DOCTORAT ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : *Immunologie*

Par
Olivier TRANQUET

Anticorps chimériques dirigés contre des séquences des domaines répétés des gliadines pour mimer la réactivité des IgE de patients allergiques au blé

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 07 juillet 2020
Unité de recherche : INRAE, Unité Biopolymères, Interactions Assemblages

Rapporteurs avant soutenance :

Christiane HILGER	Investigateur Principal, Luxembourg Institute of Health (LIH)
Stéphane HAZEBROUCK	Chargé de Recherche, INRAE

Composition du Jury :

Président :	Xavier SAULQUIN	Professeur des université, Université de Nantes
Examinateur :	Fabrice BATTAIS	Chargé de recherche, INRS
Dir. de thèse :	Sandra DENERY	Directrice de Recherche, INRAE
Co-dir. de thèse :	Jean-Charles GAUDIN	Chargé de recherche, INRAE

Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement d'un long travail de thèse qui n'aurait pas été possible sans le soutien et la confiance de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du Jury. Monsieur Xavier Saulquin, Professeur à l'Université de Nantes qui a accepté de présider mon jury, Madame Christiane Hilger et Monsieur Stéphane Hazebrouck pour le temps précieux pris pour évaluer ce manuscrit et Monsieur Fabrice Battais d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes remerciements vont ensuite vers Sandra Denery qui depuis mon intégration dans son équipe m'a formé puis a accepté de diriger ma thèse. Ses conseils, sa clairvoyance, sa gentillesse et la liberté qu'elle m'a laissée pour orienter mes travaux ont été primordiaux. Cette relation professionnelle d'une grande qualité s'est agrémentée d'une amitié que je souhaite longue et chaleureuse. Sandra, sans toi cet accomplissement personnel et professionnel n'aurait pas été possible.

Je remercie également, Jean-Charles Gaudin qui a co-encadré ce travail et qui bien qu'éloigné à Orléans a toujours su prodiguer des conseils bien utiles quand je me trouvais dans une impasse. Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse, Mathilde Francin-Allami et Xavier Saulquin qui ont pris le temps de me donner des conseils avisés, une aide et un regard critique au cours de ces cinq années.

J'aimerais aussi remercier les membres de l'équipe allergie. Tout d'abord Roberta Lupi qui m'a soutenu quand j'hésitais à me lancer dans ce challenge et dont l'exemplarité, la rigueur scientifique (un protocole de « dégra » qui fonctionne c'est elle !), et l'amitié m'ont guidé tout au long de ce travail. A Colette et Chantal, qui m'ont aidé à prendre du recul et ne pas me perdre quand j'avais le nez dans le guidon. A Valérie Echasserieau, Laurence Lavenant et Florence Pineau qui m'ont accompagné et apporté toute leur expertise en biologie moléculaire et en immunochimie. A Véronique Solé qui s'est prise au jeu de mes caractérisations et a permis de concrétiser mon intuition. A « mes » stagiaires Julien, Audrey, Yngrid, Maxime et Annabelle qui ont passé de longues heures à produire mes anticorps. Je n'oublie pas non plus Emilie, Laura, Grégory et Gilbert pour leur bonne humeur et pour avoir pris le relais de mes autres activités quand la charge était trop lourde. Sans oublier les super-thésardes de l'équipe : Clélia et Amandine qui faisaient pétiller les fins de journée quand il fallait décompresser !

Ma carrière étant déjà bien longue avant que je ne commence ce travail de thèse, plusieurs autres personnes à l'INRA et en dehors ont contribué à me former et indirectement à me conduire jusque-là. Aussi, je profite de cette page pour remercier ici, Philippe Poncelet qui, à mes débuts à Biocytex à Marseille, m'a donné le goût de la recherche et enseigné l'art d'exploiter objectivement, précisément et complètement ses résultats.

Je terminerai en remerciant également ma famille qui m'a soutenu tout au long de ce projet.

A mon père,

Liste des publications et communications

Publications en lien direct avec le travail de thèse

Tranquet, O., Lupi R., Echasserieau-Laporte V., Pietri M., Larré C., & Denery-Papini S. (2015). Characterization of Antibodies and development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63 (22), 5403–5409. DOI : 10.1021/acs.jafc.5b00923

Denery, S., Tranquet, O. (2017). Structure moléculaire des allergènes et des épitopes à l'origine des réactions allergiques aux hydrolysats de protéines de blé. In: Jocelyne Just, Antoine Deschildre, Etienne Beaudouin, Allergies alimentaires Nouveaux concepts, affections actuelles, perspectives thérapeutiques (p. 74-81). Issy-les-Moulineaux, FRA : Elsevier Mason SAS.

Tranquet, O., Gaudin, J.-C., Patil, S., Steinbrecher, J., Matsunaga, K., Teshima, R., Sakai, S., Larre, C., Denery-Papini, S. (2017). A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for in vitro allergenicity assessment of functionalized glutens. PLoS ONE, 12 (11) : e0187415. DOI : 10.1371/journal.pone.0187415

Tranquet, O., Larré, C., Denery-Papini, S. (2020) Allergic reactions to hydrolysed wheat proteins: clinical aspects and molecular structures of the allergens involved. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(1), 147-150. DOI: 10.1080/10408398.2018.1516622

Villemin, C., Tranquet, O., Solé-Jamault, V., Smit, J.J., Pieters, R.H.H., Denery-Papini, S., Bouchaud, G. (2020). Deamidation and enzymatic hydrolysis of gliadins alter their processing by dendritic cells in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68 (5), 1447−1456. DOI : 10.1021/acs.jafc.9b06075

Communications orales en lien direct avec le travail de thèse

Tranquet, O. (2016). *Allergenicity of Acid Hydrolyzed Wheat Proteins: from France to Japan.* XXXth meeting of the Working Group on Prolamin analysis and Toxicity (WGPAT), Valencia, Spain (2016-09-22 - 2016-09-24).

Tranquet, O. (2016). Allergenicity of Acid Hydrolyzed Wheat Proteins: from France to Japan. Presented at Second International Conference - COST improving Allergy Risk Assessment Strategy for new proteins, Varsovie, POL (2016-09-20 - 2016-09-22).

Tranquet, O. (2017). Characterization of mAbs to analyze deamidation of prolamins' repeated domains. XXXIst meeting of the Working Group on Prolamin analysis and Toxicity (WGPAT), Minden, GER (2017-09-28 - 2016-09-30).

Tranquet, O., Solé V., Denery S. (2019). *Effect of the distribution of γ-gliadins epitopes on antibody aggregation and basophil degranulation.* XXXIIIrd meeting of the Working Group on Prolamin analysis and Toxicity (WGPAT), Urbino, Italy (2019-10-10- 2019-10-12).

Posters en lien direct avec le travail de thèse

Tranquet, O., Echasserieau-Laporte, V., Lupi, R., Pietri, M., Larré, C., Denery, S. (2015). *Deamidated Gluten: Specific detection and characterisation*. First International Conference - COST ImPARAS Improving Allergy Risk Assessment Strategy for new food proteins, Belgrade, SRB (2015-11-24 - 2015-11-26).

Tranquet, O., Gaudin, J-C., Lupi, R., , Sakai, S., Matsunaga, K., Teshima, R., Larré, C., Denery, S. (2016). *Allergenicity of acid-hydrolyzed wheat proteins from France to Japan.* Fourth Food Allergy and Anaphylaxis Meeting, Rome, ITA (2016-10-13 - 2016-10-15).

Tranquet, O., Pineau, F., Lupi, R., Pietri, M., Sakai, S., Matsunaga, K., Teshima, R., Larre, C., Denery, S. (2017). *A mouse/human chimeric IgE to assess the allergenicity of Acid –Hydrolyzed Wheat Proteins.* Third ImpARAS Conference, Helsingør, DAN, (2017-10-10 – 2017-10-12).

Tranquet, O., Pineau, F., Lupi, R., Pietri, M., Sakai, S., Matsunaga, K., Teshima, R., Larré, C., Denery, S. (2017). *Intensity of deamidation in the epitopes of acid-Hydrolyzed Wheat Proteins is a key parameter for their allergenicity.* International Symposium on Molecular Allergology (ISMA), Luxembourg, LUX (2017-11-09 - 2017-11-11).

Tranquet, O., Pineau, F., Linxe, L., Larré, C., Brossard, C., Altenbach, S.B., Denery, S. (2019). *Antibodies, IgG or chimeric IgE, directed to IgE-binding epitopes: tools to monitor in vitro antigenicity and eliciting capacity of wheat allergens during food digestion and absorption*. Sixth International Conference on Food Digestion, Granada, SPA (2019-04-02 - 2019-04-04).

Autres Publications

Buffetto, F., Cornuault, V., Rydahl, M. G., Ropartz, D., Alvarado, C., Echasserieau, V., Le Gall, S., Bouchet, B., **Tranquet, O.**, Verhertbruggen, Y., Willats, W. G. T., Knox, J. P., Ralet, M.-C., Guillon, F. (2015). The deconstruction of pectic rhamnogalacturonan i unmasks the occurrence of a novel arabinogalactan oligosaccharide epitope. Plant and Cell Physiology, 56 (11), 2181-2196. DOI : 10.1093/pcp/pcv128

Tranquet, O., Echasserieau-Laporte, V., Bernard, H., Boquien, C., Moyon, T., Drouet, M. (2016). Projet MANOE, Maîtrise Allergène NutritiOn Enfant. Etude de la réactivité de patients allergiques à des faibles doses d'allergènes (blé, œuf, lait, arachide). Détection et quantification des allergènes présents à faibles doses dans des matrices alimentaires complexes. Innovations Agronomiques, 52, 27-35. DOI : 10.15454/1.513583543955866E12

Claude, M., Bouchaud, G., Lupi, R., Castan, L., **Tranquet, O.**, Denery-Papini, S., Bodinier, M., Brossard, C. (2017). How proteins aggregate can reduce allergenicity: Comparison of ovalbumins heated under opposite electrostatic conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65 (18), 3693-3701. DOI : 10.1021/acs.jafc.7b00676

Rydahl, M.G., Kračun, S.K., Fangel, J.U., Michel, G., Guillouzo, A., Génicot, S., Mravec, J., Harholt, J., Wilkens, C., Motawia, M.S., Svensson, B., **Tranquet, O.**, Ralet, M.-C., Jørgensen, B., Domozych, D. S., Willats, W.G.T. (2017). Development of novel monoclonal antibodies against starch and ulvan - implications for antibody production against polysaccharides with limited immunogenicity. Sci Rep 7, 9326. DOI : 10.1038/s41598-017-04307-2

Boulard, C., Thevenin, J., **Tranquet, O.**, Laporte, V., Lepiniec, L., Dubreucq, B. (2018). LEC1 (NF-YB9) directly interacts with LEC2 to control gene expression in seed. Biochimica Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms, 1861 (5), 443-450. DOI : 10.1016/j.bbagrm.2018.03.005

Brossard, C., Rancé, F., Drouet, M., Paty, E., Juchet, A., Guérin, C., Pasco, M., **Tranquet, O.**, Nau, F., Denery, S. (2019). Relative reactivity to egg white and yolk or change upon heating as markers for baked egg tolerance. Pediatric Allergy and Immunology, 30 (2), 225-233. DOI : 10.1111/pai.13009

Lupi, R., Denery-Papini, S., Claude, M., **Tranquet, O.**, Drouet, M., Masci, S., Larre, C. (2019). Thermal treatment reduces gliadin recognition by IgE, but a subsequent digestion and epithelial crossing permits recovery. Food Research International, 118, 22-31. DOI : 10.1016/j.foodres.2018.02.011

Mills, E. C., Adel-Patient, K., Bernard, H., De Loose, M., Gillard, Huet, Larre, C., Nitride, Pilolli, R., **Tranquet, O.**, van Poucke, C., Monaci, L. (2019). Detection and quantification of allergens in foods and

minimum eliciting doses in food-allergic individuals (Thrall). Journal of AOAC International, 102(5), 1346-1353. DOI : 10.5740/jaoacint.19-0063

Di Stasio, L., **Tranquet, O.**, Picariello, G., Ferranti, P., Morisset, M., Denery-Papini, S., Mamone, G. (2020). Comparative analysis of eliciting capacity of raw and roasted peanuts: the role of gastrointestinal digestion. Food Research International, 127, 108758. DOI: 10.1016/j.foodres. 2019.108758

Scherf, K.A., Catassi, C., Chirdo, F., Ciclitira, P.J., Feighery, C., Gianfrani, C., Koning, F., Lundin, K.E.A., Schuppan, D., Smulders, M.J.M., **Tranquet, O.**, Troncone, R., Koehler, P. (2020). Recent progress and recommendations from the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity on celiac disease. Frontiers in Nutrition, 7, 29, 1-14. DOI: 10.3389/fnut.2020.00029

Pilolli, R., Nitride, C., Gillard, N., Huet, A.C., van Poucke, C., de Loose, M., **Tranquet, O.**, Larré, C., Adel-Patient, K., Bernard, H., Mills, E.N.C., Monaci, L. (2020). Critical review on proteotypic peptide marker tracing for six allergenic ingredients in incurred foods by mass spectrometry. Food Research International, 128, 108747. DOI : 10.1016/j.foodres.2019.108747

Table des matières

Remerciements

Liste des publications et communications

Liste des figures

Liste des tableaux

A. INTRODUCTION 17

1. GENERALITES 17

1.1. Les réactions physiologiques indésirables aux aliments 17

1.2. Les allergies alimentaires dépendantes des IgE 18

1.3. Allergies indépendantes des IgE 18

1.4. Prévalence 19

1.4.1 Toutes allergies 19

1.4.2 Allergies alimentaires 19

1.4.3 Allergies à la farine de blé 20

1.5. Facteurs influençant l'allergie 21

1.5.1 Facteurs génétiques 21

1.5.2 Facteurs environnementaux et épigénétiques 22

1.5.2.1. L'hypothèse hygiéniste 22

1.5.2.2. Dysbiose 23

1.5.2.3. Rôle de la peau 25

1.5.2.4. Période d'introduction des aliments 25

1.5.2.5. Synthèse 26

1.6. Manifestations cliniques de l'allergie alimentaire 26

1.6.1 Focus sur l'anaphylaxie 26

1.7. Diagnostic de l'allergie alimentaire 28

1.7.1 Anamnèse 28

1.7.2 Recherche d'IgE spécifiques 28

1.7.3 Test de provocation orale (TPO) 29

1.7.4 Test d'activation des basophiles 29

1.8. Eviction alimentaire et traitement de l'allergie 30

1.8.1 Eviction alimentaire 30

1.8.2 Traitement symptomatique 30

1.8.3 Immunothérapie 30

1.8.4 Prévention primaire (petites doses d'allergène, pré/pro-biotique) 31

1.9. Gestion du risque allergie alimentaire 32

1.9.1 L'information au patient et l'éducation thérapeutique 32

1.9.2 Etiquetage des allergènes alimentaires ... 32
1.9.3 Seuils de réactivité des patients ... 33
1.9.4 Détection des allergènes dans les aliments ... 33
1.9.4.1. Les méthodes ... 33
1.9.4.2. Difficultés liées aux matrices et aux procédés. ... 34
1.9.4.3. La détection du gluten ... 35
1.10. Mécanismes de l'allergie alimentaire ... 35
1.10.1 La réponse Immune aux antigènes ... 35
1.10.1.1. Passage et présentation des antigènes ... 36
1.10.2 Tolérance aux antigènes alimentaires ... 37
1.10.3 Sensibilisation allergique : une rupture de la tolérance ... 38
1.10.3.1. Initiation de la sensibilisation ... 39
Cellules de l'épithélium et de l'immunité innée ... 39
Régime alimentaire ... 39
Rôle de la peau ... 40
Synthèse des mécanismes d'initiation de la sensibilisation ... 40
1.10.3.2. Phase de déclenchement ... 41
1.10.3.3. Amplification de l'inflammation allergique ... 44
1.10.4 Extension du répertoire IgE ... 45
1.11. Modèles d'étude de la phase de dégranulation ... 46
1.11.1 Basophiles de patients ... 46
1.11.2 Basophiles de donneurs ... 47
1.11.3 Lignées cellulaires ... 47
1.12. Les allergènes alimentaires ... 48
1.12.1 Les principaux allergènes alimentaires ... 48
1.12.2 Caractéristiques structurales et fonctionnelles des allergènes alimentaires ... 49
1.12.3 Exemple la superfamille des prolamines ... 50
1.12.4 Procédés de transformation ... 51
1.12.4.1. Traitements thermiques ... 51
1.12.4.2. La fermentation ... 52
1.12.5 La digestion ... 53
2. LES ALLERGIES ALIMENTAIRES AU BLE ... 55
2.1. Les céréales ... 55
2.2. Composition protéique des farines de Triticeae ... 56
2.3. Composition protéique de la farine de blé ... 57
2.3.1 Les prolamines du blé ... 57
2.3.1.1. Le réseau de gluten ... 58
2.3.1.2. Les différents domaines structuraux des prolamines ... 58
Le domaine C-Terminal ... 59
Les domaines répétés ... 60
2.3.1.3. Les ω-gliadines ... 61
Séquence d'une $\omega_{1,2}$-gliadine ... 61

Séquence d'une ω_5-gliadine 62
2.3.2 La fraction albumines/ globulines (focus LTP) 62
2.3.2.1. Les inhibiteurs d'α-amylase et de trypsine (ATI) 63
2.3.2.2. Les nsLTP 64
2.4. Les glutens modifiés 64
2.4.1 Procédés chimiques 64
2.4.2 Procédés enzymatiques 65
2.4.3 Utilisation industrielle 65
2.5. Les pathologies liées à la consommation de la farine de blé autres que l'allergie 66
2.5.1 La maladie cœliaque 67
2.5.2 L'hypersensibilité au blé non cœliaque 68
2.6. Les allergies à la farine de blé 68
2.6.1 Classification des allergies alimentaires au blé 68
2.6.1.1. L'allergie alimentaire à la farine de blé 69
2.6.1.2. Anaphylaxie au blé induite par l'effort 69
2.6.1.3. L'allergie au gluten désamidé 70
2.6.2 Prévalence et évolution naturelle 72
2.6.3 Protocoles d'immunothérapie 72
2.7. Les allergènes de la farine de blé 73
2.7.1 Allergènes et épitopes impliqués dans l'anaphylaxie induite par l'effort. 74
2.7.1.1. Profils de sensibilisations 74
2.7.1.2. Epitopes 75
2.7.1.3. Activité fonctionnelle 77
2.7.2 Allergènes et épitopes impliqués dans l'allergie alimentaire à la farine de blé. 77
2.7.2.1. Profils de sensibilisation 77
2.7.2.2. Activité fonctionnelle 80
Test cutanés 80
Tests de dégranulation de basophiles 80
2.7.2.3. Epitopes 81
2.7.3 Allergènes et épitopes impliqués dans l'allergie au gluten désamidé 82
2.7.3.1. Allergènes 82
2.7.3.2. Epitopes 82
3. LES IGE CHIMERIQUES 85
3.1. Rappels sur la structure des anticorps 85
3.1.1 Domaines constants : différentes classes et sous classes 85
3.1.2 Domaines variables : une très grande diversité 86
3.2. Interaction Anticorps / Antigène 88
3.2.1 Le paratope 88
3.2.2 La relation épitope/paratope 88
3.2.3 Conséquences sur l'identification des épitopes 90
3.3. Les IgE chimériques 91

3.3.1 Les IgE chimériques en thérapeutique 91
3.3.2 Les IgE chimérique en allergologie moléculaire 92
4. DONNEES ACTUELLES SUR L'ORGANISATION STRUCTURALE DES EPITOPES ET LE DECLENCHEMENT DES SYMPTOMES ALLERGIQUES 95
4.1. Paramètres/caractéristiques intrinsèques du basophile 95
4.2. Paramètres/caractéristiques liés l'interaction allergène – IgE 97
4.2.1 Effet de l'organisation spatiale des épitopes sur la dégranulation 97
4.2.1.1. Effet de la distance entre 2 épitopes sur la dégranulation 98
4.2.1.2. Effet du nombre d'épitopes sur la dégranulation 99
4.2.2 Effet de l'affinité des IgE sur la dégranulation 100
4.3. Implication sur le répertoire IgE 101
B. OBJECTIFS ET DEMARCHE 103
C. RESULTATS 107
1. PREMIER ARTICLE : PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX MURINS SPECIFIQUES DU GLUTEN DESAMIDE ET DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DETECTION DANS LES ALIMENTS 107
2. PROCEEDING DU WGPAT 2017: COMPLEMENTARITE DE 3 ANTICORPS MONOCLONAUX POUR EVALUER LE DEGRE DE DESAMIDATION DES PROTEINES DU GLUTEN 117
3. DEUXIEME ARTICLE : IGE CHIMERIQUE RECOMBINANTE MIMANT LA REACTIVITE DES IGE DE PATIENTS ALLERGIQUES AU GLUTEN DESAMIDE 127
4. TROISIEME ARTICLE : IMPACT DU NOMBRE ET DE L'ESPACEMENT DES EPITOPES SUR LA DEGRANULATION DES BASOPHILES 153
5. PRODUCTION D'UNE IGE CHIMERIQUE SOURIS/HOMME SPECIFIQUE DES ω_5-GLIADINES POUR MIMER LES IGE DE PATIENTS SOUFFRANT D'ANAPHYLAXIE AU BLE INDUITE PAR L'EFFORT 191
5.1. Anticorps monoclonaux dirigés contre les ω5-gliadines 192
5.2. Spécificité des IgE de patients souffrant d'anaphylaxie au blé induite par l'effort 194
5.3. Sélection d'anticorps anti 5-gliadines mimant la réactivité des patients 197
5.4. Caractérisation des AcMx mimant la réactivité IgE des patients 199
5.5. Production d'IgE chimériques souris/homme spécifiques des ω5-gliadines 200
5.6. Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps chIgE-WO5 202
5.7. Identification des isoformes d'w_5-gliadines et des suG-FPM reconnues par l'AcM 13E5 et déduction des épitopes linéaires les plus probables 205
5.8. Activité fonctionnelle de chimérique IgE-WO5 206
5.9. Exemple d'application du chIgE WO5 : évaluation de l'effet du chauffage et de la digestion sur l'allergénicité des ω_5-gliadines 208
5.10. Conclusion 209
D. DISCUSSION 212
1. LES IGE CHIMERIQUES 213
1.1. Stratégies d'obtention 213

1.2. Les IgE chimériques dirigées contre des allergènes du blé *214*
2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET ANTIGENICITE DES ALLERGENES DU BLE 216
2.1. Caractérisation des glutens désamidés *216*
2.1.1 Une antigénicité particulière 216
2.1.2 Une distribution et une variabilité des épitopes désamidés complexes 217
2.2. Antigénicité des ω5-gliadines *217*
3. POTENTIEL DES ALLERGENES DU BLE A INDUIRE LA DEGRANULATION DES BASOPHILES 218
4. COMPREHENSION DU REPERTOIRE IGE DES PATIENTS 219
4.1. Répertoire IgE dans l'anaphylaxie induite par l'effort *220*
4.2. Répertoire IgE dans l'allergie au gluten désamidé *221*
4.2.1 Hypothèses concernant les mécanismes de sensibilisation – comparaison des cas français et japonais . 221
5. GERER LE RISQUE D'ALLERGIES AU GLUTEN DESAMIDE 222
E. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 226
F. BIBLIOGRAPHIE 230

Liste des abréviations

AA : acide aminé

Ac : anticorps

Ag : Antigène

AIE : anaphylaxie induite par l'effort

APC : Cellule présentatrice d'antigène

ATI : inhibiteurs d'α-amylases et de trypsine

CDR : Complementary-determining region

DNP : dinitrophenol

ED : Eliciting dose

Fc : Fragment c des immunoglobulines

FcεR : Récepteur au IgE

HPB : Hydrolysat de protéines de blé

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

LTP : Protéine de transfert de lipides

nsLTP : Protéine de transfert de lipides non spécifique

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

SDS : Sodium dodecyl sulfate

suG : sous-unité de gluténine

TAB : test d'activation des basophiles

T_H : Lymphocyte T auxiliaire

T_{REG} : Lymphocyte T régulateur

Liste des Figures

Figure 1 : Classification des réactions indésirables aux aliments (Boyce, 2010) 17

Figure 2 : facteurs de risque ou facteurs protecteurs pour le développement d'allergie dans la petite enfance (Lambrecht & Hammad, 2017) 23

Figure 3 : Facteurs liés au microbiote influençant le risque d'allergie dans la petite enfance (Aitoro *et al.*, 2017) 24

Figure 4 : manifestations cliniques de l'anaphylaxie (https://commons.wikimedia.org) 27

Figure 5 : présentation schématique d'un protocole d'immunothérapie alimentaire ((Burks, Sampson, Plaut, Lack, & Akdis, 2018) 31

Figure 6 : Impact des procédés sur la détection immunochimique 34

Figure 7: Schéma acquisition de tolérance intestin et cellules immunitaires (Yu *et al.*, 2016) 38

Figure 8 : mécanismes de la sensibilisation allergique (Yu *et al.*, 2016) 40

Figure 9 : Activation du récepteur de haute affinité aux IgE (Daëron, 2014) 41

Figure 10 : effet de l'activation des mastocytes et des basophiles (Blank & Vitte, 2015) 42

Figure 11 : récepteurs activateurs (+) ou inhibiteurs (-) aux IgE et aux IgG exprimés par les basophiles et les mastocytes murins (en haut) ou humains (en bas). Adapté de (Jönsson & Daëron, 2012). 43

Figure 12 : phase de dégranulation (Galli & Tsai, 2012) 44

Figure 13 : production IgE et extension du répertoire (Galli & Tsai, 2012) 45

Figure 14 : Analyse d'une courbe de dégranulation dose réponse (Hoffmann *et al.*, 2015) 46

Figure 15 : représentation schématique des ponts disulfures formés entre les cystéines conservées dans la superfamille des prolamines (Mills *et al.*, 2004) 51

Figure 16 : principaux changements induits par la température sur la structure des protéines (Vanga, Singh, & Raghavan, 2017) 52

Figure 17 : Phylogénie des céréales de la famille des *Poaceae* (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2008) 55

Figure 18 : Classification des protéines du gluten de blé (A S Tatham & Shewry, 2008) 57

Figure 19 : Séparation par électrophorèse 2D des différents groupes de prolamines à partir d'un extrait protéique de farine de blé (cv Butte 86), LMW-GS = suG FPM et HMW-GS = suG HPM (Vensel *et al.*, 2014) 58

Figure 20 : représentation schématique des domaines structuraux des prolamines (Delcour *et al.*, 2012) 59

Figure 21 : Séquence d'une γ-gliadine (UniProtKB-P08453) 60

Figure 22 : Séquence d'une $\omega_{1,2}$-gliadine (UniProtKB-Q9FUW7) 61

Figure 23 : Séquence d'une ω_5-gliadine (UniProtKB-Q402I5) 62

Figure 24 : Pathologies associées à la consommation de blé 66

Figure 25 : Classification des allergies provoquées par la farine de blé 68

Figure 26 : Domaines structuraux d'une Immunoglobuline 85

Figure 27 : Commutation isotypique par recombinaison et délétion des locus codants pour les domaines constants des immunoglobulines humaines (Geha, Jabara, & Brodeur, 2003). 87

Figure 28 : structuration et diversité des séquences hypervariables des domaines variables des anticorps d'après figure 3-7 dans Immunobiologie 6ème Ed. © Garland science 2005 88

Figure 29 : relation liant paratope épitope 89

Figure 30 : Structure des anticorps chimériques et humanisés 91

Figure 31 : La courbe en cloche reliant l'intensité de dégranulation à la concentration en allergène est la résultante des signaux activateurs et inhibiteurs de la dégranulation (Huber, 2013) 96

Figure 32 : Structure formées par des IgE et des homodimères de leur épitope 97

Figure 33 : Dégranulation de basophiles avec 1, 2 ou 3 IgE monoclonales (clones E, H10 et H12) dirigées contre des épitopes distincts de Der p 2 (L. H. Christensen *et al.*, 2008) 100

Figure 34 : hypothèse de distribution des acides glutamiques et des glutamines dans les domaines répétés des gliadines après une désamidation induite par un chauffage en condition acide 117

Figure 35 : Spécificité des AcMx 6B3 (B), 13E5 (C) et 5E11 par immunoempreinte sur des fractions purifiées d'α- , de γ-, d'ω2- et d'ω5-gliadines et des suG-FPM et suG-HPM séparées par SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide (A). 199

Figure 36 : Contrôle de l'expression des chaines lourdes et légères de chIgE-WO5 (A) et contrôle de la reconnaissance des ω5-gliadines par ChIgE-WO5 (B) et chIgE-6B3 (C) en ELISA indirect. SN, surnageant de culture cellulaire. 201

Figure 37 : Spécificité de chIgE-WO5 vis-à-vis des différentes fractions du gluten 202

Figure 38 : Immunoempreintes de chIgE-WO5 sur des membranes de peptides couvrant les séquences (PEPSCAN) d'une γ-gliadine, d'une ω2-gliadine, d'une ω5-gliadine et d'une suG-FPM. 203

Figure 39 : Séquence LOGO issue de l'analyse MEME discriminant l'ensemble des séquences reconnues par chIgE-WO5, de celles qui ne le sont pas 203

Figure 40 : immunoempreinte de l'AcM O13E5 sur le protéome de la farine de blé (cv. Keumkang) séparé en électrophorèse 2D 205

Figure 41 : Dégranulation de basophiles de rat humanisés avec le récepteur aux IgE humaines (lignée SX38) sensibilisés avec un pool de patients humains ou avec ChIgE-WO5 et activés avec des ω5-gliadines Pour chaque condition, les valeurs d'EC50% (sensibilité) et le maximum de dégranulation (réactivité) sont déterminées avec PRISM5 (GraphPad) et reportées dans le tableau. 206

Figure 42 : Dégranulation de basophiles de rat humanisés avec le récepteur aux IgE humaines (lignée SX38) sensibilisés avec ChIgE-WO5 et activés avec des α-, des γ-, des ω2- et des ω5-gliadines et des suG-FPM et HPM. Pour chaque condition, les valeurs d'EC50% (sensibilité) et le maximum de dégranulation (réactivité) sont déterminées avec PRISM5 (GraphPad) et reportées dans le tableau. 208

Figure 43 : Dégranulation de basophiles de rat humanisés avec le récepteur aux IgE humaines (lignée SX38) sensibilisés avec ChIgE-WO5 et activés avec des ω5-gliadines, une fraction de gliadines totales, une fraction de gliadines totales digérée à la pepsine ou une fraction de gliadines totales chauffées puis digérée à la pepsine. 209

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principales familles d'allergènes alimentaires d'origine animale..... 49

Tableau 2 : Principales superfamilles et familles d'allergènes alimentaires d'origine végétale..... 49

Tableau 3 : Séquences caractéristiques des domaines répétés des prolamines de blé (Koehler et al., 2014)..... 60

Tableau 4 : Principales familles de protéines de la fraction albumine globulines. Leur proportion ont été déterminée par (Vensel *et al.*, 2014). 63

Tableau 5 : Liste des allergène du blé référencés par l'OMS/IUIS (http://allergen.org/). Les allergènes explicitement associés à une allergie alimentaire sont mis en gras. 74

Tableau 6 : Epitopes reconnus par les IgE de patients souffrant d'AIE..... 76

Tableau 7 : Profil de sensibilisation de patients allergiques à la farine de blé 78

Tableau 8 : Principales caractéristiques des immunoglobulines humaines..... 86

INTRODUCTION

1. Généralités

1.1. Les réactions physiologiques indésirables aux aliments

Les réactions indésirables aux aliments peuvent avoir des causes multiples (Figure 1). Ces réactions peuvent être classées selon qu'elles impliquent ou non, le système immunitaire. Les réactions non immunologiques peuvent être de nature toxique et concerner l'ensemble de la population ou être liées à des déficits métaboliques ou enzymatiques et toucher des populations spécifiques (comme l'intolérance au lactose). Il est à noter que certaines de ces réactions non-immunologiques, comme la réaction aux sulfites, peuvent déclencher des réactions qui ressemblent à celles d'ordre immunologique, et rendent parfois difficile le diagnostic (Boyce, 2010).

Les réactions impliquant le système immunitaire sont classées en fonction des mécanismes mis en œuvre. Ainsi se distinguent les réactions qui font intervenir des IgE, celles faisant intervenir uniquement une réponse cellulaire, et celles faisant intervenir un mélange des deux.

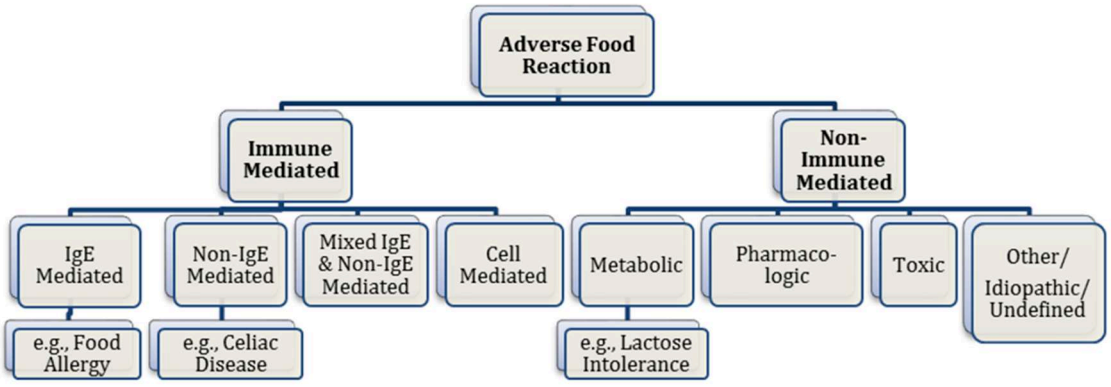


Figure 1 : Classification des réactions indésirables aux aliments (Boyce, 2010)

Les allergies alimentaires résultent de 3 types de mécanismes selon la classification donnée par Boyce: celles qui sont dépendantes des IgE, celles qui ont à la fois une médiation dépendante et indépendante des IgE (mixte) et celles qui ont une médiation cellulaire (Yu, Freeland, & Nadeau, 2016).

1.2. Les allergies alimentaires dépendantes des IgE

Le terme « allergie » a été proposé pour la première fois en 1906 par Clemens von Pirquet comme désignant une « réaction de l'organisme spécifiquement altérée ». Aujourd'hui l'allergie est définie comme une hypersensibilité immunologique consécutive au contact avec une substance, l'allergène, normalement tolérée. Une allergie résulte donc de la non acquisition ou de la rupture d'une tolérance de l'organisme. Les allergies alimentaires sont ainsi des réactions anormales et spécifiques vis-à-vis d'un aliment donné.

Les réactions dépendantes des IgE sont les plus fréquentes et/ou les mieux diagnostiquées par rapport aux autres allergies. Elles sont caractérisées par l'apparition de symptômes rapidement après l'exposition, généralement entre quelques minutes et les 2 heures suivant l'ingestion (Burks *et al.*, 2012). Les symptômes peuvent être variés, toucher différents organes, parfois simultanément, comme la peau, le tractus gastro-intestinal et/ou les voies respiratoires. Ces symptômes peuvent être légers ou sévères et parfois même menacer la vie du patient.

Aujourd'hui, le terme atopie est fréquemment utilisé par la plupart de médecins et des scientifiques comme synonyme d'allergie dépendante des IgE (S. G. O. Johansson *et al.*, 2008) mais quelques pédiatres et dermatologues considèrent également l'atopie comme une prédisposition génétique (S. G. O. Johansson *et al.*, 2008).

1.3. Allergies indépendantes des IgE

Il a été récemment montré que chez les enfants de moins de 2 ans 50 % des allergies alimentaires sont indépendantes des IgE (Adel-Patient, 2016) ; les symptômes apparaissant généralement entre 2 et 4 heures après l'ingestion. Ces allergies sont bien moins caractérisés que les allergies IgE dépendantes et relèvent du syndrome d'entérocolite induite par les protéines alimentaires ; ou d'œsophagite à éosinophiles et moins fréquemment d'entéro- et recto-colites et d'entéropathies induites par les protéines alimentaires (Adel-Patient, 2016).

1.4. Prévalence

1.4.1 Toutes allergies

La prévalence des allergies a notablement augmenté ces 20-30 dernières années dans les pays industrialisés. Dans les pays en développement qui adoptent un mode de vie plus " occidentalisé ", des rapports récents montrent une augmentation des maladies allergiques non alimentaires telles que l'asthme (S. Prescott & Allen, 2011). Les allergies affectent de 20 à 25 % de la population mondiale, ce qui les classe au 4-5ème rang des maladies chroniques pour l'OMS. Dans les pays industrialisés, la prévalence de la dermatite atopique est évaluée à 15-20%, celle de l'asthme à 7-10%, celles de la rhinite et de la conjonctivite allergiques autour de 15-20% (https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/allergies).

1.4.2 Allergies alimentaires

De nombreux auteurs estiment que les allergies alimentaires sont également en forte augmentation ces deux ou trois dernières décennies. Elles toucheraient jusqu'à 10 % de la population des régions industrialisées et occidentalisées (Nicholas J Osborne *et al.*, 2011). Elles sont plus fréquentes chez les enfants que chez les adultes et une liste plutôt courte d'aliments explique la plupart des réactions les plus fréquentes et les plus sévères : arachide, noix, poisson, mollusque, œuf, lait, blé, soya et graines (Sicherer & Sampson, 2018).

Cependant l'augmentation de la prévalence des allergies alimentaires reste aujourd'hui discutée car la plupart des études comportent de nombreux biais (Savage & Johns, 2015). En effet, l'estimation de la prévalence des allergies alimentaires est délicate. Ainsi, l'absence de registres précis dans de nombreux pays (S. L. Prescott *et al.*, 2013) et les biais de recrutement en milieu hospitalier, rendent les études difficilement comparables ou suffisantes pour déterminer une prévalence des allergies alimentaires à l'échelle de la population (Tang & Mullins, 2017). De plus, le coût et les risques associés à un test de provocation orale, seule méthode établissant un diagnostic certain, limitent le nombre d'études exhaustives réalisées (Tang & Mullins, 2017). A ces difficultés méthodologiques s'ajoutent les faits que : 1/ la prévalence des allergies alimentaires varie fortement en fonction de l'âge et 2/ certaines allergies alimentaires ont un taux élevé de résolution dans l'enfance (autour de 50 % pour le lait, l'œuf, le blé ou le soja) alors que d'autres sont davantage persistantes (arachide, noix, graines, poissons, crustacées) (Savage, Sicherer, & Wood, 2016). Le suivi de 1456 enfants nés sur l'île de Wight entre le janvier 1989 et février 1990, de la naissance jusqu'à leur 18 ans, a clairement mis en évidence ces évolutions de prévalences en fonction de l'âge et des différents allergènes considérés (D. Venkataraman *et al.*, 2018). Il convient donc de sérier la population par classe d'âge et de distinguer les allergènes pour comparer les prévalences.

Une étude australienne à la méthodologie robuste, portant sur 2848 enfants consultant pour une vaccination obligatoire, indique que plus de 10% des enfants souffrent d'allergies alimentaires à l'âge de 12 mois (Nicholas J Osborne *et al.*, 2011). Ce résultat concorde avec ceux décrits dans d'autres études qui concluent que les allergies alimentaires affectent de 3 à 10 % des enfants et de 1 à 4 % des adultes (Cianferoni & Spergel, 2009; Longo, Berti, Burks, Krauss, & Barbi, 2013; S. L. Prescott *et al.*, 2013; Sicherer & Sampson, 2010; Tsai *et al.*, 2009).

Dans une analyse systématique des études portant sur des patients européens suivie d'une méta-analyse des articles les plus fiables, Nwaru *et al.* déterminent que la prévalence des allergies alimentaires est de 10% si l'on considère la présence d'IgE spécifiques d'au moins 1 aliment, de 2,7 % sur la base d'un test cutané positif et de 0.9% en considérant un test de provocation orale positif (Nwaru *et al.*, 2014). Les auteurs indiquent que cette prévalence est sans doute une sous-estimation de la réalité en raison de la rigueur de leur méthodologie de sélection et d'analyse. De plus cette prévalence globale pour toute l'Europe masque des disparités géographiques : les pays de l'ouest et du nord de l'Europe seraient davantage affectés que les pays du sud et de l'est.

Si les données de prévalence restent encore sujettes à discussion, il apparait plus clairement que le nombre d'hospitalisations dues à une réaction allergique sévère est en augmentation. Par exemple, aux Etats-Unis, l'incidence des hospitalisations d'enfants de moins de 18 ans liées à une réaction anaphylactique est passée de 0.6 à 1.3 % entre 2000 et 2009 (Rudders, Arias, & Camargo, 2014). Cette augmentation peut refléter une augmentation de la prévalence des allergies alimentaires mais aussi une augmentation de la sévérité des réactions qui nécessite alors une hospitalisation (Longo *et al.*, 2013).

1.4.3 Allergies à la farine de blé

Le blé est l'un des 5 aliments les plus communs qui provoquent des réactions allergiques chez l'enfant (Czaja-Bulsa & Bulsa, 2017). En Allemagne, au Japon et en Finlande, il a été décrit comme le troisième allergène le plus fréquent, après le lait et l'œuf (Longo *et al.*, 2013). La prévalence de l'allergie au blé, tant chez les enfants que chez les adultes, est inférieure à 1 % (Nwaru *et al.*, 2014; Östblom, Lilja, Pershagen, van Hage, & Wickman, 2008; Zuidmeer *et al.*, 2008).

La farine de blé est également une cause fréquente d'allergie respiratoire professionnelle. Communément nommée Asthme du boulanger, cette allergie provoque également des rhinites allergiques annonciatrices d'un asthme à venir si l'exposition se poursuit. En France, entre 1996 et 1999, environ 5 à 10 % des professionnels manipulant de la farine souffraient d'asthme et 15-20 % de rhinite. Cela constituait la première cause de maladies professionnelles (Ameille *et al.*, 2003). L'exposition aux grains et à la farine de blé était rapportée en 2000 et 2004 comme étant la deuxième

cause de maladie professionnelles au Royaume Uni et en Norvège respectivement (Quirce & Diaz-Perales, 2013; Salcedo, Quirce, & Diaz-Perales, 2011).

1.5. Facteurs influençant l'allergie

L'étiologie de l'allergie alimentaire est complexe et en grande partie inconnue. Une étude américaine portant sur 581 familles américaines a démontré que la survenue d'allergies alimentaires dans une famille étaient à la fois d'ordre génétique et environnemental (Tsai *et al.*, 2009). Aujourd'hui un consensus établit que les allergies alimentaires sont influencées par des facteurs environnementaux pré- et post-nataux liés au mode de vie, à l'alimentation et aux autres expositions, par des facteurs génétiques et par l'interaction génome-environnement, en incluant des effets épigénétiques (Carter & Frischmeyer-Guerrerio, 2018; Sicherer & Sampson, 2018).

Plusieurs études ont examiné si l'allergie alimentaire chez un enfant donné présageait un risque accru pour ses frères et sœurs, ou si elle était associée à une atopie chez d'autres membres de la famille. Par exemple, dans la vaste étude HealthNuts menée en Australie (N. J. Osborne *et al.*, 2010), les chercheurs ont d'abord mesuré la prévalence globale de l'allergie alimentaire orale confirmée par un test de provocation, puis examiné les associations entre l'allergie alimentaire chez les nourrissons et les antécédents familiaux de maladie allergique (J. Koplin *et al.*, 2013). Fait intéressant, les enfants qui répondaient à la définition actuelle de " risque élevé " de maladie allergique (un membre de la famille immédiate ayant des antécédents de maladie allergique) ne présentaient qu'une augmentation modeste du risque de développer une allergie alimentaire, tandis que le fait d'avoir deux membres allergiques ou plus dans la famille permettait de mieux prévoir les allergies alimentaires.

1.5.1 Facteurs génétiques

L'héritabilité de l'allergie a été clairement mise en évidence en suivant 58 paires de jumeaux, qui partageaient le même environnement : 64,3% de jumeaux monozygotes partageaient une allergie à l'arachide contre 6,8 % des jumeaux hétérozygotes (Sicherer *et al.*, 2000). Par ailleurs, huit maladies génétiques monogéniques ont été associées à un risque accru de développer une atopie ou une allergie alimentaire. Toutes affectaient directement des voies de modulations de la réponse immunitaire et l'une d'entre elles modifiait également la structuration de l'épiderme. Cependant la rareté de ces maladies génétiques ne permet pas d'expliquer l'héritabilité de la plupart des cas d'allergies alimentaires (Carter & Frischmeyer-Guerrerio, 2018). Plus fréquentes, des mutations fonctionnelles de la filaggrine, protéine impliquée dans fonction barrière de la peau, ont été suggérées comme augmentant le risque de développer une allergie alimentaire. Ce lien a été clairement démontré dans une étude portant sur allergie à l'arachide (Brown *et al.*, 2011). Cette observation n'a

cependant pas été confirmée avec d'autres allergènes alimentaires (E. K. Johansson *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2012).

1.5.2 Facteurs environnementaux et épigénétiques

Le fait que les allergies soient plus fréquentes dans les pays occidentaux indépendamment de l'origine ethnique de ses habitants suggère que le mode de vie occidental favorise leur apparition (D. Strachan *et al.*, 1997). De fait, le mode vie occidental est associé à une moins grande activité physique, une utilisation importante d'antibiotiques, une alimentation plus riche, notamment en graisses, et plus pauvre en fibres. Plusieurs hypothèses sont aujourd'hui posées pour soutenir ce constat.

1.5.2.1. L'hypothèse hygiéniste

Cette hypothèse est suggérée dès 1976 par Gerrard *et al.* qui observent une plus grande fréquence des maladies allergiques dans une communauté blanche que dans une communauté métisse d'une région du Canada (Saskatchewan). Ils suggèrent alors que la diminution des infections dans la communauté blanche par rapport à la population métisse augmenterait la fréquence des allergies (Gerrard, Geddes, Reggin, Gerrard, & Horne, 1976). Cette hypothèse est plus clairement posée en 1989 lorsque Strachan *et al.* rapportent que les enfants qui grandissent dans des familles nombreuses au Royaume-Uni présentent un risque moindre de rhume des foins et d'eczéma que les enfants de petites familles (D. P. Strachan, 1989). Il propose alors que les maladies allergiques étaient prévenues par les infections transmises au cours de la petite enfance ou acquises par la mère durant sa grossesse au contact des enfants plus âgés. L'hypothèse hygiéniste sous-tend qu'une trop faible stimulation par des infections ne permet pas un développement et une orientation appropriés du système immunitaire.

Depuis, plusieurs études ont étoffé cette hypothèse en mettant en évidence que l'enfance en milieu rural, la consommation de lait non pasteurisé, l'augmentation de la taille de la famille, l'exposition maternelle prénatale et celle des enfants aux animaux domestiques, sont associées à une protection contre les troubles atopiques (Ho & Bunyavanich, 2018). Dans une cohorte australienne de 5276 enfants, le fait d'avoir des frères ou sœurs ou un chien a été associé à un risque réduit d'avoir une allergie à l'œuf à l'âge de 1 an (J. J. Koplin *et al.*, 2012).

Ces observations suggèrent que des expositions différentes aux microorganismes pendant la petite enfance prédisposent différemment aux allergies. Inversement, les expositions prénatales ou précoces aux antibiotiques sont en corrélation avec un risque accru de développer des troubles atopiques (Ho & Bunyavanich, 2018).

Depuis sa première énonciation, l'hypothèse hygiéniste s'est affinée et des mécanismes ont été suggérés. B.N. Lambrecht et H. Hammad proposent ainsi que des facteurs environnementaux, des

signaux de danger et des métabolites d'origine microbienne influent sur le phénotype des cellules épithéliales qui agiraient alors comme rhéostats importants pour l'immunorégulation, en particulier au début du développement postnatal (Figure 2) (Lambrecht & Hammad, 2017).

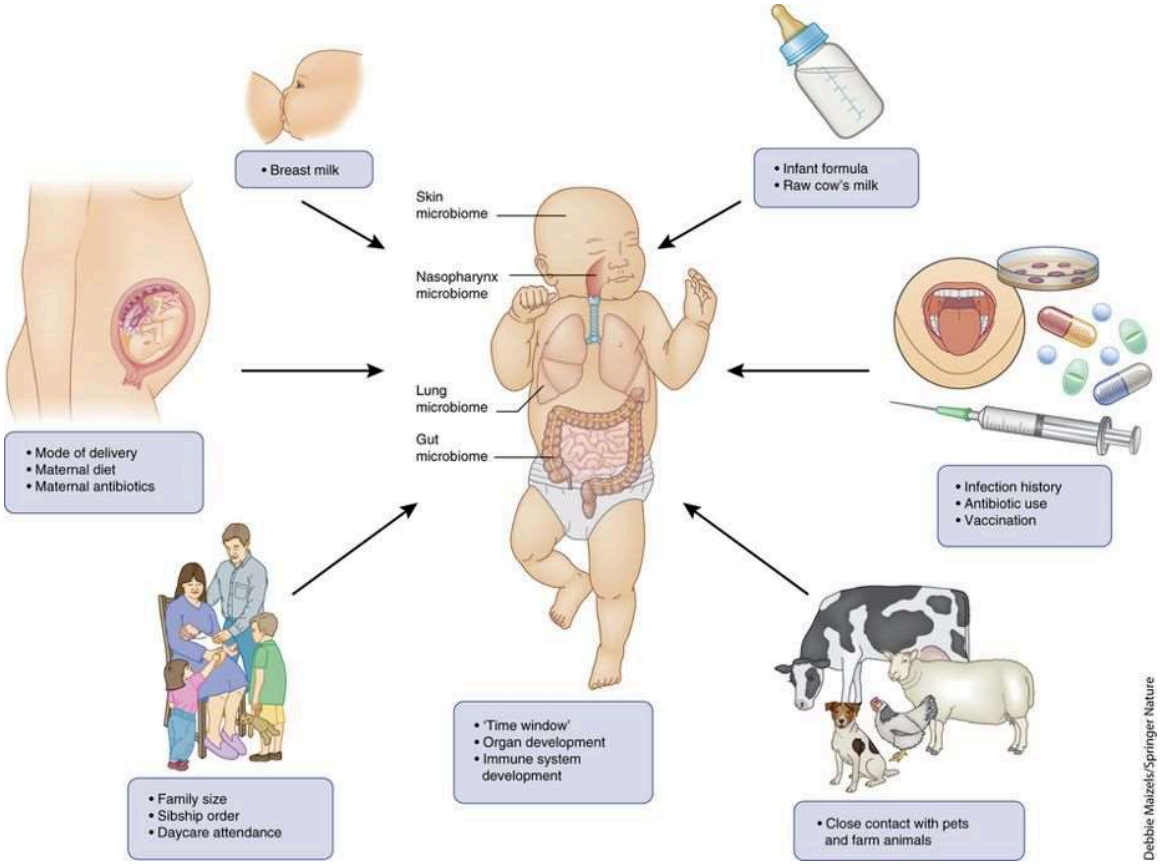


Figure 2 : facteurs de risque ou facteurs protecteurs pour le développement d'allergie dans la petite enfance (Lambrecht & Hammad, 2017)

1.5.2.2. Dysbiose

En lien ou non avec l'hypothèse hygiéniste, l'implication du microbiote dans le développement des allergies alimentaires a émergé depuis les années 2000 grâce au progrès des méthodes d'identification des micro-organismes. Le microbiote se définit comme une communauté complexe de bactéries, archéobactéries, de champignons, de virus et de protozoaires (Thursby & Juge, 2017). On estime qu'un individu héberge 10^{12} microorganismes, le tube digestif étant le plus grand réservoir devant les poumons et la peau (McCoy, Ignacio, & Geuking, 2018). Le microbiote colonise progressivement l'organisme dans les premières années de vie et se révèle relativement stable à l'âge adulte (McCoy *et al.*, 2018). La dysbiose, c'est-à-dire une réduction de la diversité microbienne et des changements notables dans la proportions de certains consortiums bactériens, est associée à plusieurs maladies chroniques auto-immunes ou inflammatoires (Belkaid & Hand, 2014). Ainsi il est maintenant

clairement établi que le microbiote joue un rôle critique dans le façonnage et le maintien des fonctions barrière et immunitaire de la muqueuse intestinale (Hooper, Littman, & Macpherson, 2012).

Des études épidémiologiques ont suggéré que le microbiote pourrait jouer un rôle dans l'allergie alimentaire en établissant un lien entre les facteurs environnementaux et le risque d'atopie (figure 3). Dans une cohorte norvégienne de 2803 enfants, avoir une mère atopique et être né par césarienne augmentent d'un facteur 4 le risque d'avoir une allergie à l'œuf à l'âge de 2 ans et demi (Eggesbo *et al.*, 2005). La naissance par césarienne a pour effet de réduire la diversité microbienne chez le nourrisson et retarde l'implantation de bactéries du genre *Bacteroides*. Une méta-analyse portant sur 26 études révèle que la naissance par césarienne augmente le risque de rhinite, d'asthme et peut être celui de développer une allergie alimentaire (Bager, Wohlfahrt, & Westergaard, 2008).

Considérées dans leur ensemble, ces observations ont donné lieu à l'hypothèse que la prévalence accrue de l'allergie alimentaire pourrait être due à des changements dans l'exposition microbienne au début de la vie (Figure 3). Ces changements (1) affectent la composition du microbiote hôte, (2) modifient le développement immunitaire de l'hôte et (3) entraînent des réactions immunitaires pathologiques aux allergènes alimentaires (Ho & Bunyavanich, 2018).



Figure 3 : Facteurs liés au microbiote influençant le risque d'allergie dans la petite enfance (Aitoro *et al.*, 2017)

1.5.2.3. Rôle de la peau

Le fait que certaines réactions allergiques aux aliments se produisent parfois dès la première ingestion connue suggère que d'autres voies d'exposition aux allergènes seraient impliquées dans l'allergie alimentaire. Par ailleurs plusieurs études ont mis en évidence un lien entre des altérations de la fonction barrière de la peau et l'augmentation du risque de développer une allergie alimentaire. Dès les années 80-90, un lien est établi entre la dermatite atopique et la survenue d'allergies alimentaires (Borkowski, Eigenmann, Sicherer, Cohen, & Sampson, 1998; Sampson, 1985). Récemment, en suivant une cohorte de 4453 enfants australiens âgés d'un an, Martin *et al.* ont montré qu'un nourrisson sur 5 soufrant d'eczéma développera une allergie alimentaire contre 1 sur 25 pour ceux sans eczéma (Martin *et al*., 2015). Ce lien avec la perméabilité a été conforté par Kelleher *et al.* qui ont observé qu'une augmentation de la perméabilité cutanée du nouveau-né augmente le risque de développer une allergie alimentaires avant l'âge de 2 ans sans association systématique avec une dermatite atopique (Kelleher *et al.*, 2016). Le développement d'une allergie alimentaire via une sensibilisation cutanée a également été démontré chez l'adulte. Au japon, plus de 2000 adultes ont développé une allergie alimentaire au gluten après avoir utilisé un savon contenant du gluten modifié. Là encore, on peut faire l'hypothèse que la présence de détergent susceptible d'accroitre la perméabilité cutanée a joué un rôle dans ces sensibilisations (Adachi, Nakamura, Sakai, Fukutomi, & Teshima, 2012; Chinuki & Morita, 2012). Enfin, des mutations fonctionnelles de la filaggrine, une protéine de barrière épithéliale cutanée, confèrent un risque accru de développer une allergie alimentaire persistante (Devasmitha Venkataraman *et al.*, 2014).

Ces observations et le fait que le tube digestif soit considéré comme une voie d'acquisition de tolérance (Chinthrajah, Hernandez, Boyd, Galli, & Nadeau, 2016), ont conduit à l'hypothèse qu'une altération de la barrière cutanée pourrait faciliter une sensibilisation aux antigènes alimentaires et mener au développement d'allergies alimentaires (Oyoshi, Oettgen, Chatila, Geha, & Bryce, 2014).

1.5.2.4. Période d'introduction des aliments

Face à la recrudescence des allergie alimentaires, à partir des années 90, il a été recommandé de retarder l'introduction des aliments potentiellement allergéniques au moment de la diversification alimentaire du nourrisson (Perkin *et al.*, 2016). Ces recommandations n'ont pas enrayé cette augmentation et ont été abandonnées en 2008 (Palmer, Sullivan, Gold, Prescott, & Makrides, 2017). Certains auteurs suggèrent même que cette éviction pourrait avoir contribué à l'augmentation des allergies alimentaires (Jennifer J. Koplin *et al.*, 2010). Les études conduites par G. Du Toit *et al.* a même renversé ce postulat en montrant que l'introduction précoce d'arachide était un facteur de protection (Du Toit *et al.*, 2008, 2015). Plusieurs études observationnelles ont ensuite suggéré que l'introduction précoce des aliments chez des enfants à risque limiterait le développement d'allergies alimentaires à

l'œuf, au lait, à l'arachide, au sésame, au poisson et au blé (Du Toit *et al.*, 2015; Katz *et al.*, 2010; Jennifer J. Koplin *et al.*, 2010). Le bénéfice de l'introduction précoce pour les enfants ne présentant pas de facteurs de risque à développer une allergie, reste cependant débattu (Palmer *et al.*, 2017; Perkin *et al.*, 2016).

1.5.2.5. Synthèse

Individuellement, aucun des facteurs mis en évidence ne suffit à expliquer la recrudescence des allergies alimentaires. L'association de ces différents facteurs est sans doute nécessaire. Les études se sont focalisées sur le développement des allergies dans la petite enfance. L'apparition d'une allergie alimentaire chez l'adulte a sans doute certaines spécificités mais elles restent largement méconnues.

1.6. Manifestations cliniques de l'allergie alimentaire

Les allergies alimentaires IgE médiées se révèlent par différentes manifestations cliniques qui varient selon les patients, leur état physiologique, la présence de cofacteurs et la quantité d'allergène. Les symptômes, qui apparaissent de quelques minutes à quelques heures après l'exposition, peuvent être modérés ou sévères et même parfois engager le pronostic vital. Différents organes peuvent être affectés : la peau (urticaire, angio-œdème), tractus oro-gastro-intestinal (gonflement des lèvres, douleurs abdominales, vomissements, diarrhées, œdème) et les voies respiratoires (toux, dyspnée, œdème, asthme) et plus rarement les systèmes cardio-vasculaire et nerveux (M. Kulis, Wright, Jones, & Burks, 2015). La sévérité des symptômes peut varier chez le même patient : survenue d'anaphylaxie alors que les symptômes étaient jusque-là modérés. Ces manifestations apparaissent rapidement, de quelques minutes à quelques heures après l'exposition. Les manifestations à distance du tractus oro-gastro-intestinal traduisent une diffusion systémique rapide de l'allergène ingéré et/ou des molécules et cellules responsables des symptômes.

1.6.1 Focus sur l'anaphylaxie

L'anaphylaxie se définit comme une réaction allergique aigüe, potentiellement fatale, affectant plusieurs organes (Panesar *et al.*, 2013). Elle se caractérise par l'implication de plus d'un organe dans la manifestation des symptômes, en particulier la peau, le tube digestif, les systèmes cardiovasculaire et respiratoire (Figure 4) (Wölbing, Fischer, Köberle, Kaesler, & Biedermann, 2013).

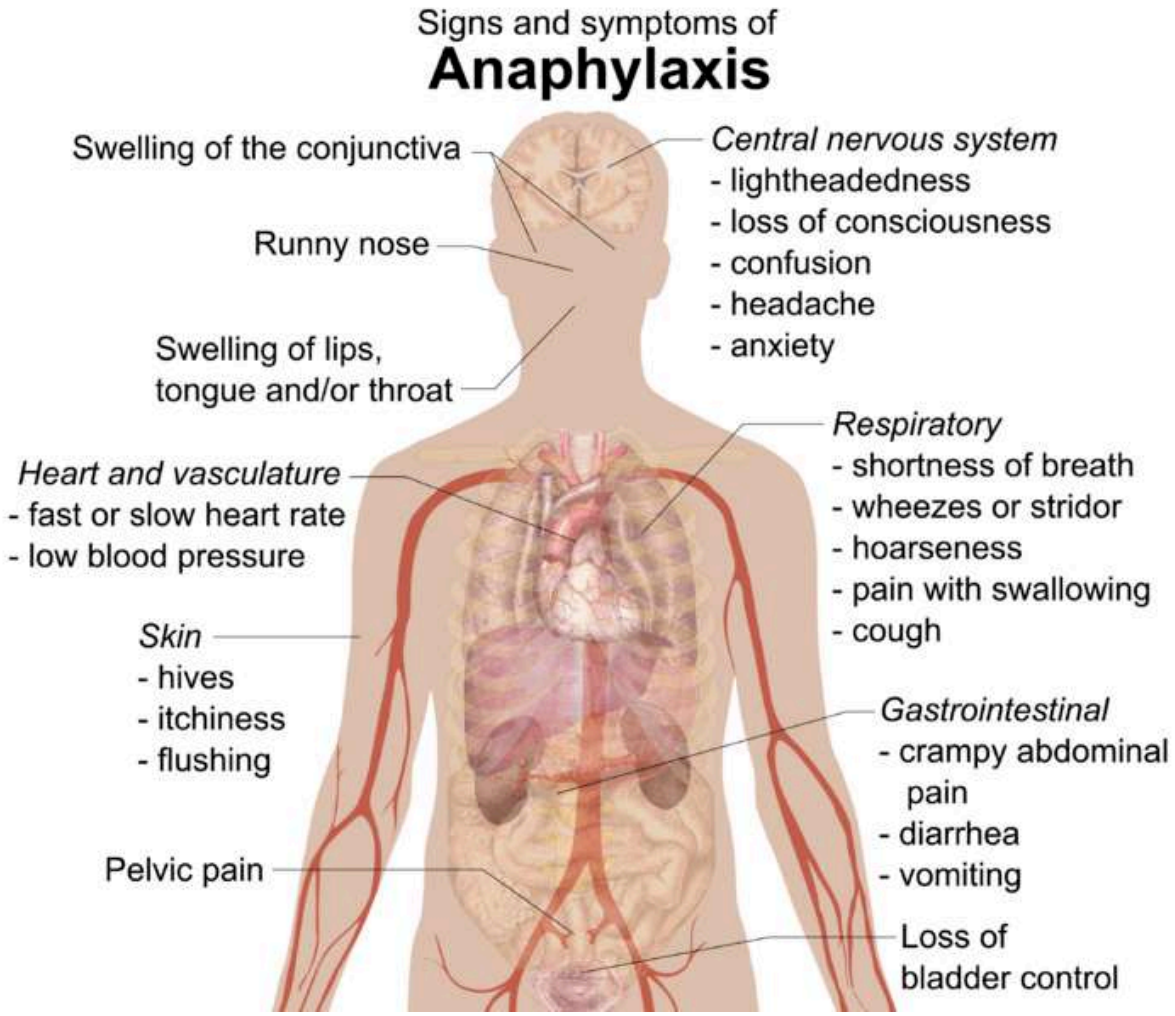


Figure 4 : manifestations cliniques de l'anaphylaxie (https://commons.wikimedia.org)

Une revue systématique de la littérature estime à 0.3% la prévalence des anaphylaxies en Europe (Panesar *et al.*, 2013). Les aliments, les médicaments, les piqures d'insectes et le latex sont les plus communément impliqués dans ces réactions sévères. Chez les enfants, 65% des anaphylaxies sont provoquées par un aliment contre 20% pour les adultes (Cianferoni & Muraro, 2012; Worm *et al.*, 2014). L'arachide, les fruits à coque, les crustacés, l'œuf et le lait sont les plus fréquents chez l'enfant, alors qu'il s'agit du blé et des fruits à coques chez les adultes (Cianferoni & Muraro, 2012; Oropeza *et al.*, 2017). Les données du réseau d'allergo-vigilance confirment ces observations en ce qui concerne les enfants mais révèlent également que pour les adultes, les crustacés, les légumineuses (dont l'arachide), les fruits croisant avec le latex (kiwi, banane), le sésame et le sarrasin, sont aussi responsables d'anaphylaxie (Renaudin *et al.*, 2017).

Une extrapolation faite à partir de différentes études suggère que des cofacteurs sont impliqués dans 30% des anaphylaxies chez l'adulte (Wölbing *et al.*, 2013). Les cofacteurs les plus fréquents en Europe sont l'effort physique, la consommation d'alcool, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les

infections (Wölbing *et al.*, 2013). Différents mécanismes physiopathologiques expliquant le rôle de ces cofacteurs ont été suggérés : perméabilité gastro-intestinale accrue, redistribution du flux sanguin qui conduit les allergènes vers des cellules effectrices différentes, une osmolarité accrue ou une acidose qui abaissent les seuils de réactivité des cellules effectrices (Barg, Medrala, & Wolanczyk-Medrala, 2011; Versluis *et al.*, 2016). S'il est établi que les anti-inflammatoires non stéroïdiens et l'alcool augmentent la perméabilité intestinale, les mécanismes proposés pour les autres cofacteurs restent à déterminer. Ainsi, l'intensité des efforts physiques rapportés dans les anaphylaxies provoquées par l'effort est souvent trop faible pour modifier la perméabilité intestinale, augmenter l'osmolarité sanguine ou induire une acidose (Ansley *et al.*, 2015). Le blé est l'aliment le plus fréquemment impliqué dans les anaphylaxie induite par l'effort (Robson-Ansley & Du Toit, 2010).

1.7. Diagnostic de l'allergie alimentaire

1.7.1 Anamnèse

Les symptômes de l'allergie ne sont pas spécifiques d'un allergène donné. L'identification de l'allergène incriminé repose donc en grande partie sur l'interrogatoire du patient quant à son environnement et son mode de vie. Dans le cas des allergènes alimentaires, cette tâche est parfois délicate car plusieurs sources allergéniques sont souvent présentes dans un aliment. De plus, les recettes industrielles utilisent parfois des ingrédients non présents dans les recettes traditionnelles (noix de cajou dans une sauce de type pesto, gluten dans la charcuterie, …).

1.7.2 Recherche d'IgE spécifiques

L'interrogatoire du patient est complété par une exploration clinique. Les tests les plus communs visent à mettre en évidence des IgE spécifiques d'un aliment donné. Les tests cutanés (prick-test) sont réalisés en première intention, en piquant l'épiderme à travers une goutte d'un extrait des aliments suspectés sur la face interne de l'avant-bras en général. Un érythème ou une papule apparaissent dans les 20 minutes qui suivent quand l'aliment est reconnu par des IgE et provoque une réaction d'hypersensibilité. Des IgE spécifiques d'un aliment ou de l'un de ces composants peuvent être également recherchées dans le sérum des patients. Plus couteux, ces tests sont réalisés en nombre limité. Contrairement aux tests cutanés, ces dosages permettent d'explorer les IgE spécifiques aux différents allergènes contenus dans un aliment afin d'améliorer le diagnostic et le pronostic. Des puces à protéines ont ainsi été développées afin d'explorer simultanément un grand nombre d'aliments et leurs composants (autour d'une centaine) avec une quantité limitée de sérum. L'utilité des tests cutanés et des dosages d'IgE spécifiques pour le diagnostic a été récemment évalué dans une méta-analyse : ces tests sont très sensibles mais manquent de spécificité car la présence d'IgE traduit une

sensibilisation mais pas obligatoirement une allergie (Soares-Weiser *et al.*, 2014). La faible spécificité observée est à nuancer car cette méta-analyse agrège des résultats obtenus avec des extraits ou des composants qui peuvent être différents pour une même source allergénique. Ainsi dans le cas de l'allergie à l'arachide, la spécificité du dosage des IgE augmente si l'on mesure les IgE dirigées contre Ara h 2 plutôt que contre un extrait total des protéines de l'arachide (Schussler & Kattan, 2015). Par ailleurs l'établissement de seuils de positivité pourrait aussi améliorer la spécificité des dosages d'IgE. Dans le cas du blé, l'identification d'IgE spécifique dirigées contre une protéine du gluten, l'ω5-gliadine, est caractéristique de l'anaphylaxie au blé induite par l'effort pour plus de 70 % des patients (Altenbach *et al.*, 2015; H. Matsuo *et al.*, 2008; Morita *et al.*, 2003; Kati Palosuo *et al.*, 1999).

1.7.3 Test de provocation orale (TPO)

Un test de provocation orale (TPO) est parfois nécessaire pour confirmer la source allergénique suspectée à l'issue de l'interrogatoire du patient et de la recherche d'IgE spécifiques. Ce test consiste à faire ingérer des doses croissantes d'un allergène au patient. Les TPO sont réalisés en milieu hospitalier car ils peuvent induire des symptômes sévères nécessitant une prise en charge médicale d'urgence. Le test de provocation orale en double aveugle est considéré comme la méthode de référence pour prouver une allergie alimentaire (Boyce, 2010). Cependant, pour des raisons pratiques et financières, ce test peut être réalisé en simple aveugle ou en ouvert s'il est associé à une histoire clinique et/ou des résultats biologiques convaincants.

1.7.4 Test d'activation des basophiles

Afin de diminuer le nombre de tests de provocation orale complexes à réaliser et potentiellement risqués, différentes équipes évaluent l'intérêt de tests *ex-vivo* d'activation des basophiles (cellules impliquées dans la manifestation des symptômes). Ainsi une équipe du King's College de Londres a mis au point un test d'activation des basophiles de patients allergiques à l'arachide (Santos *et al.*, 2014). Dans ce test, les basophiles sanguins du patient sont stimulés avec un extrait d'arachide et l'expression d'un marqueur révélant l'activation des cellules est suivie. Ce test permet de distinguer les patients tolérants ou sensibilisés mais non-allergiques, des patients allergiques avec 95% comme valeur de prédiction positive et 98 % comme valeur de prédiction négative (Santos *et al.*, 2014).

1.8. Eviction alimentaire et traitement de l'allergie

1.8.1 Eviction alimentaire

En l'absence de traitement étiologique, plusieurs approches sont mises en place par les médecins et cliniciens pour traiter l'allergie alimentaire d'un patient. La première vise à éviter le contact avec l'allergène. Une fois que la ou les sources allergéniques incriminées ont été identifiées, un régime d'éviction est indiqué aux patients. Ces régimes d'éviction sont parfois difficiles à mettre en place en regard de la complexité des recettes des aliments et des différents lieux de consommation. Ils ont en général un impact fort sur la qualité de vie des patients et de leur famille. Ainsi, l'achat de produits nécessite une lecture attentive des étiquettes de composition, la consommation en restaurant est plus délicate et plus hasardeuse. Pour les enfants scolarisés des protocoles d'accueil individualisé (PAI) peuvent être mis en place afin que des repas particuliers leur soient dédiés et que le risque de contamination croisée avec les autres menus soit bien géré.

1.8.2 Traitement symptomatique

Ce régime d'éviction peut être associé à un traitement symptomatique par des antihistaminiques, ou des corticoïdes dont les effets se font sentir en quelques heures ou quelques jours. Par ailleurs, quand une exposition peut déclencher des symptômes sévères, l'injection rapide d'adrénaline est indiquée. Ce traitement à l'adrénaline qui peut se faire à l'aide de système auto injectable est la pierre angulaire du traitement des réactions allergiques sévères (Sicherer & Sampson, 2018). L'Omalizumab, un anticorps monoclonal humanisé bloquant la fixation des IgE sur leurs récepteurs, est également indiqué pour traiter l'asthme allergique et est de plus en plus fréquemment associé à des immunothérapies (Yu *et al.*, 2016).

1.8.3 Immunothérapie

A l'instar de certains types d'allergie respiratoires, différents protocoles d'immunothérapie utilisant des aliments ou des fractions d'aliments ont été développés et évalués ces dernières années. Ces traitements sont délivrés par voie orale, sublinguale ou cutanée. Ils ciblent un allergène donné et visent à réduire ou éliminer une réaction allergique suite à une exposition à cet allergène. Ces protocoles d'immunothérapie se déroulent en plusieurs phases et durent de plusieurs mois à plusieurs années. La première phase, de 3 à 9 mois, consiste à augmenter progressivement la quantité d'allergène donné quotidiennement au patient pour attendre une dose maximale qui sera ensuite maintenue pendant plusieurs mois (Figure 5). Ces traitements ont comme objectifs de favoriser la production de cytokines, d'anticorps et/ou de populations cellulaires qui réguleront favorablement les cellules, cytokines et anticorps responsables de la réaction allergique.

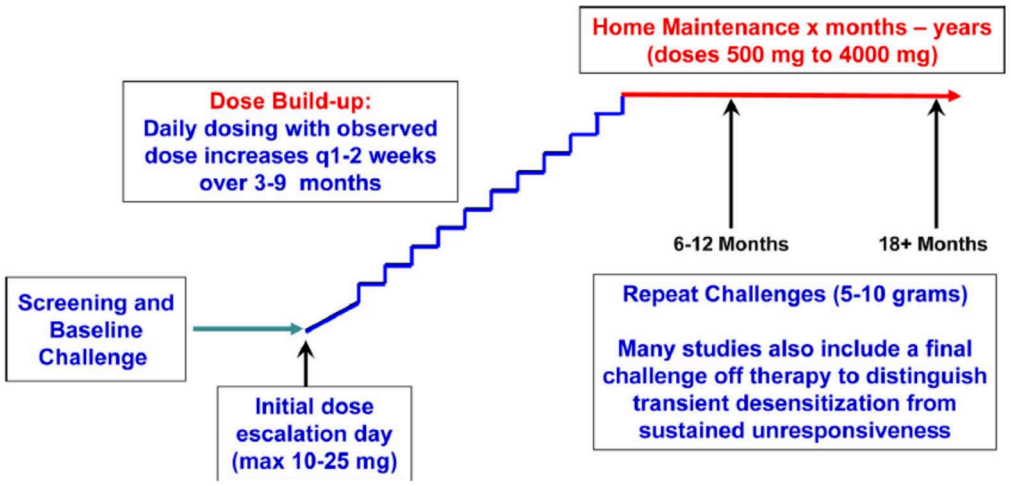


Figure 5 : présentation schématique d'un protocole d'immunothérapie alimentaire ((Burks, Sampson, Plaut, Lack, & Akdis, 2018)

L'efficacité de ces immunothérapies alimentaires est évaluée en comparant les doses d'allergènes provoquant une réaction dans un test de provocation orale avant et en fin traitement. Plusieurs situations sont observées (Burks *et al.*, 2018) :

- échec : la dose reste identique où s'est réduite ;
- désensibilisation/accoutumance : le patient est toujours en cours de traitement mais la dose d'allergène nécessaire pour déclencher des symptômes a augmenté ;
- absence durable de réponse (sustained unresponsiveness) : absence de réaction allergique alors que le traitement a été arrêté. Actuellement, il est admis que cet état nécessite une certaine exposition régulière à l'allergène pour perdurer ;
- rémission : absence de réaction allergique alors que le protocole d'immunothérapie est fini ;
- tolérance orale : absence complète de réaction allergique à l'allergène, que l'exposition à l'allergène soit maintenue ou pas.

Le premier objectif des protocoles d'immunothérapie alimentaire est d'induire une désensibilisation chez le patient afin d'obtenir une protection en cas d'exposition accidentelle (M. D. Kulis, Patil, Wambre, & Vickery, 2018)

1.8.4 Prévention primaire (petites doses d'allergène, pré/pro-biotique)

Les actions de prévention primaire sont basées sur les facteurs de risques identifiés ou suspectés. Un suivi accru des enfants dans les familles à risque est souvent mis en œuvre. Par ailleurs, plusieurs mesures visant le régime alimentaire des mères ou des enfants telles que l'allaitement maternel, la consommation de pré ou probiotiques, la période d'introduction des aliments potentiellement allergéniques sont explorées.

1.9. Gestion du risque allergie alimentaire

1.9.1 L'information au patient et l'éducation thérapeutique

Compte tenu des spécificités de chaque allergie alimentaire (allergène incriminé, sévérité des symptômes, …), la gestion du risque doit être individualisée. A la fois le personnel médical et des associations de patients telles que l'AFPRAL ou l'AFDIAG précisent ainsi au patient et à sa famille quels aliments doivent être évités ou dont la composition doit être particulièrement surveillée afin d'éviter une exposition accidentelle. Dans le cas d'allergies à des aliments fréquemment utilisés tels que le lait, l'œuf ou le blé, des recettes particulières permettant de les substituer sont également transmises. Par ailleurs, si le patient est susceptible d'avoir des symptômes sévères, un système d'auto-injection d'adrénaline peut lui être fournit. Une éducation thérapeutique est alors apportée au patient et à sa famille afin de d'indiquer quand l'utiliser et de réduire l'appréhension qu'il pourrait y avoir à se faire une injection d'adrénaline.

1.9.2 Etiquetage des allergènes alimentaires

Face à l'augmentation des cas d'allergies alimentaires et leur sévérité potentielle, l'Europe a mis en place en 2003 une réglementation rendant obligatoire et explicite l'étiquetage de 13 allergènes alimentaires et des sulfites. En l'absence de données cliniques suffisantes sur les doses réactives minimales, aucun seuil en deçà duquel l'étiquetage ne serait pas nécessaire n'a pu être fixé. Un seuil existe cependant pour le gluten dans le contexte de la maladie céliaque : en dessous de 20 mg/kg, la mention « sans gluten » peut être indiquée. Selon Hischenhber *et al.* et Taylor *et al.*, ce seuil serait protecteur pour la plupart des personnes allergiques au blé (Hischenhber *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2014).

Afin de répondre à la réglementation et de gérer les risques de contaminations involontaires, l'Europe préconise que soit mise en place une analyse de risque de type HACCP pour les allergènes. Cette méthode globale analyse les risques de présence involontaire d'un allergène en se basant notamment sur les flux des produits au cours de leur réception, production, stockage et distribution. Cette démarche prévoit aussi la formation des personnels et le contrôle des ingrédients, des produits finis et des procédures de nettoyage. Cette démarche permet de mettre en place des actions correctives afin d'éliminer ou de réduire le risque. En l'absence de seuils réglementaires, si un risque de contamination persiste, les industriels ajoutent souvent sur leurs produits des mentions d'avertissement comme « Trace de … », « Peut contenir de … » ou « Fabriqué dans un atelier manipulant le … », quelle que soit la quantité d'allergène potentiellement présente. Alors que la réglementation visait à améliorer l'information et la qualité de vie des patients allergiques, les consommateurs ont vu fleurir sur les produits alimentaires un nombre élevé d'avertissements qui ne

les informaient pas sur le risque qu'ils couraient et qui variait d'un fabricant à l'autre. Ces étiquetages de précaution conduisent les personnes allergiques à adopter des comportement à risque en négligeant ces avertissements ou, au contraire, à réduire leur panel de produits consommés (Barnett *et al.*, 2011; Do, Khuda, & Sharma, 2018). Quel que soit le comportement du patient, le faible niveau d'information et l'inconsistance de ces avertissements ne prévient pas les risque d'accident liés au contaminations croisées (Blom *et al.*, 2018; Remington, Baumert, Marx, & Taylor, 2013).

1.9.3 Seuils de réactivité des patients

Les données cliniques permettant d'établir des seuils de réactivité à l'échelle d'une population allergique sont difficiles à obtenir. Elles nécessitent en effet d'une part des tests de provocation orale différents de ceux réalisés à des fins diagnostics (doses différentes et à adapter pour chaque allergène, timing) et d'autre part d'avoir un échantillon important qu'il n'est pas toujours possible de réunir dans une seule étude (Klein Entink *et al.*, 2014). Depuis 2009, la distribution des quantités réactogènes de plusieurs allergènes a été publiée (Taylor *et al.*, 2014, 2010). Ainsi la dose en dessous de laquelle, moins de 1 % des patients allergiques réagiront (ED_{01} Eliciting Dose 1%) est estimée à 0,1 mg de protéines d'arachide, à 0,03 mg de protéines d'œuf. Pour le gluten, en raison d'un nombre trop faible de données, l'ED_{01} n'a pas pu être déterminée et seule l'ED_{05} a pu être calculée. Elle est de 1 mg de gluten ; ramené à une portion de 50 g, cette dose correspond à une contamination de 20 mg de gluten/kg.

Cependant l'utilisation de tels seuils à des fins réglementaires reste très délicate. En effet, à l'échelle individuelle, un patient peut voir son seuil de réactivité se réduire considérablement du fait de facteurs aggravants qui ne sont pas pris en compte dans les études cliniques. De plus la sévérité des symptômes demeure largement imprévisible et semble indépendante de la dose (Niggemann & Beyer, 2014; Pettersson, Koppelman, Flokstra-de Blok, Kollen, & Dubois, 2018).

En l'absence de tels seuils, les seuils qui déclenchent un étiquetage de précaution sont de fait les seuils des méthodes de détection des allergènes.

1.9.4 Détection des allergènes dans les aliments

1.9.4.1. Les méthodes

Les méthodes de détection des allergènes sont basées sur la recherche de marqueurs (protéines, peptides ou ADN) indiquant la présence d'un aliment allergénique. La détection des protéines se fait essentiellement par des méthodes immunochimiques (ELISA, immuno-chromatographie), des peptides par spectrométrie de masse et de l'ADN par PCR (Sharma, Khuda, Parker, Eischeid, & Pereira, 2016). A l'heure actuelle, les méthodes ELISA sont les plus sensibles et les plus aisément utilisables dans des environnements non experts. Compte tenu des seuils de réactivité des patients les plus

sensibles, la limite de détection souhaitée des méthodes se situe autour du mg de protéines totales de la source allergénique/kg d'aliment. Pour la plupart des allergènes à déclaration obligatoire, les méthodes ELISA ont aujourd'hui des sensibilités suffisantes.

