



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Immunologie*

---

**Présentée et soutenue par** *Etienne BRUNET*  
**Le 6 mai 2013**  
*Salle du Conseil - Faculté de Pharmacie*

*Mise au point d'un procédé industriel de réduction de l'allergénicité de l'arachide*

---

### **JURY**

*M. Pr. Pascal Demoly*  
*Mme Dr. Caroline Strub*  
*M. Pr. Pierre Rougé*  
*Mme Pr. Annick Barre*

---

**Ecole doctorale :** *BSB*  
**Unité de recherche :** *UMR152 - Pharma-Dev (UPS-IRD)*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Pr. Annick Barre ; Pr. Pierre Rougé*



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Sabine GALINDO et Pascal DEMOLY d'avoir accepté de lire et de juger mon travail de thèse malgré leurs emplois du temps chargés, ainsi qu'à Dr. Caroline STRUB pour avoir accepté le rôle d'examinatrice dans mon jury de thèse.

Merci à Annick BARRE et Pierre ROUGE pour m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche, ainsi que pour la grande autonomie que j'ai pu mettre à profit dans l'exploration de pistes audacieuses. Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans la contribution de Fabienne RANCE, vers qui vont mes meilleures pensées avec le grand regret de l'avoir vu quitter ce monde trop tôt.

J'exprime toute ma reconnaissance à Nicolas CORMOULS-HOULES pour avoir pris le pari d'effectuer des recherches dans le domaine de l'arachide « allergen free », et tiens à remercier par la même occasion Vincent LE MOUEL pour son regard avisé sur les problématiques industrielles.

Le partenariat mis en place avec le LCA m'a permis d'effectuer les manips clés de ma recherche, et je tiens à ce propos à remercier Zéphirin MOULOUGUI et Eric LACROUX de bien avoir voulu m'accueillir ponctuellement au sein de leur laboratoire. Un grand merci à Alain JAUNEAU, Cécile POUZET et Aurélie LE RU de la plateforme de microscopie, et à Carole PICHEREAUX pour ses conseils en spectrométrie de masse.

Ma première année de thèse à l'UMR 5546, m'a permis d'appréhender le cœur de mon sujet de recherche, et je tiens à remercier tout particulièrement Gisèle BORDERIES et Raphaël CULERRIER pour leurs conseils avisés, ainsi que Sandra UHLENBROICH et Jean-Jacques BONO pour la bonne ambiance du bureau et pour leur excellent accueil.

Mes remerciements les plus chaleureux durant les deux années suivantes à l'UMR152 vont naturellement vers Stéphanie CAZE-SUBRA, qui a su m'accompagner dans mon travail et me guider dans les décisions scientifiques importantes. Un grand merci aussi à toute l'équipe POP: Camille, Jean-Philippe, Valérie, Clarisse, aux stagiaires Héléna, Marie, Fabien. Nous nous sommes serrés les coudes et sans votre présence, je n'aurais pas réussi à aller jusqu'au bout.

Mes remerciements personnels vont tout d'abord à ma famille : Papa, Maman, Juliette, Clément, Mathilde, Gaspard et Lou, ainsi qu'à mes grands-parents et mon arrière-grand-mère, Mémé, qui nous a quitté il y a peu.

Un merci tout particulier à D., qui partage ma vie depuis un an et qui a su me supporter dans les étapes finales de la thèse, me conseiller, me soutenir.

Un énorme merci à tous ceux qui m'accompagnent au quotidien ou plus ponctuellement, citer la liste serait trop long alors je vous laisse le loisir de vous y reconnaître !

# Avant-Propos

L'allergie à l'arachide est la première allergie alimentaire mondiale de par sa prévalence et la sévérité des symptômes cliniques constatés. Depuis quelques années, les études épidémiologiques ont mis en avant une augmentation du nombre de personnes concernées, faisant de l'allergie à l'arachide une problématique de santé publique.

Le groupe SOFICOR, avec ses 12 000 tonnes annuelles d'arachides mises sur le marché, jouit d'une grande expérience dans le domaine de la transformation de la cacahuète. De ce fait, les considérations allergologiques sont de première importance pour le développement de produits présentant une allergénicité réduite voire totalement supprimée. Le groupe SOFICOR, grâce à ce projet, se place au cœur de la problématique « allergie à l'arachide ».

Le travail de thèse a pour objectif de mettre au point un procédé non polluant capable d'éliminer des graines d'arachide la majorité des allergènes majeurs responsables des réactions anaphylactiques les plus sévères (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3).

