

> Les principaux allergènes protéiques

- Structure des allergènes et allergenicité (quelques cas d'étude sur le blé)

Hamza Mameri, UMR IATE- INRAE Montpellier
hamza.mameri@inrae.fr

en bref...



Montpellier



- 80 permanent staff members
(INRA, CIRAD, Montpellier University and SupAgro)
- ~ 80 PhD positions + PostDocs + master
- Numerous master students
- Visiting senior scientists on regular basis
- 8 research teams (~8 permanent members)
- 2 technical platforms



Soft Matter Engineering (I2M)

Seed storage proteins digestibility (and allergenicity)

➤ **Collaboration with Allergy Team INRAE Nantes (Dr Sandra Denery)**

PLAN

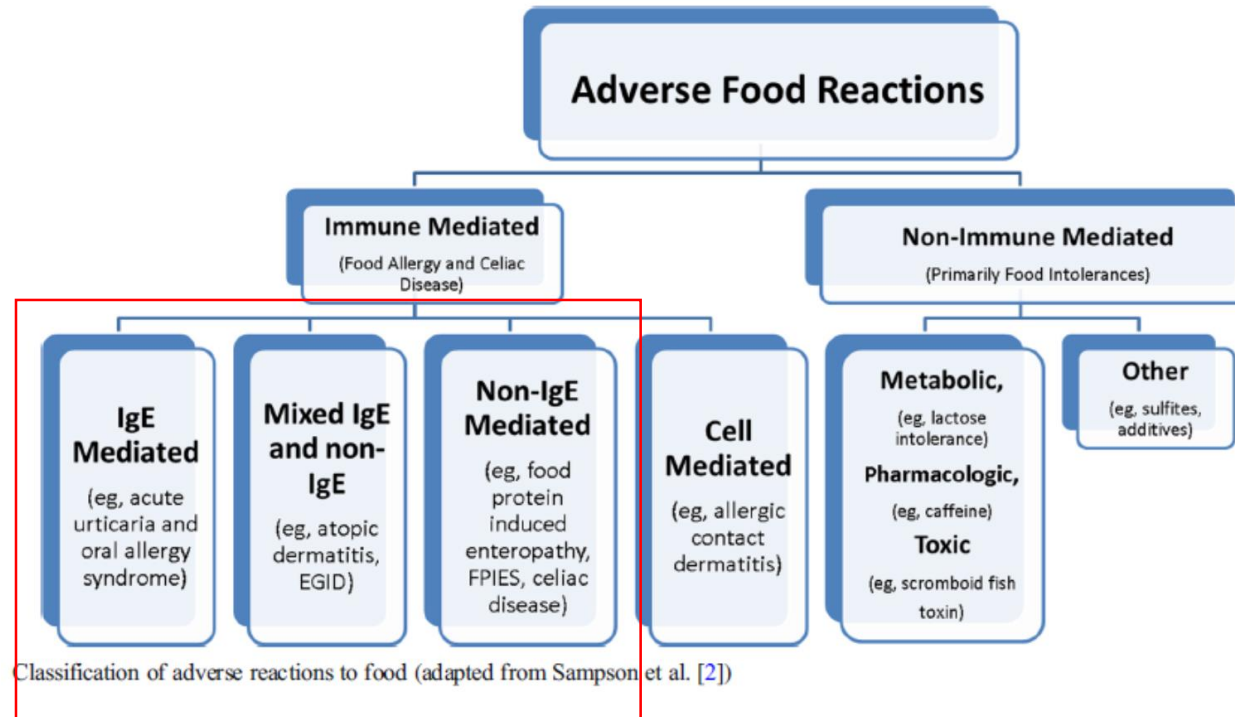
Généralités & présentation	Définitions	<u>Pneumallergènes / Trophallergènes</u> <u>Les allergie croisées</u> <u>De la source allergénique à l'allergène</u>
	Nomenclature	
	Familles d'allergènes	<u>Principales familles d'allergènes</u> <u>Structures des principales familles d'allergènes</u>
Etudes des Allergènes	Identification des épitopes	<u>Cas 1 : épitopes linéaires</u> <u>Cas 2 : épitopes conformationnels</u>
	Identification d'un allergène	Cas 3 : Gluten modifié
3 exemples		

Définitions

- **Allergène:**

- Molécule (antigène) de nature protéique (pas seulement) appartenant à l'environnement responsable d'une réaction allergique (réponse du système immunitaire).

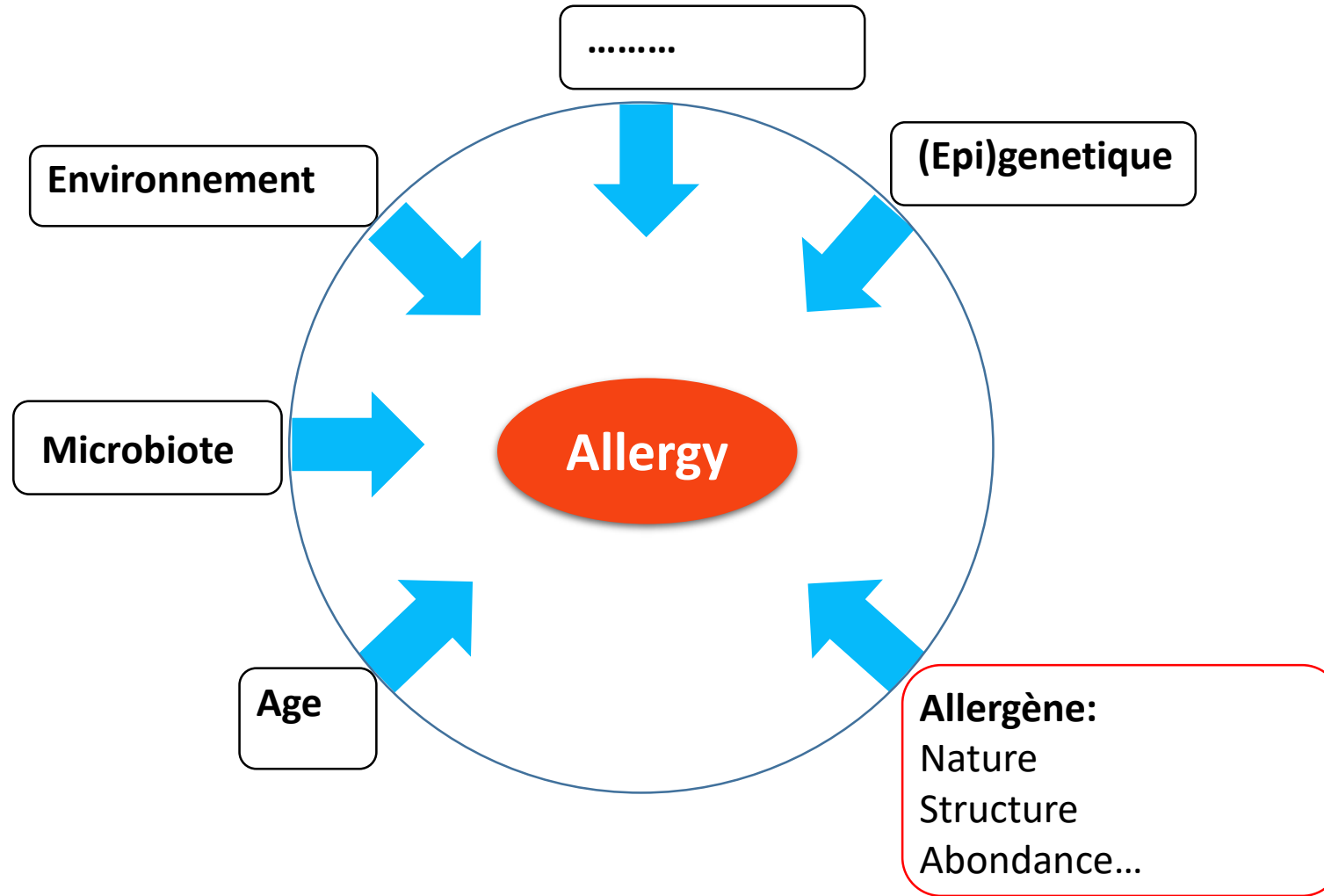
- **Allergies :**



syndrome d'entérocolite induite par les protéines alimentaires (SEIPA ou FPIES en anglais)

(Anvari., 2019 Clin Rev Allerg Immunol (2019) 57:244–260)

L'allergie est une maladie multifactorielle

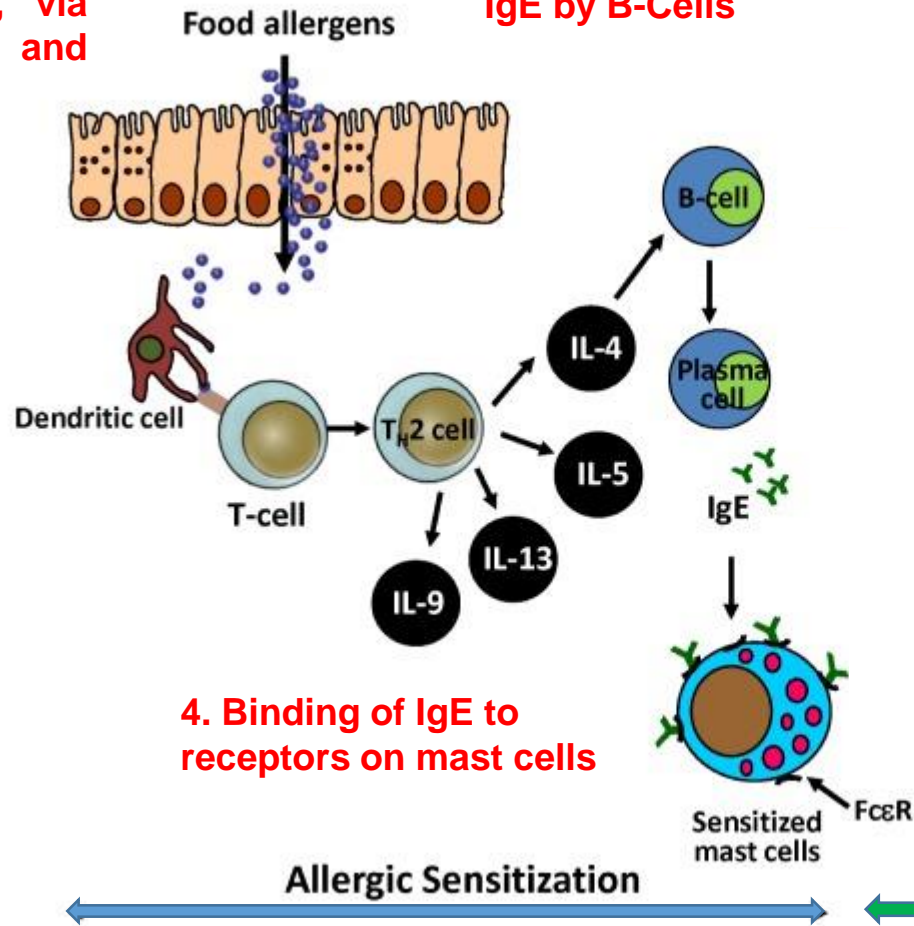


Évolution dans le temps, pathogenèse et manifestations des allergies alimentaires

1. Allergen contact via gastrointestinal tract, via the respiratory tract, and eventually via the skin

3. Production of IgE by B-Cells

2. Recognition of the allergen by T cells



4. Binding of IgE to receptors on mast cells



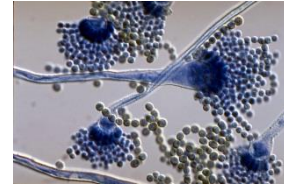
Jee-Boong Lee, 2016 Immune Netw,
Valenta R et al., Gastroenterology 2015

Allergy >> bi-phasic mechanism

Les allergènes

■ Les allergènes protéiques

- Pneumallergènes: acariens, poils d'animaux, pollens, moisissures...



- Trophallergènes: aliments (animaux et végétaux)



■ Les médicaments

■ Les haptènes

- Produits chimiques (sulfites)
- Métaux (nickel)

Les pneumallergènes (1)

(positivité 30% des adultes)

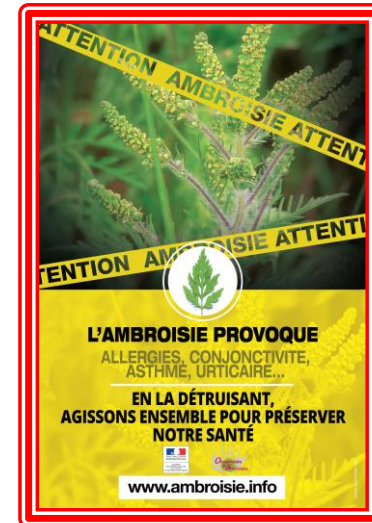
■ Voies respiratoires

■ Pollens (positivité 15% des adultes)

- Graminées (blé, riz, orge, sorgho...)
- Ambroisie
- Armoise



- Arbres (bouleau, noisetier, aulne, chêne, frêne, cyprès ...) (méditerranée +++)



Compagnes de lutte contre l'ambrosie

Les pneumallergènes (2)

- Acariens



- Animaux (poils, déjections)



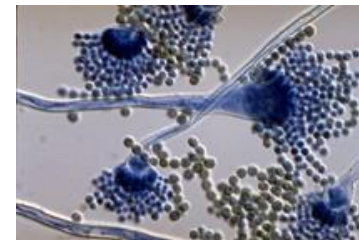
➔ maladies professionnelles

- Blattes



- Moisissures

- *Alternaria, Cladosporium* ...



Les trophallergènes

(Allergènes alimentaires)

3-5 % de la pop

■ Origine animale

- Lait
- Œuf
- Poisson
- Crustacés
- Coquillages
- Viandes

Origine végétale

- Fruits à coque (arachide, noix...)
- Fruits (pomme, fruits noyaux, kiwi...)
- Légumes (céleri, carotte...)
- **Céréales** (farine de blé, orge...)
- Soja
- Epices

Autres allergènes protéiques

- **Venins** (abeille, guêpe, frelon, ...)
- **Latex** (sève)
 - Allergie contact → anaphylaxie chirurgicale
 - Allergie respiratoire (professionnelle)
 - Allergie alimentaire (allergie croisée fruits et légumes)

Règlementation INCO de 2011 (Déclaration obligatoire des allergènes)

Allergènes	Exclusions
Céréales contenant du gluten (blé, seigle, orge, avoine, épeautre, kamut ou leurs souches hybridées) et produits à base de ces céréales.	<ul style="list-style-type: none"> •Sirops de glucose à base de blé, y compris le dextrose. •Maltodextrines à base de blé. •Sirops de glucose à base d'orge. •Céréales utilisées pour la fabrication de distillats ou d'alcool éthylique d'origine agricole pour les boissons spiritueuses et d'autres boissons alcooliques.
Crustacés et produits à base de crustacés	
Oeufs et produits à base d'oeufs	
Poissons et produits à base de poissons	Gélatine de poisson utilisée comme support pour les préparations de vitamines ou de caroténoïdes ou ichtyocolle utilisée comme agent de clarification dans la bière et le vin.
Arachides et produits à base d'arachide	
Soja et produits à base de soja	<ul style="list-style-type: none"> •Huile et la graisse de soja entièrement raffinées. •Tocophérols mixtes naturels. •Phytostérols et esters de phytostérol dérivés d'huiles végétales de soja. •Ester de stanol végétal produit à partir de stérols dérivés d'huiles végétales de soja.
Lait et produits à base de lait (y compris de lactose)	<ul style="list-style-type: none"> •Lactosérum utilisé pour la fabrication de distillats alcooliques, y compris d'alcool éthylique d'origine agricole. •Lactitol
Fruits à coques (amandes, noisettes, noix, noix de : cajou, pécan, macadamia, du Brésil, du Queensland, pistaches) et produits à base de ces fruits.	Fruits à coques utilisés pour la fabrication de distillats alcooliques, y compris d'alcool éthylique d'origine agricole.
Céleri et produits à base de céleri	
Moutarde et produits à base de moutarde	
Graines de sésame et produits à base de graines de sésame	
Anhydride sulfureux et sulfites en concentration de plus de 10mg/kg ou 10 mg/l (exprimés en SO ₂).	
Lupin et produits à base de lupin	
Mollusques et produits à base de mollusques	

Source: <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fiches-pratiques/Allergene-alimentaire>

Les trophallergènes

(Allergènes alimentaires)

3-5 % de la pop

■ Origine animale

- Lait
- Œuf
- Poisson
- Crustacés
- Coquillages
- Viandes



Origine végétale

- Fruits à coque (arachide, noix...)
- Fruits (pomme, fruits noyaux, kiwi...)
- Légumes (céleri, carotte...)
- Céréales (farine de blé, orge...)
- Soja
- Epices