1.9.4.2. Difficultés liées aux matrices et aux procédés.

Les méthodes de détection et de quantification des allergènes doivent être applicables sur une grande variété de produits pouvant contenir un grand nombre d'ingrédients et ayant subi un ou plusieurs procédés de transformation. Procédés et matrices peuvent avoir une incidence négative sur la détection ou la quantification des sources allergéniques (Sharma *et al.*, 2016). Les méthodes de détection sont en général séquentielles et comportent plusieurs étapes : extraction, solubilisation, mesure et conversion (Figure 6). L'extraction et la solubilisation des protéines ciblées par les méthodes utilisant des anticorps (Ac) peuvent être altérées à cause de traitements thermiques (cuisson, congélation) ou physiques (micro-ondes, hautes pressions), de modifications chimiques, d'hydrolyse enzymatique ou de changements de pH (Khuda *et al.*, 2012). Ces traitements peuvent notamment induire l'agrégation des protéines ciblées entre elles ou avec d'autres protéines issues de la source allergénique ou de la matrice et limiter leur extraction/solubilisation. Ces agrégations peuvent aussi réduire la reconnaissance de la protéine ciblée par l'Ac de détection. L'épitope reconnu par l'Ac peut ainsi se retrouver masqué au cœur d'agrégats solubles mais insuffisamment dissociés. Les procédés peuvent aussi altérer l'interaction avec l'Ac par des changements de conformation ou de séquence de la protéine ciblée, ou l'ajout d'adduits tels que des sucres (réactions de Maillard).

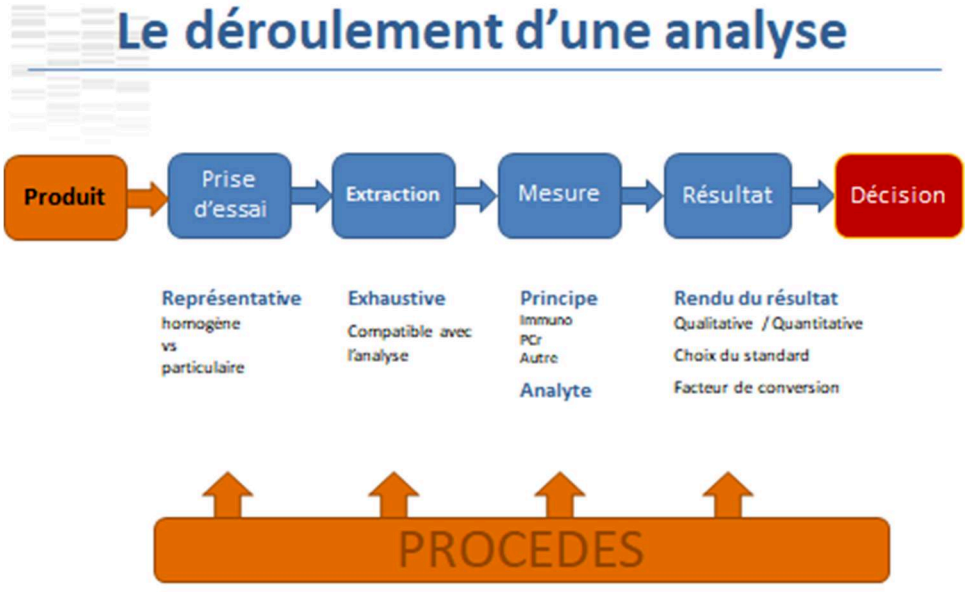


Figure 6 : Impact des procédés sur la détection immunochimique

1.9.4.3. La détection du gluten

La détection et la quantification du gluten reposent sur l'utilisation d'Ac dirigés contre des séquences qui sont présentes avec un fort degré d'homologie dans les différentes protéines du gluten (cf page 60). Cependant ces séquences ne sont pas identiques et sont reconnues avec des affinités différentes par un même Ac. De ce fait, la standardisation précise des dosages du gluten reste toujours problématique (Rzychon *et al.*, 2017) et ne permet pas toujours d'obtenir des résultats exacts et équivalents d'une méthode à l'autre.

1.10. Mécanismes de l'allergie alimentaire

1.10.1 La réponse Immune aux antigènes

La rencontre avec une grande variété d'antigènes étrangers impose au système immunitaire d'adapter sa réponse en fonction du danger que représente chacun d'entre eux. En règle générale la réponse de l'organisme à un danger se fait en deux temps. Tout d'abord une réponse rapide et non spécifique est mise en œuvre, on parle d'immunité innée. Dans un second temps, une réponse immune adaptée, c'est-à-dire spécifique de l'antigène, se met en place. Cela se traduit par l'activation ou la répression de différents types ou sous-types cellulaires, l'expression de récepteurs à leur surface et la sécrétion de différentes molécules : cytokines, chimiokines, Ac. Des cellules présentatrices d'antigène, APC (Antigen Presenting Cell) telles que les cellules dendritiques, et les lymphocytes T auxiliaires (Thelper, T_H) et T régulateurs (T_{REG}) sont au cœur de cette orchestration.

Les APC, telles les cellules dendritiques dont c'est la fonction première, ou des cellules épithéliales, détectent les Ag au moyen de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR : *Pattern Recognition Receptors*) ou d'immunoglobulines fixées à leur surface. Elles internalisent ces Ag et en présentent des fragments aux lymphocytes T naïfs via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. L'orientation de la réponse T par les cellules dendritiques repose sur un ensemble de cofacteurs présents ou absents pendant le contact avec les lymphocytes T naïfs. Ainsi selon le type de PRR impliqués dans la reconnaissance de l'Ag mais aussi en fonction de l'environnement cytokinique, différents récepteurs s'expriment à la surface de la cellule dendritique et différentes cytokines vont être sécrétées. L'activation de lymphocytes T naïf est ainsi modulée (Pulendran, Tang, & Manicassamy, 2010). Par exemple, la fixation de Ara h 1 sur le récepteur DC-SIGN, exprimé à la surface des cellules dendritiques, induit la différentiation de lymphocytes T_H vers une profil T_H2 (W. G. Shreffler *et al.*, 2006).

En fonction de l'environnement cytokinique et du phénotype de l'APC, les lymphocytes T_H et T_{REG} s'orientent donc vers des phénotypes différents. Selon le danger associé à un Ag, différents types de

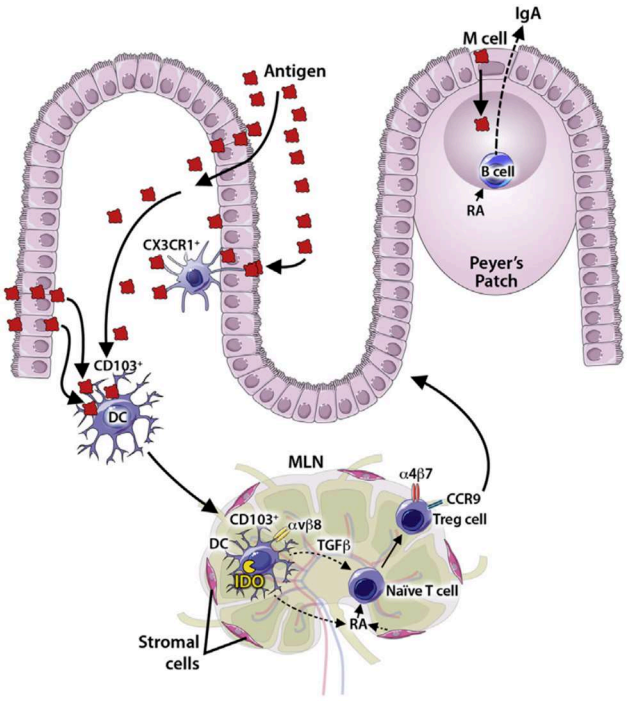
lymphocytes T_H et T_{REG}, aux phénotypes distincts, sont activés. Les principaux types de T_H aujourd'hui identifiés sont les T_H1, les T_H2 et les T_H17 caractérisés notamment par la production de cytokines différentes qui vont mobiliser différents acteurs de l'immunité. Les lymphocytes T_H1 sont ainsi efficaces pour lutter contre les bactéries intracellulaires et les virus en activant des macrophages et des cellules T_{NK} (Natural Killer) via la production d'interféron γ. Les lymphocytes T_H17 ont un rôle clé dans la lutte contre les bactéries extracellulaires et les champignons en produisent de l'interleukine 17 (IL-17). Les lymphocytes T_H2 seront efficaces pour lutter contre les parasites en induisant la production d'IgE via l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Pulendran *et al.*, 2010).

L'action activatrice des lymphocytes T_H est contrebalancée, directement ou indirectement, par les lymphocytes T_{REG} dont la fonction est de contenir ou d'inhiber la réponse immunitaire. Cette action est centrale dans la tolérance aux antigènes (du soi ou alimentaires par exemple) (Pulendran *et al.*, 2010). Des boucles de régulation se mettent ainsi en place au cours de l'interaction entre la cellule T et la cellule dendritique pour amplifier ou inhiber la réponse du système immunitaire.

1.10.1.1. Passage et présentation des antigènes

Les antigènes alimentaires peuvent traverser la barrière épithéliale passivement par diffusion paracéllulaire ou activement par transcytose au travers des cellules épithéliales ou par endocytose au niveau des cellules M. En l'absence d'altération de la barrière intestinale, la diffusion paracéllulaire se limite à des molécules de moins de 5 kDa de passer. Les passages par transcytose impliquent dans la plupart des cas une dégradation par des enzymes lysosomiques (Heyman, M. and Desjeux, 1992). Ainsi par exemple, plus de 90 % la β-lactoglobuline se retrouve hydrolysée au cours de son transport vers la lamina propria. Il est à noter que cette hydrolyse est incomplète et génère des fragments de 2 à 4 kDa toujours susceptibles d'interagir avec le système immunitaire (Heyman, M. and Desjeux, 1992).

Par ailleurs, certaines cellules dendritiques ($CX3CR1^+$, $CD103^+$) émettent des dendrites qui traversent la couche épithéliale et capturent des antigènes directement dans la lumière intestinale. Enfin les cellules épithéliales peuvent également présenter des antigènes directement aux cellules T car elles expriment le MHC de classe II dans certaines conditions (Chinthrajah et al., 2016).



1.10.2 Tolérance aux antigènes alimentaires

Exposés à de multiples sources d'agressions physiques, chimiques ou biologiques, la peau, les voies aériennes et le tube digestif ont la double fonction de protéger l'organisme tout en tolérant une flore commensale et des antigènes inoffensifs (ou même bénéfiques) très divers. La tolérance aux antigènes alimentaires, dite tolérance orale, est ainsi la réponse normale du système immunitaire. Elle a été décrite pour la première fois par Osborne et Wells en 1911 et fait toujours l'objet de nombreux travaux (Berin & Sampson, 2013). Cette tolérance orale est un processus immunitaire actif caractérisé par une absence de réponse durable aux Ag alimentaires, même en l'absence d'une exposition régulière aux allergènes (Yu *et al.*, 2016).

La muqueuse digestive est ainsi le plus grand réservoir de cellules immunitaires de l'organisme (Berin & Sampson, 2013). Ces cellules se situent dans des tissus lymphoïdes (plaques de Peyer, ganglions mésentériques) ou sont dispersées dans la *lamina propria* (Figure 7) (Chinthrajah *et al.*, 2016; Pabst & Mowat, 2012). Ces cellules immunitaires collaborent avec les cellules épithéliales dans la série d'événements qui établit et maintient la tolérance immunitaire, impliquant la transmission de l'antigène de la lumière intestinale à la *lamina propria*, le transfert de l'antigène au tissu lymphoïde, la présentation et l'induction d'une réponse des cellules T dans le tissu lymphoïde puis le retour des cellules effectrices immunitaires dans le tube digestif.

Dans la lamina propria, les cellules dendritiques $CX3CR1^-$, $CD103^+$, capturent les antigènes et migrent vers les ganglions mésentériques (via le récepteur d'adressage CCR7) et y présentent les antigènes aux lymphocytes T naïfs (Chinthrajah *et al.*, 2016). L'interaction DC/T promeut la génération de

lymphocytes T_{REG} par, entre autres mécanismes, la production d'acide rétinoïque et de TGFβ. Ces lymphocytes migrent à leur tour vers l'intestin et expriment également du TGFβ (Berin & Sampson, 2013). L'acide rétinoïque qui agit en synergie avec l'IL-6 et l'IL-5 produites par les cellules dendritiques, induit également un tropisme des lymphocytes B vers l'intestin et la production d'IgA (Chinthrajah *et al.*, 2016). L'ensemble de ces mécanismes concourent à l'acquisition de tolérance.

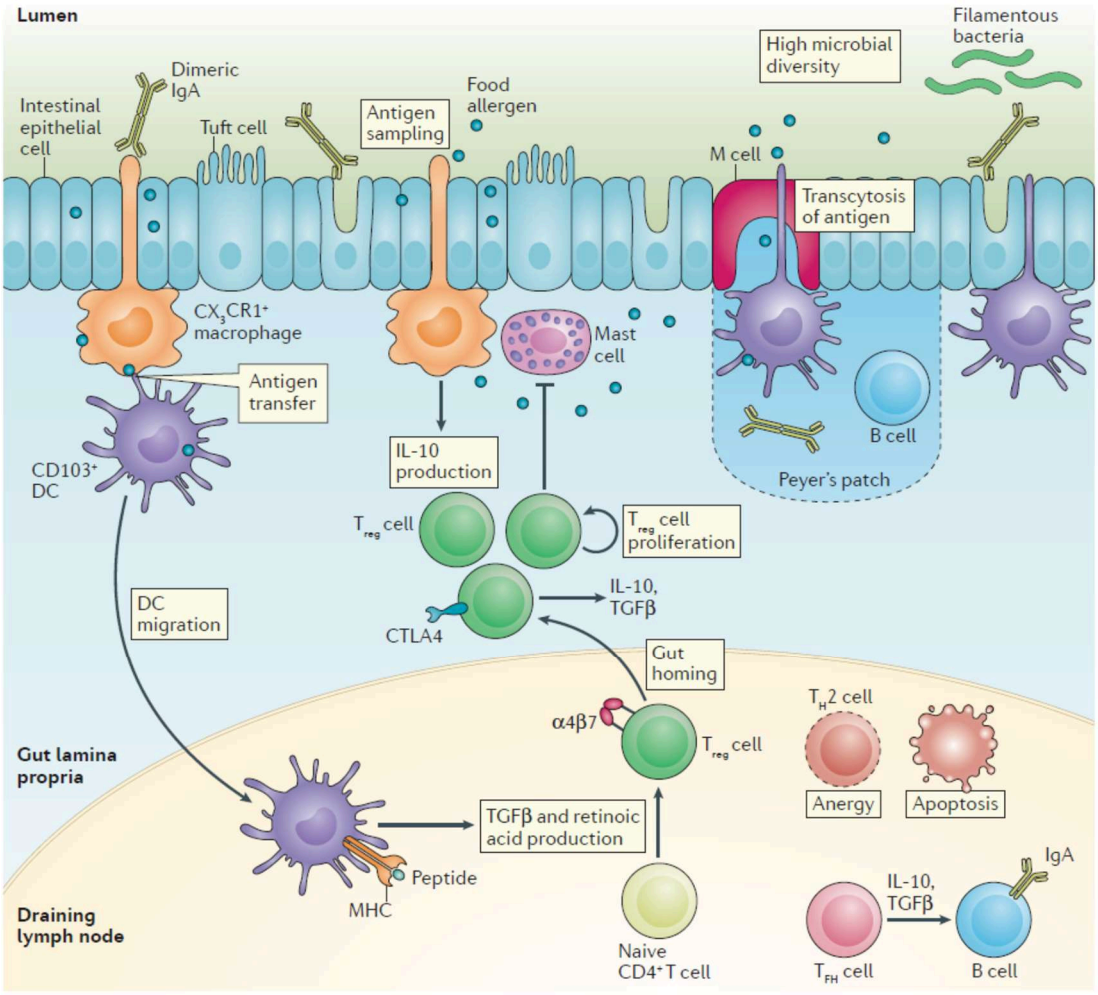


Figure 7: Schéma acquisition de tolérance intestin et cellules immunitaires (Yu *et al.*, 2016)

1.10.3 Sensibilisation allergique : une rupture de la tolérance

La réponse immune cellulaire de type 2 est la réponse normale aux infections contre des macro-parasites et vis à vis de composés nocifs non microbiens ou de venins afin de maintenir l'homéostasie métabolique et réguler la réparation tissulaire (Noti, 2018).

Les allergies alimentaires résultent d'une réponse anormale du système immunitaire qui s'oriente dans la majorité des cas, vers une réponse immune de type 2 et produit des IgE contre des Ag alimentaires inoffensifs. Cette orientation est le résultat d'un défaut de mise en place ou d'une rupture de la tolérance vis-à-vis de certaines protéines alimentaires ou plus rarement contre certains motifs

glucidiques présents sur des glycoprotéines ou des protéines « glyquées » par les procédés de transformation des aliments.

1.10.3.1. Initiation de la sensibilisation

Les mécanismes des allergies dépendantes des IgE, de leur initiation à l'activation de lymphocyte T_H2, restent encore activement étudiés. La sensibilisation allergique qui se caractérise par la production d'IgE est la conséquence d'un passage de la muqueuse intestinale, anormal ou non contrôlé, d'un Ag et d'un contexte immun de type 2. De nombreux travaux, conduits pour la plupart sur des modèles murins, ont identifié plusieurs mécanismes initiant une réponse immunitaire de type 2, avec la différentiation de cellules T_H2 qui, via la production d'IL-4 et d'IL-13, active des lymphocytes B et favorise la production d'IgE (Chinthrajah *et al.*, 2016).

Cellules de l'épithélium et de l'immunité innée

Les cellules de l'épithélium et de l'immunité innée peuvent être activées consécutivement à une inflammation de l'intestin, à des lésions de l'épithélium ou par certains des constituants présents dans l'alimentation via des récepteurs (PRR) ou des récepteurs de motifs moléculaires associés aux dangers DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns) (Noti, 2018). Ainsi activées, les cellules épithéliales libèrent différentes cytokines. Parmi celles-ci, la thymic stromal lymphopoietin (TSLP), l'IL-25 et l'IL-33 suscitent beaucoup d'attention car ces facteurs orientent la différentiation des cellules dendritiques vers un phénotype pro-T_H2 et contribuent ainsi au déclenchement et au maintien d'une réponse T_H2 (Chinthrajah *et al.*, 2016). Récemment des études sur des modèles cellulaires et murins ont ainsi montré que les inhibiteurs d'α-amylase ou de trypsine, présents dans la farine de blé, se fixent sur un PRR (le Toll Like Receptor 4) et auraient un rôle adjuvant dans la sensibilisation allergique (Bellinghausen *et al.*, 2018).

Régime alimentaire

Des liens entre la composition du régime alimentaire et la survenue d'allergie ont également été suggérés. Ainsi, l'acide rétinoïque qui est un métabolite de la vitamine A est impliqué dans la tolérance orale en favorisant la production d'IgA en conjonction avec de l'IL-6 et de l'IL-5. Un déficit en vitamine A pourrait donc limiter les mécanismes de tolérance et laisser la place à une orientation T_H2. Le même type de lien est proposé pour la vitamine D. Pour cette dernière une corrélation entre un faible niveau de vitamine D et la sensibilisation à l'arachide ou à la crevette a été établi chez les enfants. Cependant, ce lien n'a pas été établi pour les allergies au lait ou à l'œuf ou pour les allergies chez l'adulte (Berin & Sampson, 2013).

Rôle de la peau

La sensibilisation à un antigène alimentaire peut également s'initier au niveau de la peau. Cette hypothèse a été confirmée dans des modèles murins dans lesquels une sensibilisation à l'arachide par la peau permet qu'une allergie orale se développe. Elle s'appuie également sur des observations cliniques qui ont établi, d'une part un lien (épidémiologique) entre la dermatite atopique de l'enfant et la survenue ultérieure d'allergies alimentaire (Lack, Fox, Northstone, & Golding, 2003) ; et d'autre part le fait que des mutations fonctionnelles de la filaggrine augmentent le risque de développer une allergie à l'arachide (Brown *et al.*, 2011).

Synthèse des mécanismes d'initiation de la sensibilisation

Yu *et al.* ont récemment proposé un schéma général des mécanismes conduisant à l'initiation d'une sensibilisation allergique (Figure 8) (Yu *et al.*, 2016). Ainsi il apparait que des lésions de l'épithélium ou une inflammation de l'intestin, de la peau ou des voies respiratoires permettent une entrée non régulée dans l'organismes des Ag alimentaires et favorisent la sécrétion des cytokines pro T_H2 (IL-25, IL-33 et la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP)) par l'épithélium. Ces médiateurs orientent alors la différenciation des cellules dendritiques vers un phénotype favorisant la différentiation T_H2 des cellules T $CD4^+$ naïves. La sécrétion d'IL-25 par les cellules épithéliales favorise également l'expansion de cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2). Celles-ci, comme les lymphocytes T_H2, sécrètent de l'IL-5 et de l'IL-13 et promeuvent une réponse immune TH2 qui se traduit par un afflux d'éosinophiles et la production d'IgE.

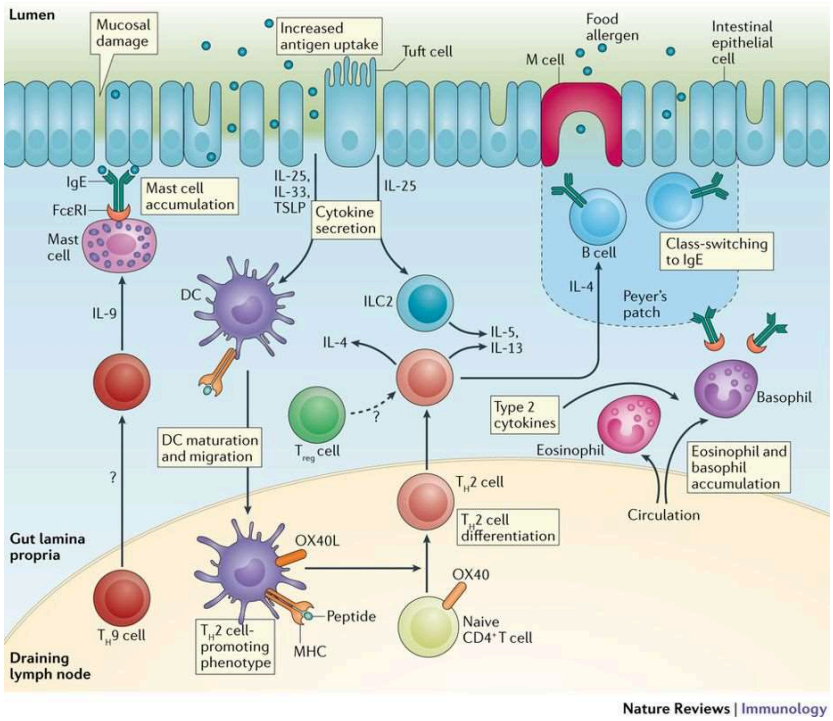


Figure 8 : mécanismes de la sensibilisation allergique (Yu *et al.*, 2016)

1.10.3.2. Phase de déclenchement

La phase de sensibilisation a généré des IgE spécifiques d'un ou plusieurs allergènes qui se sont fixées à la surface des mastocytes et des basophiles via des récepteurs spécifiques de haute affinité aux IgE (FcεRI). Le FcεRI est constitué d'une sous unité FcεRα, qui fixe le fragment Fc des IgE, associée à une sous unité FcεRβ et à 2 sous unités FcεRγ (Figure 9).

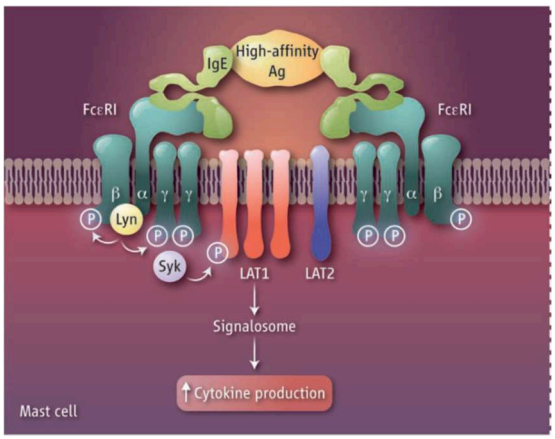


Figure 9 : Activation du récepteur de haute affinité aux IgE (Daëron, 2014)

La fixation des IgE sur le FcεRI favorise la survie des basophiles et des mastocytes et augmente le niveau d'expression des FcεRI à leur surface (Galli & Tsai, 2012; Yamaguchi *et al.*, 1997). En conséquence, davantage de mastocytes et de basophiles sont présents dans les tissus et ont la capacité de fixer davantage d'IgE. La reconnaissance d'un allergène par plusieurs IgE fixées sur les FcεRI provoque le pontage des complexes IgE-FcεRI et déclenche la phosphorylation de motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) présents sur les domaines intracellulaires des sous unités FcεRβ et FcεRγ (Figure 9). Il en résulte une cascade de signaux intracellulaires qui activent les basophiles et les mastocytes. Cette activation induit 1/ la sécrétion de composés préformés et stockés dans des granules dans les minutes qui suivent le contact avec l'allergène, 2/ puis en quelques dizaines de minutes la sécrétion de composés synthétisés à partir de phospholipides membranaires et 3/ dans les heures qui suivent, la synthèse *de novo* de cytokines et de chimiokines et leur libération (Figure 10).

La dégranulation libère de nombreux médiateurs dont l'histamine, des enzymes (ex. tryptase, β-hexosaminidase), des médiateurs peptidiques (ex. bradykinine), des cytokines (ex. TNFα, IL8, I25, IL33, TSLP) et des protéoglycanes (Blank & Vitte, 2015). L'histamine est le principal moteur physiopathologique des symptômes immédiats par ses effets vasodilatateurs, d'augmentation de la perméabilité vasculaire, de bronchoconstriction, de vasoconstriction et de nociception.

En quelques dizaines de minutes après l'activation, des médiateurs lipidiques sont produits à partir de phospholipides membranaires et sont transportés à l'extérieur des cellules. Ils prolongent les effets immédiats liés à la dégranulation.

Dans un troisième temps, l'activation induit la synthèse *de novo* de plusieurs cytokines. Certaines sont pro-inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-6, IL-17), d'autres sont pro-T_H2 (IL-4) ou favorisent le recrutement, l'activation et la survie des éosinophiles et des basophiles (IL-3, IL-15, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP). Enfin, certaines sont pro TH1 (IFNα). Des chimiokines responsables du recrutement des éosinophiles, des monocytes et des neutrophiles sont également synthétisées et libérées. Les effets de ces cytokines et chimiokines sont parfois antagonistes. Les quantités produites et la chronologie de leur production sont finement régulées en fonction de l'environnement du mastocyte ou du basophile. Il est à noter que certains de ces composés peuvent être synthétisés et libérés sans qu'il y ait eu de dégranulation (Blank & Vitte, 2015).

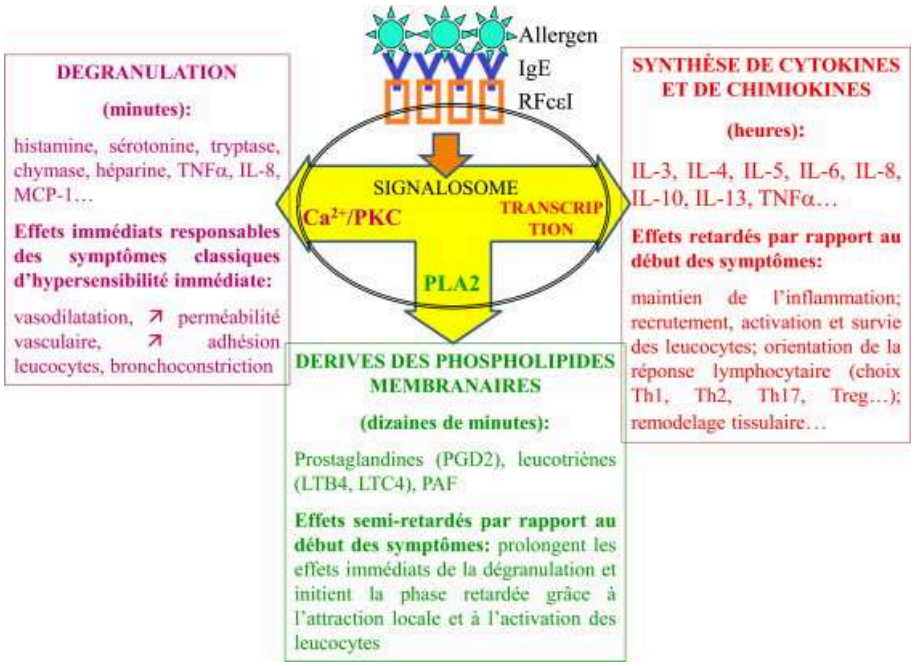


Figure 10 : effet de l'activation des mastocytes et des basophiles (Blank & Vitte, 2015)

Les mastocytes et les basophiles expriment également différents récepteurs aux IgG (Figure 11). Certains de ces récepteurs sont constitutifs, d'autres présentent une expression inductible par des cytokines (FcγRI humain via IFNγ) ou dépendante de la localisation tissulaire des cellules. La fixation de complexes antigène-IgG active ces récepteurs en les agrégeant. Selon les récepteurs et les cellules impliqués, cette agrégation induit alors des messages soit activateurs, soit inhibiteurs de la dégranulation et/ou de la synthèse de médiateurs de l'allergie (Jönsson & Daëron, 2012). Ainsi, sur les basophiles, le potentiel inhibiteur domine le potentiel activateur des FcγR et prévient ainsi que les

basophiles soient activés par des IgG (Cassard, Jönsson, Arnaud, & Daëron, 2012). Sur les mastocytes humains, l'expression du FcγRI est induite par l'interféron γ (IFNγ) ; son activation provoque la libération d'histamine, la production de prostaglandine D2 et la sécrétion d'IL-3 notamment (Jönsson & Daëron, 2012). Il apparait donc que les IgG susceptibles d'être pontées par des antigènes alimentaires rendent plus complexe et modulent la réponse cellulaire induite par le pontage des IgE.

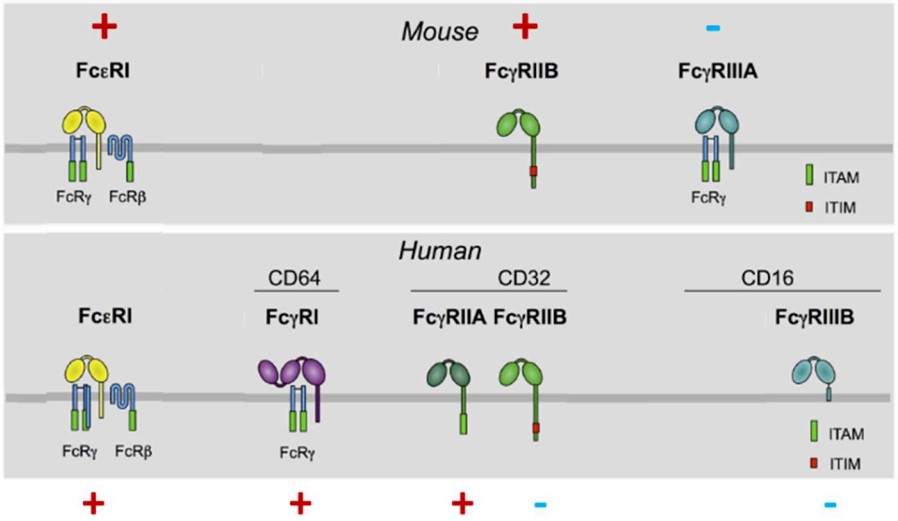


Figure 11 : récepteurs activateurs (+) ou inhibiteurs (-) aux IgE et aux IgG exprimés par les basophiles et les mastocytes murins (en haut) ou humains (en bas). Adapté de (Jönsson & Daëron, 2012)**.**

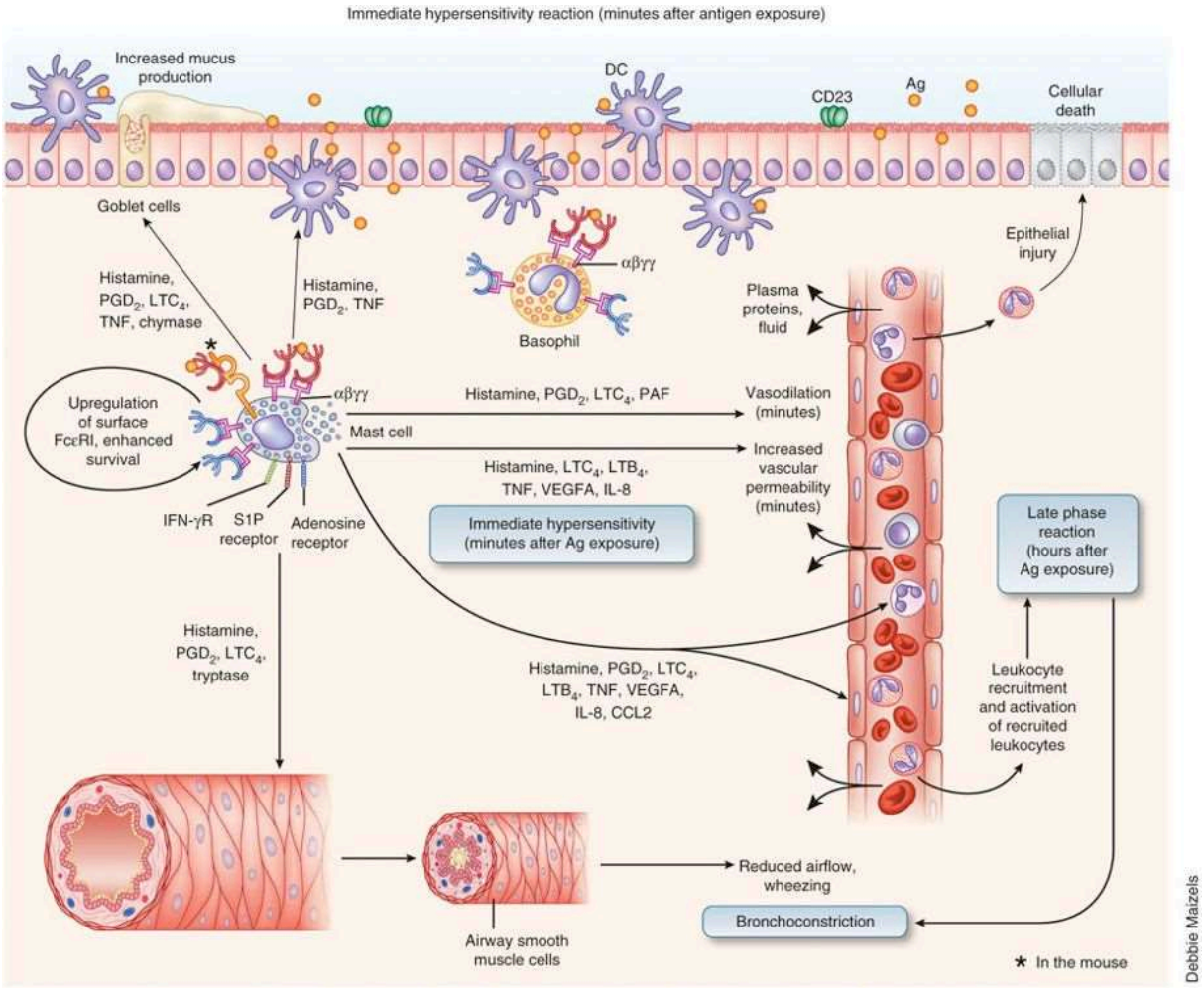


Figure 12 : phase de dégranulation (Galli & Tsai, 2012)

1.10.3.3. Amplification de l'inflammation allergique

Un fois initiée, l'inflammation allergique s'entretient et s'amplifie. L'initiation de la sensibilisation a produit des cellules et des cytokines pro-T_H2 et des IgE spécifiques d'un ou plusieurs Ag alimentaires. De plus, si elle a eu lieu, la dégranulation des basophiles et des mastocytes a également libéré des cytokines et chimiokines pro-T_H2 et recruté sur le lieu de l'inflammation des cellules lymphoïdes innées de type 2, et neutrophiles (Galli & Tsai, 2012).

Cette inflammation pro-T_H2 persistante conduit à un remodelage de l'épithélium. Des boucles d'amplification pro-T_H2 impliquant des cellules épithéliales, des cellules dendritiques, des basophiles ou des mastocytes, des ILC2, des éosinophiles se mettent en place. Ainsi, les cellules épithéliales altérées ou activées produisent des médiateurs, tels que L'IL-25, l'IL-33, le TSLP ou le GM-CSF qui induisent une production accrue de cytokines pro-T_H2 telles que l'IL-4 et l'IL5 (Noti, 2018).

1.10.4 Extension du répertoire IgE

La fixation des IgE sur des FcεRI exprimés par d'autres types cellulaires (cellules dendritiques, monocytes et les macrophages) ou sur les récepteurs au IgE de faible affinité (FcεRII) (lymphocytes B matures, cellules épithéliales et cellules dendritiques) entraine une diversification du répertoire des épitopes reconnus lors de la réponse allergique à une protéine (Galli & Tsai, 2012). Ces cellules internalisent les complexes récepteurs-IgE-allergènes et présentent de nouveaux épitopes aux cellules T naïves. Du fait d'un environnement pro-T_H2, ces cellules se différencient en lymphocytes T_H2, activent des lymphocytes B et orientent la commutation isotypique vers la production d'IgE de nouvelles spécificités (Figure 13).

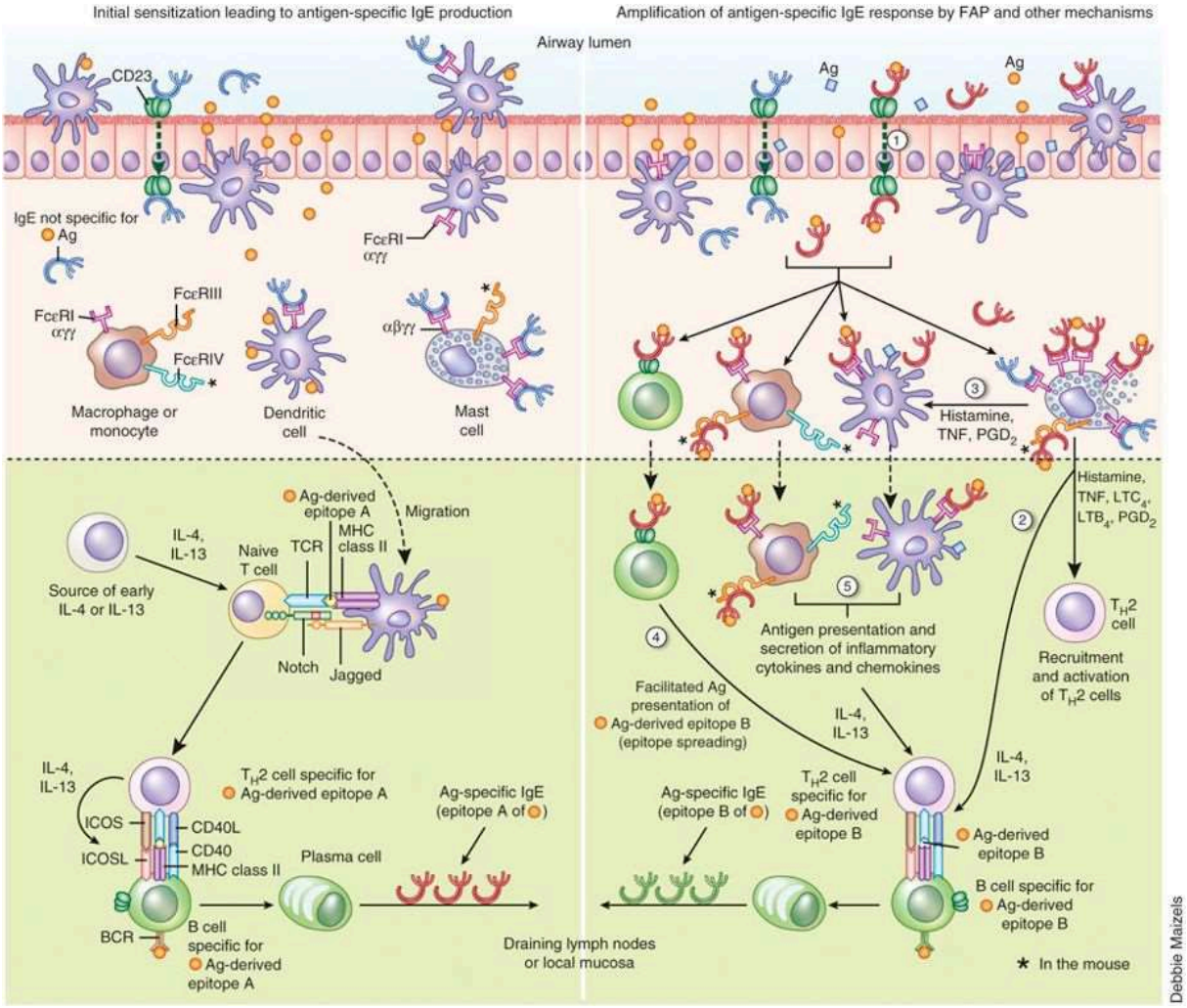


Figure 13 : production IgE et extension du répertoire (Galli & Tsai, 2012)

De fait, ce mécanisme de diversification du répertoire IgE au cours du temps a été clairement mis en évidence chez les patients allergiques à la fléole et aux acariens (Custovic *et al.*, 2015; Hatzler *et al.*, 2012). Il se traduit par une augmentation du nombre d'épitopes reconnus sur un même allergène. Ce

mécanisme a été suggéré pour des allergènes associés, tels que Ara h 1 et Ara h 6 agrégés lors d'une cuisson (Guillon, Bernard, Drumare, Hazebrouck, & Adel-Patient, 2016).

1.11. Modèles d'étude de la phase de dégranulation

La présence d'IgE dirigées contre différents allergènes ne permet pas de conclure que ces allergènes vont induire des symptômes. En effet le déclenchement des symptômes nécessite que ces allergènes soient aussi capables de ponter les IgE à la surface des basophiles ou des mastocytes et d'induire leur dégranulation. Différents modèles *ex vivo* ou *in vitro* de dégranulation ont été établis dans l'optique d'aider au diagnostic et d'éviter certains tests de provocation orale, ou pour étudier plus en détail la phase de dégranulation.

1.11.1 Basophiles de patients

Les mastocytes, qui sont localisés au niveau des tissus, ne sont pas accessibles pour des prélèvements préalables à des tests *ex vivo*. Par contre, une partie des basophiles sont circulants et accessibles par un prélèvement de sang où ils représentent moins de 1% des leucocytes (Ebo *et al.*, 2008). S'ils proviennent d'un patient allergique, ces basophiles sont déjà sensibilisés par des IgE dirigés contre un ou plusieurs allergènes et leur dégranulation peut être induite en les exposant à ces allergènes. La dégranulation des basophiles peut être suivie soit par un dosage d'histamine, soit par cytométrie en flux en suivant l'expression du marqueur de surface CD203 qui augmente quand les cellules sont activées, ou celle du CD63 présente sur la face interne des granules et qui se trouve exposé à la surface des cellules après la dégranulation (Ebo *et al.*, 2008). Des courbes dose-réponse relient la concentration en allergène et le pourcentage de basophiles CD63+ (Figure 14) (Hoffmann et al., 2015; S. U. Patil & Shreffler, 2012). Deux paramètres sont déterminés pour interpréter et comparer ces courbes : le pourcentage maximal de cellules CD63+ qui mesure la réactivité des basophiles ; la concentration en allergène activant 50% des basophiles CD63+ qui mesure la sensibilité des basophiles à un allergène donné (Santos *et al.*, 2015).

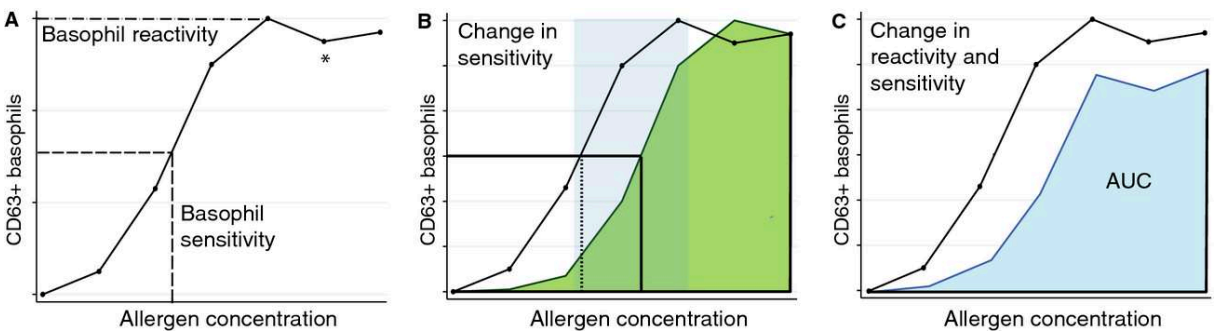


Figure 14 : Analyse d'une courbe de dégranulation dose réponse (Hoffmann *et al.*, 2015)

Ce test d'activation des basophiles (TAB) s'est révélé utile pour distinguer parmi les patients sensibilisés à l'arachide, ceux qui étaient tolérants de ceux qui étaient allergiques, dans l'optique d'éviter un test de provocation orale potentiellement dangereux (Santos *et al.*, 2014).

1.11.2 Basophiles de donneurs

Il est également possible d'utiliser des basophiles de donneurs allergiques ou non pour étudier la phase de dégranulation. Avant d'effectuer un TAB les IgE du donneur doivent être préalablement retirés de la surface des basophiles qui sont ensuite re-sensibilisés par les IgE du sérum que l'on souhaite étudier. La mise en œuvre de ce test reste néanmoins délicate car l'élimination des IgE du donneur nécessite un traitement de quelques dizaines de secondes à l'acide lactique. Ce traitement court permet d'éliminer seulement 50 à 90 % des IgE du donneur. Des durées plus longues réduisent la capacité du basophile à dégranuler (MacGlashan, 2013).

1.11.3 Lignées cellulaires

La mise en œuvre de basophiles de patients ou de donneurs est délicate en dehors de structures hospitalières car les basophiles sont présents en faible quantité dans le sang et doivent être activés dans les 24h qui suivent le prélèvement pour qu'ils conservent leur capacité à dégranuler (Hoffmann *et al.*, 2015). Plusieurs lignées cellulaires de basophiles ou de mastocytes sont disponibles. La plus largement utilisée en recherche est une lignée de basophile de Rat (RBL, clone 2H3). Le FcεRI de rat fixe également les IgE de souris, permettant d'utiliser cette lignée avec des sérums issus de modèles murins d'allergie. Cette lignée a également été modifiée pour exprimer tout ou partie du récepteur aux IgE humaines. Ainsi les clones RBL-SX38 et RBL-clone6 expriment toutes les chaines du récepteur FcεRI humain et dégranulent en présence d'IgE humaines et d'allergènes (Bodinier *et al.*, 2008; Dibbern, Palmer, Williams, Bock, & Dreskin, 2003; Wiegand *et al.*, 1996). Des lignées n'exprimant que la chaine α du récepteur humain, responsable de la fixation des IgE, ont également été utilisées (Bodinier *et al.*, 2008; Takagi, Nakamura, Teshima, & Sawada, 2003; Vogel, Luttkopf, Hatahet, Haustein, & Vieths, 2005). Dans ces clones, la chaine α humaine s'associe aux chaines β et γ de rat. Il apparait cependant que ces récepteurs chimériques sont moins efficaces pour induire une dégranulation (Bodinier *et al.*, 2008). Avec ces différentes lignées, la dégranulation est suivie en dosant l'histamine ou la β-hexosaminidase présentes dans les granules.

Récemment la lignée LAD-2 de mastocyte humain a été utilisée avec succès pour remplacer le TAB à des fins de diagnostique (Santos et al., 2018). Cependant le taux de doublement de cette lignée est d'environ 2 semaines alors qu'il n'est que de 24h pour les lignées RBL (Bodinier *et al.*, 2008).

1.12. Les allergènes alimentaires

Bien que 170 aliments aient été recensés comme responsables d'allergies alimentaires (Burks *et al.*, 2012), la plupart des cas sont provoqués par un nombre restreint d'entre eux : lait, œuf, arachide, fruits à coques, crustacées, poisson, blé et soja (Sicherer & Sampson, 2010). Des variations quant à leur fréquence respective s'observent si l'on considère l'âge des patients (Nwaru *et al.*, 2014) ou leur origine géographique (Hiroaki Matsuo, Yokooji, & Taogoshi, 2015). Ainsi les allergies au lait et à l'œuf sont plus fréquentes chez le jeune enfant alors que l'allergie à l'arachide, aux fruits à coque, au poisson et aux crustacés apparaissent plus tardivement (Nwaru *et al.*, 2014).

Aalberse a proposé de classer les allergènes alimentaires en deux catégories : les allergènes complets (dits de classe I), capables de sensibiliser et de déclencher des symptômes par la voie orale, et les allergènes incomplets (dits de classe II) qui n'induisent pas de sensibilisation allergique par voie orale mais qui déclenchent des symptômes (R.C Aalberse, 1997). La réactivité à ces allergènes alimentaires incomplets est souvent la conséquence d'une sensibilisation à un pneumallergène qui partage suffisamment d'homologies avec un ou des allergènes alimentaires. La relation entre le potentiel à interagir avec des IgE et les symptômes cliniques est influencée par les propriétés physiques (stabilité, taille) des allergènes et leurs propriétés immunologiques (affinité et valence des épitopes) (Rob C. Aalberse, 2000).

Contrairement aux allergènes respiratoires ou de contact, les protéines alimentaires peuvent subir diverses modifications lorsqu'elles sont soumises aux procédés de transformation des aliments et à la digestion. Ceux- ci doivent donc être pris en compte car ils modifient les caractéristiques biochimiques et structurales des allergènes et modulent leur capacité à interagir avec les différents acteurs du système immunitaire que ce soit pour la phase de sensibilisation ou pour la phase de déclenchement.

1.12.1 Les principaux allergènes alimentaires

Dans leur méta-analyse publiée en 2008, Radauer *et al.* observent que, toutes allergies confondues, les allergènes (707 inclus dans cette étude) se distribuent dans un nombre très restreint de familles protéiques (définies à partir de la base de données Pfam) : seules 5 % de ces familles contiennent des allergènes (Radauer, Bublin, Wagner, Mari, & Breiteneder, 2008). En ce qui concerne les allergies alimentaires, bien que les aliments contiennent plusieurs milliers de protéines différentes, un nombre restreint de protéines alimentaires sont en cause et 80 % d'entre elles sont incluses dans 0,16 % des familles protéiques (Bannon, 2004; Masilamani, Commins, & Shreffler, 2012; Radauer *et al.*, 2008). Les superfamilles des prolamines et des cupines et les familles des tropomyosines et des profilines contiennent plus des 2/3 des allergènes alimentaires, viennent ensuite les protéines de la famille PR10-like et les caséines (Tableau 1 & Tableau 2). Jenkins *et al.* ont observé que les 129 allergènes végétaux

considérés dans leur étude se répartissaient dans 20 famille de protéines (0,5%) et que 65 % se répartissaient dans 4 familles : la superfamille des prolamines, la famille PR10-like, la superfamille des cupines et la famille des profilines (Jenkins, Griffiths-Jones, Shewry, Breiteneder, & Mills, 2005).

Familles	Principales sources	Exemples d'allergènes
Tropomyosines	Crustacés, mollusques	Pen a 1 (Crevette)
Parvalbumines	Poissons, amphibiens	Sal s 1 (Saumon)
Caséines	Lait	Bos d 5 (Vache)
Serpin	Œuf	Gal d 2 (Poule)

Tableau 1 : Principales familles d'allergènes alimentaires d'origine animale

Super-Familles	Familles	Principales sources	Exemples d'allergènes
Prolamines	Protéines de réserves des céréales	Céréales, Arachide, Fruits à coques	Tri a 19 (ω5-gliadines, Blé) Tri a 26 (FPM suG, Blé)
	Protéines de transfert de lipides non spécifiques (nsLTP)		Tri a 14 (nsLTP1, Blé) Pru p 3 (Pèche)
	Albumine 2S		Ara h 2 (Arachide)
	Inhibiteurs d'α-amylase et de trypsine (ATI)		Tri a 20 (Blé)
Cupines	Globulines 11S, 12S	Légumineuses, Oléagineuses	Ara h 3 (Arachide)
	Globulines 7S		Ara h 1 (Arachide)
	Profilines	Fruits, Légumes	Api g 4 (Céleri)
Bet v1	PR-10	Fruits, Légumes	Mal d 1 (Pomme)

Tableau 2 : Principales superfamilles et familles d'allergènes alimentaires d'origine végétale

1.12.2 Caractéristiques structurales et fonctionnelles des allergènes alimentaires

Le fait que les allergènes alimentaires appartiennent à un nombre restreint de familles protéiques parmi toutes celles présentes dans nos aliments suggère que la plupart des allergènes alimentaires possède des caractéristiques structurales ou fonctionnelles intrinsèques à l'origine de leur potentiel allergique (Radauer *et al.*, 2008; Ruiter & Shreffler, 2012).

Ainsi la capacité à résister ou à échapper, au moins partiellement, à la dégradation induite par les procédés appliqués aux aliments et par la digestion, est fréquemment observée pour les allergènes alimentaires complets (allergènes de type I). Ainsi la structure des nsLTP (Protéines de transfert de lipides non spécifiques ; Pru p 3, Tri a 14), compacte et solidement stabilisée par 4 ponts disulfures explique leur forte résistance aux traitements thermiques et à la digestion (Mills, Jenkins, Alcocer, & Shewry, 2004). A contrario, la cuisson déstructure l'allergène Mal d 1 (Pomme). Cet allergène provoque le plus souvent un syndrome oral et traduit une sensibilisation croisée à des pneumallergènes (allergène de type II) (Ruiter & Shreffler, 2012).

La glycation, fréquente parmi les allergènes alimentaires, ou la capacité à interagir avec des lipides (nsLTPs, albumines 2S, certaines cupines, les caséines) stabilise également la structure des allergènes et facilite la formation d'agrégats ou de structure macromoléculaire (Breiteneder & Mills, 2005). Ceci pourrait limiter leur digestion et augmenterait dans certains cas leur absorption intestinale (Mills *et al.*, 2004). On notera également que certaines glycosylations sont reconnues par plusieurs récepteurs de l'épithélium intestinal et génèrent des signaux mobilisant et orientant le système immunitaire vers une réponse T_H2 (Bencurova, 2004; Noti, 2018; Ruiter & Shreffler, 2012).

1.12.3 Exemple la superfamille des prolamines

Cette superfamille a initialement été identifiée en 1985 (Kreis, Forde, Rahman, Miflin, & Shewry, 1985). Elle se subdivise en 6 familles : les prolamines du blé, de l'orge de l'avoine et du riz ; les prolamines du maïs, du sorgho et du millet ; les puroindolines des céréales ; les inhibiteurs d'α-amylases et de trypsine (ATIs) ; les albumines 2S ; et les nsLTP (Mills *et al.*, 2004). Il est à noter qu'à l'exception des nsLTP, aussi présentes dans d'autres organes, ces protéines sont localisées dans les grains et les graines.

La superfamille des prolamines se caractérise par la présence d'une signature de 8 cystéines dont 4 sont présentes dans les motifs Cys–Cys and Cys–X–Cys (X représentant n'importe quel autre AA). Ces 8 cystéines forment 4 ponts disulfures qui stabilisent la structure tertiaire composée de 4 hélices α (Figure 15). Deux cystéines supplémentaires sont présentes dans les ATIs et dans certaines albumines 2S (en pointillé dans Figure 15). Le degré d'identité des régions conservées des divers membres de la superfamille des prolamines est faible. Cependant la comparaison de leur structure 3D révèle de fortes homologies : les ponts disulfures stabilisent 4 hélices α dont le positionnement est approximativement conservé parmi les membres de la superfamille (Mills *et al.*, 2004). Cette structure, stabilisée par ces 4 ponts disulfures, est associée une résistance à la chaleur et contribuerait à la résistance à la digestion de nombreuses protéines de cette famille (Mills, Johnson, & Alexeev, 2012).

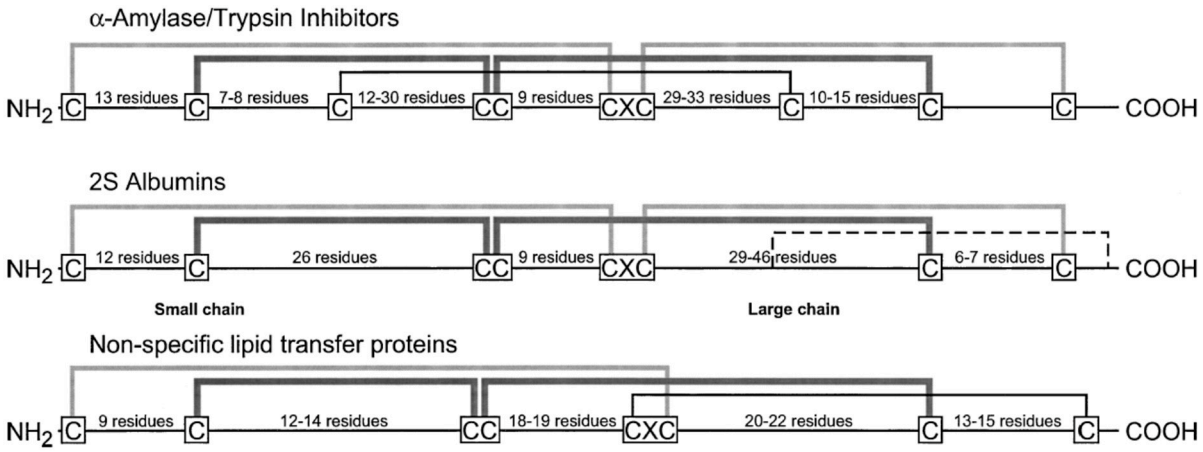


Figure 15 : représentation schématique des ponts disulfures formés entre les cystéines conservées dans la superfamille des prolamines (Mills *et al.*, 2004)

1.12.4 Procédés de transformation

Nos aliments subissent différents procédés avant d'être consommés afin d'en améliorer les qualités organoleptiques, nutritionnelles, fonctionnelles ou leur conservation. La proportion des aliments transformés dans notre alimentation ne cesse d'augmenter, leur côté pratique en étant probablement la principale raison (Sathe & Sharma, 2009). Les traitements thermiques et divers types de fermentation sont parmi les plus anciens procédés appliqués à nos aliments et restent fréquents. Les matières premières telles que l'œuf, le lait ou le blé, sont aussi très souvent fractionnées avant d'être incorporées dans les aliments. Selon le traitement, son intensité et l'allergène considéré, le potentiel allergénique d'une protéine peut augmenter, diminuer ou rester inchangé. En conséquence, les protéines alimentaires peuvent se retrouver sous de multiples formes, avec des potentiels allergéniques différents, dans notre alimentation.

1.12.4.1. Traitements thermiques

Schématiquement, au cours d'un traitement thermique, une protéine va progressivement perdre ses structures quaternaire et tertiaire (≈55°C) puis sa structure secondaire (≈70°C) ; enfin ses ponts disulfures vont se réduire (≈80°C) (Figure 16). Au cours du refroidissement et selon l'intensité du traitement, la protéine reprend une conformation pouvant être complètement différente de son état natif. Il peut notamment se reformer des ponts disulfures différents de ceux initialement présents. Un traitement thermique peut aussi conduire à l'agrégation des protéines (Taheri-Kafrani et al., 2009).

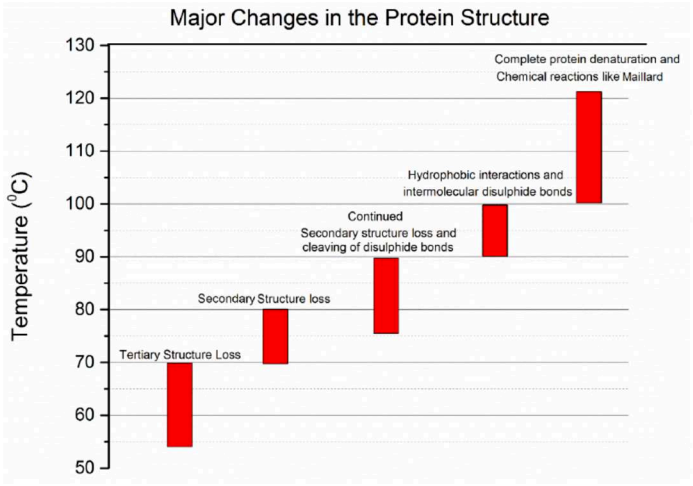


Figure 16 : principaux changements induits par la température sur la structure des protéines (Vanga, Singh, & Raghavan, 2017)

Les modifications de structure induites par un traitement thermique peuvent avoir un effet direct sur l'interaction allergène / IgE. Cet effet peut être favorable si le traitement thermique change la conformation d'un épitope conformationnel, ou si des épitopes se retrouvent masqués dans des agrégats protéiques. A contrario, des épitopes initialement enfouis dans la structure de la protéine peuvent se retrouver à sa surface et devenir plus accessibles aux IgE.

La plupart du temps ces traitements thermiques sont appliqués sur des aliments complexes qui contiennent donc de nombreuses protéines et d'autres composés tels que sucres et lipides. La réaction de Maillard qui, sous l'action de la chaleur, crée une liaison covalente entre un sucre et un acide aminé (AA) , est fréquemment recherchée pour des raisons organoleptiques et parce qu'elle est responsable du brunissement des aliments (l'aspect « doré » est dû à la réaction de Maillard en surface d'un aliment). Elle peut engendrer des modifications de la réactivité IgE (Taheri-Kafrani et al., 2009).

1.12.4.2. La fermentation

La fermentation vise à augmenter la durée de conservation des aliments et à préparer des produits, d'origine animale ou végétale, ayant de nouvelles propriétés organoleptiques, nutritionnelles ou fonctionnelles. Les aliments fermentés représentent environ un tiers des aliments consommés dans le monde et la liste des produits fermentés est vaste, diversifiée et hétérogène en raison des traditions et des cultures des régions du monde dont ils proviennent. Il existe actuellement pas moins de 250 types de produits fermentés dans le monde (Tamang, Thapa, Tamang, Rai, & Chettri, 2015).

Les aliments sont fermentés par une variété de micro-organismes (bactéries et levures) naturellement présents ou ajoutés au substrat comme ferments. La fermentation est un processus métabolique au cours duquel un organisme transforme un sucre provenant de sources variées comme l'amidon, le lactose… en alcool ou en acide. Le développement des micro-organismes autotrophes au cours de la

fermentation repose sur un ensemble de glycosydases et secondairement de protéases qui vont utiliser les composants du substrat comme nutriments. Ces protéases dégradent, au moins partiellement, ou modifient les protéines du substrat. Par ailleurs, l'acidification induite par certaines fermentations peut également modifier la structure tertiaire des protéines.

1.12.5 La digestion

La résistance à la digestion humaine est considérée comme un facteur favorisant l'allergénicité des protéines alimentaires. Cependant une analyse récente et détaillée de la littérature montre que plusieurs allergènes alimentaires ne résistent pas à des digestions réalisées *in vitro* (Bøgh & Madsen, 2016; Herman, Roper, & Zhang, 2020). Il apparait que ce paramètre est difficile à évaluer car il est difficile de mimer la digestion *in vitro*. Ces dernières années, le réseau du COST Infogest a fixé plusieurs protocoles de digestion *in vitro* consensuels (https://www.cost-infogest.eu/). On ne sait cependant pas encore quel est le meilleur modèle en lien avec une évaluation de l'allergénicité. De plus les matrices alimentaires et/ou aux procédés de transformation ne sont que très rarement pris en compte dans les études de résistance à la digestion alors que la complexité d'un aliment et des interactions possibles entre un allergène et les autres constituants combinés à des procédés de transformation semblent pourtant clés dans plusieurs cas (Ruiter & Shreffler, 2012).

Ainsi, dans le cas du blé et de la cuisson du pain, le chauffage et la présence d'amidon modifient la digestion du gluten (Smith *et al.*, 2015). Par ailleurs, plusieurs allergènes (la LTP par exemple) interagissent avec des lipides, ce qui les protège en partie, des enzymes digestives et favorise leur absorption (Mills *et al.*, 2004).

2. Les allergies alimentaires au blé

2.1. Les céréales

Les céréales, notamment le blé, le riz et le maïs, sont très largement cultivées dans le monde et apportent une part notable des calories dans de nombreux régimes alimentaires. Elles constituent également une part non négligeable de l'alimentation du bétail (Peter Koehler, Wieser, & Konitzer, 2014).

« Céréale » est le terme vernaculaire qui désigne les membres de la famille des *Poaceae* (ou graminées) utilisés en alimentation humaine ou animale. Le blé, le seigle et l'orge sont génétiquement proches et forment la tribu des *Triticeae* dans la sous-famille des *Pooideae* (Figure 17). L'avoine appartient également à la sous-famille de *Pooideae* mais est génétiquement un peu plus éloigné. Le riz, le maïs, le sorgho et le millet constituent des sous-familles différentes (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2008).

Différentes espèces de blé sont cultivées : le blé tendre ou froment (*Triticum aestivum* ssp *astivum*), l'épeautre (*Triticum aestivum* ssp *spelta*), le blé dur (*Triticum turgidum*) et l'engrain ou petit épeautre (*Triticum monococcum*). Au sein de chacune de ces espèces, de nombreuses variétés ont été sélectionnées pour leurs propriétés agronomiques, technologiques ou nutritionnelles.

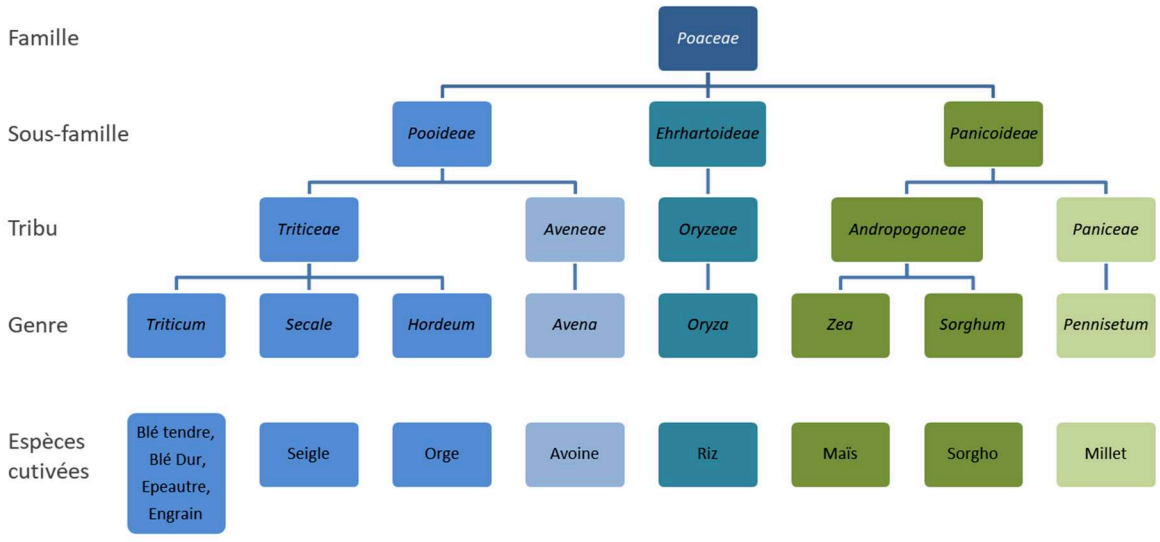


Figure 17 : Phylogénie des céréales de la famille des *Poaceae* (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2008)

2.2. Composition protéique des farines de *Triticeae*

Les grains des céréales sont majoritairement composés d'amidon. Selon le génotype considéré (genre, espèce, variété) et les conditions de culture, leur contenu en protéines varie de 6 à 20 %. Entre 70 et 80 % de ces protéines sont des protéines de réserve. (Peter Koehler et al., 2014). L'hydratation et le pétrissage des farines des céréales de la tribu des *Triticeae* permettent la formation du gluten qui se forme par l'agrégation de leurs protéines de réserve. Les protéines de réserve des autres céréales (avoine, riz, maïs, sorgho et millet) ne sont pas génératrices de gluten.

Les protéines de la farine de *triticeae* ont été séparées en diverses fractions en fonction de leur solubilité par Osborne en 1907. On distingue ainsi : les albumines solubles dans l'eau, les globulines solubles dans une solution saline, les prolamines (gliadines dans le blé) solubles dans une solution alcoolique et les glutélines (gluténines dans le blé) qui ne sont solubilisées dans une solution alcoolique ou acide en présence d'un réducteur et d'agents désagrégeant tels que l'urée ou le SDS (T. Osborne, 1907). Les albumines et les globulines représentent environ 20% des protéines du grain de blé ; les gliadines et gluténines constituant les 80% restant et se répartissant approximativement en parts égales.

La classification d'Osborne est toujours utilisée. Cependant, les connaissances accumulées ces dernières décennies sur la génétique et les caractéristiques physicochimiques et biochimiques des protéines du gluten ont permis de définir de nouvelles classifications en fonction de leurs poids moléculaires (Peter Koehler et al., 2014) et/ou de leur contenu en AA soufrés (Arthur S Tatham & Shewry, 2012). Quelle que soit la classification utilisée, il apparait que les gluténines doivent être considérées comme des prolamines (Arthur S Tatham & Shewry, 2012). En effet, l'insolubilité des gluténines dans des solutions alcooliques, qui les avait initialement classées à part des prolamines, résulte du fait que les gluténines sont constituées de sous-unités qui s'assemblent en polymères de hauts poids moléculaires par la formation de ponts disulfures. La réduction de ces ponts libère ces sous-unités qui ont alors des caractéristiques biochimiques et structurales similaires à celles des prolamines. Gliadines et gluténines forment aujourd'hui le groupe des prolamines, mais certains auteurs ou fabricants de kit continuent d'utiliser l'ancienne classification et limitent toujours le groupe des prolamines aux seules gliadines.

2.3. Composition protéique de la farine de blé

2.3.1 Les prolamines du blé

Les prolamines du blé se distinguent en protéines monomériques que sont les gliadines, et en sous-unités de gluténines (suG) qui s'assemblent en polymères dans le grain (Figure 18).

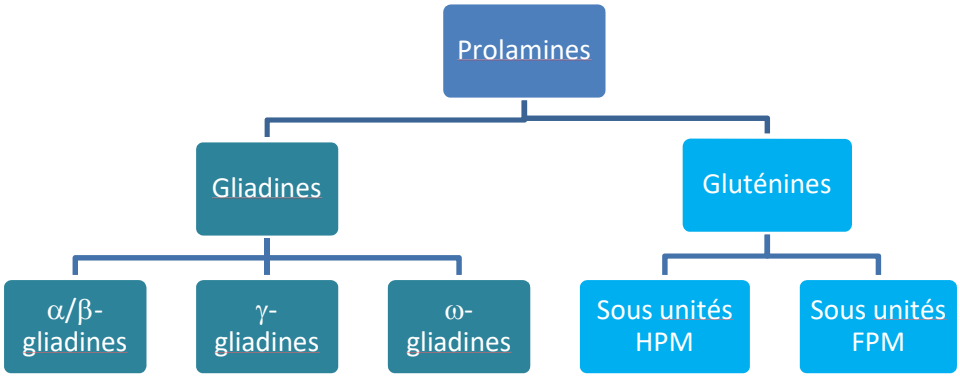


Figure 18 : Classification des protéines du gluten de blé (A S Tatham & Shewry, 2008)

Les gliadines sont classées en 3 groupes selon leur mobilité électrophorétiques en conditions acides : les α/β, les γ et les ω-gliadines (A S Tatham & Shewry, 2008). Les ω-gliadines se subdivisent en $\omega_{1,2}$ et ω_5 gliadines**. L**es α/β-gliadines ont des poids moléculaires compris entre 28 et 33 kDa, les γ-gliadines entre 31 et 35 kDa, les ω-gliadines entre 40 et 55 kDa (Peter Koehler et al., 2014).

Les suG sont classées en fonction de leur poids moléculaire. Elles peuvent être de faible poids moléculaire (32-45 kDa, suG-FPM), ou de haut PM (66-88 kDa, suG-HPM) (Vensel, Tanaka, & Altenbach, 2014). Dans le grain, les suG s'associent via des ponts disulfures intermoléculaires et forment des polymères qui peuvent atteindre des masses moléculaires de 8000 kDa (Bean & Lookhart, 2001).

On retrouve également, polymérisées avec des suG, quelques gliadines qui possèdent une cystéine supplémentaire (Vensel *et al.*, 2014). Ces gliadines particulières sont ainsi nommées Cα-, Cγ- ou D-type. Ainsi des ω5-gliadines possédant une cystéine ont été identifiées et classées parmi les suG-FPM en raison de leurs conditions de solubilisation (Masci *et al.*, 1999).

Des analyses protéomiques (électrophorèse 2D associé à la spectrométrie de masse), telles que celle conduite par Vensel *et al.*, illustre qu'une farine de blé peut contenir plusieurs centaines de prolamines différentes et illustre le fort polymorphisme présent dans ces différents groupes de protéines (Figure 19)(Vensel *et al.*, 2014).

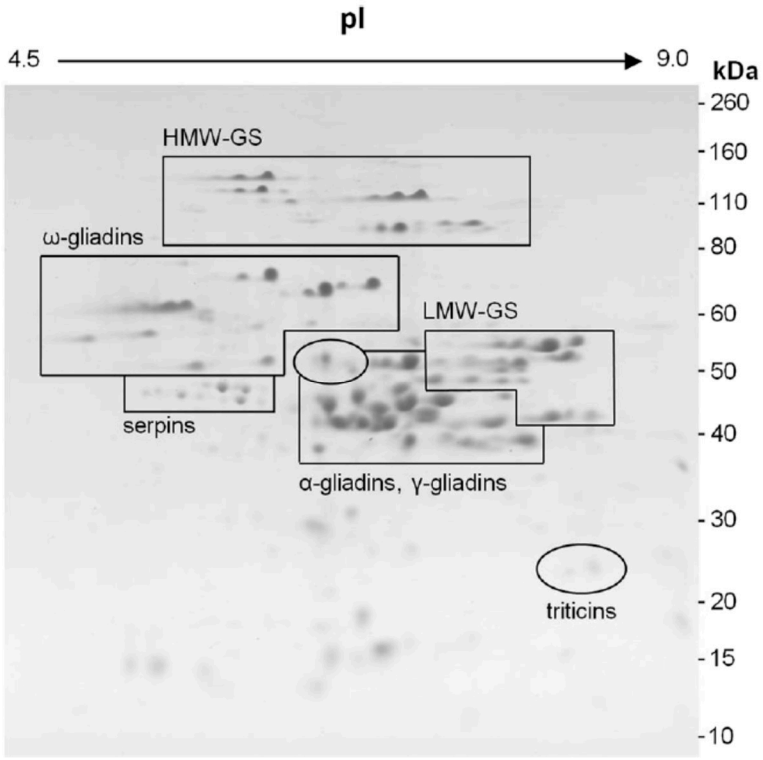


Figure 19 : Séparation par électrophorèse 2D des différents groupes de prolamines à partir d'un extrait protéique de farine de blé (cv Butte 86), LMW-GS = suG FPM et HMW-GS = suG HPM (Vensel *et al.*, 2014)

2.3.1.1. Le réseau de gluten

Le gluten est un réseau constitué de gliadines et de suG qui se forme par hydratation et pétrissage des farines de *Triticeae*. Le gluten a des caractéristiques viscoélastiques particulières qui permettent à la pâte de retenir les gaz issus de la fermentation et d'obtenir, après cuisson, des pâtes levées avec une mie élastique. Les séquences des prolamines et les interactions covalentes et non covalentes qui lient ces protéines entre elles sont responsables de ces propriétés uniques.

2.3.1.2. Les différents domaines structuraux des prolamines

Les gliadines et les suG dérivent d'un ancêtre commun (Kreis *et al.*, 1985). Elles possèdent par conséquent une organisation structurale similaire : un court domaine N-terminal, un long domaine central, dit « répété » et un domaine C-terminal présent dans les α/β-gliadines, les γ-gliadines et les suG mais absent dans les ω-gliadines (Figure 20) (Balakireva & Zamyatnin, 2016).

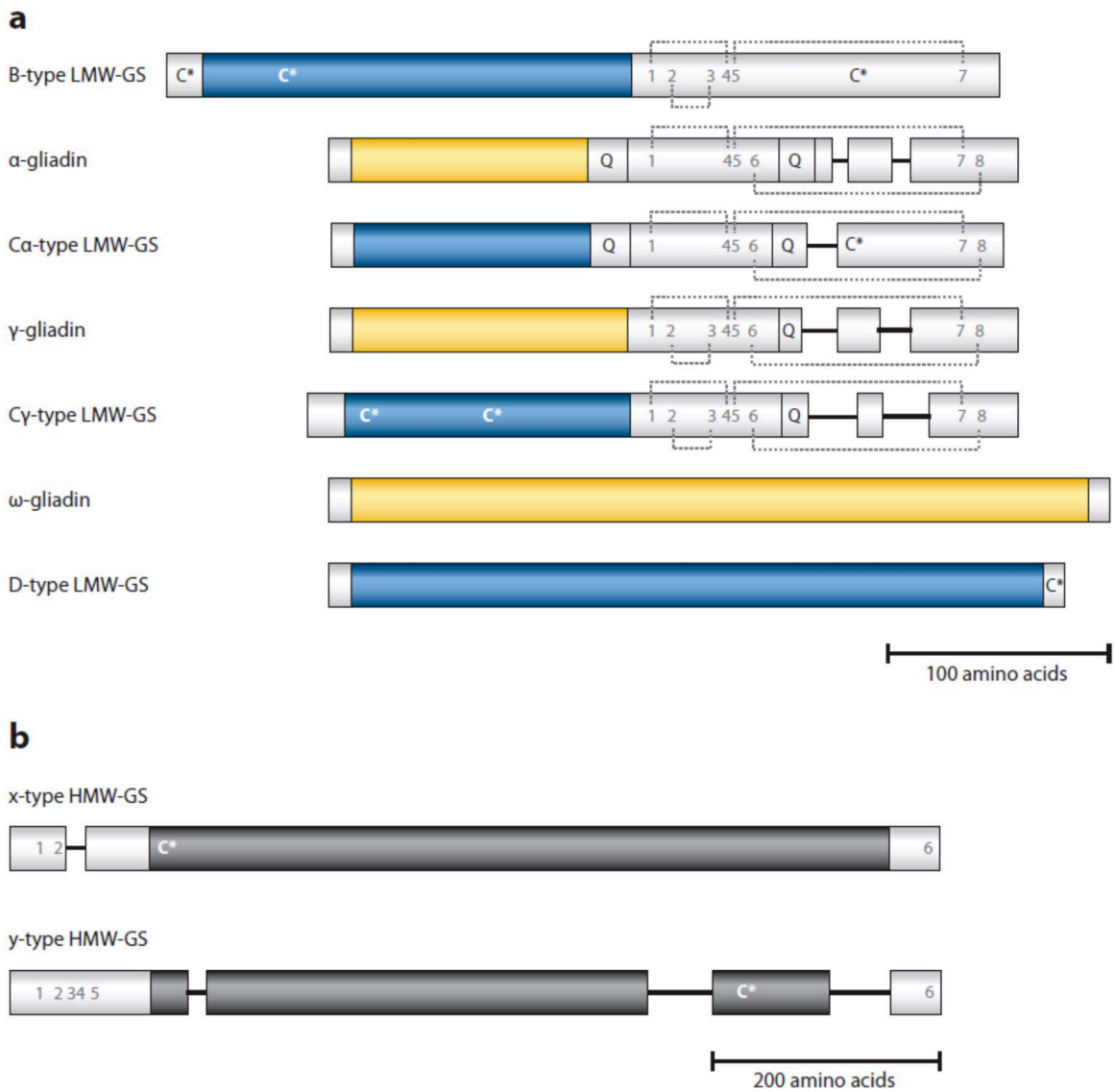


Figure 20 : représentation schématique des domaines structuraux des prolamines (Delcour *et al.*, 2012)

Le domaine C-Terminal

Les α/β et γ-gliadines et les suG-FPM possèdent un domaine C-terminal d'environ 150 AA, dont certaines parties présentent des homologies de séquences entre ces différents groupes de protéines (Balakireva & Zamyatnin, 2016). Les structures 3D de ces protéines ne sont pas connues mais des travaux en dichroisme circulaire ont montré que ce domaine est structuré sous forme d'hélices α reliées par 3 ou 4 ponts disulfures (Mameri *et al.*, 2015; A S Tatham & Shewry, 1985). Le positionnement des cystéines et l'organisation des ponts disulfures sont la signature de la superfamille des prolamines (Mills *et al.*, 2004). Ce domaine est scindé en 2 parties dans les suG-HMW et dans lesquelles il n'existe pas en tant que tel. Au cours de l'évolution une partie du domaine répété se serait inséré au milieu du domaine « prolamine » (Balakireva & Zamyatnin, 2016; Kreis *et al.*, 1985).

Les ω-gliadines, quant à elles, ne possèdent pas ce domaine C-Terminal et sont quasi exclusivement constituées d'un domaine répété plus long que dans les autres gliadines et suG (Balakireva & Zamyatnin, 2016).

Les domaines répétés

La plus grande particularité des prolamines du blé réside dans leur domaine répété dont la composition en AA est dominée par la présence de glutamine et de proline (en moyenne 45% et 23% des AA respectivement) (Popineau & Denery-Papini, 1996). Ces domaines contiennent également de nombreux AA hydrophobes tels que la phénylalanine, la tyrosine et la leucine. Les suG-HPM contiennent de plus de nombreuses glycines (Peter Koehler et al., 2014). Les séquences d'AA répétées dans ces domaines présentent de fortes homologies entre elles. Du fait d'insertion(s), d'échange ou de délétion(s) d'AA, elles varient en longueur (5 à 9 AA) mais aussi en fréquence (jusqu'à plus de 20 fois) selon les prolamines (A S Tatham & Shewry, 2008). Le motif QQPQQPFP est ainsi fréquent dans les $\omega_{1,2}$ et les γ gliadines, le motif QQQFP dans les ω_5 gliadines, et les séquences QPQPFP et PQQPYP dans les α gliadines. Les suG-FPM sont caractérisées par la séquence QQQPPFS et les suG-HPM par QQPGQG, YYPTSP et le tripeptide QQG (Tableau 3).