Le sujet de la thèse se situe dans un cadre très prometteur, puisque l'entreprise SOFICOR traite annuellement 1/100ème de la production mondiale. La mise au point d'un procédé supprimant l'allergénicité de produits issus de la transformation de l'arachide et la commercialisation de ces dernières permettrait de proposer aux consommateurs des produits alimentaires (arachides, beurre d'arachide, produits dérivés) présentant un caractère hypoallergénique dont l'innocuité a été vérifiée.

Pour la société SOFICOR, la fabrication de produits hypoallergéniques permettrait de s'implanter sur les marchés européens et surtout américain. La garantie d'un aliment qui ne provoque pas de réaction allergique serait un facteur de consommation déterminant chez les ménages qui comptent en leur sein un patient allergique à l'arachide.



# **TABLE DES MATIERES**



<b>Introduction .....</b>	<b>23</b>
I. L'allergie Alimentaire .....	25
A. Historique et données actuelles .....	25
1. Historique.....	25
2. Données actuelles.....	25
B. Place de l'allergie à l'arachide .....	27
1. Une symptomatologie sévère .....	27
2. Un risque élevé pour le patient allergique .....	28
C. Mécanismes immunologiques et implication des molécules .....	29
1. Les IgE et leur récepteurs.....	30
a. Les Immunoglobulines E.....	30
b. Les récepteurs FcεRI et FcεRII .....	31
2. Phase de sensibilisation ou production d'IgE .....	33
3. Phase de déclenchement.....	33
1. Les cellules immunitaires impliquées dans la réaction allergique.....	34
a. Cellules présentatrices d'antigène .....	34
b. Les lymphocytes B et les plasmocytes .....	35
c. Les granulocytes .....	36
2. Balance Th1/Th2 chez le patient allergique.....	36
II. L'arachide comme aliment allergénique .....	39
A. Considérations botaniques .....	39
B. Les allergènes de l'arachide.....	40
1. Ara h 1.....	41
2. Ara h 2 et Ara h 6 .....	43
3. Ara h 3/4 .....	46
4. Autres allergènes .....	48
C. Les corps protéiques : organe de stockage des protéines de réserve .....	50
1. Biosynthèse et assemblage des protéines de réserve.....	51
2. L'aspect matriciel de l'arachide reliée à l'allergénicité.....	52
D. Arachide et Industrie alimentaire .....	53
1. Comme aliment ou additif .....	53
2. Influence des traitements industriels sur les propriétés des protéines .....	54
3. Les procédés thermiques.....	55
a. Réaction de Maillard – Chaleur sèche.....	56
b. Procédé thermique par voie humide .....	60

III. Réduction de l'allergénicité .....	60
A. Définition .....	60
B. Etat de l'art des recherches actuelles dans le domaine .....	61
1. Modifications physico-chimiques .....	61
2. Modifications génétiques et sélection de variants agronomiques.....	62
3. Méthodes biologiques .....	64
a. Utilisation d'enzymes .....	64
b. Fermentation par les microorganismes .....	66
i. Les champignons.....	67
(a) <i>Aspergillus oryzae</i> .....	67
(b) <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	68
ii. Les bactéries .....	70

<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>73</b>
-----------------------------------	-----------

I. Productions d'anticorps polyclonaux chez le lapin.....	75
A. Extraction et purification des protéines .....	75
1. Ara h 1 .....	75
a. Extraction .....	75
b. Purification sur colonne Concanavaline A.....	76
c. Elimination de la Concanavaline A résiduelle .....	76
2. Ara h 2 et Ara h 3 .....	77
a. Extraction .....	77
b. Purification .....	77
B. Caractérisation des protéines purifiées par spectrométrie de masse.....	79
1. Principe .....	79
2. Protocole.....	80
C. Immunisation des lapins .....	81
II. Location immunohistochimique des allergènes de l'arachide .....	81
A. Principe de la microscopie confocale à balayage laser.....	81
B. Préparation des échantillons .....	82
C. Expériences réalisées en microscopie confocale.....	83
III. Traitement des arachides par homogénéisation haute pression.....	84
A. Principe .....	84
B. Mise en œuvre du procédé.....	85
C. Analyse.....	86