- Allergies croisées (alimentaire/alimentaire – respiratoire/alimentaire)

Les allergies croisées entre aliments

Aliments responsables d'une allergie	Allergies croisées possibles
Légumineuse (ex : cacahuète)	Autres légumineuses (ex: pois, pois chiche, fèves, haricots, lentilles, soja, lupin)
Fruits à coque (ex : noix)	Autres fruits à coques (ex: noisette, amande, noix, pistache, noix de cajou, noix de macadamia, noix du Brésil)
Lait de vache	Viande de boeuf, lait de chèvre, lait de jument, lait d'ânesse
Poisson (ex : sole)	Autres poissons (ex : morue, truite, saumon)
Crustacés (ex: crevette)	Autres crustacés (ex: homard, langouste)
Céréales (ex : blé)	Autres céréales (ex : orge, seigle)
Ail	Oignon, ciboulette, poireau, asperge
Tomate	Poivron, piment de Cayenne, paprika, aubergine, pomme de terre
Orange	Citron, pamplemousse, mandarine
Moutarde	Choux, radis, navet, rutabaga, colza, raifort
Pêche	Autres rosacées (ex: prune, poire, pomme, cerise)
Melon	Autres fruits (ex : pastèque, banane, avocat)
Oeuf	Volaille
(source : Allergies Alimentaires : Conseils pratiques Asthme & Allergies, Le quotidien du Médecin : Fiche pratique, les réactions allergiques croisées)	

<https://www.allergobox.com/les-allergies-alimentaires/les-allergies-croisees>

Les allergies croisées entre aliments et allergènes respiratoires

Pollens	Allergies croisées possibles
Ambroisie	Banane, pastèque, concombre, melon
Armoise	Céleri, carotte, fenouil, moutarde, poivre, anis, piment
Aulne	Amande, céleri, cerise, noisette, pêche, persil, pomme, poire
Noisetier	Noix, noisette
Bouleau	Abricot, pomme, pêche, cerise, poire, noisette, prune
Graminée	Tomate, pomme de terre
Composée (ex : tournesol)	Miel, gelée royale
Acariens	Escargots, crevettes, crabe, langouste, calamar
Plumes d'oiseaux	oeuf

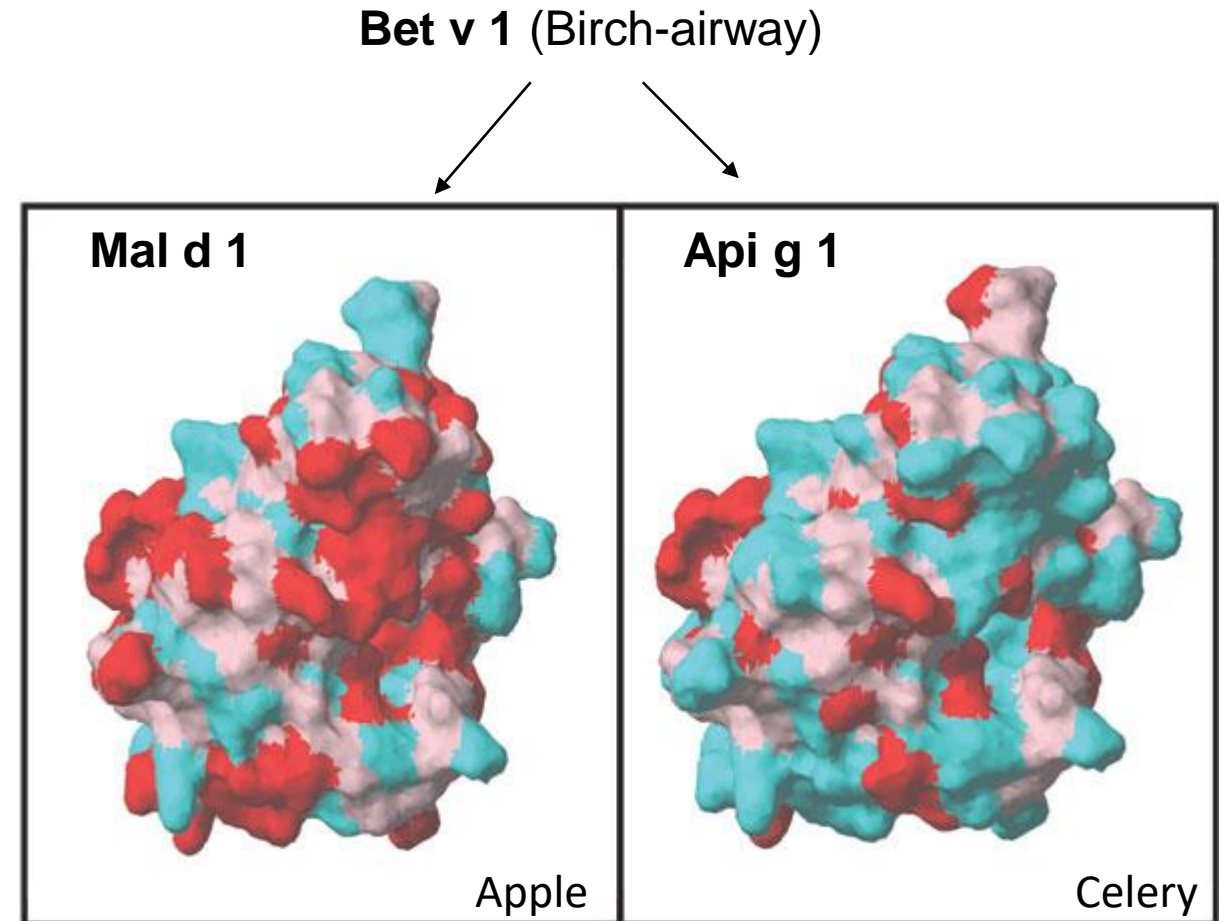
Allergie	Allergies croisées possibles
Latex	Avocat, banane, kiwi, châtaigne, sarrasin, papaye, épinards, concombre, figue, pêche, melon, cerise, raisin, tomate
(source : Allergies Alimentaires : Conseils pratiques Asthme & Allergies, Le quotidien du Médecin : Fiche pratique, les réactions allergiques croisées)	

<https://www.allergobox.com/les-allergies-alimentaires/les-allergies-croisees>

Allergies croisées

Allergic reaction triggered by a food that does not contain the sensitizing allergen

>>>>Sequence homology or structure



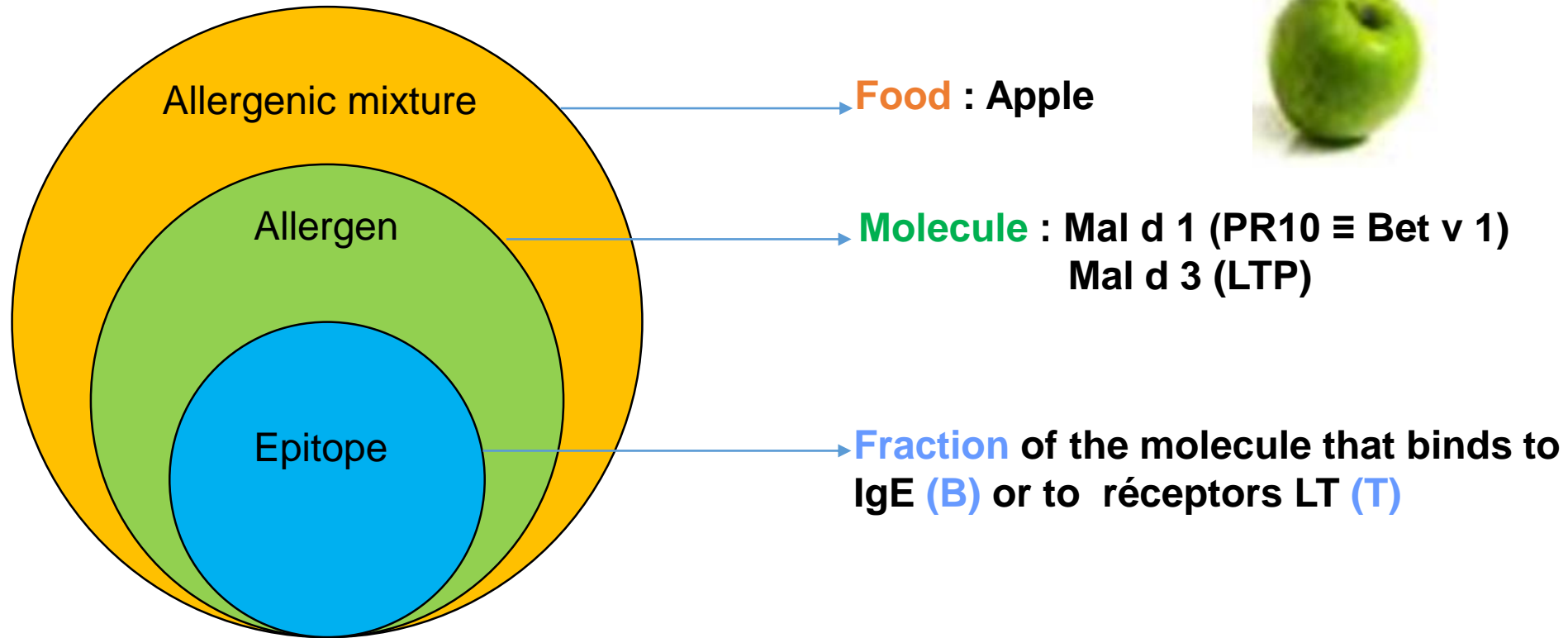
Breiteneder *et al.* (2005) *JACI* 115, 14

Commun structural elements ==> **cross-reactions**

Les épitopes

- **Epitopes** = déterminant ou site antigénique spécifique
- **Partie d'un antigène** capable d'induire une réponse immunitaire et d'interagir avec un anticorps produit lors de cette réponse (5-8 acides aminés)

De l'aliment à l'épitope

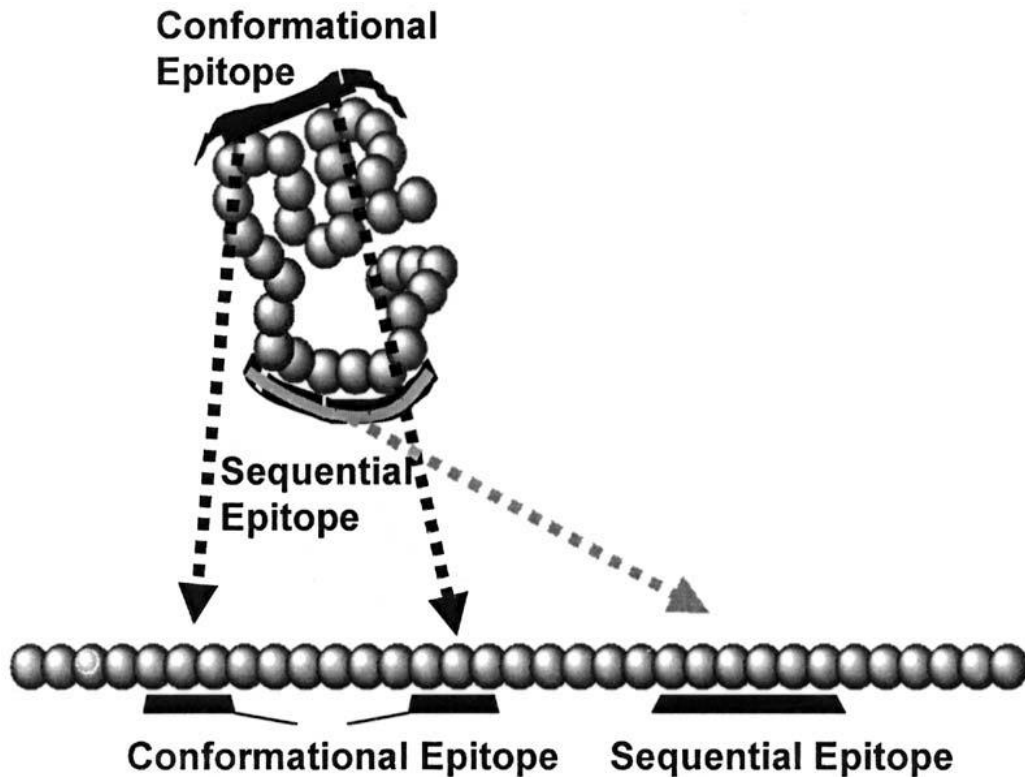


1 Food contains generally several allergens

1 allergen contains generally several epitopes

- Major allergen : positive reaction in 50 % allergic patients
- Minor allergen : < 10 % patients

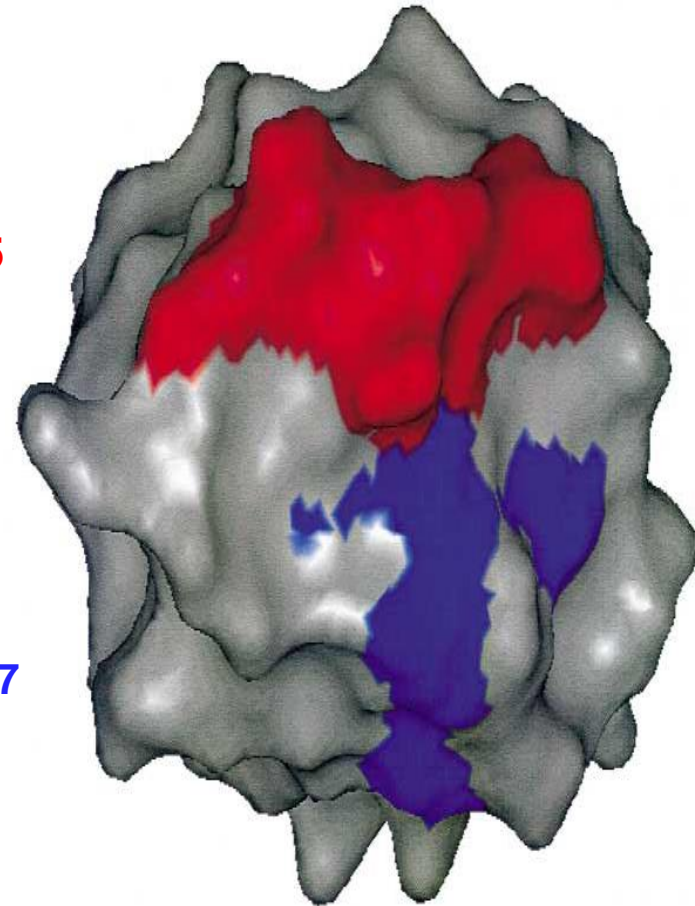
Types d'épitopes: (linéaires & conformationnels)



LYSOZYME

116-121,
124 - 125

18-19,
22-24, 27



*Fischmann et al. (1991) JBC 266, 12915
cité par Aalberse (2000) JACI 106, 228*

Mast cells degranulation needs at least 2 epitopes within the same molecule

Utilisation des épitopes

- Etude des réactions croisées : Actuellement prédiction basées sur homologues de séquence – *pas assez de données sur les épitopes*
- Comprendre les mécanismes moléculaires des allergies
- Immunothérapie : vaccins peptidiques
- Diagnostic - pronostic : Relation diversité des épitopes / sévérité, persistance
- Evaluation du risque : détection d'allergènes, suivi de leurs modifications

Nomenclature des allergènes

▪ Nomenclature officielle des allergènes




World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS)

<http://www.allergen.org>

<http://www.allergome.org>

▪ Classement en fonction de l'organisme d'origine (nom scientifique latin):

- 3^{es} lettres du genre
- 1^{ère} lettre de l'espèce
- Numéro d'identification

Ex: β -lactoglobuline bovine (*Bos domesticus*)  Bos d 5
Utéroglobine du chat (*Felis domesticus*)  Fel d 1
Cupine d'arachide (*Arachis hypogaea*)  Ara h 3

Les bases de données d'allergènes

Tableau 1

Bases de données en allergologie moléculaire.