α/β gliadines	γ gliadines	$\omega_{1,2}$ gliadines	ω_5 gliadines	suG FPM	suG HPM
QPQPFP PQQPYP	QQPQQPFP	QQPQQPFP	QQQFP	PQQPPFS	QQPGQG YYPTSP QQG

Tableau 3 : Séquences caractéristiques des domaines répétés des prolamines de blé (Peter Koehler et al., 2014)

La séquence d'une γ-gliadine (UniProtKB-P08453) présentée ci-dessous illustre la fréquence et l'homologie des séquences répétées des prolamines (Figure 21). Dans le domaine répété (séquence soulignée), la séquence PQQPFPQ est répétée 8 fois de suite avec des espacements de 1 ou 3 AA. Des séquences proches telles que PQQTFP (en noir), PQQPQQ (en bleu), ou PQQQ(V/L/R)P (en orange) sont également répétées au moins deux fois.

```
1   NIQVDPSGQV QWLQQQLVPQ LQQPLSQQPQ QTFPQPQQTF PHQPQQQVPQ50
51  PQQPQQPFLQ PQQPFPQQPQ QPFPQTQQPQ QPFPQQPQQP FPQTQQPQQP100
101 FPQQPQQPFP QTQQPQQPFP QLQQPQQPFP QPQQQLPQPQ QPQQSFPQQQ150
151 RPFIQPSLQQ QLNPCKNILL QQSKPASLVS SLWSIIWPQS DCQVMRQQCC200 201
    QQLAQIPQQL QCAAIHSVVH SIIMQQQQQQ QQQQGIDIFL PLSQHEQVGQ250
251 GSLVQGQGII QPQQPAQLEA IRSLVLQTLP SMCNVYVPPE CSIMRAPFAS300
301 IVAGIGGQ308
```

Figure 21 : Séquence d'une γ-gliadine (UniProtKB-P08453)

Ces domaines répétés sont considérés comme ne présentant pas de structures secondaires, mais des travaux menées sur une γ-gliadine purifiée et sur des protéines recombinantes suggèrent que son domaine répété adopte une structure en hélice de type β (poly-L-proline I et II) (Mameri et al., 2015; A.S. Tatham, Masson, & Popineau, 1990; A S Tatham & Shewry, 1985).

2.3.1.3. Les ω-gliadines

Les ω-gliadines représentent 5 à 10 % des protéines de la farine (Altenbach *et al.*, 2018). Elles ne possèdent pas de domaine C-terminal et leur domaine répété couvre plus de 90 % de leur séquence. Elles sont classées en 2 groupes : les $\omega_{1,2}$-gliadines et les ω_5-gliadines qui diffèrent par leurs séquences N-terminales et par les séquences répétées dans leur domaine central. Les $\omega_{1,2}$-gliadines commencent par les AA ARE, ARQ ou KEL et leur domaine central contient la séquence répétée PQQPFP alors que les ω_5-gliadines commencent par SRL et possède de multiples répétitions des séquences FPQQQ et QQIPQQ (Altenbach *et al.*, 2018).

Séquence d'une $\omega_{1,2}$-gliadine

La Figure 22 présente une séquence d'$\omega_{1,2}$-gliadine (UniProtKB-Q9FUW7). Comme dans la γ-gliadine (Figure 21), la séquence PQQPFPQ (en rouge) apparait de nombreuses fois (9 fois), notamment au travers de 3 dimères de cette séquence. Par ailleurs, cette même séquence tronquée à ses extrémités, QQPFP (en noir), se répète 5 fois. Des séquences proches de ce penta-peptide où la phénylalanine (F) est substituée par une tyrosine (Y, en bleu), une isoleucine (I, en orange) ou une thréonine (T, en orange) sont présentes 4, 2 et 1 fois respectivement.

```
1   ARELNPSNKE LQSPQQSFSY QQQPFPQQPY PQQPYPSQQP YPSQQPFPTP 50
51  QQQFPEQSQQ PFTQPQQPTP IQPQQPFPQQ PQQPQQPFPQ PQQPFPWQPQ 100
101 QPFPQTQQSF PLQPQQPFPQ QPQQPFPQPQ LPFPQQSEQI IPQQLQQPFP 150
151 LQPQQPFPQQ PQQPFPQPQQ PIPVQPQQSF PQQSQQSQQP FAQPQQLFPE 200
201 LQQPIPQQPQ QPFPLQPQQP FPQQPQQPFP QQPQQSFQQP QQPYPQQQPY 250
251 GSSLTSIGGQ
```

Figure 22 : Séquence d'une $\omega_{1,2}$-gliadine (UniProtKB-Q9FUW7)

Séquence d'une ω5-gliadine

La Figure 23 présente une séquence d'ω5-gliadine (UniProtKB-Q402I5). La séquence QQFPQQ se retrouve 20 fois dans cette séquence (en rouge). Des séquences proches de cet hexa-peptide où la phénylalanine (F) est substituée par une isoleucine (I, en vert), une leucine (L, en orange), une proline (P, en noir) ou une sérine (S, en bleu) sont présentes 10, 4, 2 et 1 fois respectivement.

```
1   SRLLSPRGKE LHTPQEQFPQ QQQFPQPQQF PQQQIPQQHQ IPQQPQQFPQ50
51  QQQFLQQQQI PQQQIPQQHQ IPQQPQQFPQ QQQFPQQHQS PQQQFPQQQF100
101 PQQKLPQQEF PQQQISQQPQ QLPQQQQIPQ QPQQFLQQQQ FPQQQPPQQH150
201 QFPQQQLPQQ QQIPQQQQIP QQPQQIPQQQ QIPQQPQQFP QQQFPQQQFP200
251 QQQFPQQEFP QQQQFPQQQI ARQPQQLPQQ QQIPQQPQQF PQQQQFPQQQ300
301 SPQQQQFPQQ QFPQQQQLPQ KQFPQPQQIP QQQQIPQQPQ QFPQQQFPQQ350
351 QQFPQQQEFP QQQFPQQQFH QQQLPQQQFP QQQFPQQQFP QQQQFPQQQQ400
401 LTQQQFPRPQ QSPEQQQFPQ QQFPQQPPQQ FPQQQFPIPY PPQQSEEPSP450
451 YQQYPQQQPS GSDVISISGL420
```

Figure 23 : Séquence d'une ω5-gliadine (UniProtKB-Q402I5)

Tatham et Shwery proposent que la séquence consensus du domaine répété des ω5-gliadines soit $FPQ_{2\text{-}4}$ où la phénylalanine (F) peut être remplacée par une isoleucine (I), une leucine (L) et moins fréquemment par une proline (P) ou une sérine (S) (Arthur S Tatham & Shewry, 2012).

Bien que plus d'une centaine de séquences d'ω5-gliadines soit présentes sur GeneBank (NCBI), seules 3 séquences sont complètes (Altenbach *et al.*, 2018). Récemment, l'analyse de 14 variétés de blé tendre, de blé dur et d'engrain a montré que la séquence QQFPQQ était la plus fréquente (Du *et al.*, 2015).

2.3.2 La fraction albumines/ globulines (focus LTP)

Peu d'études ont détaillé la composition protéique de la fraction albumines/globulines de la farine de blé car, bien que ces protéines soient essentielles pour le développement du grain et sa germination, elles ont un impact limité sur la qualité boulangère de la farine de blé. Ces protéines qui ont des fonctions métaboliques ou de structure, se situent essentiellement dans la couche aleurone du grain, à sa périphérie, et dans le germe. De ce fait, certaines d'entre elles ne se retrouvent pas qu'en faible quantité dans la farine. Ces protéines se répartissent dans 14 familles telles que les ATIs, les β-amylase, les peroxidases, les nsLTP et les serpins (inhibiteurs de protéases à serine) notamment (A S Tatham & Shewry, 2008). Les proportions, les fonctions et les données structurales disponibles des principales protéines de cette fraction sont présentées dans le tableau ci-dessous

Nom	Proportion de la fraction protéique	fonction	Famille protéique	Référence bibliographique
ATI Inhibiteurs d'α-amylase	4 %	Inhibition d'enzymes d'insectes	superfamille des prolamines	(Tundo *et al.*, 2018)
Serpins Inhibiteurs de protéases à sérine	1.6 %	Peu clair. Certaines serpin de blé sont capables d'inhiber de la chymotrypsine	superfamille des Serpins	(Mameri, Denery-Papini, *et al.*, 2012)
Triticines	1.6 %	inconnue	Legumin-like type 11S/12S	(Goel *et al.*, 2015)
Purinines	0.9 %	inconnue	superfamille des prolamines	(Kasarda, Adalsteins, Lew, Lazo, & Altenbach, 2013)
Farinines	0.8 %	inconnue	superfamille des prolamines	(Kasarda *et al.*, 2013)
nsLTP, Protéines de tranfert de lipids non spécifiques		Signalisation Défense contre stress biotiques ou abiotiques	superfamille des prolamines	(Kouidri, Whitford, Suchecki, Kalashyan, & Baumann, 2018)

Tableau 4 : Principales familles de protéines de la fraction albumine globulines. Leur proportion ont été déterminée par (Vensel *et al.*, 2014)**.**

2.3.2.1. Les inhibiteurs d'α-amylase et de trypsine (ATI)

Les ATIs recouvrent un ensemble d'au moins 19 protéines de 13 à 16 kDa (Altenbach, Vensel, & Dupont, 2011; Dupont, Vensel, Tanaka, Hurkman, & Altenbach, 2011; A S Tatham & Shewry, 2008). Certaines d'entre elles s'associent pour former des dimères (24-30 kDa) et des tétramères (50-60 kDa). Les ATI représentent 35 % des protéines de la fraction albumine/globuline (4% de la totalité des protéines) (Dupont *et al.*, 2011). Les ATI jouent un rôle important dans la protection des réserves d'amidon et de

protéines du grain contre les dégradations, en particulier celles causées par les stress biotiques comme les attaques des insectes (Franco, Rigden, Melo, & Grossi-de-Sá, 2002; Guo *et al.*, 2012)

2.3.2.2. Les nsLTP

Les nsLTP sont des protéines de moins de 10 kDa, ubiquitaires chez les plantes, qui appartiennent à la superfamille des prolamines. Les nsLTP se caractérisent par leur capacité à fixer différents lipides dans une cavité hydrophobe. Chaque nsLTP est spécifique de certains tissus et de certaines étapes du développement de la plante (Salminen, Blomqvist, & Edqvist, 2016). Bien que leurs fonctions précises soient inconnues et sans doute spécifiques de chaque protéine, les nsLTP sont associées au développement de différents organes de la plantes mais aussi à la défense des plantes contre des stress biotiques ou abiotiques (Bakan *et al.*, 2006). Dans le grain de blé, la nsLTP1 serait impliquée dans la synthèse de la subérine (Salminen *et al.*, 2016).

2.4. Les glutens modifiés

Comme d'autres aliments tels que le lait ou l'œuf, la farine de blé est fractionnée en sous-produits. Ainsi l'amidon est transformé en sirop de glucose par l'industrie amidonnière. Compte tenu des volumes d'amidon extraits, le gluten est, en tant que sous-produit, une source de protéines abondante et meilleur marché que les protéines animales (Day, Augustin, Batey, & Wrigley, 2006). Le gluten peut être alors utilisé en tant qu'ingrédient pour renforcer la qualité boulangère des farines ou pour texturer/épaissir de nombreux produits. Cependant, ses caractéristiques physico-chimiques qui font sa force pour la panification ou la pastification, sont un inconvénient pour l'incorporer dans une large gamme de produits. En effet les protéines du gluten sont insolubles dans des solutions aqueuses et leur propension à s'agréger et à former un réseau limitent leur usage.

Depuis les années 1950, plusieurs procédés chimiques ou enzymatiques ont été décrits pour augmenter la solubilité du gluten et lui conférer de nouvelles propriétés fonctionnelles.

2.4.1 Procédés chimiques

Parmi eux, la désamidation des nombreuses glutamines présentes dans les protéines de gluten et/ou la protéolyse ont été fréquemment utilisées. La désamidation par hydrolyse acide a été décrite dès 1959 (Holme & Briggs, 1959). Le gluten désamidé par cette méthode a été proposé comme substitut du blanc d'œuf dans les desserts à la meringue et le glaçage des gâteaux (Mc Donald & Pence, 1961) ou comme émulsifiant dans les produits laitiers (Wu, Nakai, & Powrie, 1976). Outre l'hydrolyse de la fonction amide des glutamines, ce traitement cause également une hydrolyse modérée des liaisons peptidiques des protéines de gluten. La désamidation par hydrolyse alcaline a ensuite été proposée par Batey & Gras en 1981 (Batey & Gras, 1981). Cette hydrolyse alcaline est connue pour provoquer

non seulement une hydrolyse et une désamidation partielles, mais aussi la formation de liaisons covalentes intra ou intermoléculaires agrégeant les proteines (Provansal, Cuq, et Cheftel 1975). En 2001, Kumagai *et al.* ont publié une méthode de désamidation du gluten par résine échangeuse de cations (Kumagai, Norimatsu, Hashizume, Sakurai, & Kumagai, 2001).

2.4.2 Procédés enzymatiques

Les méthodes enzymatiques décrites pour modifier le gluten sont pour la plupart basées sur l'utilisation d'enzymes protéolytiques. L'hydrolyse de la pepsine a été décrite pour la première fois par Draudt *et al.* en 1965 (Draudt, Whistler, Babel, & Reitz, 1965). L'utilisation de la trypsine, de la papaïne, de la broméline ou de la subtilisine a été décrite par la suite (Day *et al.*, 2006). Dans les années 1990, la désamidation enzymatique du gluten a également été proposée. Ainsi, Larré *et al.* ont décrit la désamidation des gliadines par la transglutaminase du foie de cobaye qui catalyse les réactions de désamidation ou de réticulation en fonction de la disponibilité des amines primaires (Larré, Chiarello, Blanloeil, Chenu, & Gueguen, 1993). L'utilisation d'une autre glutaminase, la protéine glutaminase, qui a l'avantage de ne pas créer de liaisons intermoléculaires ou d'hydrolyser la liaison peptidique, a été proposée par Hamada et al en 1994 pour améliorer la fonctionnalité des protéines alimentaires (Hamada & Swanson, 1994) puis appliquée au gluten (Yong, Yamaguchi, & Matsumura, 2006).

2.4.3 Utilisation industrielle

Depuis au moins les années 1990, plusieurs de ces traitements ont été appliqués industriellement. En particulier, la désamidation chimique, effectuée dans des conditions acides ou alcalines, qui est une méthode facile à mettre en œuvre à l'échelle industrielle.

Il existe une grande diversité de glutens modifiés qui ont des applications différentes dans l'industrie alimentaire mais aussi dans l'industrie cosmétique. Par exemple, certains glutens modifiés ont été ainsi utilisés pour leurs propriétés émulsifiantes et ont remplacé les protéines d'œufs (mayonnaise, sauces, glaçages) ; d'autres, comme sources de protéines, ont remplacé les protéines de lait (régimes à base d'aliments faibles en glucides ou pour végétariens). En cosmétique, on les retrouve dans les après-shampooings, les crèmes ou les savons auxquels ils donnent une texture onctueuse. Ces produits ont été étiquetés sous plusieurs noms : protéines de blé, isolats de protéines de blé, hydrolysats de blé ou protéines de blé hydrolysées (HWP pour « Hydrolyzed Wheat Proteins » dans la littérature scientifique anglophone), qui ne reflètent pas toujours leurs caractéristiques : le terme "Isolat" indique que 80% du poids total est constitué de protéines mais ne donne aucune indication sur l'état natif ou modifié des protéines dont il est composé ; cet état dépend du procédé utilisé pour l'enrichissement en protéines.

Les termes "hydrolysats de blé" ou "protéines de blé hydrolysées" sont plus précis puisqu'ils indiquent que les protéines ont subi une modification entraînant une protéolyse. Cependant, selon la méthode utilisée (hydrolyse chimique ou enzymatique) et l'intensité du traitement, la taille et la structure moléculaire des constituants générés ainsi que, l'allergénicité potentielle des protéines modifiées peuvent être très différentes. Ainsi, à la suite de réactions allergiques sévères, les hydrolysats obtenus par traitements acides ne sont plus commercialisés en Europe depuis le début des années 2010.

2.5. Les pathologies liées à la consommation de la farine de blé autres que l'allergie

Les protéines de gluten ont la particularité unique d'être exceptionnellement enrichie en glutamine et en proline. Ceci les rend très résistantes à la digestion gastro-intestinale (Wieser, 2007). L'incapacité des protéases gastriques et pancréatiques, ainsi que des endopeptidases de la bordure de la brosse de l'épithélium, à cliver les liaisons proline-glutamine dans les séquences des protéines de gluten, permet à des fragments peptidiques d'échapper à la dégradation protéolytique (Shan et al., 2002). Ces peptides de gluten conservent un potentiel immunogène marqué, car ils traversent la barrière épithéliale de l'intestin grêle et peuvent déclencher une réponse immunitaire, indésirable chez certains individus sensibles (Matysiak-Budnik et al., 2008).

La consommation de farine de blé entraine ainsi 2 types de pathologies chez un petit nombre de personnes : la maladie céliaque et l'allergie alimentaire à la farine de blé. Récemment une 3ème entité pouvant être liée à la consommation de blé a été nommée hypersensibilité au blé (Figure 24).

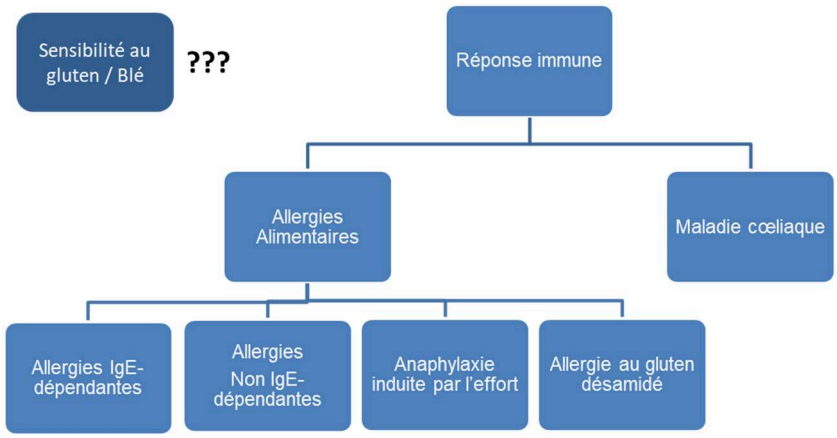


Figure 24 : Pathologies associées à la consommation de blé

2.5.1 La maladie cœliaque

La maladie cœliaque est définie comme une entéropathie immunitaire persistante de l'intestin grêle avec des caractéristiques auto-immunes causée par l'ingestion de gluten de blé, de seigle et d'orge chez des sujets ayant une prédisposition génétique dominante et nécessaire (HLA-DQ2 ou -DQ8) (Ludvigsson et al., 2013). Le principal facteur environnemental connu responsable de la maladie cœliaque est la consommation de gluten, mais le ou les facteurs initiateurs restent encore largement inconnus (Katharina A. Scherf et al., 2020). Les patients développent des anticorps muqueux caractéristiques (généralement des IgA) contre la transglutaminase tissulaire (TG2). Celle-ci peut désamider les peptides de gluten, ce qui améliore leur présentation par HLA-DQ2 ou -DQ8 sur les cellules présentatrices d'antigènes de la muqueuse intestinale, et cela augmente leur potentiel de stimulation des cellules T (Molberg et al., 1998). Bien que de telles réponses des cellules T spécifiques au gluten soient caractéristiques de la maladie cœliaque, on ne connait pas exactement quels événements provoquent la perte de la tolérance des muqueuses aux antigènes alimentaires dans cette pathologie. De nombreuses études suggèrent actuellement l'implication d'autres agents environnementaux, y compris l'exposition à des virus et à des bactéries (Katharina A. Scherf et al., 2020).

La maladie cœliaque se manifeste principalement dans la muqueuse de l'intestin grêle supérieur (duodénum, jéjunum proximal) et se caractérise par une atrophie villositaire et une hyperplasie des cryptes, qui peuvent varier d'une légère atteinte partielle à une absence totale de villosités. La pathologie se présente sous des formes symptomatique, asymptomatique, potentielle et réfractaire et peut survenir à tout âge. En particulier, Elle se présente souvent avec une grande variété de symptômes extra-intestinaux, y compris des maladies auto-immunes associées (Fasano et al., 2003 ; Kahaly et al., 2018 ; Lundin et Sollid, 2014 ; Schuppan et al., 2009). Le seul traitement efficace à ce jour est un régime alimentaire qui exclut les sources de gluten et repose essentiellement sur la consommation d'aliments naturellement sans gluten tels que les produits d'origine animale, les fruits, les légumes, les légumineuses et les noix, ainsi que les produits diététiques sans gluten qui ne peuvent pas contenir plus de 20 mg/kg de gluten selon le Codex Alimentarius (norme Codex 118-1979).

La prévalence mondiale de la maladie cœliaque, basée sur les cas confirmés par biopsie, est estimée à 0,7% (confiance de 95 % , CI 0,5-0,9%) avec de grandes divergences régionales (Singh et al., 2018). Elle est estimée à 1% dans les pays occidentaux (Lebwohl, Ludvigsson, & Green, 2015). Elle est significativement plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, et chez les enfants que chez les adultes (Singh et al., 2018)

2.5.2 L'hypersensibilité au blé non cœliaque

L'hypersensibilité au blé non cœliaque n'est actuellement pas bien caractérisée. Elle se définit par des troubles digestifs et extradigestifs peu spécifiques rapportés après la consommation de blé en absence de maladie cœliaque ou d'allergie au blé (Catassi *et al.*, 2013). Les symptômes recouvrent en partie ceux du syndrome de l'intestin irritable, ce qui rend difficile l'étude de ses causes (Catassi *et al.*, 2017). Le gluten a tout d'abord été incriminé car un régime sans blé semblait améliorer l'état des patients. Son implication est aujourd'hui largement discutée et d'autres constituants du blé sont suspectés :

- les FODMAPS (mono-, di- et oligosaccharides et polyols fermentescibles), dont les fructanes présents dans le blé,
- les inhibiteurs de la trypsine et de l'α-amylase (ATI) qui pourraient jouer un rôle pro-inflammatoire (Biesiekierski, Muir, & Gibson, 2013; Junker et al., 2012).

2.6. Les allergies à la farine de blé

2.6.1 Classification des allergies alimentaires au blé

La farine de blé peut provoquer des allergies alimentaires mais aussi des allergies respiratoires ou des allergies cutanées dites de contact (Figure 25). Les allergies provoquées par l'ingestion de blé sont classées dans 3 groupes en fonction de leurs caractéristiques cliniques et des allergènes incriminés. Du fait d'un tableau clinique très particulier, l'anaphylaxie au blé induite par l'effort (AIE) constitue un groupe. Plus récemment, l'allergie alimentaire induite après une sensibilisation au gluten désamidé a été défini comme un groupe distinct.

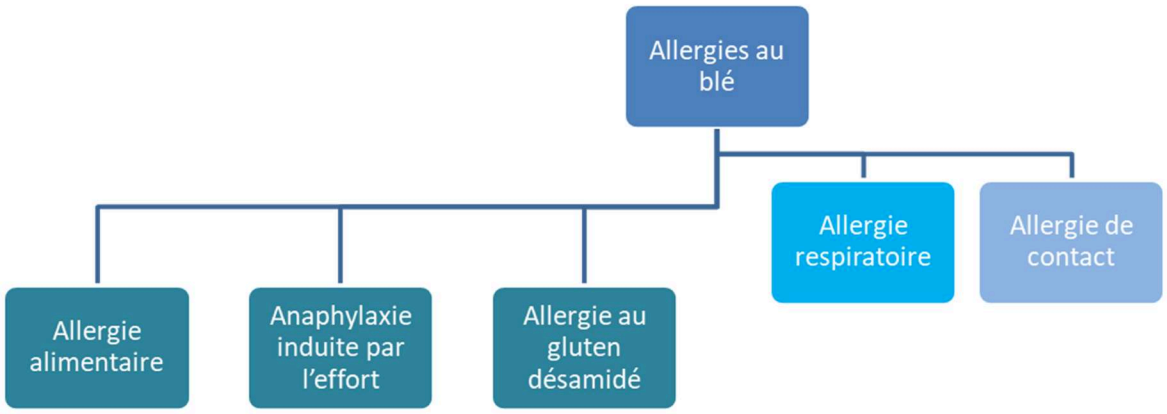


Figure 25 : Classification des allergies provoquées par la farine de blé

2.6.1.1. L'allergie alimentaire à la farine de blé

L'allergie alimentaire au blé concerne essentiellement les enfants et plus rarement les adultes (M. Mäkelä, 2016). La plupart des études ont été menées sur de populations pédiatriques. Les enfants sont pour la plupart allergiques à d'autres aliments tels que le lait, l'œuf ou l'arachide (Czaja-Bulsa & Bulsa, 2017). Une très forte proportion d'entre eux souffre de dermatite atopique (Battais *et al.* : 96%, (3,6 ans, 1-13ans) ; Mäkelä *et al.* : 83% (1,5 ans, 0.6-17,3 ans) ; Sievers *et al.* : 89 %, (3 ans) ; Nilsson *et al.* : 69% (6,5 ans, 1-17)).

Cette allergie provoque aussi des symptômes immédiats qui se développent dans les 1 à 2h qui suivent l'ingestion tels que urticaire, anaphylaxie, angio-oedème et troubles gastro-intestinaux (Czaja-Bulsa & Bulsa, 2017). Des travaux de Battais, Mäkelä et Nilsson, il ressort que 33 %, 23% et 35%, respectivement, des enfants développent des symptômes sévères de type asthme et anaphylaxie (Fabrice Battais *et al.*, 2005; M. J. Mäkelä *et al.*, 2014; Nilsson *et al.*, 2015; Sievers, Rawel, Ringel, Niggemann, & Beyer, 2016). Chez les adultes, les symptômes cutanés (urticaire, dermatite atopique, prurit) sont fréquents, la dermatite atopique est parfois associé à de l'asthme, et certains patients souffrent d'anaphylaxie (Fabrice Battais *et al.*, 2005; Weichel *et al.*, 2005).

2.6.1.2. Anaphylaxie au blé induite par l'effort (AIE)

L'anaphylaxie induite par l'effort est une allergie au blé potentiellement sévère qui ne se produit qu'en présence d'un cofacteur. Les symptômes classiques sont le prurit, l'urticaire, l'angio-œdème, la dyspnée, l'obstruction des voies respiratoires supérieures, des symptômes gastro-intestinaux, de l'hypotension et si les symptômes s'aggravent un bronchospasme, un collapsus vasculaire ou un choc anaphylactique (K. A. Scherf, Brockow, Biedermann, Koehler, & Wieser, 2016).

Les cofacteurs les plus fréquents sont la pratique d'un exercice physique même si son intensité est modérée, la prise d'antiinflammatoires non stéroïdiens tels que l'aspirine ou l'ibuprofen, ou la consommation d'alcool (réseau d'allergo-vigilance). Pour les patients souffrant d'AIE au blé, il est recommandé qu'ils ne pratiquent pas d'exercice physique dans les 3h qui suivent ou dans l'heure qui précède la consommation d'un produit contenant du blé (Robson-Ansley & Du Toit, 2010). Il est à noter que chez certains patients souffrant d'AIE, une réaction allergique reste possible même sans cofacteur identifié (M. J. Christensen, Eller, Mortz, Brockow, & Bindslev-Jensen, 2018). La dose d'allergène nécessaire pour déclencher ces réactions sans cofacteur est alors plus importante et les symptômes sont moins sévères. Le terme « facteur augmentant » semble ainsi plus approprié que le terme cofacteur (Niggemann & Beyer, 2014).

La prévalence précise de l'AIE au blé n'est pas connue. Elle concerne principalement les adultes. En France le réseau d'allergo-vigilance a recensé, de 2002 à 2015, que le blé a été responsable de 1 % des cas d'anaphylaxie chez les enfants et de 5,8 % des cas chez les adultes (Renaudin *et al.*, 2017).

2.6.1.3. L'allergie au gluten désamidé

Les premiers cas d'allergie impliquant des produits contenant des hydrolysats de protéines de blé ou HPB (hydrolyzed wheat proteins ou HWP) ont été décrits en Europe entre les années 2000 et 2006 (Espagne, Finlande, France). Il s'agissait principalement de cas d'urticaire de contact liés à des cosmétiques (Lauriere *et al.*, 2006; Pecquet, Lauriere, Huet, & Leynadier, 2002; Sanchez-Perez, Sanz, & Garcia-Diez, 2000; Varjonen, Petman, & Mäkinen-Kiljunen, 2000). Laurière *et al.* ont notamment décrit une série de neuf patients français, tous tolérants au blé, avec une urticaire de contact à des produits cosmétiques contenant des HPB et mentionnent que six d'entre eux avaient aussi déclaré une urticaire ou une anaphylaxie lors de la consommation d'aliments contenant des HPB (Lauriere *et al.*, 2006). Les cosmétiques à l'origine des réactions allergiques, des produits hydratants pour le corps ou le visage, des shampooings, après-shampooings ou gels douche appartenaient à 11 marques différentes. Le type d'HPBs présent dans ces produits n'est pas connu. Dans un cas d'allergie professionnelle avec réaction immédiate lors de la manipulation d'un produit cosmétique, le Tritisol (Croda, Royaume-Uni) a été identifié sans ambiguïté comme le produit déclencheur (Delaunay *et al.*, 2018). Lors d'un test cutané, ce patient a réagi positivement au Tritisol et au produit cosmétique contenant 12% de Tritisol et négativement au gluten ; il avait également des anticorps IgE dirigés contre le gluten désamidé.

En France, Denery-Papini *et al.* ont décrit 15 cas d'allergie alimentaire liés à l'ingestion d'HPB : charcuteries, viandes reconstituées, soupes, gâteaux industriels (Denery-Papini *et al.*, 2012). Trois de ces patients avaient également réagi à des cosmétiques contenant des HPB. Ces 15 patients ont eu des réactions sévères aux HPB (anaphylaxie induite par l'effort ou AIE, anaphylaxie, urticaire) ; 14 d'entre eux toléraient les aliments à base de blé non modifié et le 15ème patient a réagi également lors d'un test de provocation orale au blé non modifié associé à un effort. Tous ces patients étaient sensibilisés à un gluten désamidé. Le premier de ces cas avait été décrit en 2003 après consommation d'un HPB. Ce dernier nommé GemTec (Manildra Group, Australie), incorporé dans la charcuterie, était responsable de la réaction allergique ; vendu en tant qu'"isolat de blé", il a été caractérisé comme un gluten désamidé. Dès 2006, un extrait de gluten désamidé a été proposé pour le diagnostic de ces patients (Fabrice Battais et al., 2006; Virginie Leduc, Moneret-Vautrin, Guerin, Morisset, & Kanny, 2003). Entre 2002 et 2014, 25 cas d'accidents allergiques graves aux HPB ont été recensés par le Réseau d'Allergo-Vigilance ; aucun cas n'a été déclaré depuis 2014.

Des incidents similaires se sont produits au Danemark (M. J. Christensen, Stahl Skov, Poulsen, Bindslev-Jensen, & Mortz, 2017). L'anaphylaxie a été déclenchée chez neuf patients après la consommation de produits contenant un HPB appelé Meripro 711 (Tereos Syral, France). Les neuf patientes danoises toléraient le blé, mais un diagnostic d'AIE au blé a été établi par la suite pour trois d'entre eux. Ces patients avaient des anticorps IgE spécifiques, des tests cutanés positifs et des tests d'activation du basophil à Meripro 711. Il est à noter que cette publication ne rapporte que des cas féminins, ce qui soulève des questions concernant une éventuelle sensibilisation cutanée avec des cosmétiques.

Plusieurs centaines de cas d'allergies sévères aux HPB ont été récemment décrits au Japon. Ces cas sont liés à l'utilisation du savon Cha no Shizuku® contenant un hydrolysat acide de gluten, le Glupearl 19S. Les premiers cas ont été observés en 2009 (Chinuki & Morita, 2012; Fukutomi *et al.*, 2011). En 2012 et 2013, respectivement plus de 1300 et 2000 cas d'allergie au blé étaient recensés chez des individus, en grande majorité des femmes, ayant utilisé ce savon (M. Nakamura *et al.*, 2014; Teshima, 2014). Les cas japonais [8] se caractérisent par une phase de sensibilisation de plusieurs mois par voie percutanée et/ou rhino-conjonctivale par lavage du visage. Une partie des patients a développé une urticaire puis une AIE lors de la consommation de produits à base de blé. Les délais rapportés entre l'utilisation du savon et l'apparition de l'AIE au blé varient entre 1 mois et 5 ans (Chinuki & Morita, 2012). Les autres patients ont développé directement une réaction systémique à l'ingestion de blé, parfois dans le cadre d'un effort modéré. Le symptôme prédominant était un angio-œdème des paupières ; la plupart des patients ont rapporté des anaphylaxies et quelques chocs anaphylactiques.

Les cas décrits au Japon et au Danemark sont liés à l'utilisation d'un gluten désamidé. Bien que le type de HPB présent dans les produits consommés ne soit pas identifié pour les 15 patients français, tous sont sensibilisés au gluten désamidé. La source allergénique semble donc la même dans ces groupes de patients français, danois et japonais.

Très récemment, une étude génétique portant sur 3152 sujets a identifié 3 variants de HLA-DQ associés à une augmentation du risque de développer une allergie au gluten désamidé (Noguchi *et al.*, 2019). Il est à noter que l'un d'entre eux, HLA-DQ8, est également associé à la maladie céliaque. Par contre, aucune des 5 mutations les plus communes de la fillagrin affectant la perméabilité cutanée, n'ont pas été identifiées.

L'évolution de ces allergies n'a été suivie qu'au Japon. Sur 11 patients, Hiragun *et al.* indiquent une diminution des concentrations en IgE mesurées vis-à-vis du gluten non modifié quelques mois après l'arrêt de l'utilisation du savon (Hiragun *et al.*, 2013). Certains patients sont alors à nouveau capables de tolérer du blé en faible quantité et en l'absence de cofacteurs. En 2016, une étude rétrospective portant sur 110 patients a rapporté un taux de rémission d'environ 50 % cinq ans après l'arrêt de

l'utilisation du savon et un taux de résolution plus élevé chez les sujets de moins de 30 ans (Hiragun, Ishii, Yanase, Hiragun, & Hide, 2016).

2.6.2 Prévalence et évolution naturelle

La prévalence des allergies alimentaires au blé confirmées par un test de provocation orale ou par une histoire clinique convaincante, tant chez les enfants que chez les adultes, est estimée autour de 1 % (0,4 -4 %) avec des variations en fonction de l'âge et des zones géographiques considérés (Nwaru *et al.*, 2014; Östblom *et al.*, 2008; Zuidmeer *et al.*, 2008).

Avec le lait, l'œuf, l'arachide, le poisson et le soja, le blé est fréquemment responsable d'allergie alimentaire chez le jeune enfant et son évolution naturelle est le plus souvent favorable (Keet *et al.*, 2009). Les taux de résolution sont de 20 % à l'âge de 4 ans, de 52 % à l'âge de 8 ans, de 66 % à l'âge de 12 ans et de 76 % à l'âge de 18 ans (Kotaniemi-Syrjänen *et al.*, 2010). L'âge médian d'acquisition de tolérance est de 6,5 ans (Czaja-Bulsa & Bulsa, 2014; Keet *et al.*, 2009). Une étude récente menée sur 10 adultes souffrant d'allergie au blé révèle également une résolution favorable en 5 ans de leur allergie pour 9 d'entre eux (J Scibilia *et al.*, 2019).

2.6.3 Protocoles d'immunothérapie

Comme pour d'autres allergies alimentaires, l'immunothérapie orale a été envisagée pour traiter l'allergie au blé. A ce jour, toutes les études publiées portent sur des groupes d'enfants et d'adolescents (Kulmala et al., 2018; Lauener et al., 2017; Nowak-Węgrzyn et al., 2019; Rodríguez Del Río et al., 2014; Sato et al., 2015). Il ressort de ces travaux que l'immunothérapie orale au blé permet de désensibiliser (cf page 30) plus de la moitié des patients et prévient ainsi du risque de réaction en cas d'exposition accidentelle à de petites doses de blé. Dans deux études, l'efficacité de l'immunothérapie orale à induire une tolérance a aussi été évaluée (Nowak-Węgrzyn *et al.*, 2019; Sato *et al.*, 2015). Ainsi 30 % des patients suivis dans l'étude de Nowak-Wegrzyn *et al.* tolèrent une dose de 7.45 g de gluten, 8 mois après l'interruption du traitement. Dans l'étude de Sato *et al.*, 61 % des patients tolèrent une dose de 5,2 g de protéines de blé 2 semaines après l'arrêt du traitement.

Il est à noter que les réactions allergiques liées aux protocoles d'immunothérapie orale au blé sont fréquentes et parfois sévères. Dans certains protocoles, les symptômes sévères sont néanmoins plus rares (Lauener *et al.*, 2017; Rodríguez Del Río *et al.*, 2014). Le type de produit à base de blé utilisé (Céréales hydrolysées) et/ou l'association de traitement limitant les réactions allergiques pourraient expliquer cette moindre sévérité.

2.7. Les allergènes de la farine de blé

La caractérisation détaillée des allergènes alimentaires de la farine de blé a permis d'améliorer le diagnostic de l'allergie alimentaire au blé en limitant le recours au test de provocation orale. En effet les tests de détection des IgE, basés sur des extraits salins - et donc incomplets - de protéines, s'avéraient trop peu spécifiques (nombreux faux positifs) (Beyer *et al.*, 2008; Joseph Scibilia *et al.*, 2006; Sievers *et al.*, 2016). Parallèlement, plusieurs travaux ont eu pour but d'explorer le répertoire IgE des patients en lien avec les différents phénotypes cliniques d'allergie alimentaire au blé touchant l'enfant et l'adulte.

Vingt-huit allergènes issus de la farine de blé sont aujourd'hui référencés dans la base de donnée « ALLERGEN NOMENCLATURE » de l'OMS/IUIS (Tableau 5). Dix-huit d'entre eux y sont explicitement associés à une allergie alimentaire. Ils se répartissent dans les 2 grandes groupes de protéines de la farine de blé, les albumines/globulines et les protéines du gluten (http://allergen.org/).

Tri a 12	Profiline
Tri a 14	protéine de transfert des lipides non spécifique
Tri a 15	inhibiteur d'a-amylase monomérique 0.28
Tri a 17	beta-amylase
Tri a 18	Agglutinine isolectine 1
Tri a 19	w5-gliadine
Tri a 20	g-gliadine
Tri a 21	a-gliadine
Tri a 25	Thioredoxine
Tri a 26	suG-HPM
Tri a 27	homolgue de la thiol réductase
Tri a 28	inhibiteur d'a-amylase dimérique 0.19
Tri a 29	inhibiteur d'a-amylase tétramérique CM1/CM2
Tri a 30	inhibiteur d'a-amylase tétramérique CM3
Tri a 31	Triosephosphate-isomerase
Tri a 32	1-cys-peroxiredoxine
Tri a 33	Serpin
Tri a 34	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
Tri a 35	Dehydrine
Tri a 36	suG-FPM

Tri a 37	purothionine alpha
Tri a 39	Serine protease inhibitor-like protein
Tri a 40	inhibiteur d'a-amylase CM17
Tri a 41	Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1
Tri a 42	Hypothetical protein from cDNA
Tri a 43	Hypothetical protein from cDNA
Tri a 44	Endosperm transfer cell specific PR60 precursor
Tri a 45	Elongation factor 1 (EIF1)

Tableau 5 : Liste des allergène du blé référencés par l'OMS/IUIS (http://allergen.org/). Les allergènes explicitement associés à une allergie alimentaire sont mis en gras.

2.7.1 Allergènes et épitopes impliqués dans l'anaphylaxie induite par l'effort.

2.7.1.1. Profils de sensibilisations

Les ω_5-gliadines ont été mises en évidence comme allergènes majeurs de l'AIE pour la première fois en 1999 puis en 2001 sur des patients finlandais (K. Palosuo, Alenius, Varjonen, Kalkkinen, & Reunala, 2001; Kati Palosuo *et al.*, 1999). Dans ces 2 études, portant en grande partie sur les mêmes patients, tous avaient des IgE dirigées contre les ω_5-gliadines. De même, dans une série de 6 patients souffrant d'AIE d'allergie au blé, Battais *et al.* observent que tous ont des IgE qui reconnaissaient les ω_5-gliadines (Fabrice Battais *et al.*, 2005).

Sans remettre en cause la prédominance des ω_5-gliadines, plusieurs études conduites depuis lors ont montré que dans 20 à 30 % de cas d'AIE d'autres protéines de la farine de blé sont impliquées. Une étude menée sur des patients français a ainsi observé que seuls 75% des patients souffrant d'AIE avait des IgE spécifiques aux ω_5-gliadines (Jacquenet *et al.*, 2009). Ainsi les suG-HPM ont été identifiées dans une série de patients japonais (3/15) et une série de patients français (1/11) (Altenbach *et al.*, 2015; Hiroaki Matsuo, Kohno, Niihara, & Morita, 2005; Hiroaki Matsuo *et al.*, 2004). Sur une série de 48 patients souffrant d'AIE, Takahashi *et al.* remarquent de plus que ce sont essentiellement des patients entre 10 et 20 ans qui sont sensibilisés au suG-HPM (Takahashi *et al.*, 2012). La LTP est également mise en évidence chez certains patients souffrant d'AIE (Bodinier *et al.*, 2008; Capra *et al.*, 2017; Denery-Papini *et al.*, 2011; Hofmann *et al.*, 2012; Pastorello *et al.*, 2007). Par ailleurs des profils de sensibilisations comprenant des α et γ-gliadines, des suG-FPM, des ATI, des peroxydases et des triticins sont également décrits (Altenbach *et al.*, 2015; Hofmann *et al.*, 2012; Pastorello *et al.*, 2007).

Les profils de sensibilisation des patients sensibilisés aux ω5-gliadines réalisés sur les différentes protéines du gluten purifiées révèlent fréquemment que les autres gliadines et les suG-FPM sont également reconnues, la plupart des fois à des niveaux nettement inférieurs que ceux observés sur les ω5-gliadines (Altenbach *et al.*, 2015; Fabrice Battais *et al.*, 2005; Hofmann *et al.*, 2012; Hiroaki Matsuo *et al.*, 2004; Kati Palosuo *et al.*, 1999). Ces observations traduisent vraisemblablement le plus souvent les réactivités croisées des IgE anti ω_5-gliadines avec les autres protéines du gluten qui possèdent des séquences proches.

2.7.1.2. Epitopes

Les épitopes dominants reconnus par les IgE des patients souffrant d'AIE au blé sur l'ω_5-gliadine et sur les gluténines HPM ont été identifiés par pepscan et sont présentées dans le Tableau 6 (F Battais *et al.*, 2005; Denery-Papini *et al.*, 2011; Hiroaki Matsuo, Kohno, & Morita, 2005; Hiroaki Matsuo *et al.*, 2004). De ces travaux la séquence consensus fixant les IgE sur l'ω_5-gliadine a été déduite : QQX_1PX_2QQ, où X_1 peut être I, L, F, S, ou Y and X_2 peut être Q, G or E (F Battais *et al.*, 2005). Ce motif est répété de nombreuses fois dans les ω_5-gliadines. La séquence QQFPQQQ est également présente dans certaines suG-FPM et explique en partie que la plupart des patients sensibilisés aux ω_5-gliadines le soit également aux suG-FPM (Altenbach *et al.*, 2015). Néanmoins, d'autres épitopes ont été identifiés sur les suG-FPM (Bouchez-Mahiout, Snégaroff, *et al.*, 2010; Denery-Papini *et al.*, 2011; Mameri, Snégaroff, *et al.*, 2012). Trois séquences ont été identifiées sur suG-HPM : QQPGQ, QQPGQGQQ, et QQSGQGQ (Hiroaki Matsuo, Kohno, Niihara, *et al.*, 2005). Concernant la LTP, Les épitopes reconnus par les IgE sont essentiellement, si ce n'est exclusivement, conformationnels (Denery-Papini *et al.*, 2011). Bien que la technique du pepscan ne soit pas adaptée pour identifier ce type d'épitopes, deux séquences ont néanmoins été identifiées par cette technique (Tableau 6).

référence	allergène	Epitopes majeurs	Epitopes mineurs
(Hiroaki Matsuo *et al.*, 2004)	ω_5-gliadines	**QQIPQQQ** **QQFPQQQ** **QQSPEQQ** **QQSPQQQ**	QQLPQQQ QQYPQQQ PYPP
(Hiroaki Matsuo, Kohno, & Morita, 2005)	ω_5-gliadines	**YQQYPQQ**	QQFHQQQ QSPEQQQ QQPPQQ
(F Battais *et al.*, 2005)	ω_5-gliadines	**FHQQQLPQQQ** **QQQLPQQQFP** **QQQFPQQQFP**	QQPQQLPQQQ PQQLPQQQIP LPQQQIPQQP PRPQQSPEQQ PQQSPEQQQF PEQQQFPQQQ
(Denery-Papini *et al.*, 2011)	ω_5-gliadines	**FPQQQQFPQP** **QQQQIPQQQI** **QQFPQQQQLP** **QQQQLPQQQF** **PQQIPQQQQI** **HQQQLPQQQF** **RPQQSPEQQQ**	QQFPQQQQFL FPQQQSPQQQ QPQQLPQQQF QPQQFPQQQF PQQQFPQQQF PYQQYPQQQP QQFPQQQQFP FPQQQIPQQH EQQQFPQQQF PQQQQFPQQQ PQPQQIPQQQ QFPQQQFPQQ QPQQFPQQQI PQQQQFPQQQ QQQQFPQQQS
(Denery-Papini *et al.*, 2011)	suG-FPM		QQPIQQQP QSRYEAIRAI QQFPQQQPCS QCSPVAMPQS LPQIPQQRSY PFVHPSILQQ
(Mameri, Snégaroff, *et al.*, 2012)	suG-FPM	**QQPIQQQPQQ** **QQQIPFVH**	QQFPQQQP QQQQPVLLQQ ILQQLNPCKV VAMPQSLA LQQSSCHVMQ LPQIPQQSRY QQPQQLGQCV
(Hiroaki Matsuo, Kohno, Niihara, *et al.*, 2005)	suG-HPM	**QQPGQ** **QQPGQGQQ** **QQSGQGQ**	
(Denery-Papini *et al.*, 2011)	LTP		GQCCDGVKNL QARSQSDRQS

Tableau 6 : Epitopes reconnus par les IgE de patients souffrant d'AIE

2.7.1.3. Activité fonctionnelle

La présence d'IgE spécifiques d'un allergène ne signifie pas nécessairement que cet allergène soit capable d'induire la dégranulation des basophiles et des mastocytes sensibilisés par ces IgE. La capacité des ω_5-gliadines à induire une dégranulation a tout d'abord été mise en évidence par tests cutanés (Morita *et al.*, 2003; K. Palosuo *et al.*, 2001). Bodinier *et al.* ont par la suite décrit des tests cutanés positifs avec une fraction d'ω-gliadines (8 patients sur 10) mais aussi avec des α-gliadines (5 patients sur 12) et des suG-FPM (5 patients sur 12) (Bodinier *et al.*, 2008). Cette activité déclenchante des ω5-gliadines et des suG-FPM a également été mise en évidence dans deux modèles de basophiles de rat humanisés et sensibilisés avec des sérums de patients souffrant d'AIE (Bodinier *et al.*, 2008; Chinuki *et al.*, 2012).

2.7.2 Allergènes et épitopes impliqués dans l'allergie alimentaire à la farine de blé.

2.7.2.1. Profils de sensibilisation

Peu d'études ont exploré en détail (c'est-à-dire en utilisant au moins 4 fractions ou protéines différentes) les profils de sensibilisation chez des patients allergiques à la farine de blé. Compte tenu de la forte prévalence de cette allergie chez les enfants par rapport aux adultes, les populations étudiées sont essentiellement pédiatriques (M. J. Mäkelä *et al.*, 2014; Nilsson *et al.*, 2015). Seules 2 études conduites dans notre laboratoire portent à la fois sur des adultes et des enfants (Fabrice Battais *et al.*, 2005; Mameri, Denery-Papini, *et al.*, 2012). Cependant, la population adulte décrite dans les études de Mameri *et al.* et de Battais *et al.* est en partie composées de patients souffrant d'anaphylaxie induite par l'effort.

Ces 4 études diffèrent également du fait des méthodes et des fractions/protéines utilisées pour déterminer les profils de sensibilisation. Ainsi, dans l'étude de Mameri *et al.*, seules des fractions de gliadines totales et de suG-FPM sont testées parmi les protéines du gluten, alors que seules les ω5-gliadines sont testées dans l'étude de Nilsson *et al.*. La comparaison est encore plus délicate en ce qui concerne la fraction albumines/globulines. En effet, cette fraction est soit spécifiquement préparée par extraction séquentielle (Fabrice Battais *et al.*, 2005; Mameri, Denery-Papini, *et al.*, 2012), soit juste enrichie et peu caractérisée dans le test Immunocap Phadia sur l'extrait Wheat F4 (M. J. Mäkelä *et al.*, 2014; Nilsson *et al.*, 2015).

Malgré ces différences de méthodologie, il ressort que contrairement à ce qui est observé dans l'AIE, les patients allergiques au blé sont fréquemment sensibilisés à plusieurs allergènes présents dans les 2 fractions principales de la farine de blé : les protéines du gluten et les albumines/globulines (Tableau

7). Ainsi plus de 80% des enfants et 60% des adultes sont sensibilisés à au moins une protéine de la fraction albumines/globulines. Des pourcentages supérieurs sont logiquement obtenus quand la réactivité des patients est déterminée par ImmunoCap Wheat-F4 car cette fraction contient également des gliadines.

	Battais 2005	Battais 2005	Mameri 2012	Nilsson, 2015	Mäkelä, 2014
	enfants	adultes	enfants	enfants	enfants
nombre de patients	31	29	82	32	30
Methodes	ELISA	ELISA	ELISA	ImmunoCap	ImmunoCap et micro array
IgEs +	87%	93%			
Albumines/ globuline	84%	59% (63%)	89%		
Wheat F4				100%	97%
Gliadines			79%	94%	93%
Gluten	55%	79%			93%
α-gliadines	39%	7% (8%)			53%
β-gliadines	29%	7% (8%)			60%
γ-gliadines	23%	3% (8%)			70%
ω2-gliadines	29%	14% (17%)			63%
ω5-gliadines	26%	48% (38%)		63%	50%
suG-FPM	29%	31% (25%)	63%	72%	83%
suG-HPM	26%	31% (33%)		91%	60%
LTP	35%	21% (21%)	55%		33%
ATI (monomer 0.28)					33%
ATI (dimer 0.19)					60%
ATI (tetramer CM2, 3, 16)					37%
serpin			23%		
farinins					47%

Tableau 7 : Profil de sensibilisation de patients allergiques à la farine de blé

Les protéines du gluten sont également très souvent reconnues par les patients : de 55 % à 93 % selon les études. Les profils de réactivités sur les différentes gliadines et suG ont été déterminés dans les études de Battais *et al.* et de Mäkelä *et al.*. Chez les enfants, toutes ces protéines sont reconnues dans les mêmes proportions au sein de chaque étude : de 23 à 39 % pour Battais *et al.* et de 53 à 83 % dans l'étude de Mäkelä *et al.*. Chez les adultes, le profil de réactivité apparait plus restreint : les ω5-gliadines et les suG apparaissant prédominantes (respectivement 48% et 31%). Il est à noter que les pourcentages de réactivité sont systématiquement supérieurs dans l'étude de Mäkelä *et al.*. Les auteurs suggèrent que cette différence résulterait d'une différence de pureté des protéines testées entre les deux études mais ces différences pourraient aussi être dues à des différence de phénotype cliniques des 2 cohortes (âge, symptômes immédiats ou non, …).

Concernant la réactivité vis-à-vis de protéines particulières de la fraction albumines/globulines, seule la réactivité vis-à-vis de la LTP est commune dans ces différentes études : entre 33% et 55% des enfants sont sensibilisés à la LTP. D'autres protéines de la fraction albumines/globulines ont également été identifiées comme reconnues par les IgE des patients allergiques à la farine de blé. Ainsi Mäkela *et al.* observent que l'ATI 0.19 et la farinine sont fréquemment reconnues ; Mameri *et al.* notent que la serpin l'est par environ 1/4 des patients de leur cohorte, et enfin Baar *et al.* remarquent qu'une purothionine est reconnue par 1 patient sur 6. Ces études portant sur des groupes de patients différents, il est difficile de comparer les fréquences de reconnaissance. Cependant prises dans leur ensemble, ces 3 études montrent que les patients sont fréquemment sensibilisés à plusieurs protéines de la fraction albumines / globulines.

Le lien entre certaines protéines de la farine de blé et la sévérité des symptômes observés après un test de provocation orale nous donnent des éléments indirects sur les protéines impliquées dans l'allergie. Ainsi Makela *et al.* observent que les γ-gliadines et et les suG-HPM sont les marqueurs qui prédisent le mieux les réactions sévères au test de provocation orale (M. J. Mäkelä *et al.*, 2014). Des résultats similaires ont été obtenus par Nilsson *et al.* en 2015. Dans ce travail où la réactivité aux albumines/globulines n'est explorée qu'au travers d'un extrait des protéines totales de la farine de blé dans lequel, à l'exception de l'ω_5-gliadine, les gliadines ne sont pas individualisées. Gliadines totales, ω5-gliadine, gluténines LPM et HPM se révèlent être des marqueurs de symptômes sévères (Nilsson *et al.*, 2015). En 2014, Pahr *et al.* ont observé que l'α-purothionine était reconnue par 53 % des patients souffrant d'anaphylaxie alors que seulement 23 % des patients n'ayant pas d'IgE dirigées contre cette protéines souffraient d'anaphylaxie (Pahr *et al.*, 2013). Une observation similaire avait été faite précédemment par Mameri *et al.* qui avaient mis en évidence la serpin comme marqueur de sévérité. Nous observons donc, d'une part que les profils de sensibilisation des patients sont divers et souvent étendus, et d'autre part que, selon le focus des études citées ci-dessus, différentes protéines signent

la sévérité des symptômes. Ces deux points suggèrent que l'étendue de la sensibilisation pourrait-être le marqueur de sévérité commun à ces différentes études. Le développement et le renforcement de l'allergie au blé chez un patient se traduirait par une diversification du répertoire IgE vers les protéines mineures qui seraient alors marqueurs de la persistance de cette allergie.

2.7.2.2. Activité fonctionnelle

Test cutanés

La présence d'IgE spécifiques signe une sensibilisation mais pas nécessairement que les allergènes reconnus déclenchent des symptômes. Les tests cutanés permettent d'apprécier la capacité d'un allergène ou d'une fraction à provoquer la dégranulation des cellules effectrices de l'allergie, sans avoir les risques de réactions sévères d'un test de provocation orale. Mäkelä *et al.* ont ainsi observé 80 % de prick-tests positifs avec une fraction de gliadines totales et 97% avec un extrait salin (0.9 % NaCl) de farine de blé (M. J. Mäkelä *et al.*, 2014). L'extrait salin de farine de blé utilisé dans cette étude favorise la solubilisation des albumines/globulines de la farine de blé au détriment des gliadines et des suG et suggère leur importance dans ces allergies.

La capacité de certaines albumines/globulines purifiées à provoquer des test cutanés positifs a par ailleurs été démontrée. Ainsi 2 ATIs purifiés (CM3 et CM16) ont induit des prick-tests positifs sur un enfant de 9 mois soufrant d'anaphylaxie au blé (Zapatero *et al.*, 2003). De même, la LTP a induit des tests cutanés positifs chez 5 patients (3 enfants et 2 adultes) sur 6 testés dans l'étude de Bodinier *et al.* et chez 6 adultes souffrant d'anaphylaxie (sans effort) dans l'étude de Palacin *et al.* (Bodinier *et al.*, 2008; Palacin *et al.*, 2010). Concernant les protéines du gluten, les α, les γ et les ω-gliadines et les suG-FPM ont également induit des tests cutanés positifs (Bodinier *et al.*, 2008; Mameri *et al.*, 2015).

Tests de dégranulation de basophiles

Les tests *in vitro* basés sur la dégranulation de basophiles représentent une alternative de plus en plus utilisée pour évaluer le potentiel déclenchant d'un extrait, d'une fraction ou d'un allergène purifié car l'utilisation de fractions purifiée est d'un point de vue éthique et réglementaire de plus en plus difficile à réaliser. Tokuda *et al.* ont ainsi montré que des extraits d'albumines/globulines, de gliadines, de suG ou des ω5-gliadines purifiées activaient les basophiles d'enfants allergiques à la farine de blé (Tokuda *et al.*, 2009). Le potentiel déclenchant de différentes protéines de la fraction albumines/globulines a également été évalué dans une modèle de dégranulation de basophiles de rat humanisés. Ainsi la LTP, une serpin, une β-amylase et des ATIs ont induit la dégranulation de ces basophiles sensibilisés avec des sérums de patients (Bodinier et al., 2008; Hofer et al., 2018; Mameri, Denery-Papini, et al., 2012; Tundo et al., 2018). En ce qui concerne les protéines du gluten, Baar *et al.* observent également qu'une suG-FPM recombinante ou des fragments de suG-HPM recombinants induisent la dégranulation de

basophiles (Baar *et al.*, 2014, 2012). La même observation est faite par Mameri *et al.* en ce qui concerne l'α-gliadine sous forme purifiée ou recombinante (Mameri *et al.*, 2015).

2.7.2.3. Epitopes

Les travaux identifiants des épitopes IgE reconnus dans l'allergie à la farine de blé sont limités et concernent principalement les protéines du gluten, notamment parce que ces protéines sont réputées peu ou pas structurées et permettent l'utilisation de courts peptides synthétiques pour identifier leurs épitopes. Ainsi, Denery *et al.* ont utilisé des peptides de 10 aa pour identifier les épitopes reconnus sur les α, les ω_2 et les ω_5-gliadines et les suG-LPM (Denery-Papini *et al.*, 2011). Neuf et 7 peptides étaient reconnus sur les séquences d'α-gliadines et de suG-FPM respectivement. Ces peptides se situent sur leur domaine répété ou sur leur domaine C-terminal. Sur l'ω_2 et l'ω_5, deux peptides consensus sont ressortis : QQQXP (X= F, I ou L) sur l'ω5-gliadine et QQPFP sur l'ω2-gliadine. Ces peptides étant différents de ceux identifiés dans l'AIE. De cette étude et de celle de Battais *et al.* (F Battais *et al.*, 2005), il ressort également que certains sérums ne réagissent pas contre ces décapeptides alors qu'ils reconnaissent la protéine entière. Cela suggére ainsi que des épitopes non séquentiels ou structurés sont reconnus par les IgE des patients. Mameri *et al.* ont confirmé cette hypothèse sur les gliadines organisées en 2 domaines (α- et γ-gliadines) et la complète en précisant que le domaine répété contiendrait essentiellement des épitopes continus alors qu'ils seraient plutôt discontinus (et donc liés à la structure secondaire et tertiaire) dans le domaine C-terminal de l'α-gliadine (Mameri *et al.*, 2015). Il s'avère d'ailleurs que ces 2 domaines sont nécessaires pour induire la dégranulation de basophiles (Baar *et al.*, 2012; Mameri *et al.*, 2015; Mameri, Snégaroff, *et al.*, 2012)

Les publications concernant les épitopes des albumines/globuline sont encore plus limitées car ces protéines sont très structurées et l'utilisation de peptides synthétiques apporte des informations limitées. Ainsi, il apparait dans le cas de la LTP que la destruction de ses structures secondaires et tertiaire par réduction de ses 4 ponts disulfures limite très fortement la fixation des IgE des patients (Denery-Papini *et al.*, 2011). Néanmoins 5 sérums de patients sur 16 testés en pepscan ont montré une faible réactivité sur des décapeptides et ont révélé 4 peptides différents, l'un d'entre eux étant reconnu par 4 sérums sur 5. La même observation a été faite avec une serpin : la destruction de la conformation par chauffage réduit fortement la reconnaissance de IgE des patients et très peu de sérums ont reconnu des décapeptides (Mameri, Denery-Papini, *et al.*, 2012). A contrario, dans le cas de la purothionine, il apparait que la conformation de la protéine n'impacte pas la fixation des IgE (Pahr *et al.*, 2014).

2.7.3 Allergènes et épitopes impliqués dans l'allergie au gluten désamidé

Deux équipes au Japon ont décrit la réactivité des IgE de patients allergiques au blé après sensibilisation avec un HPB, le Glupearl 19S (Chinuki & Morita, 2012; Fukutomi *et al.*, 2011). Elles mettent en évidence des IgE spécifiques de l'HPB ainsi qu'une plus faible reconnaissance de protéines de la farine de blé (protéines solubles, gliadines et gluténines) dont la reconnaissance est entièrement inhibée par l'HPB. L'exploration de différents HPB par Nakamura *et al.* précise que les IgE ne reconnaissent que les HPB obtenus par hydrolyse acide mais pas ceux obtenus par hydrolyse enzymatique et que les HPB « acides » sont capables d'induire la dégranulation de basophiles sensibilisés avec des sérums de patients contrairement au gluten natif (R. Nakamura *et al.*, 2013).

Bien qu'avec une exploration moins poussée, les neuf cas français décrits par Laurière *et al.* en 2006 présentent des similarités en termes de réactivité IgE (Lauriere *et al.*, 2006). Des tests cutanés réalisés chez quelques patients avec différentes catégories d'HPB indiquent que 3/3 patients réagissent à des hydrolysats acides et 1/3 à un hydrolysat enzymatique ; un dot blot confirme que les IgE de ces patients reconnaissent mieux un hydrolysat acide qu'un hydrolysat enzymatique (Bouchez-Mahiout, Pecquet, *et al.*, 2010). Aucun patient ne réagissait à des protéines de blé natives en test cutané mais les IgE de tous les patients se lient pourtant à des protéines de blé non modifiées en immuno-empreinte. Plus récemment, 10 HPBs commercialisés comme ingrédients dans des cosmétiques ont été analysés par Nakamura *et al.* qui ont montré que quatre d'entre eux ont induit un test cutané positif et des réponses ELISA chez des patients devenus allergiques après sensibilisation avec Glupearl (M. Nakamura *et al.*, 2016). Selon leur fiche technique, trois de ces produits ont été obtenus par hydrolyse enzymatique et avaient un MW moyen inférieur à 3 500 Da tandis que le quatrième a été obtenu par hydrolyse alcaline.

2.7.3.1. Allergènes

Dans les cas français liés à l'ingestion d'aliments contenant des HPBs, Denery-Papini *et al.* ont directement exploré la réactivité des IgE à l'échelle moléculaire à l'aide de protéines purifiées sous forme natives ou désamidées (Denery-Papini *et al.*, 2012). La majorité des patients possède des IgE vis-à-vis de certaines protéines natives, notamment vis-à-vis des γ et des ω_2-gliadines mais pas d'IgE spécifiques des ω_5-gliadines ni des albumines/ globulines. Pour tous les patients la réponse IgE augmente nettement quand ces protéines sont désamidées, en particulier les γ et les ω_2-gliadines désamidées. Ces fractions désamidées sont de plus capables d'induire la dégranulation de basophiles sensibilisés avec les sérums des patients.

2.7.3.2. Epitopes

En se basant sur les séquences natives des deux allergènes les plus reconnus (γ et ω_2-gliadines), un épitope consensus a été identifié sur des décapeptides : QPQQPFPQ (Denery-Papini *et al.*, 2012).

Remarquablement, ce motif est répété au moins huit fois sur les séquences de ces deux gliadines. La réactivité IgE a ensuite été mesurée sur une série de peptides présentant toutes les combinaisons possibles de désamidation de ce peptide natif identifié. Comme sur les protéines, l'intensité de la réponse IgE augmente fortement lorsque plusieurs positions de glutamine sont converties en acide glutamique ; l'épitope désamidé le mieux reconnu par les anticorps IgE des patients correspond au peptide QPEEPFPE.

A leur tour, les chercheurs japonais ont caractérisé les allergènes moléculaires impliqués chez des patients allergiques au blé sensibilisés par voie cutanée (Yokooji *et al.*, 2013, 2015) et ont trouvé des résultats très similaires à ceux observés chez les patients français. En utilisant des gliadines et gluténines recombinantes, ils ont remarqué que les patients étaient fréquemment sensibilisés aux α, γ et ω_2-gliadines natives mais rarement et/ou faiblement aux ω_5-gliadines. Parmi les protéines recombinantes, seules les γ-gliadines étaient capables d'induire la dégranulation de basophiles. À l'aide de peptides synthétiques correspondant à des séquences natives ou désamidées des γ-gliadines, ils ont identifié l'épitope QPQQPQPFPQ sur les protéines natives et l'épitope désamidé PEEPFP sur lequel les IgE des patients se fixaient plus intensément. Il est à noter que cet épitope désamidé est inclus dans l'épitope décrit précédemment par Denery-Papini et al (Denery-Papini *et al.*, 2012). La concordance des études françaises et japonaises dans l'identification des épitopes impliqués dans l'allergie aux HPBs met en évidence les similitudes qui existent entre ces deux groupes de patients.

3. Les IgE chimériques

3.1. Rappels sur la structure des anticorps

3.1.1 Domaines constants : différentes classes et sous classes

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines présents à la surface des lymphocytes B ou sécrétés par ces mêmes cellules. Ils sont composés de 4 chaines polypeptidiques globulaires, 2 chaines lourdes de 50 à 70 kDa chacune et 2 chaines légères de 25 kDa chacune, qui sont associées entre elles par des ponts disulfures (Figure 26). Une chaine lourde est composée de 3 ou 4 domaines constants (selon l'isotype) et d'un domaine variable ; une chaine légère, d'un domaine constant et d'un domaine variable. Les anticorps (historiquement nommés « Ig » car ils ont servi à la définition du terme « immunoglobuline ») sont subdivisés en classes ou « isotypes » selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes qu'ils contiennent : les chaînes γ, α, μ, ε et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD (Wikipedia). De même, il existe 2 isotypes pour le domaine constant des chaines légères, κ ou λ. Enfin, plusieurs sous classes d'IgG (1, 2a, 2b, 3 et 4) et d'IgA (1 et 2) sont définies. A l'exception des IgG4, un anticorps possède des chaines lourdes et légères identiques. L'interaction avec l'antigène se fait au niveau des domaines variables. Un anticorps peut donc fixer 2 antigènes identiques, à condition que l'encombrement stérique de l'antigène le permette. Les domaines constants portent les sites d'interaction liés aux fonctions des anticorps : fixation à différents récepteurs, fixation du complément.

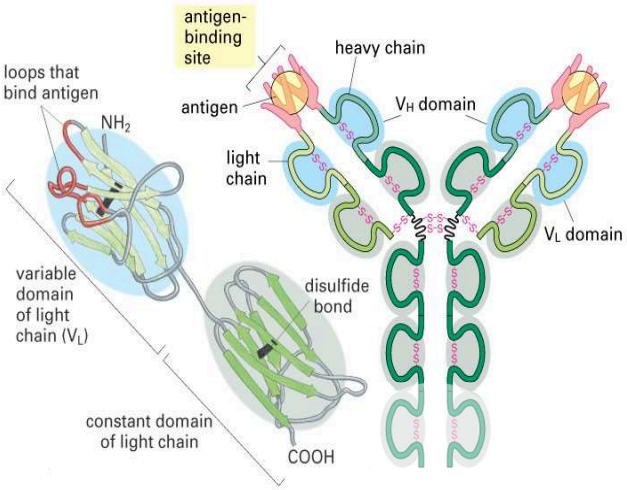


Figure 26 : Domaines structuraux d'une Immunoglobuline

En fonction de leur isotype, les anticorps ont des localisations différentes et leur concentration dans le sang varie grandement (Tableau 8).

Isotype		IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Chaine lourde	type	γ	α	μ	δ	ε
	Nombre de domaines constants	3	3	4	4	4
Localisation		Intra et extra vasculaire	Intravasculaire et muqueuses	Principalement intra vasculaire	Surface des lymphocytes	Surface des mastocytes (tissus) et basophiles (Sang)
Fonctions principales		Réponse immune secondaire	Protection des muqueuses	Réponse immune primaire	Interface entre immunité et inflammation	Protection contre le parasites
Concentration sérique		10-16 mg/mL	1-4 mg/mL	0.5 – 2 mg/mL	0 – 0.4 mg/mL	10 -400 ng/mL

Tableau 8 : Principales caractéristiques des immunoglobulines humaines

La classe des IgE est la plus récente à avoir été identifiée. Elle l'a été au cours des années 60 (Ishizaka & Ishizaka, 1967; S. G. Johansson & Bennich, 1967). Elle est officiellement définie en 1968 (Ishizaka & Ishizaka, 1969). Les IgE, comme les IgM, sont caractérisées par la présence de 4 domaines constants. Elles sont principalement localisées dans les tissus à la surface de différents types cellulaires (notamment basophiles et mastocytes) via les récepteurs FcεRI et FcεRII (CD23). Elles représentent en général moins de 1% des anticorps présents dans le sérum (150 ng/mL chez un individu non atopique).

3.1.2 Domaines variables : une très grande diversité

La diversité des anticorps résulte de plusieurs mécanismes. Au cours de sa différentiation une cellule pré-B exprime à sa surface des anticorps d'une seule spécificité, constitués d'une chaine lourde de type μ ou δ et d'une chaine légère κ ou λ. Les domaines variables des chaines lourde et légère sont issus de la recombinaison de fragments d'ADN pris au hasard dans 3 régions multigéniques (dites V, D et J) pour le domaine variable de la chaine lourde et dans 2 régions (V et J) pour la chaine légère. Par ces

mécanismes d'association de chaines et de recombinaisons plus de 2.10^6 anticorps différents peuvent être générés chez l'homme.

La fixation d'un antigène sur un anticorps membranaire localisé à la surface d'un lymphocyte pré-B mature déclenche sa prolifération et sa différentiation en plasmocyte. Cette différentiation se traduit par une commutation isotypique de classe par recombinaison de l'ADN codant les domaines constants de la chaine lourde qui aboutit à un changement d'isotype (IgG, IgE ou IgA) (Figure 27). Cette commutation isotypique est sous la dépendance de l'environnement cellulaire et cytokinique du lymphocyte. Cette différentiation s'accompagne également de mutations aléatoires de l'ADN, dites hypersomatiques, qui se produisent essentiellement au niveau séquences dites « hypervariables » ou CDR (*Complementary-determining region*) dans les domaines variables des chaines lourde et légère. Quand ces mutations permettent une traduction productive, plusieurs AA sont changés et l'affinité de l'anticorps pour son antigène change. Les lymphocytes B qui produisent les anticorps de plus haute affinité fixent plus facilement leur antigène, ils sont plus facilement activés, ils prolifèrent d'avantage, et les anticorps de haute affinité sont d'avantage sécrétés (Théorie de la sélection clonale).

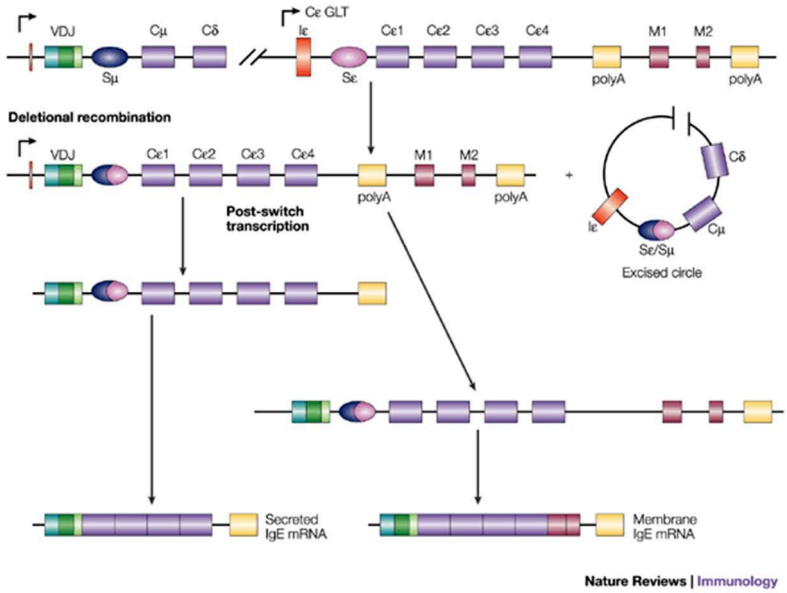


Figure 27 : Commutation isotypique par recombinaison et délétion des locus codants pour les domaines constants des immunoglobulines humaines (Geha, Jabara, & Brodeur, 2003).

3.2. Interaction Anticorps / Antigène

3.2.1 Le paratope

L'interaction d'un anticorps avec son antigène se fait au niveau des domaines variables de la chaine lourde et de la chaine légère de l'anticorps. Les AA impliqués dans cette interaction et leur distribution spatiale définissent le paratope. Ces AA se trouvent préférentiellement dans 3 boucles dites hypervariables, CDR1, 2 et 3, présentes sur chaque chaine. Ces 3 boucles sont orientées pour être exposées à la surface de l'anticorps par 4 régions structurées en feuillets β (FR1, 2, 3 ou 4) (Figure 28).

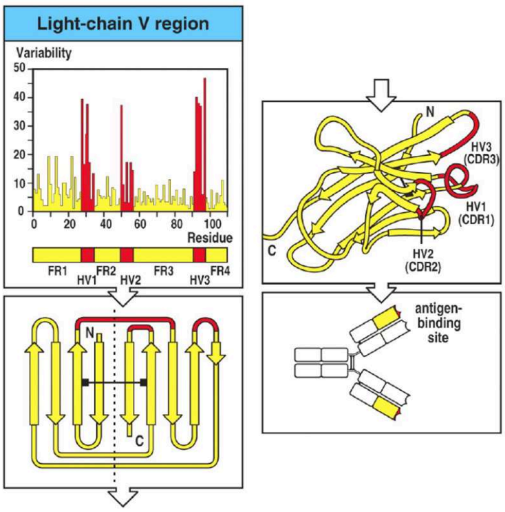


Figure 28 : structuration et diversité des séquences hypervariables des domaines variables des anticorps d'après figure 3-7 dans Immunobiologie 6ème Ed. © Garland science 2005

3.2.2 La relation épitope/paratope

Le paratope définit ainsi l'épitope comme l'ensemble d'AA qui présentent une complémentarité structurale et chimique avec le paratope. Les AA du paratope interagissent avec l'antigène au travers de nombreuses interactions non covalentes : forces de van der Waals, forces électrostatiques, ponts hydrogènes et interactions hydrophobes (Abès, Dutertre, & Teillaud, 2009). Du fait que ces interactions agissent à des distances différentes, l'interaction de l'anticorps avec l'antigène se met en place et se renforce au fur et à mesure que l'épitope et paratope se rapprochent. La somme de ces interactions va déterminer l'affinité avec laquelle un anticorps interagit avec son antigène.

La relation qui lie paratope et épitope n'est pas bijective : un paratope peut interagir avec différents épitopes et un épitope peut réagir avec différents paratopes (Figure 29) (R. C. Aalberse & Crameri, 2011). Dans ces cas-là, les atomes de l'épitope et/ou le type d'interaction en œuvre dans la liaison des divers paratopes sont différents.

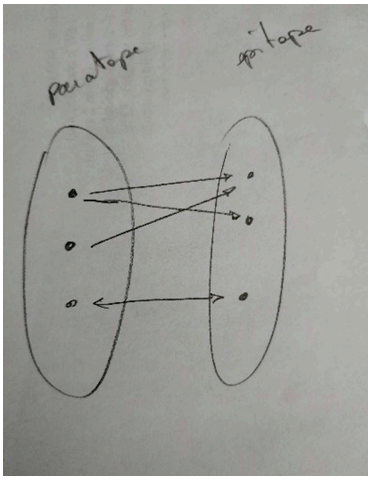


Figure 29 : relation liant paratope épitope

Ce type de relation s'applique plus largement aux diverses interactions fonctionnelles des protéines telles que les enzymes (James & Tawfik, 2003). Dans ce cadre, l'interaction paratope/épitope doit être considérée comme une interaction fonctionnelle et dynamique.

Plusieurs phénomènes ont été proposés pour expliquer la permissivité des interactions paratope/épitope observées. Le premier repose sur le fait que certains paratopes puissent se retrouver dans différentes conformations, soit préexistantes à l'interaction (stéréo-isomères), soit induites par l'interaction entre le paratope et l'épitope du fait de leur plasticité (James, Roversi, & Tawfik, 2003). Ces mécanismes expliquent notamment les cas de réactivité croisée où les différents épitopes reconnus ont des caractéristiques structurales proches (R. C. Aalberse & Crameri, 2011). Dans la plupart des cas de réactivités croisées, les affinités d'interaction du paratope avec les différents épitopes sont différentes (Van Regenmortel, 2014). La seconde hypothèse qui explique les interactions avec des ligands sans liens structuraux (multi-spécificité), repose sur le fait que des paratopes distincts puissent coexister sur un même anticorps (James *et al.*, 2003).

Ces notions de réactivité croisée et de multi-spécificité amènent à considérer avec circonspection la notion de spécificité des IgE. En conséquence, les anticorps peuvent présenter des spectres plus ou moins larges de spécificité et les épitopes, et donc les antigènes, reconnus par un unique anticorps le sont avec des affinités différentes. Aalberse et Cameri observent d'ailleurs que les IgE ont tendance à présenter davantage de réactivités croisées que les IgG (R. C. Aalberse & Crameri, 2011). Du point de vue fonctionnel, l'interaction IgE-allergène est une étape indispensable à l'apparition des symptômes et ces deux caractéristiques de l'interaction, affinité et spécificité, sont à considérer.

3.2.3 Conséquences sur l'identification des épitopes

Une fois qu'un allergène est identifié, différentes techniques permettent de localiser les épitopes IgE qu'il contient. Ces techniques utilisent :

- des allergènes recombinants dans lesquels certains AA sont remplacés et supprimés ;
- des peptides issus de l'hydrolyse d'un allergène ;
- des peptides synthétiques correspondant à des zones précise d'un allergène (par exemple Pepscan) ;
- des banques de peptides aléatoires où la structure des peptides liant des IgE sera ensuite rapprochée avec celle de peptides présents dans l'allergène exploré (mimotopes).

Le plus souvent ces techniques sont qualitatives et ne permettent pas de déterminer les affinités des interactions en jeu afin de les comparer avec les affinités vis-à-vis de l'allergène entiers.

Les épitopes peuvent correspondre à un enchaînement continu ou discontinu des AA d'un allergène et/ou adopter des conformations contraintes par la structure de l'allergène. Dans la littérature, l'identification d'épitopes continus prédomine car la détermination de la structure d'un allergène ou de ses mutants recombinants ou de peptides synthétiques sont des approches longues et complexes (Lollier, Denery-Papini, Brossard, & Tessier, 2014). Cependant, cette notion d'épitope continu/discontinu a été récemment revisitée, la frontière entre continu et discontinu apparaissant floue et difficile à définir : les épitopes discontinus peuvent être considérés comme une succession d'épitopes continus plus courts reconnus avec une moindre affinité que l'épitope complet (R. C. Aalberse & Crameri, 2011; Schramm *et al.*, 2001).

Un épitope est en général constitué de 5 à 10 AA. Par conséquent l'utilisation de peptides ou de fragments plus longs ne permet d'identifier précisément les AA impliqués dans l'interaction avec les IgE. A contrario l'utilisation de peptides courts (8 à 10 AA) nécessitent des techniques sensibles afin de révéler, le cas échéant, les portions d'épitopes discontinus.

L'absence ou la faible reconnaissance de peptides linéaires comparée à celle de l'allergène entier et structuré indique que les épitopes doivent adopter des conformations particulières pour interagir avec les IgE. Dans ce cas, des approches structurales lourdes (recombinants mutés, mimotopes) doivent être conduites pour identifier les épitopes.

3.3. Les IgE chimériques

Les anticorps monoclonaux (AcMx) occupent aujourd'hui une grande part de l'arsenal thérapeutique. Les AcMx et les produits dérivés d'anticorps (fragments d'AcMx, protéines-fusion avec un fragment Fc, anticorps conjugués à des composés actifs) étaient en 2013 la classe de médicaments dominant le marché pharmaceutique (Ecker, Jones, & Levine, 2015).

La spécificité fine et la forte affinité permettent en effet aux AcMx de bloquer des récepteurs ou l'action de molécules circulantes ou de toxines. Dans le domaine de l'allergie, l'Omalizumab se fixe sur les IgE et empêche leur liaison au récepteur FcεRI. Cet anticorps est utilisé en traitement symptomatique dans les cas d'asthme sévère et, depuis peu, proposé dans les protocoles d'immunothérapie afin de limiter les réactions les plus sévères.

Les AcMx chimériques sont des anticorps constitués de domaines constants et variables provenant d'espèces différentes (Figure 30). Un anticorps est dit humanisé quand seules les zones hypervariables, les CDR, ne sont pas humaines. Ces constructions permettent ainsi d'obtenir des anticorps fonctionnels sur des cellules humaines qui auront une spécificité précise obtenue après immunisation dans une espèce de laboratoire telle que la souris.