## Table des matières

1. Analyse structurale .....	86
2. Analyse granulométrique.....	87
IV. Fermentation par les souches de champignons et bactéries .....	87
A. <i>Aspergillus oryzae</i> et <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	87
1. Mise en culture .....	87
2. Fermentation en milieu solide .....	88
a. Protocole de fermentation en boîte de pétri .....	88
b. Extraction des protéines .....	89
3. Fermentation liquide .....	89
a. Protocole de fermentation.....	89
b. Extraction des protéines .....	89
B. <i>Bacillus subtilis</i> .....	90
1. Mise en culture .....	90
2. Fermentation en milieu liquide .....	90
3. Dégradation par les protéases de <i>Bacillus subtilis</i> .....	90
4. Extraction des protéines .....	91
V. Analyse des fractions protéiques après fermentation .....	93
A. Dosage par la méthode de l'acide bicinchoninique.....	93
1. Principe .....	93
2. Protocole.....	94
B. Analyse électrophorétique en conditions dénaturantes.....	94
VI. Analyses immunologiques après fermentation .....	95
A. Western Blot .....	95
1. Principe .....	95
2. Protocole.....	96
B. ELISA.....	97
1. Principe .....	97
2. Protocole.....	97

<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>99</b>
--------------------------------------	-----------

Partie 1 : Outils d'analyse de la dégradation des allergènes .....	103
I. Purification des allergènes majeurs de l'arachide .....	103
A. Ara h 1.....	103
B. Ara h 2 et Ara h 3 .....	105
II. Caractérisation des protéines purifiées par spectrométrie de masse.....	107

III. Validation immunologique des anticorps de lapin .....	116
A. Spécificité immunologique .....	116
A. Mise au point du Western Blot.....	117
B. Mise au point de l'ELISA.....	119
I. Localisation des allergènes par immunohistochimie.....	119
<b>Partie 2 : Dégradation des allergènes .....</b>	<b>123</b>
I. La fermentation solide.....	123
A. Séparation Electrophorétique .....	124
B. Western Blot.....	128
C. ELISA.....	129
D. Conclusion.....	131
II. Les procédés technologiques de déstructuration .....	131
A. L'accessibilité des protéines .....	131
A. Procédé technologique comme solution technique.....	132
1. L'extrusion.....	132
1. L'homogénéisation ultra haute pression .....	135
III. La fermentation par les micro-organismes en milieu liquide .....	140
A. <i>Aspergillus oryzae</i> .....	140
1. Gel SDS PAGE .....	140
2. Western Blot.....	142
1. ELISA.....	143
1. Conclusion.....	146
B. <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	146
1. Gel SDS-PAGE.....	146
2. Western Blot.....	148
3. ELISA.....	150
4. Conclusion.....	152
C. <i>Bacillus subtilis</i> .....	153
1. Fermentation avec les micro-organismes.....	153
a. Gel SDS-PAGE .....	153
b. Western Blot.....	155
c. ELISA .....	156
d. Conclusion .....	159
2. Dégradation par les protéases.....	159
a. Gel SDS-PAGE .....	160

## Table des matières

---

b. Western Blot.....	161
c. Dosage ELISA .....	162
d. Conclusion .....	163

<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>165</b>
---	------------

<b>Bibliographie .....</b>	<b>171</b>
----------------------------	------------

<b>Brevet .....</b>	<b>183</b>
---------------------	------------



## LISTE DES ABBREVIATIONS

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Sulfate d'ammonium
ARN	Acide Ribonucléique
BCA	Acide bicinchoninique
BSA	Albumine sérique de bœuf
CASO	Bouillon caséine soja
cdNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Con A	Concanavoline A
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
Cu <sup>+</sup>	Ion cuivreux
Cu <sup>2+</sup>	Ion cuivrique
DTT	Dithiothréitol
EAST	Enzyme AllergoSorbent Test
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FR3450	Fédération de Recherche 3450
GRAS	Generally Recognized As Safe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HLA	human leukocyte antigen
HSA	Albumine sérique humaine
IFN- $\gamma$	Interféron $\gamma$
IgE	Immunoglobuline de classe E
IgG	Immunoglobuline de classe G
IL	Interleukine
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
IUIS	International Union of Immunological Societies
KCl	Chlorure de potassium