Nom	Lien	Langue	Inscription nécessaire	Mise à jour en 2021–2022	Référencement croisé IUIS/WHO	Académique	Industriel	Commentaires
AllerData	https://www.allerdata.com	Français, anglais	Oui pour certaines fonctionnalités	Oui	Non	Oui : sfa	Oui : stallergenes greer, thermo fisher	Outil d'analyse et de prédiction des réactions croisées
IUIS/WHO Allergen Nomenclature	http://www.allergen.org/	Anglais	Non	Oui	Oui	Oui : eaaci, aaai, iuis	Non	Nomenclature officielle des allergènes moléculaires
Allergome	http://www.allergome.org/	Anglais, français, autres	Oui pour certaines fonctionnalités	Oui	Oui	Pas de détails sur le site)	Oui : allergy data laboratories srl	Vaste référence bibliographique, beaucoup d'allergènes non validés
AllerBase	http://bioinfo.unipune.ac.in/AllerBase/Home.html	anglais	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Très exhaustif
AllFam	http://www.meduniwien.ac.at/allfam/	Anglais	Non	Non	Oui	Oui	Non	Classification en famille de protéines
AllergenOnline	http://www.allergenonline.org/	Anglais	Non	Oui	Oui	Oui	Pas de détails	Recherche de séquences allergéniques
COMPARE	http://www.comparedatabase.org	Anglais	Non	Oui	Non	Oui	Non	Revue à comitè d'experts
Immune Epitope database	http://www.iedb.org	Anglais	Non	Oui		Oui	Non	Spécifique dédiée aux épitopes des allergènes
Structure database of Allergenic protein	https://fermi.utmb.edu/	Anglais	Non	Non	Oui	Oui	Non	Spécifique dédiée à la structure des allergènes

Les bases de données d'allergènes



Allergens total: 1042
Allergens with AllFam family assigned: 959
AllFam families: 151
Pfam domains in allergens: 216 (1.3% of all domains)

AllFam Statistics

2017-03-07

Allergen.org
WHO/IUIS Allergen Nomenclature:

2017-03-06

831 allergens
1220 sequences of isoallergens and variants

AllergenOnline: Univ Nebraska

Gestion: Food Allergy Research and Resource Program ([FARRP](#))









v22 (2023-05-25)
952 allergen groups
2290 sequences
Sequence based analysis

151 allergen families found.
959 of 1042 allergens from all sources with all routes of exposure classified into them.

ID	Protein family name	Number of allergens
1	AF050 Prolamin superfamily	91
2	AF007 EF hand family	74
3	AF054 Tropomyosin	64
4	AF051 Profilin	53
5	AF045 Cupin	37
6	AF044 CAP family	32
7	AF069 Bet v 1 family	29
8	AF015 Lipocalin	25
9	AF093 Expansin and expansin-like	24
10	AF021 Subtilisin-like serine protease	23
11	AF060 Thaumatin-like protein	17
12	AF024 Trypsin-like serine protease	17

Les grandes familles d'allergènes animaux


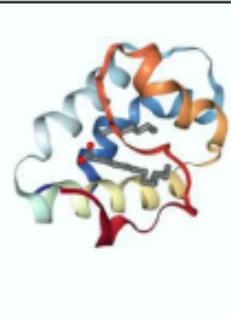

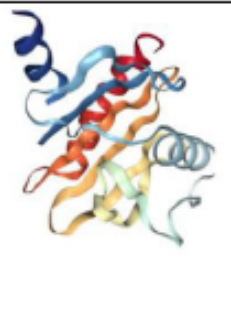
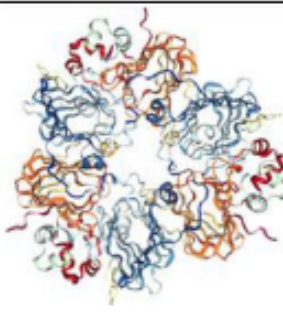
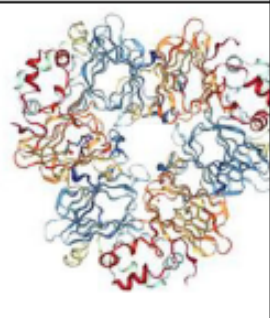
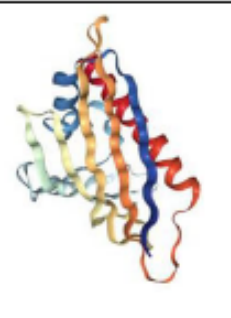
445 allergènes: 410 appartenant à 71 familles, 70% € à 4 familles

	Tropomyosins	Parvalbumins	Arginine kinases	Caseins	Serum albumins	Glycoside hydrolase family 22	Transferrins	Lipocalins	Ovomucoids	Serpins
Size (aa)	~284	~109	355-357	190-224	607-608	129 (Gal d 4) 123 (Bos d 4)	686-690	172	210	386
MW (kDa)	34-38	11-12	40-45	20-30	60-69	~14	78-80	17-25	22.5	44
Biological function	Structural	Structural	Enzymatic/ Regulatory	Regulatory	Transport	Defence (Gal d 4) Structural (Bos d 4)	Transport	Transport	Regulatory	Regulatory Reserve
Protein structure	4D Homo- /heterodimer (coiled-coil)	3D Globular monomer	3D Monomer	Typically 2D Casein micelles (4D)	3D Globular monomer	3D Monomer	3D Monomer	4D Globular homodimer	4D (3 globular native configurations)	4D Homodimer
Crystal structures (Method: X-ray diffraction)	There are structures experimentally determined at PDB (e.g. chicken tropomyosin), but none is classified as an allergen.			 Partial structure					There are structures experimentally determined at PDB (e.g. turkey ovomucoid), but none is classified as an allergen.	
Example of an allergen (source)	Shrimp Pen m 1	Cod Gad m 1	Shrimp Lit v 2	Cow's Bos d 10	Cow's Bos d 6	Chicken Gal d 4	Chicken Gal d 3	Cow's Bos d 5	Chicken Gal d 1	Chicken Gal d 2
PDB accession number	NR	2MBX	4AM1	6FS4	3V03	2LYM	1N04	2Q2M	NR	1OVA

Costa 2020

Les grandes familles d'allergènes végétaux

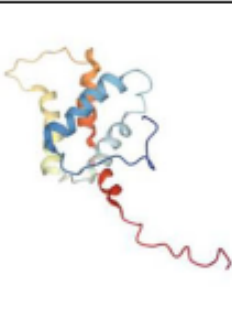
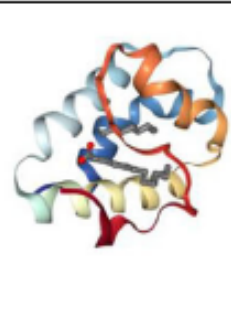
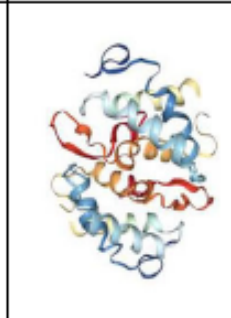

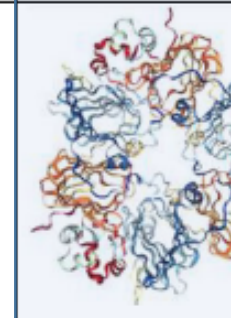
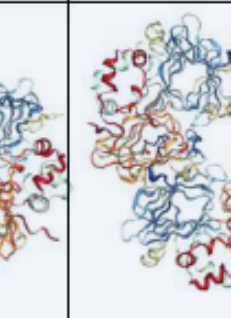
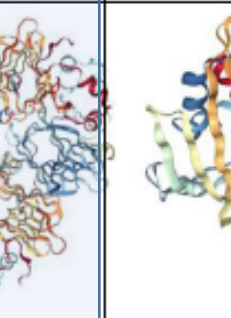
467 allergènes: dont 436 appartenant à 65 familles, 44% € à 8 familles

	2S Albumins	nsLTP	ATI	Cereal prolamins	Profilins	Legumins	Vicilins	PR-10 proteins
Size (aa)	130-160	100-120	120-160 (subunit)	430-480 (gliadin) ~380 (LMW) ~850 (HMW)	~130	480-560	500-600	150-160
MW (kDa)	10-18	9.5-10.5	12-16 (subunit)	30-50 (gliadin) 40 (LMW) 85-90 (HMW)	12-15	360 ~60 (subunit)	150-190 40-80 (subunit)	15-17
Biological function (Abundance)	Seed storage proteins (20-60% depending on species)	Transport proteins. (highly expressed in pollens, leaves, fruit peels) (4% of total proteins)	Regulatory proteins. (4% of total proteins)	Seed storage proteins. (10-20% glutenins, 40-50% gliadins)	Structural proteins. (highly abundant in all cells, especially in pollen)	Seed storage proteins. (50-70% depending on species)	Seed storage proteins. (~20% depending on species)	Regulatory proteins. (highly expressed in case of biotic stress)
Protein structure	Tertiary Heterodimer	Tertiary Monomer	Tertiary/quaternary Homodimer	Tertiary Monomer (gliadin) Polymer (glutenin)	Tertiary Monomer	Quaternary Hexamer	Quaternary Trimer or homotrimer	Tertiary/quaternary Monomer
Crystal structures (Method: X-ray diffraction)				No crystal structures available for gliadins or glutenins				
Example of allergen (source)	Peanut Ara h 6	Peach Pru p 3	Wheat Tri a 28	Wheat	Birch pollen Bet v 2	Soybean Gly m 6	Peanut Ara h 1	Celery Api g 1
PDB accession number	1W2Q	2B5S	1HSS	NR	1CQA	2D5H	3SMH	2BK0

Super famille des **prolamines** (91 allergènes identifiés)

Les grandes familles d'allergènes végétaux

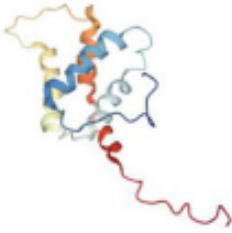
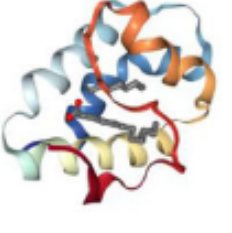
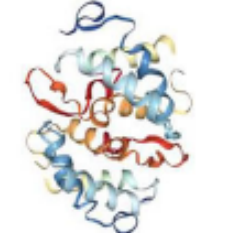
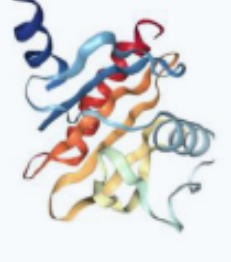
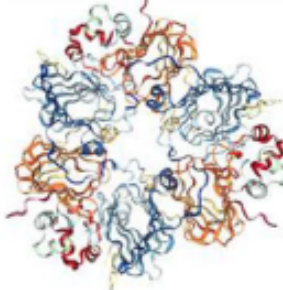
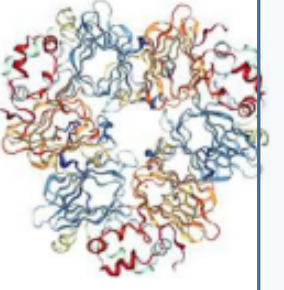
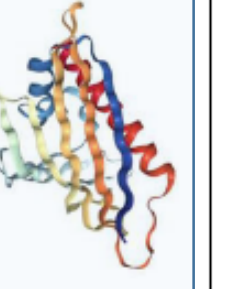
467 allergènes: dont 436 appartenant à 65 familles, 44% € à 8 familles

	2S Albumins	nsLTP	ATI	Cereal prolamins	Profilins	Legumins	Vicilins	PR-10 proteins
Size (aa)	130-160	100-120	120-160 (subunit)	430-480 (gliadin) ~380 (LMW) ~850 (HMW)	~130	480-560	500-600	150-160
MW (kDa)	10-18	9.5-10.5	12-16 (subunit)	30-50 (gliadin) 40 (LMW) 85-90 (HMW)	12-15	360 ~60 (subunit)	150-190 40-80 (subunit)	15-17
Biological function (Abundance)	Seed storage proteins (20-60% depending on species)	Transport proteins. (highly expressed in pollens, leaves, fruit peels) (4% of total proteins)	Regulatory proteins. (4% of total proteins)	Seed storage proteins. (10-20% glutenins, 40-50% gliadins)	Structural proteins. (highly abundant in all cells, especially in pollen)	Seed storage proteins. (50-70% depending on species)	Seed storage proteins. (~20% depending on species)	Regulatory proteins. (highly expressed in case of biotic stress)
Protein structure	Tertiary Heterodimer	Tertiary Monomer	Tertiary/quaternary Homodimer	Tertiary Monomer (gliadin) Polymer (glutenin)	Tertiary Monomer	Quaternary Hexamer	Quaternary Trimer or homotrimer	Tertiary/quaternary Monomer
Crystal structures (Method: X-ray diffraction)				No crystal structures available for gliadins or glutenins				
Example of allergen (source)	Peanut Ara h 6	Peach Pru p 3	Wheat Tri a 28	Wheat	Birch pollen Bet v 2	Soybean Gly m 6	Peanut Ara h 1	Celery Api g 1
PDB accession number	1W2Q	2B5S	1HSS	NR	1CQA	2D5H	3SMH	2BK0

Super famille des **cupines** (37 allergènes)

Les grandes familles d'allergènes végétaux

467 allergènes: dont 436 appartenant à 65 familles, 44% € à 8 familles

	2S Albumins	nsLTP	ATI	Cereal prolamins	Profilins	Legumins	Vicilins	PR-10 proteins
Size (aa)	130-160	100-120	120-160 (subunit)	430-480 (gliadin) ~380 (LMW) ~850 (HMW)	~130	480-560	500-600	150-160
MW (kDa)	10-18	9.5-10.5	12-16 (subunit)	30-50 (gliadin) 40 (LMW) 85-90 (HMW)	12-15	360 ~60 (subunit)	150-190 40-80 (subunit)	15-17
Biological function (Abundance)	Seed storage proteins (20-60% depending on species)	Transport proteins. (highly expressed in pollens, leaves, fruit peels) (4% of total proteins)	Regulatory proteins. (4% of total proteins)	Seed storage proteins. (10-20% glutenins, 40-50% gliadins)	Structural proteins. (highly abundant in all cells, especially in pollen)	Seed storage proteins. (50-70% depending on species)	Seed storage proteins. (~20% depending on species)	Regulatory proteins. (highly expressed in case of biotic stress)
Protein structure	Tertiary Heterodimer	Tertiary Monomer	Tertiary/quaternary Homodimer	Tertiary Monomer (gliadin) Polymer (glutenin)	Tertiary Monomer	Quaternary Hexamer	Quaternary Trimer or homotrimer	Tertiary/quaternary Monomer
Crystal structures (Method: X-ray diffraction)				No crystal structures available for gliadins or glutenins				
Example of allergen (source)	Peanut Ara h 6	Peach Pru p 3	Wheat Tri a 28	Wheat	Birch pollen Bet v 2	Soybean Gly m 6	Peanut Ara h 1	Celery Api g 1
PDB accession number	1W2Q	2B5S	1HSS	NR	1CQA	2D5H	3SMH	2BK0

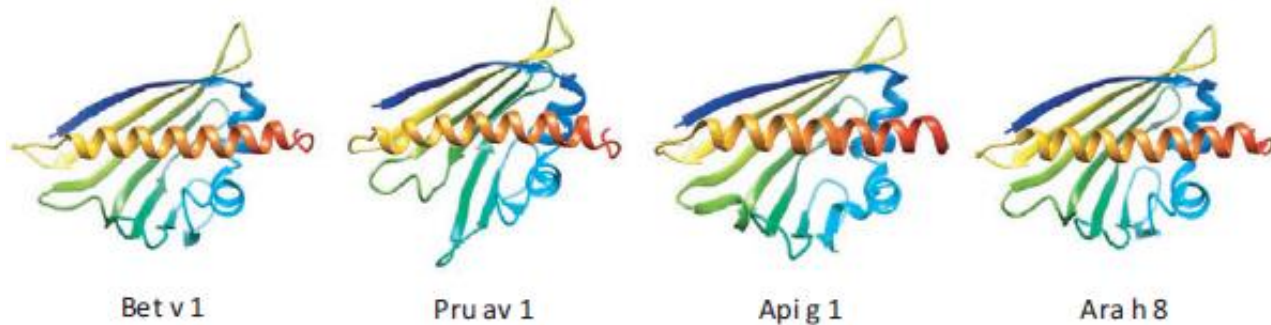
50 allergènes

29 allergènes

Costa 2020

Superfamille Bet v 1 (pathogenesis-related group 10 [PR-10] proteins)

- **Bet v 1 allergène majeur du pollen bouleau**
- **Allergies croisées alimentaires aux rosacées (pomme, poire, abricot...) et légumes apiacés (celeri, carrote, ...)**
- **MW: 15–17 kDa**
- **6 brins β anti-parallèles et 3 hélices α**
- **Multiples isoformes (Bet v 1 = 14 allèles de 7 gènes différents)**