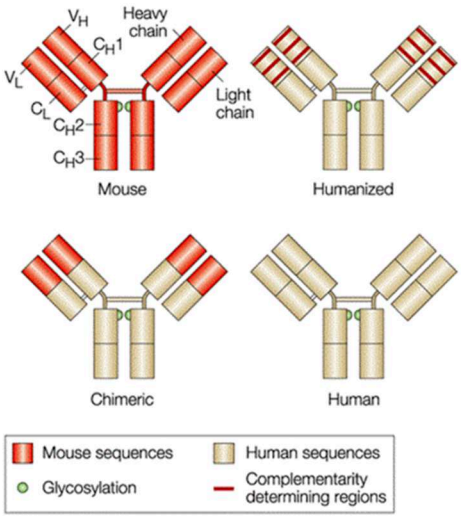


Figure 30 : Structure des anticorps chimériques et humanisés

3.3.1 Les IgE chimériques en thérapeutique

Les fonctions biologiques portées par le fragment Fc des anticorps sont utilisées comme supportant l'activité de certains AcMx thérapeutiques. Ces activités biologiques permettent en effet d'engager/activer différent éléments du système immunitaire du patient (cellules, complément) qui participent alors activement à l'effet thérapeutique (Gould & Sutton, 2008). Les IgG sont très

largement représentées parmi les AcMx thérapeutiques. Cependant la faible affinité du Fcγ pour ses récepteurs et la présence de récepteurs inhibiteurs dans le microenvironnement tumoral seraient des limitations expliquant la faible efficacité des IgG thérapeutiques dans le traitement de certains cancers. Depuis les années 90, l'hypothèse que les IgE aient également des fonctions de surveillance et d'éradication des tumeurs a été posée et par la suite observé pour le cancer du pancréas et de certaines leucémies chez l'enfant (Jensen-Jarolim & Pawelec, 2012; Neuchrist *et al.*, 1994). En effet, la haute affinité du FcεRI, l'absence de récepteurs inhibiteurs au Fcε, la localisation préférentiellement tissulaire des IgE et les fonctions déjà connues des mastocytes et des basophiles suggèrent que les IgE seraient efficaces dans l'élimination des cellules tumorales. Plusieurs stratégies basées sur l'utilisation d'IgE ont ainsi été proposées : l'utilisation d'IgE comme adjuvant ou des vaccins recouvert d'IgE, l'immunothérapie orale visant à induire des IgE spécifiques de tumeurs et l'utilisation d'IgE chimériques visant des antigènes tumoraux (Josephs, Spicer, Karagiannis, Gould, & Karagiannis, 2014). Quelques IgE chimériques pour le traitement contre le cancer sont aujourd'hui en phase d'évaluation préclinique.

3.3.2 Les IgE chimériques en allergologie moléculaire

Les IgE recombinantes ont été initialement développées pour étudier plus finement le répertoire IgE des patients et identifier les épitopes réellement impliqués dans la phase symptomatique de l'allergie. En effet, les IgE présentes dans les sérums des patients, qui sont par nature polyclonales et présentes en faible quantité, ne permettent pas d'individualiser la réponse liée à des épitopes précis sur un allergène. Les IgE recombinantes sont au contraire monoclonales et possède une réactivité parfaitement définie. Il est possible de les produire en quantité suffisante pour mener des études détaillées.

Ces IgE recombinantes sont produites par transfection de vecteurs d'expression dans des cellules de mammifères, CHO ou HEK dans la plupart des cas, pour permettre un repliement, la formation de ponts disulfures et la glycosylation, de façon similaire aux IgE humaines. Les domaines constants des chaines lourde et légère sont clonés soit à partir d'une lignée myéloïde humaine, soit à partir de PBMC de patients ou soit directement synthétisés à partir de séquence déposées sur genBank (Flicker *et al.*, 2000; Furtado *et al.*, 2002; Hecker *et al.*, 2012; Knipping *et al.*, 2014). Les 2 premières approches ont l'avantages d'inclure les introns, qui lorsqu'ils sont présents dans les systèmes d'expression eucaryotes, favorisent l'expression des immunoglobulines (Norderhaug, Olafsen, Michaelsen, & Sandlie, 1997). Ces séquences sont introduites dans des vecteurs d'expression dans lesquels on insère alors, à l'aide d'enzymes de restriction, les séquences codant les domaines variables d'un anticorps. Les séquences codant ces domaines variables sont isolées soit à partir de cellules de patients soit à

partir de cellules produisant des AcMx provenant d'autres espèces. Dans ce dernier cas les IgE produites sont dites chimériques.

L'utilisation de cellules de patients pour isoler les séquences codant les domaines variables permet la correspondance avec le répertoire des patients mais cette approche nécessite d'identifier les épitopes reconnus quand cela est possible. Les AcMx murins sont en général mieux définis, d'une part parce que l'immunogène est connu, d'autres part parce que l'identification de l'épitope reconnu est techniquement plus facile. Ces anticorps sont également bien plus accessibles que les cellules des patients.

Les gènes codant les chaines lourde et légère de l'IgE recombinante peuvent être situés sur des vecteurs différents ou sur un seul vecteur. La présence des 2 chaines sur un seul vecteur facilite l'expression combinée dans des cellules en culture (Dodev *et al.*, 2014). Les chaines lourde et légère ainsi clonées, sont ensuite exprimées dans des cellules de mammifères. Les lignées HEK et CHO sont les plus fréquemment utilisées. Des lignées de cellule B, réputées pour produire efficacement des anticorps recombinants pourraient être utilisées, mais cela n'a pas encore été décrit pour des IgE chimériques.

L'expression de protéines recombinantes en cellule eucaryote peut être transitoire ou stable. Dans le cas d'une expression transitoire, l'ADN du vecteur ne s'intègre pas dans l'ADN nucléaire, il n'est pas répliqué au cours de divisions cellulaire et finit par disparaitre au cours des divisions des cellules transfectées. Quand on utilise un vecteur pour la chaine lourde et un autre pour la chaine légère, certaines cellules n'intègrent qu'un des deux vecteurs. Comme la chaine lourde n'est pas sécrétée en l'absence de chaine légère, le surnageant des cellules ainsi transfectées contient un mélange d'anticorps entiers et de chaines légères. Obtenir une lignée stable nécessite de sélectionner les rares cellules qui ont intégré l'ADN du ou des vecteurs dans leur ADN nucléaire qui sera alors répliqué au cours des divisions cellulaires. Des antibiotiques de sélection sont alors utilisés pour éliminer les cellules n'ayant pas intégré dans leur ADN nucléaire le ou les vecteurs codant pour les chaines lourde et légère.

4. Données actuelles sur l'organisation structurale des épitopes et le déclenchement des symptômes allergiques

Les symptômes allergiques sont provoqués par l'activation et la dégranulation des basophiles et des mastocytes. En 1969, Ishizaka et Ishizaka suggèrent pour la première fois que l'agrégation, suite à la liaison à un allergène, d'au moins deux IgE à la surface des cellules effectrices de l'allergie est indispensable au relargage d'histamine (Ishizaka & Ishizaka, 1969). Différents modèles cellulaires ont ensuite été développés pour étudier cette phase de dégranulation. La plupart sont basés sur l'utilisation de lignées de basophiles qui ont l'avantage d'être plus facilement mises en œuvre que des prélèvements de patients.

L'utilisation d'anticorps de patients, polyclonaux par nature, et d'allergènes peu caractérisés ont tout d'abord limité la portée de ces travaux sur l'organisation spatiale des épitopes dans l'allergène. L'utilisation d'IgE monoclonales et d'allergènes parfaitement définis contenant des répétitions du même épitope a permis la progression des connaissances à la fois sur les paramètres liés au basophiles et ceux propres à l'interaction des IgE avec les allergènes

4.1. Paramètres/caractéristiques intrinsèques du basophile

Les modèles de dégranulation ont ainsi montré que la courbe reliant la concentration en allergène et l'intensité de la dégranulation adopte généralement la forme d'une courbe en cloche (Figure 31). Il est à noter que des courbes en cloche sont également fréquemment obtenues dans des systèmes plus complexes utilisant des basophiles de patients sensibilisés et des sources allergéniques complexes (Santos & Lack, 2016).

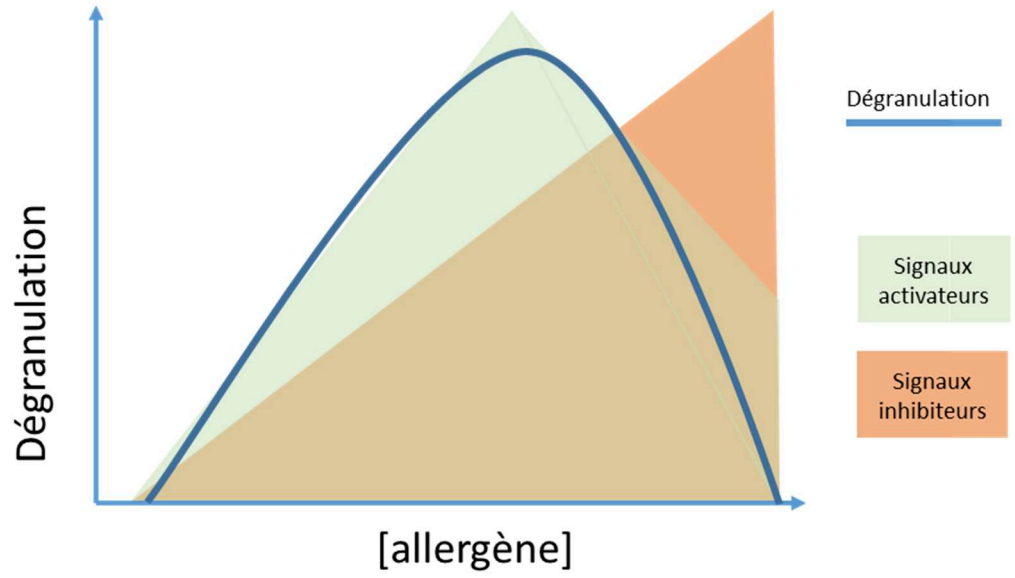


Figure 31 : La courbe en cloche reliant l'intensité de dégranulation à la concentration en allergène est la résultante des signaux activateurs et inhibiteurs de la dégranulation (Huber, 2013)

Moins de 1% des récepteurs aux IgE ont besoin de s'agréger pour provoquer une dégranulation détectable (Knol, 2006). Dans la première partie de la courbe (croissante), l'augmentation de l'intensité de dégranulation est associée à une augmentation de la taille des agrégats et du nombre de récepteurs engagés (Seagrave, Pfeiffer, Wofsy, & Oliver, 1991). Ainsi, en utilisant un modèle de basophiles humanisés et des sérums de patients, Mahajan *et al.* ont récemment montré que l'agrégation de 300 récepteurs FcεRI, sur les 70 000 qu'exprime à sa surface une cellule de leur lignée, suffit à provoquer la dégranulation et que celle-ci sera maximale quand environ 2700 récepteurs (4%) seront agrégés (Mahajan *et al.*, 2017).

Par analogie avec les courbes en cloche obtenues quand on observe la formation d'un précipitat en faisant varier le ratio anticorps/antigène, il a tout d'abord été proposé qu'à partir d'une certaine concentration en allergène, la taille et le nombre d'agrégats de FcεRI se réduisaient jusqu'à obtenir uniquement des monomères IgE-allergène. Cette explication est aujourd'hui remise en cause. L'analyse de la topographies des FcεRI à la surface des basophiles et des voies de signalisations activées, a montré que l'agrégation des FcRI génère des signaux activateurs et inhibiteurs dont les intensités varient en fonction de la taille et de la stabilité des agrégats de FcεRI (Huber, 2013). Au-delà de la concentration optimale en allergène, la taille des agrégats continue à croitre mais les signaux inhibiteurs l'emporteraient sur les signaux activateurs. (Handlogten, Deak, & Bilgicer, 2014; Mahajan *et al.*, 2014).

4.2. Paramètres/caractéristiques liés l'interaction allergène – IgE

La phosphorylation des domaines intracellulaires du FcεRI est le premier signal de la voie d'activation aboutissant à la dégranulation. Cette réaction impose que les domaines intracellulaires soient correctement orientés (Andrews *et al.*, 2009), suffisamment proches et sur une durée de 100 à 1000 s pour que la phosphorylation se produise (Posner *et al.*, 2002; Reinhard Schweitzer-Stenner & Pecht, 1999). La forte affinité du FcεRI pour les IgE ($KD=10^{-10}$) (Miller, Blank, Metzger, & Kinet, 1989)) ,caractérisée notamment par une très faible vitesse de dissociation, assure que les IgE restent fixées au FcεRI sur des durées suffisantes. Le pontage des FcεRI dépend donc principalement de l'affinité des IgE pour l'allergène et de l'organisation spatiale des épitopes dans l'allergène.

4.2.1 Effet de l'organisation spatiale des épitopes sur la dégranulation

La topologie des FcεRI dans les agrégats repose donc sur deux paramètres : le nombre d'épitopes reconnus dans l'allergène et les distances qui les séparent. Des modèles théoriques et expérimentaux ont été développés pour étudier ces paramètres.

En 1978, Dembo et Goldstein établissent un modèle théorique régissant l'interaction d'IgE d'une seule spécificité avec des dimères de leur épitope (Dembo & Goldstein, 1978). Cette interaction peut conduire à la formation de 2 types de complexes : des anneaux formés par autant d'IgE que de dimères ou des chaines d'IgE plus ou moins branchées (Figure 32). Le plus simple des anneaux étant formé par une IgE dont les deux paratopes sont occupés par 1 dimère de l'épitope (Figure 32 a.). Dans ce dernier cas il n'y a pas de pontage des FcεRI et aucune dégranulation n'est induite. Les structures formées quand il y a plus de deux épitopes ne sont plus uniquement des chaines ou des anneaux mais aussi des arbres ou des réseaux complexes qu'il est plus difficile de modéliser (Posner et al., 2004).

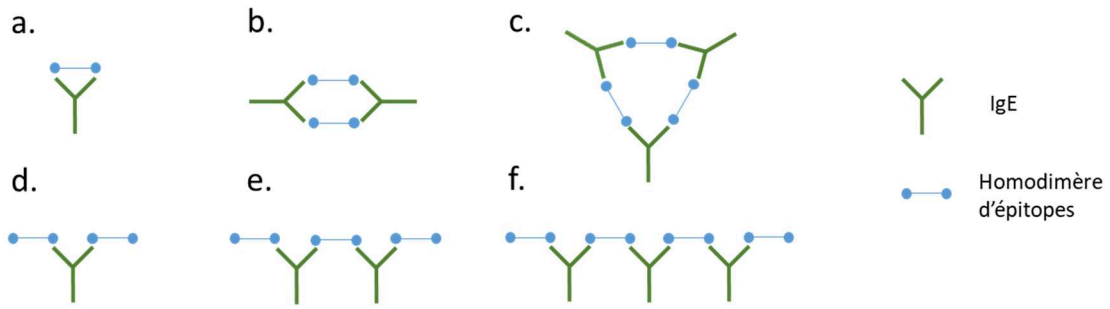


Figure 32 : Structure formées par des IgE et des homodimères de leur épitope

Les premières études expérimentales conduites dans le cadre de ce modèle simplifié utilisent des multimères de 2,4 dinitrophenol (DNP), une IgE monoclonale murine dirigée contre le DNP (IgE^{DNP}) (Liu

et al., 1980) et une lignée de basophile de rat (RBL) qui fixe les IgE murines. Elles se sont recemment poursuivies avec des allergènes impliqués dans des allergies humaines et une IgE murine (Gieras *et al.*, 2007) ou des IgE chimériques (souris/homme) recombinantes (L. H. Christensen, Holm, Lund, Riise, & Lund, 2008; L. H. Christensen, Riise, Bang, Zhang, & Lund, 2010; Gieras *et al.*, 2015). Leurs conclusions sont détaillées ci-dessous.

4.2.1.1. Effet de la distance entre 2 épitopes sur la dégranulation

Compte tenu de la faible flexibilité de la région charnière des IgE, les deux paratopes d'une IgE restent à des distances comprises entre 10 et 13 nm (Baird, Holowka, Coates, & Baird, 2003; Handlogten, Kiziltepe, & Bilgicer, 2013). Par conséquent, quand les 2 épitopes d'un homodimère sont séparés de 10 à 13 nm, des anneaux constitués d'une IgE et d'un homodimère peuvent se former (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) sans induire de dégranulation. Cependant les résultats obtenus avec des *spacers* de même longueurs mais de différente nature (PEG, ADN ou polyproline) sont hétérogènes et il reste difficile de prédire la formation de ces anneaux (Baird *et al.*, 2003; R. Schweitzer-Stenner, Licht, Luescher, & Pecht, 1987). En effet d'autres paramètres structuraux du dimère comme l'encombrement stérique, la charge nette ou la flexibilité du *spacer* affectent également l'interaction avec les deux paratopes d'une IgE.

En deçà de 10 nm, des dimères d'épitopes peuvent interagir avec les paratopes de 2 IgE adjacentes et former des complexes induisant une dégranulation. En utilisant des dimères de DNP séparés par un *spacer* de PEG, Baird estime que la longueur minimale du *spacer* est de 2 nm (Baird *et al.*, 2003) et Handlogten rapporte qu'une longueur de 6 nm est optimale (Handlogten 2012). Cependant ces résultats ont été obtenus avec des *spacers* de PEG dont la longueur est difficile à estimer car celle-ci varie en fonction des solutions (solvant, sels) dans lesquels ils sont solubilisés. De plus une chaine de PEG présente une certaine flexibilité. Des résultats obtenus avec des spacers peptidiques plus rigides ont permis de préciser ces distances. En utilisant un squelette protéique plus rigide pour espacer de molécules de DNP, Mahajan et ses collègues ont ainsi déterminé qu'une distance de 3,4 nm (2,7-6,2 nm) était efficace pour induire une dégranulation (Mahajan *et al.*, 2014). Par la suite Gieras *et al.* ont montré qu'un dimère d'épitopes de l'allergène Phl p 1 séparés par 6 AA (soit 2 à 3 nm) placés dans une myoglobine recombinante induit une dégranulation cellulaire (Gieras *et al.*, 2015).

Peu de données sont disponibles des longueurs de *spacer* au-delà de 13 nm, la flexibilité des *spacers* de grande longueur empêchant de tirer des conclusions (Andrews *et al.*, 2009).

L'identification des structures moléculaires d'allergènes respiratoires ou alimentaires et de leurs épitopes ont étayé ces résultats. Il apparait ainsi que dans le cas de Der p 1 (Greene & Thomas, 1992), de Phl p 1 (Flicker *et al.*, 2006), et Bos d 4 (Hochwallner *et al.*, 2010) notamment, les épitopes

cliniquement relevant sont situés à proximité les uns des autres et forment des clusters. Par ailleurs, un fragment de Phl p 1 d'une surface de 8,4 nm² est suffisant pour induire une dégranulation. Il est donc capable de fixer au minimum 2 IgE. Par conséquent, si l'on interprète ces résultats en considérant que la zone d'interaction entre un antigène et un anticorps occupe une surface de 5,6 à 8,6 nm² (Davies & Cohen, 1996), et que l'on assimile ces surfaces à des disques, on peut estimer que deux épitopes sont au plus distants de 7,7 nm et au moins de 2.7 nm.

4.2.1.2. Effet du nombre d'épitopes sur la dégranulation

Bien que le minimum requis pour induire la dégranulation de basophiles ou de mastocytes soit le pontage de deux FcεRI, Fewtrell et Metzger ont démontré en 1980 que trois IgE ou plus, pontées chimiquement, induisaient une dégranulation plus forte qu'un dimère d'IgE (Fewtrell & Metzger, 1980). En utilisant l'IgE^{DNP} et des multimères de DNP ayant 2, 3 ou plus de 10 répétitions de DNP, plusieurs travaux ont révélé que les dimères de DNP n'induisaient pas ou seulement une faible dégranulation par rapport à des multimères contenant 3 molécules de DNP ou plus. (Handlogten et al., 2014; Posner et al., 2007a, 2002; R. Schweitzer-Stenner, Licht, & Pecht, 1992). Posner *et al.* ont interprété la non efficacité des dimères de DNP à induire une dégranulation par le fait que les dimères utilisés favorisaient la formation d'anneaux constitués de 2 IgE^{DNP} et de 2 dimères de DNP (Figure 32 b.), plutôt que la formation de chaine d'IgE-FcεRI (Figure 32 d-f) et que cette configuration n'était pas très efficace pour induire une dégranulation (Posner et al., 2007a). Andrews et ses collègues ont émis l'hypothèse que selon leur structure, les dimères agrégeant les FcεRI n'étaient pas toujours correctement orientés pour permettre les premières étapes de phosphorylation des récepteurs (Andrews *et al.*, 2009). Compte tenu de la flexibilité des *spacers* utilisés dans ces allergènes synthétiques, on peut aussi penser que dans ces travaux des anneaux formés d'une IgE et d'un dimère de DNP (Figure 32 a.) se soient également formés. Contrairement aux dimères de DNP, des dimères formés d'un épitope de Phl p 1 et son IgE murine ont montré leur capacité à induire une dégranulation (Gieras *et al.*, 2007). Une, 2 ou 4 copies de ce même épitope ont par la suite été intégrées dans une myoglobine recombinante (Gieras *et al.*, 2015). Ces allergènes modèles ont ensuite été utilisés dans le modèle RBL et dans un modèle animal (sensibilisation passive). Dans les deux modèles, l'allergène recombinant possédant 4 répétitions de l'épitope était plus efficace que celui n'en contenant que 2.

En 2008, Christensen *et al.* ont fait un pas de plus pour mimer la réactivité polyclonale des patients en produisant plusieurs IgE monoclonales chimériques souris/homme et en les associant pour sensibiliser des basophiles. Ces IgE chimériques étaient constituées de paratopes d'IgG murines spécifiques d'un allergène d'acarien (Der p 2) intégrés dans un squelette d'IgE humaine (L. H. Christensen *et al.*, 2008). Ils ont ensuite mesuré l'intensité de dégranulation de basophiles humains sensibilisés avec 1, 2 ou 3 IgE chimériques provoquée par Der p 2. L'association de deux IgE de spécificités différentes suffisait à

induire une dégranulation. Celle-ci se trouvait nettement augmentée quand 3 IgE étaient associées. Cette étude très détaillée montre que les maximums de dégranulation avec 2 ou 3 IgE sont équivalents mais que la concentration en allergène nécessaire pour induire une dégranulation, est diminuée d'un facteur 10 avec 3 IgE (CD63 : EC50 de 36 fmol/mL). En d'autres termes, la sensibilité à l'allergène des basophiles sensibilisés avec 3 IgE est augmentée d'un facteur 10.

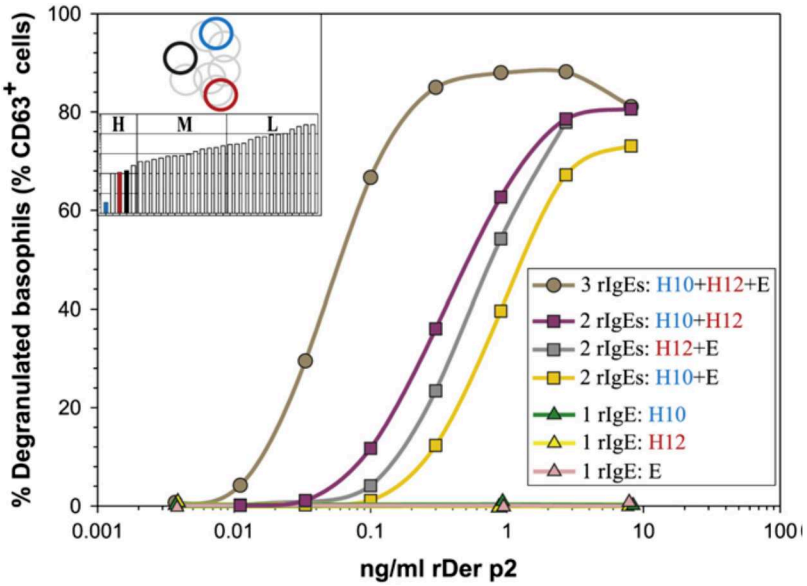


Figure 33 : Dégranulation de basophiles avec 1, 2 ou 3 IgE monoclonales (clones E, H10 et H12) dirigées contre des épitopes distincts de Der p 2 (L. H. Christensen *et al.*, 2008)

4.2.2 Effet de l'affinité des IgE sur la dégranulation

Les IgE sont généralement décrites comme des anticorps de haute affinité. Des études récentes ont cependant mis en évidences des IgE de faible affinité dans les sérums d'enfants et d'adultes allergiques (Kawamoto, Kamemura, Kido, & Fukao, 2017; López-Torrejón *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

La phosphorylation des domaines intracellulaires des FcεRI nécessite que ceux-ci restent à proximité au moins 100 s (Reinhard Schweitzer-Stenner & Pecht, 1999). Compte tenu de la très forte affinité du FcεRI pour les IgE, cette durée est surtout dépendante de l'affinité des IgE pour leur épitope (R. Schweitzer-Stenner *et al.*, 1992). Ainsi l'avidité des IgE de sérum de patients a été corrélée avec la sensibilité (concentration d'allergène nécessaire pour un induire une dégranulation) à l'allergène dans un test de dégranulation de basophiles de patients (Mita, Yasueda, & Akiyama, 2000). Il est à noter cependant que la valence d'un allergène, c'est à dire le nombre d'épitopes qu'il contient, peut contrebalancer la faiblesse des affinité des IgE (Collins, Basil, Nguyen, & Thelian, 1996).

L'implication d'IgE de faible affinité dans la dégranulation a ainsi été détaillée avec des modèles *in vitro* utilisant des IgE monoclonales de différentes affinités. Dans un modèle mettant en jeu un allergène tétravalent portant deux épitopes reconnus avec une forte affinité (KD = 54 nM) et deux autres reconnus avec une faible affinité (KD = 41 µM), il apparait que l'ajout des 2 épitopes de faible affinité permettent une dégranulation qui n'est pas observée avec un allergène portant seulement les deux épitopes de haute affinité (Handlogten, Kiziltepe, Serezani, Kaplan, & Bilgicer, 2013). Ce résultat indique qu'en présence d'IgE de haute affinité, des IgE de faible affinité peuvent avoir un rôle dans une réaction clinique.

En utilisant différentes combinaison d'IgE monoclonales chimériques dirigées contre Der p 2, Christensen et ses collègues ont davantage détaillé l'impact de l'affinité des IgE sur la dégranulation (L. H. Christensen *et al.*, 2008). Globalement il apparait que l'affinité des IgE impacte la sensibilité et n'a qu'un effet limité sur la réactivité des cellules (maximum de dégranulation). Ainsi la sensibilité augmente d'un facteur 1000 quand on associe 2 IgE de faible affinité (30 nM et 100 nM) au lieu de 2 IgE de forte affinité (0.04 nM et 1 nM). Il apparait de plus que quand une IgE de forte affinité est associée avec une IgE de faible affinité la sensibilité des basophiles est quasiment identique à celle observée avec deux IgE de haute affinité. Ainsi la présence d'une IgE de haute affinité ancrerait l'allergène à la surface de basophiles et permettrait ensuite le pontage des FceRI via des IgE de plus faible affinité (Lund *et al.*, 2012).

4.3. Implication sur le répertoire IgE

Le répertoire IgE, c'est dire l'ensemble des spécificités des IgE d'un patient reconnaissant un allergène donné, et donc un ensemble d'épitopes présent sur cet allergène, est à considérer au regard de l'organisation structurale des épitopes qui sont reconnus. Lund et ses collègues distinguent ainsi le répertoire IgE fonctionnel (Lund *et al.*, 2012) : toutes les IgE n'ont pas la même implication dans l'allergie (pas le même statut). Cette distinction se reflète d'ailleurs au niveau clinique, tant au niveau d'un individu que d'une population. Bien entendu la distinction d'un répertoire IgE fonctionnel parmi le répertoire IgE total n'est pas le seul élément qui explique l'existence d'épitopes dominants. D'autres aspects, comme la persistance de certains épitopes après la digestion et leur immunogénicité ou encore des facteurs individuel (Wayne G. Shreffler, Beyer, Chu, Burks, & Sampson, 2004) ont leur rôle à jouer dans la constitution du répertoire IgE. Plus le répertoire est étendu, plus il y a de possibilités qu'un pontage efficient des FcεRI. Les individus avec une allergie alimentaire persistante reconnaissent un panel plus large d'épitopes (séquentiels) que les patients dont l'allergie se résout (Wayne G. Shreffler *et al.*, 2004).

B. OBJECTIFS ET DEMARCHE

L'objectif de cette thèse est d'apporter des connaissances sur le répertoire des IgE de patients allergiques au blé et sur l'organisation spatiale des épitopes en lien avec l'activation des cellules effectrices dans l'allergie.

Dans le contexte des allergies à la farine de blé, l'étude du répertoire IgE des patients et de l'organisation structurale des épitopes impliqués se heurte à une double difficulté. D'une part, la polyclonalité des sérums de patients et d'autre part les fortes homologies de séquences et les multiples isoformes des différentes protéines du gluten qui rendent difficile l'interprétation des résultats obtenus en utilisant des sérums ou des basophiles de patients et des extraits de gluten pour répondre à ces questions. La mise en place de modèles moins complexes est donc nécessaire.

Pour détailler cette question, nous nous sommes intéressés à deux phénotypes d'allergie au blé dont les symptômes sont immédiats et très souvent sévères : l'anaphylaxie induite par l'effort et l'allergie au gluten désamidé. Ces phénotypes cliniques présentent plusieurs avantages. 1/ Les symptômes correspondent à des réactions IgE-dépendantes qui impliquent l'activation de mastocytes et de basophiles pour lesquels on dispose de modèles cellulaires ; 2/ les patients ont des profils de réactivité IgE qui sont homogènes et dont les allergènes et/ou les épitopes immuno-dominants ont été identifiés.

Sur le plan des modèles protéiques, nous nous sommes focalisés sur les allergènes et les épitopes immuno-dominants précisément caractérisés dans ces deux types d'allergies. Ainsi, les γ- et les ω_2-gliadines désamidées sont étudiées dans le contexte des allergies alimentaires et cutanées au gluten désamidé et les ω_5-gliadines dans celui des anaphylaxies induites par l'effort. Dans les deux cas, les IgE de patients reconnaissent des épitopes linéaires dans les domaines répétés de ces gliadines ; les épitopes dominants correspondent à des motifs répétés plusieurs fois au sein de ces domaines couvrant la moitié (γ-gliadines) ou la totalité (ω-gliadines) des séquences. Le plateau purification de l'unité BIA nous permet de disposer de ces sous-classes de gliadines sous forme de fractions purifiées (Fabrice Battais *et al.*, 2005), et des peptides de synthèse permettent d'étudier les liens entre l'organisation des épitopes et leur activité fonctionnelle.

Sur le plan des IgE, afin de répondre aux objectifs fixés, nous avons défini une démarche visant à réduire la complexité du modèle expérimental.

Dans un premier temps, nous avons ainsi produit des IgE monoclonales chimériques mimant la réactivité des IgE de patients. L'utilisation d'IgE monoclonales recombinantes permet de définir et de contrôler expérimentalement le répertoire IgE utilisé dans les modèles de dégranulation de basophiles.

Ces IgE recombinantes peuvent posséder la spécificité d'anticorps de patients (IgG ou IgE) ou celle d'anticorps monoclonaux produits chez l'animal (la souris pour l'essentiel d'entre eux). Le principe consiste à greffer les domaines variables d'anticorps existants sur des domaines constants d'une IgE. Passés les efforts liés à leur genèse et leur production, elles offrent en outre l'avantage d'être disponibles en quantité bien plus importante que les sérums de patients.

La stratégie que j'ai mise en place pour l'obtention d'IgE chimériques se déroule en plusieurs étapes :

1. Production et caractérisation des anticorps monoclonaux. Afin que la spécificité des anticorps monoclonaux de souris produits soit la plus proche possible de celle des IgE de patients, je me suis basé sur les travaux antérieurs dans l'équipe et sur la littérature afin de choisir les immunogènes, allergènes ou épitopes dominant, servant à immuniser des souris ;
2. Caractérisation fine de la réactivité des sérums de patients représentatifs du principal phénotype clinique dans l'AIE au blé et dans l'allergie au gluten désamidé ;
3. Sélection des anticorps monoclonaux mimant la réactivité des IgE de patients. La réactivité des anticorps obtenus a été comparée de façon détaillée à celle des IgE de patients pour sélectionner ceux qui serviront pour produire les IgE chimériques ;
4. Genèse et production d'IgE chimériques.

L'activité fonctionnelle de ces dernières et leur capacité à mimer les IgE de patients ont été établies à l'aide d'un modèle de dégranulation de basophiles. Les similitudes et les différences dans l'antigénicité et l'activité fonctionnelle des IgE chimérique et des sérums permettent d'émettre des hypothèses sur le répertoire des IgE de patients. Dans le contexte des allergies au gluten désamidé, une IgE chimérique a permis d'étudier les effets de la distribution spatiale et du nombre d'épitopes sur l'activation des cellules effectrices des symptômes.

C. RESULTATS

1. Premier article : Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux murins spécifiques du gluten désamidé et développement d'une méthode de détection dans les aliments

Depuis les années 1990, plusieurs traitements industriels sont appliqués sur le gluten pour lui conférer de nouvelles propriétés technologiques (Tranquet, Larré, & Denery-Papini, 2020). Le gluten est ainsi hydrolysé chimiquement ou enzymatiquement pour augmenter sa solubilité et lui donner des propriétés émulsifiantes. Ceci permet d'élargir ses domaines d'application bien au-delà de ses usages traditionnels et de donner des débouchés à une source de protéines végétales abondante et bon marché dans un contexte de transition alimentaire. Ces glutens hydrolysés sont ainsi utilisés dans des produits alimentaires tels que des glaces, des boissons énergétiques ou de la charcuterie. Ils se retrouve également dans certains cosmétiques auxquels ils donnent un aspect crémeux.

Autour des années 2000, des cas de réactions allergiques sévères associées à des glutens hydrolysés chez des patients tolérant par ailleurs les autres produits à base de blé, sont apparus en Europe (Tranquet *et al.*, 2020). Notre équipe, a étudié les caractéristiques biochimiques de l'ingrédient responsable d'un de ces premiers cas. Cette exploration a révélé que ce gluten était modifié par une désamidation résultant de son procédés d'obtention (V Leduc, Moneret-Vautrin, Guerin, Morisset, & Kanny, 2003). Nous avons réalisé par la suite une étude clinique et biologique sur une cohorte de 15 patients ayant réagi par voie orale et parfois par voie cutanée à des produits contenant des hydrolysats de protéines de blé. Cette étude a permis de caractériser précisément cette allergie au blé particulière et de mettre en évidence chez tous les patients des anticorps IgE dirigés contre des gliadines désamidées (Denery-Papini *et al.*, 2012). Ainsi, les γ- et les ω_2-gliadines se sont révélées en être les allergènes majeurs et l'épitope QPQQPFPQ, un épitope immuno-dominant, particulièrement sous sa forme désamidé, QPEEPFPE.

Parallèlement, au Japon, les premiers cas d'allergie provoquée par l'utilisation d'un savon contenant du gluten désamidé par hydrolyse acide, sont décrits (Fukutomi *et al.*, 2011). Très largement utilisé, ce savon va provoquer plus de 2000 cas de réactions allergiques sévères au blé (Yagami *et al.*, 2017). Là

aussi, l'analyse biologique de ces cas identifie les γ-gliadines et l'épitope PQQPFPQ (PEEPFP, sous sa forme désamidé) comme immuno-dominants (Yokooji *et al.*, 2013).

La désamidation du gluten qui convertit en acides glutamiques les nombreuses glutamines présentes dans les domaines répétés des protéines du gluten, a aussi pour conséquence de rendre inopérantes les méthodes de détection immunochimiques du gluten dans les aliments (Kanerva, Brinck, Sontag-Strohm, Salovaara, & Loponen, 2011). En effet, ces méthodes sont basées sur des anticorps qui visent les domaines répétés des gliadines et ont été obtenus contre des prolamines natives.

Le premier article présenté et publié dans Journal of Agricultural Food and Chemistry, décrit la production et la caractérisation d'anticorps spécifiques du gluten désamidé et le développement d'une méthode de détection applicable aux aliments. En effet, la détection des glutens natifs mais aussi modifiés est nécessaire au contrôle des aliments destinés aux personnes souffrant de maladie cœliaque. La détection des glutens désamidés était également devenue nécessaire pour les patients souffrant de cette nouvelle forme d'allergie au blé.

Les IgE des patients présentent une forte réactivité vis-à-vis des gliadines désamidées et de la séquence épitopique fortement désamidée QPEEPFPE, alors qu'ils détectent seulement avec une faible intensité l'épitope ou certaines gliadines sous une forme native. Nous avons donc choisi une stratégie de production d'anticorps anti-peptide en utilisant comme immunogène la séquence QPEEPFPE, dans le but d'obtenir des anticorps capables de détecter les protéines du gluten désamidées en limitant les réactions croisées avec les protéines natives.

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Article

pubs.acs.org/JAFC

Characterization of Antibodies and Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten

Olivier Tranquet,* Roberta Lupi, Valerie Echasserieau-Laporte, Manon Pietri, Colette Larré, and Sandra Denery-Papini

INRA, UR1268 Biopolymers, Interactions, Assemblies, rue de la Geraudiere, Nantes cedex 03, France

ABSTRACT: Diversification of gluten applications in the food and cosmetics industries was achieved through the production of water-soluble gluten that can be obtained by deamidation. Current analytical methods dedicated to gluten detection failed to detect deamidated gluten. After immunizing mice with the peptide LQPEEPFPE conjugated to keyhole limpet hemocyanin, five mouse monoclonal antibodies (mAbs) were produced and sequences of bound epitopes were determined as XPXEPFPE, where X is Q or E. The mAbs exhibited high specificity for deamidated gliadins and low molecular weight glutenin subunits. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on INRA-DG1 mAb was developed with an IC50% of 85 ng/mL and a limit of detection of 25 ng/mL. The intra- and interassay coefficients of variation (CV) were <10% except for the interassay CV of the low-level control (40 ng/mL), which was 20%. This assay was capable of detecting three of the four deamidated gluten samples spiked in rice flour at 20 mg/kg.

KEYWORDS: *deamidated gluten, deamidated gliadins, monoclonal antibodies, ELISA*

INTRODUCTION

Wheat, which is adapted to various climate and agronomic conditions, is consumed worldwide as a major supplier of calories. The gluten protein fraction of flour has unique viscoelastic properties that enable the preparation of bread, pasta, and noodles. These functional properties and its low cost as a byproduct of the starch industry make gluten an ingredient that is now included in numerous foods, feed, and cosmetics far beyond its traditional uses.

Gluten is the causative agent of celiac disease (CD)[1] and is also involved in food allergy to wheat.[2−4] To date, there is no curative treatment for these two pathologies and the only solution for patient is a lifelong gluten-free diet. Codex alimentarius states a threshold of 20 mg of gluten/kg in food as safe for CD patients.[5] Below this content, food can be claimed as "gluten-free". Recently, The VITAL Scientific Expert Panel established that a dose of 1 mg of wheat protein did not trigger symptoms in 95% of people allergic to wheat, suggesting that the 20 mg/kg threshold is also suitable for wheat-allergic patients.[6]

Gluten is a complex network of gliadins and glutenins that interacts by covalent and noncovalent bounds. Gliadins are monomeric proteins classified into α/β-, γ-, ω2-, and ω5-subtypes, while glutenins are polymeric proteins classified in low- and high-molecular weight glutenin subunits (LMW-GS and HMW-GS). Gliadins and GS are insoluble in water and characterized by homologous repetitive domains rich in proline and glutamine.[7] The low water solubility of gluten limits its application as a functional ingredient in the food industry.[8] Diversification of gluten applications has been achieved through the production of gluten samples functionalized by chemical or enzymatic processes.

Deamidation is one of the methods used for this purpose. It may be performed by either chemical or enzymatic treatment, resulting in the conversion of the amide groups of glutamine and asparagine to the corresponding carboxyl groups. By introducing one negative charge at the deamidation site, this reaction affects the physicochemical properties of peptides and proteins.[9] Heating gluten under acidic conditions is an effective and simple method of deamidation used on an industrial scale. Concomitantly to deamidation, partial proteolysis of gluten components may occur at various degrees depending on the acid concentration, temperature and time for treatment. These modified gluten samples exhibit enhanced water solubility, foaming, and emulsifying properties while preserving their nutritional properties.[8,10]

Deamidation has an impact on gluten biological activity. It is known that most of the gluten-derived peptides involved in CD need to be deamidated in vivo by tissue transglutaminase to enhance their T-cell activation potential.[11,12] Gliadin fractions deamidated by chemical treatment (heat/acid treatment) have also been shown to exhibit such activity.[13] Early in the 2000s, severe allergic reactions to deamidated gluten (DG) were reported in individuals otherwise tolerant to native wheat.[14] The allergens and epitopes detected by immunoglobulin E (IgE) from these patients were shown to be different from those from patients allergic to classical wheat products. This allergy to DG was a different entity from wheat allergy specifically elicited by DG.[15] More dramatically, DG has been shown to be involved in a sensitization mechanism enabling both hydrolyzed or native proteins to elicit severe skin reactions and food allergy in more than 1300 individuals.[16] In Japan, almost all of these patients were sensitized by the same soap containing the same ingredient consisting of acid-hydrolyzed gluten (Glupearl 19S).[17]

Received: February 18, 2015
Revised: May 7, 2015
Accepted: May 17, 2015

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Gluten detection is mainly based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antibodies that target epitopes among the repetitive domains of gliadins.[18] Repetition of the recognized epitopes allows the establishment of a sandwich ELISA with a single monoclonal antibody (mAb) and sequence homologies of these domains among gliadins enable the simultaneous detection of several gliadins.[19] However, these repetitive sequences, rich in glutamine, are strongly modified by deamidation and thus mAb recognition is reduced or absent. As a consequence, the concentration of DG detected by these kits is drastically underestimated.[20]

Denery-Papini et al. identified dominant epitopes bound by IgE from DG allergic patients. They corresponded to deamidated repetitive peptides of γ and ω2-gliadins containing two or three Glu residues.[15] As the sequences of these deamidated peptides are absent in native gluten or gliadins, we therefore hypothesized that they would be a good target for the specific detection of DG. In this study, we present the production of mAbs and the development of a competitive ELISA that specifically detects deamidated gluten.

MATERIALS AND METHODS

Gliadin and Glutenin Subunit Purification. Gliadins were extracted from wheat flour (cultivar Hardi) using a sequential procedure.[21] Briefly, the albumins/globulins (water/salt soluble proteins from wheat flour) were extracted from flour with a saline buffer. After three washings, the insoluble components were suspended in 70% (v/v) ethanol for 1 h at room temperature, and after centrifugation, the supernatant, i.e. the total gliadins were collected. The gliadin classes (α, γ, ω2, and ω5) were then prepared by ion-exchange chromatography and reversed-phase HPLC[3,22] and lyophylized. LMW-GS were obtained by the procedure of Verbruggen et al.[23] After pre-extraction of gliadins, glutenin subunits were solubilized from flour at 60 °C with 50% propanol containing 1% dithiothreitol. LMW-GS were then selectively precipitated with a final concentration of 85% propanol. Protein content of the fractions was determined by the Kjeldahl method.

Preparation of Deamidated Wheat Protein Fractions. Purified α-, ω2-, and ω5-gliadins, total gliadins, and LMW-GS were deamidated by acidic treatment as previously described.[24] A set of total gliadin fractions deamidated to different extents was also prepared. Gliadins (10 mg) were solubilized in 1 mL of 50% (v/v) ethanol, 0.1 N hydrochloric acid, and heated at 90 °C for 40, 60, 90, and 120 min. At each time, the reaction was stopped by neutralization with 1 mL 0.1 N NaOH. Solutions were dialyzed by ultrafiltration on AMICON centrifugal units with a MWCO at 3000 Da and centrifuged at 10 000 g, and the supernatant was recovered and freeze-dried. The degree of deamidation was calculated as the ratio of the amount of ammonia released from the deamidated sample to the total ammonia in the native sample and expressed as a percentage. Ammonia release was determined according to manufacturer's instructions (K-AMIAR, Megazyme, Ireland) after complete deamidation (3 h in 2 M HCl at 110 °C) of each sample. The deamidated Gliadins (D-Glia) were analyzed by native-PAGE on 10% acrylamide gels and compared with native gliadins.

Native and Functionalized Industrial Gluten Samples. VITAL Gluten (AIT Ingredients ref M120406) has been used as a native gluten reference. Four functionalized gluten samples (FG) described as wheat protein isolates with enhanced solubility in aqueous solution or with high emulsifying properties were selected for this study, referred to hereafter as FG1 to FG4. FG1 and FG2 were acid hydrolyzed gluten samples, already described by Krogshbo et al.[25] (with a deamidation level of 20−30% and 60%, respectively). FG3 and FG4 have been used in cosmetics. FG3 was provided by ALPOL Cosmétique (France), and FG4 was provided by Prof. Moneret-Vautrin (CH Epinal). No information was available about the processes used for neither their preparation nor their degree of deamidation or hydrolysis. Without any availability of the raw gluten used in these processes, measurement of the percentage of deamidation was not possible. They were characterized by native PAGE.

mAb Generation. Three BALB/c mice were injected subcutaneously twice at two-week intervals with 20 μg of the synthetic peptide LQPEEPFPEQC, conjugated to keyhole limpet hemocyanin (Millegen, France) and emulsified in Titermax Gold Adjuvant (SIGMA, CytRx Corporation, France). Three days after the second immunization, the mice were sacrificed. The popliteal lymph nodes were removed, and the lymphocytes were suspended by perfusion and fused with a SP2/0 myeloma cell line using standard hybridoma preparation and limiting dilution cloning procedures. The hybridoma supernatants from the fusion were screened for the presence of antipeptide antibodies using an indirect ELISA. The five selected hybridomas were cloned by dilution and referred to as INRA-DG1 to INRA-DG5. Crude hybridoma supernatants were used as the source of monoclonal antibodies.

Animal experiments were carried out at the INRA facilities, which are authorized by the Local Veterinary Department (authorization no. 44502). mAb production was approved by the Ethical Comity of Pays de la Loire under the number CEEA-2011.26.

Indirect ELISA. Reactivity of the antibodies to gliadins and LMW-GS, either native or deamidated, was assessed by indirect ELISA as described by Battais et al. for sample preparation and coating.[22] Uncoated sites were blocked with 4% defatted skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 for 1 h. Hybridoma supernatants diluted 250 times in PBS containing 0.1% skimmed milk were then added and incubated for 1 h at room temperature. After washing with PBS 0.05% Tween 20, bound antibodies were detected by incubation with horseradish peroxidase antimouse IgG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France, 1:3000 dilution) and orthophenylenediamine as the substrate. Color development was stopped with 100 μL of 2 M H_2SO_4, and the absorbance was read at 492 nm.

Epitope Mapping with Solid-Phase Synthetic Peptides (Pepscan). Impact of the deamidation of the immunogenic peptide on mAb interaction was explored with octapeptides prepared by automated spot synthesis and covalently fixed by their C-terminal end on a cellulose membrane (Abimed, Langenfeld, Germany) as previously described.[15] After washing for 5 min with ethanol and three times for 5 min with Tris 50 mM buffer at pH 8.0 containing 0.05% Tween 20 (v/v) (TBS/T), the membrane was blocked with 2.5% (w/v) skimmed dried milk and 5% (w/v) sucrose in TBS/T for 1 h, washed in TBS-T and incubated overnight with mAb supernatant diluted 4000 times. After further washing, horseradish peroxidase antimouse IgG (170-6516, Bio-Rad) diluted 1/100 000 in blocking buffer was added for 1 h and washed. The membrane was then incubated with a chemiluminescent substrate (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate; Pierce, Rockford, IL). mAb binding was revealed by chemiluminescence with a CCD camera (Luminescent Image Analyzer LAS 3000; Fujifilm, Tokyo, Japan).

Competitive Inhibition ELISA. Microtiter plates (Maxisorp, NUNC, Roskilde, Denmark) were coated with LQPEEPFPEQC conjugated to BSA in 10 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and left overnight at 4 °C. D-Glia and FGs were solubilized at 1 mg/mL in water or in PBS, taking into account their protein content. They were further diluted from 20 μg/mL to 8 ng/mL in PBS containing 0.1% skimmed milk prior incubation with INRA-DG1 mAb for 2 h at 37 °C. Then, 100 μL of antibody-sample solution was added to plates coated in BSA-LQPEEPFPEQC and incubated for 1 h. After washing, bound mAbs were revealed as previously described by indirect ELISA. Inhibition of antibody binding was expressed as the percentage of the maximal response obtained with antibody in the absence of the competitor according to the following formula:

$$\%\text{inhibition} = 1 - (\text{sample OD}/\text{blank sample OD})$$

Inhibition curves were obtained and fitted with a four parameter logistic regression. IC50 was defined as the analyte concentration that causes 50% inhibition of antibody binding. Limit of detection (LOD) expressed as a percentage of the inhibition unit was calculated with an

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

absorbance value equal to the mean value of the blank samples −3.3 × SD.

R5 ELISA kits were purchased from R-Biopharm (RIDASCREEN Gliadin competitive kit, Darmstadt, Germany). Samples were extracted in 60% (v/v) ethanol and analyzed according to the manufacturer's instructions. D-Glia and FGs were analyzed in triplicate in the INRA-DG1 competitive assay and in duplicate in the R5 competitive ELISA. FG2 was used in triplicate when chosen as standard.

Analysis of Wheat and Related Species, Maize, Soya, and Rice Flours. Grains of bread wheat (cv. apache), durum wheat (cv. Neodur), einkorn (cv. pays de sault), spelt (cv. rouquin), rye (cv. caroass), barley (cv. vanessa), oat (cv. evora), and triticale (cv. tremplin) were ground in liquid nitrogen. Maize, rice, and soya flour were purchased in food store. Soluble proteins were extracted by suspending flour at 100 mg/mL in PBS for 1 h, at room temperature under continuous agitation. Supernatants were collected after centrifugation (10 min/2500*g*), diluted at 1:20 in PBS containing 0.1% skimmed milk, and applied in the INRA-DG1 competitive ELISA.

Assay Evaluation. Reproducibility and repeatability were determined with three solutions of FG2 solubilized in water at 1 mg/mL and further diluted at 1000, 200, and 40 ng/mL in PBS containing 0.1% skimmed milk. Each solution was analyzed in quadruplicate on three different days by the same manipulator on freshly coated plates and with three independent standard solutions. We prepared contaminated rice flour samples spiked with 20 mg/kg of each FG. A 5 g portin of rice flour were suspended in 49.9 mL of PBS and 100 μL of FGs at 1 mg/mL (100 μg) and incubated for 1 h at room temperature. After centrifugation (2500 g/10 min), supernatants were collected and diluted at 1:20 in PBS 0.1% skimmed milk before analysis in the competitive ELISA.

Statistical Analysis. Mean and standard deviation were calculated with Excel 2010 (Microsoft) software.

RESULTS

MAbs Production and Specificity. MAbs were produced against the peptide LQPEEPFPEQC containing a dominant epitope QPEEPFPE recognized by patients suffering from an allergy to deamidated gluten.[15] The supernatants of the resulting hybridomas were screened by indirect ELISA for their reactivity to the peptide LQPEEPFPEQC conjugated to BSA. Five of them secreting mAbs specific for the immunogenic peptide were selected. They were denoted as mAbs INRA-DG1 to DG5.

Their substrate specificity was explored by indirect ELISA with native or deamidated α-, γ-, ω2-, and ω5-gliadins and LMW-GS. The five INRA-DG mAbs were specific for deamidated samples. They were divided into two groups according to their profiles of reactivity: the first was represented by INRA-DG1 and the second corresponded to INRA-DG2, -DG3, -DG4, and -DG5, which were represented by INRA-DG2 (Figure 1). mAb INRA-DG1 showed similar binding intensities for all deamidated fractions and it bound weakly to the native ω2-gliadins. mAb INRA-DG2 displayed a more restricted profile of reactivity as it only bound strongly to three deamidated fractions: γ-, ω2-, and ω5-gliadins; it exhibited weak reactivity to deamidated α-gliadins and LMW-GS and no binding to the native gluten proteins. The contribution of the number and the position of Glu residues to the binding of mAbs DG1 and DG2 was then investigated by the pepscan technique on a set of 16 peptides representing all the possible Q/E substitutions of the immunogenic peptide QPEEPFPE (Figure 2, peptide no. 2). Both mAbs recognized four deamidated peptides. All of them were deamidated to at least 50%. The position of the Q/E substitution appeared of importance: at position 1, it did not affect binding to the mAbs;

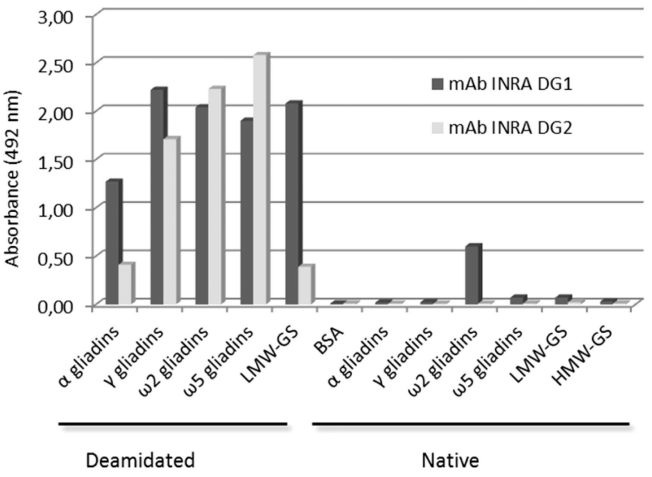


Figure 1. Reactivity of INRA-DG1 and INRA-DG2 mAbs toward native or deamidated gliadins and LMW-GS by indirect ELISA.

Peptide n°	% deamidation	Peptide sequence	INRA-DG1	INRA-DG2
1	100	E P E E P F P E		
2	75	Q P E E P F P E		
3	75	E P E Q P F P E		
4	75	E P Q E P F P E		
5	75	E P E E P F P Q		
6	50	Q P Q E P F P E		
7	50	Q P E Q P F P E		
8	50	Q P E E P F P Q		
9	50	E P Q Q P F P E		
10	50	E P Q E P F P Q		
11	50	E P E Q P F P Q		
12	25	Q P Q Q P F P E		
13	25	Q P Q E P F P Q		
14	25	Q P E Q P F P Q		
15	25	E P Q Q P F P Q		
16	0	Q P Q Q P F P Q		

Figure 2. Reactivity of INRA-DG1 and INRA-DG2 mAbs on octapeptides synthesized on cellulose membrane (Pepscan). Percentages of deamidation were calculated as the ratio number of E/(Q + E).

at position 3, it was not essential, but strongly enhanced the binding intensity; Q/E substitutions at position 4 and 8 were absolutely required for peptide recognition. Thus, epitopic sequences were the same for both MAbs and corresponded to peptides XPXEPFPE, where X is Q or E.

Characterization of Deamidated Gliadins and Functionalized Gluten Samples. Deamidated gliadin fractions with levels of deamidation ranging from 15% to 48% (elsewhere referred to as D-Glia-15% to D-Glia-48%) were produced. Their analysis on native PAGE reveals that the apparent mobility of proteins increased with their deamidation

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

level under these conditions (Figure 3). Contrarily, native gliadins were almost unable to migrate in these conditions.

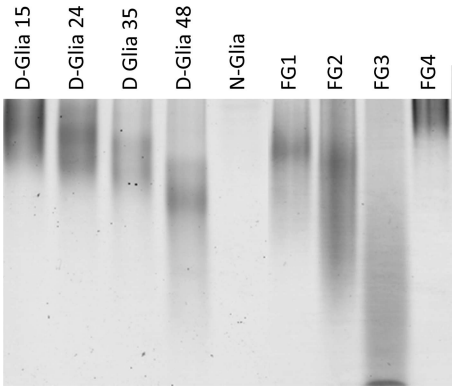


Figure 3. Analysis by native PAGE of deamidated gliadins (D-Glia) at various deamidation levels (15%, 24%, 35%, and 48%), native gliadins (N-Glia), and industrial functionalized gluten samples (FG).

Analysis of these samples illustrated that negative net charge increased proportionally to the duration of acid hydrolysis. Functionalized gluten samples (FG) were subjected to the same analysis by native PAGE. All FG samples were able to migrate along the gel at different distances from the top of the gel revealing that they contained different levels of negative charges. FG1 was very similar to D-Glia-35%. FG2 and FG3 displayed more mobility and a more heterogeneous pattern. The pattern of FG3 suggested that concomitantly with deamidation, strong hydrolysis had occurred. FG4 displayed lower mobility, similar to D-Glia-15%.

Development of Competitive Indirect ELISA. Considering its broad reactivity to deamidated gluten proteins, INRA-DG1 mAb was selected for assay development. Since deamidated gluten may also be cleaved, a competitive format was chosen for the ELISA. Two competitive assays were tested with either deamidated gliadins or the peptide LQPEEPFPEQC conjugated to BSA for coating on the microplates. The similarity of results (data with deamidated gliadins not shown) led us to choose the peptide LQPEEPFPEQC conjugated to BSA for coating the solid phase because it could be easily produced with good reproducibility. Two parameters were then explored to optimize the sensitivity of the ELISA: the concentration for the coating antigen and the antibody dilution. A lower IC50 with D-Glia-48% indicated higher sensitivity. It was reached for a coating performed at 0.75 μg/mL and a dilution of 1:4000 for the DG1 supernatant. Using these conditions, we checked for the reactivity of purified native gliadins and GS. None of them were detected in the competitive assay (data not shown).

Analysis of Samples by Competitive R5 and INRA-DG1 ELISA. Detection of the deamidated gliadin fractions was compared by means of two competitive ELISAs, the first based on the INRA-DG1 mAb, and the second based on the R5 antibody.[26] Increasing percentages of deamidation progressively impaired the detection of gliadins by the competitive R5 assay (Figure 4a). IC50 obtained with D-Glia-15%, −24%, −35%, and −48% were 3, 4, 8, and 50 times lower, respectively, than that of standard in the kit (pepsic/tryptic digest of prolamins from wheat, rye, and barley). The opposite effect of deamidation was observed with the INRA-DG1 assay (Figure 4b) since D-Glia 48% was the better recognized sample while

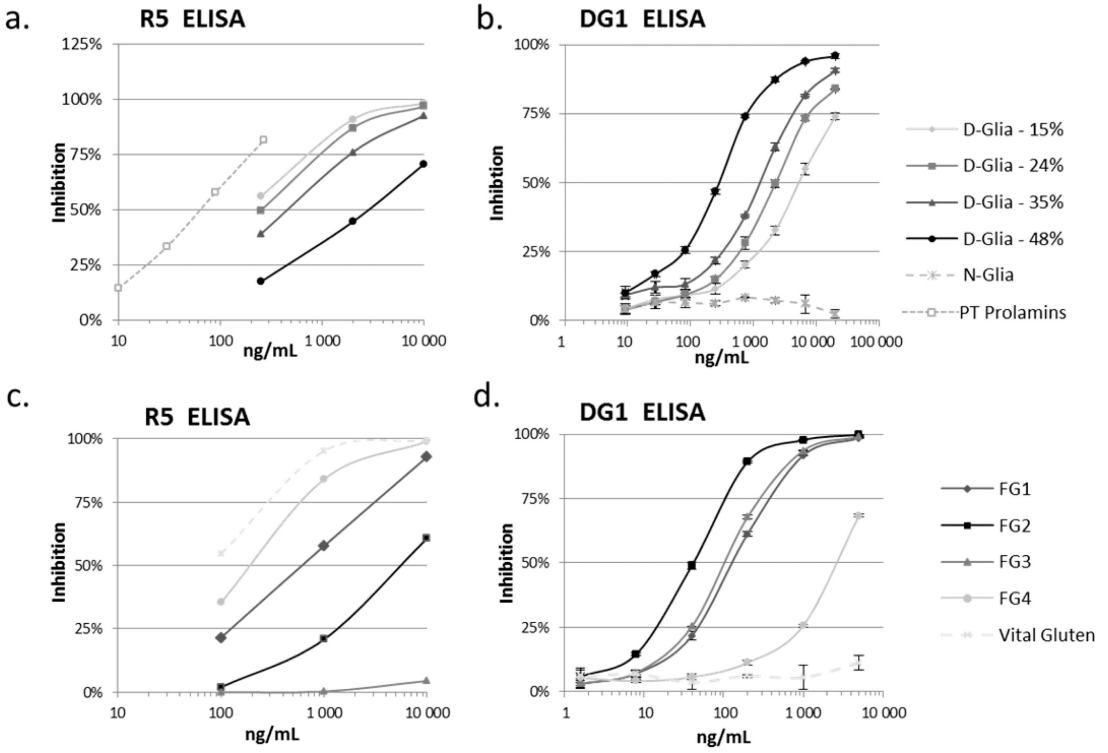


Figure 4. Analysis by indirect competitive ELISA of deamidated gliadins (D-Glia) at various deamidation levels (15%, 24%, 35%, and 48%), native gliadins (N-Glia), industrial functionalized gluten samples (FG), and vital gluten. D-Glia (a) and FG (c) were analyzed by the R5 competitive ELISA. D-Glia (b) and FG (d) were analyzed by the INRA-DG1 Competitive ELISA. Pepsic trypsic digested prolamins from wheat rye and barley (PT-Prolamins).

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

D-Glia-15% gave the weaker response. Moreover, the absence of response with native gliadins confirmed that deamidation was absolutely required for DG1 binding.

FG samples and vital gluten were then analyzed with both R5 and INRA-DG1 competitive assays. In the competitive R5 ELISA, decreasing responses to FG4, 1, and 2 were observed and were 3, 10, and 100 times lower, respectively, than to vital gluten (Figure 4c). There was no response to FG3. In the competitive INRA-DG1 ELISA vital gluten was not detected while all FG samples were (Figure 4d). In terms of response intensity, FG4, 3, 1, and 2 gave increasing responses in the INRA-DG1 assay. It should be noted that FG3, which was undetected by the R5 assay, was detected similarly to FG1 with the INRA-DG1 competitive ELISA.

Immunoassay Evaluation. Performance evaluation of the competitive ELISA was performed with eight concentrations of FG2 ranging from 3 to 7500 ng/mL in PBS, which were chosen as the standards. A typical standard curve is presented in Figure 5. On the basis of three independent experiments, IC50 and a

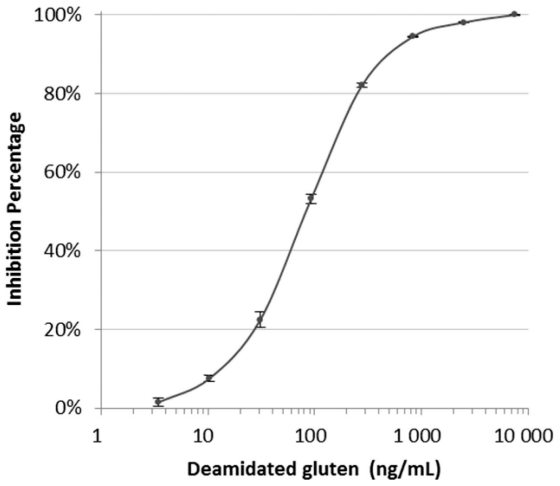


Figure 5. Competitive inhibition curve of FG2.

blank value were calculated as 85 ± 16 and 16 ± 2.8 ng/mL, respectively. Taking into account interassay variation, LOD was set at 25 ng/mL (mean of blank −3.3 × SD), which corresponded to 21% inhibition. Repeatability and reproducibility were assessed with three solutions of FG2 at 40, 200, and 1000 ng/mL in PBS. They were analyzed in quadruplicate in three independent experiments for evaluation of intra- and interassay variations. The intra-assay coefficients of variation (CV) ranged from 2.1% to 6.2%, and the interassay CVs were 7.8%, 5.1%, and 20.3% for the 1000, 200, and 40 ng/mL solutions, respectively (Table 1).

Soluble proteins extracted from common cereal grains (four wheat species, rye, barley, oat maize, and rice) and from soya seeds were used to check their potential cross reactivity in our assay. None of these extracts caused inhibition over the LOD of the assay (data not shown).

Application to Contaminated Rice Flour (20 mg/kg). Contamination of rice flour was performed with the four FG samples at 20 mg/kg and quantified in the INRA-DG1 ELISA. This level of contamination led to significant percentages of inhibition for FG1, 2, and 3, but not for FG4 (Table 2). Recoveries were then determined using FG2 as standard. Recovery of the FG2 was excellent since it reached 100%. Recoveries of FG1 and FG3 were 42% and 52% respectively.

Table 1. Repeatability and Reproducibility of INRA-DG1 Competitive ELISA Determined at Three FG2 Concentrations

A (ng/mL)	assay	mesured amount (ng/mL)	recovery (%)	intra-assay CV (%)	interassay CV (%)
1000	1	882 ± 54	88	6.1	
	2	1045 ± 31	105	3.0	7.8
	3	1049 ± 62	105	5.9	
200	1	202 ± 12	101	6.2	
	2	222 ± 5	111	2.1	5.1
	3	203 ± 5	101	2.7	
40	1	50 ± 3	124	5.5	
	2	61 ± 4	152	6.1	20.3
	3	64 ± 3	134	4.4	

Table 2. Percentage of Inhibition and Recoveries of FG Samples Spiked at 20 mg/kg in Rice Flour and Analyzed in INRA-DG1 Competitive ELISA

	% inhibition	SD[a]	recovery
FG1	24%	2%	42%
FG2	47%	1%	100%
FG3	29%	2%	52%
FG4	11%	1%	NA

[a]Standard deviation.

These values were expected since FG 1 and FG3 were less recognized than the standard (FG2) by INRA-DG1 mAb.

DISCUSSION

Patients allergic to DG possess IgE specific for peptides derived from the domains containing repetitive sequences of γ- and ω2-gliadins where glutamine has been replaced by glutamic acid. Denery-Papini et al. determined that the peptide QPEEPFPE was a dominant epitope for patients allergic to DG but tolerant to native wheat.[15] Part of this epitope, PEEPFP, has also been found in Japanese patients sensitized by a soap containing DG.[27] After immunizing mice with the synthetic peptide LQPEEPFPEQC, we selected mAbs capable of discriminating between deamidated gluten proteins and their native counterparts. One of them, mAb INRA-DG1, appeared extremely interesting for detection purposes as it bound both deamidated gliadins and deamidated LMW-GS. In accordance with the sequence similarities between the repetitive domains of native gliadins and those of LMW-GS, such cross reactivities are frequent and have already been observed with a large set of mAbs directed toward native domains containing repetitive sequences of gliadins;[28] the same phenomenon was observed after deamidation. We identified four epitopes of mAb INRA-DG1. None of them were present in extenso in all gliadins and LMW-GS. Further exploration is required for complete epitope mapping. When compared to mAbs applied to gluten detection, INRA-DG1 mAb differs from others by its capacity to specifically detect DG with high sensitivity. To date, most of, if not all, commercial kits designed for gluten detection are based on antibodies targeting the repetitive sequences of gliadins.[18] These sequences rich in glutamine are susceptible to deamidation. Kits based on R5, but also on Skerritt's or G12 mAbs[29,30] were incapable of properly detecting deamidated gluten: their binding to gluten deamidated at 52% was abolished for Skerritt's and G12 mAbs or strongly reduced for R5.[20,31] In this study, we demonstrated that the decrease of

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

R5 binding was a continuous phenomenon directly related to the level of deamidation. Even a low deamidation level, such as 15%, induced a 3-fold decrease for R5 mAb recognition. On the contrary, INRA-DG1 mAb was able to detect gliadins deamidated at levels varying from 15% to 50%. Moreover, the more the gliadins are deamidated, the stronger the binding. The capacity of DG1 to detect weakly deamidated gliadins (15%) added to the fact that the identified epitopes were deamidated at least by 50% suggested that, as a random process, deamidation in acidic condition is heterogeneous and may result in high percentage of deamidation on small portion of the repetitive sequences.

Furthermore, impaired detection by the R5 assay was also observed with the tested FG samples. It should be noted that one of them (FG3) was not even detected. This sample appeared highly hydrolyzed and the remaining fragments should be of smaller length than in the other FG samples. R5 is known to bind sequences as small as the pentapeptide[32] and the competitive format should allow their detection. This absence of detection of FG-3 by R5 might be attributed to the absence of remaining native sequences.

Repetitive sequences of gliadins and GS, which are homologous, are a target of choice for gluten detection. However, these sequences are not identical and are recognized with different affinity by mAbs; therefore, accurate standardization of gluten assays is still a serious issue.[18] Detection of deamidated gluten faces similar difficulties to which possible hydrolysis and heterogeneity in the level of deamidation of the sample are added. The INRA-DG1 competitive assay was capable of detecting contamination as low as 20 mg/kg in rice flour for 3 of 4 of the DGs tested. The particular behavior of FG4 in both assays—low detection by the DG1 assay and good detection by the R5 competitive assay—can be related to a low deamidation level as suggested by weak mobility in native PAGE. In such a case, the R5 and the INRA-DG1 competitive assays appeared fully complementary. With this set of samples with varying degrees of deamidation, we observed that the more a sample is recognized in one assay, the less it would be in the other assay.

In conclusion, the INRA-DG1 mAb assay described here is useful for the detection of deamidated gliadins or gluten with high sensitivity and specificity. Further experiments are required to validate its applicability to incurred processed food and cosmetic samples.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +33 240675027. Fax: +33 240675027. E-mail: olivier.tranquet@nantes.inra.fr.

Funding

This research was supported by INRA Transfert and through the project PREDEXPITOPE funded the French National Research Agency (ANR-08-ALIA-0014).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Julie Le Luhant and Lenaig Guillard for the mAb production and Annabelle Blanchet, Fiona Francini, and Maxime Pecquet for their technical assistance in characterizing the mAbs and developing the competitive ELISA.

ABBREVIATIONS

CD, celiac disease; GS, glutenin subunits; LMW, low molecular weight; DG, deamidated gluten; IgE, immunoglobulin E; mAb, monoclonal antibody; FG, functionalized gluten; D-Glia, deamidated gliadins; PBS, phosphate buffered saline; IC, inhibition concentration; LOD, limit of detection; CV, coefficient of variation

REFERENCES

(1) Sollid, L. M. Coeliac Disease: Dissecting a Complex Inflammatory Disorder. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 647−655.

(2) Battais, F.; Richard, C.; Jacquenet, S.; Denery-Papini, S.; Moneret-Vautrin, D. A. Wheat Grain Allergies: An Update on Wheat Allergens. *Eur. Ann. Allergy Clin Immunol* **2008**, *40*, 67−76.

(3) Battais, F.; Courcoux, P.; Popineau, Y.; Kanny, G.; Moneret-Vautrin, D.-A.; Denery-Papini, S. Food Allergy to Wheat: Differences in Immunoglobulin E-Binding Proteins as a Function of Age or Symptoms. *J. Cereal Sci.* **2005**, *42*, 109−117.

(4) Tatham, A. S.; Shewry, P. R. Allergens to Wheat and Related Cereals. *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*, 1712−1726.

(5) Codex Alimentarius Commission. Codex Standard 118-1979 (revised 2008), *Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten*; In FAO/WHO, Rome, 2008.

(6) Taylor, S. L.; Baumert, J. L.; Kruizinga, A. G.; Remington, B. C.; Crevel, R. W. R.; Brooke-Taylor, S.; Allen, K. J.; Houben, G. F. Establishment of Reference Doses for Residues of Allergenic Foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *63*, 9−17.

(7) Shewry, P. R.; Tatham, A. S. The Characteristics, Structures and Evolutionary Relationships of Prolamins. In *Seed Proteins*; Shewry, P. R., Casey, R., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1999; pp 11−33.

(8) Popineau, Y.; Huchet, B.; Larré, C.; Bérot, S. Foaming and Emulsifying Properties of Fractions of Gluten Peptides Obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration. *J. Cereal Sci.* **2002**, *35*, 327−335.

(9) Cui, C.; Hu, Q.; Ren, J.; Zhao, H.; You, L.; Zhao, M. Effect of the Structural Features of Hydrochloric Acid-Deamidated Wheat Gluten on Its Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5706−5714.

(10) Liao, L.; Zhao, M.; Ren, J.; Zhao, H.; Cui, C.; Hu, X. Effect of Acetic Acid Deamidation-Induced Modification on Functional and Nutritional Properties and Conformation of Wheat Gluten. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 409−417.

(11) Molberg, Ø.; Mcadam, S. N.; Körner, R.; Quarsten, H.; Kristiansen, C.; Madsen, L.; Fugger, L.; Scott, H.; Norén, O.; Roepstorff, P.; Lundin, K. E. A.; Sjöström, H.; Sollid, L. M. Tissue Transglutaminase Selectively Modifies Gliadin Peptides That Are Recognized by Gut-Derived T Cells in Celiac Disease. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 713−717.

(12) Vader, W.; Kooy, Y.; van Veelen, P.; de Ru, A.; Harris, D.; Benckhuijsen, W.; Peña, S.; Mearin, L.; Drijfhout, J. W.; Koning, F. The Gluten Response in Children with Celiac Disease Is Directed toward Multiple Gliadin and Glutenin Peptides. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1729−1737.

(13) Sjöström, H.; Lundin, K. E.; Molberg, O.; Körner, R.; McAdam, S. N.; Anthonsen, D.; Quarsten, H.; Norén, O.; Roepstorff, P.; Thorsby, E.; Sollid, L. M. Identification of a Gliadin T-Cell Epitope in Coeliac Disease: General Importance of Gliadin Deamidation for Intestinal T-Cell Recognition. *Scand. J. Immunol.* **1998**, *48*, 111−115.

(14) Leduc, V.; Moneret-Vautrin, D. A.; Guerin, L.; Morisset, M.; Kanny, G. Anaphylaxis to Wheat Isolates: Immunochemical Study of a Case Proved by Means of Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111*, 897−899.

(15) 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. Allergy to Deamidated Gluten in Patients Tolerant to

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Wheat: Specific Epitopes Linked to Deamidation. *Allergy* **2012**, *67*, 1023−1032.
(16) Chinuki, Y.; Morita, E. Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Protein in Soap. *Allergol. Int.* **2012**, *61*, 529−537.
(17) Nakamura, R.; Nakamura, R.; Adachi, R.; Itagaki, Y.; Fukutomi, Y.; Teshima, R. Evaluation of Allergenicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in Vitro Elicitation Test. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2013**, *160*, 259−264.
(18) Diaz-Amigo, C.; Popping, B. Accuracy of ELISA Detection Methods for Gluten and Reference Materials: A Realistic Assessment. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5681−5688.
(19) Denery-Papini, S.; Nicolas, Y.; Popineau, Y. Efficiency and Limitations of Immunochemical Assays for the Testing of Gluten-Free Foods. *J. Cereal Sci.* **1999**, *30*, 121−131.
(20) Kanerva, P. M.; Brinck, O.; Sontag-Strohm, T. S.; Salovaara, H. O.; Loponen, J. Deamidation of Gluten Proteins and Peptides Decreases the Antibody Affinity in Gluten Analysis Assays. *J. Cereal Sci.* **2011**, *53*, 335−339.
(21) Nicolas, Y.; Martinant, J.; Denery-Papini, S.; Popineau, Y. Analysis of Wheat Storage Proteins by Exhaustive Sequential Extraction Followed by RP-HPLC and Nitrogen Determination. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *96*, 96−102.
(22) Battais, F.; Pineau, F.; Popineau, Y.; Aparicio, C.; Kanny, G.; Guerin, L.; Moneret-Vautrin, D.-A.; Denery-Papini, S. Food Allergy to Wheat: Identification of Immunogloglin E and Immunoglobulin G-Binding Proteins with Sequential Extracts and Purified Proteins from Wheat Flour. *Clin. Exp. Allergy* **2003**, *33*, 962−970.
(23) Verbruggen, I. M.; Veraverbeke, W. S.; Vandamme, a.; Delcour, J. a. Simultaneous Isolation of Wheat High Molecular Weight and Low Molecular Weight Glutenin Subunits. *J. Cereal Sci.* **1998**, *28*, 25−32.
(24) Gourbeyre, P.; Denery-Papini, S.; Larré, C.; Gaudin, J.-C.; Brossard, C.; Bodinier, M. Wheat Gliadins Modified by Deamidation Are More Efficient than Native Gliadins in Inducing a Th2 Response in Balb/c Mice Experimentally Sensitized to Wheat Allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 336−344.
(25) Kroghsbo, S.; Andersen, N. B.; Rasmussen, T. F.; Jacobsen, S.; Madsen, C. B. Acid Hydrolysis of Wheat Gluten Induces Formation of New Epitopes but Does Not Enhance Sensitizing Capacity by the Oral Route: A Study in "Gluten Free" Brown Norway Rats. *PLoS One* **2014**, *9*, e107137.
(26) Valdés, I.; Garcia, E.; Llorente, M.; Mendez, E. Innovative Approach to Low-Level Gluten Determination in Foods Using a Novel Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Protocol. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *15*, 465−474.
(27) Yokooji, T.; Kurihara, S.; Murakami, T.; Chinuki, Y.; Takahashi, H.; Morita, E.; Harada, S.; Ishii, K.; Hiragun, M.; Hide, M.; Matsuo, H. Characterization of Causative Allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap. *Allergol. Int.* **2013**, *62*, 435−445.
(28) Tranquet, O.; Larré, C.; Denery-Papini, S. Selection of a Monoclonal Antibody for Detection of Gliadins and Glutenins: A Step towards Reliable Gluten Quantification. *J. Cereal Sci.* **2012**, *56*, 760−763.
(29) Skerritt, J. H.; Hill, A. S. Monoclonal Antibody Sandwich Enzyme Immunoassays for Determination of Gluten in Foods. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1771−1778.
(30) Morón, B.; Bethune, M. T.; Comino, I.; Manyani, H.; Ferragud, M.; López, M. C.; Cebolla, A.; Khosla, C.; Sousa, C. Toward the Assessment of Food Toxicity for Celiac Patients: Characterization of Monoclonal Antibodies to a Main Immunogenic Gluten Peptide. *PLoS One* **2008**, *3*, e2294.
(31) Kahlenberg, F.; Sanchez, D.; Lachmann, I.; Tuckova, L.; Tlaskalova, H.; Méndez, E.; Mothes, T. Monoclonal Antibody R5 for Detection of Putatively Coeliac-Toxic Gliadin Peptides. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 78−82.
(32) Osman, A. A.; Uhlig, H. H.; Valdes, I.; Amin, M.; Mendez, E.; Mothes, T. A Monoclonal Antibody That Recognizes a Potential Coeliac-Toxic Repetitive Pentapeptide Epitope in Gliadins. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2001**, *13*, 1189−1193.

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00923
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

2. Proceeding du WGPAT 2017: Complémentarité de 3 anticorps monoclonaux pour évaluer le degré de désamidation des protéines du gluten

L'analyse biochimique de différents glutens désamidés industriels a montré que le taux de désamidation est variable d'un produit à l'autre. Ces dosages biochimiques donnent des mesures globales qui fournissent peu d'information à l'échelle des séquences répétées des γ- et des ω2-gliadines contenant le motif (QPQQPFPQ). Ainsi par exemple un taux de désamidation global de 50 % peut indiquer que chaque séquence est désamidé à 50 % (QPEQPFPE ou QPEEPFPQ par exemple) ou que seule la moitié des séquences est désamidée à 100% (une moitié de QPQQPFPQ et une autre EPEEPFPE). L'anticorps monoclonal INRA-DG1 est spécifique de cette séquence fortement désamidée (XPXEPFPE, X = Q ou E). Son utilisation a d'ailleurs suggéré que la désamidation des glutamines ne devait pas être homogène dans les domaines répétés des gliadines et que des séquences plus ou moins désamidées devaient coexister. (Tranquet *et al.*, 2015) (Figure 34). En effet, l'anticorps INRA-DG1 a détecté des séquences désamidées à 50 % au moins, dans des produits dont le taux de désamidation global était nettement inférieur à 50 %

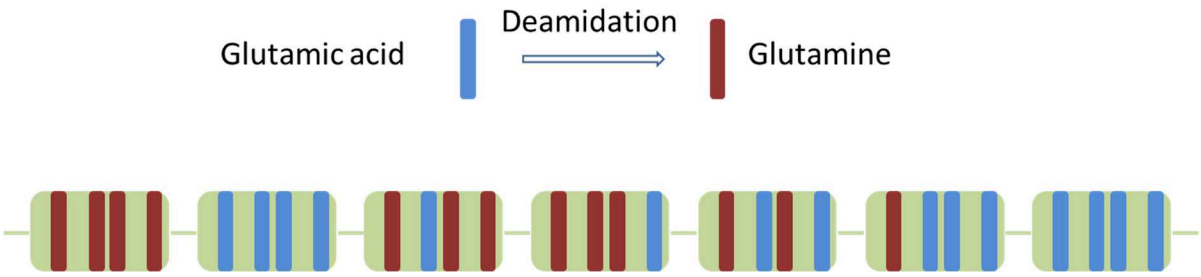


Figure 34 : hypothèse de distribution des acides glutamiques et des glutamines dans les domaines répétés des gliadines après une désamidation induite par un chauffage en condition acide

Les résultats suivants ont été présentés au XXXIst congrès du groupe de travail sur l'analyse et la toxicité des gliadines (WGPAT, http://wgpat.com/index.html). Ils montrent la complémentarité de 3 anticorps monoclonaux spécifiques de séquences des domaines répétés des gliadines sous leurs formes natives, faiblement désamidées ou fortement désamidées, respectivement, pour caractériser le taux de désamidation à l'échelle de l'épitope.

Ces anticorps s'avèrent intéressants pour une caractérisation fine des modifications de séquences qui peuvent être induites par certains procédés de fonctionnalisation des protéines du gluten. La persistance de séquences natives de prolamines ou de séquences peu modifiées est une information importante pour des produits destinés à des patients présentant des formes classiques d'allergie au blé, alors que la présence de séquences fortement désamidées l'est dans le cas d'allergie au gluten désamidé.