## Table des matières

---

kDa	kiloDalton
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Di-hydrogénophosphate de potassium
LRW	London Resin White
LT	Leucotriène
LTP	Protéine de Transfert de Lipides
MALDI-TOF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice - Temps de vol
$-\text{N}+(\text{CH}_3)_3$	Groupe triméthylamine
$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Cacodylate de sodium hydraté
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Hydrogénophosphate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium / Soude
OMS	Organisation Mondiale de la santé
PAF	Facteur activant des plaquettes
PBS	Phosphate Buffer Saline / Tampon Phosphate Salin
PDA	Potato Dextrose Agar
PES	Polyethersulfone
PGD2	Prostaglandine D2
PGI2	Analogue de la Prostaglandine PGD2
pI	Point isoélectrique
PNA	Peanut Agglutinin
PR-10	Plant pathogenesis-related protein
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
SDS	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate - Gel d'électrophorèse polyacrylamide
SOFICOR	Société Financière Cormouls-Houles
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultraviolet

# LISTE DES FIGURES

## Introduction

Figure 1 : Structure de l'IgE. ....	30
Figure 2 : Schéma d'un récepteur tétramérique $\alpha\beta\gamma_2$ Fc $\epsilon$ RI .....	32
Figure 3 : Schéma global de la réaction allergique. ....	35
Figure 4 : Dialogue moléculaire entre Th1 et Th2.....	37
Figure 5 : Influence des T <sub>reg</sub> sur la différenciation en Th2 .....	37
Figure 6 : Dessin botanique d'un plant d'arachide .....	39
Figure 7 : Champ planté d'arachides et récolte d'un pied d'arachide mature dans les Landes (Soustons, 2012) .....	40
Figure 8 : Modèle moléculaire de l'homotrimère d'Ara h 1 .....	42
Figure 9 : Surfaces moléculaire de l'albumine 2S Ara h 2 .....	44
Figure 10 : Comparaison des modèles moléculaires d'Ara h 2 (A) et Ara h 6 (B) .....	45
Figure 11 : Formation d'un pont lysino-alanyle (D'après Lorient, D. (2010)) .....	56
Figure 12 : Schéma général des réactions de Maillard (D'après Lorient, D. (2010)) .....	59
Figure 13 : Exemples de fermentations solides réalisées avec <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	69
Figure 14 : Soja fermenté avec <i>Bacillus subtilis</i> .....	70

## Matériel et Méthodes

Figure 15 : Courbe d'élution des protéines sur HiTrap Q FF 5 mL .....	78
Figure 16 : Protocole expérimental pour l'extraction des protéines après fermentation. ....	91
Figure 17 : Réaction chimique du dosage au BCA.....	94
Figure 18 : Principe de la technique ELISA directe.....	97

## Résultats et discussion

Figure 19 : Séparation des protéines de l'extrait brut par précipitation au (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	104
Figure 20 : Chromatogramme d'élution d'Ara h 1 sur colonne de Con A.....	104
Figure 21 : Gels SDS PAGE des fractions après passage sur colonnes Con A et PD-10.....	104
Figure 22 : Chromatogramme d'élution pour la purification sur HiTrap Q FF de 5 mL .....	106

Figure 23 : Profil électrophorétique sur gel SDS-PAGE des fractions H2 à H6 après purification sur HiTrap Q FF .....	106
Figure 24 : Profil électrophorétique sur gel SDS-PAGE des fractions I7 à I11 après purification sur HiTrap Q FF .....	106
Figure 25 : SPS-PAGE des protéines purifiées et numéros des spots analysés en spectrométrie MALDI-TOF .....	108
Figure 26 : Profil massique du digestat trypsique n°1 après analyse .....	108
Figure 28 : Alignement avec ClustalW des séquences «Allergen Ara h 3/4», « Storage Protein », «Arachin Ahy-4», «Crystal Structure of Peanut Major Allergen Ara h 3». .....	112
Figure 27 : Alignement avec ClustalW des séquences Ara h 2 et Ara h 6.....	112
Figure 29 : Alignement des séquences « Allergen Ara h 3/4 » et « Trypsin inhibitor ».....	113
Figure 30 : Courbe du titrage des séra de lapins G24101 et G24168 à J63 .....	118
Figure 31 : Courbe du titrage des séra de lapins G45117 et G45201 à J63 .....	118
Figure 32 : Courbe du titrage des séra de lapins G24123 et G24173 à J63 .....	118
Figure 33 : Western Blot des séra de lapin avec l'extrait brut d'arachide.....	120
Figure 34 : Western Blot du pool de séra de lapins avec l'extrait total d'arachide.....	120
Figure 35 : Courbes étalons des dosages ELISA des protéines d'arachide contre les différents séra anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3. ....	120
Figure 36 : Marquage immunofluorescent des allergènes par microscopie confocale.....	122
Figure 37 : Graphique de comparaison de composition du soja et de l'arachide. ....	125
Figure 38 : Gels SDS PAGE des extraits réalisés sur l'arachide fermentée avec <i>Aspergillus oryzae</i> en présence de maïs extrudé.....	126
Figure 39 : Western Blot des extraits d'arachide fermentée avec <i>Aspergillus oryzae</i> .....	127
Figure 40 : Dosages ELISA des extraits de fermentation solide avec <i>Aspergillus oryzae</i> .....	130
Figure 41 : Microscopie en fond clair de l'arachide non traitée et traitée par extrusion-cuisson .....	134
Figure 42 : SDS-PAGE des protéines d'arachide avant et après l'extrusion-cuisson .....	134
Figure 43 : Microscopie en fond clair de l'arachide avant et après passage dans l'homogénéisateur haute pression.....	136
Figure 44 : Analyse granulométrique de l'arachide avant et après passage dans l'homogénéisateur.....	136