Protéines thermolabiles

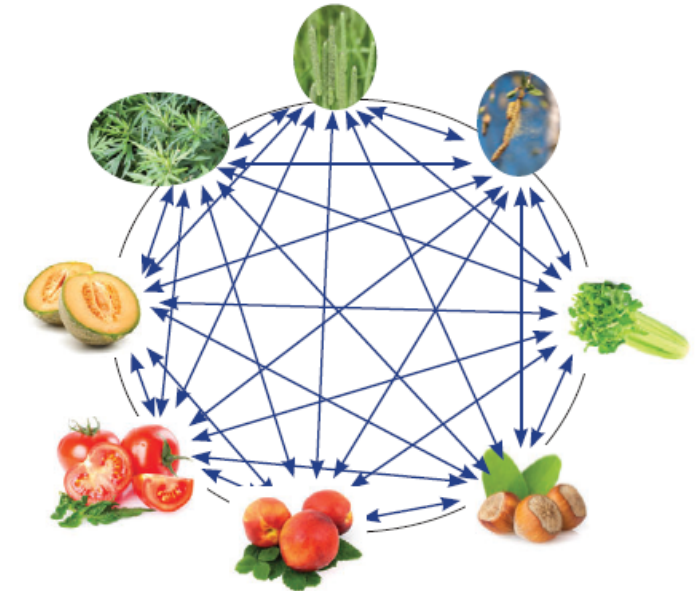
Botanical family	Allergen source	Allergen
<i>Rosaceae</i>	Strawberry (<i>Fragaria ananassa</i>)	Fra a 1
	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Mal d 1
	Apricot (<i>Prunus armeniaca</i>)	Pru ar 1
	Cherry (<i>Prunus avium</i>)	Pru av 1
	Peach (<i>Prunus persica</i>)	Pru p 1
	Pear (<i>Pyrus communis</i>)	Pyr c 1
	Raspberry (<i>Rubus idaeus</i>)	Rub i 1
<i>Actinidiaceae</i>	Golden kiwifruit (<i>Actinidia chinensis</i>)	Act c 8
	Green kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Act d 8
<i>Apiaceae</i>	Celery (<i>Apium graveolens</i>)	Api g 1
	Carrot (<i>Daucus carota</i>)	Dau c 1
<i>Fabaceae</i>	Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	Ara h 8
	Soybean (<i>Glycine max</i>)	Gly m 4
	Mung bean (<i>Vigna radiata</i>)	Vig r 1
<i>Corylaceae</i>	Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	Cor a 1.04
<i>Fagaceae</i>	Chestnut (<i>Castanea sativa</i>)	Cas s 1
<i>Solanaceae</i>	Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Sola l 4



Superfamille des profilines

- **Protéines cytosoliques**
- **12-15 kDa**
- **Participent à la polymérisation de l'actine**
- **Très conservées parmi les plantes (70 à 85% d'identité entre les espèces)**
- **Allergies croisées pollen / alimentaire (10 à 30% allergiques pollen)**
- **Sensible à la dénaturation thermique**
- **Ex : Pru p 4 (pêche), Pru av 4 (cerise), Ara h 5 (arachide) ...**

Botanical family	Allergen source	Allergen
Rosaceae	Apple (<i>Malus domestica</i>)	Mal d 4
	Peach (<i>Prunus persica</i>)	Pru p 4
	Pear (<i>Pyrus communis</i>)	Pyr p 4
Cucurbitaceae	Melon (<i>Cucumis melo</i>)	Cuc m 2
Actinidiaceae	Kivi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Act d 9
Apiaceae	Celery (<i>Apium graveolens</i>)	Api g 4
	Carrot (<i>Daucus carota</i>)	Dau c 4
Rutaceae	Orange (<i>Citrus sinensis</i>)	Cit s 2
Leguminosae	Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	Ara h 5
	Soybean (<i>Glycine maxima</i>)	Gly m 3
Solanaceae	Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Sola l 1
Bromeliaceae	Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)	Ana c 1
Corylaceae	Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	Cor a 2
Brassicaceae	Yellow mustard (<i>Sinapis alba</i>)	Sin a 4
Asteraceae	Sunflower (<i>Helianthus annuus</i>)	Hel a 2
Moraceae	Fig (<i>Ficus carica</i>)	Fic c 4



Autres familles d'allergènes de plantes

■ Protéines de défense

- Protéases
- Inhibiteurs de protéases de type Kunitz (soja)
- Chitinases
- Protéines thaumatine-like (TLPs)
 - Mad d 2 (pomme)
- Peroxydases

■ Nouveaux allergènes

- Oléosines
- Serpines
- Enolases
-

Conclusion 1: conservation de séquence parmi les allergènes homologues

Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions

THE JOURNAL OF
**Allergy AND Clinical
Immunology**

Christian Radauer, PhD,^a Merima Bublin, PhD,^a Stefan Wagner, PhD,^a Adriano Mari, MD,^{b,c} and Heimo Breiteneder, PhD^a *Vienna, Austria, and Latina and Rome, Italy*

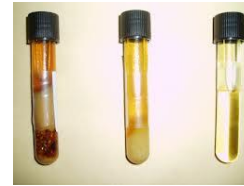
**Il y a une certaine
logique à observer des
réactions croisées**

Identification des allergènes

Identification de l'aliment

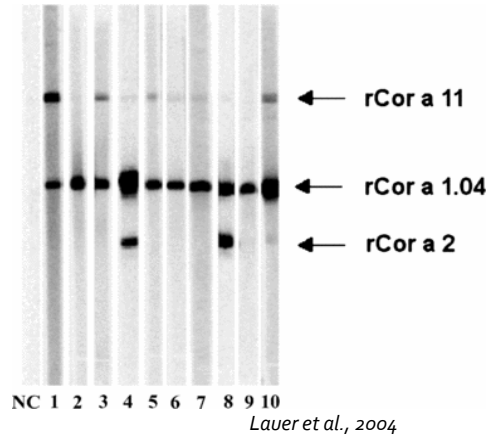


Extraction /
Séparation

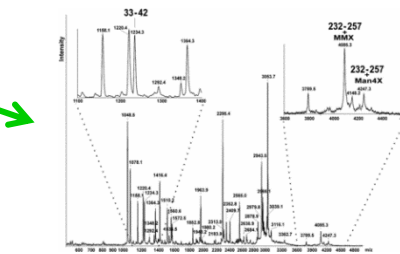
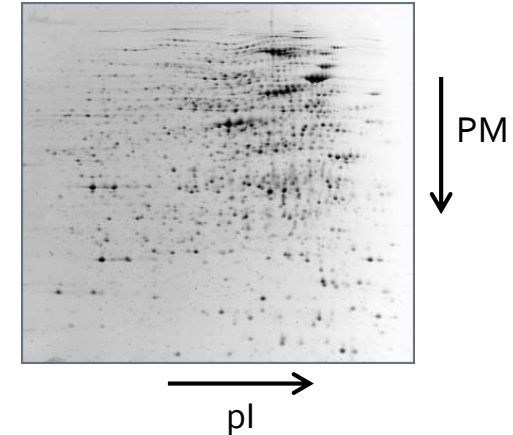


Extrait

Séparation 1D
(western blot IgE)



Séparation 2D
(western blot IgE)



Analyse des bandes/spots
(spectrométrie de masse)

Séquence protéique

Ex: Les allergies au blé

→Prévalence :

- Allergie alimentaire à la farine de blé : 0,2% pop générale (Zuidmeer 2008, Morita 2012, Nwaru, 2014).
- Allergie respiratoire (contact) : 15 % des professionnels
- Allergie alimentaire et de contact à des glutens modifiés

→Principaux allergènes



Protéines
Cytoplasmiques
15-20%

Albumines

LTP, Inhib α -
amylase...

Globulines

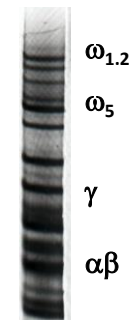
Protéines de stockage
GLUTEN
80-85%

Gliadines

Gluténines

LMW
HMW

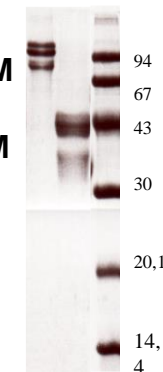
Gliadines



Acide PAGE

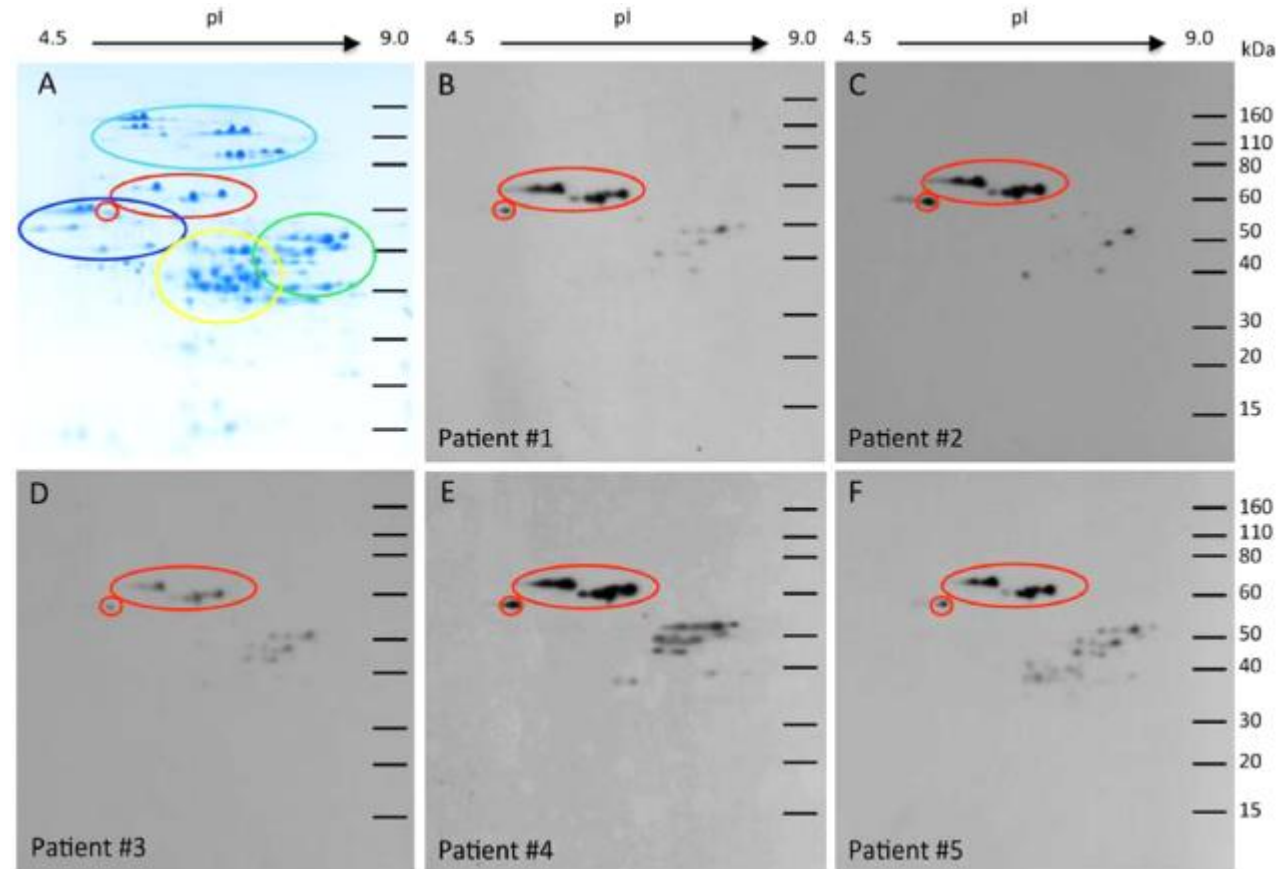
Gluténines

SU HPM
et
SU FPM



SDS PAGE

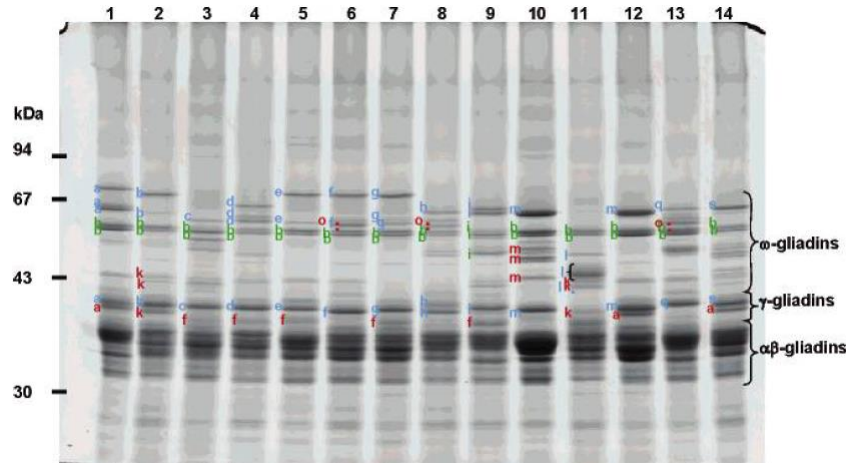
Les allergies au blé



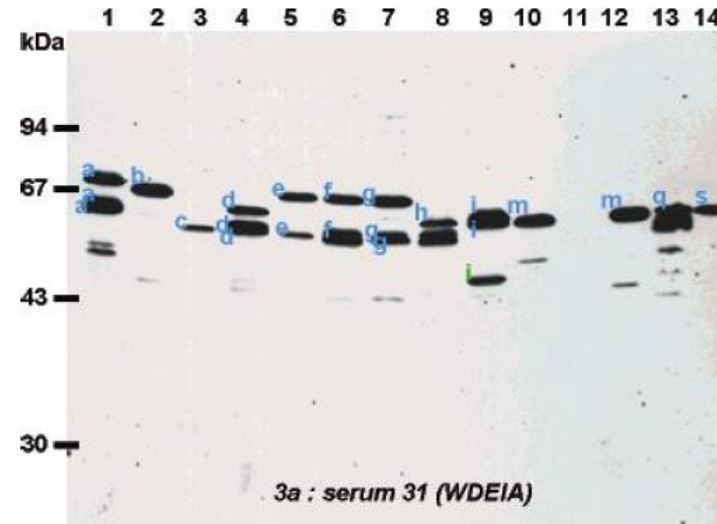
Variabilité en fonction des patients

Les allergies au blé

L'oméga-5 Gliadine est l'allergène majeur impliqué dans les cas d'anaphylaxie induite par l'effort



Hétérogénéité des profils protéiques d'une variété à l'autre.