5 Clinical research reports

5.1 Complementarity of 3 monoclonal antibodies (mAbs) directed against native and deamidated repeat motifs of gliadins to evaluate the extent of gluten modification after chemical or enzymatic deamidation processes

Olivier Tranquet[1], Valerie Echasserieau-Laporte[1], Colette Larré[1], Florence Pineau[1], Päivi Kanerva[2], Tuula Sontag-Strohm[2], Sandra Denery-Papini[1]

[1] UR1268 Biopolymers Interactions Assemblies, INRA, Nantes, France
[2] Department of Food and Nutrition, University of Helsinki, Finland

Introduction

Acid-hydrolysed wheat proteins (a-HWP) were used as ingredients in food and cosmetics. From the 2000's, cases of severe food allergy to HWP have been reported in people tolerant to native wheat proteins. More recently in Japan, a soap containing a-HWP elicited severe skin reactions and food allergy to wheat in over 2000 individuals [1]. Gliadins and glutenin subunits (GS), the main protein fractions of wheat flour, are characterised by homologous domains consisting of repeated sequences of 6 to 8 amino acids rich in glutamines. We have shown that deamidation of these sequences, as the main consequence of acid hydrolysis, generates neo-epitopes responsible for this allergy [2]. The main IgE epitopes involved were identified for French and Japanese cohorts (QPEEPFPE and PEEPFP respectively) [2,3]. The detailed analysis of the IgE reactivity of French patients on all the possibilities of deamidation of the peptide QPQQPFPQ revealed that the position and the extent of deamidation at the scale of this repeated sequence had a strong impact on the IgE binding. Deamidation of 3 on the 4 glutamines allowed the strongest IgE/peptide interaction. The determination of the extent of deamidation of wheat prolamins is essentially based on biochemical methods such as the measurement of ammonium release after extensive acid hydrolysis [4]. Such a measure gives an overall result that provides little information about the rate and distribution of deamidation at the scale of an epitope. A method to assess this rate of deamidation at the epitope level, together with the presence of residual native repeat peptide would be useful for the characterisation of glutens modified by chemical or enzymatic processes of deamidation.

In this work, we evaluated the ability of 3 mouse monoclonal antibodies directed against native and deamidated repeat motifs of gliadins to discriminate between gliadin and gluten samples with different deamidation rates.

Materials and methods

Antibodies

MAb PQQ3B4 has been raised against the peptide YPQQPFPQ and described in Tranquet *et al.* [5]. MAb MCO1 has been raised against the peptide QPFPQPELPYPQPQ and described in Skovbjerg *et al.* [6]. Mab INRA-DG1 has been raised against the peptide LQPEEPFPEQC and described in Tranquet *et al.* [7]. MAbs PQQ3B4, and INRA DG1 were used as cell culture supernatant. MC01 was provided purified by Zedira (Darmstadt, Germany).

Native and deamidated gliadin sub-fractions and total gliadins

Native gluten and native gliadins were previously prepared from wheat flour (c.v. recital) according to Battais *et al.* [8]. Briefly, flour was defatted and gluten was separated from starch by extensive washing of the dough by water. The gliadin fraction was isolated from the gluten with 70 % ethanol (v/v) and further divided into α, γ, ω2 and ω5-gliadins by ion-exchange chromatography and reverse-phase HPLC. Three samples of deamidated gliadins with deamidation rates of 15 %, 35 % and 48 % (referred to as D-GLIA 15, 35 and 48) have been produced by acid hydrolysis of gliadins and characterised in a previous study [7]. Briefly, Gliadins (10 mg) were solubilised in 1 mL of 50 % (v/v) ethanol, 0.1N hydrochloric acid, and heated at 90˚C for 40, 90, and 120 min before dialysis against water and lyophilisation. Purified α-, γ, ω2-, and ω5-gliadins, LMW-GS were deamidated by acidic treatment. Level of deamidation were determined for α-, γ, ω2-, and ω5-gliadins: 52 %, 32 %, 36 % and 51 % respectively [9].

Gluten samples treated by protein glutaminase

Protein-glutaminase (PG) Amano 50 (50 unit/g, 1 % active constituent, 99 % dextrin as bulking agent), was supplied by Amano Enzyme Inc. (Japan). Vital Gluten (Raisio Grain Starch Ltd, Finland) at 10 mg/mL was dispersed with PG at 0.13 Unit/mL in sodium phosphate buffer pH 7 and incubated at 40°C for various periods of time (0-30h). Control sample (Gluten CTL) was treated under the same conditions without PG for 24h. After incubation with enzyme, the samples were freeze-dried. In these conditions, deamidation degrees of 20 %, 45 %, 60 and 72 % were reported for incubation times of 1 h, 3 h, 5 h, and 30 h respectively [10].

Indirect ELISA

Reactivity of the three antibodies on gliadins and LMW-GS, either native or deamidated, was assessed by indirect ELISA as described by Battais *et al.* for sample preparation and coating [8]. Uncoated sites were blocked with 4 % defatted skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 for 1 h. MAbs were diluted in PBS containing 0.1 % skimmed milk (dilution 1:2 for PQQ3B4; MC01 at 0.4 µg/mL; dilution 1:50 for INRA-DG1) and then added and incubated for 1 h at room temperature. After washing with PBS 0.05 % Tween 20, bound antibodies were

detected with horseradish peroxidase anti-mouse IgG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France, dilution 1:3000) and ortho-phenylenediamine as the substrate. Color development was stopped with 100 µL of 2 M H2SO4, and the absorbance was read at 492 nm.

Inhibition ELISA

In order to further characterize the reactivity of the 3 mAbs, native or deamidated gliadin and gluten samples were used as inhibitors in competitive ELISA as described for INRA-DG1 in Tranquet *et al.* [7]. For mAb PQQ3B4 (diluted at 1:10), the coating solution was a total gliadin fraction at 0.3 µg/mL. For the mAb MC01 (diluted at 1 µg/mL), the coating solution was deamidated α-gliadins at 0.5 µg/mL.

Results and discussion

The reactivity of the 3 mAbs on native and deamidated gliadin sub-fractions and LMW GS were determined by indirect ELISA (Fig 1). Stars indicated the proteins which contain the immunogenic peptide against which the mAb was raised.

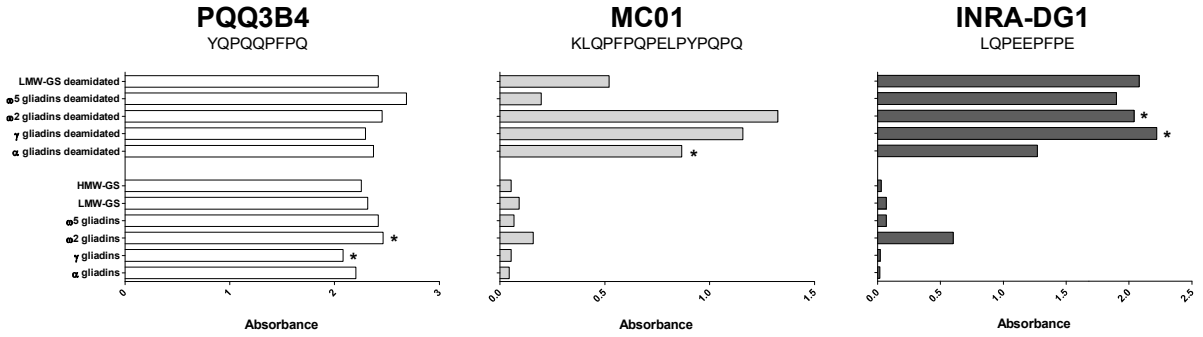


Figure 1. *Reactivity of mAbs PQQ3B4, MC01 and INRA-DG1 towards purified native and deamidated gliadins and GS in indirect ELISA. Stars indicated the proteins in which the immunogenic peptide was present.*

In antigen coated plate ELISA, mAb PQQ3B4 was able to bind to all gliadin classes and LMW-GS, whether native or deamidated. MAb MC01 recognised deamidated α, γ and ω2 gliadins and, to a lesser extent, deamidated LMW GS, while deamidated ω5 gliadins, native gliadins and native GS were not bound. INRA-DG1 recognised all deamidated gliadins and deamidated LMW-GS and showed low but noticeable reactivity to native ω2 gliadins, while the other native gliadins and GS were not bound.

The three mAbs were able to bind gluten proteins which contain their corresponding immunogenic peptide (stars in Fig 1) but they also recognised other gliadins and GS. As gliadins and LMW-GS share homologous sequences in their repetitive domains, the cross-reactivity of mAbs generated against these sequences was expected and has already been described [5,11]. Even considering this point, the wide reactivity of mAb PQQ 3B4 was remarkable. Furthermore, in this assay, the binding of PQQ3B4 to deamidated gluten proteins raises questions. Was the mAb capable of a certain extent

of cross-reactions with deamidated repeated sequences or was its binding only due to native sequences remaining in acid hydrolysed gluten proteins as previously shown for mAb R5 [7,12]? Impact of deamidation on mAb PQQ3B4 binding was tested by pepscan on the peptide QPQQGQQ. The replacement of at least 1 glutamine by glutamic acid abolished PQQ3B4 binding (data not shown). So it can be assumed that mAb PQQ3B4 binding on deamidated gliadins was due to interaction with remaining native epitopes. Both mAbs MC01 and INRA-DG1 have recognised deamidated gliadins and LMW-GS with minimal cross-reactivity to native proteins. A previous characterisation had shown that mAb INRA-DG1 has a restricted reactivity and recognizes strongly deamidated epitopes (XPXEPFPE, where X is Q or E). In the case of MC01, considering that the peptide against which it was generated has only one deamidation site, it can be hypothesised that MC01 would rather bind to weakly deamidated sequences.

In order to go further in determining their ability to discriminate products according to the presence of native sequences or weakly or strongly deamidated sequences, these three mAbs, were implemented in competitive ELISA using modified gliadin and gluten samples whose deamidation rates have been characterised.

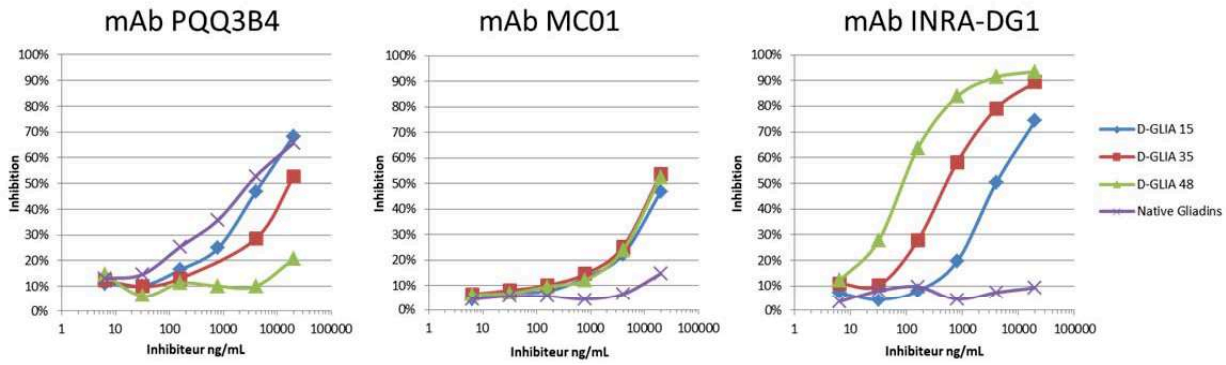


Figure 2a. *Characterisation of mAbs PQQ3B4, MC01 and INRA-DG1 in a competitive ELISA with native and deamidated gliadins (D-GLIA15, 35, 48).*

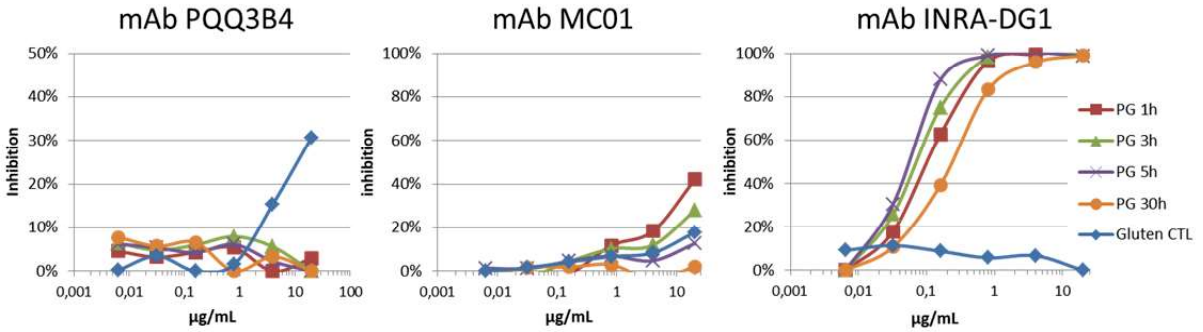


Figure 2b. *Characterisation of mAbs PQQ3B4, MC01 and INRA-DG1 in a competitive ELISA with native and PG-treated gluten 1h, 3h, 5h, 30h.*

In the PQQ3B4 competitive ELISA, native gliadins were the most potent inhibitor. Gliadin samples with low deamidation degree (DD of 15 % and 35 %) were still well detected by this mAb in contrast to the sample with 48 % of DD. The native gluten sample also partially inhibited the mAb binding to native gliadins coated on the plate but none of the PG-treated gluten samples (DD comprised between 20 and 72 %) inhibited PQQ3B4 mAb binding.

Opposite results were observed in the INRA-DG1 competitive ELISA: native gliadins or native gluten showed no inhibitory effect, while INRA-DG1 mAb bound well to all deamidated samples. The inhibitory effect on INRA-DG1 binding gradually increased as the DD of gliadin and PG-treated gluten samples increased. In competitive ELISA, the MCO1 mAb bound equally well to the samples D-GLIA 15, 35 and 48, which displayed an equivalent inhibition capability. In this test, only gluten treated with PG for 1 or 3 h inhibited MC01 (44 % and 28 % respectively); other PG-glutens were not detected neither the native samples.

This combination of three competitive ELISAs indicated that during the kinetic of acid hydrolysis of gliadins, the proportion of native epitopes decreased only significantly for the sample with a DD of 48 %. Despite different DD (15, 35 and 48 %), similar amount of weakly deamidated epitopes remained in the three D-GLIA samples; they much more differ by in their highly deamidated epitopes content. Our combination of mAbs indicated that only two of the PG-treated samples contained a low amount of weakly deamidated epitopes while all contained large amount of highly deamidated epitopes and no native epitopes.

Conclusions

In order to overcome the ambiguity resulting from global determinations of deamidation rates in deamidated gluten, we evaluated the three mAbs, PQQ3B4, MC01 and INRA-DG1 in competitive ELISAs for their capacity to differentiate products based on the extent of deamidation at the epitope level. PQQ3B4 reacts with native epitopes from the repeated domains of gliadins while MCO1 detect weakly deamidated epitopes. INRA DG1 binds to highly deamidated sequences which are the main IgE-binding epitopes involved in allergy to HWP.

References

1. Nakamura M, Yagami A, Hara K, *et al.* Evaluation of the cross-reactivity of antigens in Glupearl 19S and other hydrolysed wheat proteins in cosmetics. *Contact Dermatitis* 2016; **74:** 346–352.
2. Denery-Papini S, Bodinier M, Larré C, *et al.* Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy* 2012; **67:** 1023-1032.

3. Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, *et al.* Characterization of causative allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int* 2013; **62:** 435-445.

4. Kanerva PM, Brinck O, Sontag-Strohm TS, *et al.* Deamidation of gluten proteins and peptides decreases the antibody affinity in gluten analysis assays. *J Cereal Sci 2011*; **53:** 335-339.

5. Tranquet O, Larré C, Denery-Papini S. Selection of a monoclonal antibody for detection of gliadins and glutenins: A step towards reliable gluten quantification. *J Cereal Sci* 2012; **56:**760-763.

6. Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, *et al.* Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1690:** 220-230.

7. Tranquet O, Lupi R, Echasserieau-Laporte V, *et al.* Characterization of antibodies and development of an indirect competitive immunoassay for detection of deamidated gluten. *J Agric Food Chem* 2015; **63:** 5403-5409.

8. Battais F, Pineau F, Popineau Y, *et al.* Food allergy to wheat: identification of immunogloglin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy* 2003; **33:** 962-970.

9. Gourbeyre P, Denery-Papini S, Larré C, *et al.* Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Mol Nutr Food Res* 2012; **56:** 336-344.

10. Yong YH, Yamaguchi S, Matsumura Y. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *J Agric Food Chem* 2006; **54:** 6034-6040.

11. Röckendorf N, Meckelein B, Scherf KA, *et al.* Identification of novel antibody-reactive detection sites for comprehensive gluten monitoring. *PLoS One* 2017; **12**: e0181566.

12. Tranquet O, Lupi R, Larré C, *et al.* Complementarity of native and deamidated gluten detection with R5 and INRA-DG1 mAbs. In: Koehler P (ed) *Proceedings of the 28th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, 2015; pp. 21-25.

3. Deuxième article : IgE chimérique recombinante mimant la réactivité des IgE de patients allergiques au gluten désamidé

L'exploration biochimique et immunochimique de différents glutens désamidés industriels a montré que leur niveau de désamidation était très variable (Tranquet et al., 2015). Il est de plus apparu que pour chacun d'entre eux, les protéines du gluten portaient, dans leur domaine répété, un mélange de séquences natives, faiblement désamidées ou fortement désamidées (Tranquet, Echasserieau-Laporte, et al., 2017). Or, l'étude de Denery et al. sur une cohorte de 15 patients avait clairement montré que le niveau de désamidation à l'échelle de l'épitope était un paramètre déterminant l'intensité de fixation des IgE des patients (Denery-Papini et al., 2012). Que ce soit à l'échelle de l'extrait protéique ou à celle de l'épitope, l'effet du niveau de désamidation du gluten sur son allergénicité n'était pas connu.

Ce travail visait à produire deux IgE chimériques à partir des 2 anticorps monoclonaux INRA-DG1 et INRA-DG2 décrits précédemment (Tranquet et al., 2015). Nos objectifs étaient de déterminer si une unique IgE chimérique était capable de mimer la réactivité des IgE de patients allergiques au gluten désamidé et pouvait de ce fait être utilisée comme substitut pour évaluer le potentiel allergène de glutens modifiés. Deux IgE-chimériques, chIgE-DG1 et chIgE-DG2, ont ainsi été produites, l'une portant le paratope de INRA-DG1, l'autre celui de INRA-DG2. Les deux anticorps donnant des résultats similaires, seule l'IgE chimérique DG1 (chIgE-DG1) est décrite en détail dans l'article à suivre et publié dans PLOS ONE. Son activité biologique a été évaluée sur des basophiles humains et sur une lignée de basophiles de rat humanisés. Les basophiles sensibilisés avec cette unique IgE étaient activés en présence de gluten désamidé ; cette propriété est à mettre en relation avec la répétition de l'épitope reconnu au sein des allergènes désamidés. Sa capacité à mimer les IgE de patients a ensuite été évaluée en utilisant des échantillons de glutens et de gliadines plus ou moins désamidées. Cette comparaison a également fourni des informations sur l'étendue du répertoire des patients. Enfin, l'effet du niveau de désamidation du gluten sur son antigénicité et sur sa capacité à induire la dégranulation de basophiles a été exploré avec l'IgE chimérique et des sérums de patients. Grace à la bonne représentativité de la réactivité des sérums, chIgE-DG1 s'avère un outil intéressant pour évaluer le potentiel allergène de nouveaux ingrédients dérivés du gluten.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for *in vitro* allergenicity assessment of functionalized glutens

Olivier Tranquet[1]*, Jean-Charles Gaudin[1¤], Sarita Patil[2], Johanna Steinbrecher[2], Kayoko Matsunaga[3], Reiko Teshima[4], Shinobu Sakai[4], Colette Larré[1], Sandra Denery-Papini[1]

1 UR 1268 Biopolymers Interactions Assemblies, INRA, Nantes, France, **2** Center for Immunology and Inflammatory Diseases, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America, **3** Department of Integrative Medical Science for Allergic Disease, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan, **4** National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

¤ Current address: AGPF Unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, ORLEANS, France
* olivier.tranquet@nantes.inra.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Tranquet O, Gaudin J-C, Patil S, Steinbrecher J, Matsunaga K, Teshima R, et al. (2017) A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for *in vitro* allergenicity assessment of functionalized glutens. PLoS ONE 12(11): e0187415. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415

Editor: Heinz Fehrenbach, Forschungszentrum Borstel Leibniz-Zentrum fur Medizin und Biowissenschaften, GERMANY

Received: July 20, 2017

Accepted: October 19, 2017

Published: November 8, 2017

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Olivier Tranquet received specific funding for this work from his institution INRA, Nantes, France.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Acid-hydrolyzed wheat proteins (acid-HWPs) have been shown to provoke severe allergic reactions in Europe and Japan that are distinct from classical wheat allergies. Acid-HWPs were shown to contain neo-epitopes induced by the deamidation of gluten proteins. However, products with variable rates of deamidation can be found.

Objectives

In this work, we studied the effect of the extent of wheat proteins deamidation on its allergenicity. A recombinant chimeric IgE was produced and compared to patients' IgE for its capacity to assess the IgE-mediated triggering potential of acid-HWPs.

Methods

Sera from acid-HWP allergic patients were analyzed via ELISA and a functional basophil assay for their IgE reactivity to wheat proteins with different deamidation levels. A chimeric mouse/human IgE (chIgE-DG1) specific for the main neo-epitope, QPEEPFPE, involved in allergy to acid-HWPs was characterized with respect to its functionality and its reactivity compared to that of patients' IgE.

Results

Acid-HWPs with medium (30%) and high (50–60%) deamidation levels displayed a markedly stronger IgE binding and capacity to activate basophils than those of samples with

weak (15%) deamidation levels. The monoclonal chIgE-DG1 allowed basophil degranulation in the presence of deamidated wheat proteins. ChIgE-DG1 was found to mimic patients' IgE reactivity and displayed the same ability to rank acid-HWP products in a degranulation assay.

Conclusion

Increasing the deamidation level of products from 15% to 60% resulted in an approximately 2-fold increase in their antigenicity and a 100-fold increase in their eliciting potential. The chimeric ChIgE-DG1 may be a useful tool to evaluate functionalized glutens for their allergenic potential. By mimicking patient sera reactivity, chIgE-DG1 also provided data on the patients' IgE repertoire and on the functionality of certain repeated epitopes in gluten proteins.

Introduction

A large proportion of food allergies are IgE mediated. In these patients, the immune system is unbalanced towards a Th2 profile and allergens induce the production of immunoglobulins E (IgE), which bind to high-affinity IgE receptors (FcεRI) expressed on effector cells (e.g., mast cells and basophils). Subsequent crosslinking of IgE by allergens induces clustering of FcεRI and subsequent effector cell degranulation with the release of mediators such as histamine, leukotrienes and cytokines, resulting in allergic symptoms.

Wheat proteins, of which at least 80% are gluten proteins, have been shown to trigger IgE-mediated food, respiratory and contact allergies [1,2]. The group containing gluten proteins is composed of approximately 100 proteins, which can be classified into 2 groups: monomeric proteins (the gliadins) and polymeric proteins (the glutenin subunits). Gluten proteins contain large repeat domains composed of homologous and repetitive sequences of 6 to 8 amino acids rich in proline and glutamine [3]. Beyond their traditional uses in bakery and pastry, wheat proteins can be transformed by enzymatic or chemical hydrolysis to increase their water solubility and confer new foaming and emulsifying functionalities [4,5]. One of these processes, acid hydrolysis of wheat proteins via heating in acidic conditions, is conducted at the industrial scale to produce ingredients for food, feed and cosmetics. During such mild chemical treatment, gluten proteolysis is generally limited, but deamidation, which leads to the conversion of glutamines into glutamic acids, occurs to a larger extent.

Beginning in the 2000s, case reports have described allergic reactions to hydrolyzed wheat proteins (HWPs) in several European countries [6–8]. In 2012, our group described 15 patients with allergy to acid-HWPs. All of them had experienced severe allergic symptoms (anaphylaxis, exercise induced anaphylaxis or urticaria) after ingestion of food products containing HWPs. The patients were sensitized to neo-epitopes generated by acid hydrolysis of gluten. Allergy to acid-HWPs was therefore considered a new form of allergy. From 2002 to 2014, 25 severe cases were reported by the French Allergy Vigilance Network (http://www.allergyvigilance.org/). More dramatically, in Japan, a facial soap containing the acid-HWP Glupearl19S® (GP19S) was involved in more than 2000 cases of severe allergic reactions [9]. The sensitization mechanism probably occurred through contact via percutaneous or rhino-conjunctival routes over several months, after which the patients developed anaphylaxis or exercise induced anaphylaxis when ingesting classical wheat-based products [10].

The same IgE-binding consensus peptide, QPQQPFPQ, was identified for the French and Japanese patients [11,12] and corresponds to a repeat motif of γ and ω2 gliadins. The neo-epitope QPEEPFPE generated by deamidation of the QPQQPFPQ motif was found to be an immune-dominant epitope in the French patients. In the Japanese patients, peptides containing the deamidated PEEPFP sequence were also more reactive than the native epitope.

During acid hydrolysis of gluten proteins, deamidation does not occur on all glutamines. Acid-HWPs undergo variable rates of deamidation and hydrolysis depending on treatment intensity (pH, temperature, duration) [13,14], resulting in ingredients with different functionalities [5,15]. Monoclonal antibodies (mAbs) have been produced to detect deamidated gluten for food safety [13,16]. Tranquet et al. produced the mouse antibody INRA-DG1 (mDG1) raised against the neo-epitope QPEEPFPE, which is capable of discriminating between deamidated and native gluten sequences. Using this mAb together with mAb R5 specific for native sequences [17,18], Tranquet et al. revealed the heterogeneity of the deamidation level of industrially produced HWP [13]. However, nothing is known about the allergenicity of such products as a function of their deamidation level.

The potency of acid-HWP products to trigger reactions, i.e., their capacity to activate allergic effector cells in the presence of allergen-specific IgE, can be addressed with basophils and IgE. Humanized rat basophilic leukemia (RBL) cell lines, which express at least the α-chain of human FcεRI, can be used as a functional assay in the presence of human sera [19,20]. Indeed, this model was previously applied to demonstrate the capacity of acid-HWPs to trigger allergic reactions in French and Japanese patients [11,14]. However, sera from patients allergic to acid-HWPs are available in very limited amounts to analyze the eliciting capacities of functionalized glutens.

Recombinant monoclonal IgEs have been used as serum substitutes for studying the molecular properties of allergens and IgE/allergen interactions [21,22]. In particular, chimeric mouse/human IgEs have been produced to investigate on model allergens how IgE properties and epitope repertoires affect effector cell activation [23,24]. Recently, a combination of 6 recombinant chimeric IgEs specific for β-lactoglobulin was generated to assess the allergenic potential of whey hydrolysates [25].

The present work aimed to clarify how the extent of deamidation affects allergenicity by analyzing the reactivity of IgE from acid-HWP-allergic patients towards HWP products showing various deamidation levels. A chimeric mouse/human IgE directed to the neo-epitope, QPEEPFPE, was also studied for its capacity to be used in assessing the triggering potential of these products.

Materials and methods

Ethics statement

Human sera were collected from 2001 to 2014. All sera were collected into three distinct clinical trials corresponding to 3 successive research projects on the characterization of wheat allergens before their inclusion into our bio-collection (DC-2008-809). The first clinical trial was funded by the INRA call "Food, quality and Security: Identification of wheat allergenic proteins". It was approved by the Ethical Committee of the Cochin hospital (Paris, France). The second was funded by the INRA Food Research Program: Study of feasibility of wheat based products for some wheat allergic patients. It was approved by the Ethical Committee of Biomedical Research from Lorraine and by the Health Ministry (DGS2007-0066). The third was funded by the National Research Agency: PREDEXPITOPE (prediction and experimental validation of epitopes of wheat allergens). It was approved by the Ethical Committee of Ile de France III and AFSSAPS (authorization number 2008-A01565–50). These 3 clinical trials

received ethical approvals for serum collection and their use for research purposes and written consents were obtained from the patients or their parents.

Native and deamidated wheat proteins

Laboratory and industrial samples of native and deamidated gliadins and glutens were used in this study. Native gluten and native gliadins were previously prepared from wheat flour (c.v. recital) according to Battais et al. [26]. Briefly flour was defatted and gluten was separated from starch by extensive washing of the dough by water. The gliadin fraction was isolated from the gluten with 70% ethanol (v/v). Three fractions of deamidated gliadins with deamidation rates of 15%, 35% and 48% (referred to as D-GLIA 15, 35 and 48) have been produced by acid hydrolysis of gliadins and characterized in a previous study [13]. Briefly, Gliadins (10 mg) were solubilized in 1 mL of 50% (v/v) ethanol, 0.1 N hydrochloric acid, and heated at 90˚C for 40, 90, and 120 min. Deamidated Gluten (D-Gluten) was prepared by acid hydrolysis of gluten according to Gourbeyre et al. [27]: Gluten (20 mg) was solubilized in 1 mL of 0.1 N hydrochloric acid, and heated at 90˚C for 1h. The reaction was stopped by neutralization with 1 mL 0.1 N NaOH. Solutions were dialyzed against water and freeze-dried.

Industrial samples of HWP (HWP1 to HWP4 and GP19S) have been commercialized for food or cosmetic applications in Europe and in Japan and were previously described in former papers [7,11,13,14,28]. HWP1, 2 and 4 and GP19S have been prepared by acid hydrolysis; no data was available for HWP3. The deamidation rates were only specified for HPW1 and 2 (respectively 20–30% and 60%). The deamidation level of other products was estimated by a competitive ELISA using mAb mDG1 as described by Tranquet et al. The proteolysis extent of samples was analyzed by SDS-PAGE.

Subjects

Sera were obtained from nine subjects with food allergy to acid-HWP (S1 Table). The patients experienced symptoms of urticaria, exercise-induced anaphylaxis or anaphylactic shock. Patients 30 and 34 also presented contact urticaria with cosmetics containing HWP. One of these patients (n˚34) presented also symptoms of exercise-induced anaphylaxis due to wheat. The other patients were tolerant to native wheat proteins. Allergy to acid-HWP was established on the basis of the clinical history and/or by a positive double-blind placebo-controlled food challenge. Sensitization to deamidated or native wheat proteins was assessed by skin prick tests to wheat flour, gluten (ALK-Abello), and deamidated gluten (ALK-Abello isolate) or by specific IgE determination in fluorimetric ELISA (F-ELISA) using native fractions (gliadins, ω5-gliadins, LTP, albumins/globulins) and deamidated gluten (D-Gluten). Six of the sera (#30, 34, 285, 299, 352 and 390) had been previously used in Denery et al. (2012). A serum from one patient suffering from food allergy to wheat with atopic dermatitis was used as control (#1274).

Fluorimetric ELISA

Sera were analyzed for specific IgE by F-ELISA on white NuncMaxiSorp 384 well microtiter plates (Fischer Scientific, France) with a Biomek NXP automated workstation (BEKMAN-Coulter, France) as described [29]. Antigens were solubilized at 1 mg/mL by continuous agitation overnight at room temperature. Native gliadins were solubilized in 50% ethanol and D-GLIA 15, 35 and 48 were solubilized in phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1 mM KH_2PO_4; pH 7.2). Gluten and Acid-HWP were solubilized in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) with 0.1% SDS and 0.2% 2-mercaptoethanol. All antigens were then diluted in 0.1M carbonate buffer (pH9.6) at 5μg/mL for coating. Human sera

(diluted 1:10) and chIgE-DG1 (1:1000) were analyzed in triplicate. Concentrations in specific IgE were calculated by reference to a standard curve included in each microtiter plate (from 160 ng/ mL to 0.07 ng/mL of standard human IgE—2nd WHO international reference NIBSC 75/502). The standard curve was fit using four-parameter logistic regression. For each serum, results were normalized in comparison to the laboratory D-gluten sample by determining the ratios of antigen-specific IgE concentrations to the D-Gluten-specific IgE concentration. To determine differences in antigen recognition, matched ratios per serum were analyzed by repeated-measures one-way ANOVA and subsequent Bonferroni's multiple-comparisons test ($p<0.05$) using GRAPHPAD PRISM version 5.02 (GraphPad Software Inc., USA).

Construction of mouse/human IgE-DG1 heavy and light chain plasmids

Mab mDG1 (Tranquet, Lupi, Echasserieau-Laporte, et al. 2015) was raised in mouse against the peptide LQPEEPFPEQC containing a dominant IgE-binding epitope for patients allergic to acid-HWP. Variable domains of heavy and light chains (VH and VL) of mDG1 were cloned in pMD18 and sequenced (Genscript, Piscataway, USA). In order to express in mammalian cells the chimeric mouse/human IgE specific for this deamidated epitope we used two plasmids: pLNOH-2IgE and pLNOK (Norderhaug et al. 1997; Christensen et al. 2008). pLNOH and pLNOK had been designed to express IgG3 heavy chain and kappa light chain (Norderhaug et al. 1997), pLNOH was further modified to give pLNOH-2IgE in order to express IgE heavy chain (Christensen et al. 2008). pLNOH and pLNOK DNA were kindly provided by Pr Lund (ALK-Abello, Horsholm, Denmark). cDNA of mDG1 variable domains VH and VL were cloned in pMD18 and amplified by PCR with VH (5'VH primer: `TGC ATT CCG ATG TGC AGC TTC AGG`; 3' VH primer: `CGT ACG ACT CAC CTG AGG AGA CGG TGA CCG T`) and VK (5'VK primer `TGC ATT CCG ATG TTG TGA TGA CCC AA`; 3'VK primer `CGT ACG ACT CAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TG`) primer pairs respectively. These primers contained bsmI (bold) or bsiWI (underlined) restriction sites to allow cloning of the VH PCR product into plasmid pLNOH-2IgE and of the VK PCR product into plasmid pLNOK. In a first step, PCR products were ligated into pGEMTeasy (Promega, France) to facilitate digestion with bsmI and bsiWI and subcloning onto pLNOH-2IgE and pLNOK.

Expression of chimeric IgE-DG1

Full-length recombinant chimeric human IgE (chIgE-DG1) containing the mDG1 paratope was expressed by transient co-transfection of HEK293 cells (ATCC® CRL-1573) with pLNOH2IgE-DG1VH and pLNOK-DG1VL plasmids. To this end, adherent HEK293 cells were cultured at 5% CO_2 and 37˚C in DMEM containing 4.5 g/L L-glucose (ThermoFisher) and supplemented with 10% decomplemented FBS (Lonza, France), 4 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin (Lonza, France) and 100 μg/mL streptomycin (Lonza, France). The day before transfection, 3 x 10^5 cells were seeded into 24-well culture plates and grown for 24 h in 293 FreeStyle™ expression medium (ThermoFisher). Co-transfection with 1 μg of each heavy and light chain-encoding plasmid was performed using 293fectin™ (ThermoFisher, France) and Opti-MEM (ThermoFisher, France) according to the manufacturer's instructions. ChIgE-DG1 containing supernatant was collected 4 days after transfection and cleared by centrifugation for 10 min at 2500 g before 0.22 μm filtration and dialysis against PBS by ultracentrifugation on an Amicon® 50 kDa MWCO Ultra cell Unit (Millipore, France) and stored at -20˚C.

ChIgE-DG1 expression was controlled by Western blotting. Ten microliters of supernatant was loaded on a 12% precast gel (Bio-Rad, France) and separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a 0.22 μm nitrocellulose membrane (Bio-Rad, France) using the semi-dry transfer system (TransBlot Turbo, Bio-Rad). After saturation with PBS containing 4% BSA

(SIGMA, France), the membrane was incubated with peroxidase-conjugated anti-human IgE (1/3000, art. n° 9160–05, SouthernBiotech, USA) or peroxidase-conjugated anti-human kappa light chains (1/3000, art. N°GtxHu-084-DHRPX, ImmunoReagents, USA) diluted in PBS containing 0.1% BSA. Detection was performed using ECL reagent (Western Bright Quantum, Advansta, USA) and a cooled digital camera (LAS3000, Fuji).

The activity and specificity of chIgE-DG1 were controlled and compared with those of mDG1 via indirect ELISA on native or deamidated gliadins coated at 5 μg/mL. ChIgE-DG1 was revealed with peroxidase-conjugated anti-human IgE, while mDG1 was revealed with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1/3000, art. n° 170–6516, Bio-Rad).

Basophil activation assays

Degranulation assays were performed either with stripped human basophils as previously described [30] or with the humanized rat basophil cell line RBL-SX38 (clone P4B7), which expresses the α, β and γ chains of the human FcεRI [19] and was kindly provided by Pr. Kinet (Harvard Medical School, New York, USA).

For the stripped basophil assay, buffy coats were obtained from healthy, de-identified blood donors at the Massachusetts General Hospital Blood Donor Center (Boston, MA). The study was approved by the Institutional Review Board of Partners Healthcare (Boston, MA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll centrifugation. After washing, IgEs were stripped from the cell surface with a lactic acid buffer as previously described [31]. The cells were then passively sensitized by incubation at 37°C for 60 min with chIgE-DG1 at 2 μg/mL in RPMI/0.5% BSA. After washing, sensitized PBMCs were stimulated with D-Gluten (1ng/mL- 100μg/mL, diluted from a stock solution at 1 mg/mL in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 with 0.1% SDS and 0.2% 2-mercaptoethanol) in RPMI/BSA containing 2 μg/mL IL-3 (Shenandoah Biotechnology rH-IL3 100–30). Anti-IgE antibody (5 μg/mL, Bethyl Laboratories A80-109A) or RPMI/BSA/IL-3 alone was used as a control. Stimulation of 2 x 10^6 cells per condition was performed for 30 min at 37°C. The reaction was stopped with EDTA, and cells were stained by incubation at 4°C with labeled anti-CD123-phycoerythrin-cyanin5 (BioLegend, San Diego, Calif), CD63-fluorescein isothiocyanate (eBioscience, San Diego, Calif), and CD203c-phycoerythrin-cyanin 7 (BioLegend, San Diego, Calif) followed by flow cytometric analysis. Basophils were gated as side scatter–low, $CD123^+$, and $CD203c^+$ cells. Cells were measured with a FACS LSRII flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using BD FACS Diva software (BD Biosciences). $CD63^{++}$ basophils were determined after stimulation with D-gluten and after stimulation with anti-IgE. Basophil activation was expressed as the percentage of $CD63^{++}$ basophils induced by D-gluten to $CD63^{++}$ basophils induced by the anti-IgE antibody.

For the humanized RBL assay, sera were decomplemented by heating for 45 min at 56°C in the presence of 4 M glucose to reduce cytotoxicity [32]. RBL-SX38 cells at $1.2x10^4$ or $2.5x10^4$ cells/well in 96-well flat-bottom culture plates were grown for 24 h before sensitization with patient sera (diluted 1:25) or with chIgE-DG1 (100 ng/mL) for 24 h. Sensitized RBL-SX38 cells were washed 3 times with PBS before stimulation with either mouse anti-human IgE (0.5 μg/mL; Le27 clone, NBS-c BioScience, Vienne, Austria) or with antigens (0.1 ng/mL to 10 μg/mL) diluted in Tyrode buffer with 50% D_2O. β-hexosaminidase release induced by the crosslinking of the FcεRI was measured with pNAG (art. N° N9376, SIGMA) as previously described [20]. For each serum or chIgE-DG1, spontaneous release was determined with unstimulated cells and used as the background value. The β-hexosaminidase release induced by the samples was expressed as the percentage of the release observed with anti-human IgE antibodies (set as 100% degranulation). Curves presenting the percentage of degranulation as a function of

allergen concentration were fit using four-parameter logistic regression. Allergen concentrations corresponding to 50% of the highest release (EC_{50}) were then determined using GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The EC_{50} values of different samples were compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparisons test.

For inhibition experiments, cells were sensitized with 6 patients' sera and mDG1 [13] was used as an inhibitor of acid-HWP-induced degranulation. Acid-HWP samples (HWP-2 and GP19S) at 200 ng/mL were incubated with mDG1 at 20 μg/mL for 1 h at 37˚C in 2X Tyrode buffer before dilution in D_2O (v/v) and stimulation of sensitized RBL-SX38 cells. Data were analyzed with a Wilcoxon matched-pairs signed rank test for HWP2 or GP19S (*: $p \leq 0.05$).

Results

Characterization of industrial HWP and laboratory deamidated wheat proteins

Products with known and unknown levels of deamidation were used in the study. To enable a comparison among them, a competitive ELISA with mAb mDG1 was performed on all samples and the relative abundance of deamidated sequences was estimated using a comparison of their IC_{50} [13](Table 1). Three groups of products were extrapolated from this analysis and were characterized by their extent of deamidation: weak (D-GLIA 15 and HWP4 with deamidation level approximately 15%), medium (D-GLIA 35 and HWP1 with deamidation level approximately 30%) and high (D-GLIA 48, HWP2 and 3 and GP19S with deamidation level approximately 50–60%). The migration patterns of HWP samples in SDS-PAGE suggested that concomitantly with deamidation, strong proteolysis had occurred for HWP3, while it was only moderate for other samples (S1 Fig).

Determination of patient IgE reactivity to the various deamidated wheat proteins in ELISA

The sera from nine acid-HWP-allergic patients were used for this study. Native and deamidated gliadins, gluten and industrial HWP-specific IgE concentrations were measured by F-ELISA. Patients' IgEs were almost exclusively directed towards deamidated proteins since they displayed no or very low reactivity to native gliadin or gluten extracts (S2 Table). To compare the reactivity profiles of these patients independently of their total and specific IgE concentrations, which varied considerably from one patient to another, the results were normalized using D-Gluten-specific IgE as an internal reference. Fig 1 shows the ratios of the specific IgE concentration for each sample to the specific IgE concentration for D-Gluten. Statistical analysis of the means of the ratios revealed 3 distinct groups of samples ($p<0.001$):

Table 1. Relative abundance of deamidated sequences detected by mDG1 in deamidated protein fractions. Six concentrations (6 ng/mL-20 μg/mL) of native or deamidated samples were analyzed with a competitive mDG1 ELISA. For each sample, IC_{50}, i.e., the concentration that inhibited half of the maximum binding, was graphically determined.

	HWP1	HWP2	HWP3	HWP4	GP19S	D-GLIA 15	D-GLIA 35	D-GLIA 48
IC competitive ELISA	0.3	0.05	0.1	2	0.04	4	0.5	0.08
% Deamidation	25–30[a]	60[a]	50–60[c]	15[c]	50–60[c]	15[b]	35[b]	48[b]

[a] data from manufacturer

[b] data from Tranquet et al. 2015

[c] percentage of deamidation estimated by comparison to other samples

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.t001

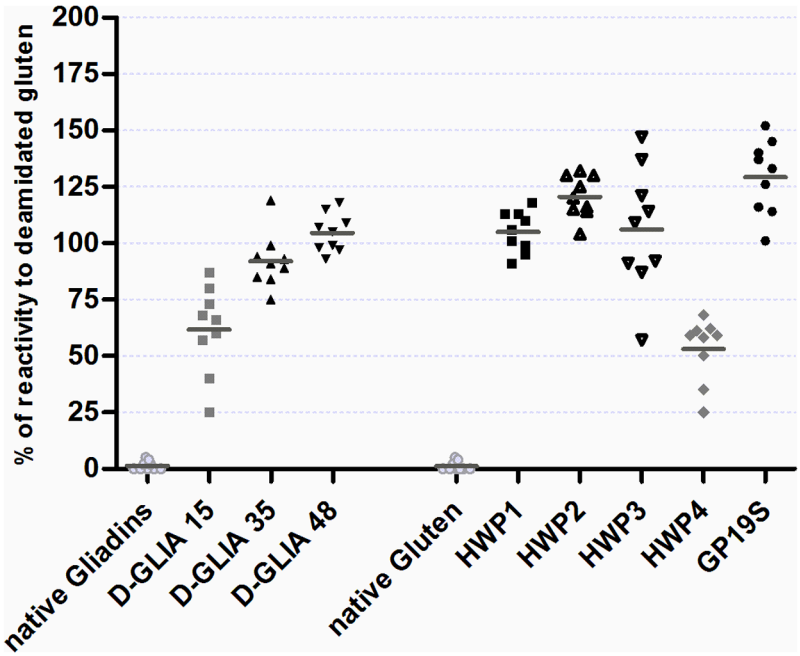


Fig 1. Reactivity of patient IgEs to deamidated wheat proteins with different deamidation levels. Concentrations of patients' specific IgEs for native gliadins, native gluten, deamidated gliadins (D-GLIA15, 35, 48), and gluten (D-Gluten), and industrial samples of HWP (HWP1, 2, 3, 4 and GP19S) were determined by indirect ELISA. The results were normalized by determining the ratios of the specific IgE for each protein fraction to the specific IgE for D-Gluten. Symbols represent means of triplicates. Statistical analysis by Bonferroni's multiple comparison test of the means of the ratios revealed 3 distinct groups of samples ($p<0.001$): 1) native gliadins and native gluten (light grey symbols), 2) D-GLIA 15 and HWP4 (dark grey symbols), and 3) samples with medium and high deamidation rates: HWP1, 2 and 3 and GP19S and D-GLIA35 and 48 (black symbols). HWP, hydrolyzed wheat protein. GP19S, Glupearl 19S®.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g001

1) native gliadins and native gluten, 2) weakly deamidated samples, and 3) samples with medium and high deamidation rates. Indeed, the mean ratios calculated for the weakly deamidated laboratory (D-GLIA 15) and industrial (HWP4) samples were not significantly different from one another, while they were significantly lower than those calculated for the medium and highly deamidated gliadin and HWP samples (HWP1, 2 and 3 and GP19S and D-GLIA35 and 48). Heterogeneity was observed in patients' IgE binding for some deamidated samples, particularly for D-GLIA15 and HWP4 and HWP3.

Characterization of patient IgE reactivity to the various deamidated wheat proteins using humanized RBL assay

RBL-SX38 cells were passively sensitized with the sera from patients allergic to acid-HWPs or with a serum from a wheat-allergic patient (#1274) and were stimulated with D-Gluten (from 1 to 1000 ng/mL) (data not shown). Wheat-allergic serum-sensitized RBL cells did not induce any β-hexosaminidase release upon stimulation with any doses of D-Gluten. However, acid-HWP-allergic sera (n = 7 of 9) -sensitized RBL cells resulted in the release of β-hexosaminidase to D-gluten in a dose-dependent manner. Similar EC_{50} values (approximately 10 ng/mL) were found for the 7 sera, although both the concentration and the proportion of specific IgEs to D-gluten of the total IgE varied considerably among the sera (S2 Table).

Two sera (#285 and #299) were used to investigate the capacity of the different HWP samples to induce RBL activation. These 2 sera were selected because they bound differently to

weakly deamidated samples in ELISA (ratio of 0.68 versus 0.35 on HWP4 for sera #285 and 299, respectively). Native gluten did not induce cell degranulation (Fig 2). The products with the highest deamidation levels (HWP2, HWP3 or GP19S) induced the most efficient RBL activation, irrespective of the sensitizing serum. Statistical analysis of the EC_{50} revealed that HWP2, HWP3 and GP19S were not significantly different ($p<0.05$), while HWP4 displayed a lower triggering capacity ($p<0.01$). These results suggest that patient IgE preferentially binds to highly deamidated products, which possess strong RBL activation abilities.

Inhibition of RBL degranulation by anti-peptide mDG1

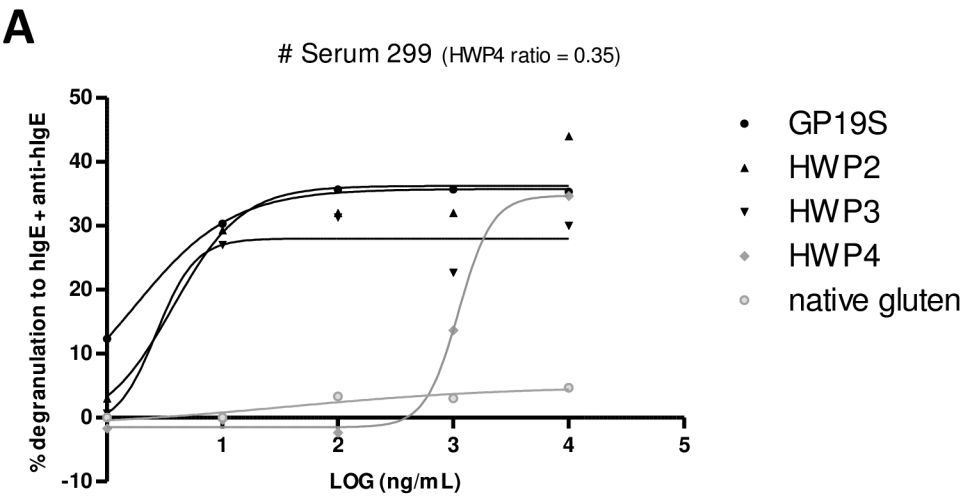
To further explore the contribution of highly deamidated sequences to IgE binding and RBL cell activation, mDG1 was used for inhibition experiments. This mouse mAb specifically binds the highly deamidated sequences E/QPEEPFPE and more weakly to the sequences E/QPQEPFPE [13]. The ability of mDG1 to inhibit HWP2- or GP19S-induced degranulation was investigated with 6 patients' sera. Both HWP2 and GP19S induced equivalent percentages of degranulation (means 28% and 27%, respectively) of RBL cells in the absence of an inhibitor (Fig 3). Pre-incubation with mDG1 systematically and significantly reduced the percentages of degranulation induced by either HWP2 or GP19S compared with those induced with the buffer alone ($p = 0.0340$ and $p = 0.0355$). The mean inhibition of the degranulation by mDG1 was 45% (range 30–63%) and 50% (33–72%) for HWP2 and GP19S, respectively.

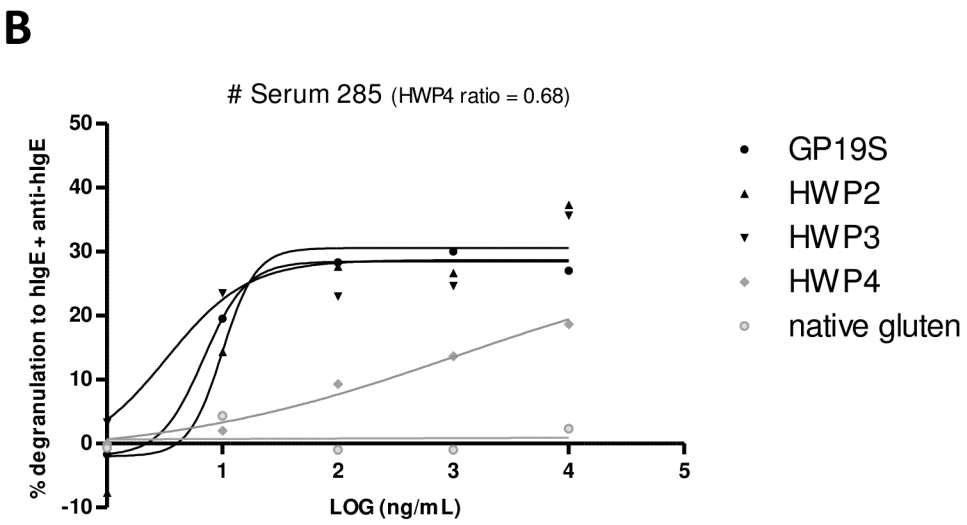
Generation and characterization of a chimeric mouse/human IgE DG1 specific for acid-HWPs

Since the highly deamidated sequences bound by mDG1 notably contributed to RBL cell degranulation, this mAb was used to produce a chimeric mouse/human recombinant IgE. cDNAs encoding the variable regions of mDG1 were cloned into plasmids containing sequences encoding constant regions of IgE heavy and kappa light chains in order to produce full-length IgE. HEK293 cells were co-transfected with the two expression vectors to transiently express a chimeric human IgE (chIgE-DG1) harboring the mDG1 paratope. After transfection, expression of chIgE-DG1 in the culture supernatant was assayed by Western blotting with anti-human Fcε (anti-hFcε) and anti-human κ light chain (anti-hkL) antibodies. A single band was revealed at approximately 190 kDa with both anti-hFcε and anti-hkL antibodies. After reduction, this band shifted to two bands, resolving at approximately 70 kDa with anti-hFcε and 25 kDa with anti-hkL (Fig 4A), as expected due to the formation of disulfide bridges between the two heavy chains of 70 kDa and two light chains of 25 kDa. The activity and specificity of chIgE-DG1 and mDG1 were compared via indirect ELISA on native gliadins and D-GLIA 48. As expected, no reactivity on native gliadins was observed. ChIgE-DG1 and mDG1 displayed equivalent titration curves for the detection of deamidated gliadins independently of the isotype (Fig 4B).

ChIgE-DG1 sensitization allowed basophil degranulation

The ability of chIgE-DG1 to bind to cells expressing the human FcεRI receptor was verified on human basophils and on RBL-SX38 cells. Basophils from human donors were stripped and passively sensitized with chIgE-DG1 before stimulation with either anti-human IgE or D-Gluten. Crosslinking of chIgE-DG1 with anti-human IgE induced basophil degranulation demonstrating that chIgE-DG1 is biologically functional. More interestingly, basophils sensitized with the single chIgE-DG1 antibody were able to degranulate in a dose-dependent manner when triggered with D-Gluten. Maximum degranulation was reached with D-Gluten at 10 μg/mL and the EC_{50} was graphically estimated at 200 ng/mL (Fig 5). Then, RBL-SX38 cells were





C

	EC50 (ng/mL)			
	GP19S	HWP2	HWP3	HWP4
#299	1.69	3.75	2.68	1114
#285	6.86	10.0	3.30	1047

Fig 2. Degranulation induced by different HWPs of RBL-SX38 cells sensitized with sera from 2 HWP-allergic patients. Human FcεRI-expressing RBL cells were passively sensitized with serum #299 (A) or with serum #285 (B) and subsequently activated with anti-human IgE antibody or five concentrations (1 ng/mL to 10 μg/mL) of native gluten, HWP2, 3, 4 or GP19S. The results are expressed as percentages of degranulation compared to anti-human IgE-induced degranulation. Symbols represent means of triplicates. EC_{50} values were determined using GraphPad Prism 5.02for Industrial HWPs (C). HWP, hydrolyzed wheat protein. GP19S, Glupearl 19S®.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g002

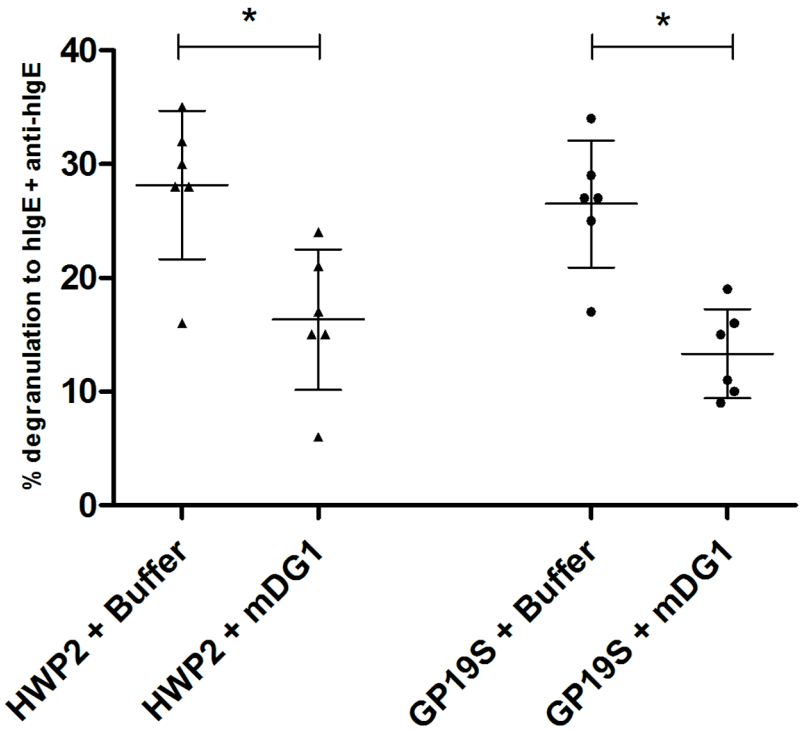


Fig 3. Inhibition of HWPs-induced-degranulation of RBL-SX38 cells by mAb mDG1. Human FcεRI-expressing RBL cells were passively sensitized with 6 sera (#30, 285, 299, 352, 1414, 1649) and subsequently cross-linked with anti-human IgE antibodies, HWP2 (100 ng/mL) or GP19S (100 ng/mL), pre-incubated for 1 h with purified mouse monoclonal antibody mDG1 (20 μg/mL). The results are expressed as percentage of degranulation compared to anti-human IgE-induced degranulation. HWP, hydrolyzed wheat protein. GP19S, Glupearl 19S®. Symbols represent means of triplicates. Horizontal bars represent mean, and error bars represent ± SD. Data were analyzed with a Wilcoxon matched-pairs signed rank test for HWP2 or GP19S (*: $p \leq 0.05$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g003

also passively sensitized with chIgE-DG1 at 100 ng/mL. As observed with human basophils, D-Gluten was able to induce the degranulation of chIgE-DG1-sensitized RBL-SX38 cells. Maximum degranulation was almost reached at 1000 ng/mL, and the EC_{50} was graphically estimated to be between 20 and 30 ng/mL (Fig 5).

Comparison of chIgE-DG1 reactivity with sera from acid-HWP-allergic patients

ChIgE-DG1 was then applied on our set of deamidated gliadins and HWPs, and its reactivity profile was compared with the reactivity profiles of sera from acid-HWP-allergic patients. ChIgE-DG1 bound to all deamidated samples, with no reactivity to native gliadins and gluten (Fig 6). Specific IgE ratios were determined using D-Gluten as the reference and compared with the means of IgE ratios already determined from human sera (plotted as stars). All of the samples, except for D-GLIA 15 and HWP4, exhibited similar binding between chIgE-DG1 and patients' sera. For D-GLIA 15 and HWP4, chIgE-DG1 binding was notably lower than that with human IgE.

The functionality of the chIgE-DG1 antibody was compared to that of the pool of the 6 positive patients' sera (sera #30, #285, #299, #352, #1414 and #1649) in the RBL-SX38 degranulation assay. RBL-SX38 cells were passively sensitized with either the pool of sera or with chIgE-DG1 and stimulated with serially diluted native or deamidated samples. Native gliadins

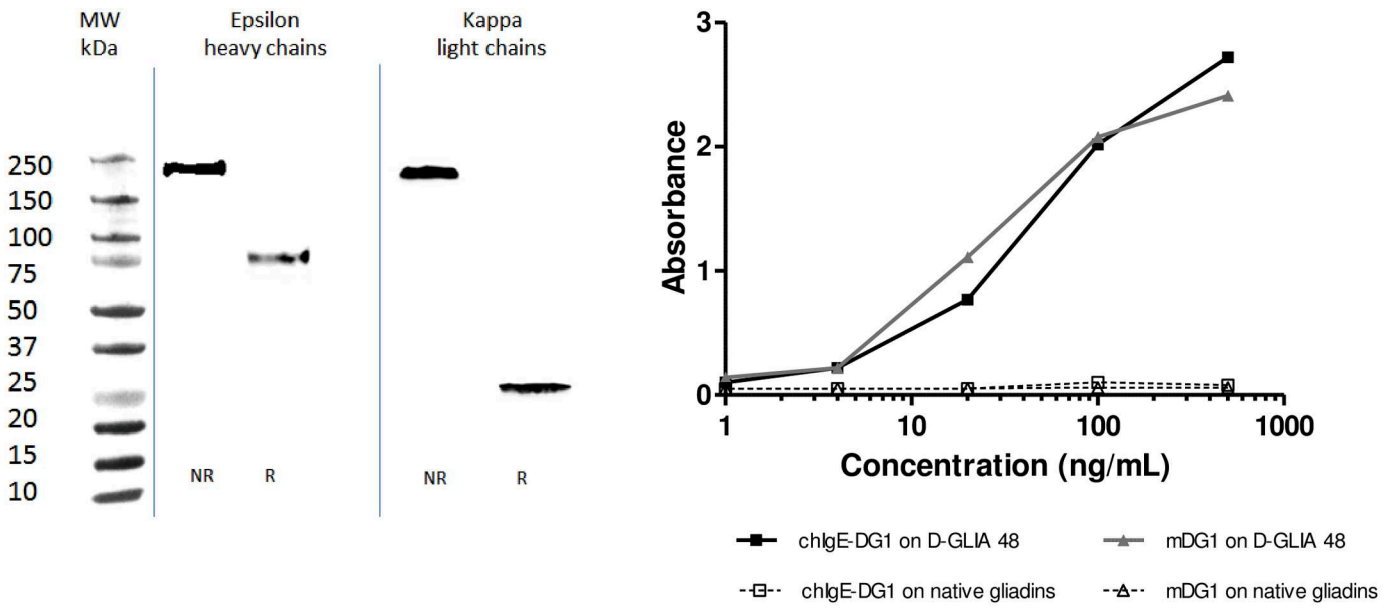


Fig 4. Characterization of chimeric mouse/human IgE-DG1. Chimeric mouse/human IgE-DG1 was transiently expressed in HEK293 cells, and the IgE concentrations were determined by ELISA. A. Non-reduced (NR) or reduced (R) proteins from the supernatant of transfected HEK293 cells were separated by SDS-PAGE (12%) and transferred onto nitrocellulose membrane. IgE heavy and kappa light chains were detected by peroxidase-conjugated anti-human epsilon heavy chains or by anti-human kappa light chains, respectively, prior to chemiluminescent visualization. B. The activity and specificity of chimeric IgE-DG1 and its mouse monoclonal IgG counterpart (mDG1) were compared by indirect ELISA. Native gliadin- or deamidated gliadin (D-GLIA 48) -coated ELISA plates were incubated with indicated concentrations of chimeric IgE-DG1 or mDG1.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g004

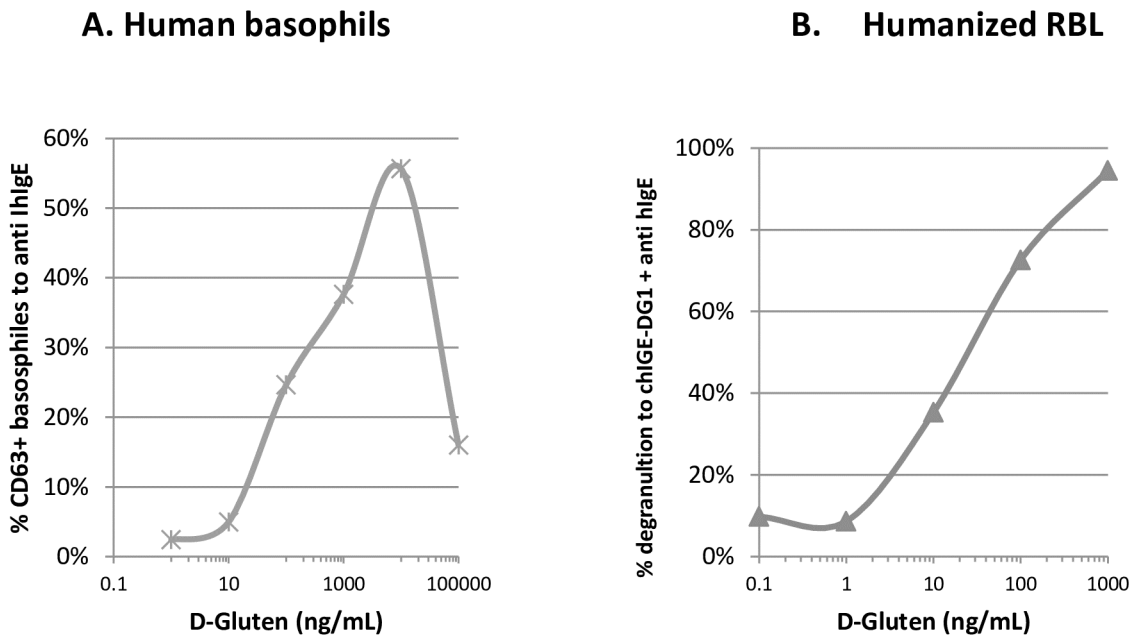


Fig 5. Chimeric mouse/human IgE-DG1 functionality on human basophils. A. Basophils from 2 human donors were passively sensitized with chIgE-DG1 and subsequently cross-linked with anti-human IgE antibodies or 6 doses of D-Gluten. For each D-Gluten dose, the mean percentage of $CD63^+$ cells was monitored by flow cytometry and compared to the percentage of $CD63^+$ cells induced by anti-human IgE. B. D-Gluten, Deamidated Gluten.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g005

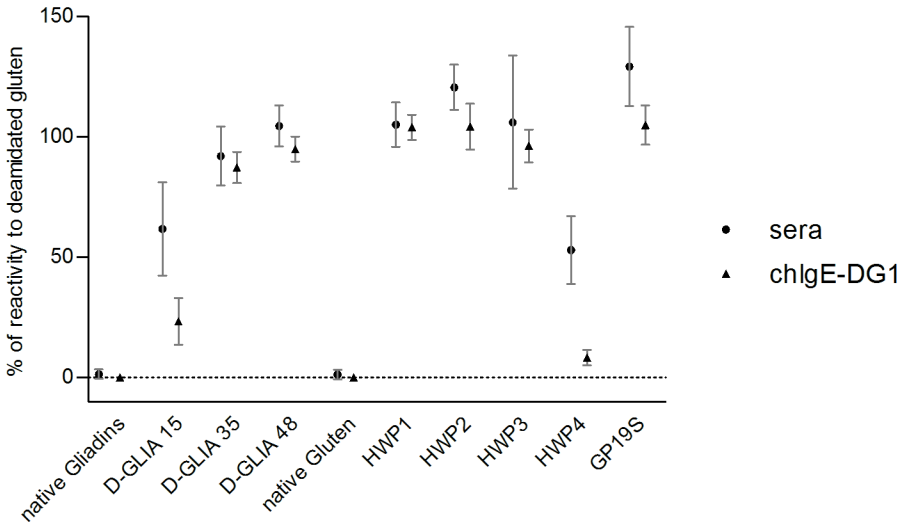


Fig 6. Reactivity of chimeric IgE-DG1 to various deamidated wheat protein fractions and comparison with patients' reactivity. The concentrations of chIgE-DG1 bound to native gliadins; native gluten; deamidated gliadins (D-GLIA15, 35, 48); D-gluten; HWP1, 2, 3, 4; and GP19S were determined by indirect ELISA. The results were normalized by determining the ratio of IgE for each protein to specific IgE for D-gluten. Symbols represent means of the ratio for human sera (circle, n = 9) or chIgE-DG1 (triangle, n = 3). Error bars represent ± SD. HWP, hydrolyzed wheat protein. GP19S, Glupearl 19S®.

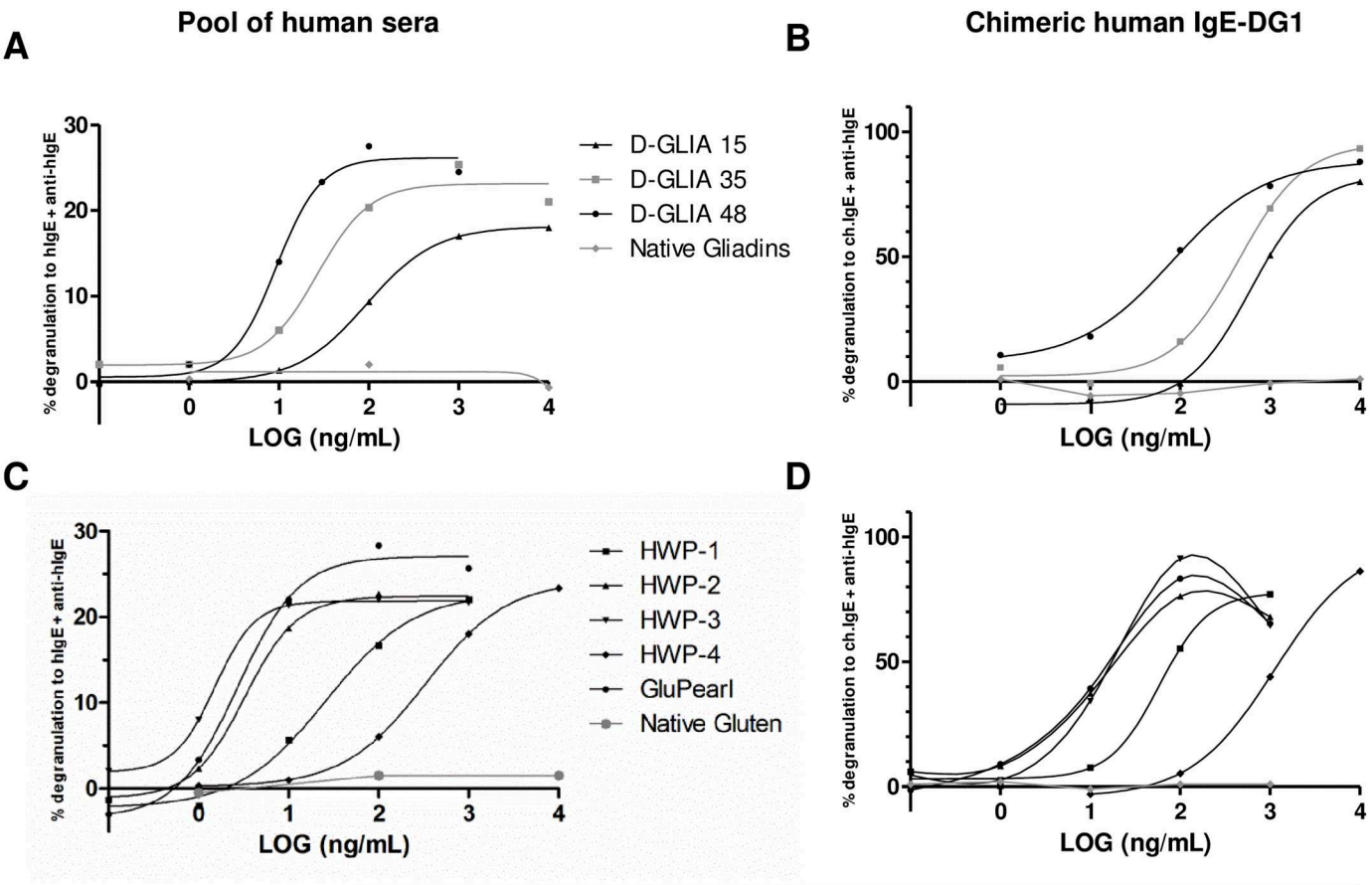
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g006

and gluten did not induce cell degranulation, whereas all deamidated samples induced β-hexosaminidase release of the cells sensitized either with the serum pool or with chIgE-DG1 (Fig 7). All HWPs elicited a similar maximal degranulation when cells were sensitized with the pool of sera or with chIgE-DG1 (22–28% and 76–91%, respectively). The triggering capacity of the various deamidated samples was compared by determining their EC_{50} values in the two sensitizing conditions (table in Fig 7). The industrial samples HWP2, 3 and GP19S displayed the lowest EC_{50}, resulting in the highest and equivalent triggering potential. HWP1 and 4 showed intermediate and low triggering potential, respectively. Although EC_{50} values obtained when cells were sensitized with the pool of sera or with the chIgE-DG1 were not in the same order magnitude, the ranking of the samples was the same and the gaps between degranulation curves were comparable for chIgE-DG1 and the pool of sera.

Discussion

Acid-HWPs have been shown to trigger numerous cases of contact or food allergies in Europe and Japan. *In vivo* models have been used to investigate the allergenic potency of different HWPs in comparison to native gluten proteins [28,33,34]. However, animal models pose ethical considerations and are not well suited for screening a large number of samples. In this study, we took advantage of the known IgE-binding epitopes involved in allergic reactions to acid-HWPs and developed a chimeric recombinant IgE usable as an *in vitro* evaluation tool of the antigenic and triggering potency of functionalized glutens. The effect of the deamidation level of the products on the reactivity of IgEs from patients allergic to acid-HWP was first explored. Then, patients' and chimeric IgE responses were compared via ELISA and a functional basophil degranulation assay.

A set of laboratory and industrial deamidated wheat proteins were used in the study. According to analysis, the samples could be classified and ranked into 3 groups, characterized



E

	EC 50 (ng/mL)							
	D-GLIA 15	D-GLIA 35	D-GLIA 48	HWP-1	HWP-2	HWP-3	HWP-4	GP19S
Pool of human sera	94	27	9	26	3	2	333	3
chimeric human IgE-DG1	609	451	82	59	13	17	1129	25

Fig 7. Comparison of human IgE and chimeric IgE-DG1 in an RBL SX38 assay with deamidated gliadins and HWP. RBL SX38 cells were sensitized with either a pool of 6 human sera (1/25; A and C) or chimeric IgE-DG1 at 100 ng/mL (B and D) and subsequently cross-linked with anti-human IgE antibody or five concentrations (1 ng/mL to 10 μg/mL) of native and deamidated gliadins (A and B); native gluten; HWP1, 2, 3, 4; or GP19S (C and D). The results are expressed as the percentage of degranulation compared to anti-human IgE-induced degranulation. The results corresponded to the mean of 3 independent experiments. EC_{50} values were determined by the regression of 4 parameters (E). D-GLIA, deamidated gliadin. HWP, hydrolyzed wheat protein. GP19S, Glupearl 19S®.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415.g007

by their weak (approximately 15%), medium (approximately 30%) or high (50–60%) level of deamidation

IgEs from HWP-allergic patients reacted with all deamidated industrial and laboratory samples, while they did not bind or bound only very weakly to the native gliadin or gluten samples. They reacted markedly more strongly with the samples with high and medium deamidation rates than with the weakly modified samples. Variability in IgE binding among patients' sera was sample dependent; it was particularly high for D-GLIA 15 and HWP3 and 4. For HWP3, this variability may be linked to the heterogeneity of the composition of this product, which is both deamidated and extensively hydrolyzed.

The products with medium and high deamidation rates also possessed the strongest ability to activate RBL-SX38 cells sensitized with patient IgE. In addition, mAb mDG1, presenting a restricted reactivity to the heptapeptides E/QPEEPFPE, was able to markedly inhibit the

activation of HWP-induced RBL cells. These results highlight that the allergenicity of deamidated products was mainly borne by epitopes with a relatively high modification level.

These results are in accordance with the sequential epitopes identified in our previous work [11]. Using synthetic peptides corresponding to a consensus IgE-binding sequence with all combinations of glutamine substitutions into glutamic acid, we observed increasing IgE binding with increasing deamidation rate, and the QPEEPFPE sequence showed the highest IgE-binding intensity. However, IgE binding to weakly deamidated sequences was also observed. Although these responses occurred with a low binding intensity and with variability among patients, they might explain why inhibition of degranulation by mDG1 was incomplete. Our previous studies indicate that human sera recognized a broader repertoire of peptides than did mAb mDG1 [11,13]. In contrast to their reaction to this mAb, most patients' sera were still able to react with peptides having only one or two Q/E substitutions and tolerated the presence of glutamine at positions Q_2, Q_3 or Q_4.

Due to the significant contribution to IgE-binding and basophil activation of the deamidated epitopes bound by mDG1, this mAb was used to generate a chimeric mouse/human recombinant IgE specific for these sequences. The mAb was produced in the HEK293 cell line using an expression vector obtained by inserting cDNA encoding variable domains of mAb mDG1 into plasmids containing the sequences encoding the human IgE scaffold according to Christensen et al. (2008). The resulting recombinant chIgE-DG1 retained the activity and the specificity of the original mouse IgG and was able to bind to the human FcεRI receptor on both human basophils and RBL-SX38 cells. More interestingly, human basophils and RBL-SX38 cells sensitized with this unique chIgE-DG1 were activated by deamidated gluten. This ability of deamidated gluten to induce the degranulation of basophils sensitized with a single monoclonal IgE has to be related to the repetition of the mAb epitopes within γ and ω2-gliadin sequences. The repetition of linear epitopes in the allergen sequence is a distinctive feature of the repeated domains of gluten proteins [35,36]. We previously hypothesized that in ω-gliadins, composed of a unique repeated domain, these recurrent epitopic sequences may promote efficient effector cell degranulation [11,37]. In the case of deamidated wheat proteins, using a monoclonal IgE, we proved here that repeated epitopes were able to trigger basophil activation and therefore strongly contributed to gluten protein allergenicity. However, this feature may not be a general attribute of all gluten proteins, as α-gliadin repetitive domain alone was not able to induce RBL cell activation [38]. Recently, Gieras et al. showed that both the number and the proximity of epitopes on the sequence influenced effector cell activation capacity. Artificial allergens containing four IgE epitopes in adjacent positions were more potent at inducing basophil degranulation than molecules with fewer epitopes or composed of distantly placed epitopes [24]. Deamidated γ and ω2-gliadins are the main allergens involved in allergy to acid-HWPs [11]. These allergens appeared to fulfill both criteria; they not only contain a large number of repetitions (8/9) of the consensus IgE-binding epitope but these sequences also are in close proximity to each other.

We established that the chIgE-DG1 possesses an IgE-binding capacity equivalent to that of patients' sera on laboratory and industrial samples with medium and high deamidation rates and did not react with native gliadin and gluten fractions. As expected, because the reactivity of its paratope is limited to a few highly deamidated epitopes, the chIgE-DG1 possessed a more restricted specificity than did most of the patients' sera.

The chIgE-DG1 also mimicked patient sera when used in the functional RBL assay. In this assay, the various deamidated products were ranked in the same order according to their triggering potential, irrespective of the sensitizing antibodies (chIgE-DG1 or human IgE pool). Regarding the five industrial products, the products with the highest potency were the same in the two sensitizing conditions, i.e., HWP2, 3 and GP19S. The HWP1 product displayed an

intermediate response; depending on the antibodies, it was 3 to 10 times less potent for cell activation than the former products; HWP4 was less active, approximately 100 times less active than HWP2. The ranking of products in the RBL assay matched the classification performed on the basis of the deamidation levels. Although HWP3 presented a higher degree of proteolysis than HWP2, this did not affect its triggering potential.

Functionalized glutens are among ingredients derived from plant proteins usable as animal protein substitutes in the context of sustainable food production. Safety assessment of modified glutens is therefore required with respect to the significant allergenic risk of acid-HWPs, which has been highlighted by the numerous Japanese cases and by the severity of reactions in both Europe and Japan. Although, no cases of allergy to acid-HWPs have been reported by the French Allergy Vigilance Network from 2014, Nakamura recently showed that such ingredients were still released on the market by European companies [9]. Human sera are not available in sufficient amounts for risk assessment purposes. In addition, highly specific IgE concentrations are generally needed in effector cell activation tests. The basophil activation test based on RBL-SX38 cells sensitized with chIgE-DG1 therefore appeared to be a suitable *in vitro* alternative to the use of human sera or animal models. This test can be used to assess the allergenicity of functionalized wheat proteins. In the same way, Knipping et al. recently proposed an RBL degranulation assay based on a pool of β-lactoglobulin-specific chimeric IgE for the *in vitro* assessment of whey hydrolysate [25]. A ring-trial for intra- and inter-laboratory validation showed that this type of assay based on humanized RBL cells and chimeric mouse/human IgE monoclonal antibodies was a robust, reproducible, and promising tool for use in safety assessment [39].

Of note, for the group of French sera evaluated in this study, the HWP GP19S commercialized in Japan displayed IgE-binding and triggering capacities matching those of two products released in Europe. Although the sensitization mode and the duration of exposition differed in these populations, cases of allergy to acid-HWPs presented high similarities, notably in the type and severity of symptoms. The larger number of cases in Japan probably resulted from a combination of factors such as the wide exposure to the GP19S-containing soap, the presence of a detergent that was shown to favor sensitization by gluten proteins [34], and repeated skin applications [40]. Similar dominant epitopes and allergens have also been reported for both patient populations [11,12]. We confirmed here that the culprit allergen sources possessed similar biochemical and allergenic properties. These results suggest that French and Japanese patients suffered from the same unconventional allergy to deamidated wheat proteins generated by acid hydrolysis.

The comparison between patients' and chimeric IgE antibodies enables investigations of the composition of patients' IgE repertoire. The similar reactivity of patients' IgEs and of the chimeric anti-peptide IgE suggests that continuous epitopes play an important role in this type of allergy. The equivalent triggering activity of the IgE pool with that of the monoclonal chIgE-DG1 suggests that a limited IgE repertoire might be involved in allergy to acid-HWPs, with IgE preferentially binding highly deamidated sequences. However, we observed that the patients' sera displayed a somewhat larger reactivity than the chIgE-DG1, notably towards low deamidated products or epitopes [11,13]. Chemical deamidation is a random process. Within the glutamine-rich repeat domains of gluten proteins, this process randomly generates discrete sequences with various deamidation levels (Tranquet 2015), with the amount of highly deamidated sequences increasing with the treatment intensity. It is not easy to clarify whether the broader patient reactivity results from a restricted repertoire of IgEs that are able to cross-react with sequences possessing various combinations of deamidation or whether it stems from a larger IgE repertoire.

To conclude, a chimeric mouse/human IgE was produced against the deamidated epitope QPEEPFPE involved in allergy to acid-HWP products. This recombinant antibody was equivalent to patient sera in its ability to classify and rank industrial deamidated glutens in a basophil activation assay and could be a relevant tool in the allergenicity evaluation of functionalized glutens. This reagent also demonstrates that epitope organization in the repeated domains of some gluten proteins allows a single monoclonal IgE to efficiently trigger effector cells. This study also shows that the IgE repertoire of French acid-HWP-allergic patients might be restricted and that effector cells are mainly activated by highly deamidated epitopes.

Supporting information

S1 Fig. SDS Page analysis of Hydrolyzed wheat proteins (HWP) on 4–20%. Hydrolyzed wheat protein (30μg) or native gluten (10 μg) were separeated on StainFree 4–20% gels (Bio-Rad). Proteins were revealed by 5 min. photocativation of in gel-flurorochrome which bind to tryptophan (GelDoc EZ system, BioRad). GP, Glupearl19S. Glut, native gluten. D-Glut, deamidated gluten.
(DOCX)

S1 Table. Clinical and serological characteristics of allergic patients. Patient's reactivity towards native proteins (Wheat or Gluten) or Deamidated Gluten (D-Gluten from ALK-A-bello) was tested by skin prick test. Specific IgE concentrations to albumins/globulins fraction (A/G), gliadins, ω5 gliadins, LTP and D-Gluten (laboratory made) were determined by F-ELISA.–negative; nd, not determined; U, Urticaria; EIA, Exercise induced anaphylaxis; AS, Anaphylaxis; AD Atopic dermatitis.
(DOCX)

S2 Table. Specific IgE concentrations of allergic patients to various native and deamidated wheat protein fractions. Concentrations of total and specific IgE were determined by F-ELISA. D-GLIA, Deamidated Gliadins. HWP, Hydrolyzed Wheat Proteins. GP19S, GluPearl 19S®.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Florence Pineau and Laurence Lavenant for their excellent technical assistance in immunochemistry and molecular biology. The authors also thank Audrey Bayout and Julien Oré for their involvement in the production of the chimeric IgE. Sandra Denery-Papini, Colette Larré and Olivier Tranquet are participants in COST Action FA1402, "Improving Allergy Risk Assessment Strategy for New Food Proteins" (impARAS).