Figure 45 : Schéma de la tête d'homogénéisation..... 137

Figure 46 : Analyse des protéines avant et après passage dans l'homogénéisateur haute pression..... 138

Figure 47 : Gels SDS PAGE des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *Aspergillus oryzae* ..... 141

Figure 48 : Western Blot des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *A. oryzae*..... 142

Figure 49 : Dosages ELISA des extraits de la fermentation liquide avec *A. oryzae*..... 144

Figure 50 : Gels SDS PAGE des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *R. oryzae* ..... 147

Figure 51 : Western Blot des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *Rhizopus oligosporus* ..... 149

Figure 52 : Dosages ELISA des extraits de la fermentation liquide avec *Rhizopus oligosporus* ..... 151

Figure 53 : Gel SDS-PAGE des extraits après fermentation par les bactéries *Bacillus subtilis* ..... 154

Figure 54 : Western Blot des extraits après fermentation par les bactéries *Bacillus subtilis* 156

Figure 55 : Dosages ELISA des extraits de la fermentation liquide avec *Bacillus subtilis* ..... 157

Figure 56 : Gel SDS-PAGE des protéines d'arachide après dégradation par les protéases de *Bacillus sub.* ..... 160

Figure 57 : Western Blot des protéines d'arachide après dégradation par les protéases de *Bacillus sub.* ..... 161

Figure 58 : Dosage ELISA des extraits obtenus après dégradation de l'arachide par les protéases de *Bacillus subtilis*. ..... 162



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Proportion d'individus allergiques qui réagissent à la plus petite quantité de protéines alimentaires définie par le test de provocation par voie orale.....	28
Tableau 2 : Composition nutritionnelle de l'arachide, d'après Souci, S. W. et al. (2008) .....	40
Tableau 3: Données épidémiologiques sur Ara h 3 dans l'allergie à l'arachide. ....	47
Tableau 4 : Les allergènes mineurs de l'arachide référencés selon l'IUIS (www.allergen.org)49	
Tableau 5 : Principaux microorganismes utilisés pour les fermentations alimentaires en Asie .....	66
Tableau 6 : Résultats d'identification protéique des spots analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 25) .....	110
Tableau 7 : Evolution du titre des anticorps au cours de l'immunisation des lapins G24101 et G24168 avec la protéine Ara h 1 .....	118
Tableau 8 : Evolution du titre des anticorps au cours de l'immunisation des lapins G45117 et G45201 avec la protéine Ara h 2 .....	118
Tableau 9 : Evolution du titre des anticorps au cours de l'immunisation des lapins G24123 et G24173 avec la protéine Ara h 3 .....	118
Tableau 10 : Récapitulatifs des signaux obtenus en ELISA pour la fermentation liquide avec <i>A. oryzae</i> pendant 72h .....	145



