation et/ou *in vitro*
- Possibilité d'établir un classement en allergènes forts ou faibles, avec des variations intermédiaires pour affiner l'évaluation du risque

3.3 Résistance à la digestion

Certaines caractéristiques de séquence, de structures secondaires et tertiaires et/ou des propriétés agrégatives limitent la dégradation de certaines protéines par les enzymes digestives et favorisent donc la conservation d'une quantité suffisante d'allergène sous une forme immunologiquement active (protéine entière, polypeptides, peptides > 3 KDa) pour sensibiliser le système immunitaire.

Ces formes peuvent entrer dans la circulation dès la muqueuse buccale (en très faible quantité) ou juste après la libération gastrique. C'est pourquoi, la résistance à la digestion pepsique a longtemps été un des critères pour la prédiction de l'allergénicité d'une protéine alimentaire.

Il est maintenant admis que ce paramètre n'est pas suffisamment informatif (Untersmayr and Jensen-Jarolim, 2010). D'une part, parce que d'autres caractéristiques vont jouer sur d'autres étapes clés de la phase de sensibilisation ; et d'autre part, parce que les protocoles appliqués ne prenaient pas suffisamment en compte les conditions physiologiques de la digestion, ni les facteurs (l'âge, la prise de médicaments...) susceptibles de modifier les conditions optimales pour les enzymes digestives et l'hydrolyse des protéines. Une relation claire a été démontrée par exemple entre la prise de médicaments anti-acide et une réduction de la digestion gastrique, et l'augmentation de la production d'anticorps IgE.

Modèles préconisés pour l'évaluation de la stabilité protéolytique

Cependant, il paraît encore essentiel d'identifier les protéines ou polypeptides résistants et qui sont susceptibles de jouer un rôle dans la sensibilisation ou le déclenchement de symptômes et de rechercher des corrélations entre le potentiel allergène et la stabilité dans d'autres modèles de digestion. L'EFSA (2010, 2011) a ainsi recommandé de se rapprocher des conditions physiologiques, de faire varier le ratio protéine/pepsine et le pH et d'ajouter une phase duodénale. Des travaux sont en cours au sein d'un groupe de travail collaboratif (ILSI HESI PATC) sur la digestibilité et visent à évaluer sur 5 paires de protéines comprenant un allergène reconnu / une protéine homologue rarement impliquée dans des réactions d'allergie, si de telles conditions permettraient de mieux distinguer des allergènes forts par rapport à des protéines non / ou faiblement allergène. Les premiers résultats sont encourageants sur la possibilité de trouver des conditions de digestion gastriques discriminantes, même si certains échantillons font exception. La nécessité d'inclure une phase de digestion duodénale reste à préciser. Le groupe confirme que le seul résultat de digestibilité ne permettra pas de prédire le potentiel allergène ou d'évaluer un niveau de risque mais doit être inclus dans une évaluation d'un faisceau de preuves.

Les travaux de l'action COST Infogest ont également abouti à un protocole harmonisé (Minekus et al., 2014) de digestion complète par les enzymes de la voie orale, gastrique, duodénales et des membranes des bordures en brosse de l'intestin. Ce protocole a été appliqué à des études comparatives des peptides résistants issus de différents allergènes au sein d'échantillons complexes ou de matrices alimentaires, notamment à base de blé (Mamone et al., 2015). En prenant en compte ces différentes étapes, notamment l'action des enzymes des bordures en brosse, il est possible de voir des différences de composition en peptides résiduels à partir d'échantillons proches (par exemple, 2 géotypes de blé).

Les produits alimentaires subissent très généralement un traitement ayant un impact sur les propriétés physico-chimiques de leurs constituants, les plus fréquents étant des traitements thermiques. Il n'y a pas de règles générales concernant l'impact d'un procédé sur la résistance à la digestion des protéines alimentaires ; certains phénomènes (polymérisation/agrégation) peuvent l'augmenter et d'autres (dénaturation) la réduire. Il y a donc un fort intérêt à appliquer les protocoles de digestion à la fois au niveau protéique et au niveau d'un produit complexe. De plus, la préparation des aliments est aussi un élément à considérer dans le suivi des allergènes ; par exemple, un allergène peut être particulièrement résistant à la digestion mais être éliminé dans l'eau de cuisson.

4. Les propriétés biologiques/fonctionnelles des allergènes et les modèles cellulaires de prédiction du potentiel sensibilisant

Les étapes considérées dans cette partie sont l'absorption / la mise en contact de l'allergène avec le système immunitaire conduisant à l'activation de l'immunité innée puis de l'immunité spécifique. Ces étapes font l'objet d'une revue par le groupe de travail 2 (méthodes *in vitro*) du COST ImpARAS.