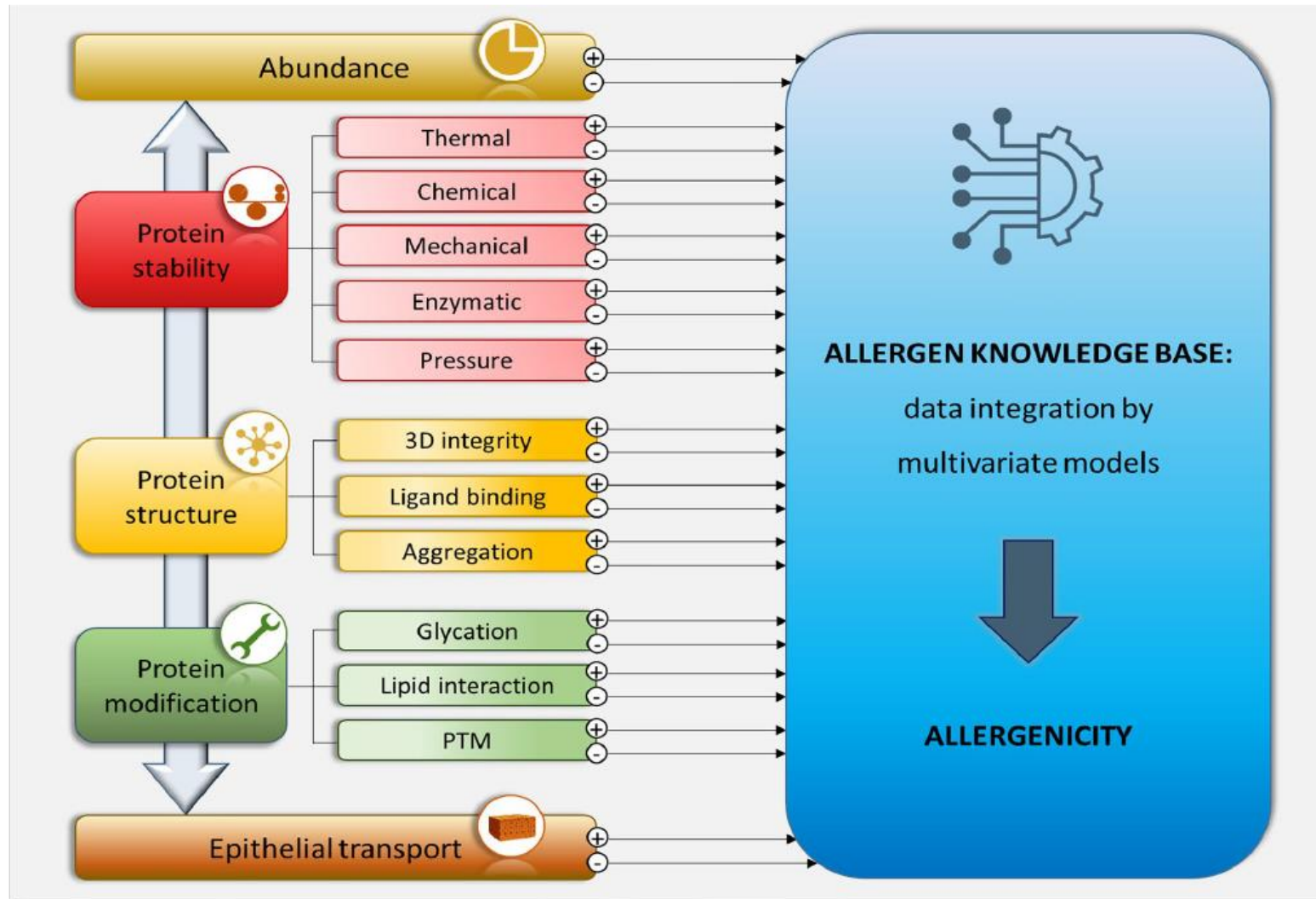


Hétérogénéité des réponses

Variabilité en fonction des différents cultivars

S. Denery-Papini, JAFC, 2007

Paramètres à intégrer dans l'évaluation de l'allergénicité d'une protéine

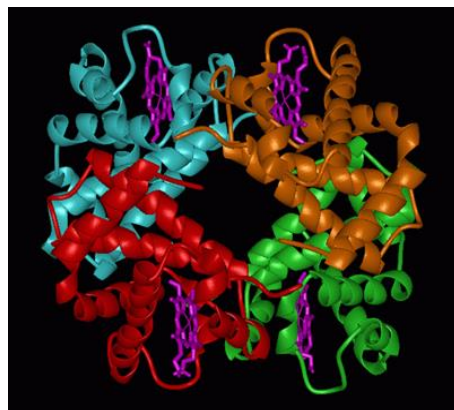
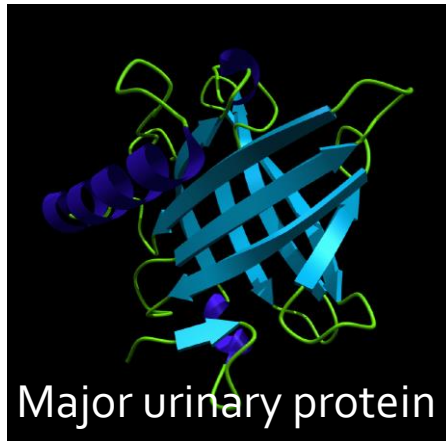
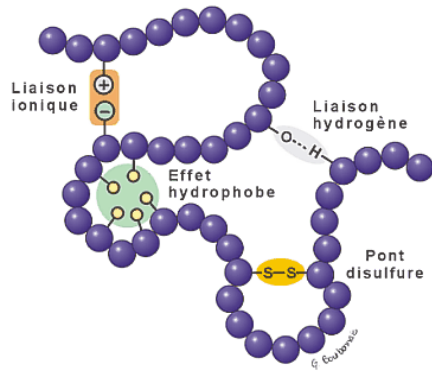


+ Effet de la matrice alimentaire

Modifications post-traductionnelles des protéines

- Ponts disulfure
- Glycosylation (O- sur Ser, Thr ou N- sur Asn)
 - ➔ CCD (cross-reactive carbohydrate determinant)
- Phosphorylation (Tyr, Ser, Thr)
- Isoprénylation (prénylation, myristoylation, farnésylation...sur Gly N-ter, Cys)
- Acétylation (aa N-ter ou Lys)
- Amidation (aa C-ter)
- Biotinylation
- Carboxylation
- Hydroxylation (exemple Ara h 2)
- Méthylation
- Sulfatation
- Ubiquitination
- Désamidation (Gln ➔ Glu)

Structure des allergènes et familles structurales



Hémoglobine

Structure primaire

- Séquence

Structure secondaire

- Hélice α (α -helix)
- Feuillet β (β -sheet)
- Coude β (β -turn)
- Boucles/Pelote statistique (coil/random coil)

Structure tertiaire

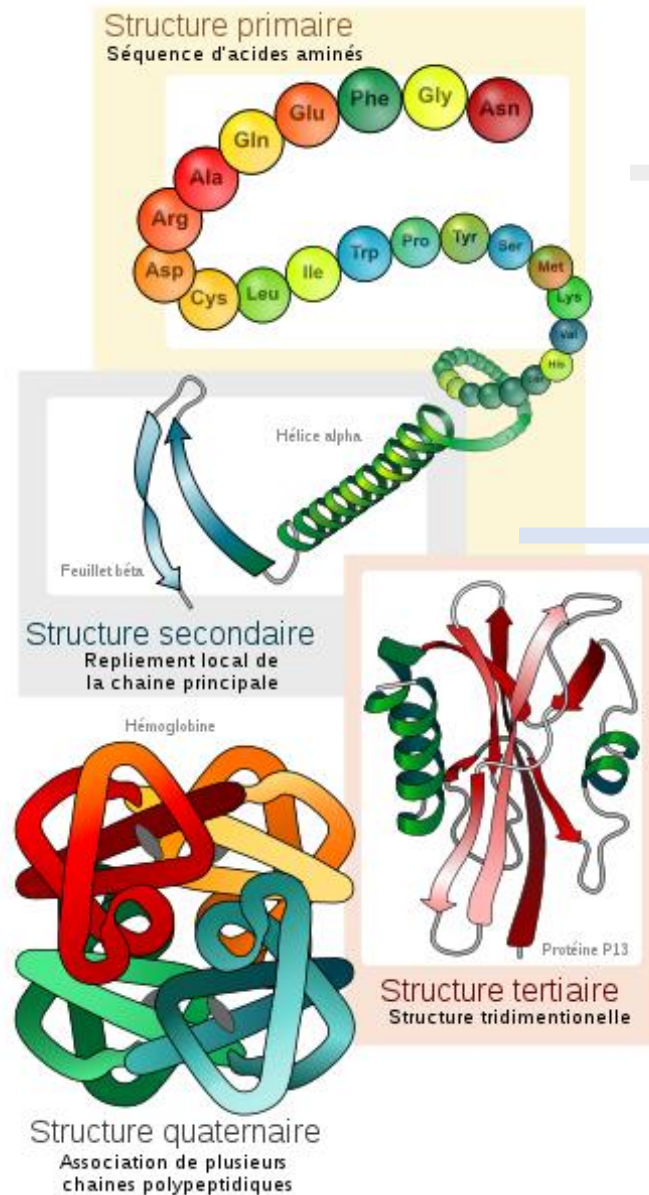
- Repliement des structures II dans l'espace

Structure quaternaire

- Arrangement des sous-unités identiques ou différentes

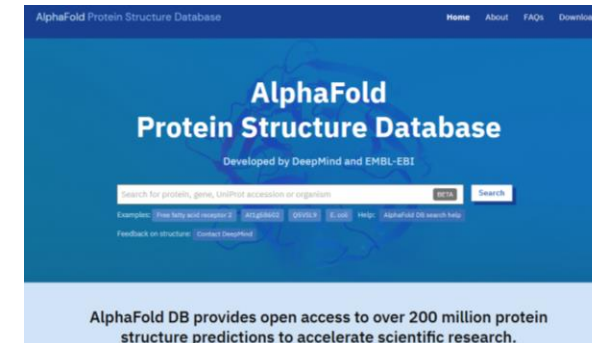
Classification des protéines dans + de 9000 familles

Structure des protéines: méthodes d'études

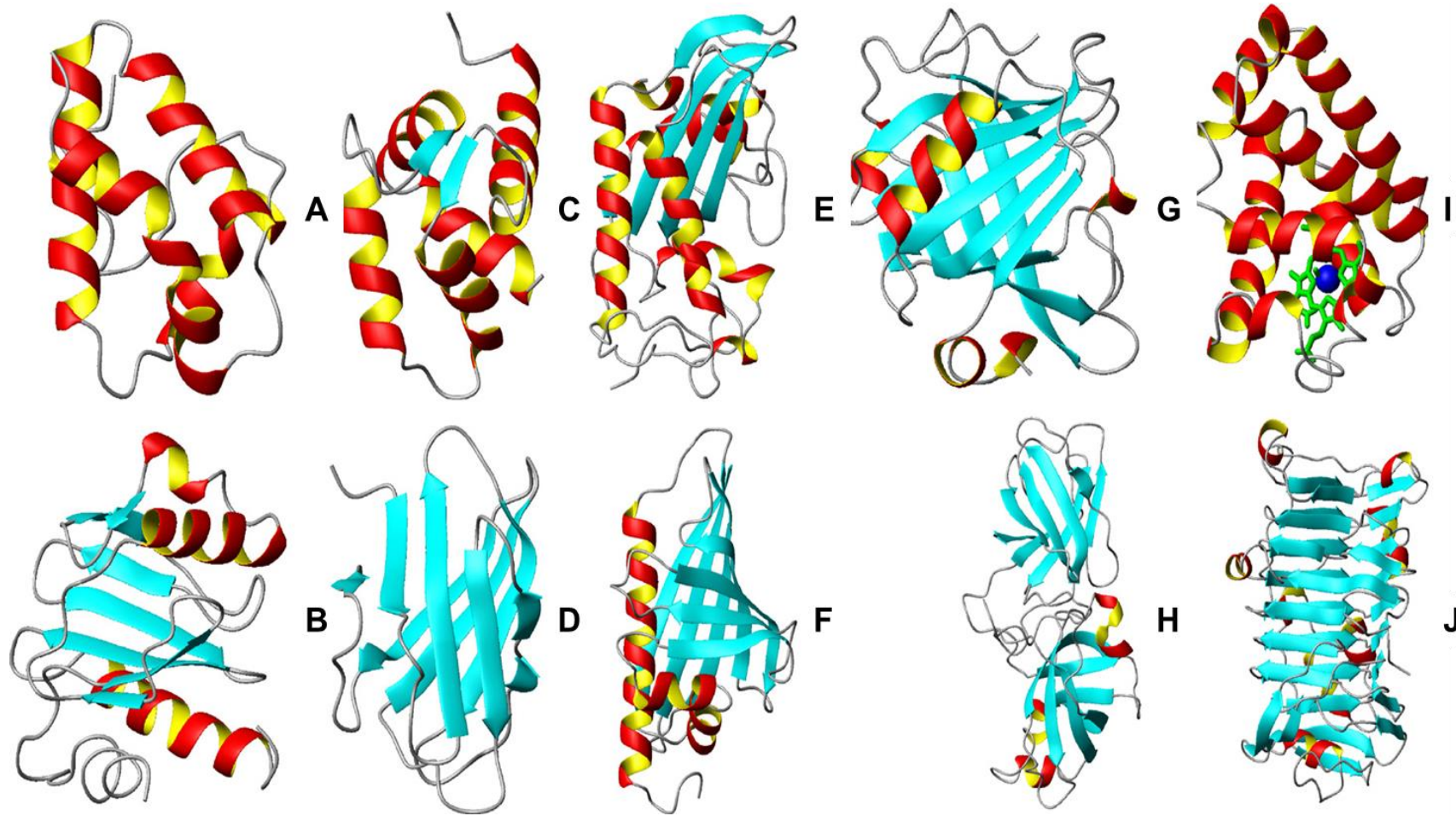


Séquençage (dégradation d'Edman)
Spectrométrie de masse
Clonage

Dichroïsme circulaire
Cristallographie / diffraction des rayons X
Spectroscopie RMN
Prédiction de structure
(alignement /structure 3D – identité > 25%)



Structure PDB d'allergènes des familles les plus abondantes



(A) Pru p 3 protease inhibitor/seed storage/LTP family; (B) Hev b 8, (profilin); (C) Bet v 4, (EF hand); (D) Phl p 2, (pollen allergen); (E) Ves v 5, (SCP-like extracellular protein); (F) Bet v 1, (pathogenesis-related protein Bet v 1 family); (G) Bos d 5, (lipocalin/cytosolic fatty-acid binding protein family); (H) Phl p 1, (rare lipoprotein A (RlpA)-like double-psi beta-barrel); (I) Chi t 1, (globin); (J) Jun a 1, (pectate lyase).

Pas beaucoup de structures disponibles + Pas de structure typique des allergènes?!

Conclusion 2: Pas de structure(s) typique(s) des allergènes?!

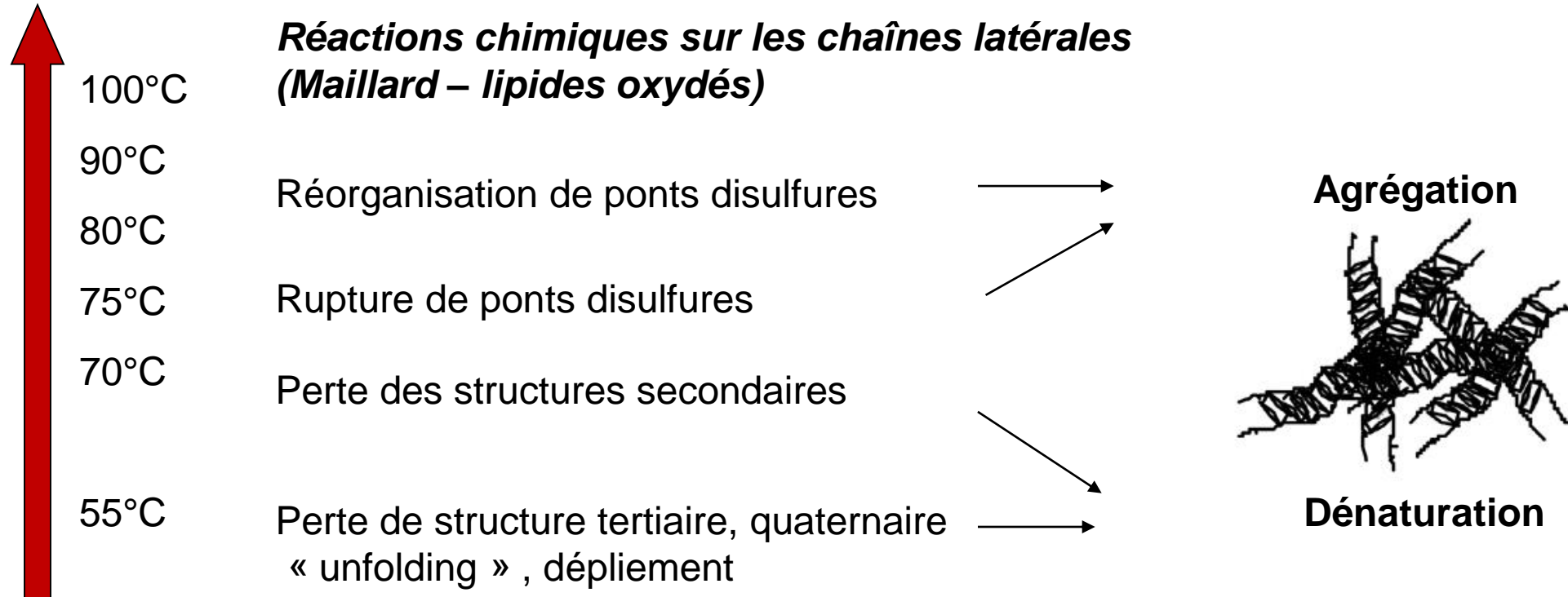
Mais!! Les structures sont sensibles au procédé de transformation!