# Introduction



## I. L'allergie Alimentaire

### A. Historique et données actuelles

#### 1. Historique

L'allergie est un phénomène immunologique que l'on peut considérer comme ayant existé de tous temps. Déjà, en 2650 av. JC, le premier pharaon égyptien Ménéès est mort après une piqûre de guêpe alors que son allergie aux Hyménoptères était connue (Molkhou, P. 2011). Richard III (1431-1483) était allergique aux fraises, et ses crises d'urticaires sciemment provoquées lors de repas avec ses ennemis lui permettaient de les faire accuser d'empoisonnement et de se débarrasser d'eux. Ce n'est cependant qu'au début du XXème siècle que le terme anaphylaxie apparaît grâce aux expérimentations de deux français, Richet et Portier. En 1902, ceux-ci injectèrent à un chien une faible dose d'extrait d'anémone de mer sans constater de symptômes particuliers. Après quelques semaines, ils réinjectèrent à ce même chien une nouvelle dose d'extrait d'anémone de mer et celui-ci réagit violemment et mourut. Ils eurent alors l'idée d'appeler ce phénomène reproductible « anaphylaxie », dérivé de mots grecs « ana » : contraire, « phylaxis » : protection (Mondoulet, L. 2005), en opposition avec le terme de prophylaxie. Quelques années après, en 1906, l'autrichien Von Pirquet donne la définition du terme « allergie » (*allos*, autre et *ergon*, action) comme « une altération de la capacité de l'organisme à réagir à une substance étrangère » et l'émergence d'une nouvelle discipline s'en suivit : l'allergologie. Dès lors, l'allergie a fait l'objet de nombreuses études, tant des points de vue immunologique qu'épidémiologique.

#### 2. Données actuelles

L'allergie dans sa globalité est aujourd'hui reconnue par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme la quatrième maladie non infectieuse mondiale. Depuis quelques années, les études épidémiologiques ont montré une nette augmentation de la prévalence de l'allergie alimentaire en France avec 28% d'augmentation de cas d'anaphylaxies alimentaires entre 2001 et 2006 (Moneret-Vautrin, D.-A. 2008). Chez les enfants européens, la population concernée représente 4,7% de la population globale, alors

que ce chiffre est entre 3,2% et 3,6% chez les adultes (Moneret-Vautrin, D.-A. 2008). Pour la France, l'étude la plus récente montre que la prévalence de l'allergie alimentaire, tous âges confondus, se situe entre 2,1 et 3,8% (Moneret-Vautrin, D. A. et al. 1998). Il est à noter que les études épidémiologiques sur les allergies alimentaires sont moins fréquentes que les études sur l'asthme ou les rhinites atopiques qui sont souvent au cœur des interrogations allergologiques. Cela peut se justifier par la complexité du diagnostic de l'allergie alimentaire, car de nombreux symptômes sont à prendre en compte et ne sont pas obligatoirement des signes d'une réponse allergique (Dutau, G. 2003). L'augmentation du nombre de patients allergiques met en avant de nouvelles considérations industrielles au niveau agro-alimentaire (Taylor, S. and Baumert, J. 2010). Par exemple, le rôtissage ou autre traitement thermique entraîne une modification des allergènes qui a pour finalité une augmentation de l'allergénicité de l'arachide. En outre, l'utilisation de plus en plus d'ingrédients dans les recettes industrielles peut conduire à des contaminations croisées et l'apparition d'allergènes cachés dans les aliments. En effet, pour le cas de l'arachide, les seuils de tolérance sont très faibles : chez une population allergique à l'arachide de 286 patients, 10% présentent des symptômes d'une réaction avec une dose de 8,4 mg d'arachide (Taylor, S. L. et al. 2010). Il faut donc éviter toute contamination croisée au cours des productions de denrées alimentaires afin de réduire l'apparition d'aliments contaminés à l'insu du patient.

En 2001, il a été créé un réseau français d'allergologues (« Allergo-vigilance », coordonné par le CHU (Centre Hospitalo-Universitaire) de Nancy qui regroupe près de 450 docteurs et spécialistes, qui, *via* le recensement et la mise en commun des données cliniques concernant les accidents allergiques ayant nécessité une intervention médicale, permet d'établir des bases de données précises sur la prévalence de l'allergie en France, l'apparition de nouveaux allergènes ou de nouvelles réactions croisées et de définir les risques inhérents à l'apparition de nouveaux aliments sur le marché (Barnett, J. et al. 2011). Malgré les symptômes souvent très voisins, l'allergie alimentaire ne doit pas être confondue avec l'intolérance alimentaire qui ne met pas en œuvre de réponse immunologique. L'allergie est décrite comme une réaction d'hypersensibilité, mettant en jeu des phénomènes immunologiques nuisibles pouvant conduire à des manifestations cliniques graves voire mortelles.