4.1 Absorption / Interaction des allergènes avec l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal consiste en une monocouche de cellules recouverte de mucus ; les entérocytes représentent les cellules les plus répandues associées entre elles par des jonctions serrées ; les cellules M contenues dans les plaques de Peyer sont un autre type important de cellules épithéliales qui se localisent au niveau de follicules/organes lymphoïdes de la muqueuse intestinale (Figure 2). L'absorption intestinale des molécules peut se faire par différentes voies. En temps normal, la diffusion paracellulaire ne concerne que les petites molécules (MW <600 Da). Cependant, lorsque l'intégrité de l'épithélium est affectée, elle peut permettre la diffusion de molécules de PM plus élevé. Les protéines alimentaires et les peptides résistant à la digestion sont donc normalement absorbés par la voie trans-cellulaire via les entérocytes ou les cellules M. Les connaissances actuelles indiquent que la voie de pénétration d'une protéine alimentaire pourrait influencer sa capacité à sensibiliser un individu, que cette voie (entérocytes ou cellules M) dépendrait de la conformation et de la taille de la protéine (présence sous forme d'agrégats), et que les voies les plus efficaces pour la phase de sensibilisation et pour celle de déclenchement de l'allergie pourraient différer. Sur la base d'un petit nombre d'études (Bodinier et al., 2007 ; Tordesillas et al., 2013), il semble que certains allergènes possèdent une plus grande aptitude à traverser des modèles d'épithélium intestinal sous une forme antigénique en comparaison de protéines homologues appartenant à la même famille mais pas ou peu allergéniques. De plus, certains allergènes sont capables d'exercer un effet sur l'épithélium et sa capacité de barrière (Scheurer et al., 2015). Un certain nombre d'allergènes respiratoires sont des protéases capables d'augmenter la perméabilité ou d'induire une inflammation par l'activation de récepteurs spécifiques présents au niveau des barrières épithéliales. Récemment une activité similaire a été démontrée pour un allergène alimentaire. D'autres allergènes sont capables d'interagir avec des récepteurs de l'immunité innée présents sur les cellules épithéliales, propriétés qui peuvent être médiées par la présence de résidus glucidiques ou la liaison de lipides.

La capacité d'une protéine à conserver son immunogénicité et son antigénicité après son transport intestinal et à activer des cellules épithéliales semble donc un paramètre important pour la prédiction du potentiel allergène. L'évaluation du transport des protéines à travers l'épithélium intestinal peut se réaliser *ex vivo* en utilisant des fragments d'intestins animaux ou à l'aide de différents modèles cellulaires. Des lignées de cellules épithéliales intestinales sont utilisées, même si une seule lignée cellulaire ne peut pas à elle seule mimer la complexité de l'épithélium intestinal. La lignée cellulaire Caco-2 représente un "étalon-or" pour l'étude de la perméabilité et du transport intestinaux. En effet, ces cellules reproduisent les principales caractéristiques des cellules intestinales d'absorption une fois pleinement différenciées. Ce modèle peut être amélioré par des systèmes de co-culture avec d'autres types cellulaires afin d'inclure des cellules reproduisant le phénotype de cellules M et/ ou capables de sécréter du mucus. Ces nouveaux modèles *in vitro* de co-culture sont en développement actuellement. Différentes méthodes sont ensuite nécessaires à l'analyse du passage des allergènes sur le plan qualitatif et quantitatif (méthodes de détection et dosages immunochimiques et biochimiques des protéines et peptides). Ces mêmes modèles cellulaires peuvent également être utilisés pour évaluer l'impact des protéines alimentaires sur l'intégrité de la barrière intestinale et sur son état inflammatoire. Dans ce cas, des changements histologiques et fonctionnels pourront être mis en évidence par microscopie et par la recherche de biomarqueurs pertinents (cytokines, molécules pro-inflammatoires...).

4.2 Evaluation de la capacité à stimuler l'immunité innée et spécifique

Les travaux les plus aboutis sur la capacité de certaines molécules à stimuler l'immunité innée (par le biais des cellules épithéliales et des cellules dendritiques) et l'immunité spécifique ont été réalisés dans le cadre de l'évaluation de sensibilisants chimiques ou protéiques cutanés ou respiratoires. Le projet européen Sens-it-iv (Ladics et al., 2014) a notamment proposé une boîte à outils de modèles cellulaires (lignées cellulaires ou cellules prélevées sur des animaux ou des donneurs de sang) dont l'utilisation est en cours de validation pour des stratégies d'évaluation du risque allergique.

La capture de l'allergène par les cellules dendritiques (CD), la migration des CD vers des ganglions lymphatiques afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T sont les événements initiateurs d'une réponse spécifique de cet allergène susceptible d'aboutir in fine à la production d'anticorps spécifiques de cet allergène. De plus, certains allergènes respiratoires et alimentaires sont capables d'activer les CD en se liant à des récepteurs spécialisés dont sont équipées ces cellules pour reconnaître des pathogènes. Le projet Sens-it-iv propose donc 3 niveaux de tests afin d'évaluer la capacité de molécules à induire ces différents événements : 1/ l'activation des cellules dendritiques 2/ la migration des CD dans un test à 2 compartiments et 3/ l'activation des lymphocytes T.