Procédés de transformation des aliments (allergènes)

Heat stability	Pressure stability	Light/radiation stability	Mechanical stability	Chemical stability
<ul style="list-style-type: none">• Autoclaving• Frying• Boiling• Dry or wet roasting• Blanching• Baking• Canning• Pasteurisation	<ul style="list-style-type: none">• High pressure processing (HPP)• High pressure microfluidisation• High hydrostatic pressure (HHP)• High pressure steaming (HPS)	<ul style="list-style-type: none">• Gamma-irradiation• High voltage impulses• Pulsed electric fields (PEF)• Pulsed ultraviolet light (PUV)• Microwave	<ul style="list-style-type: none">• Sonication• Ultrasound	<ul style="list-style-type: none">• Fermentation• Alkylation/reduction• Enzymatic hydrolysis• Crosslinking• Carboxymethylation• Acid/urea treatments

Costa 2020

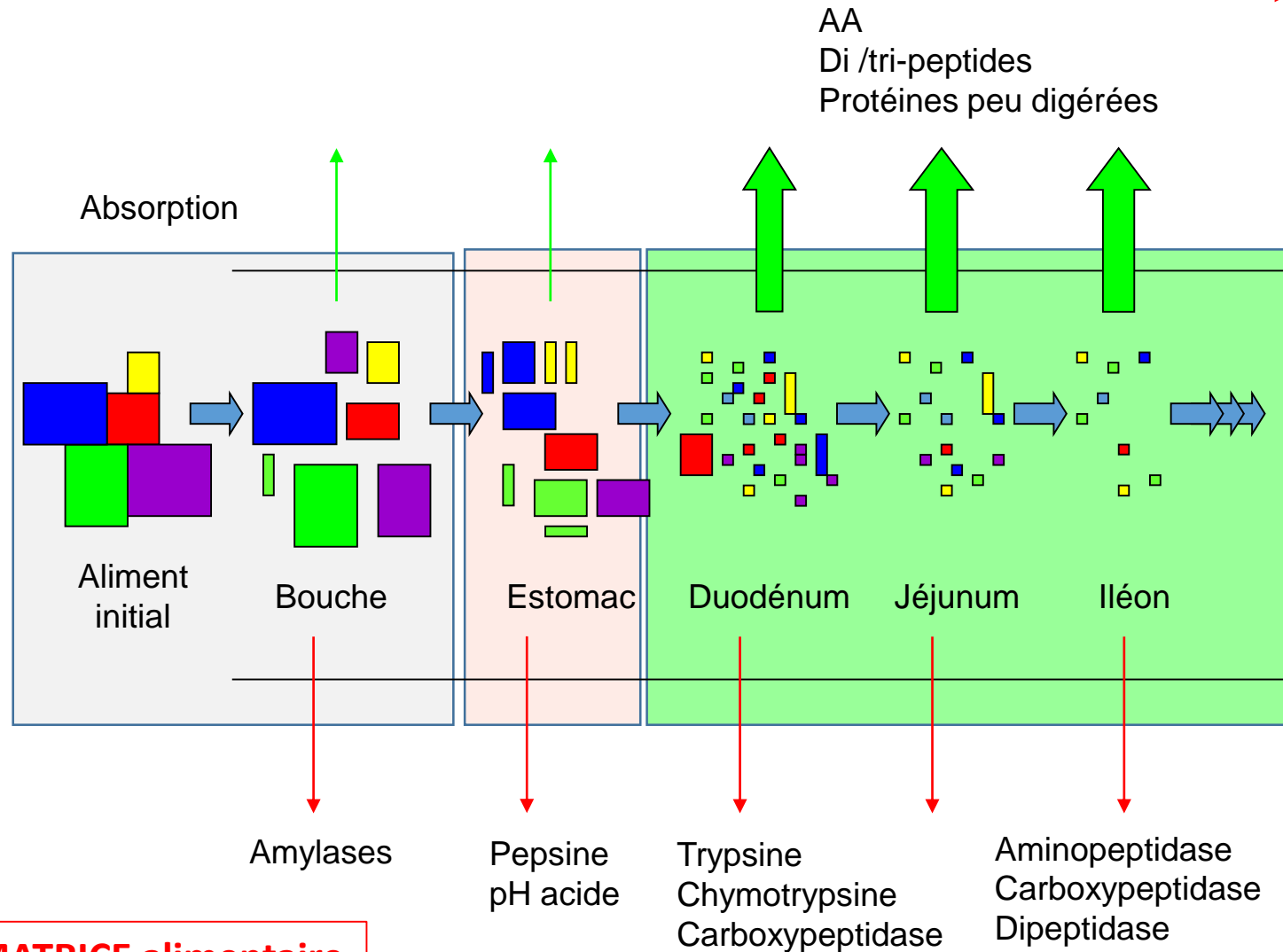
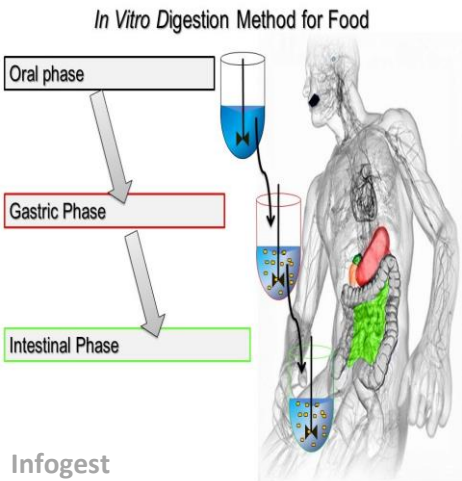
Structure des protéines et température



Fonction de : structure initiale, concentration, teneur en eau, temps, autres molécules...

Digestion et allergénicité

Temps →



IMPACT DE LA MATRICE alimentaire

Dégradation des protéines en polypeptides, peptides....

non immunogènes

↓

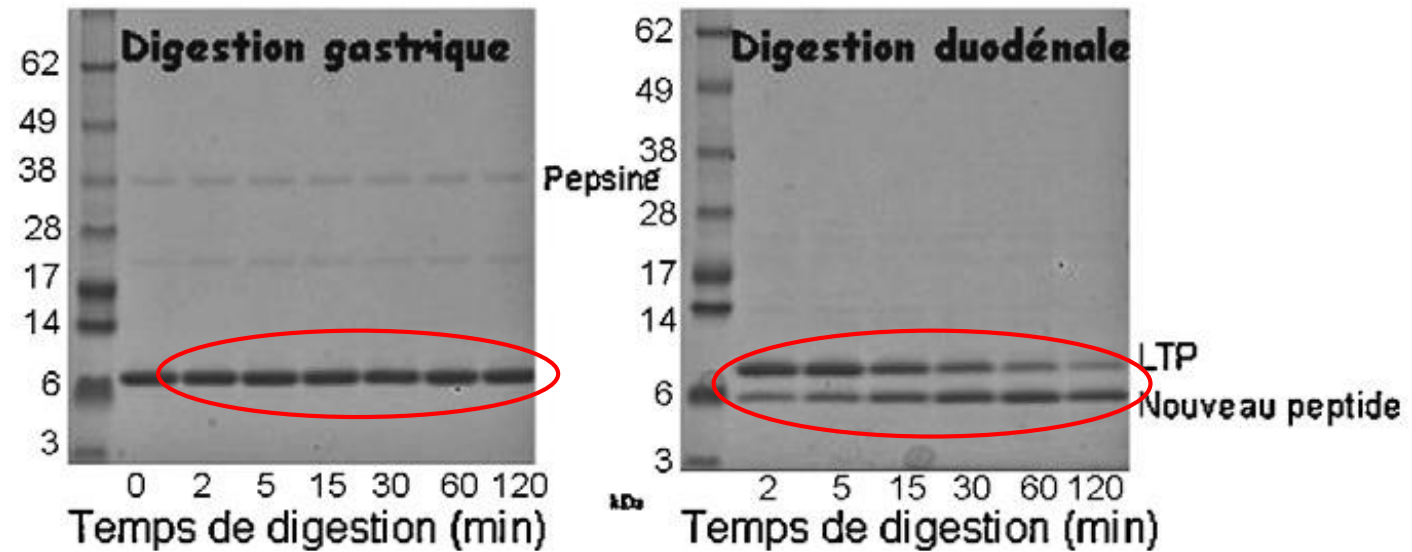
Ignorance par le système immunitaire
Ou sensibilisation

Résistance des allergènes à la digestion

Exemple : les LTP : Protéines de Transfert de Lipides

Allergènes ubiquitaires :

pomme, pêche, cerise, céréales, laitue, noisette, raisin ...



Adel-Patient et al. - 2008

Relation structure et allergénicité

Identification des épitopes

Méthodes d'étude

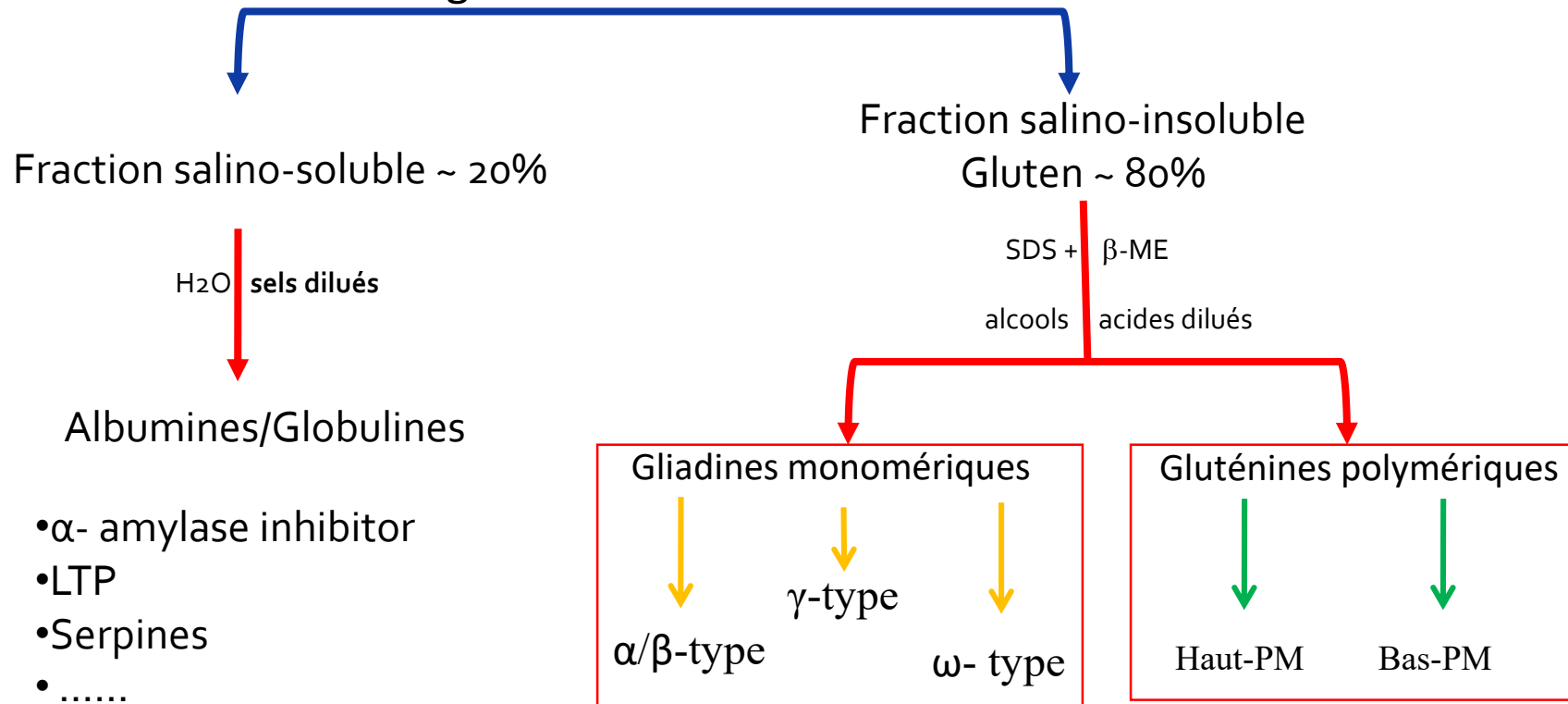
- Pepsan/Alascan
- ELISA sur peptides purifiés issus de digestion protéique
- Phage display (banques de peptides, fragments protéiques,)
- Protéines recombinantes (mutagénèse)
- ELISA compétitif
- Protéines dénaturées (chauffage, réduction/alkylation)

Quelques exemples d'études sur les épitopes et allergènes de blé

Les prolamines de céréales

Exemple . 1

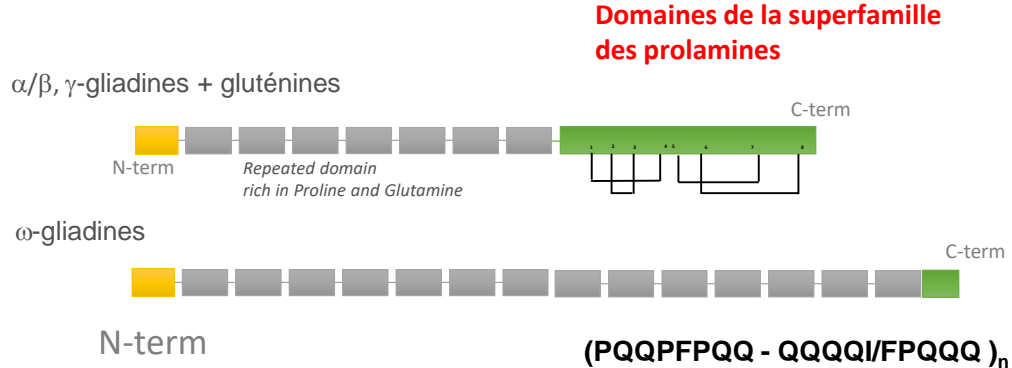
- Protéines de réserve (farine)
- Riches en Pro et Glu
- Pas de structure connue
- Insolubles → polymère visco-élastique = gluten
- Gliadines + gluténines



Caractéristiques des protéines du gluten

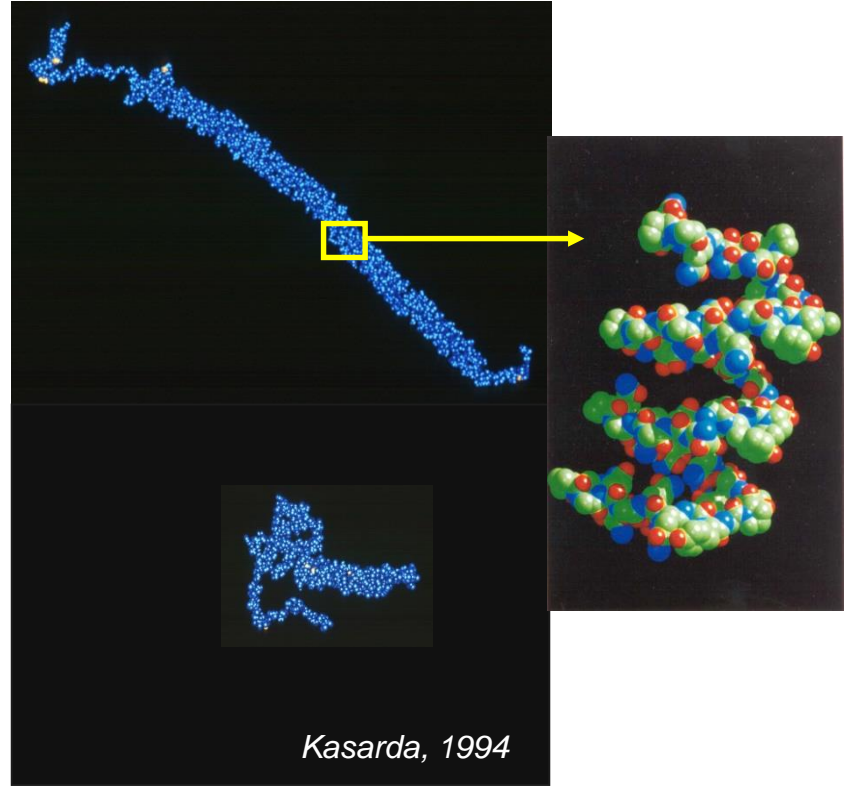
Ex. 1

- Protéines des protéines du gluten
2 domaines, répétitions, fortes homologues de séquences, structure «étendue»



α/β -gliadines	$(PQQPY / QPQFPF)_n$
γ -gliadines	$(PQQPFPQ)_n$
ω -gliadines	$(PQQPFPQQ - QQQQI/FPQQQ)_n$
SU Glut FPM	$(PQQQPPFS/QQQQPVL)_n$
SU Glu HPM	$(GYYPTSPQQ / PGQGQQ / GQQ)_n$