## **B. Place de l'allergie à l'arachide**

Sicherer, S. H. et al. (2010) ont mené une étude aux Etats-Unis sur une période de 11 ans afin de suivre l'évolution de la prévalence de l'allergie à l'arachide chez les adultes et les enfants. Chez les adultes, la prévalence montre une stagnation à 1,3% de la population. La population des enfants (moins de 18 ans) a montré une fréquence du nombre d'allergique à l'arachide qui évolue de 0,4% en 1997 puis 0,8% en 2002 jusqu'à atteindre 1,4% en 2008. La fréquence de l'allergie à l'arachide a donc été multipliée par 3,5 entre 1997 et 2008 aux Etats-Unis chez les enfants, mais est restée inchangée chez les adultes. En Grande-Bretagne, des études menées entre 1989 et 1996 ont montré une augmentation de la prévalence de l'allergie à l'arachide de 0,5 à 1,8% (Hourihane, J. O. B. et al. 2007). L'étude la plus récente en France (Morisset, M. et al. 2005) chiffre la prévalence de l'allergie à l'arachide entre 0,3 et 0,75%.

### **1. Une symptomatologie sévère**

L'allergie à l'arachide chez les patients sensibilisés provoque des symptômes communs aux autres allergies alimentaires dites « immédiates » : digestifs, respiratoires, cutanés ou muqueux (Bouvier, M. et al. 2009). Cependant, l'allergie à l'arachide est une des allergies alimentaires les plus violentes au niveau des symptômes (Rancé, F. and Dutau, G. 2007) : en France et en Belgique entre les années 2003 à 2007, elle a à elle seule provoqué 13,2% des accidents anaphylactiques sévères toutes allergies alimentaires confondues (Moneret-Vautrin, D.-A. 2008). Aux Etats-Unis, une étude de Bock, S. A. et al. (2007) a montré que sur les 31 chocs anaphylactiques létaux enregistrés entre 2001 et 2006, 17 d'entre eux (54,4%) étaient dus à une allergie à l'arachide. L'allergie à l'arachide (selon la prévalence et la sévérité des symptômes) peut revêtir un caractère épidémique dans certaines régions du monde (Sicherer, S. H. and Sampson, H. A. 2007). Cependant, en prenant l'exemple de l'Asie ou d'Israël, la prévalence de l'allergie est moindre : environ 0,5% à Singapour et Philippines (Shek, L. P.-C. et al. 2010), et 0,06% à Israël (Dalal, I. et al. 2002). On ne peut donc pas conclure au caractère épidémique de l'allergie à l'arachide de manière généralisée.

## 2. Un risque élevé pour le patient allergique

L'allergie à l'arachide a pour spécificité la faible rémission des patients sensibilisés. Selon les études menées, un patient allergique aura très peu de chance (10 à 20%) de voir sa sensibilité spontanément diminuer avec le temps. Un patient diagnostiqué comme sensible à l'arachide avec une réaction généralisée devra alors adopter un régime d'éviction total, selon les recommandations de son allergologue (Bouvier, M. et al. 2009). Dans les années 90, différents essais de désensibilisation par immunothérapie ont été menés sur des patients allergiques, mais à la vue de la sévérité des symptômes rencontrés, la prise de risque pour le patient était trop grande pour que ce traitement soit généralisé (Nelson, H. S. et al. 1997). Depuis, des essais de sensibilisation sublinguale ont été menés avec succès (Mansfield, L. 2006; Moneret-Vautrin, D. A. et al. 2010) sur des patients présentant des syndromes oraux. Cette désensibilisation s'apparenterait davantage à une induction de tolérance car elle nécessite la consommation régulière de doses d'arachides pour être entretenue. Cependant, il n'existe pas de traitement pour les patients présentant de sévères réactions, qui se voient imposer une éviction stricte et tenus d'être toujours muni de leur trousse de soin d'urgence en cas de crise. Les doses réactogènes minimales à l'apparition de symptômes chez les patients allergiques ont été évaluées par différentes études et reprises dans l'étude de (Rancé, F. and Dutau, G. 2006). L'analyse statistique du seuil réactogène a permis de définir la dose de 0,29 mg de protéines d'arachide, qui est sûrement sur-estimé : en effet, les patients qui présentent des symptômes sévères ou très sévères de réaction allergiques ne rentrent pas dans cette étude à cause du risque encouru. Par ailleurs, ce type d'étude est très dépendant de la population étudié : une population d'adulte réagira très différemment d'une population pédiatrique, par exemple. De plus, la première dose réactogène incriminée est peut-être déjà surévaluée par rapport à la réelle dose qui provoquerait la réaction chez le patient allergique.