Author Contributions

Conceptualization: Olivier Tranquet, Sandra Denery-Papini.

Formal analysis: Olivier Tranquet, Jean-Charles Gaudin, Colette Larré, Sandra Denery-Papini.

Funding acquisition: Olivier Tranquet, Colette Larré, Sandra Denery-Papini.

Investigation: Olivier Tranquet, Johanna Steinbrecher.

Methodology: Olivier Tranquet, Johanna Steinbrecher, Sandra Denery-Papini.

Resources: Olivier Tranquet, Sarita Patil, Kayoko Matsunaga, Reiko Teshima, Shinobu Sakai, Sandra Denery-Papini.

Supervision: Jean-Charles Gaudin, Sandra Denery-Papini.

Validation: Olivier Tranquet, Sarita Patil, Sandra Denery-Papini.

Writing – original draft: Olivier Tranquet, Sandra Denery-Papini.

Writing – review & editing: Olivier Tranquet, Jean-Charles Gaudin, Sarita Patil, Kayoko Matsunaga, Reiko Teshima, Shinobu Sakai, Colette Larré, Sandra Denery-Papini.

References

1. Battais F, Richard C, Szustakowski G, Denery-Papini S, Moneret-Vautrin DA, Leduc V, et al. Wheat flour allergy: an entire diagnostic tool for complex allergy. Eur Ann Allergy Clin Immunol. 2006; 38: 59–61. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16711538 PMID: 16711538
2. Tatham AS, Shewry PR. Allergy to wheat and related cereals. Clin Exp Allergy. 2008; 38: 1712–26. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x PMID: 18823308
3. Shewry PR, Tatham AS. The characteristics, structures and evolutionary relationships of prolamins. In: Shewry PR, Casey R, editors. Seed Proteins. Kluwer Aca. Dordrecht, The Netherlands; 1999. pp. 11–33.
4. Day L, Augustin MA, Batey IL, Wrigley CW. Wheat-gluten uses and industry needs. Trends Food Sci Technol. 2006; 17: 82–90. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.003
5. Liao L, Zhao M, Ren J, Zhao H, Cui C, Hu X. Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten. J Sci Food Agric. 2009; 90: n/a–n/a. https://doi.org/10.1002/jsfa.3830 PMID: 20355061
6. Varjonen E, Petman L, Mäkinen-Kiljunen S. Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. Allergy. 2000; 55: 294–296. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2000.00516.x PMID: 10753023
7. Leduc V, Moneret-Vautrin D-A, Guerin L, Morisset M, Kanny G. Anaphylaxis to wheat isolates: Immunochemical study of a case proved by means of double-blind, placebo-controlled food challenge. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111: 897–899. https://doi.org/10.1067/mai.2003.1345 PMID: 12704375
8. Hann S, Hughes M, Stone N. Allergic contact dermatitis to hydrolyzed wheat protein in a cosmetic cream. Contact Dermatitis. 2007/01/25. 2007; 56: 119–120. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.00977.x PMID: 17244090
9. Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano-Nagai A, Kobayashi T, Matsunaga K. Evaluation of the cross-reactivity of antigens in Glupearl 19S and other hydrolysed wheat proteins in cosmetics. Contact Dermatitis. 2016; 74: 346–352. https://doi.org/10.1111/cod.12551 PMID: 27027256
10. Chinuki Y, Morita E. Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Protein in Soap. Allergol Int. ISHIMIZU BLDG, 7F, 1-35-26, HONGO, TOKYO, 113–0033, JAPAN: JAPANESE SOCIETY ALLERGOLOGY; 2012; 61: 529–537. https://doi.org/10.2332/allergolint.12-RAI-0494 PMID: 23093796
11. Denery-Papini S, Bodinier M, Larré C, Brossard C, Pineau F, Triballeau S, et al. Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. Allergy. 2012; 67: 1023–1032. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x PMID: 22737987
12. Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, et al. Characterization of Causative Allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap. Allergol Int. JAPANESE SOCIETY ALLERGOLOGY, MY BLDG 4F, 1-13-3, UENO, TAITO-KU, TOKYO, 110–0005, JAPAN; 2013; 62: 435–445. https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0561 PMID: 23963475
13. Tranquet O, Lupi R, Echasserieau-Laporte V, Pietri M, Larré C, Denery-Papini S. Characterization of Antibodies and Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten. J Agric Food Chem. 2015; 63: 5403–5409. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00923 PMID: 25980542
14. Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of Allergenicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in vitro Elicitation Test. Int Arch Allergy Immunol. ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND: KARGER; 2013; 160: 259–264. https://doi.org/10.1159/000341671 PMID: 23075478

15. Cui C, Hu Q, Ren J, Zhao H, You L, Zhao M. Effect of the structural features of hydrochloric acid-deamidated wheat gluten on its susceptibility to enzymatic hydrolysis. J Agric Food Chem. American Chemical Society; 2013; 61: 5706–14. https://doi.org/10.1021/jf400281v PMID: 23705589

16. Masiri J, Benoit L, Katepalli M, Meshgi M, Cox D, Nadala C, et al. Novel Monoclonal Antibody-Based Immunodiagnostic Assay for Rapid Detection of Deamidated Gluten Residues. J Agric Food Chem. 2016; 64: 3678–3687. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06085 PMID: 27087556

17. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Méndez E, Mothes T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. Eur J Gastroenterol Hepatol. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 530 WALNUT ST, PHILADELPHIA, PA 19106–3621 USA; 2001; 13: 1189–1193. https://doi.org/10.1097/00042737-200110000-00011

18. Tranquet O, Lupi R, Larré C, Denery S. Analytical research reports Complementarity of native and deamidated gluten detection with R5 and INRA-DG1 mAbs. In: Koehler P, editor. Proceedings of the 28th Meeting of the WORKING GROUP on PROLAMIN ANALYSIS and TOXICITY. Freising: Verlag Deutsche Forschungsanstal t für Lebensmittelchemie; 2015. pp. 21–25. http://wgpat.com/proceeding_28th.pdf

19. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. J Immunol. 1996; 157: 221–30. PMID: 8683119

20. Bodinier M, Brossard C, Triballeau S, Morisset M, Guérin-Marchand C, Pineau F, et al. Evaluation of an in vitro Mast Cell Degranulation Test in the Context of Food Allergy to Wheat. Int Arch Allergy Immunol. 2008/03/28. 2008; 146: 307–320. https://doi.org/10.1159/000121465 PMID: 18367844

21. Flicker S, Vrtala S, Steinberger P, Vangelista L, Bufe A, Petersen A, et al. A Human Monoclonal IgE Antibody Defines a Highly Allergenic Fragment of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 5: Molecular, Immunological, and Structural Characterization of the Epitope-Containing Domain. J Immunol. 2000; 165: 3849–3859. https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3849 PMID: 11034391

22. Madritsch C, Flicker S, Scheiblhofer S, Zafred D, Pavkov-Keller T, Thalhamer J, et al. Recombinant monoclonal human immunoglobulin E to investigate the allergenic activity of major grass pollen allergen Phl p 5. Clin Exp Allergy. 2011; 41: 270–280. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03666.x PMID: 21143538

23. Christensen LH, Holm J, Lund G, Riise E, Lund K. Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge. J Allergy Clin Immunol. 2008; 122: 298–304. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.026 PMID: 18572230

24. Gieras A, Linhart B, Roux KH, Dutta M, Khodoun M, Zafred D, et al. IgE epitope proximity determines immune complex shape and effector cell activation capacity. J Allergy Clin Immunol. Elsevier Inc.; 2015; 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.055 PMID: 26684291

25. Knipping K, Simons PJ, Buelens-Sleumer LS, Cox L, den Hartog M, de Jong N, et al. Development of β-Lactoglobulin-Specific Chimeric Human IgEκ Monoclonal Antibodies for In Vitro Safety Assessment of Whey Hydrolysates. Karagiannis SN, editor. PLoS One. 2014; 9: e106025. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106025 PMID: 25153680

26. Battais F, Pineau F, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, et al. Food allergy to wheat: identification of immunogloglin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. Clin Exp Allergy. 2003; 33: 962–970. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01592.x PMID: 12859454

27. Gourbeyre P, Denery-Papini S, Larré C, Gaudin J-C, Brossard C, Bodinier M. Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. Mol Nutr Food Res. 2012; 56: 336–344. https://doi.org/10.1002/mnfr.201100353 PMID: 22147540

28. Kroghsbo S, Andersen NB, Rasmussen TF, Jacobsen S, Madsen CB. Acid Hydrolysis of Wheat Gluten Induces Formation of New Epitopes but Does Not Enhance Sensitizing Capacity by the Oral Route: A Study in "Gluten Free" Brown Norway Rats. Mantis NJ, editor. PLoS One. 2014; 9: e107137. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107137 PMID: 25207551

29. Lupi R, Masci S, Rogniaux H, Tranquet O, Brossard C, Lafiandra D, et al. Assessment of the allergenicity of soluble fractions from GM and commercial genotypes of wheats. J Cereal Sci. 2014; 60: 179–186. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.02.009

30. Kleine Budde I, de Heer PG, van der Zee JS, Aalberse RC. The Stripped Basophil Histamine Release Bioassay as a Tool for the Detection of Allergen-Specific IgE in Serum. Int Arch Allergy Immunol. 2001; 126: 277–285. https://doi.org/10.1159/000049524 PMID: 11815734

31. Santos AF, James LK, Bahnson HT, Shamji MH, Couto-Francisco NC, Islam S, et al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major

allergens. J Allergy Clin Immunol. 2015; 135: 1249–1256. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.012 PMID: 25670011

32. Binaghi RA, Demeulemester C. Influence of the medium on the heat and acid denaturation of IgE. J Immunol Methods. 1983; 65: 225–233. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90319-8 PMID: 6655241

33. Gourbeyre P, Desbuards N, Grémy G, Tranquet O, Champ M, Denery-Papini S, et al. Perinatal and Postweaning Exposure to Galactooligosaccharides/Inulin Prebiotics Induced Biomarkers Linked to Tolerance Mechanism in a Mouse Model of Strong Allergic Sensitization. J Agric Food Chem. American Chemical Society; 2013; 61: 6311–6320. https://doi.org/10.1021/jf305315g PMID: 23746232

34. Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R. Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. Allergy. 2012; 67: 1392–1399. https://doi.org/10.1111/all.12018 PMID: 22994386

35. Baar a, Pahr S, Constantin C, Giavi S, Papadopoulos NG, Pelkonen a S, et al. The high molecular weight glutenin subunit Bx7 allergen from wheat contains repetitive IgE epitopes. Allergy. 2014; 69: 1316–1323. https://doi.org/10.1111/all.12464 PMID: 24943225

36. Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, et al. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. Allergy. 2005; 60: 815–821. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00795.x PMID: 15876313

37. Denery-Papini S, Bodinier M, Pineau F, Triballeau S, Tranquet O, Adel-Patient K, et al. Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. Clin Exp Allergy. 2011; 41: 1478–1492. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03808.x PMID: 21771117

38. Mameri H, Brossard C, Gaudin J, Gohon Y, Paty E, Beaudouin E, et al. Structural Basis of IgE Binding to α- and γ-Gliadins: Contribution of Disulfide Bonds and Repetitive and Nonrepetitive Domains. J Agric Food Chem. 2015; 63: 6546–6554. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01922 PMID: 26186140

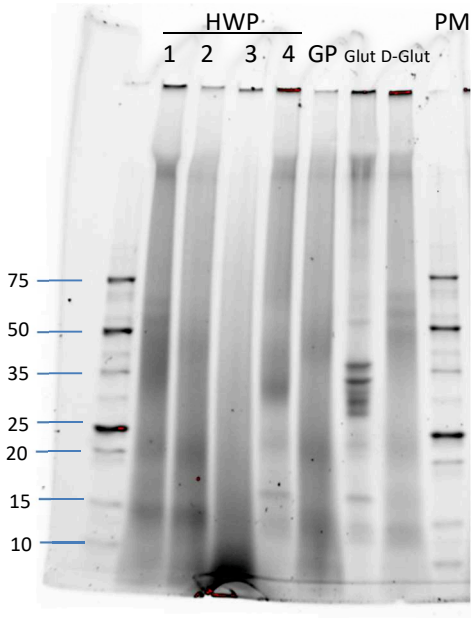
39. Knipping K, van Roest M, Kruijssen L, Smits M, Teunis M, Cox L, et al. Intra- and inter-laboratory validation of an innovative huFcεRIα-RBL-2H3 degranulation assay for in vitro allergenicity assessment of whey hydrolysates. Toxicol Vitr. Elsevier B.V.; 2016; 33: 29–34. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.018 PMID: 26921666

40. Yagami A, Aihara M, Ikezawa Z, Hide M, Kishikawa R, Morita E, et al. Outbreak of immediate-type hydrolyzed wheat protein allergy due to a facial soap in Japan. J Allergy Clin Immunol. The Authors; 2017; https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.019 PMID: 28633942

Supplementary data

S1 Fig1. SDS Page analysis of Hydrolyzed wheat Proteins (HWP) on 4-20%

Hydrolyzed wheat protein (30µg) or native gluten (10 µg) were separeated on StainFree 4-20 % gels (Bio-Rad). Proteins were revealed by 5 min. photocativation of in gel-flurorochrome which bind to tryptophan (GelDoc EZ system, BioRad). GP, GluPearl19S. Glut, native gluten. D-Glut, deamidated gluten.



S1 Table 1. Clinical and serological characteristics of allergic patients

Patients reactivity towards native proteins (Wheat or Gluten) or Deamidated Gluten (D-Gluten from ALK-Abello) was tested by skin prick test. Specific IgE concentrations to albumins/globulins fraction (A/G), gliadins, ω5 gliadins, LTP and D-Gluten (laboratory made) were determined by F-ELISA. – negative; nd, not determined; U, Urticaria; EIA, Exercise induced anaphylaxis; AS, Anaphylaxis; AD Atopic dermatitis.

	Patients' information				Skin Prick test (mm)			Specific IgE concentration (ng/mL)				
	Sera	Age	Sexe	Symptoms	Wheat	Gluten	D-Gluten	A/G	Gliadins	ω5	LTP	D-Gluten
Allergic to acid-HWP	# 30*	24	F	U, U	-	2.5	7	5	17	13	0	174
	# 34*	18	F	EIA, U	-	-	8.5	0	+	0	0	34
	# 285*	10	F	AS	-	nd	6	nd	nd	nd	nd	142
	# 299*	8	M	AS	-	nd	5.5	0	+	+	nd	119
	# 352*	12	M	EIA	-	-	4.5	0	+	0	0	216
	# 390*	10	M	U	-	3	5	0	4	0	0	60
	# 833	28	F	AS	nd	nd	5	nd	0	0	nd	23
	# 1414	15	M	EIA	3.5	7	5	0	0	0	0	122
	# 1649	14	F	AS	-	nd	10	5	5	0	0	229
Wheat	#1274	8	M	AD	7	6	6	98	89	0	30	0

Table S2. Specific IgE concentrations of allergic patients to various native and deamidated wheat protein fractions

Concentrations of total and specific IgE were determined by F- ELISA. D-GLIA, Deamidated Gliadins. HWP, Hydrolyzed Wheat Proteins. GP19S, GluPearl 19S®.

	IgE concentration - ng/ml											
Sera	Total IgE	native Gliadins	D-GLIA 15	D-GLIA 35	D-GLIA 48	Deam. Gluten	native Gluten	HWP1	HWP2	HWP3	HWP4	GP19S
# 30*	998	0	139	209	182	174	0	196	202	189	106	232
# 34*	475	0	20	34	40	34	0	41	45	47	20	50
# 285*	2569	6	124	127	168	142	6	150	178	209	97	194
# 299*	520	0	47	101	129	119	0	109	157	143	41	166
# 352*	928	4	143	196	214	216	4	213	259	199	127	247
# 390*	631	0	44	56	58	60	0	61	62	55	35	60
# 833	181	0	6	21	24	23	0	26	26	26	6	29
# 1414	231	6	72	103	114	122	6	116	139	69	61	141
# 1649	895	6	157	172	224	229	0	253	297	200	143	348
#1274	22451	88	41	34	25	0	0	4	0	0	4	0

* Sera already presented in Denery et al allergy, 2012

*

4. Troisième article : Impact du nombre et de l'espacement des épitopes sur la dégranulation des basophiles

Il est établi depuis plusieurs décennies que le pontage des IgE liées à leur récepteur à la surface des basophiles et des mastocytes, par un allergène contre lequel elles sont dirigées, déclenche la dégranulation de ces cellules. Le répertoire IgE des patients et les extraits allergéniques sont souvent complexes. Des systèmes modèles de dégranulation utilisant des IgE monoclonales, des lignées cellulaires de basophiles et des allergènes réduits à leur plus simple expression, c'est-à-dire quelques répétitions d'un ou de deux épitopes distincts, ont donc été développés pour étudier l'impact du nombre et de l'espacement des épitopes sur la dégranulation. Pendant longtemps, ces travaux se sont appuyés sur deux IgE monoclonales, l'une dirigée contre le DNP, l'autre contre le dansyl et des allergènes modèles constitués de multimères de ces deux haptènes. Ils ont permis de démontrer que l'intensité de la dégranulation augmente quand le nombre d'épitopes augmente et d'identifier des distances entre épitopes qui permettent la dégranulation des basophiles (4-6 nm), et d'autres qui, *a contrario*, l'empêchent (11-13 nm). Cependant les multimères de DNP produits pour ces travaux reflètent imparfaitement les caractéristiques des allergènes protéiques et leurs interactions avec les IgE. Récemment, des modèles basés des IgE recombinantes ciblant des épitopes IgE de patients allergiques ont été développés pour s'approcher davantage de la réalité des réactions allergiques et prendre en compte les caractéristiques des allergènes. Ils ont produit de nouvelles connaissances sur les liens entre la topologie des épitopes et la dégranulation des basophiles (Bucaite et al., 2019; L. H. Christensen et al., 2008; Gieras et al., 2015).

Les protéines du gluten se caractérisent par la présence d'un domaine contenant de multiples répétitions de séquences de 6 à 8 acides, dont certaines sont des épitopes IgE. Le nombre important de répétitions d'un épitope identique est unique parmi les allergènes alimentaires et il a été suggéré que cela contribue à la sévérité des symptômes observés dans l'AIE au blé et dans l'allergie au gluten désamidé. Ainsi Les γ- et les ω_2-gliadines, allergènes majeurs de l'allergie au gluten désamidé, se caractérisent par la présence d'une dizaine de répétitions de la séquence QPQQPFPQ, correspondant à l'épitope IgE désamidé immuno-dominant, PEEPFPE. Cette particularité offre la possibilité de tester l'impact du nombre d'épitope et de la distance qui les sépare sur la dégranulation des basophiles dans un modèle réaliste d'allergie au protéines de blé tout en n'utilisant qu'une IgE monoclonale (Tranquet 2017). Ce travail a été soumis en novembre 2020 dans le journal « Allergology International ».

The spatial organization of hydrolysed-wheat-protein epitopes favours the formation of large immune complexes that promote efficient basophil degranulation

For Peer Review

Olivier Tranquet, Véronique Solé-Jamault, Roberta Lupi, Jean-Charles Gaudin, Sandra Denery-Papini

UR1268 BIA, Rue de la Géraudière, BP71627, 44316 Nantes, France

Corresponding authors

Olivier Tranquet

UR1268 BIA, Rue de la Géraudière, BP71627, 44316 Nantes, France

olivier.tranquet@inrae.fr

Sandra Denery-Papini

UR1268 BIA, Rue de la Géraudière, BP71627, 44316 Nantes, France

Sandra.denery@inrae.fr

Conflict of interest

All authors declare not having any financial support or relationships that may pose a conflict of interest.

Authors' Contributions

SD and OT designed the study; OT, RL and VSJ performed the experiments; OT, J-CG and SD drafted the manuscript; all author read and approved the manuscript.

Abstract

Background: In IgE-mediated allergic reactions, basophil activation and symptom elicitation require the interactions of FcεRI (high-affinity IgE receptor)-bound IgE with several epitopes on an allergen. Spatial organization of IgE epitopes required for efficient cell activation is still poorly known. Gliadins are major wheat allergens; a repeat motif of γ- and ω_2-gliadins was evidenced as a dominant IgE epitope in allergy to acid-hydrolysed wheat protein (acid-HWP). In this work, we studied the influence of the number and spacing of this repeat epitope on basophil degranulation.

Methods: Synthetic peptides containing 2 repetitions of the deamidated epitope separated by various gaps containing between 3 and 29 residues, or 3 or 4 epitope repetitions, were synthesized. This set of polypeptides was used to trigger RBL (rat basophil leukaemia) cells sensitized with chimeric mouse/human IgE (chIgE-DG1) that mimics the reactivity of IgE from patients allergic to acid-HWP. The composition of immune complexes formed by these polypeptides and the monoclonal antibody was analysed by size exclusion chromatography.

Results: Gaps of 3 residues between 2 epitopes were insufficient to induce basophil degranulation, whereas gaps of 6–29 residues were sufficient. Moreover, basophil activation significantly increased when cells were triggered with peptides containing 3 or 4 epitope repetitions. Interactions of these trivalent and tetravalent polypeptides with the DG1 antibody resulted in formation of complexes containing antibody oligomers.

For Peer Review

Conclusion: The number and positioning of repeat epitopes of deamidated γ- and ω_2-gliadin sequences appear very favourable to basophil activation via bridging of several antibodies.

Key words: Allergy, gliadin, B-cell epitope, basophil, IgE antibody

Abbreviations:

AA	Amino acid residue
Acid-HWP	Acid-hydrolysed wheat protein
BSA	Bovine serum albumin
chIgE	Chimeric mouse/human IgE
DNP	Dinitrophenol
FcεRI	High-affinity IgE receptor
F-ELISA	Fluorescent ELISA
HPLC	High-performance liquid chromatography
MALS	Multiangle light scattering
RBL	Rat basophil leukaemia
SPT	Skin prick test

For Peer Review

Introduction

Basophils and mastocytes are key cells in eliciting symptoms in IgE-mediated allergies. Their activation induces degranulation of preformed granules containing multiple inflammatory mediators, such as histamine, and de novo synthesis of cytokines and chemokines.[1] Degranulation is triggered by clustering of on the cell surface, due to the interaction of bound IgE with allergen. Therefore, cross-linking of FcεRI-IgE complexes depends mainly on the affinity of IgE for the allergen and on the spatial organization of IgE-binding epitopes in the allergen.

Nonetheless, knowledge of the characteristics and positioning of IgE-binding epitopes is still incomplete.[2,3] Data on functional IgE epitopes, i.e. those involved in symptom elicitation, is even more limited. Studies on grass and birch pollen and on milk allergens have shown that IgE epitopes can be in close vicinity and form patches, suggesting that epitope proximity might be important for efficient cross-linking of IgE antibodies on effector cells.[4–7]

Allergens are usually multivalent proteins containing distinct epitopes and are able to interact with several IgE with distinct specificity.[3] However, some allergens contain repetitions of identical IgE-epitope motifs. The majority of these allergens are in multimeric form. Some of them consist naturally of homo-multimers, such as Pen a 1.[8] Others, such as Bet v 1, have a propensity to aggregate.[9] Note that in the case of food allergens, food processing can also induce protein aggregation and generate multimers of allergens that would otherwise be in monomeric form. Gliadin and glutenin, the main wheat allergens, have the distinction of naturally bearing multiple repetitions of identical or highly homologous IgE epitopes in their monomeric form; moreover these proteins are prone to aggregate during food processing.[10,11] These repeat epitopes are considered an aggravating factor for eliciting symptoms because they enable

For Peer Review

clustering of FcεRI-IgE complex with a limited IgE repertoire,[11,12] and even with IgE exhibiting a single specificity.[13]

Because IgE from human sera is polyclonal, simplified models have been used to understand the impact of the valency of epitopes and the distance between them on basophil degranulation. Early models used multimers of dinitrophenol (DNP) as allergen and anti-DNP rat monoclonal IgE.[14] Work using these models confirmed, first, that 2 epitopes are required to induce basophil degranulation. Second, distances of 3–8 nm between epitopes appear to be optimal for triggering strong degranulation of basophil models.[15–17]

However, the use of small molecules as allergen surrogates means that these models may not fully reflect the complexity of naturally occurring allergens.[18]

Recently, the development of more realistic models combining recombinant human IgE directed against pneumallergens and human IgE epitopes has generated new insight into the interplay between valency and epitope spacing in basophil degranulation.[18–20] For example, using artificial allergens in which epitopes were grafted at different positions onto a folded protein scaffold, Gieras *et al.* showed that homodimers of a Phl p 1 epitope spaced by 6 amino acid residues (AA) induced strong basophil degranulation. Cell activation was markedly reduced when the epitopes were located at other positions. Using different Bet v 4 and Phl p 7 dimers, Bucaite *et al.* also observed that spacers ranging from 2.4 to 7.4 nm enabled marked degranulation. In terms of the number of epitope repetitions, the same studies[18,20] reported increased basophil activation with trivalent or tetravalent allergens compared with divalent allergens.

Wheat gluten can be chemically or enzymatically hydrolysed to produce functional ingredients useful in food and cosmetics. However, since the early 2000s, severe allergies to acid-hydrolysed wheat protein (acid-HWP) have been described in Europe and Japan.[21] Most of the

For Peer Review

time, patients experienced anaphylaxis or exercise-induced anaphylaxis. Acid hydrolysis caused deamidation of gluten protein, i.e. conversion of glutamine into glutamic acid.[21] Studies of French and Japanese patient cohorts identified a dominant IgE-binding epitope (QPEEPFPE) on deamidated γ- and ω_2-gliadins.[22,23] This epitope appears remarkably specific to HWP allergy, resulting in the definition of a new wheat allergic entity.[21] The corresponding native sequence, QPQQPFPQ, is a repeated motif in γ- and ω_2-gliadins.[24] A mouse monoclonal antibody (mDG1) and its chimeric mouse/human IgE form (chIgE-DG1), specific to the deamidated epitope QPEEPFPE, have been produced previously.[25,26] This single chIgE-DG1 was shown to mimic the reactivity of IgE from acid-HWP-allergic patients and was sufficient for basophil degranulation.[26]

In the work described here, we aimed to complete observations on haptens and respiratory allergens by investigating the spatial organization of functional epitopes on a gliadin involved in food and cutaneous allergies to acid-HWP. We used a realistic system combining chIgE-DG1 mimicking patient IgE and a set of polypeptides whose sequences fully correspond to fragments of a deamidated γ-gliadin. Our objective was to explore the impact of the number and spacing of epitopes in this protein on basophil activation. We also analysed the composition of immune complexes resulting from the interaction of these polypeptides with the DG1 antibody by size exclusion chromatography and related the results to the eliciting potential of the polypeptides.

Material and methods

Peptides

The sequence of one γ-gliadin isoform (UniProtKB – P08453) (Supplementary Fig. 1) was used as a template to design peptides/polypeptides varying in the number of repetitions (2, 3 or 4) of

For Peer Review

the deamidated epitope QPEEPFPE involved in HWP allergy and in the distances between repetitions. Five peptides containing 2 epitope repetitions separated by a distance ranging from 3 to 29 AA were designed. The sequences of the spacers corresponded to those present between the PQQPFPQ motifs in the native γ-gliadin isoform (UniProtKB – P08453). Peptides with 3 or 4 repetitions were synthesized with the 11 AA spacer. These synthetic peptides (Genscript, USA) are hereafter referred to as #1 #2/3, #2/6, #2/11, #2/19, #2/29, #3/11 and #4/11 (Table 1), where the first number corresponds to the number of repetitions and the second to the spacer length in AA. The LQPEEPFPEQC peptide was conjugated to bovine serum albumin (BSA) (Millegen, France) to prepare a multivalent positive control.

Circular dichroism measurements

Circular dichroism spectra of the peptides were measured using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Japan) and a mini-quartz cell with a path length of 1 cm. The spectra were recorded in the range from 385 to 525 nm and averaged over 3 scans to increase the signal-to-noise ratio (response time, 0.125 s; resolution, 0.1 nm). The peptides were first solubilized in water/acetonitrile (75/25 v/v) at 10 mg/mL and further diluted at 1 mg/mL in PBS, pH 7.4.

Deamidated gliadins and gluten

Gliadins were extracted from wheat flour (cultivar Hardi) using a sequential procedure.[27] Albumins/globulins (water-/salt-soluble proteins from wheat flour) were extracted from the flour using a saline buffer. After several washings by centrifugation (8000 g, 20 min), the pellet was suspended in 70% ethanol for 1 h at room temperature. Some of the material remained insoluble. After centrifugation (8000 g, 20 min), the supernatant containing all the gliadins was collected. Class α-, γ- and ω_2-gliadins were then purified by ion-exchange chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC).[28,29]

The α-, γ- and ω_2-gliadins were next deamidated by acid treatment. Twenty milligrams of protein was dispersed in 1 mL of 0.1 N hydrochloric acid and heated for 1 h at 90°C in boiling

For Peer Review

155 water. The reaction was stopped by neutralization with 0.1 N NaOH. The deamidation
156 percentages were calculated by assaying Glu and Gln content and amounted to 52% (±1), 32%
157 (±6) and 36% (±12) for α-, γ- and ω_2-gliadins, respectively.[30] HWP was produced by acid
158 hydrolysis and previously characterized.[26]

159 Production of monoclonal antibodies mDG1 and chIgE-DG1

160 Monoclonal antibody mDG1 was previously raised in mouse against the peptide
161 LQPEEPFPEQC containing a dominant IgE-binding epitope for patients allergic to HWP.[25]
162 Hybridoma supernatant was cleared by centrifugation for 10 min at 2000 g and filtered on a
163 0.22 µm membrane. mDG1 was then purified on HiTrap Protein A (GE Healthcare) according
164 to manufacturer's instructions and dialysed against PBS.

165 The chimeric mouse human IgE with the antigen binding site of the mAb mDG1 (chIgE-DG1)
166 was obtained according to Tranquet *et al.*[26]

167 Human sera

168 Two sera from subjects with food allergy to acid-HWP were selected from our Biocollection
169 (DC-2008-209). Written consent had been obtained from the patients or their parents for serum
170 use for research purposes. The first patient (serum #707 – boy, 13 years old) experienced
171 symptoms of exercise-induced anaphylaxis after eating commercial cake; his skin prick test
172 (SPT) was positive to acid-HWP and negative to gluten. He reacted to 2.2 g of acid-HWP in a
173 double-blind, placebo-controlled food challenge, but did not react to a challenge with 70 g of
174 wheat flour with exercise. The second patient (serum #1649 – girl, 14 years old) had an
175 anaphylactic reaction after a meal containing sausage. Her SPT was positive to sausage and
176 acid-HWP and negative to wheat flour; she could eat bread and other wheat-based products.

177 Sera were assayed for total IgE and IgE specific to HWP using F-ELISA (fluorescent ELISA)
178 described in Tranquet *et al.*[26] The HWP sample was first solubilized in 0.1 M carbonate buffer

For Peer Review

(pH 9.6) with 0.1% SDS and 0.2% 2-mercaptoethanol and further diluted in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) at 5 μg/mL for coating. Human sera (diluted 1:10) and chIgE-DG1 (1:1000) were compared in triplicate. The 2 sera were pooled in equal volumes, and the resulting total and specific IgE concentrations were calculated.

Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography was performed on an Agilent 1260 Infinity HPLC system to determine the molecular weight distribution of the different samples. mDG1 and peptides were mixed at a 1:1 molar ratio (1.67 μM) in D-PBS (Gibco) and incubated for 1 h at room temperature. Samples were then loaded on a Superose 6 column (10/300 mm, 24 mL, GE Healthcare) equilibrated in D-PBS. Elution was performed for 60 min at 0.5 mL/min.

The 3 online detectors were coupled to the column: a Dawn HELEOS MALS (multiangle light scattering) instrument with 18 angles (Wyatt, Santa Barbara, CA, USA); a 1260 RID refractometer (Agilent Technologies) and a multiple wavelength detector (MWD RL, Agilent Technologies). ASTRA software (Wyatt) was used for data acquisition and processing. Peak integration was used to determine protein purity. Molecular weights were calculated using the Zimm extrapolation with a first-order polynomial fit and a refractive index increment (dn/dc) of 0.1851 mL/g.

Basophil activation assays

Degranulation assays were performed with the humanized rat basophil cell line RBL-SX38 (clone P4B7), which expresses α-, β- and γ-chains of human FcεRI[31] and was kindly provided by Jean-Pierre Kinet (Harvard Medical School, Boston, MA, USA).

Sera #707 and #1649 were pooled and decomplemented by heating for 45 min at 56°C in the presence of 4 M glucose to reduce serum component cytotoxicity.[32] RBL-SX38 cells seeded at 1.2×10^4 cells/well in 96-well flat-bottom culture plates were incubated for 24 h in Delbucco's

For Peer Review

Modified Eagle's medium with 10% calf foetal serum, before sensitization with decomplemented sera (diluted 1:25 in medium) or with chIgE-DG1 (300 ng/mL or 10 ng/mL) for 48 h. Sensitized RBL-SX38 cells were washed 3 times with D-PBS (Thermo Fischer Scientific) before stimulation with mouse anti-human IgE (0.5 µg/mL; Le27 clone, NBS-c BioScience, Vienna, Austria) diluted in Tyrode's buffer containing 50% D_2O to set degranulation to 100%, or with Tyrode's buffer containing 50% D_2O to measure the background and set the level of positivity. Sensitized RBL-SX38 cells were also stimulated with deamidated α-, γ- and ω_2-gliadins (0.1 ng/mL to 10 µg/mL), or with total gliadins, LQPEEPFPEQC-BSA (0.1 ng/mL to 10 µg/mL), or with peptides (1 fmole/mL to 1 nmole/mL) diluted in Tyrode's buffer with 50% D_2O. β-Hexosaminidase release induced by cross-linking FcεRI was measured with pNAG (Sigma) as previously described.[33] The β-hexosaminidase release induced by the samples was expressed as a percentage of the release observed with anti-human IgE antibodies (set to 100% degranulation). For the pool of sera or chIgE-DG1, spontaneous release in the presence of Tyrode's buffer containing 50% D_2O was measured, and the mean + 3 SD was used to calculate the limit value of a positive percentage of degranulation. Curves presenting the percentage of degranulation as a function of allergen concentration were fit using 4-parameter logistic regression (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Allergen concentrations corresponding to 50% of the highest release (EC_{50}, sensitivity) and maximum degranulation percentage (reactivity) were determined using GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software Inc.). The EC_{50} and maximum percentage values of the different samples were compared by 2-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test.

For Peer Review

Results

Total and specific IgE in sera and chIgE-DG1

Total and acid-HWP-specific IgE concentrations in human sera and chIgE-DG1 supernatant were assayed by F-ELISA (Table 2). The 2 human sera display high acid-HWP-specific IgE concentrations: 310 and 183 ng/mL for sera #707 and #1649, respectively; and equivalent total IgE concentrations: 895 and 847 ng/mL for sera #707 and #1649, respectively. The 2 sera were pooled 50:50 (v/v), and the resulting HWP-specific IgE and total IgE concentrations were calculated as 247 and 878 ng/mL, respectively. The chIgE-DG1 concentration in PBS-dialysed and concentrated supernatant was 5000 ng/mL.

Eliciting capacity of deamidated gliadin fractions

In previous work, the reactivity of chIgE-DG1 was explored on total gliadin or gluten samples deamidated to different extents.[26] The work described here explored triggering of basophils sensitized with chIgE-DG1 by individual purified deamidated gliadins using RBL-SX38 cells.

The LQPEEPFPEQC-BSA conjugate induced strong degranulation, while the native gliadin fraction, in which the DG1 epitope is not deamidated, did not (Supplementary Fig. 2). The deamidated α-gliadin fraction appeared to be a weak elicitor, and only the highest concentration tested (10 µg/mL) triggered basophil degranulation. As expected, deamidated ω_2-gliadins and deamidated γ-gliadins efficiently triggered cell degranulation with an EC_{50} of 11 and 90 ng/mL, respectively. These results reflected the differential distribution of the DG1 epitope among gliadin classes, the epitope being largely repeated in γ- and ω_2-gliadins, but not in α-gliadins.

The capacity of mDG1, from which chIgE-DG1 was generated, to bind deamidated γ- and ω_2-gliadins was also evaluated using the competitive ELISA previously described in Tranquet *et al.*[25] In this assay, both γ- and ω_2-gliadins strongly interacted with mDG1. The IC_{50} of

For Peer Review

deamidated ω_2-gliadins and deamidated γ-gliadins was determined to be 11 and 77 ng/mL, respectively (Supplementary Fig. 2).

Differential eliciting capacity as a function of the number and proximity of epitopes on basophils sensitized with chIgE-DG1

Peptides #1, #2/3, #2/6, #2/11, #2/19 and #2/29 were used as elicitors on basophils sensitized with chIgE-DG1 at an optimal concentration of 300 ng/mL to explore the effects of distance between repetitions of epitopes on basophil degranulation. The dose-response curves were fitted with 4-parameter equations for calculating the EC_{50} and maximum degranulation that describe the sensitivity and reactivity, respectively, of the sensitized basophils and allow comparison of the triggering potency of these allergen fragments.[34]

As expected, the peptide bearing a single epitope (#1) was not able to cross-link IgE bound to FcεRI and no basophil degranulation was observed, whereas the #2/3 dimer induced a bell-shaped curve that was barely distinguishable from the background (set to 5%) (Fig. 2, upper left). DG1-epitope dimers with 6 or more AA-long spacers induced sigmoidal dose-response curves. Comparison of the fitted curves revealed that the #2/6 and #2/11 dimers on one side, and the #2/19 and #2/29 dimers on the other side, could not be distinguished and defined 2 sigmoidal dose-response curves with a distinct EC_{50} but a similar maximum response (62–67%) (Fig. 2, table). However, lengthening the spacing of epitopes from 6 or 11 AA to 19 or 29 AA only increased the EC_{50} 2-fold.

To explore the effect of the number of epitopes on basophil degranulation, dimers, trimers and tetramers of the DG1 epitope separated by 11 AA (set of peptides #2/11, #3/11 and #4/11) were applied to RBL cells sensitized with chIgE-DG1. Peptides with 2, 3 or 4 repetitions of the DG1 epitope induced degranulation with sigmoidal dose-response curves (Fig. 2, bottom left). Comparison of the fitted curves revealed that the EC_{50} and maximum degranulation induced by the #2/11 peptide were different from those induced by the #3/11 and #4/11 peptides.

For Peer Review

Degranulation curves induced by the #3/11 and #4/11 peptides could not be differentiated, and degranulation induced by these peptides could be fitted with a single curve (dashed in Fig. 2, bottom left). The EC_{50} of the #2/11 and the #3/11 and #4/11 peptides was 0.15 pmole/mL and 0.03 pmole/mL, respectively, and the maximum degranulation was 65 and 84%, respectively (Fig. 2, table). Switching from a polypeptide containing 2 epitopes to polypeptides containing 3 or 4 epitopes improved RBL cell reactivity and increased their sensitivity by a factor of 5.

RBL cells were then exposed to the 2 sets of peptides after sensitization with chIgE-DG1 at the suboptimal concentration of 10 ng/mL. This concentration was equivalent to the working concentration of the human serum pool (Table 2). The #1 and #2/3 peptides induced no degranulation (Fig. 2 upper right). The other peptides induced bell-shaped degranulation curves. The 2 higher peptide concentrations were excluded to allow fitting with 4-parameter equations. Although the EC_{50} increased from 0.16 to 0.91 pmole/mL when the spacing between the 2 epitopes increased from 6 to 19 amino acids, the #2/6, #2/11 and #2/19 dimers showed equivalent degranulation curves that could not be statistically discriminated: these curves can be fitted with a unique sigmoidal curve (EC_{50} of 0.41 and maximum of 28%). On the other hand, the #3/11 trimer and #4/11 tetramer of the DG1 epitope still induced more efficient degranulation when compared with the #2/11dimer (Figure 2 bottom right). One single sigmoidal curve could fit the degranulation induced by the #3/11 and #4/11 peptides and displayed parameters of sensitivity and reactivity multiplied by factors of 5 and 2.5, respectively, compared with those calculated for the #2/11 dimer curve.

Differential eliciting capacity as a function of the number and proximity of the epitopes on basophils sensitized with patient IgE

The capacity of this set of peptides to induce degranulation when RBL cells are sensitized with a pool of 2 sera from acid-HWP-allergic patients was then explored (Fig. 3).

For Peer Review

Again, the peptide containing only one epitope (#1) did not induce any degranulation. The #2/3 peptide induced a bell-shaped degranulation curve that barely exceeded the background, with a degranulation maximum of 7% (Fig. 3, table). The #2/6 and #2/11 peptides induced sigmoidal degranulation curves which could not be differentiated from each other, with an EC_{50} of 4.25 pmole/mL and a maximum degranulation of 14%. Degranulation induced by the #2/19 peptide followed a very flat sigmoidal curve and had an EC_{50} (21.54 pmole/mL) that was a factor 5 greater than that of the #2/6 and #2/11 peptides.

In terms of the number of repetitions, RBL cells sensitized with the pool of sera were much more sensitive to the #3/11 and #4/11 peptides than to the #2/11 peptide. The trivalent and tetravalent peptides induced similar sigmoidal degranulation curves that could be fitted by a unique curve with an EC_{50} that was about 40-fold higher than that calculated for the #2/11 peptide.

Structural analysis of peptides (circular dichroism)

The presence of secondary structures in the synthesized peptides was explored by circular dichroism. All of the peptides exhibited only a random coil structure (data not shown).

Size exclusion chromatography

To estimate the size of the immune complexes resulting from the interaction of the different peptides with the antibody directed against the epitope QPEEPFPE, size exclusion chromatography was performed. Because the interaction of mDG1 and chIgE-DG1 with the allergens appears to be similar, and because the amount of chIgE was limited, mDG1 was used. The antibody mDG1 alone was eluted in a single peak at 32 min corresponding to a molecular weight of 149 kDa (Fig. 4A). Free peptides were too diluted to generate a detectable signal (data not shown). When the monovalent peptide (#1) was mixed with mDG1, the elution profile was equivalent to that of mDG1 alone (Fig. 4A). Divalent peptides with 6–29 AA spacers (#2/6,

For Peer Review

#2/11, #2/19 and #2/29) had similar elution profiles, with a single peak at 28.5 min corresponding to a molecular weight of 290 kDa (Fig. 4B). This size corresponded to large numbers of antibody dimers and a small percentage of monomers (11–18% of total immune complexes) and oligomers (10-12%). When the spacer was 29 AA long, the elution profile was slightly different, with a major peak at 28.5 min and a shoulder at 31 min, indicating an increased number of monomers (33% of total immune complexes). When the spacer was reduced to 3 AA (peptide #2/3), a large peak between 28 and 32 min was observed (Fig. 4A). It corresponded to a nearly equal mixture of mDG1 monomers and dimers.

The molar weight of the immune complexes resulting from the interaction of trivalent and tetravalent peptides containing 11 AA spacers was also assessed by size exclusion chromatography. Compared with the divalent #2/11 peptide, the interaction of mDG1 trivalent and tetravalent peptides formed immune complexes that were eluted faster (between 24 and 29 min) in a larger peak. This peak corresponded to a mix of molecules with molecular weights ranging from 290 kDa to almost 600 kDa (Fig. 4C). Because the molecular weight of peptides is low compared to that of mAbs, the molecular weight of the peptides was neglected. The elution profiles were attributed to the formation of immune complexes consisting of 2, 3 and 4 mAbs (Fig. 4D).

Discussion

Over the past decade, many IgE-binding epitopes on food allergens have been identified. However, knowledge is lacking regarding their ability to trigger degranulation of effector cells and, consequently, their clinical relevance. Identifying the spatial features of epitopes that enable efficient degranulation therefore appears crucial for better understanding allergy, improving diagnosis and prognosis, and proposing new strategies for immunotherapy. The spatial proximity of epitopes has been shown to be one of these favouring features. Studies

For Peer Review

based on a small number of synthetic or pollen allergens indicated optimal distances to be around 6 AA or in the range of 3–8 nm. In our work, we took advantage of a class of wheat allergens naturally bearing repetitions of an epitopic sequence at different positions to explore the vicinity of functional epitopes as well as the influence of their valency on effector cells. The sequence of a deamidated γ-gliadin identified as a triggering allergen in allergy to HWP[22,23] was used as a template to design polypeptides with varying gaps between 2 repetitions of the epitope QPEEPFPE or comprising 3 or 4 copies thereof. These polypeptides were used in a realistic model of basophil degranulation combining rat basophils expressing human FcεRI and the chimeric IgE-DG1 antibody directed against this deamidated epitope.[26]

Serum versus chIgE

When basophils were sensitized with the patient serum pool or with the chimeric IgE at an equivalent amount of IgE specific for acid-HWP (10 ng/mL), serum-sensitized basophils clearly appeared less sensitive and reactive to the peptides than chIgE-sensitized basophils. Cell reactivity was especially affected: the higher maximum degranulation rate obtained with serum-sensitized basophils was 17%, whereas it reached up to 70% using chIgE-DG1. Two parameters may explain this difference in reactivity. First, while chIgE was directed exclusively against acid-HWP, the pool of sera only contained 28% of acid-HWP-specific IgE (Table 2). Therefore, only 28% of the FcεRI on the basophil cell surface held acid-HWP-specific IgE.. Second, the chemical deamidation of gliadin-repeat domains is a random process that produces a variety of deamidated sequences.[25,35] Many of them are well recognized by patient IgE antibodies.[22,26] Only one of these epitopes was present in our set of peptides, and some patient acid-HWP-IgE might not recognize this specific epitope, further reducing the amount of IgE on the cell surface able to interact with our peptides. With this set of peptides, conclusions drawn using sera or chIgE-DG1 were comparable, but the higher reactivity of RBL cells sensitized with chIgE-DG1 allowed easier comparison of the degranulation curves induced by different allergen sources.

For Peer Review

Number of epitopes

In our system, the reactivity and sensitivity of basophils increased significantly when passing from 2 to 3 or 4 copies of the gliadin epitope, and no difference was observed between 3 or 4 copies. The increase in sensitivity was notably stronger when cells were loaded with patient IgE than when chimeric IgE was used. Nonetheless, these results on a food protein were in agreement with previous data obtained with synthetic and pollen allergens.[18,20,36]

Distance between epitopes

In this study, we focused on limited gaps between epitopes, and we used divalent peptides in which the epitopes were separated by 3–29 AA. Although repeated gliadin domains can adopt polyproline II helix-and-turn structures,[37] deamidation of their glutamines was shown to disorganize this folding.[38] In fact, circular dichroism analysis of the γ-gliadin polypeptides revealed no specific secondary structures. Thus, considering that the distance between 2 adjacent AA in a non-structured peptide is 0.45 nm, the theoretical maximum length of the spacers in our set of peptides would range from 1.35 to 13.05 nm. This calculation becomes more theoretical as the length of the spacer increases.

In our gliadin model, a 3 AA spacer of approximately 1.3 nm (#2/3 peptide) was clearly insufficient to trigger basophil degranulation, while a 6 AA spacer of approximately 2.7 nm (#2/6 peptide) enabled strong degranulation, both with chIgE and serum pool. Therefore, minimal epitope spacing on gliadin for RBL degranulation should be between 3 and 6 AA. Increasing the size of the spacers from 6 to 29 AA (maximal length from approximately 2.7 to 13 nm) did not or only slightly affected RBL cell sensitivity and reactivity. These results are in line with those of Gieras *et al.*,[20] who also showed that a 6 AA spacer enabled strong degranulation[20] and with the efficient ranges of distances found on multimers of DNP and polcalcin.[18,36] The absence of defined gliadin polypeptide conformation made it difficult to tell whether the equivalent degranulation we observed with the 6–29 AA spacers should be

For Peer Review

attributed to an equivalent efficiency of spacer ranging from 2.7 to 13 nm or to the flexibility of the longer spacers. Recently, using Bet v 4 dimers, Bucaite *et al*. observed that in the case of low-affinity IgE, allergen flexibility enables degranulation that was not observed when orientation and distance between the epitopes are more constrained.[18]

Immune complexes with 3 or 4 antibodies favours higher degranulation efficiency

Interaction of mDG1 with the #2/3 and #3/11 peptides resulted in formation of a similar proportion of immune complexes containing 2 antibodies (43 and 42%, respectively). However, while the #2/3 peptide induced barely detectable basophil degranulation, the #3/11 peptide induced strong degranulation. In addition, when the percentage of 2-antibody immune complexes increased to about 80%, as with the mixes of mDG1 with #2/6-29 peptides (70–78%), degranulation was lower than that induced by the #3/11 peptide. Consequently, the question arises whether immune complexes containing 2 antibodies were able to induce basophil degranulation. Previous studies on divalent allergens suggested that some of them were unable to activate basophils and indicated formation of a ring shape in immune complexes containing 2 antibodies and 2 divalent allergens.[39,40]

In contrast, all of the peptides that formed 3 or more-antibody immune complexes were able to trigger RBL cell degranulation. Such immune complexes almost did not form with the divalent #2/3 peptide (1%). They comprised 10-12% of the immune complexes formed with the other divalent peptides (#2/6, #2/11, #2/19 and #2/29), which trigger equivalent degranulation. In addition, these complexes became predominant (53–62%) with the #3/11 and #4/11 peptides, which induced the strongest degranulation rates. Using microscopy, Gieras *et al.* also observed that the proportion of immune complexes composed of 3 or more antibodies was notably higher with tetravalent allergen than with divalent allergens.[20]

Implication for the triggering potential of gliadins

For Peer Review

Among wheat proteins, deamidated γ-and ω_2-gliadins have been identified as the dominant allergens of HWP allergy.[22,23] The QPQQPFPQ epitope is repeated 8 times in the repeat domain of the γ-gliadin isoform P08453 (UniProtKB) selected as template for peptide synthesis and 1–3 AA separate adjacent epitopes. According to the present study based on peptides, when 2 epitopes are separated by 1 or 3 AA, only one of these epitopes contributes to basophil activation. Consequently, in the repeat domain of the γ-gliadin, 1 epitope out of 2 would contribute to basophil activation. Hence, the #4/11 polypeptide seems to mimic the functional epitope layout of this domain. A similar conclusion could be drawn when considering ω_2-gliadin sequences (for example UniProtKB – Q9FUW7).

Based on the purified and deamidated gliadin fractions used in this work, basophils sensitized with chIgE-DG1 were slightly more sensitive to deamidated ω_2-gliadins than to deamidated γ-gliadins. The same was observed with patient sera[22] and in competitive ELISA with mDG1. This result may be attributed to a more favourable epitope distribution in deamidated ω_2-gliadins than in deamidated γ-gliadins. The C-terminal domain present in γ-gliadins but absent in ω_2-gliadins likely limits interaction of γ-gliadin with IgE by steric hindrance.

In conclusion, results obtained in this work with the set of polypeptides bearing combinations of a deamidated γ-gliadin epitope were comparable using patient sera or recombinant IgE chIgE-DG1. Consequently, chIgE-DG1 appears to be a good tool for exploring the spatial organization of gliadin epitopes by means of its activity on effector cells in the context of acid-HWP allergy. RBL cell degranulation requires a minimum spacing of epitope between 4 and 6 AA, and larger gaps between 6 and 29 AA have little influence. On the other hand, the presence of 3 or 4 repetitions of the epitope increases the efficiency of cell activation. We also observed that this type of epitope organization favours the formation of immune complexes comprising oligomers of antibodies essential for RBL cell activation. An increase in the proportion of large immune complexes leads to higher degranulation efficiency. Sequences of deamidated γ-

For Peer Review

gliadins and ω_2-gliadins actually both display at least 4 epitopes separated by 6 or more residues. According to our results, these characteristics correspond to an epitope number and positioning that best favour basophil triggering. These allergen features might be one of the factors related to the severity of the symptoms in acid-HWP allergy. Building on previous data, our findings on a food allergen support the importance of these characteristics of minimal gaps and epitope numbers for the eliciting potential of allergens.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the following colleagues for their contributions and helpful discussions: Florence Pineau, Julien Oré and Audrey Bayout, Fabrice Fleury, and Chantal Brossard.

For Peer Review

References

1. Vitte J., Claver J., Blank U. La degranulation mastocytaire: ??tat des connaissances. *Rev Fr Allergol* 2012;**52**(4):340–4. Doi: 10.1016/j.reval.2012.04.001.

2. Lollier V., Denery-Papini S., Larré C., Tessier D. A generic approach to evaluate how B-cell epitopes are surface-exposed on protein structures. *Mol Immunol* 2011;**48**(4):577–85. Doi: 10.1016/j.molimm.2010.10.011.

3. Lollier V., Denery-Papini S., Brossard C., Tessier D. Meta-analysis of IgE-binding allergen epitopes. *Clin Immunol* 2014;**153**(1):31–9. Doi: 10.1016/j.clim.2014.03.010.

4. Fedorov AA., Ball T., Mahoney NM., Valenta R., Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 1997;**5**(1):33–45. Doi: 10.1016/S0969-2126(97)00164-0.

5. Flicker S., Steinberger P., Ball T., Krauth M., Verdino P., Valent P., et al. Spatial clustering of the IgE epitopes on the major timothy grass pollen allergen Phl p 1:

Importance for allergenic activity. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**(6):1336–43. Doi: 10.1016/j.jaci.2006.02.012.

6. Hochwallner H., Schulmeister U., Swoboda I., Focke-Tejkl M., Civaj V., Balic N., et al. Visualization of clustered IgE epitopes on alpha-lactalbumin. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**(6):1279-1285.e9. Doi: 10.1016/j.jaci.2010.03.007.

7. Padavattan S., Flicker S., Schirmer T., Madritsch C., Randow S., Reese G., et al. High-Affinity IgE Recognition of a Conformational Epitope of the Major Respiratory Allergen Phl p 2 As Revealed by X-Ray Crystallography. *J Immunol* 2009;**182**(4):2141–51. Doi: 10.4049/jimmunol.0803018.

8. Mahajan A., Youssef LA., Cleyrat C., Grattan R., Lucero SR., Mattison CP., et al. Allergen Valency, Dose, and FcεRI Occupancy Set Thresholds for Secretory Responses to Pen a 1 and Motivate Design of Hypoallergens. *J Immunol* 2017;**198**(3):1034–46. Doi: 10.4049/jimmunol.1601334.

9. Schöll I., Kalkura N., Shedziankova Y., Bergmann A., Verdino P., Knittelfelder R., et al. Dimerization of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 Is Important for its In Vivo IgE-Cross-Linking Potential in Mice. *J Immunol* 2005;**175**(10):6645–50. Doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6645.

10. Battais F., Mothes T., Moneret-Vautrin DA., Pineau F., Kanny G., Popineau Y., et al. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 2005;**60**(6):815–21. Doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00795.x.

11. Denery-Papini S., Bodinier M., Pineau F., Triballeau S., Tranquet O., Adel-Patient K., et al. Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. *Clin Exp Allergy* 2011;**41**(10):1478–92. Doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03808.x.

For Peer Review

12. Baar A., Pahr S., Constantin C., Giavi S., Papadopoulos NG., Pelkonen a S., et al. The high molecular weight glutenin subunit Bx7 allergen from wheat contains repetitive IgE epitopes. *Allergy* 2014;**69**(10):1316–23. Doi: 10.1111/all.12464.

13. Mameri H., Denery-Papini S., Pietri M., Tranquet O., Larré C., Drouet M., et al. Molecular and immunological characterization of wheat Serpin (Tri a 33). *Mol Nutr Food Res* 2012;**56**(12):1874–83. Doi: 10.1002/mnfr.201200244.

14. Liu F., Bohn JW., Ferry EL., Yamamoto H., Molinaro CA., Sherman LA., et al. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody : preparation , isolation , and characterization. *J Immunol* 1980;**124**:2728–37.

15. Mahajan A., Barua D., Cutler P., Lidke DS., Espinoza FA., Pehlke C., et al. Optimal Aggregation of FcεRI with a Structurally Defined Trivalent Ligand Overrides Negative Regulation Driven by Phosphatases. *ACS Chem Biol* 2014;**9**(7):1508–19. Doi: 10.1021/cb500134t.

16. Paar JM., Harris NT., Holowka D., Baird B. Bivalent Ligands with Rigid Double-Stranded DNA Spacers Reveal Structural Constraints on Signaling by Fc RI. *J Immunol* 2002;**169**(2):856–64. Doi: 10.4049/jimmunol.169.2.856.

17. Sil D., Lee JB., Luo D., Holowka D., Baird B. Trivalent Ligands with Rigid DNA Spacers Reveal Structural Requirements For IgE Receptor Signaling in RBL Mast Cells. *ACS Chem Biol* 2007;**2**(10):674–84. Doi: 10.1021/cb7001472.

18. Bucaite G., Kang-Pettinger T., Moreira J., Gould HJ., James LK., Sutton BJ., et al. Interplay between Affinity and Valency in Effector Cell Degranulation: A Model System with Polcalcin Allergens and Human Patient–Derived IgE Antibodies. *J Immunol* 2019;**203**(7):1693–700. Doi: 10.4049/jimmunol.1900509.

For Peer Review

19. Christensen LH., Holm J., Lund G., Riise E., Lund K. Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**(2):298–304. Doi: 10.1016/j.jaci.2008.05.026.

20. Gieras A., Linhart B., Roux KH., Dutta M., Khodoun M., Zafred D., et al. IgE epitope proximity determines immune complex shape and effector cell activation capacity. *J Allergy Clin Immunol* 2015:1–9. Doi: 10.1016/j.jaci.2015.08.055.

21. Tranquet O., Larré C., Denery-Papini S. Allergic reactions to hydrolysed wheat proteins: clinical aspects and molecular structures of the allergens involved. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020;**60**(1):147–56. Doi: 10.1080/10408398.2018.1516622.

22. Denery-Papini S., Bodinier M., Larré C., Brossard C., Pineau F., Triballeau S., et al. Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy* 2012;**67**(8):1023–32. Doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x.

23. Yokooji T., Kurihara S., Murakami T., Chinuki Y., Takahashi H., Morita E., et al. Characterization of Causative Allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap. *Allergol Int* 2013;**62**(4):435–45. Doi: 10.2332/allergolint.13-OA-0561.

24. Tatham AS., Shewry PR. Allergy to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**(11):1712–26. Doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x.

25. Tranquet O., Lupi R., Echasserieau-Laporte V., Pietri M., Larré C., Denery-Papini S. Characterization of Antibodies and Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten. *J Agric Food Chem* 2015;**63**(22):5403–9. Doi: 10.1021/acs.jafc.5b00923.

26. Tranquet O., Gaudin J., Patil S., Steinbrecher J., Matsunaga K., Teshima R., et al. A

For Peer Review

chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for in vitro allergenicity assessment of functionalized glutens. *PLoS One* 2017;**12**(11):e0187415. Doi: 10.1371/journal.pone.0187415.

27. Nicolas Y., Martinant J., Denery-Papini S., Popineau Y. Analysis of Wheat Storage Proteins by Exhaustive Sequential Extraction Followed by RP-HPLC and Nitrogen Determination. *J Sci Food Agric* 1998;**96**(1):96–102.

28. Battais F., Pineau F., Popineau Y., Aparicio C., Kanny G., Guerin L., et al. Food allergy to wheat: identification of immunogloglin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**(7):962–70. Doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01592.x.

29. Battais F., Courcoux P., Popineau Y., Kanny G., Moneret-Vautrin D-A., Denery-Papini S. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *J Cereal Sci* 2005;**42**(1):109–17. Doi: 10.1016/j.jcs.2005.01.004.

30. Gourbeyre P., Denery-Papini S., Larré C., Gaudin J-C., Brossard C., Bodinier M. Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Mol Nutr Food Res* 2012;**56**(2):336–44. Doi: 10.1002/mnfr.201100353.

31. Wiegand TW., Williams PB., Dreskin SC., Jouvin MH., Kinet JP., Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol* 1996;**157**(1):221–30. Doi: 0022-1 767/96.

32. Binaghi RA., Demeulemester C. Influence of the medium on the heat and acid denaturation of IgE. *J Immunol Methods* 1983;**65**(1–2):225–33. Doi: 10.1016/0022-1759(83)90319-8.

For Peer Review

562 33. Bodinier M., Brossard C., Triballeau S., Morisset M., Guérin-Marchand C., Pineau F.,
563 et al. Evaluation of an in vitro Mast Cell Degranulation Test in the Context of Food
564 Allergy to Wheat. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;**146**(4):307–20. Doi:
565 10.1159/000121465.

566 34. Santos AF., Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist
567 research tool? *Clin Transl Allergy* 2016;**6**(1):10. Doi: 10.1186/s13601-016-0098-7.

568 35. Tranquet O., Lupi R., Larré C., Denery S. Complementarity of native and deamidated
569 gluten detection with R5 and INRA-DG1 mAbs. In: Koehler P, editor. *Proceedings of*
570 *the 28th Meeting of the WORKING GROUP on PROLAMIN ANALYSIS and*
571 *TOXICITY*, Freising: Verlag Deutsche Forschungsanstal t für Lebensmittelchemie;
572 2014, p. 21–5.

573 36. Handlogten MW., Deak PE., Bilgicer B. Two-Allergen Model Reveals Complex
574 Relationship between IgE Crosslinking and Degranulation. *Chem Biol*
575 2014;**21**(11):1445–51. Doi: 10.1016/j.chembiol.2014.08.019.

576 37. Mameri H., Brossard C., Gaudin J., Gohon Y., Paty E., Beaudouin E., et al. Structural
577 Basis of IgE Binding to α- and γ-Gliadins: Contribution of Disulfide Bonds and
578 Repetitive and Nonrepetitive Domains. *J Agric Food Chem* 2015;**63**(29):6546–54. Doi:
579 10.1021/acs.jafc.5b01922.

580 38. Wong BT., Zhai J., Hoffmann S V., Aguilar M-I., Augustin M., Wooster TJ., et al.
581 Conformational changes to deamidated wheat gliadins and β-casein upon adsorption to
582 oil–water emulsion interfaces. *Food Hydrocoll* 2012;**27**(1):91–101. Doi:
583 10.1016/j.foodhyd.2011.08.012.

584 39. Posner RG., Savage PB., Peters AS., Macias A., DelGado J., Zwartz G., et al. A
585 quantitative approach for studying IgE–FcεRI aggregation. *Mol Immunol* 2002;**38**(16–

For Peer Review

18):1221–8. Doi: 10.1016/S0161-5890(02)00067-6.

40. Posner RG., Geng D., Haymore S., Bogert J., Pecht I., Licht A., et al. Trivalent Antigens for Degranulation of Mast Cells. *Org Lett* 2007;**9**(18):3551–4. Doi: 10.1021/ol071175h.

For Peer Review

Figure legends

Fig. 1. Degranulation of RBL-SX38 cells sensitized with chimeric monoclonal IgE specific to the main epitope involved in acid-HWP allergy at 300 ng/mL and activated with increasing concentrations (0.1–10 000 ng/mL) of deamidated α-gliadins, γ-gliadins, ω_2-gliadins, native gliadins and multiple copies of the epitope conjugated to BSA. β-Hexosaminidase release is displayed as a percentage of the release induced by anti-IgE antibody on the y-axis (SD: error bars).

Fig. 2. Degranulation of RBL-SX38 cells sensitized with the chimeric monoclonal IgE specific to the main epitope involved in acid-HWP allergy at optimal (300 ng/mL) or suboptimal (10 ng/mL) concentrations and activated with increasing concentrations (0.001–100 000 pmole/mL) of polypeptides bearing 1 epitope (#1), 2 epitopes with different spacings (#2/3, #2/6, #2/11, #2/19, #2/29), 3 epitopes (#3/11) or 4 epitopes (#4/11). β-Hexosaminidase release is displayed as percentage of the release induced by anti-IgE antibody on the y-axis (SD: error bars). The table displays key parameters of the degranulation curves, EC_{50} and maximum, determined using 4-parameter regression (GraphPad Prism).

Fig. 3. Degranulation of RBL-SX38 cells sensitized with a pool of serum from acid-HWP-allergic patients and activated with increasing concentrations (0.001–1000 pmole/mL) of polypeptides bearing 1 epitope (#1), 2 epitopes with different spacings (#2/3, #2/6, #2/11, #2/19, #2/29), 3 epitopes (#3/11) or 4 epitopes (#4/11). β-Hexosaminidase release is displayed as a percentage of the release induced by anti-IgE antibody on the y-axis (SD: error bars). The table displays key parameters of the degranulation curves, EC_{50} and maximum, determined using 4-parameter regression (GraphPad Prism).

For Peer Review

614 Fig. 4. Proportion and size of the immune complexes of mDG1 and peptides with various
615 numbers of its epitope, determined by size exclusion chromatography The complexes were run
616 over a Superose 6 column (GE Healthcare) in D-PBS at a flow rate of 0.5 mL/min. Molecular
617 weights (thick lines, left axis) are superimposed on the UV signals (thin lines, right axis). The
618 chromatograms are overlaid to check the mDG1 purity or complexed with peptides bearing 1
619 epitope #1 (A) and to explore the effect of the spacing (B) and the number (C) of epitopes.
620 Distribution of immune complexes according to spacing and number of epitopes is presented
621 in (D).

622

For Peer Review

Table 1: Designation and sequences of the peptides including the number of epitopes and their spacing. Sequence of the epitope are in bold.

Designation	Number of repetitions	Spacer length (AA)	Sequence
#1	1	N/A	QPEEPFPE
#2/3	2	3	LQ**PEEPFPE**TQQ**PEEPFPE**Q
#2/6	2	6	LQ**PEEPFPE**QPFPQQ**PEEPFPE**Q
#2/11	2	11	LQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**Q
#2/19	2	19	LQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQPQQPFPQQ**PEEPFPE**Q
#2/29	2	29	LQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQPQQPFPQQPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**Q
#3/11	3	11	LQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**Q
#4/11	4	11	LQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**QPQQPFPQTQQ**PEEPFPE**LQ
BSA-LQPEEPFPEQC	?	random	

For Peer Review

Table 2: Total IgE concentration (ng/mL) and IgE concentration to acid-HWP of human sera and chimeric mouse/human IgE-DG1.

	Serum #707	Serum #1649	pool	chIgE-DG1
Specific IgE to acid-HWP (ng/mL)	310	183	247	ND
Specific IgE to native total gliadins (ng/mL)	30	5	17.5	0
Total IgE (ng/mL)	895	861	878	5000
Ratio specific IgE to acid-HWP / total IgE	0.34	0.21	0.28	1
Concentration of acid-HWP-IgE in the basophil activation assay (ng/mL)			9.9	300 or 10

For Peer Review

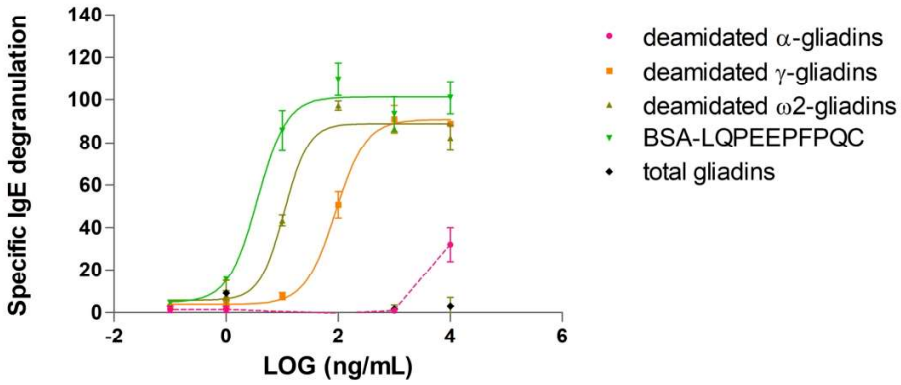
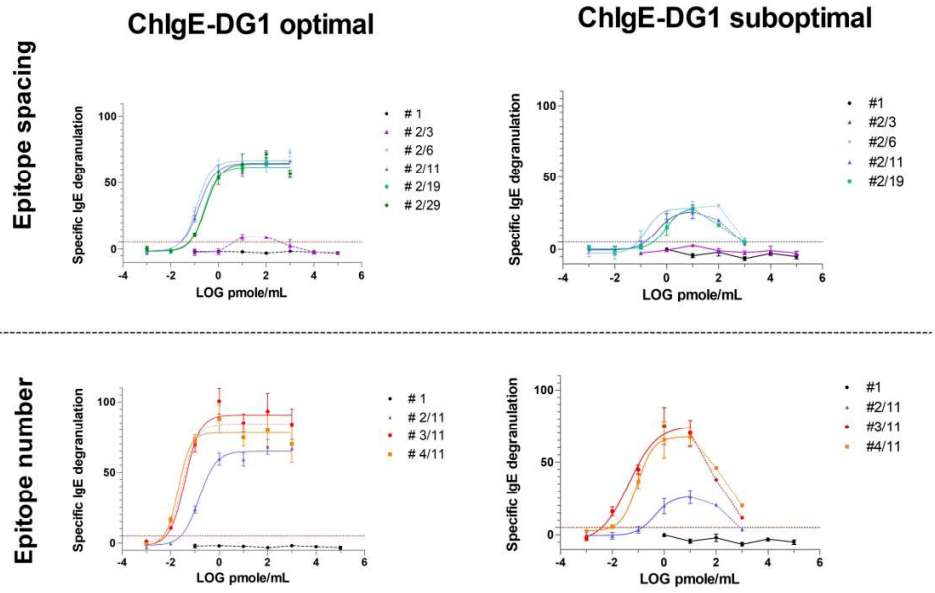


Fig. 1. Degranulation of RBL-SX38 cells sensitized with chimeric monoclonal IgE specific to the main epitope involved in acid-HWP allergy at 300 ng/mL and activated with increasing concentrations (0.1–10 000 ng/mL) of deamidated α-gliadins, γ-gliadins, ω2-gliadins, native gliadins and multiple copies of the epitope conjugated to BSA. β-Hexosaminidase release is displayed as a percentage of the release induced by anti-IgE antibody on the y-axis (SD: error bars).

181x86mm (300 x 300 DPI)

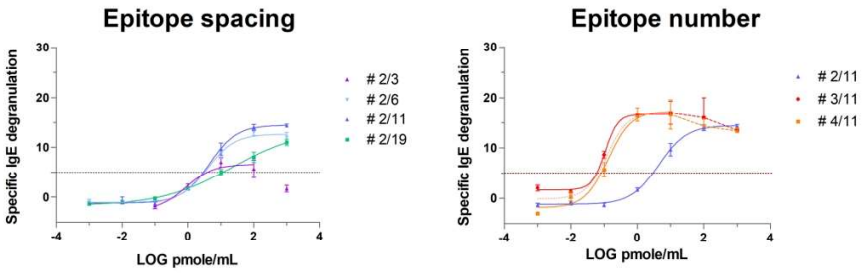


		#1	#2/3	#2/6	#2/11	#2/19	#2/29	#3/11	#4/11
ChIgE-DG1 optimal (300 ng/mL)	EC50		1,46	0,12	0,15	0,25	0,31	0,05	0,02
	(pmole/mL)			0,13		0,28		0,03	
	max		9%	67%	65%	62%	64%	91%	78%
	(%)			64%				84%	

		#1	#2/3	#2/6	#2/11	#2/19	#2/29	#3/11	#4/11
ChIgE-DG1 suboptimal (10 ng/mL)	EC50			0,16	0,42	0,91	ND	0,04	0,09
	(pmole/mL)			0,41				0,08	
	max			28%	26%	29%	ND	75%	67%
	(%)			28%				70%	

Fig. 2. Degranulation of RBL-SX38 cells sensitized with the chimeric monoclonal IgE specific to the main epitope involved in acid-HWP allergy at optimal (300 ng/mL) or suboptimal (10 ng/mL) concentrations and activated with increasing concentrations (0.001–100 000 pmole/mL) of polypeptides bearing 1 epitope (#1), 2 epitopes with different spacings (#2/3, #2/6, #2/11, #2/19, #2/29), 3 epitopes (#3/11) or 4 epitopes (#4/11). β-Hexosaminidase release is displayed as percentage of the release induced by anti-IgE antibody on the y-axis (SD: error bars). The table displays key parameters of the degranulation curves, EC50 and maximum, determined using 4-parameter regression (GraphPad Prism).

195x193mm (300 x 300 DPI)



		#1	#2/3	#2/6	#2/11	#2/19	#2/29	#3/11	#4/11
pool of serum	EC50		0,89	4,01	4,47	21,54	ND	0,11	0,13
	(pmole/mL)			4,25				0,12	
	max		7%	13%	14%	14%	ND	17%	17%
	(%)			14%				17%	

Fig. 3. Degranulation of RBL-SX38 cells sensitized with a pool of serum from acid-HWP-allergic patients and activated with increasing concentrations (0.001–1000 pmole/mL) of polypeptides bearing 1 epitope (#1), 2 epitopes with different spacings (#2/3, #2/6, #2/11, #2/19, #2/29), 3 epitopes (#3/11) or 4 epitopes (#4/11). β-Hexosaminidase release is displayed as a percentage of the release induced by anti-IgE antibody on the y-axis (SD: error bars). The table displays key parameters of the degranulation curves, EC50 and maximum, determined using 4-parameter regression (GraphPad Prism).

192x103mm (300 x 300 DPI)

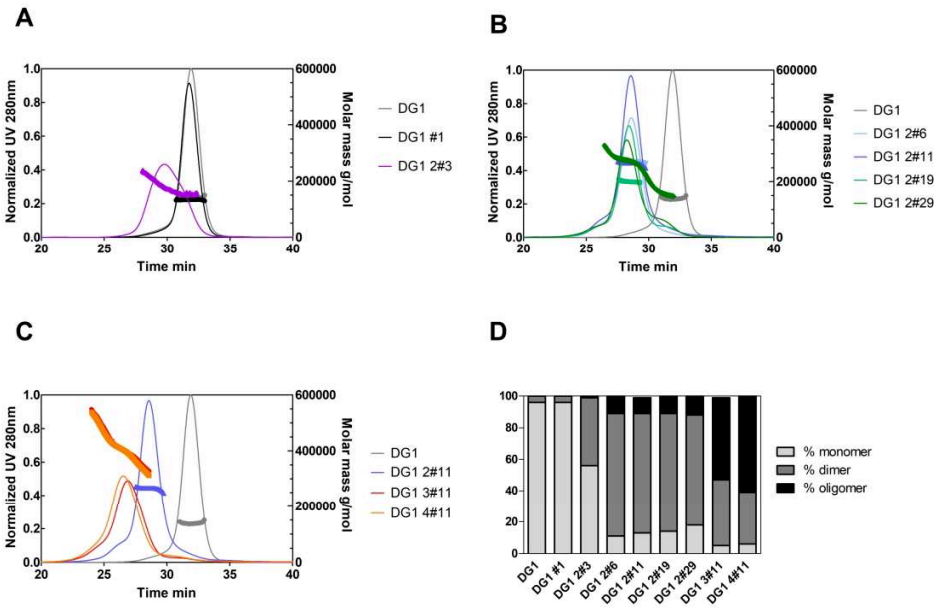


Fig. 4. Proportion and size of the immune complexes of mDG1 and peptides with various numbers of its epitope, determined by size exclusion chromatography The complexes were run over a Superose 6 column (GE Healthcare) in D-PBS at a flow rate of 0.5 mL/min. Molecular weights (thick lines, left axis) are superimposed on the UV signals (thin lines, right axis). The chromatograms are overlaid to check the mDG1 purity or complexed with peptides bearing 1 epitope #1 (A) and to explore the effect of the spacing (B) and the number (C) of epitopes. Distribution of immune complexes according to spacing and number of epitopes is presented in (D).

266x174mm (300 x 300 DPI)

Supplementary data

NIQVDPSGQVQWLQQQLVPQLQQPLSQQPQQTFPQPQQTFPHQPQQQVPQPQQPQQPFLQ**PQ**

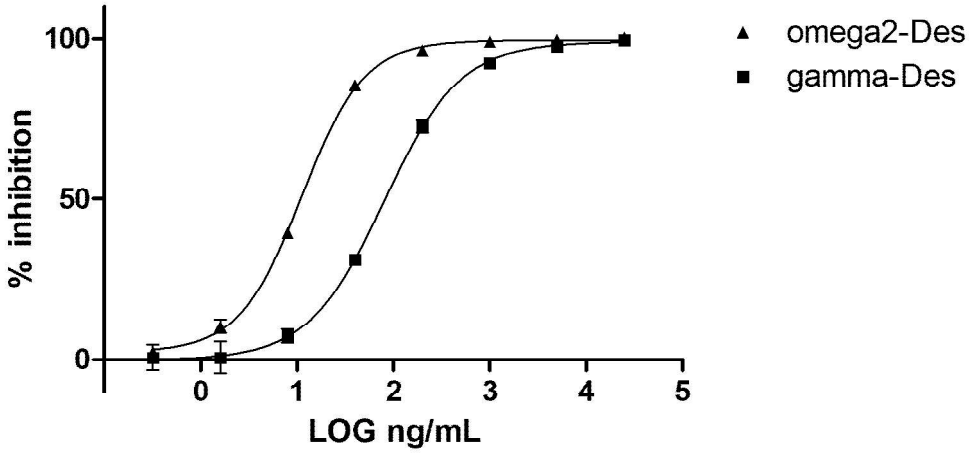
QPFPQQ**PQQPFPQ**TQQ**PQQPFPQ**Q**PQQPFPQ**TQQ**PQQPFPQ**Q**PQQPFPQ**TQQ**PQQPFPQ**LQQ

PQQPFPQPQQQLPQPQQPQQSFPQQQRPFIQPSLQQQLNPCKNILLQQSKPASLVSSLWSII

WPQSDCQVMRQQCCQQLAQIPQQLQCAAIHSVVHSIIMQQQQQQQQQQQGIDIFLPLSQHEQV

GQGSLVQGQGIIQPQQPAQLEAIRSLVLQTLPSMCNVYVPPECSIMRAPFASIVAGIGGQ

Supplementary Fig. 1. Distribution of the peptide PQQPFPQ (in bold) in the sequence of one γ-gliadin isoform (UniProKB – P08453).



Supplementary Fig. 2. Inhibition of the binding mDG1 antibody on its epitope (QPEEPFPE) conjugated to BSA with deamidated γ- or ω_2-gliadins according to the inhibition ELISA described in Tranquet *et al.* (J Agric Food Chem, 2015; 63(22):5403–9)

For Peer

5. Production d'une IgE chimérique souris/homme spécifique des ω_5-gliadines pour mimer les IgE de patients souffrant d'anaphylaxie au blé induite par l'effort

Nos travaux sur l'allergie au gluten désamidé ont montré que le répertoire IgE des patients allergiques pouvait être très restreint et même, théoriquement, se limiter à une seule spécificité (Tranquet, Gaudin, et al., 2017). En effet, la répétition d'épitopes IgE identiques dans les domaines répétés des γ- et des ω_2-gliadines leur permet d'interagir avec plusieurs IgE de même spécificité et d'agréger les complexes FcεRI-IgE à la surface des basophiles (cf paragraphe A.1 ci-dessus).

Les ω_5-gliadines sont les allergènes majeurs de l'anaphylaxie au blé induite par l'effort et plusieurs épitopes linéaires IgE dominants ont été identifiés. Ceux-ci sont répétés plusieurs fois et il est probable que comme dans le cas de l'allergie au gluten désamidé, des IgE d'une seule spécificité suffisent pour que les ω_5-gliadines induisent la dégranulation des basophiles.

La démarche d'obtention d'IgE chimériques mimant la réactivité des patients souffrant d'AIE au blé aurait pu être basée sur des anticorps anti-peptide, comme dans le cas du chIgE-DG1, en utilisant comme immunogènes les épitopes immuno-dominants identifiés chez les patients. Ainsi, un AcM produit antérieurement contre la séquence CFPQQQFPQQQ possède une réactivité vis-à-vis des différentes classes de prolamines proche de celle des IgE de patients (en immuno-empreinte). Cependant cet AcM d'isotype IgM n'a pas une affinité suffisante pour être exploité. Des anticorps polyclonaux produits contre d'autres peptides épitopiques ne présentaient pas non plus des réactivités vis-à-vis des protéines entières suffisantes pour nous inciter à poursuivre dans cette voie.

Des anticorps monoclonaux ont donc été produits en immunisant des souris avec une fraction purifiée d'ω_5-gliadines. Certains d'entre eux ont été sélectionnés sur la base de leur similarité avec les IgE des patients allergiques, et ont servi de base pour produire des IgE chimériques. L'antigénicité et l'activité biologique de ces IgE chimériques ont ensuite été comparées à celles des IgE de patients souffrant d'anaphylaxie au blé induite par l'effort.

5.1. Anticorps monoclonaux dirigés contre les ω5-gliadines

Dans des tentatives antérieures de productions d'anticorps dirigées contre les ω_5-gliadines, nous avions immunisé des souris avec 2 peptides, l'un présent en N-terminal, l'autre correspondant à un peptide épitopique présent dans le domaine répété. Parmi les AcM générés contre ce dernier peptide, seul était capable de reconnaitre les ω_5-gliadines. Sa faible affinité suggère une mauvaise accessibilité de cette séquence sur les ω_5-gliadines ou une structuration qui est mal minée par un peptide linéaire très court. Par comparaison, l'anticorps monoclonal dirigé contre la partie N-terminale des ω_5-gliadines avait une meilleure affinité, suggérant ainsi que cette séquence est probablement plus accessible et/ou moins structurée. Au regard de notre objectif de produire un anticorps chimérique mimant la réactivité des IgE, essentiellement dirigée contre le domaine répété des ω_5-gliadines, nous avons renoncé à produire des anticorps anti peptide et préféré choisir une fraction d'ω_5-gliadines comme immunogène.