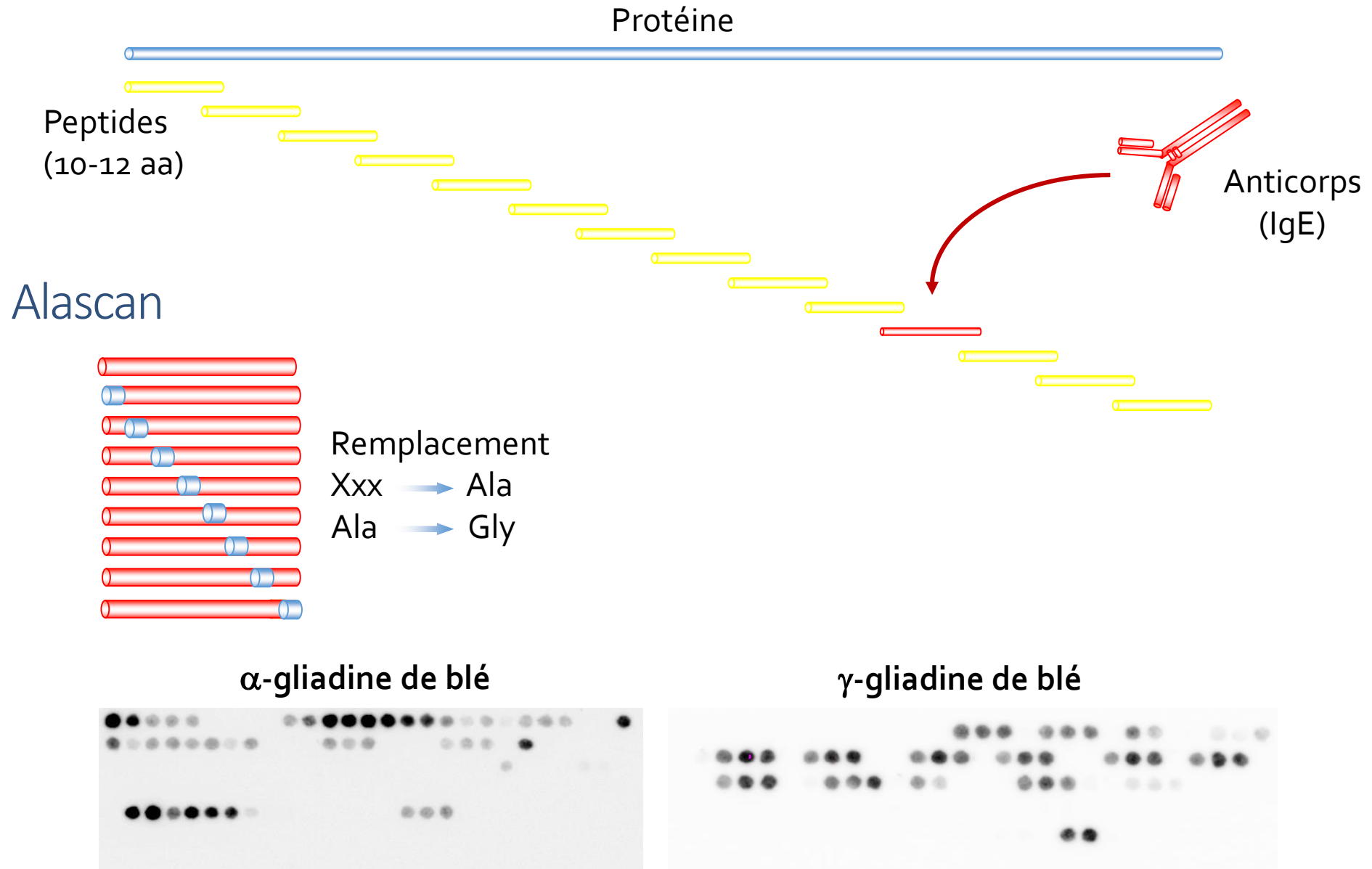
Modélisations



Ne 3D structure Spectroscopic studies (FTIR, CD) + microscopy...

PEPSCAN Identification épitopes linéaires

Ex. 1

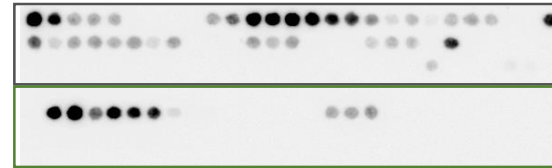


Identification des épitopes continus PEPSCAN

Ex. 1

α -gliadine

Répétitif Non répétitif

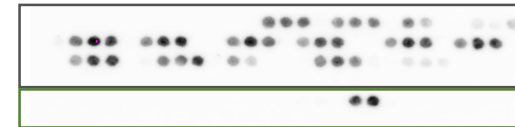


(Serum #901)

YLQLQPFPO	QQQSSQVSE
QQQFPGQQQ	QPSSQVSE
QEQMPSWQQE	SFQQF
PLVQQQFPG	QQP
QPQFPFSQQP	

γ -gliadine

Répétitif Non répétitif



LSQQPQTFP	GSLVQGQGI
LQPQPFPOQ	LVQGQGIQF
QQPQPFPOF	
QPQSFPOQ	
QQPQPFPOQ	
QPQFPPOQ	

Epitopes
communs
Réactivités
croisées

ω 5-gliadine

Répétitif

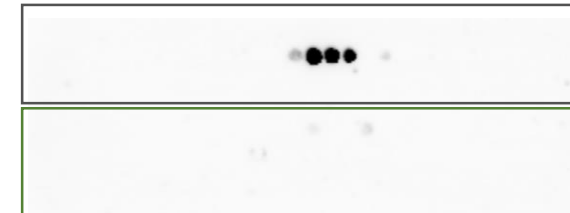


QQQIPQQI
HQQLPQQF
PQQFPQQF
RPQSPQQQ
POOOLPOO

(Serum #3)

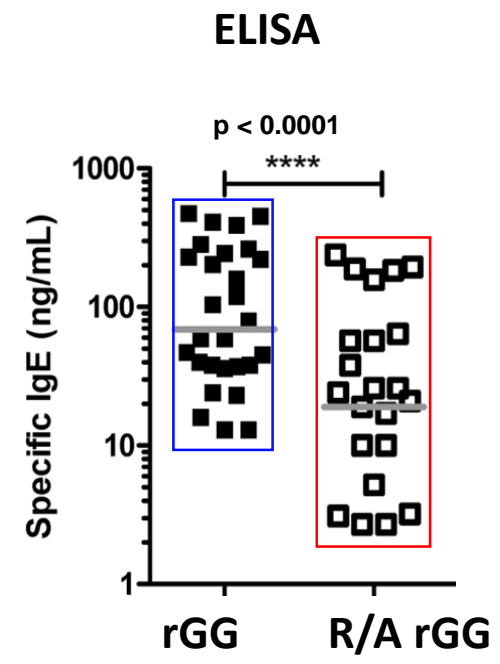
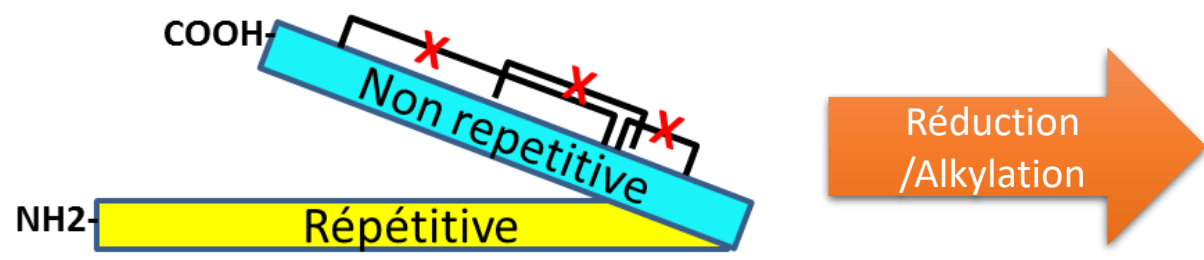
Gluténine-FPM

Répétitif Non répétitif



QQPIQQPQQ	QQQPVLQQ	SPVAMPQSLA
QPQFPQQP	QQQIPFVHPS	LPQIPQOSRY

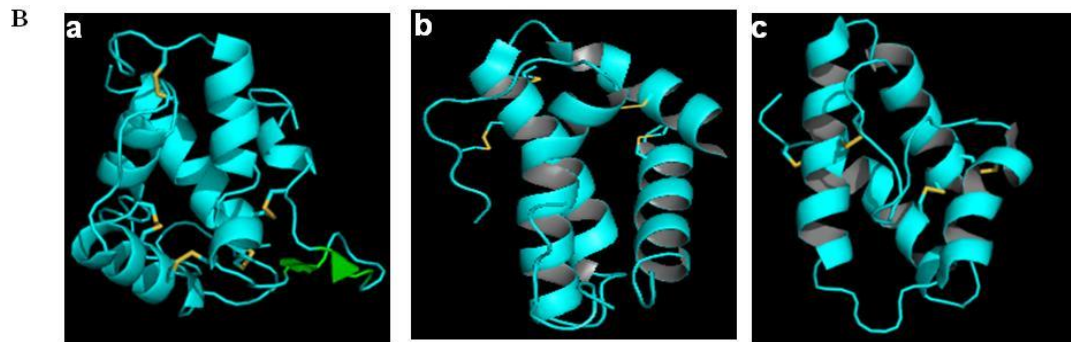
Denery-Papini 2011, Mameri et al., JAF 2012



Importance of disulfide bonds (tertiary structure : conformational epitopes) in gliadins IgE-reactivity

Allergènes végétaux: Superfamille des prolamines « globulaires »

- Squelette de 8 résidus Cystéines conservés (3-4 ponts S-S)
- Sous-familles
 - LTP ou nsLTP (lipid transfer protein)
 - Inhibiteurs d'a-amylase / trypsine
 - Albumines 2S
 - 9-18kDa
- Prolamines de céréales riches en Pro et Glu 30-60 kDa



Inhibiteur α -amylase
Tri a 28

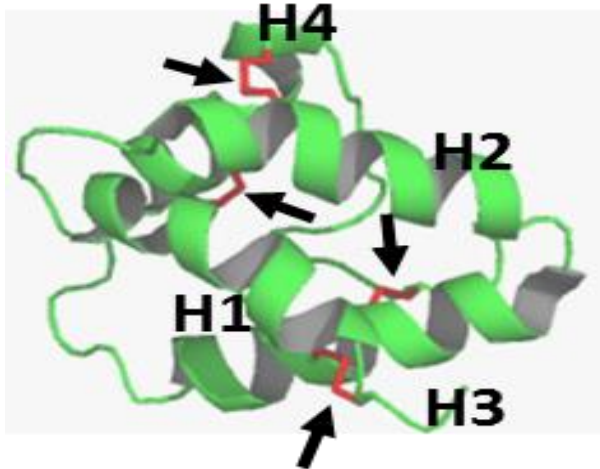
Albumine 2S
Ara h 2

LTP1
Tri a 14

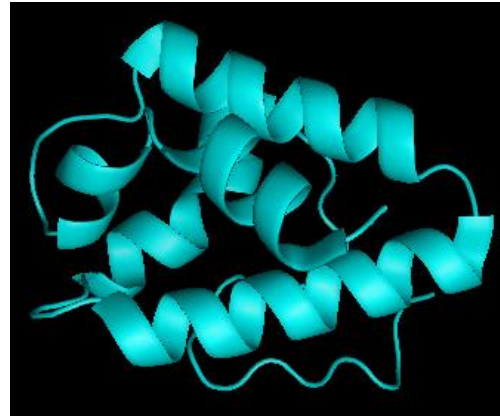
Structure globulaire en hélices alpha

Pru p 3	Peach
Mal d 3	Apple
Pru ar 3	Apricot
Pru d 3	Apricot
Sin a 1	Yellow mustard
Ber e 1	Brazilian walnut
Jug r 1	British walnut
Ara h 2	Peanut
Ara h 6	Peanut

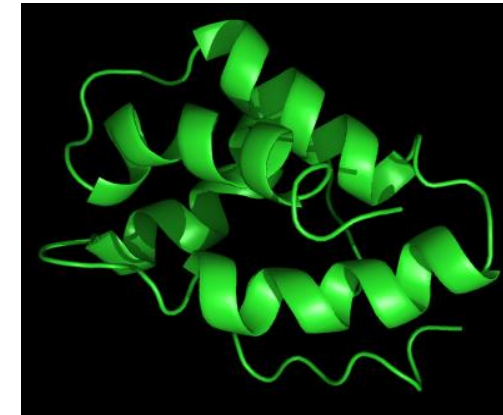
Caractérisation des épitopes de la LTP1 de Blé



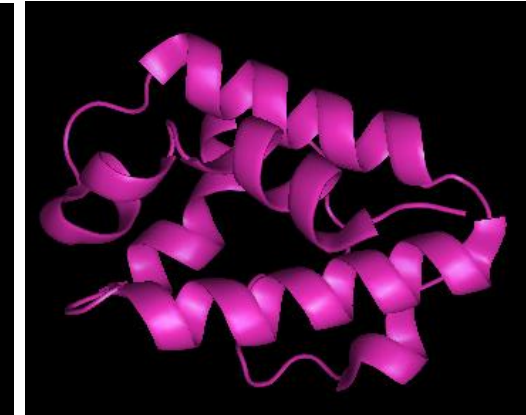
Wheat (1GH1)



Barley (3GSH)



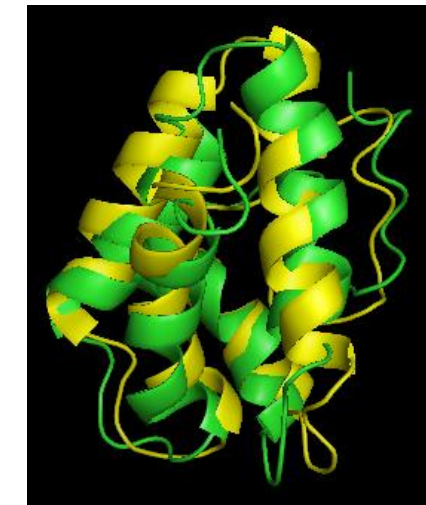
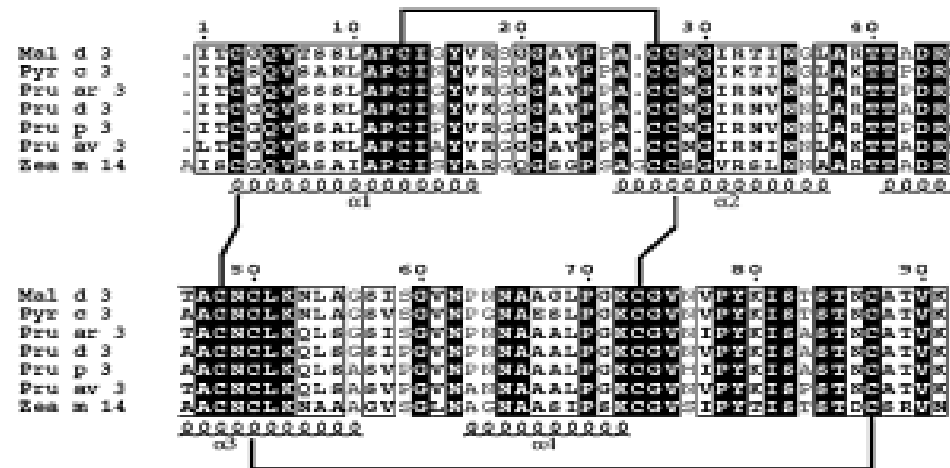
Mangue (1SIY)



Peach (2ALG)

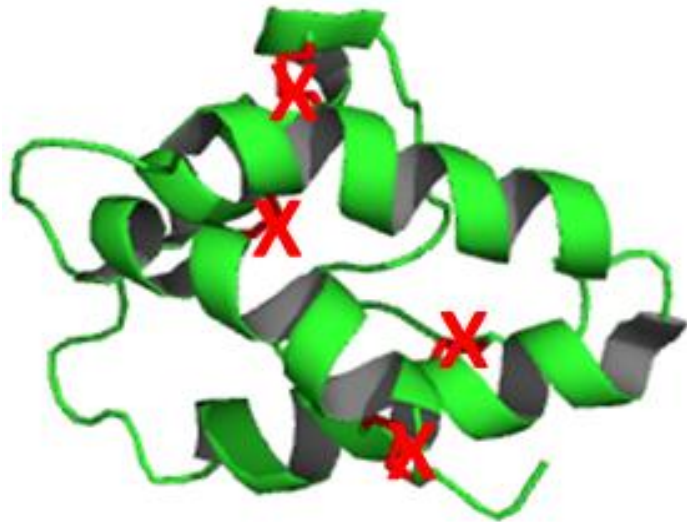
- Globular, 90 aa (9 kDa)
- pHi=8.20
- 4 S-S bonds, 4 α -helices
- Non-specific lipid transfer
- Resistant to digestion and heating