Conclusion

Le développement et la validation de tests *in vitro* aptes à classer les protéines selon leur potentiel allergène fort ou faible ou à évaluer les propriétés allergènes d'une protéine fonctionnalisée par rapport à la protéine native est un véritable enjeu pour l'industrie agro-alimentaire. De tels outils doivent permettre l'évaluation des risques allergiques dès la phase initiale de conception des ingrédients ou aliments en mettant en œuvre de modèles *in vitro* fiables et accessibles.

Accompagnant le développement de ces nouveaux outils, un certain nombre de questions sont à prendre en considération : quelle combinaison d'outils sera la plus pertinente ? Sera-t-il possible d'harmoniser les protocoles de ces méthodes *in vitro* entre différents laboratoires et avec quels jeu d'allergène les valider ? En fonction de l'ingrédient, il peut être important de considérer une autre voie de sensibilisation pour une protéine alimentaire que la voie orale (voie cutanée, voie respiratoire). Doit-on évaluer des protéines purifiées et/ ou transformées et / ou au sein d'une matrice et/ou d'un régime particulier ? Quels biais peuvent induire les méthodes d'extraction et de purification ? La présence de contaminants pouvant avoir un pouvoir adjuvant dans l'environnement de l'allergène est-elle gênante ou au contraire désirable car reflétant la situation réelle lors de la sensibilisation ?

Face à ces questions et aux limites qui seront inhérentes aux outils développés, c'est en réunissant un faisceau de preuves que l'on pourra obtenir la meilleure évaluation du risque allergénique.

Références bibliographiques

- Ahrens B., Quarcoo D., Buhner S., Reese G., Vieths S., Hamelmann E., 2014. Development of an animal model to evaluate the allergenicity of food allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 164, 89–96.
- Bodinier M., Legoux M.A., Pineau F., Triballeau S., Segain J.P., Brossard C., Denery-Papini S., 2007. Intestinal translocation capabilities of wheat allergens using the Caco-2 cell line. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4576–4583.
- Chinuki Y., Morita E., 2012. Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Protein in Soap. *Allergol. Int.* 61, 529–537.
- Dall'Antonia F., Pavkov-keller T., Zangger K., Keller W., 2014. Structure of allergens and structure based epitope predictions 66, 3–21.
- Denery-Papini S., Bodinier M., Larré C., Brossard C., Pineau F., Triballeau S., Pietri M., Battais F., Mothes T., Paty E., Moneret-Vautrin D.-A., 2012. Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to

wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy* 67, 1023–1032.

Johnston L.K., Chien K.B., Bryce P.J., Johnston L.K., 2014. The Immunology of Food Allergy 2529–2534.

Ladics G.S., Cressman R.F., Herouet-Guicheney C., Herman R.A., Privalle L., Song P., Ward J.M., McClain S., 2011. Bioinformatics and the allergy assessment of agricultural biotechnology products: Industry practices and recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 46–53.

Ladics G.S., Fry J., Goodman R., Herouet-Guicheney C., Hoffmann-Sommergruber K., Madsen C.B., Penninks A., Pomés A., Roggen E.L., Smit J., Wal J.-M., 2014. Allergic sensitization: screening methods. *Clin. Transl. Allergy* 4, 13.

Lollier V., Denery-Papini S., Brossard C., Tessier D., 2014. Meta-analysis of IgE-binding allergen epitopes. *Clin. Immunol.* 153, 31–39.

Lollier V., Denery-Papini S., Larré C., Tessier D., 2011. A generic approach to evaluate how B-cell epitopes are surface-exposed on protein structures. *Mol Immunol* 48, 577–585.

Mamone G., Nitride C., Picariello G., Addeo F., Ferranti P., Mackie A., 2015. Tracking the fate of pasta (T. Durum Semolina) immunogenic proteins by in vitro simulated digestion. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2660–2667.

Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carrière F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Recio I., Santos C.N., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Brodkorb A., 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113.

Mirsky H.P., Cressman R.F., Ladics G.S., 2013. Comparative assessment of multiple criteria for the in silico prediction of cross-reactivity of proteins to known allergens. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 67, 232–239.

Radauer C., Bublin M., Wagner S., Mari A., Breiteneder H., 2008. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121.

Scheurer S., Toda M., Vieths S., 2015. What makes an allergen? *Clin. Exp. Allergy* 45, 1150–1161.

Tordesillas L., Gómez-Casado C., Garrido-Arandia M., Murua-García A., Palacín A., Varela J., Konieczna P., Cuesta-Herranz J., Akdis C.A., O'Mahony L., Díaz-Perales A., 2013. Transport of Pru p 3 across gastrointestinal epithelium - an essential step towards the induction of food allergy? *Clin. Exp. Allergy* 43, 1374–1383.

Untersmayr E., Jensen-Jarolim E., 2010. Europe PMC Funders Group The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1301–1310.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL ou son DOI)