Ainsi, trois souris ont été immunisées avec une fraction d'ω_5-gliadines purifiée. La fusion cellulaire des splénocytes d'une des souris avec des cellules du myélome SP2/0 a généré plus de 400 hybridomes viables. Le contrôle des surnageants de ces hybridomes par ELISA indirect a permis de sélectionner 51 clones sécrétant des anticorps monoclonaux (AcMx) dirigés contre les ω_5-gliadines. Afin de déterminer plus finement la spécificité des AcMx reconnaissant les ω_5-gliadines, leur capacité à reconnaitre les autres fractions du gluten a été évaluée par ELISA indirect. Comme attendu, compte tenu des homologies de séquence entre les différentes protéines du gluten, de nombreuses réactivités croisées ont été observées (Table 1). En plus des ω_5-gliadines, les ω_2-gliadines sont ainsi reconnues par 48/51 AcMx, les sous-unités de gluténines (suG) de haut poids moléculaire (suG-HPM) par 44/51 AcMx, les suG de faible poids moléculaire (suG-FPM) par 39/51 AcMx, les γ-gliadines par 31/51 AcMx et les α-gliadines par 29/51 AcMx.

En fonction de leur profil de réactivité et du nombre de fractions reconnues, les AcMx ont été classés en 10 groupes distincts (de A à J) (Table 1). Près de la moitié des clones (25/51) reconnaissent avec une forte intensité les 6 fractions de protéines du gluten (profil A). A contrario, un seul clone apparait exclusivement spécifique des ω_5-gliadines (profil J). Entre ces deux profils extrêmes, 8 profils intermédiaires, reconnaissant entre 5 et 2 fractions, ont été définis (de B à I). Les AcMx des profils B, C et D reconnaissent tous les 2 fractions d'ω-gliadines et les 2 fractions de suG mais se distinguent par l'absence de reconnaissance des α- et/ou des γ-gliadines. Ainsi, les 5 AcMx du profil B ne reconnaissent pas les α-gliadines, les 3 AcMx du profil C, les γ-gliadines, et les 4 AcMx du profil D, les α- et les γ-gliadines. En plus des ω_5-gliadines, l'AcM du profil E reconnait uniquement les 3 autres fractions de gliadines et celui du profil F uniquement les 2 fractions de suG. Les AcMx des profils G et H

reconnaissent les 2 fractions d'ω-gliadines, ceux du profil G reconnaissant en plus les suG-HPM. Enfin, l'anticorps du profil I ne reconnait que les ω5-gliadines et les suG-FPM.

	Nombre d'AcMx	clone ID	α/β	γ	ω2	ω5	LMW-GS	HMW-GS	BSA	Nb de fractions reconnues
Profil A	25	4E5	++	++	+++	+++	++	++	-	**6**
		4C8	++	++	+++	+++	+++	++	-	
		14D1	++	++	+++	+++	+++	+++	-	
		4D3	++	++	+++	+++	+++	+++	-	
		4D12	++	++	+++	+++	+++	+++	-	
		11D11	++	++	+++	+++	+++	+++	-	
		15F12	++	++	+++	+++	+++	+++	-	
		6E4	++	++	+++	+++	+++	+++	-	
		15F1	++	++	+++	+++	++	+++	-	
		13A2	++	++	+++	+++	++	+++	-	
		4D4	++	++	+++	+++	++	+++	-	
		7D1	++	++	+++	+++	++	+++	-	
		12A8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		2C2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		9A1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		14E4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		14E6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		2B7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		7D8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		5G7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		2B8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		6G4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		7A8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		8A1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
		4C11	++	++	++	++	++	++	-	
Profil B	5	12H9	-	++	++	++	++	++	-	**5**
		12H11	-	++	+++	+++	++	+++	-	
		9H2	-	++	+++	+++	++	+++	-	
		9E2	-	++	+++	+++	++	+++	-	
		15G6	-	++	+++	+++	++	+++	-	
Profil C	3	13G8	++	-	+++	+++	++	+++	-	
		9A2	++	-	+++	+++	++	++	-	
		6F10	++	-	+++	+++	++	++	-	
Profil D	4	15C11	-	-	++	+++	++	+++	-	**4**
		15C10	-	-	++	+++	++	+++	-	
		1E11	-	-	++	+++	++	+++	-	
		5A7	-	-	+++	+++	++	+++	-	
Profil E	1	15C1	++	++	+++	+++	-	-	-	
Profil F	1	8H8	-	-	-	+++	++	+++	-	**3**
Profil G	6	2D10	-	-	++	+++	-	++	-	
		5B8	-	-	+++	+++	-	++	-	
		4C6	-	-	+++	+++	-	++	-	
		11C12	-	-	+++	+++	-	++	-	
		5A1	-	-	+++	+++	-	++	-	
		12B2	-	-	+++	+++	-	++	-	
Profil H	4	3B6	-	-	++	++	-	-	-	**2**
		4B10	-	-	++	++	-	-	-	
		6B3	-	-	+++	+++	-	-	-	
		3C7	-	-	++	+++	-	-	-	
Profil I	1	13E5	-	-	-	+++	++	-	-	
Profil J	1	5E11	-	-	-	+++	-	-	-	**1**

Table 1 : profils de réactivité des AcMx vis-à-vis des α- , γ-, ω2- et ω5-gliadines et des suG-FPM- et suG-HPM en ELISA indirect.

5.2. Spécificité des IgE de patients souffrant d'anaphylaxie au blé induite par l'effort

Vingt-neuf sérums provenant de patients souffrant d'AIE au blé ont été identifiés sur la base de leur anamnèse parmi les sérums de patients allergiques disponibles dans notre bio-collection. Leurs concentrations en IgE spécifiques vis-à-vis des différentes fractions du gluten (α-, γ-, ω_2-, et ω_5-gliadines, suG-FPM et suG-HPM), d'une fraction d'albumines/globulines et d'une fraction LTP purifiée, ont été déterminées par ELISA indirect. Selon la fraction protéique la plus reconnue, les sérums se répartissent dans trois groupes (

Table 2).

- Le premier regroupe les sérums qui reconnaissent le mieux les ω_5-gliadines parmi toutes les protéines (21 sérums).
- Le deuxième regroupe des sérums 'atypiques' : Les sérums 693 et 1411 ne reconnaissent pas les ω_5-gliadines et possèdent des IgE dirigées contre une ou deux autres fractions prolamines seulement : les ω_2-gliadines et/ou les suG-HPM. Il est à noter que le sérum 1179 présente de fortes concentrations en IgE spécifiques dirigées contre les ω_5-gliadines mais aussi en IgE dirigées contre les α-gliadines.
- Enfin, dans le troisième groupe les 5 sérums contiennent des IgE spécifiques majoritairement dirigées contre la fraction albumines/globulines ou la LTP. Dans ce groupe, 2 sérums ont des IgE exclusivement spécifiques des protéines de la fraction albumines/globulines et un sérum est uniquement spécifique de la LTP. Les 2 autres sérums possèdent des IgE spécifiques à la fois vis-à-vis des AG et de la LTP mais également contre des prolamines.

La prédominance des ω_5-gliadines comme allergène dans l'anaphylaxie au blé induite par l'effort qui est observée dans cette série de patients (23/29, 79 %) correspond à ce qui a été observé dans des cohortes de patients finlandais (84 %), japonais (80 %) ou français (75 %) (Jacquenet et al., 2009; Hiroaki Matsuo et al., 2004; Kati Palosuo et al., 2001). Dans cette série, parmi les sérums dont les IgE ne reconnaissent pas les ω_5-gliadines (6/29), deux reconnaissent d'autres protéines du gluten (ω_2-gliadines et suG-HPM) et quatre des protéines de la fraction albumines/globulines ou la LTP. Chez les patients souffrant d'AIE au blé, ces protéines mais aussi les γ-gliadines et les suG-FPM ont déjà été identifiées comme allergènes pour un petit nombre de patients (Altenbach et al., 2015; Denery-Papini et al., 2011; Hofmann et al., 2012; Hiroaki Matsuo, Kohno, Niihara, et al., 2005; Pastorello et al., 2007).

	Serum n°	IgE tot	Gliadines				suG		Alb/Glob	
			α	γ	ω2	ω5	FPM	HPM	LTP	Alb/ glob
Groupe 1	58	3715	+	10	+	112	7			
	1402	5579		5	54	101	18	25		
	1777	4328	4	59	117	136	53	4	0	0
	1775	286	0	0	11	83	11	11	0	0
	1784	1047	0	0	3	102	23	3	0	0
	705	516	+	6	39	97	52			
	20	1654			+	95	20	+		
	662	245				9				
	664	609	4	4	13	27	+	6		4
	691	2563	61	+	+	106	+	12		
	834	1035	+	13	45	115	40	14		
	993	573	9	8	10	10	+			
	1071	109		14	16	33	18			
	1087	1939			7	105	27	7		
	1093	430				32	12	+		
	1173	4322	+		+	80	20	+		
	1343	329				82				
	1363	2686			+	105	0,5			
	1493	419	6		6	43		6		
	1587	406	4	4	4	39	4	4		
	1592	1143		26	50	108	50	18		
Groupe 2	693	2439						10		
	1179	4453	175	+	29	140	82	+		
	1411	783,5			32			2		
Goupe 3	1092	710						+	27	
	500	914						10	31	14
	1638	6741	121	62	39	8	37	31	160	300
	1028	552,5								13
	1083	268								14

Table 2 : *Concentration en IgE (ng/mL) vis à vis des α- , γ-, ω2- et ω5-gliadines et des suG-FPM et suG-HPM des patients souffrant d'AIE au Blé. Les valeurs surlignées en jaunes correspondent à la fraction la plus reconnue pour chaque sérum. Les sérums notés en rouge ont été utilisés par la suite pour faire un pool de sérums.*

5.3. Sélection d'anticorps anti 5-gliadines mimant la réactivité des patients

Il est à noter que 24 des 25 patients sensibilisés à des protéines du gluten (groupes 1 et 2 et sérum 1638 du groupe 3), ont des IgE qui reconnaissent plusieurs fractions du gluten. Du fait de la polyclonalité IgE des sérums de patients et des fortes homologies de séquences des protéines du gluten, ces profils de réactivité variés peuvent s'expliquer à la fois par la présence de plusieurs IgE de spécificité distinctes (co-sensibilisation) et/ou par les réactivités croisées des IgE vis-à-vis d'épitopes aux séquences proches présents sur les différentes protéines du gluten. Sur la seule la base de l'ELISA indirect, il n'est pas possible de distinguer polyclonalité et réactivité croisée. Néanmoins, les profils de réactivité des AcMx anti ω_5-gliadines montrent que les réactivités croisées vis-à-vis des différentes fractions du gluten sont nombreuses et elles aussi variées.

Si l'on se concentre sur les 21 sérums dont les IgE reconnaissent majoritairement les ω_5-gliadines (Groupe 1) et que l'on tente d'expliquer le plus simplement possible leur profil de réactivité, d'une part en excluant les fractions faiblement reconnues (moins de 15% de la réactivité vis-à-vis des ω_5-gliadines) ; d'autre part en les comparant avec les différents profils de réactivité des AcMx, on constate que le profil de réactivité IgE de 18 sérums (18/21) correspond à un profil de réactivité observé avec un des anticorps monoclonaux anti ω_5-gliadines ou avec une combinaison de 2 anticorps (Table 3). Ainsi, 7 sérums de patients ont des profils de réactivité qui correspondent au profil J, 5 au profil I, et les 3 autres aux profils B, D et E respectivement. Le profil de 3 autres sérums (3/21) peut s'expliquer par la combinaison des profils I et H. Les 3 derniers sérums ont des profils originaux par rapport aux profils des AcMx (sérums 664, 691 et 1071).

Il apparait ainsi que les profils de réactivité des AcMx I (clone 13E5), J (clone 5E11) et I+H (clone 13E5 et par exemple clone 6B3) suffisent à décrire la réactivité IgE de 15 des 21 patients majoritairement sensibilisés aux ω_5-gliadines. Ce sont donc des AcMx très rares ou rares (produits par 1 ou 4 à 5 hybridomes sur les 51) qui décrivent le mieux la réactivité des IgE de patients avec une AIE. Au contraire, le profil A, le plus fréquent parmi les AcMx anti ω_5-gliadines n'est pas retrouvé pour les IgE de patients.

Sérum	IgE tot	Gliadins				Glutenins		Correspondance Profil AcM
		α	γ	ω2	ω5	LMW	HMW	
58	3715				100%			Profil J
1402	5579			53%	100%	18%	25%	profil D
1777	4328		43%	86%	100%	39%		profil I plus H
1775	286				100%			profil J
1784	1047				100%	22%		profil I
705	516			40%	100%	54%		Profil I plus H
20	1654				100%	21%		profil I
662	245				100%			profil J
664	609		16%	49%	100%		20%	~~profil G plus γ~~
691	2563	57%			100%			~~profil J plus α~~
834	1035			39%	100%	34%		Profil I plus H
993	573	90%	80%	100%	100%			Profil E
1071	109		42%	48%	100%	55%		~~Profil B sans HMW~~
1087	1939				100%	25%		profil I
1093	430				100%	38%		profil I
1173	4322				100%	25%		profil I
1343	329				100%			profil J
1363	2686				100%			profil J
1493	419				100%			profil J
1587	406				100%			profil J
1592	1143		24%	46%	100%	46%	17%	Profil B

Table 3 : pourcentage de réactivité de IgE de patients vis à vis des α- , γ-, ω2-gliadines et des suG-FPM et suG-HPM, par rapport à leur réactivité vis-à-vis des ω5-gliadines . ***Les sérums notés en rouge ont été utilisés par la suite pour faire un pool de sérums.***

5.4. Caractérisation des AcMx mimant la réactivité IgE des patients

Les AcMx 6B3, 13E5 et 5E11 ont été choisis comme représentants des profils d'AcMx H, I et J, respectivement, et leur réactivité vis-à-vis des protéines du gluten a été analysée par immunoempreinte sur des fractions purifiées de gliadines et de suG.

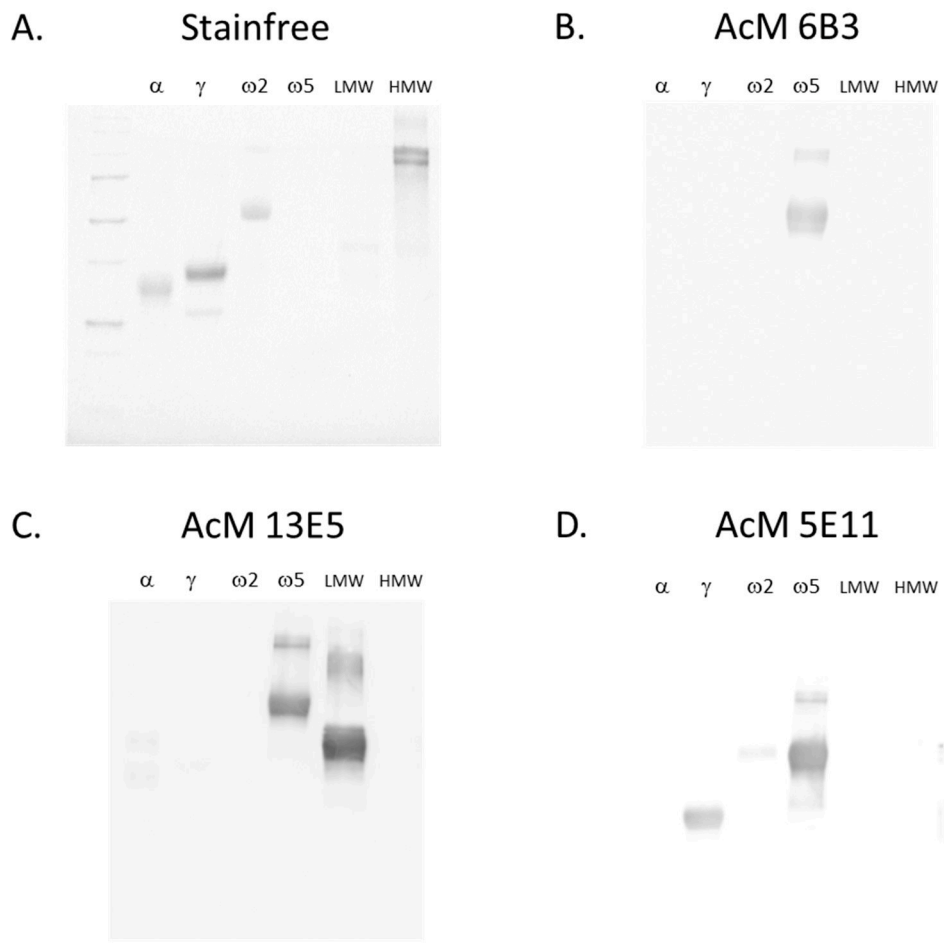


Figure 35 : Spécificité des AcMx 6B3 (B), 13E5 (C) et 5E11 par immunoempreinte sur des fractions purifiées d'α- , de γ-, d'ω2- et d'ω5-gliadines et des suG-FPM et suG-HPM séparées par SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide (A).

La révélation par la méthode Stain Free (BioRad) confirme la pureté des différentes fractions de gliadines (α, γ et ω_2) et de sous-unités de gluténines (suG-FPM et suG-HPM) (Figure 35A). Cette méthode, basée sur la présence de tryptophane, ne permet pas de révéler les ω_5-gliadines qui ne contiennent pas cet AA. Une coloration au bleu de Coomassie confirme la présence et la pureté de la fraction d'ω_5-gliadines (résultat non présenté ici, cf Figure 37 plus loin). Les immunoempreintes réalisées avec les 3 anticorps confirment bien leur forte réactivité vis-à-vis des ω_5-gliadines. Elles révèlent également la présence de dimères d'ω_5-gliadines dans cette fraction. Avec cette technique, il apparait que l'AcM 6B3 est exclusivement spécifique des ω5-gliadines (Figure 35B), que l'AcM 13E5

reconnait aussi les suG-FPM (Figure 35C) et que l'AcM 5E11 reconnait également les γ-gliadines (Figure 35D). Concernant les AcMx 6B3 et 5E11, ces résultats divergent de ceux obtenus par ELISA. En effet, en ELISA, l'AcM 6B3 se fixait également sur les ω_2-gliadines et l'AcM 5E11 ne se fixait pas sur les γ-gliadines (Table 1). L'ELISA et l'immunoempreinte ont des principes proches mais les supports utilisés (Plaque ou membrane de nitrocellulose) et les conditions de solubilisation des protéines (présence de SDS pour la séparation et le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose) diffèrent et pourraient expliquer ces différences de réactivité.

Dans une étude antérieure, nous avions observé qu'en immuno-empreinte, après séparation SDS-PAGE, les sérums de patients réagissaient fortement avec les ω_5-gliadines mais également avec certaines suG-FPM (Gluten, 2010). Aucune réponse vis à vis des suG-HPM ou des ω_2-gliadines n'était observée.

5.5. Production d'IgE chimériques souris/homme spécifiques des ω5-gliadines

L'analyse des profils de réactivité des IgE patients et la caractérisation des AcMx ont montré que les AcMx 6B3, 13E5 et 6E11 (profils H, I, J) sont ceux qui, seuls ou combinés, reproduisent le mieux la réactivité IgE des patients.

Les ADNc codant les domaines variables des chaînes lourdes et légères (VH et VL) de chaque AcM ont été clonés dans des plasmides pMD18 et séquencés (Genscript, Piscataway, USA). Afin d'exprimer dans des cellules de mammifères les IgE chimériques souris/homme correspondantes, deux plasmides ont été utilisés : pLNOH-2IgE et pLNOK (L. H. Christensen et al., 2008; Norderhaug et al., 1997). Le plasmide pLNOH-2IgE permet d'exprimer une chaîne lourde d'IgE et le plasmide pLNOK, une chaine légère de type kappa (Christensen et al. 2008). Les ADNc codant d'une part le domaine variable des chaines lourdes de chaque AcM et d'autre part pour le domaine variable des chaines légères ont été amplifiés par PCR à partir des plasmides fournis par Genscript. Les amorces utilisées contenaient des sites de restriction *Bsm*I ou *Bsi*WI pour permettre le clonage des produits PCR dans le plasmide pLNOH-2IgE pour les ADNc codant les domaines variables des chaines lourdes et dans le plasmide pLNOK pour les ADNc codant les domaines variables des chaines légères.

Des cellules HEK293 ont ensuite été co-transfectées avec les deux vecteurs d'expression codant les paires de chaines lourdes et légères, et intégrant les domaines variables chaque AcM afin qu'elles expriment transitoirement les IgE humaines chimériques correspondant aux trois AcMx.

Après transfection, l'expression des IgE chimériques dans les surnageant de culture a été contrôlée par SDS-PAGE suivi d'une immunoempreinte avec des anticorps anti-Fcε humain (anti-hFcε) et anti-chaîne légère kappa humaine (anti-hklc). La Figure 36A donne un exemple de l'expression de l'IgE chimérique correspondant à l'AcM 13E5 (ChIgE-WO5). L'anti-hFcε et l'anti-hklc révèlent une bande à environ 200 kDa, qui correspond approximativement à la masse moléculaire résultant de l'association de 2 chaines lourdes et de 2 chaines légères d'IgE. L'anti-hklc révèle également une seconde bande à environ 25 kDa qui correspond à la masse moléculaire d'une chaine légère et montre que la co-transfection a induit l'expression de chaine légère isolée en même temps que d'anticorps complet. La co-transfection avec les vecteurs codant une IgE contenant le paratope de l'AcM 6B3 (chIgE-6B3) donne des résultats équivalents alors que dans le cas de l'AcM 5E1 ni les chaines lourdes, ni les chaines légères ne sont détectées (données non présentées).

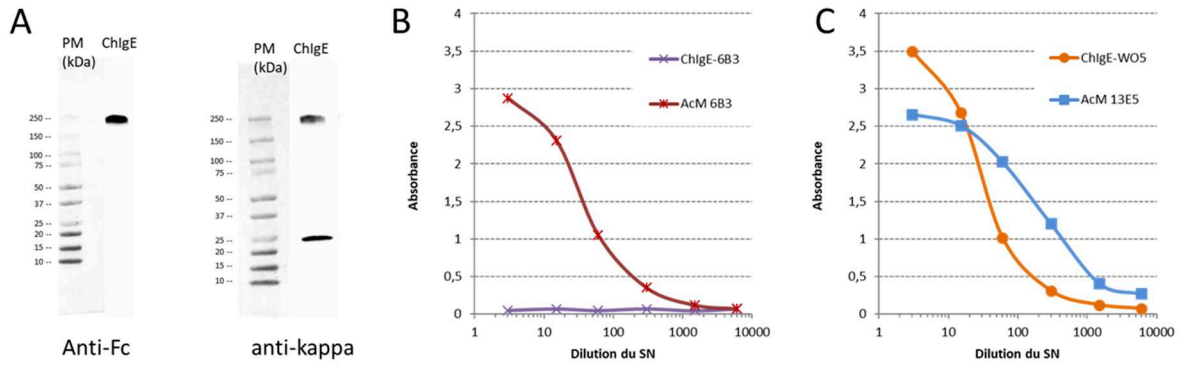


Figure 36 : Contrôle de l'expression des chaines lourdes et légères de chIgE-WO5 (A) et contrôle de la reconnaissance des ω5-gliadines par ChIgE-WO5 (B) et chIgE-6B3 (C) en ELISA indirect. SN, surnageant de culture cellulaire.

La capacité des deux IgE chimériques exprimées, chIgE-WO5 et chIgE-6B3, à lier les ω_5-gliadines a ensuite été contrôlée par ELISA indirect sur des ω_5-gliadines purifiées. Elle a été comparée à celle des AcMx 13E5 et 6B3 (Figure 36 B et C). Comme attendu, les deux AcMx reconnaissent bien les ω_5-gliadines. Mais alors que chIgE-WO5 a conservé cette activité, chIgE-6B3 ne présente plus aucune activité vis-à-vis des ω_5-gliadines.

Dans cette manipulation où des surnageants de culture (d'hybridome ou de HEK transfectées) ont été utilisés sans connaitre la concentration précise en IgG ou en IgE, et dans laquelle les systèmes de révélation sont différents car adaptés à chaque isotype, il n'est pas possible de comparer précisément les courbes de titration de l'AcM 13E5 et de chIgE-WO5 et de s'assurer que la chimérisation n'a pas induit de modification de l'affinité de l'anticorps.

Il apparait donc qu'un seul des trois AcMx identifiés comme mimant la réactivité des IgE de patients, a abouti à la production d'une IgE chimérique conservant la capacité à reconnaitre les antigènes comme l'IgG dont elle est issue.

La spécificité de chIgE-WO5 a alors été contrôlée par immunoempreinte sur les différentes fractions du gluten séparées par SDS-PAGE. La coloration du gel d'électrophorèse au bleu de Coomassie des différentes fractions confirme la pureté des fractions qui migrent aux masses relatives attendues (Figure 37 A). On observe également qu'une petite proportion de protéines agrégées (dimères et trimères) est présente dans chaque fraction de gliadines.

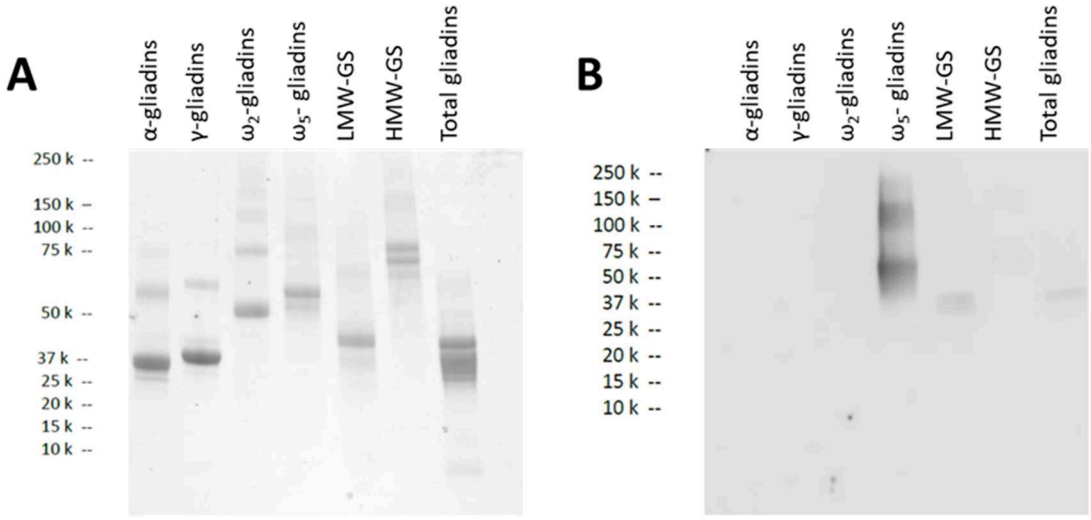


Figure 37 : Spécificité de chIgE-WO5 vis-à-vis des différentes fractions du gluten

Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, l'immunoempreinte de chIgE-WO5 est similaire à celle obtenu avec l'AcM 13E5 (Figure 35C) et révèle deux bandes larges dans la fraction d'ω_5-gliadines (≈ 60 et ≈ 120 kDa) et une bande de faible intensité dans la fraction des suG-FPM (≈ 40 kDa) (Figure 37B). Alors que la coloration au bleu de Coomassie montre que la proportion de dimères d'ω5-gliadines est faible par rapport aux monomères (Figure 37A), l'anticorps chIgE-WO5 révèle les dimères et les monomères avec des intensités équivalentes.

5.6. Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps chIgE-WO5

Afin d'identifier les épitopes reconnus par l'anticorps chIgE-WO5, des peptides couvrant les séquences d'une ω_5-gliadine (UniProtKB - Q402I5) et d'une suG-FPM (UniProtKB - Q9ZNY0) ont été synthétisés et couplés sur des membranes de nitrocellulose. Sur ces mêmes membranes des immunoempreintes de

l'anticorps AcM 13E5 ont été réalisées. Les immunoempreintes révèlent 115 peptides avec des intensités variables sur les 386 testés (Figure 38) : 62 pour l'ω_5-gliadine et 53 pour la suG-FPM (Table 4). Tous les peptides reconnus par l'anticorps chIgE-WO5 appartiennent aux domaines répétés de ces protéines.

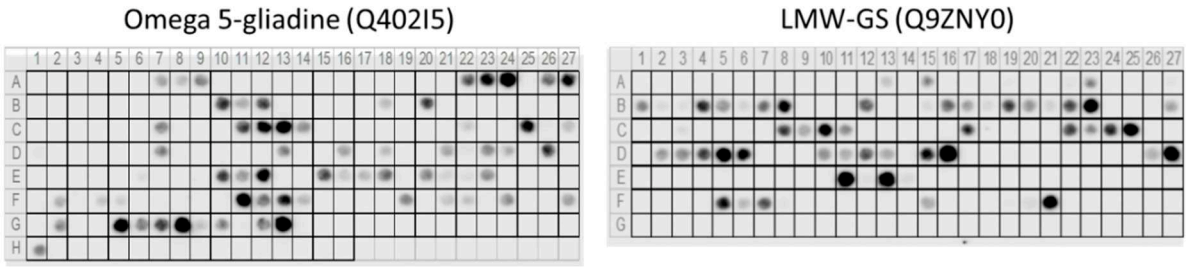


Figure 38 : Immunoempreintes de chIgE-WO5 sur des membranes de peptides couvrant les séquences (PEPSCAN) d'une γ-gliadine, d'une ω2-gliadine, d'une ω5-gliadine et d'une suG-FPM.

Afin de déterminer le ou les épitopes reconnus par l'anticorps chIgE-WO5, les séquences reconnues (115) ont été comparées à celles qui ne l'ont pas été (342) en utilisant le programme MEME (www.meme-suite.org) qui détermine la ou les séquences qui discriminent un jeu de séquences positives d'un jeu de séquence négative. Le résultat peut être visuellement représenté sous la forme d'une séquence LOGO qui tient compte de la fréquence des AA à chaque position de la séquence de l'épitope (Figure 39).

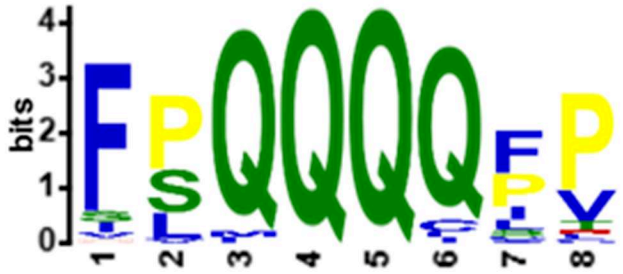


Figure 39 : Séquence LOGO issue de l'analyse MEME discriminant l'ensemble des séquences reconnues par chIgE-WO5, de celles qui ne le sont pas

La séquence la plus probable est F(P/S/L)QQQQ(F/P)(P/Y). Cette séquence LOGO est basée sur la probabilité de présence d'un AA à une position donnée dans l'ensemble des séquences reconnues par chIgE-WO5 et sur son absence à cette position dans les séquences non reconnues. De ce fait, toutes les séquences possibles décrites par la séquence LOGO n'existent pas dans le jeu de peptides testés. Ainsi, par exemple, la séquence FPQQQQPP n'est présente dans aucun des peptides positifs (ni des peptides négatifs d'ailleurs).

	Intensité des spots			
	+	++	+++	++++
ω5-gliadine (Q402I5)	QFPQQQQFPQ QFPQQQQFPQ PQQQFPQQQF PQQQLPQQQQ IPQQQQIPQQ FPQQQFPQQE QQQQFPQQQI QQSPQQQQFP SPQQQQFPQQ QQQFPQQQQL QFPQQQQLPQ IPQQQQIPQQ QQQQIPQQPQ QQQQFPQQQE QFPQQQFHQQ PQQQFHQQQL QQFPQQQQLT	QEQFPQQQQF PQQQQFPQPQ PQQFPQQQQF QFLQQQQIPQ PQQQQIPQQP QQQQFPQQQP PQQQQIPQQP FPQQQFPQQQ PQQQFPQQQF PQQEFPQQQQ FPQQQQFPQQ QFPQQQQFPQ QQQQFPQQQF FPQQQFPQQQ PQQQQLPQKQ QPQQIPQQQQ QQFPQQQQFP FPQQQFPQQQ FHQQQLPQQQ PQQQFPQQQF FPQQQFPQQQ QQFPQQQQFP FPQQQQLTQQ QQLTQQQFPR FPQQQFPIPY	QFPQQQQFLQ LQQQQIPQQQ PQQFPQQQQF PQQQQFPQQH FPQQQFPQQK QPQQFLQQQQ QQQQIPQQQQ FPQQQIARQP PQQFPQQQQF PQQQSPQQQQ FPQQQQFPQQ FPQQQQFPQQ	PQQQQFLQQQ QQFLQQQQFP FLQQQQFPQQ PQQQQFPQQQ PQQQFPQQQQ PQQQFPQQQQ QQQQFPQQQQ LTQQQFPRPQ
suG-FPM (Q9ZNY0)	HQQQPIQQQP QPPFSQQQQP PFSQQQQPPF QPPFSQQQQP SQQQLPPFSQ LPPFSQQQQP PFSQQQQPPF QQQPPFSQQQ QPPFSQQQQP SQQQLPPFSQ QQQQPVLPQQ PPFSQQQQPV QQQQPVLLQQ MQQQCCQQLP SIQTQQQQPQ	PIQQQPQQFP QQQQQPPLSQ QQQPPFSQQQ QQQPPFSQQQ PFSQQQQPVL PQQPSFSQQQ QQLPPFSQQQ PQQPSFSQQQ PPFSQQQQPV FSQQQLPPFS LPPFSQQQQP PQQPPFSQQQ QPPFSQQQQQ QQPPFSQQQQ KVFLQQQCSP QTQQQQPQQL PQQQSQQQLG	SQQQQPPFSQ SQQQQPVLPQ SQQQQPPFSQ PFSQQQQPVL QLPPFSQQQQ QQLPPFSQQQ PFSQQQQPVL PFSQQQQQPI QQQQPILPQQ FSQQQQPVLL PVLLQQQIPF QGSIQTQQQQ	SQQQQPVLPQ FSQQQQPVLP SQQQQPVLPQ SQQQQQPILP LLQQQIPFVH FLQQQCSPVA QSSCHVMQQQ HVMQQQCCQQ PQQQQLAQGT

Table 4 : Séquences des peptides reconnus par chIgE-WO5

5.7. Identification des isoformes d'w_5-gliadines et des suG-FPM reconnues par l'AcM 13E5 et déduction des épitopes linéaires les plus probables

L'analyse par Pepscan est détaillée mais ne repose que sur les séquences d'une ω_5-gliadine et d'une suG-FPM alors que de nombreuses isoformes sont présentes dans la farine de blé. Afin d'explorer cette diversité de séquences et d'identifier les ω_5-gliadines et les suG-FPM reconnues par l'AcM 13E5, l'ensemble du protéome d'une farine de blé (solubilisation SDS) a été séparé dans une électrophorèse à 2 dimensions et transféré sur une membrane de nitrocellulose avant de réaliser une immunoempreinte avec l'AcM 13E5. Les différentes protéines séparées ont été identifiées par Susanne Altenbach (USDA) qui avait préparé ces membranes (Altenbach et al., 2018).

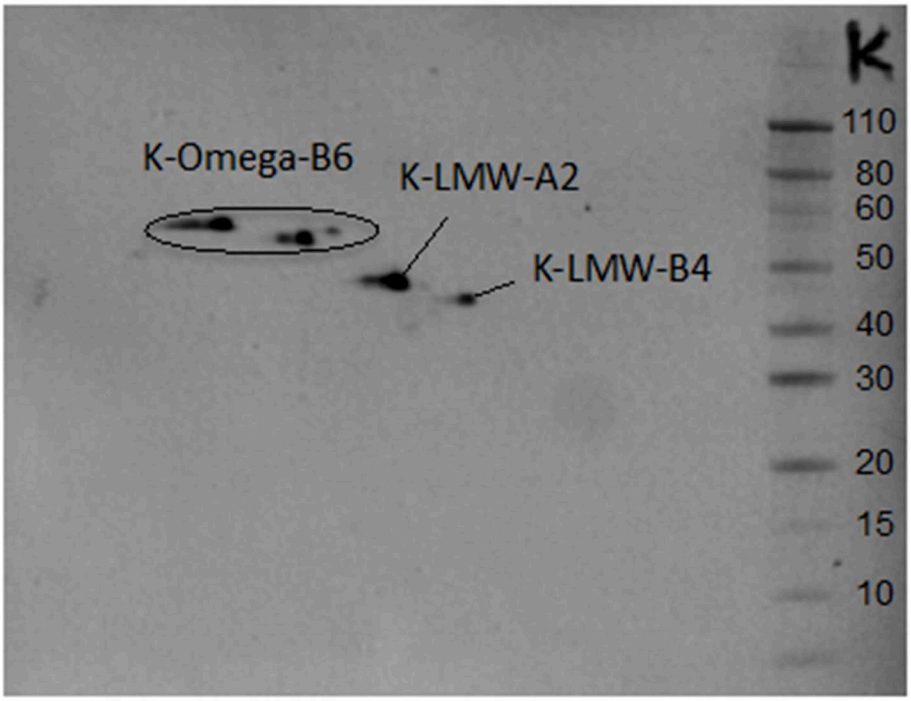


Figure 40 : immunoempreinte de l'AcM O13E5 sur le protéome de la farine de blé (cv. Keumkang) séparé en électrophorèse 2D

L'anticorps OTO13E5D8 révèle plusieurs spots correspondant à des isoformes d'ω_5-gliadine (B6), et de suG-FPM-A2 et la suG-FPM-B4.

L'alignement des séquences de l'ω_5-gliadine-B6 et de la suG-FPM-A2 révèle que seules deux séquences de 6 AA continus sont communes dans ces deux protéines, FLQQQQ et PQQQQL. Chacune de ces séquences est présente deux fois dans l'ω_5-gliadine B6 et une fois dans la suG-FPM-A2 et la suG-FPM-B4. La séquence FLQQQQ n'apparait pas dans les autres gliadines et GS alors que la séquence PQQQQL

est présente dans 3 suG-FPM qui ne sont pas reconnues par l'AcM 13E5. La séquence FLQQQQ apparait comme l'épitope probable de l'AcM 13E5.

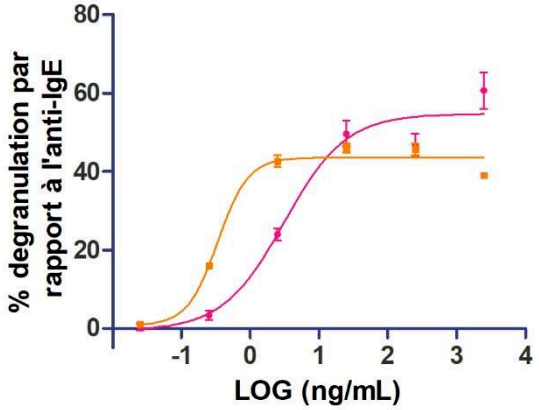
Cette séquence est aussi décrite par l'analyse MEME des peptides reconnus en Pepscan (Figure 39). Il est important de constater que de nombreux peptides reconnus en Pepscan sont présents dans des gliadines où des suG-FPM qui ne sont pas reconnues dans l'immunoempreinte, ni en ELISA. Il est probable que l'interaction d'un anticorps avec des peptides isolés, présents en forte concentration sur la membrane, librement accessibles car couplés à la membrane par leur extrémité C-terminale, soit favorisée. A l'opposée, dans le cas d'une séparation par électrophorèse en 2D suivie d'un transfert sur une membrane de nitrocellulose, il est possible que certains épitopes soient difficilement accessibles et/ou adoptent des conformations qui ne sont pas reconnues par l'anticorps.

La reconnaissance de différentes suG-FPM par chIgE-WO5 en immuno-empreinte est ici confirmée après séparation par électrophorèse en 2D. Les IgE de certains sérums de patients avaient déjà montrée cette spécificité (Gluten, 2010).

5.8. Activité fonctionnelle de chimérique IgE-WO5

Afin de vérifier que chIgE-WO5 possède la fonctionnalité des IgE des patients, sa capacité à induire la dégranulation de basophiles en présence d'ω_5-gliadines, des basophiles de rat exprimant le récepteur aux IgE humaines (FcεRI) ont été sensibilisés avec chIgE-WO5 ou un pool de 7 sérums de patients souffrant d'AIE (en rouge dans

Table 2) puis activés avec différentes concentration d'ω_5-gliadines.



chIgE-WO5
Pool serum humain

	pool sérum	chIgE-WO5
EC50% (ng/mL)	0,33	3,1
Max (%)	44	55

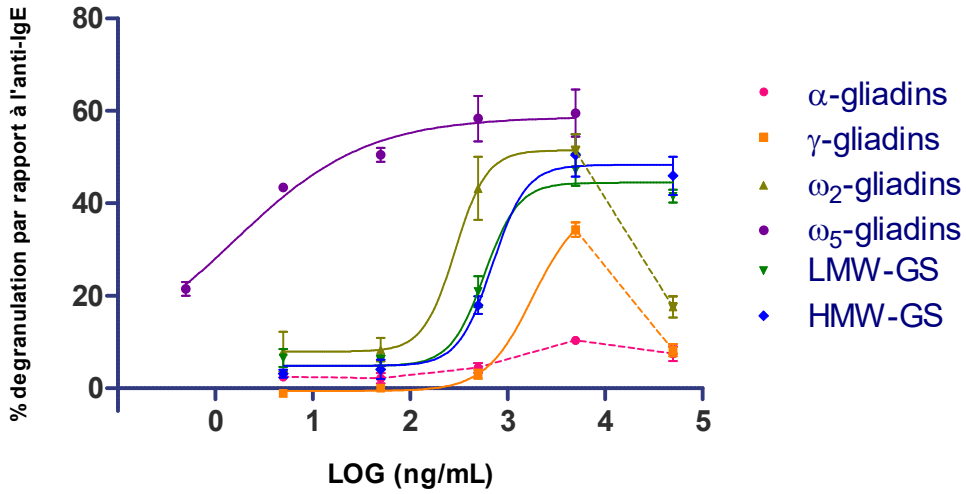
Figure 41 : Dégranulation de basophiles de rat humanisés avec le récepteur aux IgE humaines (lignée SX38) sensibilisés avec un pool de patients humains ou avec ChIgE-WO5 et activés avec des ω5-gliadines Pour chaque condition, les valeurs

d'EC50% (sensibilité) et le maximum de dégranulation (réactivité) sont déterminées avec PRISM5 (GraphPad) et reportées dans le tableau.

La fraction d'ω_5-gliadines induit une dégranulation des basophiles, qu'ils soient sensibilisés avec le pool de sérums humains ou avec chIgE-WO5 (Figure 6). Dans ces 2 conditions, les basophiles sensibilisés apparaissent tout autant réactifs aux ω_5-gliadines (max de 44% et 55%). Néanmoins un facteur 10 distingue les EC50% obtenues avec le pool de sérum ou avec chIgE-WO5 (0,33 ng/mL versus 3,1 ng/mL). Ceci illustre le fait que les basophiles sensibilisés avec les IgE de patients sont dix fois plus sensibles aux ω_5-gliadines que ceux sensibilisés avec chIgE-WO5.

La capacité des différentes fractions du gluten à induire la dégranulation de basophiles sensibilisés avec chIgE-WO5 a ensuite été testée dans le même modèle. La comparaison des EC50% montre que les basophiles sensibilisés avec chIgE-WO5 apparaissent au moins 100 fois plus sensibles aux ω_5-gliadines qu'aux autres fractions (Figure 42). Dans le cas des ω_2-gliadines, des suG-FPM et de suG-HPM, à conditions de les stimuler avec des concentrations suffisantes, les basophiles se montrent aussi réactifs qu'avec les ω_5-gliadines. Quelle que soit leur concentration, les α-gliadines n'induisent pas de dégranulation et seule une concentration de γ-gliadines induit une dégranulation (5000 ng/mL).

Les caractérisations de l'AcMx O13E5 et de sa version chimérique (chIgE-WO5) ont montré que ces anticorps reconnaissaient uniquement des ω_5-gliadines et des suG-FPM (Figure 37 et Figure 40). Compte tenu de la difficulté à purifier les différentes fractions du gluten, il est probable que la réactivité des basophiles observée avec les ω_2-gliadines et les suG-HPM soit liée à la présence résiduelle d'ω_5-gliadines dans ces fractions. En effet une contamination en ω_5-gliadines de moins de 1 % dans ces fractions suffirait pour observer cette réactivité. Bien que des suG-FPM soient reconnues par chIgE-WO5 (Figure 37), elles n'apparaissent pas plus actives que les suG-HPM sur les basophiles sensibilisés.



	α-gliadines	γ-gliadines	ω_2-gliadines	ω_5-gliadines	LMW-GS	HMW-GS
EC50% (ng/mL)		1800	290	1,5	580	700
Max (%)		*40*	51	59	44	48

Figure 42 : Dégranulation de basophiles de rat humanisés avec le récepteur aux IgE humaines (lignée SX38) sensibilisés avec ChIgE-WO5 et activés avec des α-, des γ-, des ω2- et des ω5-gliadines et des suG-FPM et HPM. Pour chaque condition, les valeurs d'EC50% (sensibilité) et le maximum de dégranulation (réactivité) sont déterminées avec PRISM5 (GraphPad) et reportées dans le tableau.

5.9. Exemple d'application du chIgE WO5 : évaluation de l'effet du chauffage et de la digestion sur l'allergénicité des ω_5-gliadines

La caractérisation de chIgE-WO5 a montré que cet anticorps possède une immuno-réactivité proche de celle des IgE de patients souffrant d'AIE au blé induite par les ω_5-gliadines. De plus, dans un modèle *in vitro* de dégranulation des basophiles, cet anticorps chimérique est capable d'induire, comme les sérums de patients, une dégranulation en présence d'ω_5-gliadines. Cette spécificité et son activité fonctionnelle, nous permettent de l'utiliser comme substitut pour explorer l'effet de différentes modifications de ces protéines sur leur activité fonctionnelle. ChIgE-WO5 a permis par exemple d'évaluer l'impact de la cuisson et de la digestion sur le potentiel éliciteur des gliadines sans utiliser de sérums de patients.

Afin de simuler les traitements que subissent les protéines du blé avant leur consommation et la phase gastrique de la digestion, des gliadines ont été chauffées à 200°C pendant 20 min, puis hydrolysées par

de la pepsine (1:20 E/S – 3500 U/mL). Des gliadines natives ou juste hydrolysées à la pepsine ont également été préparées. Ces différentes préparations ont ensuite été appliquées sur des basophiles de rat humanisés préalablement sensibilisés avec chIgE-WO5.

La digestion gastrique seule ou après un chauffage réduit l'activité biologique des ω_5-gliadines présentes dans la fraction gliadines totales (Figure 43). Un résultat similaire avait été observé avec des α-gliadines et des gliadines totales sur des basophiles sensibilisés avec des sérums de patients allergiques au blé (Lupi *et al.*, 2019).

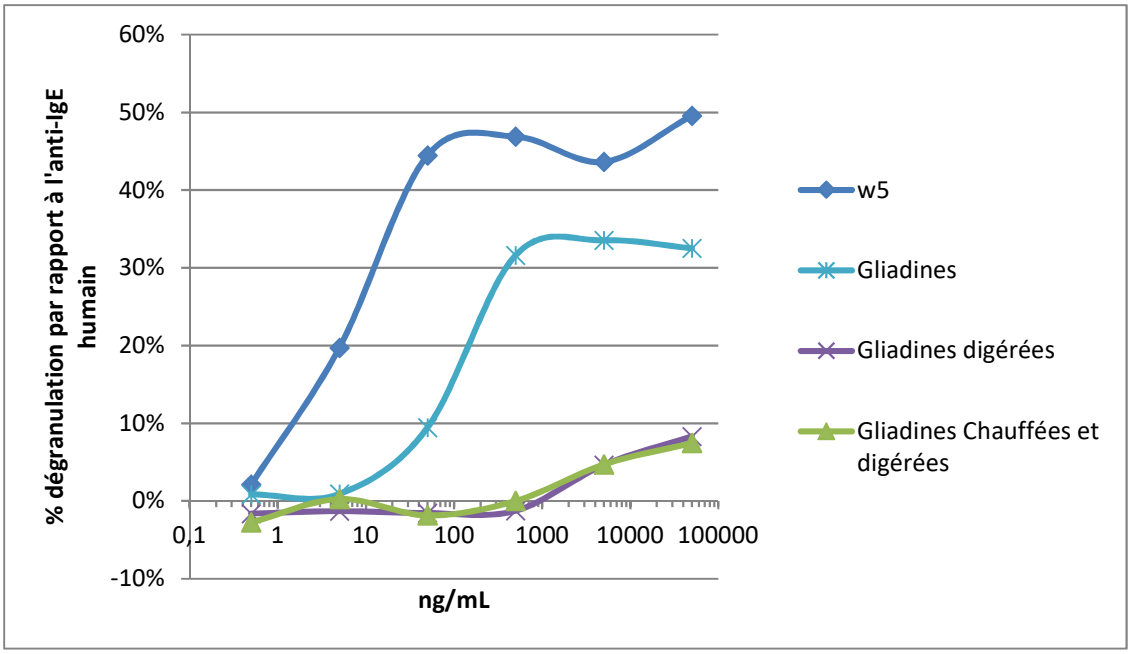


Figure 43 : Dégranulation de basophiles de rat humanisés avec le récepteur aux IgE humaines (lignée SX38) sensibilisés avec ChIgE-WO5 et activés avec des ω5-gliadines, une fraction de gliadines totales, une fraction de gliadines totales digérée à la pepsine ou une fraction de gliadines totales chauffées puis digérée à la pepsine.

5.10. Conclusion

Le répertoire IgE de patients souffrant AIE et sensibilisés aux ω_5-gliadines semble restreint et sur la base des comparaisons réalisées en ELISA et immuno-empreintes, chIgE-W05 permet de mimer en partie ce répertoire. Il est probable que le répertoire des patients sensibilisés aux ω_5-gliadines soit oligoclonal et variable d'un patient à l'autre. Les 2 autres AcMx sélectionnés pour une production d'IgE chimériques auraient permis de constituer un panel un peu plus représentatif.

D. DISCUSSION

Ce mémoire présente l'obtention et la caractérisation d'IgE chimériques recombinantes dirigées contre des séquences des domaines répétés de gliadines (γ et ω_2- et ω_5-gliadines). L'objectif était d'obtenir des IgE monoclonales possédant des réactivités et fonctionnalités proches de celles des IgE de patients allergiques au blé. Un premier intérêt à l'obtention de ces anticorps est de produire des connaissances sur les propriétés moléculaires des protéines de blé qui favorisent leur allergénicité ; ce travail a ciblé la compréhension de certaines caractéristiques structurales, organisation spatiale des épitopes, degré de modification par désamidation, homologies de séquences/réactivité croisée, pouvant favoriser l'antigénicité et l'activation des basophiles de ces allergènes ou de leurs épitopes. La réactivité de ces IgE monoclonales a pu être comparée de façon détaillée à celle des sérums de patients allergiques afin d'évaluer dans quelle mesure ces anticorps chimériques pouvaient être représentatifs du répertoire polyclonal des IgE des sérums. La production de ces anticorps est aussi source d'applications possibles telles que l'évaluation du potentiel allergène de nouveaux glutens fonctionnalisés, ou l'étude des effets des procédés de transformation des aliments et de leur digestion.

Le blé est responsable d'allergies qui se classent en plusieurs phénotypes selon la voie d'exposition, les symptômes cliniques et les allergènes incriminés (Matricardi et al., 2016). Deux de ces phénotypes se distinguent par la sévérité de leurs symptômes : l'anaphylaxie induite par l'effort et l'allergie au gluten désamidé. L'allergie au gluten désamidé est d'apparition récente (Tranquet et al., 2020). Les glutens désamidés sont principalement produits par chauffage du gluten en condition acide. Ce procédé augmente la solubilité du gluten et lui confère d'intéressantes propriétés moussantes et émulsifiantes (Liao *et al.*, 2009). Des glutens désamidés ont été commercialisés à partir des années 90. Ceci a ainsi étendu les utilisations du gluten, source de protéines végétales bon marché, bien au-delà de ses usages traditionnels en alimentation mais aussi dans le domaine des cosmétiques. Dans ces deux phénotypes d'allergies au blé, les allergènes majeurs sont des gliadines : les ω_5-gliadines pour l'anaphylaxie induite par l'effort et les γ- et les ω_2-gliadines pour l'allergie au gluten désamidé *(Fabrice Battais et al., 2005; Denery-Papini et al., 2012; Morita et al.*, 2003). Les gliadines se caractérisent par un domaine constitué de multiples répétions de séquences homologues de 5 à 10 AA (A S Tatham & Shewry, 2008). Que ce soit dans l'anaphylaxie induite par l'effort ou dans l'allergie au gluten désamidé les épitopes immuno-dominants identifiés appartiennent à ces domaines répétés. Ces motifs épitopiques répétés peuvent être à l'origine de réactions croisées entre les épitopes au sein d'une même classe de gliadines ou entre les différentes classes de gliadines et de suG.

1. Les IgE Chimériques

1.1. Stratégies d'obtention

La polyclonalité des sérums mais aussi leur faible disponibilité rendent difficiles leur utilisation pour caractériser les épitopes pertinents/fonctionnels dans une allergie ou pour étudier en détail la phase d'activation des basophiles ou des mastocytes (Lund *et al.*, 2012). La production d'IgE monoclonales recombinantes offre une alternative intéressante en remplaçant les sérums de patients et en réduisant expérimentalement la complexité du répertoire IgE étudié. Le principe de production des IgE monoclonales consiste à introduire dans un ou deux vecteurs codant les domaines constants des chaines lourde et légère d'une IgE humaine, l'ADN codant les domaines variables d'un autre anticorps dont la spécifié est définie. Il est ainsi possible de générer des lignées cellulaires produisant des IgE contenant les domaines variables de l'anticorps choisi. Cette approche offre l'avantage d'avoir ensuite à disposition une source importante d'IgE dont la spécificité est connue. Elle a permis ces dernières années des avancées significatives dans la connaissance des paramètres clés aboutissant à l'activation des basophiles (Bucaite *et al.*, 2019; L. H. Christensen *et al.*, 2008; Gieras *et al.*, 2015). Le choix de l'anticorps à l'origine des domaines variables pose cependant de nombreuses questions. Tout d'abord, il peut être d'origine humaine ou avoir été généré en immunisant des animaux. S'il est d'origine humaine, faut-il qu'il provienne d'un patient allergique ? Et dans ce cas, quelles doivent en être les caractéristiques cliniques ? Les lymphocytes B sécrétant des IgE étant extrêmement rares, peut-on plutôt sélectionner des lymphocytes sécrétant des IgG ou des IgM ? Se pose ainsi indirectement la question du répertoire des patients allergiques. Le répertoire IgE est-il distinct du répertoire IgG ? Celui des patients est-il particulier ? On manque actuellement de connaissances pour rationaliser ces choix, en particulier sur les similitudes entre les épitopes des différents isotypes d'anticorps (Sarita U. Patil *et al.*, 2015; Vickery, Scurlock, Jones, & Burks, 2012). Une étude génétique récente a identifié des 3 variants de HLA-DQ associés à une augmentation du risque de développer une allergie au gluten désamidé (Noguchi *et al.*, 2019). Ces profils HLA-DQ particulier pourrait induire la formation d'anticorps particuliers chez les patients.

Si l'on choisit un anticorps produit chez l'animal, on parle alors d'IgE chimériques et d'autres questions émergent. Quel immunogène doit être utilisé pour le produire ? L'anticorps murin choisi est-il représentatif de la réactivité des IgE de patients ?

Produire une IgE monoclonale à partir de patients dont le phénotype clinique correspond à l'objectif, est à priori l'approche la plus pertinente. Néanmoins, la réponse d'un patient à un antigène étant oligoclonale, toutes les IgE ne sont pas cliniquement relevantes. En pratique, il faut donc mettre en

place une stratégie pour choisir les IgE pertinentes. Cela est encore plus nécessaire si l'on utilise des anticorps produits chez l'animal. Cependant, comparativement à la production d'IgE recombinantes, la production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux de souris est bien plus simple à mettre en œuvre.

1.2. Les IgE chimériques dirigées contre des allergènes du blé

Pour répondre à nos objectifs, nous avons choisi de produire des IgE chimériques souris/homme. Ce choix correspond à la fois la contrainte d'accès à du sang de patients susceptible de fournir des lymphocyte B et à notre capacité et expertise à produire et à caractériser des anticorps monoclonaux murins dirigés contre les protéines de la farine de blé. Pour sélectionner les anticorps murins pertinents, nous nous sommes appuyés sur des sérums de patients allergiques de notre sérothèque afin de sélectionner les anticorps de souris qui présentaient une réactivité la plus proche possible de celle des IgE de patients.

Dans le cas de l'allergie au gluten désamidé, les anticorps monoclonaux ont été obtenus en immunisant des souris avec un peptide correspondant à un épitope IgE dominant dans cette allergie (Denery-Papini *et al.*, 2012; Tranquet *et al.*, 2015). Ces anticorps présentaient une réactivité très proche de celle des IgE de patients.

Dans le cas de l'anaphylaxie induite par l'effort, plusieurs séquences reconnues par les IgE des patients ont été identifiés dans les ω_5-gliadines. La plupart de ces séquences peuvent être décrites par la séquence consensus : QQX1PX2QQ, où X1 peut être I, L, F, S, ou Y and X2 peut être Q, G or E. Avant le démarrage de cette thèse, des souris avaient été immunisées avec la séquence épitopique CFPQQQFPQQQ et plusieurs anticorps monoclonaux avaient été générés. Parmi eux, seule une IgM s'était révélée capable de reconnaitre les ω_5-gliadines, mais avec une affinité trop faible pour prendre le risque de la convertir en IgE chimérique. Afin d'obtenir d'autres anticorps monoclonaux, nous avons donc choisi d'immuniser des souris avec une fraction d'ω_5-gliadines entières. Sur les 51 anticorps monoclonaux générés, seuls quelques-uns présentaient une réactivité proche de celle des IgE de patients. Ces exemples de production d'anticorps anti ω5-gliadines illustrent qu'il est parfois difficile d'obtenir des anticorps avec une réactivité proche de celle des IgE de patients.

Pour produire les IgE chimériques à partir des anticorps monoclonaux de souris, nous avons utilisé les vecteurs de clonage et d'expression d'IgE décrits et utilisés par Christensen et al. (2008) et qui nous ont été aimablement donné par le Pr Lund (ALK-Abello). Il est à noter qu'en pratique, la production et

la caractérisation d'anticorps monoclonaux, issus de la même série d'immunisation, de souris prend environ 6 mois. De plus, l'établissement d'une lignée stable produisant des IgE chimériques produisant un anticorps prend encore 4 à 6 mois. L'obtention d'une IgE monoclonale chimérique demande donc un investissement sur la durée. Nous avions pour objectif de produire 5 anticorps chimériques à partir de 5 anticorps monoclonaux murins que nous avons sélectionnés (2 contre le gluten désamidé et 3 contre les ω_5-gliadines). Nous n'avons abouti à la production d'IgE chimériques fonctionnelles que pour 3 d'entre eux : 2 contre le gluten désamidé, et 1 contre les ω_5-gliadines. Dans tous les cas nous sommes parvenus à cloner les ADNc codant les domaines variables des 5 anticorps dans les vecteurs d'expression, mais dans 1 cas nous n'avons jamais observé d'expression de l'IgE chimérique et dans l'autre cas l'IgE chimérique exprimée ne reconnaissait pas l'antigène correspondant. Dans les cellules de mammifère, l'expression et l'adressage dans le milieu extracellulaire des protéines nécessitent de nombreuses étapes qui sont régulées afin que les protéines soient correctement exprimées, repliées, éventuellement modifiées, et adressées dans les bons compartiments. Dans le cas où nous n'avons pas observé d'expression de l'IgE recombinante, il est possible que l'association chimérique des domaines constants humains et des domaines variables murins n'ait pas permis à l'une de ces étapes de se dérouler correctement. Dans le cas où l'IgE chimérique est exprimée mais ne reconnait pas son antigène, il est possible que le repliement des domaines variables ne se soit pas déroulé dans les cellules transfectées comme il se déroulait dans les cellules murines produisant l'anticorps monoclonal de souris originel.

L'IgE chimérique dirigée contre le gluten désamidé (chIgE-DG1) et celle contre les ω_5-gliadines (chIgE-WO5) se sont révélées capables d'induire la dégranulation de basophiles en présence de leur allergène mais l'obtention d'une IgE chimérique dirigée contre les ω_5-gliadines a été plus laborieuse que dans le cas du gluten désamidé. Sa comparaison aux IgE des patients doit encore être approfondie.

Ces difficultés expliquent sans doute pourquoi la production d'IgE chimériques, à l'instar d'autres anticorps recombinants, est encore peu développée et reste limitée soit aux équipes qui peuvent y consacrer un investissement important, notamment du temps, soit aux entreprises pharmaceutiques qui en attendent de fortes retombées économiques. Des vecteurs de clonage et d'expression plus versatiles (permettant la production de différents isotypes) et plus simples d'utilisation ont été récemment construits (Dodev *et al.*, 2014). Ils devraient permettre la production de davantage d'IgE monoclonales recombinantes.

2. Caractéristiques structurales et antigénicité des allergènes du blé

2.1. Caractérisation des glutens désamidés

Le gluten désamidé a été majoritairement commercialisé sous la désignation imprécise de « protéines de blé hydrolysées » qui recouvre en fait des ingrédients contenant des protéines plus ou moins hydrolysées et pas toujours désamidées (Tranquet *et al.*, 2020). Parallèlement à la diffusion de ces protéines de blé hydrolysées, les premiers cas d'allergie liés à l'utilisation de ces produits ont été décrit en Europe au début des années 2000 avant que de très nombreux cas soient observés au Japon à partir de 2009. L'exploration biologique et clinique d'une cohorte de 15 patients français a permis à notre équipe de démontrer que cette allergie était liée à la désamidation qui créait des néo-épitopes dans les γ- et les ω_2- gliadines (Denery-Papini *et al.*, 2012). Au démarrage de cette thèse, les caractéristiques biochimiques des glutens désamidés commercialisés ainsi que leur antigénicité et leur allergénicité étaient peu décrites. Dans un premier temps, nous sommes donc attachés à caractériser précisément ces produits en utilisant des anticorps monoclonaux.

2.1.1 Une antigénicité particulière

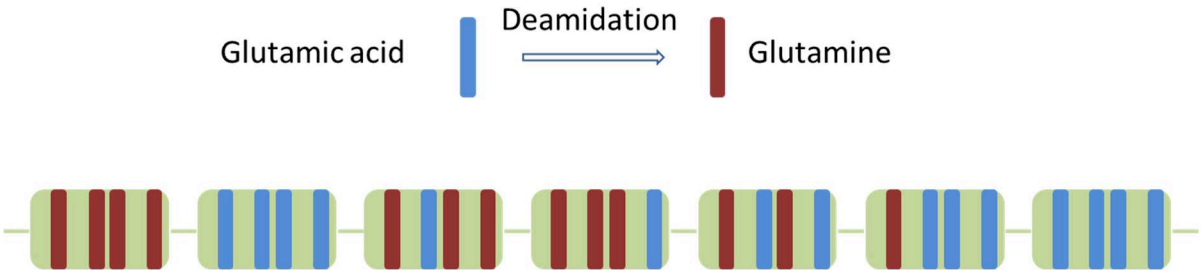
Nous avons produit plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope immuno-dominant dans l'allergie au gluten désamidé (Tranquet et al., 2015). Ce travail a permis de confirmer que l'antigénicité du gluten désamidé était en partie distincte de celle du gluten natif. En effet, les anticorps monoclonaux sélectionnés contre l'épitope désamidé reconnaissaient fortement le gluten désamidé alors qu'ils ne présentaient qu'une faible réactivité vis-à-vis du gluten natif. Cette antigénicité spécifique avait également été observée chez les patients français (Denery-Papini *et al.*, 2012). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Gourbeyre *et al.* et Krogsbo *et al*. (Gourbeyre *et al.*, 2012; Kroghsbo, Andersen, Rasmussen, Jacobsen, & Madsen, 2014). Des souris ou des rats sensibilisés avec des protéines de gluten désamidées ont dans leur sérum des anticorps capables de reconnaitre le gluten natif ou désamidé. Quand la sensibilisation est faite avec des protéines de gluten natif, la reconnaissance des protéines désamidées n'est que partielle. Toute ces résultats indiquent que des nouveaux épitopes sont présents dans les protéines désamidées.

Cette antigénicité particulière des glutens désamidés explique par ailleurs pourquoi les méthodes de détection du gluten qui pour la plupart visent les séquences répétées des gliadines natives, détectent très imparfaitement le gluten désamidé (Kanerva *et al.*, 2011). En utilisant l'un des anticorps

monoclonaux produits, INRA-DG1, nous avons développé une méthode ELISA pour la détection des glutens désamidés (Tranquet *et al.*, 2015).

2.1.2 Une distribution et une variabilité des épitopes désamidés complexes

L'analyse biochimique par native-PAGE du niveau de désamidation des glutens commerciaux a montré que celui-ci était très variable d'un produit à l'autre. Cependant cette mesure globale du niveau de désamidation n'est pas assez précise et laisse planer des incertitudes quant au niveau de désamidation à l'échelle de l'épitope. Nous avons donc complété le dosage ELISA basé sur l'utilisation de l'anticorps INRA DG1, qui détecte les séquences fortement désamidées, par deux autres dosages ELISA détectant respectivement des séquences répétées natives et faiblement désamidées. La combinaison des 3 dosages ELISA a montré que les glutens désamidés commerciaux contenaient un mélange de séquences natives, de séquences faiblement désamidées et de séquences fortement désamidées (Tranquet, Echasserieau-Laporte, *et al.*, 2017).



2.2. Antigénicité des ω5-gliadines

Les deux types d'ω-gliadines possèdent une organisation similaire de leur séquence dont la quasi-totalité est composée de motifs répétés. Cependant, ces motifs sont spécifiques à chaque type d'ω-gliadines et l'étude de Mameri *et al.* indique également que des ω_2 et des ω_5-gliadines recombinantes diffèrent dans leurs contenus en structures secondaires (Mameri, Bouchez, *et al.*, 2012). Cette étude montre également la très grande stabilité à la dénaturation de l'ω_5-gliadine.

Réalisée avant le démarrage de cette thèse, l'immunisation avec 1 peptide épitopique (CFPQQQFPQQQ) du domaine répété des ω_5-gliadines n'avait permis d'isoler qu'un seul anticorps monoclonal de faible affinité capable de reconnaitre les ω_5-gliadines (Tranquet, Larré, & Denery-Papini, 2012). D'autres peptides épitopiques (basés sur le motif consensus QQX1PX2QQ) utilisés comme immunogènes pour la production d'anticorps polyclonaux n'ont pas été plus pertinents. Au

cours de cette thèse, nous avons par contre observés que les ω_5-gliadines sont très bien reconnues par les anticorps monoclonaux produits après immunisation avec une fraction d'ω_5-gliadines purifiées. Ces différentes observations montrent que les domaines répétés des ω_5-gliadines sont antigéniques et suggèrent que leur conformation n'est pas correctement mimée par des peptides linéaires très courts, contrairement aux domaines répétés des γ et ω_2-gliadines (Tranquet *et al.*, 2012).

3. Potentiel des allergènes du blé à induire la dégranulation des basophiles

Afin de mieux comprendre la capacité des gliadines à induire la dégranulation de basophiles sensibilisés par des sérums de patients, nous avons évalué le potentiel déclenchant de peptides contenant des répétitions d'un épitope dominant dans l'allergie au gluten désamidé. En faisant varier le nombre de répétition et l'espacement, nous avons observé dans ce système modèle que : 1/des peptides divalents, c'est-à-dire portant deux épitopes suffisent à activer nettement les basophiles ; 2/ un espacement de 3 AA ne suffit pas à une activation des cellules alors qu'un espacement de 6 AA confère une bonne efficacité ; d'autre part, des dégranulations équivalentes sont observées quand l'espacement entre les deux épitopes varie de 6 à 29 AA ; 3/ les basophiles sont plus sensibles et plus réactifs en présence de peptides trivalent ou tétravalent.

Parallèlement, nous avons mesuré la masse molaire des complexes immuns formés par l'interaction de ces mêmes peptides avec l'anticorps de souris mDG1, dirigé contre l'épitope qu'ils contenaient. Il est apparu que selon le peptide, les proportions des complexes immuns formés de 1, 2, 3 ou 4 anticorps variaient. Nous alors pu faire le parallèle entre l'intensité de la dégranulation induite par les différents peptides et la proportion d'immuns complexes de 3 ou 4 anticorps qu'ils formaient en interagissant avec mDG1. A contrario, quand les complexes immuns n'étaient pas constitués de plus de 2 anticorps, aucune dégranulation n'était observé et aucun parallèle n'a pu être fait entre la proportion de complexes immuns constitués de 2 anticorps et l'intensité de dégranulation que provoquait les peptides. Dans le cas particulier d'un allergène portant 2 fois le même épitope, il a été émis l'hypothèse qu'il formait préférentiellement des complexes immuns constitués de 2 anticorps et de 2 allergènes. Cette configuration étant thermodynamiquement favorisée, elle limiterait la formation de complexes immuns plus gros et donc susceptibles d'activer plus intensément les basophiles (Posner *et al.*, 2007b). Les techniques que nous avons utilisées pour caractériser les complexes immuns ne nous permettent pas de déterminer leur forme, anneaux, chaines ou mélange des deux. Cela serait néanmoins intéressant à explorer en utilisant des techniques de microscopie électronique par exemple (Gieras *et*

al., 2015). Il serait également utile d'analyser les complexes immuns résultants de l'interaction des peptides avec chIgE-DG1 pour voir s'il y a des différences avec ceux formés avec mDG1.

Il apparait donc que de nombreuses combinaisons de répétition d'épitopes des γ-gliadines sont capables d'activer les basophiles sensibilisés avec des sérums de patients allergiques au gluten désamidé. Le fait que ces peptides n'adoptent pas de structure définie est probablement un élément important de cette propriété. Dans les γ- et les ω_2-gliadines cet épitope immuno-dominant est répété au moins 8 fois et les répétitions y sont espacées de 1 à plus de 40 AA. Comme les peptides que nous avons testés, les gliadines désamidées ne présentent pas de structure définie (Wong *et al.*, 2012). On comprend ainsi que cette absence de contrainte structurale et les multiples répétitions rendent probable l'existence de combinaisons activatrices des basophiles dans les gliadines désamidées et expliquent les symptômes sévères observés chez les patients.

Bien que la réactivité croisée protéine/peptides soit moins bonne dans le cas des ω_5-gliadines que dans le cas des γ et ω_2-gliadines, il serait tout de même intéressant d'appliquer une démarche similaire à l'étude de l'organisation spatiale des épitopes des ω_5-gliadines. Les polypeptides pourraient se baser dans un premier temps sur l'épitope de l'anticorps chIgE-WO5 déterminé dans cette étude, en faisant varier le nombre d'épitopes et leur espacement mais aussi la séquence de l'épitope. Ceci permettrait d'évaluer le rôle des homologies/réactivités croisées dans l'activation des basophiles en utilisant cet anticorps et en le comparant à des sérums de patients.

4. Compréhension du répertoire IgE des patients

L'utilisation chIgE-DG1 et de chIgE-WO5 a montré que dans ces deux cas, des IgE d'une seule spécificité suffisent pour déclencher la dégranulation de basophiles en présence de leur allergène. Les multiples répétitions des épitopes ciblés facilitent l'agrégation des récepteurs FcεRI et activent efficacement les basophiles. Il en ressort que le répertoire IgE de ces patients allergiques au blé peut être extrêmement restreint et tout de même provoquer une forte activation des basophiles.

L'activité fonctionnelle de ces 2 anticorps chimériques a été comparée à celle des IgE de patients. Nous avons clairement établi que chIgE-DG1 mimait correctement les IgE des patients. Les résultats sont encore parcellaires en ce qui concerne chIgE-WO5 et la comparaison avec les IgE de patients serait à approfondir. En comparaison à l'allergie au gluten désamidé, la réactivité des IgE anti ω_5-gliadines des patients est plus hétérogène et il est probable que chIgE-WO5 ne corresponde qu'à celle de certains patients. Le fait que l'épitope immuno-dominant de l'allergie au gluten désamidé soit une séquence linéaire, alors que plusieurs épitopes ayant une ou des conformations particulières dans les ω_5-

gliadines soient impliqués dans l'anaphylaxie au blé induite par l'effort, explique cette différence. Il est également possible qu'une combinaison de quelques IgE chimériques distinctes soit nécessaire pour bien mimer la réactivité IgE d'un patient.

4.1. Répertoire IgE dans l'anaphylaxie induite par l'effort

La caractérisation des anticorps monoclonaux dirigés contre les ω_5-gliadines a montré que la plupart d'entre eux sont capables de reconnaitre de nombreuses protéines du gluten alors que la réactivité des IgE de patients souffrant d'AIE est nettement plus restreinte. Cette différence de réactivité entre les IgE des patients et les IgG de souris, correspond-elle à une différence entre homme et souris ou à une différence entre IgG et IgE ? Dans notre travail publié en 2011, nous avions observé que les IgE de souris sensibilisées aux gliadines avaient des spécificités comparables aux IgE de patients allergiques au blé (Denery-Papini *et al.*, 2011).

Il est à noter qu'une grande partie des patients inclus dans cette comparaison ne souffraient pas d'anaphylaxie au blé induite par l'effort mais d'allergie alimentaire à la farine de blé. Les IgE de ces patients, souvent des enfants, reconnaissent fréquemment plusieurs protéines du gluten sans que l'on sache si cela est dû à la présence d'IgE spécifiques de chaque fraction du gluten et/ou à la présence d'IgE à la réactivité croisées comme les anticorps de souris. On notera également que très souvent les patients déclarent une anaphylaxie au blé induite par l'effort à l'âge adulte. Cela signifie qu'ils avaient préalablement développé une tolérance aux différentes protéines du gluten et que cette tolérance ne s'est rompue que vis-à-vis des ω_5-gliadines. On peut supposer que cette tolérance préexistante empêche la production d'IgE possédant cette capacité à réagir avec de nombreuses protéines du gluten. Ce qui n'est pas le cas dans la production d'AcMx à partir de souris et immunisées par voie intrapéritonéale et non sensibilisées par voie orale (Denery-Papini *et al.*, 2011).

Il est également possible que les répertoires IgG et IgE soient distincts. Les protocoles murins de sensibilisation aux gliadines et ceux visant à produire des anticorps monoclonaux diffèrent pour, dans le premier cas favoriser une réponse immunitaire de type T_H2, et dans l'autre une réponse de type T_H1. L'analyse comparée des réactivités croisées des IgG humaines de patients souffrant d'anaphylaxie induite par l'effort et de témoins pourrait permettre de répondre à cette question. Battais *et al.* avaient observé des profils de réactivité similaires vis-à-vis des différentes prolamines pour les IgE et les IgG de patients avec une allergie classique au blé et entre les IgG de ces patients et ceux de personnes contrôles sans allergies alimentaires (Fabrice Battais *et al.*, 2003). Cependant, les mécanismes biologiques de l'AIE au blé ne sont pas encore bien compris et les profils d'allergènes mis en évidence dans cette allergie particulière diffèrent de ceux observés dans l'allergie classique au blé.

4.2. Répertoire IgE dans l'allergie au gluten désamidé

Le fait que le gluten désamidé incriminé dans les nombreux cas japonais d'allergie soit également capable d'induire la dégranulation des basophiles avec les IgE des patients français (Tranquet, Gaudin, *et al.*, 2017) et que les sérums de patients français et japonais se caractérisent par la présence d'IgE spécifiques de séquences des domaines répétés des protéines du gluten plus ou moins désamidés (Denery-Papini *et al.*, 2012; Yokooji *et al.*, 2013), suggèrent que les patients français et japonais souffrent du même type d'allergie. Cependant, il est apparu que la plupart des patients français décrits toléraient les produits à base de blé alors que les patients japonais y réagissaient fréquemment. Les différentes études réalisées chez ces patients sensibilisés au gluten désamidé et allergiques ou non au blé soulèvent donc une série de questions : pourquoi les personnes qui tolèrent les produits conventionnels à base de blé deviennent-elles allergiques au gluten désamidé ? ; Pourquoi les patients japonais deviennent-ils également allergiques au blé ? ; Le potentiel allergénique du gluten désamidé est-il supérieur à celui du blé compte tenu du grand nombre de cas japonais et de la gravité des symptômes observés tant en Europe qu'au Japon ? Plusieurs hypothèses ont été émises pour répondre à ces questions.

4.2.1 Hypothèses concernant les mécanismes de sensibilisation – comparaison des cas français et japonais

Les études menées sur des modèles animaux (souris et rats) peuvent apporter quelques réponses. Ainsi, que ce soit par sensibilisation intrapéritonéale ou cutanée, en comparaison aux gliadines natives, les gliadines désamidées induisent une production plus importante d'IgE contre les gliadines désamidées mais aussi contre les gliadines natives (Adachi *et al.*, 2012; Ballegaard, Madsen, & Bøgh, 2019; Gourbeyre *et al.*, 2012). En 2018, Castan *et al.* ont confirmé ce dernier point en montrant que la sensibilisation aux gliadines désamidées induisait chez les souris une réaction allergique plus forte que la sensibilisation aux gliadines natives, avec en particulier une production d'IgE et une réponse immunitaire plus précoces (Castan *et al.*, 2018). Madsen et Bogh ont de leur côté, montré très récemment chez des rats tolérant les protéines de blé natives, que l'administration de gluten désamidé par voie orale n'induisait pas de sensibilisation, illustrant ainsi la tolérogénicité de cette voie (Madsen & Bøgh, 2020). Ces études montrent à la fois le potentiel de sensibilisation élevé des protéines de blé désamidées par voie IP ou cutanée et le fait que la persistance des séquences natives dans ces produits génère également des IgE capables de reconnaître les protéines natives.

L'application sur la peau d'un produit contenant des épitopes différents de ceux présents dans la farine de blé, des néo-épitopes induits par la désamidation contre lesquels une tolérance orale n'a pas été établie, expliquerait donc l'apparition de ce nouveau phénotype clinique d'allergie au blé chez des

personnes tolérant pourtant au blé. Pour les patients japonais et certains patients européens, la génération d'une réponse allergique pourrait avoir été facilitée par la pénétration cutanée, moins tolérogène que la voie orale , et par l'application d'un produit plus hydrophile que le gluten ou la présence de détergents comme dans le savon. La durée et la chronicité de la sensibilisation peuvent également expliquer pourquoi les patients japonais ont également répondu aux protéines de blé natives. Initialement sensibilisés par les séquences désamidées, leur répertoire IgE se serait étendu aux séquences natives qui persistent dans le gluten désamidé.

5. Gérer le risque d'allergie au gluten désamidé

La fonctionnalisation des protéines du blé par désamidation est susceptible de générer des néo-épitopes qu'il est important de détecter, à la fois pour diagnostiquer les patients et pour contrôler les produits qui peuvent en contenir (aliments ou cosmétiques).

En fait, les extraits de blé natif proposés pour les tests cutanés et pour les dosages d'IgE spécifiques sont inefficaces pour le diagnostic et l'exploration en laboratoire de ces patients allergiques au gluten désamidé. La caractérisation du gluten modifié impliqué dans le premier cas français décrit par Leduc et al, réalisée dans notre groupe, a abouti à la proposition en 2006 d'un extrait de gluten désamidé pour le diagnostic des patients allergiques au gluten désamidé (Fabrice Battais *et al*., 2006). Dans le même but, Nakamura *et al*. ont proposé en 2014 d'utiliser le Glupearl 19S pour les patients japonais (M. Nakamura *et al*., 2014).

En termes d'étiquetage des aliments et des cosmétiques, la gestion de ce risque spécifique est tout aussi délicate. En effet, d'une part la réglementation sur l'étiquetage ne permet pas l'identification des produits contenant du gluten désamidé et, d'autre part les méthodes analytiques dédiées à la détection du gluten sont fortement impactées par la désamidation *(Kanerva et al., 2011*; Tranquet *et al.*, 2015). L'identification d'un épitope majeur de gluten désamidé (Denery-Papini *et al.*, 2012) a ainsi permis le développement d'une méthode de détection spécifique applicable aux aliments et aux cosmétiques. De même, chIgE-DG1, mimant la réactivité IgE des patients allergiques au gluten désamidé, est maintenant proposé comme outil pour évaluer *in vitro* l'allergénicité des glutens fonctionnalisés (Tranquet, Gaudin, *et al*., 2017). En Europe, les glutens désamidés par traitement acide ont été retirés du marché alimentaire par certains fabricants en 2011. L'association industrielle "Starch Europe" interrogée en janvier 2018 a déclaré que les producteurs de gluten en Europe ne produisent plus de glutens désamidés pour la consommation humaine, mais commercialisent des protéines de blé hydrolysées enzymatiquement. Ces mesures ont l'air de porter leurs fruits puisqu'aucun cas d'allergie au gluten désamidé n'a été identifié par le réseau d'allergo-vigilance depuis 2014.

Dans le cas des produits cosmétiques, le Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs de la Commission européenne a recommandé en 2014 (SCCS/1534/14) qu'ils soient utilisés dans les cosmétiques après une protéolyse extensive générant des polypeptides/peptides dont la taille moyenne est inférieure à 3,5 kDa. Pourtant, une publication récente dans le journal de l'EFSA a indiqué que des peptides de 9 AA (environ 1 KDa) pourraient suffire à réticuler les IgE sur les cellules effectrices (Naegeli *et al.*, 2017). D'autres résultats récents publiés par Nakamura et al. montrent aussi que des protéines de blé hydrolysées présentes dans des cosmétiques ayant un poids moléculaire moyen inférieur à cette limite ont induit une réaction au prick-test chez les patients japonais (M. Nakamura *et al.*, 2016). Au vu de ces résultats, cette limite de 3,5 kDa pourrait être reconsidérée.

E. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les IgE chimériques que nous avons produites ont des réactivités très proches des IgE des patients. Elles peuvent donc les remplacer et permettent d'étudier l'effet de différents facteurs sur la reconnaissance IgE/allergène et sur la capacité des allergènes à déclencher une réaction allergique dans différentes conditions ou suite à la modification des allergènes. Ainsi peuvent être étudiés les effets de la matrice alimentaires et de différents procédés de transformation (traitements thermiques ou chimique, hydrolyse dont digestion, fermentation, …) car en pratique, compte tenu de la très faible disponibilité des sérums de patients, des études faisant varier de multiples paramètres sont quasiment impossibles à réaliser uniquement avec des sérums. L'exemple du travail que nous avons mené sur le gluten désamidé en est l'illustration. Nous avons pu ainsi démontrer l'antigénicité particulière du gluten désamidé et le fort potentiel des néo-épitopes induit par la désamidation à provoquer la dégranulation des basophiles.

Plus généralement, l'allergie au gluten désamidé a montré que la transformation des aliments ou de leurs sous-produits afin d'améliorer la durabilité des productions agricoles ou d'augmenter leur valeur ajoutée peut provoquer de nouvelles allergies et leur potentiel allergénique doit être évalué. On peut supposer que les modifications entraînant des changements notables dans les séquences des protéines auront un impact plus important en termes de néo-allergénicité. Actuellement, il n'existe pas d'outils consensuels pour l'évaluation a priori des risques pour ce type de produits ou d'ingrédients.

Bien que difficiles à obtenir, les IgE chimériques souris/homme sont de précieux outils pour étudier l'activation des basophiles et apporter de nouvelles connaissances sur le répertoire IgE des patients. Il a ainsi été démontré le rôle essentiel des domaines répétés des gliadines dans l'anaphylaxie au blé induite par l'effort et dans l'allergie au gluten désamidé. La présence de plusieurs répétitions du même épitope sur ces allergènes conduit à une activation très efficace des cellules effectrices de l'allergie avec un répertoire très limité d'IgE. Ces résultats pourraient expliquer la gravité des symptômes de ces allergies. Dans notre modèle de γ et d'ω_2-gliadines désamidées, les nombreuses possibilités d'interactions de ces domaines répétés avec les IgE facilitent en effet la formation de complexes immuns comportant 3 ou 4 anticorps qui semblent indispensables à l'activation des basophiles.

Il serait maintenant particulièrement pertinent de poursuivre la production de ces réactifs dans le cadre du principal phénotype d'allergie au blé, l'allergie alimentaire à la farine de blé et de cibler plusieurs allergènes en cause dans les réactions IgE dépendantes. Dans cette allergie, ce sont les α-gliadines qui apparaissent comme des allergènes majeurs et des épitopes ont été identifiés à la fois dans leur domaine répété N-terminal et dans leur domaine non répété C-terminal (Mameri *et al.*,

2015). Il apparait de plus que chaque domaine pris séparément n'induit pas l'activation des basophiles et que seule la protéine entière garde cette capacité. Il semble que l'association des domaines répétés et non répétés créent des épitopes conformationnels indispensables à l'activité fonctionnelle. La LTP ou des ATI sont également des protéines dont l'activité fonctionnelle nécessite une conservation de leur structure 3D. Il serait donc intéressant de produire des IgE chimériques dirigées contre ces protéines bien plus structurées que les domaines répétés des gliadines. Plusieurs Ac chimériques contre chacun de ces allergènes devront être produits pour obtenir une activation des basophiles. La comparaison de différents modèles simplifiés allergène/ IgE chimériques permettrait peut-être de mieux cerner les répertoires des patients dans les différents phénotypes d'allergie au blé et d'apporter des connaissances sur les mécanismes moléculaires à l'origine de ces phénotypes.

Les protocoles d'immunothérapie reposent en partie sur l'hypothèse qu'ils génèrent des IgG bloquant les interactions des IgE avec les allergènes. La production d'IgG recombinantes humaines de spécificité connue permettrait d'explorer quels sont les épitopes à privilégier pour bloquer l'action des IgE et ainsi orienter les protocoles d'immunothérapie.

F. BIBLIOGRAPHIE

Aalberse, R. C., & Crameri, R. (2011). IgE-binding epitopes: a reappraisal. *Allergy*, *66*(10), 1261–1274. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02656.x

Aalberse, R.C. (1997). Food allergens. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *4*(1–2), 55–60. https://doi.org/10.1016/S1382-6689(97)10042-4

Aalberse, Rob C. (2000). Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *106*(2), 228–238. https://doi.org/10.1067/mai.2000.108434

Abès, R., Dutertre, C.-A., & Teillaud, J.-L. (2009). Les anticorps : mieux les connaître pour mieux s'en servir. *Médecine/Sciences*, *25*(12), 1011–1019. https://doi.org/10.1051/medsci/200925121011

Adachi, R., Nakamura, R., Sakai, S., Fukutomi, Y., & Teshima, R. (2012). Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. *Allergy*, *67*(11), 1392–1399. https://doi.org/10.1111/all.12018

Adel-Patient, K. (2016). Allergies alimentaires: mécanismes, biomarqueurs et impact de différents facteurs environnementaux. *Innovations Agronomiques*, *52*, 1–14. https://doi.org/10.15454/1.5133529105822612E12

Aitoro, R., Paparo, L., Amoroso, A., Di Costanzo, M., Cosenza, L., Granata, V., … Berni Canani, R. (2017). Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. *Nutrients*, *9*(7), 672. https://doi.org/10.3390/nu9070672

Altenbach, S. B., Chang, H.-C., Simon-Buss, A., Jang, Y.-R., Denery-Papini, S., Pineau, F., … Lee, J.-Y. (2018). Towards reducing the immunogenic potential of wheat flour: omega gliadins encoded by the D genome of hexaploid wheat may also harbor epitopes for the serious food allergy WDEIA. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 291. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1506-z

Altenbach, S. B., Tanaka, C. K., Pineau, F., Lupi, R., Drouet, M., Beaudouin, E., … Denery-Papini, S. (2015). Assessment of the Allergenic Potential of Transgenic Wheat (Triticum aestivum) with Reduced Levels of ω5-Gliadins, the Major Sensitizing Allergen in Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(42), 9323–9332. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03557

Altenbach, S. B., Vensel, W. H., & Dupont, F. M. (2011). The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Research Notes*, *4*(1), 242. https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-242

Ameille, J., Pauli, G., Calastreng-Crinquand, A., Vervloet, D., Iwatsubo, Y., Popin, E., … Professionnels, O. N. des A. (2003). Reported incidence of occupational asthma in France, 1996-99: the ONAP programme. *Occupational and Environmental Medicine*, *60*(2), 136–141. Retrieved from http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=12554842

Andrews, N. L., Pfeiffer, J. R., Martinez, a M., Haaland, D. M., Davis, R. W., Kawakami, T., … Lidke, D. S. (2009). Small, mobile FcepsilonRI receptor aggregates are signaling competent. *Immunity*, *31*(3), 469–479. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.026

Ansley, L., Bonini, M., Delgado, L., Del Giacco, S., Du Toit, G., Khaitov, M., … Robson-Ansley, P. J. (2015). Pathophysiological mechanisms of exercise-induced anaphylaxis: an EAACI position statement.

Allergy, *70*(10), 1212–1221. https://doi.org/10.1111/all.12677

Baar, A., Pahr, S., Constantin, C., Giavi, S., Papadopoulos, N. G., Pelkonen, a S., … Valenta, R. (2014). The high molecular weight glutenin subunit Bx7 allergen from wheat contains repetitive IgE epitopes. *Allergy*, *69*(10), 1316–1323. https://doi.org/10.1111/all.12464

Baar, A., Pahr, S., Constantin, C., Scheiblhofer, S., Thalhamer, J., Giavi, S., … Valenta, R. (2012). Molecular and Immunological Characterization of Tri a 36, a Low Molecular Weight Glutenin, as a Novel Major Wheat Food Allergen. *The Journal of Immunology*, *189*(6), 3018–3025. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200438

Bager, P., Wohlfahrt, J., & Westergaard, T. (2008). Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disesase: meta-analyses. *Clinical & Experimental Allergy*, *38*(4), 634–642. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x

Baird, E. J., Holowka, D., Coates, G. W., & Baird, B. (2003). Highly Effective Poly(Ethylene Glycol) Architectures for Specific Inhibition of Immune Receptor Activation †. *Biochemistry*, *42*(44), 12739–12748. https://doi.org/10.1021/bi034884l

Bakan, B., Hamberg, M., Perrocheau, L., Maume, D., Rogniaux, H., Tranquet, O., … Marion, D. (2006). Specific adduction of plant lipid transfer protein by an allene oxide generated by 9-lipoxygenase and allene oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(51), 38981–38988. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046828

Balakireva, A., & Zamyatnin, A. (2016). Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients*, *8*(10), 644. https://doi.org/10.3390/nu8100644

Ballegaard, A.-S. R., Madsen, C. B., & Bøgh, K. L. (2019). An Animal Model for Wheat Allergy Skin Sensitisation: A Comparative Study in Naive versus Tolerant Brown Norway Rats. *International Archives of Allergy and Immunology*, *178*(2), 106–118. https://doi.org/10.1159/000493802

Bannon, G. A. (2004). What makes a food protein an allergen? *Current Allergy and Asthma Reports*, *4*(1), 43–46. https://doi.org/10.1007/s11882-004-0042-0

Barg, W., Medrala, W., & Wolanczyk-Medrala, A. (2011). Exercise-Induced Anaphylaxis: An Update on Diagnosis and Treatment. *Current Allergy and Asthma Reports*, *11*(1), 45–51. https://doi.org/10.1007/s11882-010-0150-y

Barnett, J., Leftwich, J., Muncer, K., Grimshaw, K., Shepherd, R., Raats, M. M., … Lucas, J. S. (2011). How do peanut and nut-allergic consumers use information on the packaging to avoid allergens? *Allergy*, *66*(7), 969–978. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02563.x

Batey, I. L., & Gras, P. W. (1981). Solubilization of wheat gluten with sodium hydroxide. *International Journal of Food Science & Technology*, *16*(5), 561–566. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb01852.x

Battais, F, Mothes, T., Moneret-Vautrin, D. A., Pineau, F., Kanny, G., Popineau, Y., … Denery-Papini, S. (2005). Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy*, *60*(6), 815–821. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00795.x

Battais, Fabrice, Courcoux, P., Popineau, Y., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.-A., & Denery-Papini, S. (2005). Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *Journal of Cereal Science*, *42*(1), 109–117. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.01.004

Battais, Fabrice, Pineau, F., Popineau, Y., Aparicio, C., Kanny, G., Guerin, L., … Denery-Papini, S. (2003). Food allergy to wheat: identification of immunogloglin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical & Experimental Allergy*, *33*(7), 962–970. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01592.x

Battais, Fabrice, Richard, C., Szustakowski, G., Denery-Papini, S., Moneret-Vautrin, D. A., Leduc, V., & Guérin, L. (2006). Wheat flour allergy: an entire diagnostic tool for complex allergy. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *38*(2), 59–61. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16711538

Bean, S. R., & Lookhart, G. L. (2001). Factors Influencing the Characterization of Gluten Proteins by Size-Exclusion Chromatography and Multiangle Laser Light Scattering (SEC-MALLS). *Cereal Chemistry Journal*, *78*(5), 608–618. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.5.608

Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, *157*(1), 121–141. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011

Bellinghausen, I., Weigmann, B., Zevallos, V., Maxeiner, J., Reißig, S., Waisman, A., … Saloga, J. (2018). Wheat amylase-trypsin inhibitors exacerbate intestinal and airway allergic immune responses in humanized mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.041

Bencurova, M. (2004). Specificity of IgG and IgE antibodies against plant and insect glycoprotein glycans determined with artificial glycoforms of human transferrin. *Glycobiology*, *14*(5), 457–466. https://doi.org/10.1093/glycob/cwh058

Berin, M. C., & Sampson, H. A. (2013). Mucosal Immunology of Food Allergy. *Current Biology*, *23*(9), R389–R400. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.043

Beyer, K., Chung, D., Schulz, G., Mishoe, M., Niggemann, B., Wahn, U., & Sampson, H. A. (2008). The role of wheat ω-5 gliadin IgE antibodies as a diagnostic tool for wheat allergy in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(2), 419–421. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.006

Biesiekierski, J. R., Muir, J. G., & Gibson, P. R. (2013). Is gluten a cause of gastrointestinal symptoms in people without celiac disease? *Current Allergy and Asthma Reports*, *13*(6), 631–638. https://doi.org/10.1007/s11882-013-0386-4

Blank, U., & Vitte, J. (2015). Les médiateurs du mastocyte. *Revue Française d'Allergologie*, *55*(1), 31–38. https://doi.org/10.1016/j.reval.2014.10.002

Blom, W. M., Michelsen-Huisman, A. D., van Os-Medendorp, H., van Duijn, G., de Zeeuw-Brouwer, M., Versluis, A., … Houben, G. F. (2018). Accidental food allergy reactions: Products and undeclared ingredients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(3), 865–875. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.041

Bodinier, M., Brossard, C., Triballeau, S., Morisset, M., Guérin-Marchand, C., Pineau, F., … Denery-Papini, S. (2008). Evaluation of an in vitro Mast Cell Degranulation Test in the Context of Food Allergy to Wheat. *International Archives of Allergy and Immunology*, *146*(4), 307–320. https://doi.org/10.1159/000121465

Bøgh, K. L., & Madsen, C. B. (2016). Food Allergens: Is There a Correlation between Stability to Digestion and Allergenicity? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(9), 1545–1567. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779569

Borkowski, T. A., Eigenmann, P. A., Sicherer, S. H., Cohen, B. A., & Sampson, H. A. (1998). Prevalence

of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY*, *101*(1, 2), S241.

Bouchenak-Khelladi, Y., Salamin, N., Savolainen, V., Forest, F., Bank, M. van der, Chase, M. W., & Hodkinson, T. R. (2008). Large multi-gene phylogenetic trees of the grasses (Poaceae): Progress towards complete tribal and generic level sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *47*(2), 488–505. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.01.035

Bouchez-Mahiout, I., Pecquet, C., Kerre, S., Snégaroff, J., Raison-Peyron, N., & Laurière, M. (2010). High molecular weight entities in industrial wheat protein hydrolysates are immunoreactive with IgE from allergic patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4207–4215. https://doi.org/10.1021/jf903973x

Bouchez-Mahiout, I., Snégaroff, J., Tylichova, M., Pecquet, C., Branlard, G., & Laurière, M. (2010). Low Molecular Weight Glutenins in Wheat-Dependant, Exercise-Induced Anaphylaxis: Allergenicity and Antigenic Relationships with Omega 5-Gliadins. *International Archives of Allergy and Immunology*, *153*(1), 35–45. https://doi.org/10.1159/000301577

Boyce, W. F. (2010). Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(6), S1–S58. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.007

Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(1), 14–23. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.022

Brown, S. J., Asai, Y., Cordell, H. J., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., … McLean, W. H. I. (2011). Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(3), 661–667. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.031

Bucaite, G., Kang-Pettinger, T., Moreira, J., Gould, H. J., James, L. K., Sutton, B. J., & McDonnell, J. M. (2019). Interplay between Affinity and Valency in Effector Cell Degranulation: A Model System with Polcalcin Allergens and Human Patient–Derived IgE Antibodies. *The Journal of Immunology*, *203*(7), 1693–1700. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900509

Burks, A. W., Sampson, H. A., Plaut, M., Lack, G., & Akdis, C. A. (2018). Treatment for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.004

Burks, A. W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P. A., Ebisawa, M., … Sampson, H. A. (2012). ICON: Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *129*(4), 906–920. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.001

Capra, M. E., De Paulis, N. G., Montagni, M., Peveri, S., Savi, E., & Biasucci, G. (2017). An unusual case of wheat dependent exercise induced anaphylaxis (WDEIA) triggered by Tri a 14 in a pediatric patient: a case report. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *50*(04), 187. https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.31

Carter, C. A., & Frischmeyer-Guerrerio, P. A. (2018). The Genetics of Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, *18*(1), 2. https://doi.org/10.1007/s11882-018-0756-z

Castan, L., Villemin, C., Claude, M., Aubert, P., Durand, T., Neunlist, M., … Bouchaud, G. (2018). Acid-Hydrolyzed Gliadins Worsen Food Allergies through Early Sensitization. *Molecular Nutrition & Food Research*, *1800159*, 1800159. https://doi.org/10.1002/mnfr.201800159

Catassi, C., Alaedini, A., Bojarski, C., Bonaz, B., Bouma, G., Carroccio, A., … Sanders, D. (2017). The

Overlapping Area of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS) and Wheat-Sensitive Irritable Bowel Syndrome (IBS): An Update. *Nutrients*, *9*(11), 1268. https://doi.org/10.3390/nu9111268

Catassi, C., Bai, J. C., Bonaz, B., Bouma, G., Calabrò, A., Carroccio, A., … Fasano, A. (2013). Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients*, *5*(10), 3839–3853. https://doi.org/10.3390/nu5103839

Chinthrajah, R. S., Hernandez, J. D., Boyd, S. D., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *137*(4), 984–997. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.004

Chinuki, Y., Kaneko, S., Dekio, I., Takahashi, H., Tokuda, R., Nagao, M., … Morita, E. (2012). CD203c expression-based basophil activation test for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *129*(May), 1404–1406. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.049

Chinuki, Y., & Morita, E. (2012). Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Protein in Soap. *Allergology International*, *61*(4), 529–537. https://doi.org/10.2332/allergolint.12-RAI-0494

Christensen, L. H., Holm, J., Lund, G., Riise, E., & Lund, K. (2008). Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(2), 298–304. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.026

Christensen, L. H., Riise, E., Bang, L., Zhang, C., & Lund, K. (2010). Isoallergen variations contribute to the overall complexity of effector cell degranulation: effect mediated through differentiated IgE affinity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(9), 4966–4972. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904038

Christensen, M. J., Eller, E., Mortz, C. G., Brockow, K., & Bindslev-Jensen, C. (2018). Exercise Lowers Threshold and Increases Severity, but Wheat-Dependent, Exercise-Induced Anaphylaxis Can Be Elicited at Rest. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *6*(2), 514–520. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.12.023

Christensen, M. J., Stahl Skov, P., Poulsen, L. K., Bindslev-Jensen, C., & Mortz, C. G. (2017). Clinical relevance of sensitization to hydrolyzed wheat protein in wheat-sensitized subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.016

Cianferoni, A., & Muraro, A. (2012). Food-Induced Anaphylaxis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *32*(1), 165–195. https://doi.org/10.1016/j.iac.2011.10.002

Cianferoni, A., & Spergel, J. M. (2009). Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergology International*, *58*(4), 457–466. https://doi.org/10.2332/allergolint.09-RAI-0138

Collins, A. M., Basil, M., Nguyen, K., & Thelian, D. (1996). Rat basophil leukaemia (RBL) cells sensitized with low affinity IgE respond to high valency antigen. *Clinical & Experimental Allergy*, *26*(8), 964–970. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1996.tb00634.x

Custovic, A., Sonntag, H., Buchan, I. E., Belgrave, D., Simpson, A., & Prosperi, M. C. F. (2015). Evolution pathways of IgE responses to grass and mite allergens throughout childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(6), 1645-1652.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.041

Czaja-Bulsa, G., & Bulsa, M. (2014). The natural history of IgE mediated wheat allergy in children with dominant gastrointestinal symptoms. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, *10*(1), 12.

https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-12

Czaja-Bulsa, G., & Bulsa, M. (2017). What Do We Know Now about IgE-Mediated Wheat Allergy in Children? *Nutrients*, *9*(1), 35. https://doi.org/10.3390/nu9010035

Daëron, M. (2014). Cell biology. Signaling shifts in allergy responses. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6174), 982–983. https://doi.org/10.1126/science.1251425

Davies, D. R., & Cohen, G. H. (1996). Interactions of protein antigens with antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(1), 7–12. https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.7

Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., & Wrigley, C. W. (2006). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(2), 82–90. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.003

Delaunay, J., Hacard, F., Denery-Papini, S., Garnier, L., Bérard, F., Nicolas, J.-F., & Nosbaum, A. (2018). Occupational immediate contact allergy to hydrolysed wheat protein after cosmetic exposure. *Contact Dermatitis*, *78*(4), 291–292. https://doi.org/10.1111/cod.12929

Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 469–492. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101303

Dembo, M., & Goldstein, B. (1978). Theory of Equilibrium Binding of Symmetric Bivalent Haptens to Cell Surface Antibody: Application to Histamine Release from Basophils. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, *121*(1), 345–353. Retrieved from http://www.jimmunol.org/content/121/1/345

Denery-Papini, S., Bodinier, M., Larré, C., Brossard, C., Pineau, F., Triballeau, S., … Moneret-Vautrin, D.-A. (2012). Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy*, *67*(8), 1023–1032. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x

Denery-Papini, S., Bodinier, M., Pineau, F., Triballeau, S., Tranquet, O., Adel-Patient, K., … Kasarda, D. (2011). Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. *Clinical & Experimental Allergy*, *41*(10), 1478–1492. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03808.x

Dibbern, D. A., Palmer, G. W., Williams, P. B., Bock, S. A., & Dreskin, S. C. (2003). RBL cells expressing human FcεRI are a sensitive tool for exploring functional IgE–allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients. *Journal of Immunological Methods*, *274*(1–2), 37–45. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00369-1

Do, A. B., Khuda, S. E., & Sharma, G. M. (2018). Undeclared Food Allergens and Gluten in Commercial Food Products Analyzed by ELISA. *Journal of AOAC International*, *101*(1), 23–35. https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0384

Dodev, T. S., Karagiannis, P., Gilbert, A. E., Josephs, D. H., Bowen, H., James, L. K., … Beavil, A. J. (2014). A tool kit for rapid cloning and expression of recombinant antibodies. *Scientific Reports*, *4*, 5885. https://doi.org/10.1038/srep05885

Draudt, H. N., Whistler, R. L., Babel, F. J., & Reitz, H. (1965). Modification of Wheat Protein for Preparation of Milk-Like Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *13*(5), 407–410. https://doi.org/10.1021/jf60141a006

Du Toit, G., Katz, Y., Sasieni, P., Mesher, D., Maleki, S. J., Fisher, H. R., … Lack, G. (2008). Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(5), 984–991. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.08.039

Du Toit, G., Roberts, G., Sayre, P. H., Bahnson, H. T., Radulovic, S., Santos, A. F., … Lack, G. (2015). Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. *New England Journal of Medicine*, *372*(9), 803–813. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414850

Du, X., Zhao, J., Ma, X., Yin, H., Wang, H., Li, A., & Kong, L. (2015). Cloning and characterization of novel fast ω-gliadin genes in Triticum monococcum. *Journal of Genetics*, *94*(2), 323–327. https://doi.org/10.1007/s12041-015-0509-x

Dupont, F. M., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., & Altenbach, S. B. (2011). Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Science*, *9*(1), 10. https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-10

Ebo, D. G., Bridts, C. H., Hagendorens, M. M., Aerts, N. E., De Clerck, L. S., & Stevens, W. J. (2008). Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *74B*(4), 201–210. https://doi.org/10.1002/cyto.b.20419

Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, *7*(1), 9–14. https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042

Eggesbo, M., Botten, G., Stigum, H., Samuelsen, S. O., Brunekreef, B., & Magnus, P. (2005). Cesarean delivery and cow milk allergy/intolerance. *Allergy*, *60*(9), 1172–1173. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00857.x

Fewtrell, C., & Metzger, H. (1980). Larger oligomers of IgE are more effective than dimers in stimulating rat basophilic leukemia cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *125*(2), 701–710. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7391576

Flicker, S., Steinberger, P., Ball, T., Krauth, M., Verdino, P., Valent, P., … Valenta, R. (2006). Spatial clustering of the IgE epitopes on the major timothy grass pollen allergen Phl p 1: Importance for allergenic activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(6), 1336–1343. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.02.012

Flicker, S., Vrtala, S., Steinberger, P., Vangelista, L., Bufe, A., Petersen, A., … Valenta, R. (2000). A Human Monoclonal IgE Antibody Defines a Highly Allergenic Fragment of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 5: Molecular, Immunological, and Structural Characterization of the Epitope-Containing Domain. *The Journal of Immunology*, *165*(7), 3849–3859. https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3849

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases. *European Journal of Biochemistry*, *269*(2), 397–412. https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02656.x

Fukutomi, Y., Itagaki, Y., Taniguchi, M., Saito, A., Yasueda, H., Nakazawa, T., … Akiyama, K. (2011). Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(2), 531-533.e1-3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.035

Furtado, P. B., McElveen, J. E., Gough, L., Armour, K. L., Clark, M. R., Sewell, H. F., & Shakib, F. (2002). The production and characterisation of a chimaeric human IgE antibody, recognising the major mite allergen Der p 1, and its chimaeric human IgG1 anti-idiotype. *Molecular Pathology : MP*, *55*(5), 315–324. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1187264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, *18*(5), 693–704. https://doi.org/10.1038/nm.2755

Geha, R. S., Jabara, H. H., & Brodeur, S. R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Reviews Immunology*, *3*(9), 721–732. https://doi.org/10.1038/nri1181

Gerrard, J. W., Geddes, C. A., Reggin, P. L., Gerrard, C. D., & Horne, S. (1976). Serum IgE levels in white and metis communities in Saskatchewan. *Annals of Allergy*, *37*(2), 91–100. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/987744

Gieras, A., Focke-Tejkl, M., Ball, T., Verdino, P., Hartl, A., Thalhamer, J., & Valenta, R. (2007). Molecular determinants of allergen-induced effector cell degranulation. *J Allergy Clin Immunol*, *119*(2), 384–390. https://doi.org/S0091-6749(06)02009-4 [pii]\r10.1016/j.jaci.2006.09.034

Gieras, A., Linhart, B., Roux, K. H., Dutta, M., Khodoun, M., Zafred, D., … Valenta, R. (2015). IgE epitope proximity determines immune complex shape and effector cell activation capacity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.055

Goel, S., Rathore, M., Grewal, S., Jain, N., Singh, B. K., Ahlawat, A. K., … Singh, N. K. (2015). Effect of Allelic Variation in Triticin on Bread- and Chapati-Making Qualities of Wheat (Triticum aestivum). *Agricultural Research*, *4*(2), 139–151. https://doi.org/10.1007/s40003-015-0150-1

Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, *8*(3), 205–217. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nri2273

Gourbeyre, P., Denery-Papini, S., Larré, C., Gaudin, J.-C., Brossard, C., & Bodinier, M. (2012). Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(2), 336–344. https://doi.org/10.1002/mnfr.201100353

Greene, W. K., & Thomas, W. R. (1992). IgE binding structures of the major house dust mite allergen DER P I. *Molecular Immunology*, *29*(2), 257–262. https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90107-9

Guillon, B., Bernard, H., Drumare, M.-F., Hazebrouck, S., & Adel-Patient, K. (2016). Heat processing of peanut seed enhances the sensitization potential of the major peanut allergen Ara h 6. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(12), 2722–2735. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500923

Guo, G., Lv, D., Yan, X., Subburaj, S., Ge, P., Li, X., … Yan, Y. (2012). Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (Triticum aestivum L.). *BMC Plant Biology*, *12*(1), 147. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-147

Hamada, J. S., & Swanson, B. (1994). Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*(3), 283–292. https://doi.org/10.1080/10408399409527664

Handlogten, M. W., Deak, P. E., & Bilgicer, B. (2014). Two-Allergen Model Reveals Complex Relationship between IgE Crosslinking and Degranulation. *Chemistry & Biology*, *21*(11), 1445–1451. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.019

Handlogten, M. W., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2013). Design of a heterotetravalent synthetic allergen that reflects epitope heterogeneity and IgE antibody variability to study mast cell degranulation. *BIOCHEMICAL JOURNAL*, *449*(1), 91–99. https://doi.org/10.1042/BJ20121088

Handlogten, M. W., Kiziltepe, T., Serezani, A. P., Kaplan, M. H., & Bilgicer, B. (2013). Inhibition of weak-

affinity epitope-IgE interactions prevents mast cell degranulation. *Nature Chemical Biology*, *9*(12), 789–795. https://doi.org/10.1038/nchembio.1358

Hatzler, L., Panetta, V., Lau, S., Wagner, P., Bergmann, R. L., Illi, S., … Matricardi, P. M. (2012). Molecular spreading and predictive value of preclinical IgE response to Phleum pratense in children with hay fever. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(4), 894-901.e5. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.053

Hecker, J., Diethers, A., Schulz, D., Sabri, A., Plum, M., Michel, Y., … Spillner, E. (2012). An IgE epitope of Bet v 1 and fagales PR10 proteins as defined by a human monoclonal IgE. *Allergy*, *67*(12), n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/all.12045

Herman, R. A., Roper, J. M., & Zhang, J. X. Q. (2020). Evidence runs contrary to digestive stability predicting protein allergenicity. *Transgenic Research*, *29*(1), 105–107. https://doi.org/10.1007/s11248-019-00182-x

Heyman, M. and Desjeux, J. F. (1992). Significance of Intestinal Food Protein Transport. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *15*(1), 48–57.

Hiragun, M., Ishii, K., Hiragun, T., Shindo, H., Mihara, S., Matsuo, H., & Hide, M. (2013). The Sensitivity and Clinical Course of Patients with Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized to Hydrolyzed Wheat Protein in Facial Soap - Secondary Publication. *Allergology International*, *62*(3), 351–358. https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0553

Hiragun, M., Ishii, K., Yanase, Y., Hiragun, T., & Hide, M. (2016). Remission rate of patients with wheat allergy sensitized to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Allergology International*, *65*(1), 109–111. https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.07.004

Hischenhber, C., Crevel, R. W. R., Jarry, B., Maki, M., Moneret-Vautrin, D. A., Romano, A., … Ward, R. (2006). Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *23*(5), 559–575. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02768.x

Ho, H., & Bunyavanich, S. (2018). Role of the Microbiome in Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, *18*(4), 27. https://doi.org/10.1007/s11882-018-0780-z

Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Civaj, V., Balic, N., … Spitzauer, S. (2010). Visualization of clustered IgE epitopes on alpha-lactalbumin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(6), 1279-1285.e9. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.007

Hofer, G., Wieser, S., Bogdos, M. K., Gattinger, P., Nakamura, R., Ebisawa, M., … Keller, W. (2018). Three-dimensional structure of the wheat β-amylase Tri a 17, a clinically relevant food allergen. *Allergy*, 1–4. https://doi.org/10.1111/all.13696

Hoffmann, H. J., Santos, A. F., Mayorga, C., Nopp, A., Eberlein, B., Ferrer, M., … Knol, E. F. (2015). The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, *70*(11), 1393–1405. https://doi.org/10.1111/all.12698

Hofmann, S. C., Fischer, J., Eriksson, C., Bengtsson Gref, O., Biedermann, T., & Jakob, T. (2012). IgE detection to α/β/γ-gliadin and its clinical relevance in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy*, *67*(11), 1457–1460. https://doi.org/10.1111/all.12020

Holme, J., & Briggs, D. (1959). Studies on the physical nature of gliadin. *Cereal Chemistry*, *36*, 321–340.

Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions Between the Microbiota and the

Immune System. *Science*, *336*(6086), 1268–1273. https://doi.org/10.1126/science.1223490

Huber, M. (2013). Activation/Inhibition of mast cells by supra-optimal antigen concentrations. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 7. https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-7

Ishizaka, K., & Ishizaka, T. (1967). Identification of γ E-Antibodies as a Carrier of Reaginic Activity. *Journal of Immunology*, *99*(6), 1187.

Ishizaka, K., & Ishizaka, T. (1969). Immune mechanisms of reverse type reagenic hypersentsitivity. *J Immunol*, *103*(September), 588–595. Retrieved from http://www.jimmunol.org/content/103/3/588

Jacquenet, S., Morisset, M., Battais, F., Denery-Papini, S., Croizier, A., Baudouin, E., … Moneret-Vautrin, D. A. (2009). Interest of ImmunoCAP System to Recombinant ω-5 Gliadin for the Diagnosis of Exercise-Induced Wheat Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, *149*(1), 74–80. https://doi.org/10.1159/000176309

James, L. C., Roversi, P., & Tawfik, D. S. (2003). Antibody Multispecificity Mediated by Conformational Diversity. *Science*, *299*(5611), 1362–1367. https://doi.org/10.1126/science.1079731

James, L. C., & Tawfik, D. S. (2003). Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(7), 361–368. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00135-X

Jenkins, J. A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P. R., Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An in silico analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(1), 163–170. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.026

Jensen-Jarolim, E., & Pawelec, G. (2012). The nascent field of AllergoOncology. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *61*(9), 1355–1357. https://doi.org/10.1007/s00262-012-1315-4

Johansson, E. K., Bergström, A., Kull, I., Lind, T., Söderhäll, C., van Hage, M., … Wahlgren, C.-F. (2017). IgE sensitization in relation to preschool eczema and filaggrin mutation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(6), 1572-1579.e5. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.008

Johansson, S. G., & Bennich, H. (1967). Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, *13*(4), 381–394. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4168094%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1409218

Johansson, S. G. O., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., … Wüthrich, B. (2008). A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, *56*(9), 813–824. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2001.00002.x-i1

Jönsson, F., & Daëron, M. (2012). Mast cells and company. *Frontiers in Immunology*, *3*(February), 16. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00016

Josephs, D. H., Spicer, J. F., Karagiannis, P., Gould, H. J., & Karagiannis, S. N. (2014). IgE immunotherapy. *MAbs*, *6*(1), 54–72. https://doi.org/10.4161/mabs.27029

Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S.-J., Barisani, D., Wieser, H., Leffler, D. a, … Schuppan, D. (2012). Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(13), 2395–2408. https://doi.org/10.1084/jem.20102660

Kanerva, P. M., Brinck, O., Sontag-Strohm, T. S., Salovaara, H. O., & Loponen, J. (2011). Deamidation of gluten proteins and peptides decreases the antibody affinity in gluten analysis assays. *Journal of Cereal Science*, *53*(3), 335–339. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.02.003

Kasarda, D. D., Adalsteins, E., Lew, E. J.-L., Lazo, G. R., & Altenbach, S. B. (2013). Farinin: Characterization of a Novel Wheat Endosperm Protein Belonging to the Prolamin Superfamily. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(10), 2407–2417. https://doi.org/10.1021/jf3053466

Katz, Y., Rajuan, N., Goldberg, M. R., Eisenberg, E., Heyman, E., Cohen, A., & Leshno, M. (2010). Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(1), 77-82.e1. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.04.020

Kawamoto, N., Kamemura, N., Kido, H., & Fukao, T. (2017). Detection of ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants and its relationship to eczema. *Pediatric Allergy and Immunology*, *28*(4), 355–361. https://doi.org/10.1111/pai.12702

Keet, C. A., Matsui, E. C., Dhillon, G., Lenehan, P., Paterakis, M., & Wood, R. A. (2009). The natural history of wheat allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *102*(5), 410–415. https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60513-3

Kelleher, M. M., Dunn-Galvin, A., Gray, C., Murray, D. M., Kiely, M., Kenny, L., … Hourihane, J. O. B. (2016). Skin barrier impairment at birth predicts food allergy at 2 years of age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *137*(4), 1111-1116.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1312

Khuda, S., Slate, A., Pereira, M., Al-Taher, F., Jackson, L., Diaz-Amigo, C., … Williams, K. M. (2012). Effect of Processing on Recovery and Variability Associated with Immunochemical Analytical Methods for Multiple Allergens in a Single Matrix: Sugar Cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(17), 4195–4203. https://doi.org/10.1021/jf3001839

Klein Entink, R. H., Remington, B. C., Blom, W. M., Rubingh, C. M., Kruizinga, A. G., Baumert, J. L., … Houben, G. F. (2014). Food allergy population thresholds: An evaluation of the number of oral food challenges and dosing schemes on the accuracy of threshold dose distribution modeling. *Food and Chemical Toxicology*, *70*, 134–143. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.001

Knipping, K., Simons, P. J., Buelens-Sleumer, L. S., Cox, L., den Hartog, M., de Jong, N., … Knippels, L. M. J. (2014). Development of β-Lactoglobulin-Specific Chimeric Human IgEκ Monoclonal Antibodies for In Vitro Safety Assessment of Whey Hydrolysates. *PLoS ONE*, *9*(8), e106025. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106025

Knol, E. F. (2006). Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and basophils. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*(7), 620–624. https://doi.org/10.1002/mnfr.200500272

Koehler, Peter, Wieser, H., & Konitzer, K. (2014). Gluten—The Precipitating Factor. In *Celiac Disease and Gluten* (pp. 97–148). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420220-7.00002-X

Koplin, J., Allen, K., Gurrin, L., Peters, R., Lowe, A., Tang, M., … Team, H. S. (2013). 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*, *10*(11), 5364–5377. https://doi.org/10.3390/ijerph10115364

Koplin, J. J., Dharmage, S. C., Ponsonby, A.-L., Tang, M. L. K., Lowe, A. J., Gurrin, L. C., … Allen, K. J. (2012). Environmental and demographic risk factors for egg allergy in a population-based study of infants. *Allergy*, *67*(11), 1415–1422. https://doi.org/10.1111/all.12015

Koplin, Jennifer J., Osborne, N. J., Wake, M., Martin, P. E., Gurrin, L. C., Robinson, M. N., … Miles, L. (2010). Can early introduction of egg prevent egg allergy in infants? A population-based study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(4), 807–813. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.028

Kotaniemi-Syrjänen, A., Palosuo, K., Jartti, T., Kuitunen, M., Pelkonen, A. S., & Mäkelä, M. J. (2010). The prognosis of wheat hypersensitivity in children. *Pediatric Allergy and Immunology*, *21*(2p2), e421–e428. https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2009.00946.x

Kouidri, A., Whitford, R., Suchecki, R., Kalashyan, E., & Baumann, U. (2018). Genome-wide identification and analysis of non-specific Lipid Transfer Proteins in hexaploid wheat. *Scientific Reports*, *8*(1), 17087. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35375-7

Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Miflin, B. J., & Shewry, P. R. (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology*, *183*(3), 499–502. https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90017-8

Kroghsbo, S., Andersen, N. B., Rasmussen, T. F., Jacobsen, S., & Madsen, C. B. (2014). Acid Hydrolysis of Wheat Gluten Induces Formation of New Epitopes but Does Not Enhance Sensitizing Capacity by the Oral Route: A Study in "Gluten Free" Brown Norway Rats. *PLoS ONE*, *9*(9), e107137. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107137

Kulis, M. D., Patil, S. U., Wambre, E., & Vickery, B. P. (2018). Immune mechanisms of oral immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(2), 491–498. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.979

Kulis, M., Wright, B. L., Jones, S. M., & Burks, A. W. (2015). Diagnosis, Management, and Investigational Therapies for Food Allergies. *Gastroenterology*, *148*(6), 1132–1142. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.034

Kulmala, P., Pelkonen, A. S., Kuitunen, M., Paassilta, M., Remes, S., Schultz, R., … Mäkelä, M. J. (2018). Wheat oral immunotherapy was moderately successful but was associated with very frequent adverse events in children aged 6-18 years. *Acta Paediatrica*, *107*(5), 861–870. https://doi.org/10.1111/apa.14226

Kumagai, H., Norimatsu, Y., Hashizume, N., Sakurai, H., & Kumagai, H. (2001). Deamidation of Wheat-flour Gliadin with Ion-exchange Resin. *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI*, *48*(12), 884–890. https://doi.org/10.3136/nskkk.48.884

Lack, G., Fox, D., Northstone, K., & Golding, J. (2003). Factors Associated with the Development of Peanut Allergy in Childhood. *New England Journal of Medicine*, *348*(11), 977–985. https://doi.org/10.1056/NEJMoa013536

Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2017). The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nature Immunology*, *18*(10), 1076–1083. https://doi.org/10.1038/ni.3829

Larré, C., Chiarello, M., Blanloeil, Y., Chenu, M., & Gueguen, J. (1993). Gliadin Modifications Catalized By Guinea Pig Liver Transglutaminase. *Journal of Food Biochemistry*, *17*(4), 267–282. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1993.tb00472.x

Lauener, R., Eigenmann, P. A., Wassenberg, J., Jung, A., Denery-Papini, S., Sjölander, S., … Nutten, S. (2017). Oral Immunotherapy With Partially Hydrolyzed Wheat-Based Cereals: A Pilot Study. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*, *11*, 117955651773001. https://doi.org/10.1177/1179556517730018

Lauriere, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiout, I., Snegaroff, J., Bayrou, O., Raison-Peyron, N., … Vigan, M. (2006). Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis*, *54*(5), 283–289. https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2006.00830.x

Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F., & Green, P. H. R. (2015). Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*, *60*(4), h4347. https://doi.org/10.1136/bmj.h4347

Leduc, V, Moneret-Vautrin, D. A., Guerin, L., Morisset, M., & Kanny, G. (2003). Anaphylaxis to wheat isolates : *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(4), 897–899. https://doi.org/10.1067/mai.2003.1345

Leduc, Virginie, Moneret-Vautrin, D.-A., Guerin, L., Morisset, M., & Kanny, G. (2003). Anaphylaxis to wheat isolates: Immunochemical study of a case proved by means of double-blind, placebo-controlled food challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(4), 897–899. https://doi.org/10.1067/mai.2003.1345

Liao, L., Zhao, M., Ren, J., Zhao, H., Cui, C., & Hu, X. (2009). Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(3), n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/jsfa.3830

Liu, F., Bohn, J. W., Ferry, E. L., Yamamoto, H., Molinaro, C. A., Sherman, L. A., … Katz, D. H. (1980). Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody : preparation , isolation , and characterization. *J Immunol*, *124*, 2728–2737.

Lollier, V., Denery-Papini, S., Brossard, C., & Tessier, D. (2014). Meta-analysis of IgE-binding allergen epitopes. *Clinical Immunology*, *153*(1), 31–39. https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.03.010

Longo, G., Berti, I., Burks, A. W., Krauss, B., & Barbi, E. (2013). IgE-mediated food allergy in children. *The Lancet*, *382*(9905), 1656–1664. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60309-8

López-Torrejón, G., Díaz-Perales, A., Rodríguez, J., Sánchez-Monge, R., Crespo, J. F., Salcedo, G., & Pacios, L. F. (2007). An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(6), 1481–1488. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.02.004

Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., … Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, *62*(1), 43–52. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301346

Lund, G., Willumsen, N., Holm, J., Christensen, L. H., Wurtzen, P. A., & Lund, K. (2012). Antibody repertoire complexity and effector cell biology determined by assays for IgE-mediated basophil and T-cell activation. *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, *383*(1–2, SI), 4–20. https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.021

Lupi, R., Denery-Papini, S., Claude, M., Tranquet, O., Drouet, M., Masci, S., & Larré, C. (2019). Thermal treatment reduces gliadin recognition by IgE, but a subsequent digestion and epithelial crossing permits recovery. *Food Research International*, *118*(February), 22–31. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.011

MacGlashan, D. W. (2013). Basophil activation testing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(4), 777–787. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.038

Madsen, C. B., & Bøgh, K. L. (2020). Gluten tolerance prevents oral sensitization with enzymatic or acid hydrolyzed gluten: A study in Brown Norway rats. *PLOS ONE*, *15*(4), e0231139.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231139

Mahajan, A., Barua, D., Cutler, P., Lidke, D. S., Espinoza, F. A., Pehlke, C., … Wilson, B. S. (2014). Optimal Aggregation of FcεRI with a Structurally Defined Trivalent Ligand Overrides Negative Regulation Driven by Phosphatases. *ACS Chemical Biology*, *9*(7), 1508–1519. https://doi.org/10.1021/cb500134t

Mahajan, A., Youssef, L. A., Cleyrat, C., Grattan, R., Lucero, S. R., Mattison, C. P., … Wilson, B. S. (2017). Allergen Valency, Dose, and FcεRI Occupancy Set Thresholds for Secretory Responses to Pen a 1 and Motivate Design of Hypoallergens. *The Journal of Immunology*, *198*(3), 1034–1046. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601334

Mäkelä, M. (2016). Wheat Allergy. In EAACI (Ed.), *EAACI Molecular Allergology User's Guide* (pp. 127–133). John Wiley & Sons, Inc.

Mäkelä, M. J., Eriksson, C., Kotaniemi-Syrjänen, A., Palosuo, K., Marsh, J., Borres, M., … Pelkonen, a S. (2014). Wheat allergy in children - new tools for diagnostics. *Clinical & Experimental Allergy*, *44*(11), 1420–1430. https://doi.org/10.1111/cea.12393

Mameri, H., Bouchez, I., Pecquet, C., Raison-Peyron, N., Choudat, D., Chabane, H., … Snégaroff, J. (2012). A Recombinant ω-Gliadin-like D-Type Glutenin and an α-Gliadin from Wheat (Triticum aestivum): Two Immunoglobulin E Binding Proteins, Useful for the Diagnosis of Wheat-Dependent Allergies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(32), 8059–8068. https://doi.org/10.1021/jf301992w

Mameri, H., Brossard, C., Gaudin, J., Gohon, Y., Paty, E., Beaudouin, E., … Denery-Papini, S. (2015). Structural Basis of IgE Binding to α- and γ-Gliadins: Contribution of Disulfide Bonds and Repetitive and Nonrepetitive Domains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(29), 6546–6554. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01922

Mameri, H., Denery-Papini, S., Pietri, M., Tranquet, O., Larré, C., Drouet, M., … Gaudin, J.-C. (2012). Molecular and immunological characterization of wheat Serpin (Tri a 33). *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(12), 1874–1883. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200244

Mameri, H., Snégaroff, J., Gohon, Y., Pecquet, C., Choudat, D., Raison-Peyron, N., … Briozzo, P. (2012). Immunoglobulin-E Reactivity and Structural Analysis of Wheat Low-Molecular-Weight Glutenin Subunits and Their Repetitive and Nonrepetitive Halves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(30), 7538–7547. https://doi.org/10.1021/jf3007568

Martin, P. E., Eckert, J. K., Koplin, J. J., Lowe, A. J., Gurrin, L. C., Dharmage, S. C., … Allen, K. J. (2015). Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort. *Clinical & Experimental Allergy*, *45*(1), 255–264. https://doi.org/10.1111/cea.12406

Masci, S., Egorov, T. A., Ronchi, C., Kuzmicky, D. D., Kasarda, D. D., & Lafiandra, D. (1999). Evidence for the Presence of Only One Cysteine Residue in the D-type Low Molecular Weight Subunits of Wheat Glutenin. *Journal of Cereal Science*, *29*(1), 17–25. https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0224

Masilamani, M., Commins, S., & Shreffler, W. (2012). Determinants of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *32*(1), 11–33. https://doi.org/10.1016/j.iac.2011.12.003

Matricardi, P. M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H. J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., … Ollert, M. (2016). EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, *27*, 1–250. https://doi.org/10.1111/pai.12563

Matsuo, H., Dahlström, J., Tanaka, A., Kohno, K., Takahashi, H., Furumura, M., & Morita, E. (2008).

Sensitivity and specificity of recombinant ω-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy*, *63*(2), 233–236. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01504.x

Matsuo, Hiroaki, Kohno, K., & Morita, E. (2005). Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS Journal*, *272*(17), 4431–4438. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04858.x

Matsuo, Hiroaki, Kohno, K., Niihara, H., & Morita, E. (2005). Specific IgE determination to epitope peptides of omega-5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(12), 8116–8122. https://doi.org/175/12/8116 [pii]

Matsuo, Hiroaki, Morita, E., Tatham, A. S., Morimoto, K., Horikawa, T., Osuna, H., … Dekio, S. (2004). Identification of the IgE-binding Epitope in ω-5 Gliadin, a Major Allergen in Wheat-dependent Exercise-induced Anaphylaxis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12135–12140. https://doi.org/10.1074/jbc.M311340200

Matsuo, Hiroaki, Yokooji, T., & Taogoshi, T. (2015). Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International*. https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.06.009

Matysiak-Budnik, T., Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Ménard, S., Candalh, C., … Heyman, M. (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(1), 143–154. https://doi.org/10.1084/jem.20071204

Mc Donald, C. E., & Pence, J. W. (1961). Wheat gliadin in foams for food products. *Food Technol., Champaign*, *15*, 141–144.

McCoy, K. D., Ignacio, A., & Geuking, M. B. (2018). Microbiota and Type 2 immune responses. *Current Opinion in Immunology*, *54*, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.009

Miller, L., Blank, U., Metzger, H., & Kinet, J. (1989). Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. *Science*, *244*(4902), 334–337. https://doi.org/10.1126/science.2523561

Mills, E. N. C., Jenkins, J. A., Alcocer, M. J. C., & Shewry, P. R. (2004). Structural, Biological, and Evolutionary Relationships of Plant Food Allergens Sensitizing via the Gastrointestinal Tract. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(5), 379–407. https://doi.org/10.1080/10408690490489224

Mita, H., Yasueda, H., & Akiyama, K. (2000). Affinity of IgE antibody to antigen influences allergen-induced histamine release. *Clinical & Experimental Allergy*, *30*(11), 1583–1589. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00921.x

Molberg, Ø., Mcadam, S. N., Körner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., … Sollid, L. M. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine*, *4*(6), 713–717. https://doi.org/10.1038/nm0698-713

Morita, E., Matsuo, H., Mihara, S., Morimoto, K., Savage, A. W. J., & Tatham, A. S. (2003). Fast ω-gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Dermatological Science*, *33*(2), 99–104. https://doi.org/10.1016/S0923-1811(03)00156-7

Naegeli, H., Birch, A. N., Casacuberta, J., De Schrijver, A., Gralak, M. A., Guerche, P., … Fernandez

Dumont, A. (2017). Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, *15*(6). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4862

Nakamura, M., Yagami, A., Hara, K., Sano-Nagai, A., Kobayashi, T., & Matsunaga, K. (2016). Evaluation of the cross-reactivity of antigens in Glupearl 19S and other hydrolysed wheat proteins in cosmetics. *Contact Dermatitis*, *74*(6), 346–352. https://doi.org/10.1111/cod.12551

Nakamura, M., Yagami, A., Hara, K., Sano, A., Kobayashi, T., Aihara, M., … Matsunaga, K. (2014). A New Reliable Method for Detecting Specific IgE Antibodies in the Patients with Immediate Type Wheat Allergy due to Hydrolyzed Wheat Protein: Correlation of Its Titer and Clinical Severity. *Allergology International*, *63*(2), 243–249. https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0618

Nakamura, R., Nakamura, R., Adachi, R., Itagaki, Y., Fukutomi, Y., & Teshima, R. (2013). Evaluation of Allergenicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in vitro Elicitation Test. *International Archives of Allergy and Immunology*, *160*(3), 259–264. https://doi.org/10.1159/000341671

Neuchrist, C., Kornfehl, J., Grasl, M., Lassmann, H., Kraft, D., Ehrenberger, K., & Scheiner, O. (1994). Distribution of Immunoglobulins in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *International Archives of Allergy and Immunology*, *104*(1), 97–100. https://doi.org/10.1159/000236714

Niggemann, B., & Beyer, K. (2014). Factors augmenting allergic reactions. *Allergy*, *69*(12), 1582–1587. https://doi.org/10.1111/all.12532

Nilsson, N., Sjölander, S., Baar, A., Berthold, M., Pahr, S., Vrtala, S., … Nilsson, C. (2015). Wheat allergy in children evaluated with challenge and IgE antibodies to wheat components. *Pediatric Allergy and Immunology*, *26*(2), 119–125. https://doi.org/10.1111/pai.12334

Noguchi, E., Akiyama, M., Yagami, A., Hirota, T., Okada, Y., Kato, Z., … Matsunaga, K. (2019). HLA-DQ and RBFOX1 as susceptibility genes for an outbreak of hydrolyzed wheat allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *144*(5), 1354–1363. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.06.034

Norderhaug, L., Olafsen, T., Michaelsen, T. E., & Sandlie, I. (1997). Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *Journal of Immunological Methods*, *204*(1), 77–87. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202712

Noti, M. (2018). New perspectives on the initiation of allergic immune responses at barrier sites. *Current Opinion in Immunology*, *54*, 130–136. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.07.001

Nowak-Węgrzyn, A., Wood, R. A., Nadeau, K. C., Pongracic, J. A., Henning, A. K., Lindblad, R. W., … Sampson, H. A. (2019). Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of vital wheat gluten oral immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*(2), 651-661.e9. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.041

Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., & Sheikh, A. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, *69*(8), 992–1007. https://doi.org/10.1111/all.12423

Oropeza, A. R., Bindslev-Jensen, C., Broesby-Olsen, S., Kristensen, T., Møller, M. B., Vestergaard, H., … Mortz, C. G. (2017). Patterns of anaphylaxis after diagnostic workup: A follow-up study of 226 patients with suspected anaphylaxis. *Allergy*, *72*(12), 1944–1952. https://doi.org/10.1111/all.13207

Osborne, N. J., Koplin, J. J., Martin, P. E., Gurrin, L. C., Thiele, L., Tang, M. L., … Allen, K. J. (2010). The HealthNuts population-based study of paediatric food allergy: validity, safety and acceptability.

Clinical & Experimental Allergy, *40*(10), 1516–1522. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03562.x

Osborne, Nicholas J, Koplin, J. J., Martin, P. E., Gurrin, L. C., Lowe, A. J., Matheson, M. C., … Allen, K. J. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY*, *127*(3), 668-U188. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.039

Osborne, T. (1907). *The proteins of the wheat kernel* (Carnegie I). Washington.

Östblom, E., Lilja, G., Pershagen, G., van Hage, M., & Wickman, M. (2008). Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clinical & Experimental Allergy*, *38*(8), 1325–1332. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03010.x

Oyoshi, M. K., Oettgen, H. C., Chatila, T. A., Geha, R. S., & Bryce, P. J. (2014). Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *133*(2), 309–317. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1045

Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, *5*(3), 232–239. https://doi.org/10.1038/mi.2012.4

Pahr, S., Selb, R., Weber, M., Focke-Tejkl, M., Hofer, G., Dordić, A., … Valenta, R. (2014). Biochemical, Biophysical and IgE-Epitope Characterization of the Wheat Food Allergen, Tri a 37. *PLoS ONE*, *9*(11), e111483. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111483

Palacin, A., Bartra, J., Muñoz, R., Diaz-Perales, A., Valero, A., & Salcedo, G. (2010). Anaphylaxis to Wheat Flour-Derived Foodstuffs and the Lipid Transfer Protein Syndrome: A Potential Role of Wheat Lipid Transfer Protein Tri a 14. *International Archives of Allergy and Immunology*, *152*(2), 178–183. https://doi.org/10.1159/000265539

Palmer, D. J., Sullivan, T. R., Gold, M. S., Prescott, S. L., & Makrides, M. (2017). Randomized controlled trial of early regular egg intake to prevent egg allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *139*(5), 1600-1607.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.052

Palosuo, K., Alenius, H., Varjonen, E., Kalkkinen, N., & Reunala, T. (2001). Rye gamma-70 and gamma-35 secalins and barley gamma-3 hordein cross-react with omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clinical & Experimental Allergy*, *31*(3), 466–473. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01023.x

Palosuo, Kati, Alenius, H., Varjonen, E., Koivuluhta, M., Mikkola, J., Keskinen, H., … Reunala, T. (1999). A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *103*(5), 912–917. https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70438-0

Palosuo, Kati, Varjonen, E., Kekki, O.-M., Klemola, T., Kalkkinen, N., Alenius, H., & Reunala, T. (2001). Wheat ω-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *108*(4), 634–638. https://doi.org/10.1067/mai.2001.118602

Panesar, S. S., Javad, S., de Silva, D., Nwaru, B. I., Hickstein, L., Muraro, A., … Sheikh, A. (2013). The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy*, *68*(11), 1353–1361. https://doi.org/10.1111/all.12272

Pastorello, E. A., Farioli, L., Conti, A., Pravettoni, V., Bonomi, S., Iametti, S., … Ortolani, C. (2007). Wheat IgE-Mediated Food Allergy in European Patients: α-Amylase Inhibitors, Lipid Transfer Proteins and Low-Molecular-Weight Glutenins. *International Archives of Allergy and Immunology*, *144*(1),

10–22. https://doi.org/10.1159/000102609

Patil, S. U., & Shreffler, W. G. (2012). Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. *Clinical & Experimental Immunology*, *167*(1), 59–66. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04503.x

Patil, Sarita U., Ogunniyi, A. O., Calatroni, A., Tadigotla, V. R., Ruiter, B., Ma, A., … Shreffler, W. G. (2015). Peanut oral immunotherapy transiently expands circulating Ara h 2–specific B cells with a homologous repertoire in unrelated subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(1), 125-134.e12. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.026

Pecquet, C., Lauriere, M., Huet, S., & Leynadier, F. (2002). Is the application of cosmetics containingprotein-derived products safe? *Contact Dermatitis*, *46*(2), 123–123. https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.460220.x

Perkin, M. R., Logan, K., Tseng, A., Raji, B., Ayis, S., Peacock, J., … Lack, G. (2016). Randomized Trial of Introduction of Allergenic Foods in Breast-Fed Infants. *New England Journal of Medicine*, *374*(18), 1733–1743. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1514210

Pettersson, M. E., Koppelman, G. H., Flokstra-de Blok, B. M. J., Kollen, B. J., & Dubois, A. E. J. (2018). Prediction of the severity of allergic reactions to foods. *Allergy*, *73*(7), 1532–1540. https://doi.org/10.1111/all.13423

Popineau, Y., & Denery-Papini, S. (1996). Les protéines de réserve du grain de blé. In B. Godon (Ed.), *Protéines végétales* (LAVOISIER, pp. 120–172). Paris.

Posner, R. G., Geng, D., Haymore, S., Bogert, J., Pecht, I., Licht, A., & Savage, P. B. (2007a). Trivalent Antigens for Degranulation of Mast Cells. *Organic Letters*, *9*(18), 3551–3554. https://doi.org/10.1021/ol071175h

Posner, R. G., Geng, D., Haymore, S., Bogert, J., Pecht, I., Licht, A., & Savage, P. B. (2007b). Trivalent Antigens for Degranulation of Mast Cells. *Organic Letters*, *9*(18), 3551–3554. https://doi.org/10.1021/ol071175h

Posner, R. G., Paar, J. M., Licht, A., Pecht, I., Conrad, D. H., & Hlavacek, W. S. (2004). Interaction of a Monoclonal IgE-Specific Antibody with Cell-Surface IgE−FcεRI: Characterization of Equilibrium Binding and Secretory Response †. *Biochemistry*, *43*(35), 11352–11360. https://doi.org/10.1021/bi049686o

Posner, R. G., Savage, P. B., Peters, A. S., Macias, A., DelGado, J., Zwartz, G., … Hlavacek, W. S. (2002). A quantitative approach for studying IgE–FcεRI aggregation. *Molecular Immunology*, *38*(16–18), 1221–1228. https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00067-6

Prescott, S., & Allen, K. J. (2011). Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatric Allergy and Immunology*, *22*(2), 155–160. https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01145.x

Prescott, S. L., Pawankar, R., Allen, K. J., Campbell, D. E., Sinn, J. K., Fiocchi, A., … Lee, B.-W. (2013). A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *The World Allergy Organization Journal*, *6*(1), 21. https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-21

Pulendran, B., Tang, H., & Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology*, *11*(8), 647–655. https://doi.org/10.1038/ni.1894

Quirce, S., & Diaz-Perales, A. (2013). Diagnosis and management of grain-induced asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, *5*(6), 348–356. https://doi.org/10.4168/aair.2013.5.6.348

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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(4), 847-852.e7. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.025

Remington, B. C., Baumert, J. L., Marx, D. B., & Taylor, S. L. (2013). Quantitative risk assessment of foods containing peanut advisory labeling. *Food and Chemical Toxicology*, *62*, 179–187. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.030

Renaudin, J.-M., Beaumont, P., Sabouraud, D., Dumond, P., Liabeuf, V., Tscheiller, S., & Drouet, M. (2017). Anaphylaxie alimentaire sévère : données recueillies par le Réseau d'Allergo-Vigilance ® (2002–2017) et allergènes émergents. *Revue Française d'Allergologie*, *57*(7), e3–e7. https://doi.org/10.1016/j.reval.2017.10.005

Robson-Ansley, P., & Du Toit, G. (2010). Pathophysiology, diagnosis and management of exercise-induced anaphylaxis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *10*(4), 312–317. https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32833b9bb0

Rodríguez Del Río, P., Díaz-Perales, A., Sanchez-García, S., Escudero, C., do Santos, P., Catarino, M., & Ibañez, M. D. (2014). Oral immunotherapy in children with IgE-mediated wheat allergy: Outcome and molecular changes. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, *24*(4), 240–248.

Rudders, S. A., Arias, S. A., & Camargo, C. A. (2014). Trends in hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children, 2000-2009. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(4), 960-962.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.018

Ruiter, B., & Shreffler, W. G. (2012). Innate immunostimulatory properties of allergens and their relevance to food allergy. *Seminars in Immunopathology*, *34*(5), 617–632. https://doi.org/10.1007/s00281-012-0334-8

Rzychon, M., Brohée, M., Cordeiro, F., Haraszi, R., Ulberth, F., & O'Connor, G. (2017). The feasibility of harmonizing gluten ELISA measurements. *Food Chemistry*, *234*, 144–154. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.092

Salcedo, G., Quirce, S., & Diaz-Perales, A. (2011). Wheat allergens associated with Baker's asthma. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, *21*(2), 81–92; quiz 94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21462797

Salminen, T. A., Blomqvist, K., & Edqvist, J. (2016). Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*, *244*(5), 971–997. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2585-4

Sampson, H. A. (1985). 297 Persistence of food hypersensitivity (FH) in children with atopic dermatitis (AD). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *75*(1), 179. https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90432-4

Sanchez-Perez, J., Sanz, T., & Garcia-Diez, A. (2000). Allergic contact dermatitis from hydrolyzed wheat protein in cosmetic cream. *Contact Dermatitis*, *42*(6), 360.

Santos, A. F., Couto-Francico, N., Bécares, N., Kwok, M., Bahnson, H. T., & Lack, G. (2018). A novel human mast cell activation test for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.03.011

Santos, A. F., Douiri, A., Bécares, N., Wu, S.-Y., Stephens, A., Radulovic, S., … Lack, G. (2014). Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(3), 645–652. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.04.039

Santos, A. F., Du Toit, G., Douiri, A., Radulovic, S., Stephens, A., Turcanu, V., & Lack, G. (2015). Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(1), 179–186. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.001

Santos, A. F., & Lack, G. (2016). Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clinical and Translational Allergy*, *6*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s13601-016-0098-7

Sathe, S. K., & Sharma, G. M. (2009). Effects of food processing on food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(8), 970–978. https://doi.org/10.1002/mnfr.200800194

Sato, S., Utsunomiya, T., Imai, T., Yanagida, N., Asaumi, T., Ogura, K., … Ebisawa, M. (2015). Wheat oral immunotherapy for wheat-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(4), 1131-1133.e7. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.019

Savage, J., & Johns, C. B. (2015). Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *35*(1), 45–59. https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.09.004

Savage, J., Sicherer, S., & Wood, R. (2016). The Natural History of Food Allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *4*(2), 196–203. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.11.024

Scherf, K. A., Brockow, K., Biedermann, T., Koehler, P., & Wieser, H. (2016). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical & Experimental Allergy*, *46*(1), 10–20. https://doi.org/10.1111/cea.12640

Scherf, Katharina A., Catassi, C., Chirdo, F., Ciclitira, P. J., Feighery, C., Gianfrani, C., … Koehler, P. (2020). Recent Progress and Recommendations on Celiac Disease From the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. *Frontiers in Nutrition*, *7*(March), 29. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00029

Schramm, G., Bufe, A., Petersen, A., Haas, H., Merget, R., Schlaak, M., & Becker, W.-M. (2001). Discontinuous IgE-binding epitopes contain multiple continuous epitope regions: results of an epitope mapping on recombinant Hol l 5, a major allergen from velvet grass pollen. *Clinical & Experimental Allergy*, *31*(2), 331–341. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01049.x

Schussler, E., & Kattan, J. (2015). Allergen Component Testing in the Diagnosis of Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, *15*(9), 55. https://doi.org/10.1007/s11882-015-0554-9

Schweitzer-Stenner, R., Licht, A., Luescher, I., & Pecht, I. (1987). Oligomerization and ring closure of immunoglobulin E class antibodies by divalent haptens. *Biochemistry*, *26*(12), 3602–3612. https://doi.org/10.1021/bi00386a053

Schweitzer-Stenner, R., Licht, A., & Pecht, I. (1992). Dimerization kinetics of the IgE-class antibodies by divalent haptens. II. The interactions between intact IgE and haptens. *Biophysical Journal*, *63*(2), 563–568. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81610-7

Schweitzer-Stenner, Reinhard, & Pecht, I. (1999). Parameters determining the stimulatory capacity of the type I Fcε-receptor. *Immunology Letters*, *68*(1), 59–69. https://doi.org/10.1016/S0165-2478(99)00031-0

Scibilia, J, Rossi, C., Losappio, L., Mirone, C., Farioli, L., Pravettoni, V., & Pastorello, E. (2019). Wheat food allergy in adults has a favorable prognosis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, *29*(2), 1–26. https://doi.org/10.18176/jiaci.0296

Scibilia, Joseph, Pastorello, E. A., Zisa, G., Ottolenghi, A., Bindslev-Jensen, C., Pravettoni, V., … Ortolani, C. (2006). Wheat allergy: A double-blind, placebo-controlled study in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(2), 433–439. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.10.014

Seagrave, J., Pfeiffer, J. R., Wofsy, C., & Oliver, J. M. (1991). Relationship of IgE receptor topography to secretion in RBL-2H3 mast cells. *Journal of Cellular Physiology*, *148*(1), 139–151. https://doi.org/10.1002/jcp.1041480117

Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., … Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, *297*(5590), 2275–2279. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12351792

Sharma, G. M., Khuda, S. E., Parker, C. H., Eischeid, A. C., & Pereira, M. (2016). Detection of Allergen Markers in Food: Analytical Methods. In *Food Safety* (pp. 65–121). https://doi.org/10.1002/9781119160588.ch4

Shreffler, W. G., Castro, R. R., Kucuk, Z. Y., Charlop-Powers, Z., Grishina, G., Yoo, S., … Sampson, H. A. (2006). The Major Glycoprotein Allergen from Arachis hypogaea, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant In Vitro. *The Journal of Immunology*, *177*(6), 3677–3685. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3677

Shreffler, Wayne G., Beyer, K., Chu, T.-H. T., Burks, A. W., & Sampson, H. A. (2004). Microarray immunoassay: Association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *113*(4), 776–782. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.588

Sicherer, S. H., Furlong, T. J., Maes, H. H., Desnick, R. J., Sampson, H. A., & Gelb, B. D. (2000). Genetics of peanut allergy: A twin study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *106*(1), 53–56. https://doi.org/10.1067/mai.2000.108105

Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S116–S125. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028

Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2018). Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(1), 41–58. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003

Sievers, S., Rawel, H. M., Ringel, K. P., Niggemann, B., & Beyer, K. (2016). Wheat protein recognition pattern in tolerant and allergic children. *Pediatric Allergy and Immunology*, *27*(2), 147–155. https://doi.org/10.1111/pai.12502

Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., … Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *16*(6), 823-836.e2. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037

Smith, F., Pan, X., Bellido, V., Toole, G. A., Gates, F. K., Wickham, M. S. J., … Mills, E. N. C. (2015). Digestibility of gluten proteins is reduced by baking and enhanced by starch digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(10), 2034–2043. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500262

Soares-Weiser, K., Takwoingi, Y., Panesar, S. S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., … Sheikh, A. (2014). The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, *69*(1), 76–86. https://doi.org/10.1111/all.12333

Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, *299*(6710), 1259–1260.

https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259

Strachan, D., Sibbald, B., Weiland, S., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, H. R., … Williams, H. (1997). Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatric Allergy and Immunology*, *8*(4), 161–168. https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.1997.tb00156.x

Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J.-C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M., … Haertle, T. (2009). Effects of Heating and Glycation of β-Lactoglobulin on Its Recognition by IgE of Sera from Cow Milk Allergy Patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(11), 4974–4982. https://doi.org/10.1021/jf804038t

Takagi, K., Nakamura, R., Teshima, R., & Sawada, J. (2003). Application of Human FcεRI α-Chain-Transfected RBL-2H3 Cells for Estimation of Active Serum IgE. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *26*(2), 252–255. https://doi.org/10.1248/bpb.26.252

Takahashi, H., Matsuo, H., Chinuki, Y., Kohno, K., Tanaka, A., Maruyama, N., & Morita, E. (2012). Recombinant high molecular weight-glutenin subunit-specific IgE detection is useful in identifying wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis complementary to recombinant omega-5 gliadin-specific IgE test. *Clinical & Experimental Allergy*, *42*(8), 1293–1298. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04039.x

Tamang, J. P., Thapa, N., Tamang, B., Rai, A., & Chettri, R. (2015). Microorganisms in Fermented Foods and Beverages. In J. P. Tamang (Ed.), *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages* (p. 1). Retrieved from https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780429168345

Tan, H.-T. T., Ellis, J. A., Koplin, J. J., Matheson, M. C., Gurrin, L. C., Lowe, A. J., … Allen, K. J. (2012). Filaggrin loss-of-function mutations do not predict food allergy over and above the risk of food sensitization among infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(5), 1211-1213.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.022

Tang, M. L. K., & Mullins, R. J. (2017). Food allergy: is prevalence increasing? *Internal Medicine Journal*, *47*(3), 256–261. https://doi.org/10.1111/imj.13362

Tatham, A.S., Masson, P., & Popineau, Y. (1990). Conformational studies of peptides derived by the enzymic hydrolysis of a gamma-type gliadin. *Journal of Cereal Science*, *11*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80177-X

Tatham, A S, & Shewry, P. R. (1985). The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of a-, b-, g- and w-gliadins. *J. Cereal Sci.*, *3*, 103–113.

Tatham, A S, & Shewry, P. R. (2008). Allergy to wheat and related cereals. *Clinical & Experimental Allergy*, *38*(11), 1712–1726. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x

Tatham, Arthur S, & Shewry, P. R. (2012). The S-poor prolamins of wheat , barley and rye : Revisited. *Journal of Cereal Science*, *55*(2), 79–99. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.013

Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruizinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W. R., Brooke-Taylor, S., … Houben, G. F. (2014). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: report of the VITAL Expert Panel. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *63*, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.032

Taylor, S. L., Moneret-Vautrin, D.-A., Crevel, R. W. R., Sheffield, D., Morisset, M., Dumont, P., … Baumert, J. L. (2010). Threshold dose for peanut: Risk characterization based upon diagnostic oral

challenge of a series of 286 peanut-allergic individuals. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *48*(3), 814–819. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.013

Teshima, R. (2014). Food Allergen in Cosmetics. *YAKUGAKU ZASSHI*, *134*(1), 33–38. https://doi.org/10.1248/yakushi.13-00209-2

Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, *474*(11), 1823–1836. https://doi.org/10.1042/BCJ20160510

Tokuda, R., Nagao, M., Hiraguchi, Y., Hosoki, K., Matsuda, T., Kouno, K., … Fujisawa, T. (2009). Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, *58*(September 2008), 193–199. https://doi.org/10.2332/allergolint.08-OA-0023

Tranquet, O., Echasserieau-Laporte, V., Larré, C., Pineau, F., Kanerva, P. M., Sontag-Strohm, T. S., & Denery-Papini, S. (2017). Complementarity of 3 Mabs directed against native and deamidated repeat motives of gliadins to evaluate the extent of gluten modification after chemical or enzymatic deamidation processes. In P. Koehler (Ed.), *Proceedings of the 31th Meeting of the WORKING GROUP on PROLAMIN ANALYSIS and TOXICITY*. Freising: Verlag Deutsche Forschungsanstal t für Lebensmittelchemie.

Tranquet, O., Gaudin, J., Patil, S., Steinbrecher, J., Matsunaga, K., Teshima, R., … Denery-Papini, S. (2017). A chimeric IgE that mimics IgE from patients allergic to acid-hydrolyzed wheat proteins is a novel tool for in vitro allergenicity assessment of functionalized glutens. *PLOS ONE*, *12*(11), e0187415. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187415

Tranquet, O., Larré, C., & Denery-Papini, S. (2012). Selection of a monoclonal antibody for detection of gliadins and glutenins: A step towards reliable gluten quantification. *Journal of Cereal Science*, *56*(3), 760–763. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.07.005

Tranquet, O., Larré, C., & Denery-Papini, S. (2020). Allergic reactions to hydrolysed wheat proteins: clinical aspects and molecular structures of the allergens involved. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(1), 147–156. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1516622

Tranquet, O., Lupi, R., Echasserieau-Laporte, V., Pietri, M., Larré, C., & Denery-Papini, S. (2015). Characterization of Antibodies and Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(22), 5403–5409. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00923

Tsai, H.-J., Kumar, R., Pongracic, J., Liu, X., Story, R., Yu, Y., … Wang, X. (2009). Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clinical & Experimental Allergy*, *39*(1), 101–109. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03111.x

Tundo, S., Lupi, R., Lafond, M., Giardina, T., Larré, C., Denery-Papini, S., … Masci, S. (2018). Wheat ATI CM3, CM16 and 0.28 Allergens Produced in Pichia Pastoris Display a Different Eliciting Potential in Food Allergy to Wheat ‡. *Plants*, *7*(4), 101. https://doi.org/10.3390/plants7040101

Van Regenmortel, M. H. V. (2014). Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition. *Journal of Molecular Recognition*, *27*(April), 627–639. https://doi.org/10.1002/jmr.2394

Vanga, S. K., Singh, A., & Raghavan, V. (2017). Review of conventional and novel food processing methods on food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(10), 2077–2094. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1045965

Varjonen, E., Petman, L., & Mäkinen-Kiljunen, S. (2000). Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy*, *55*(3), 294–296. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2000.00516.x

Venkataraman, D., Erlewyn-Lajeunesse, M., Kurukulaaratchy, R. J., Potter, S., Roberts, G., Matthews, S., & Arshad, S. H. (2018). Prevalence and longitudinal trends of food allergy during childhood and adolescence: Results of the Isle of Wight Birth Cohort study. *Clinical & Experimental Allergy*, *48*(4), 394–402. https://doi.org/10.1111/cea.13088

Venkataraman, Devasmitha, Soto-Ramírez, N., Kurukulaaratchy, R. J., Holloway, J. W., Karmaus, W., Ewart, S. L., … Erlewyn-Lajeunesse, M. (2014). Filaggrin loss-of-function mutations are associated with food allergy in childhood and adolescence. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(4), 876-882.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.033

Vensel, W. H., Tanaka, C. K., & Altenbach, S. B. (2014). Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteome Science*, *12*(1), 8. https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-8

Versluis, A., van Os-Medendorp, H., Kruizinga, A. G., Blom, W. M., Houben, G. F., & Knulst, A. C. (2016). Cofactors in allergic reactions to food: physical exercise and alcohol are the most important. *Immunity, Inflammation and Disease*, *4*(4), 392–400. https://doi.org/10.1002/iid3.120

Vickery, B. P., Scurlock, A. M., Jones, S. M., & Burks, A. W. (2012). Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *127*(3), 576. https://doi.org/S0091-6749(11)00056-X [pii]10.1016/j.jaci.2010.12.1116

Vogel, L., Luttkopf, D., Hatahet, L., Haustein, D., & Vieths, S. (2005). Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. *Allergy*, *60*(8), 1021–1028. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00803.x

Wang, J., Lin, J., Bardina, L., Goldis, M., Nowak-Węgrzyn, A., Shreffler, W. G., & Sampson, H. A. (2010). Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(3), 695-702.e6. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.017

Weichel, M., Vergoossen, N. J., Bonomi, S., Scibilia, J., Ortolani, C., Ballmer-Weber, B. K., … Crameri, R. (2005). Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*, *61*(1), 128–135. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.00999.x

Wiegand, T. W., Williams, P. B., Dreskin, S. C., Jouvin, M. H., Kinet, J. P., & Tasset, D. (1996). High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *157*(1), 221–230. https://doi.org/0022-1 767/96

Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, *24*(2), 115–119. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004

Wölbing, F., Fischer, J., Köberle, M., Kaesler, S., & Biedermann, T. (2013). About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy*, *68*(9), n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/all.12193

Wong, B. T., Zhai, J., Hoffmann, S. V., Aguilar, M.-I., Augustin, M., Wooster, T. J., & Day, L. (2012). Conformational changes to deamidated wheat gliadins and β-casein upon adsorption to oil–water emulsion interfaces. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 91–101. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.012

Worm, M., Moneret-Vautrin, A., Scherer, K., Lang, R., Fernandez-Rivas, M., Cardona, V., … Grabenhenrich, L. B. (2014). First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy*, *69*(10), 1397–1404. https://doi.org/10.1111/all.12475

Wu, C. H., Nakai, S., & Powrie, W. D. (1976). Preparation and properties of acid-solubilized gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *24*(3), 504–510. https://doi.org/10.1021/jf60205a057

Yagami, A., Aihara, M., Ikezawa, Z., Hide, M., Kishikawa, R., Morita, E., … Matsunaga, K. (2017). Outbreak of immediate-type hydrolyzed wheat protein allergy due to a facial soap in Japan. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(3), 879-881.e7. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.019

Yamaguchi, M., Lantz, C. S., Oettgen, H. C., Katona, I. M., Fleming, T., Miyajima, I., … Galli, S. J. (1997). IgE Enhances Mouse Mast Cell FcεRI Expression In Vitro and In Vivo: Evidence for a Novel Amplification Mechanism in IgE-dependent Reactions. *The Journal of Experimental Medicine*, *185*(4), 663–672. https://doi.org/10.1084/jem.185.4.663

Yokooji, T., Kurihara, S., Murakami, T., Chinuki, Y., Takahashi, H., Morita, E., … Matsuo, H. (2013). Characterization of Causative Allergens for Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Proteins in Facial Soap. *Allergology International*, *62*(4), 435–445. https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0561

Yokooji, T., Okamura, Y., Chinuki, Y., Morita, E., Harada, S., Hiragun, M., … Matsuo, H. (2015). Prevalences of specific IgE to wheat gliadin components in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergology International*, *64*(2), 206–208. https://doi.org/10.1016/j.alit.2014.11.003

Yong, Y. H., Yamaguchi, S., & Matsumura, Y. (2006). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(16), 6034–6040. https://doi.org/10.1021/jf060344u

Yu, W., Freeland, D. M. H., & Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, *16*(12), 751–765. https://doi.org/10.1038/nri.2016.111

Zapatero, L., Martinez, M. I., Alonso, E., Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Barber, D., & Lombardero, M. (2003). Oral wheat flour anaphylaxis related to wheat alpha-amylase inhibitor subunits CM3 and CM16. Wheat alpha-amylase inhibitor subunits related to food allergy. *Allergy*, *58*(9), 956–956. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00158.x

Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R. J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., … Keil, T. (2008). The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol.*, *121*(5), 1210-1218.e4. Epub 2008 Apr 18.

DOCTORAT ECOLOGIE
BRETAGNE GEOSCIENCES
LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Anticorps chimériques dirigés contre des séquences des domaines répétés des gliadines pour mimer la réactivité des IgE de patients allergiques au blé

Mots clés : Allergie au blé, Epitopes, IgE, anticorps chimériques, gliadines, domaines répétés

Résumé : Les symptômes des allergies IgE-dépendantes résultent de l'activation des basophiles et de mastocytes. Cette activation est provoquée par l'agrégation à la surface de ces cellules d'anticorps de type IgE par les allergènes. Les allergènes impliqués dans les formes les plus sévères d'allergie au blé, l'anaphylaxie induite par l'effort et l'allergie au gluten désamidé, sont très particuliers dans la mesure où ils contiennent des épitopes identiques répétés plusieurs fois. Dans cette thèse, nous avons obtenu et caractérisé des IgE monoclonales chimériques souris/homme dirigées contre les domaines répétés des gliadines, allergènes impliqués dans ces phénotypes sévères d'allergie au blé.

Grace à ces IgE chimériques monoclonales, nous avons exploré le rôle qu'avait ces répétitions sur le déclenchement des symptômes de l'allergie et leurs implications sur le répertoire IgE des patients.

Ces IgE chimériques ont démontré leur capacité à mimer la réactivité des IgE des patients. Elles ont par ailleurs révélé que l'organisation spatiale très particulière des épitopes permet l'activation des basophiles avec des IgE d'une seule spécificité dans ces deux types d'allergies au blé. Il apparait ainsi que le répertoire IgE des patients allergiques au blé peut être extrêmement restreint et tout de même provoquer des réactions sévères.

Title : Chimeric antibodies directed against sequences of the repeated domains of gliadins to mimic the IgE reactivity of wheat allergic patients

Keywords : Wheat allergy, Epitopes, IgE, Chimeric antibodies, gliadins, repeated domains

Abstract : The symptoms of IgE-dependent allergies result from the activation of basophils and mast cells. This activation is induced by the aggregation by allergens of IgE-type antibodies on the surface of these cells. The allergens involved in the more severe forms of wheat allergy, exercise-induced anaphylaxis and allergy to deamidated gluten, are very special in that they contain identical epitopes repeated several times. In this thesis, we obtained and characterized chimeric mouse/human monoclonal IgE antibodies directed against the repeated domains of gliadins, allergens involved in these severe wheat allergy phenotypes.

Using these chimeric monoclonal IgE, we explored the role of these repeats on the onset of allergy symptoms and their implications on the IgE repertoire of patients.

These chimeric IgE antibodies have been shown to mimic the reactivity of patients' IgE. They also revealed that the very particular spatial organization of the epitopes allows activation of basophils with IgE of a single specificity in these two types of wheat allergies. It thus appears that the IgE repertoire of patients with wheat allergy can be extremely restricted and still cause severe reactions.