Highly conserved structure



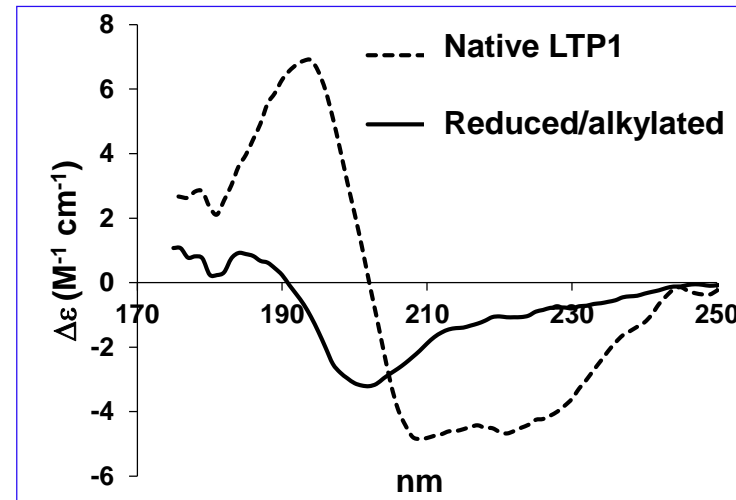
3D alignment

Caractérisation des épitopes de la LTP1 de Blé

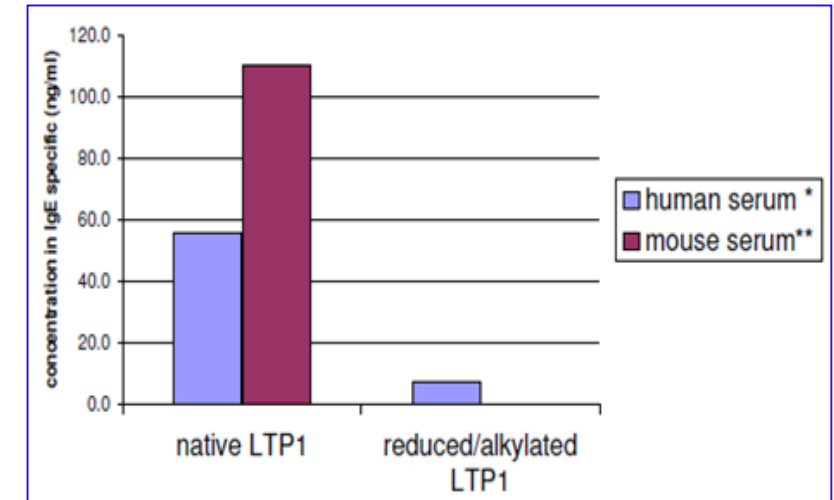


Native protein
(reduction & alkylation)

Circular dichroism



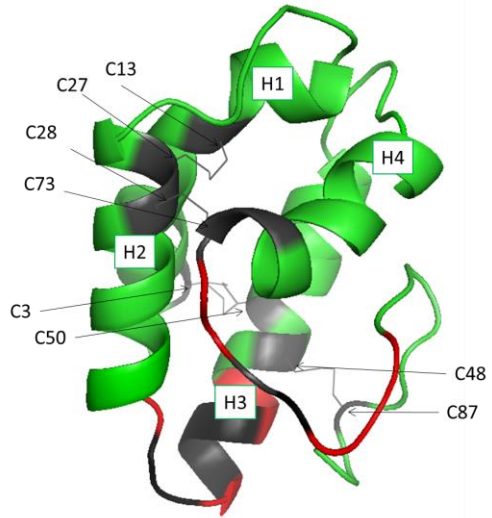
ELISA



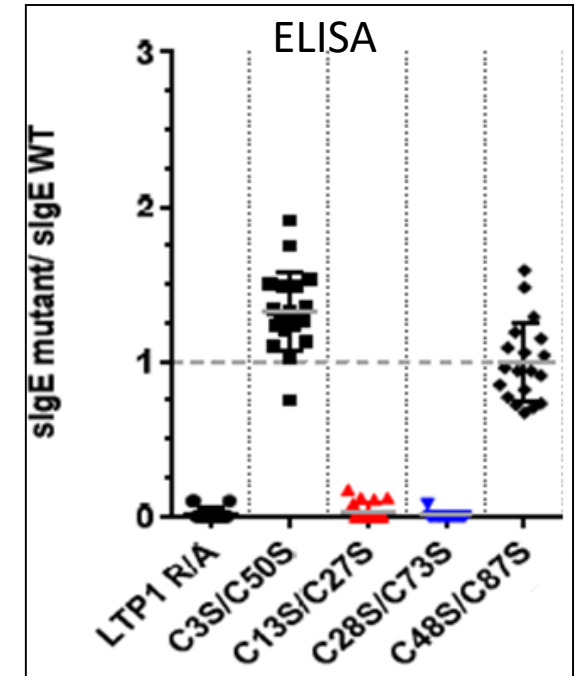
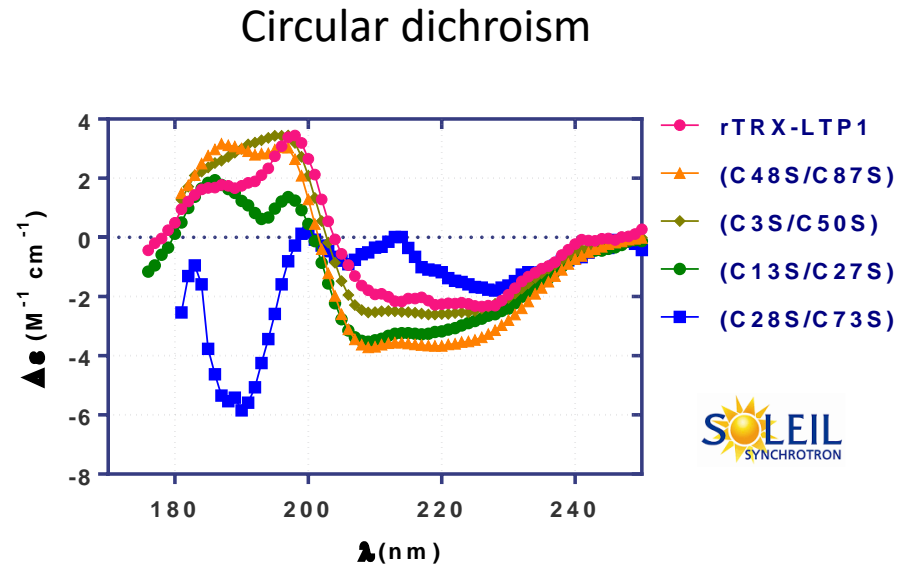
Denery-Papini et al, Clin Exp Allergy 2011

Wheat LTP1 contains mainly conformational epitopes

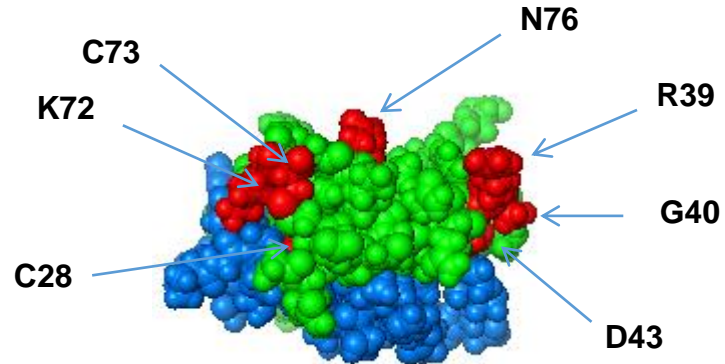
Caractérisation des épitopes de la LTP1 de Blé



Recombinant protein
(site directed mutagenesis)



**Candidates for Specific
Immunotherapy (hypoallergenic
variants)**

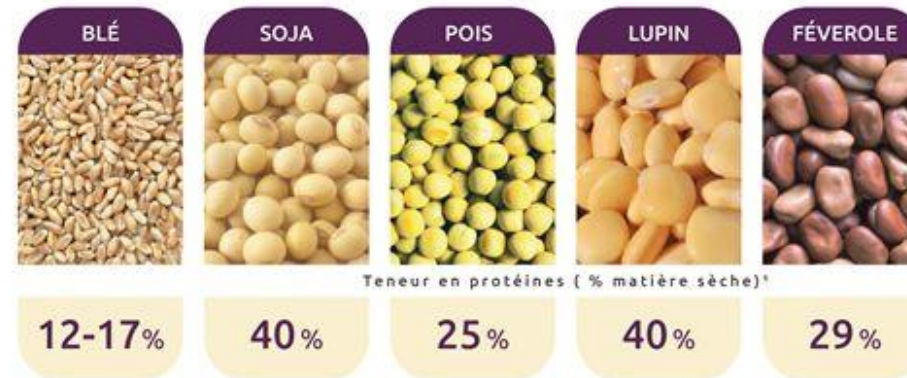


Mameri et al., 2022 Scientific Reports

Contexte actuel : Forte demandes pour protéines végétales

Protéines végétales = **ingrédients nutritionnels** et/ou **fonctionnels**

Teneur protéines	
Concentrat	65 – 90 %
Isolat	> 90%



Ajout d'une fonctionnalité

→ Goût, solubilité, propriétés émulsifiantes, moussantes, texture...



- Hydrolyses
- Fermentation
- Modifications chimiques
-
-

Nouveaux allergènes sur le marché!



Exemple 4

Modification de protéines végétales et allergénicité

Contexte du blé



12-17%

Farine



Gluten

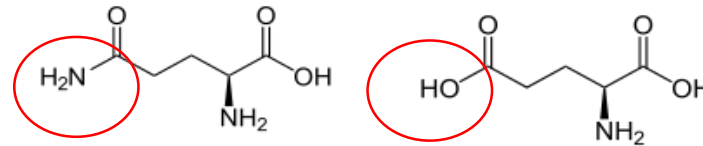
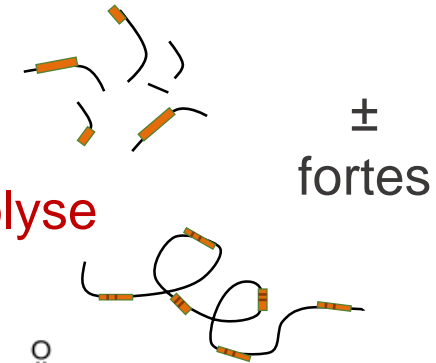


Hydrolyses enzymatiques

Hydrolyses acides (alcalines)

→ Protéolyse partielle

→ Désamidation ± Protéolyse
modif chim Gln → Glu



- ✓ Protéines de Blé Hydrolysées
- ✓ Hydrolysats de Protéines de Blé
- ✓ Protéines de Blé Fonctionnalisées
- ✓ Hydrolyzed Wheat Proteins : HWP
- ✓ ...

Sur le marché depuis les années 1990

→ Alimentation

→ Cosmétique

**PATIENTS TOLÉRANTS
AU BLÉ 'NATIF'**

Récapitulatif des Hydrolysats impliqués

- ✓ Cosmétique - Japon : Glupearl 19S
- ✓ Cosmétique - France : Tritisol (UK)
- ✓ Aliment - France : Gemtec™ (isolat – Australie)
- ✓ Aliment – Danemark : Meripro 711 (Europe)

➔ **HYDROLYSATS ACIDES**

➔ Désamidation = modification de la séquence

Composition du gluten

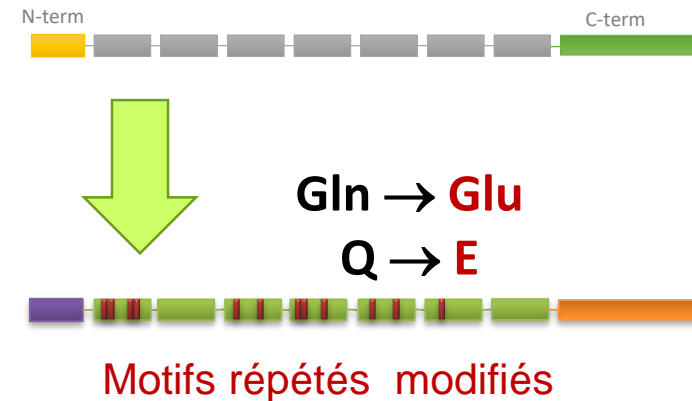
- **Gliadines** α/β , γ , ω_2 and ω_5
- **Glutenines** LMW and HMW GS

Motifs répétés

- **Gln = 40%**

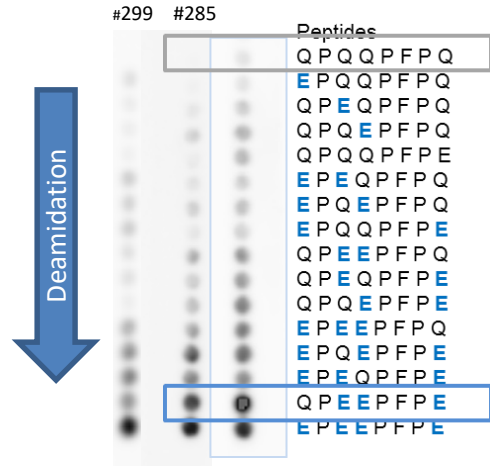
α/β -gliadins	PQQPY / QPQFPF
γ -gliadins	PQQPFPQ
ω_2 gliadins	PQQPFPQQ
ω_5 gliadins	QQQQI/FPQQQ
LMW-GS	PQQQPPFS/QQQQPVL
HMW-GS	GYYP TSPQQ -PGQQQQ-GQQ

Structure



Caractérisation des épitopes

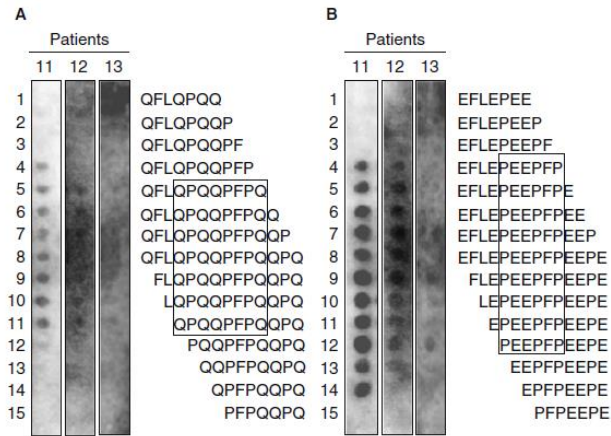
FRANCE



- ✓ Peptide consensus γ / ω 2-gliadines natif
QPQQPFPQ
faiblement reconnu
- ✓ Peptide désamidé dominant
QPEEFPPE

Denery et al. Allergy 2012

JAPON



Yokooji et al. Allergy Intern. 2013

- ✓ Même Peptide consensus natif
QPQQPFPQ
- ✓ Peptide désamidé consensus
PEEFPFP

➤ **Néo-épitopes dus à la désamidation**

Conclusion-1

✓ La situation actuelle

Au Japon ⇒ Savon Cha no Shizuku® retiré du marché en 2011

Danemark ⇒ Préparations pour gâteaux retirées du marché en 2010

En Europe ⇒ Hydrolysats acides retirés marché Alimentation Ω depuis 2010



25 cas déclarés au
RAV
Jusqu'en 2014

Aucun cas
depuis 2014

- ✓ **2014 Scientific Committee on Consumer Safety** : considers the use of HWP safe for consumers in cosmetic products, provided the Max MW average of the peptides in hydrolysates is **3,5 kDa**.

Conclusion-2

Modification des protéines alimentaires et risque allergique ?

- ✓ Protéolyse → allergénicité conservée ou diminuée
- ✓ Séquence primaire modifiée ?
Néo-épitopes → pas de tolérance orale → risque de nouvelle allergie
- ✓ Voie d'exposition différente (cutanée) → risque ↑ de sensibilisation

Ce qui est connu actuellement :

- Les différents niveaux de structure : primaire, 2D, 3D jouent un rôle important
- La résistance à la digestion favorise l'allergénicité d'une protéine
- Il faut au moins 2 ou 3 épitopes sur un allergène pour déclencher les symptômes allergiques
- Importance des réactions croisées
- Les procédés qui modifient les structures des allergènes peuvent modifier l'allergénicité

Ce qui n'est pas totalement connu :

- Les caractéristiques structurales, physico-chimiques fines, biologiques des allergènes
- Les épitopes conformationnels et les risques de réactions croisées
- Pas de règles générales sur l'effet des procédés alimentaires : cas par cas

Les principaux allergènes protéiques

- Structure des allergènes et allergenicité (quelques cas d'étude sur le blé)



Hamza Mameri, UMR IATE- INRAE Montpellier
hamza.mameri@inrae.fr

MERCI de votre attention