Arachide - Quantité réactogène (% population)	
<b>Taylor, S. L. et al. (2004)</b>	250 µg (0,32)
<b>Morisset, M. et al. (2003)</b>	1,25 mg (0,97)

**Tableau 1 : Proportion d'individus allergiques qui réagissent à la plus petite quantité de protéines alimentaires définie par le test de provocation par voie orale**

En conclusion, les différentes études sur les plus faibles doses réactogènes et la proportion de population qui y réagissent sont récapitulées dans le Tableau 1.

### C. Mécanismes immunologiques et implication des molécules

L'allergie alimentaire correspond, pour la plupart des cas et selon le classement de Gell, P. G. H. and Coombs, R. R. A. (1963), à une hypersensibilité de type I. Cette hypersensibilité est dite « immédiate » et est induite par les IgE (immunoglobulines de classe E), *via* l'activation des mastocytes et basophiles. Ce phénomène peut être facilement reproduit de façon expérimentale chez un animal comme le cobaye. Lors de la première injection d'une protéine « inoffensive » type albumine d'œuf (1 mg), le cobaye ne présente aucun symptôme. Deux à trois semaines plus tard, lorsque l'injection est reconduite, l'animal va présenter des symptômes d'anaphylaxie généralisée avec une chute de la tension artérielle et une respiration sifflante qui vont conduire en quelques minutes à sa mort. La sensibilisation induite par la première injection est caractéristique de l'hypersensibilité de type I et implique la production d'IgE par le système immunitaire. On voit donc, par cette expérience, que l'allergie alimentaire se déroule en deux phases distinctes : la phase dite de « sensibilisation », asymptotique, et la phase dite de « déclenchement ».

La capacité individuelle ou familiale à produire des IgE en réponse à des antigènes qui sont habituellement inoffensifs est appelée atopie. Cette prédisposition génétique peut conduire à l'apparition de symptômes variés tels que l'asthme, la rhino-conjonctivite ou la dermatite. Il est d'autre part prouvé par l'étude de Moneret-Vautrin, D. A. (2000), que les enfants qui développent une allergie alimentaire ont un terrain atopique favorable (66 % d'entre eux ont des antécédents familiaux).

Les deux étapes énoncées ci-dessus méritent que l'on s'y attarde plus longuement. La phase de sensibilisation est marquée par la production d'IgE spécifiques d'un antigène qui se lient *via* leur récepteur à la surface de cellules, notamment sur les basophiles et mastocytes. La phase de déclenchement consiste en l'agrégation des IgE spécifiques fixés à la surface des basophiles et mastocytes suite à la liaison avec l'antigène ce qui provoque la libération des médiateurs de la réaction allergique.

## 1. Les IgE et leur récepteurs

### a. Les Immunoglobulines E

Les immunoglobulines de type E ont été découvertes par Ishizaka, K. et al. (1966) qui les ont identifiées comme le cinquième isotype d'immunoglobuline. Elles sont présentes en quantité très faible (~100 ng/mL) comparé aux IgG (immunoglobulines de classe G) (~10.10<sup>6</sup> ng/mL). Les individus atopiques possèdent des taux d'IgE souvent supérieurs à la moyenne ; lors d'une allergie alimentaire déclarée, ces IgE sont alors globalement produits en plus grande quantité. Néanmoins, les concentrations d'IgE totales sont soumises à de fortes variations physiologiques au niveau inter- et intra-individuelles. Il est à noter qu'un faible taux d'IgE ne permet pas d'éliminer l'hypothèse clinique de l'atopie, et peut traduire une sensibilisation d'un patient. De plus, le taux d'IgE dans le sérum d'un patient allergique n'est pas corrélé avec la gravité des symptômes cliniques.

Le rôle initial des IgE est de lutter contre les infections parasitaires, ce qui explique que les organes cibles des parasites sont le siège préférentiel de la production d'IgE : la peau, les poumons et l'intestin. Lors d'une infection parasitaire, les réactions d'inflammation, de bronchoconstriction, de sécrétion de mucus etc. sont habituellement rencontrées, et sont des symptômes que l'on retrouve dans la réaction allergique.

Les IgE sont des immunoglobulines monomériques, symétriques, volumineuses (188 kDa) et glycosylées. Elles sont synthétisées et excrétées par les lymphocytes B et les plasmocytes à IgE. Leur composition est commune aux immunoglobulines : deux chaînes lourdes  $\epsilon$  composées de 5 domaines (1 domaine N-terminal variable ( $V_H$ ) et 4 domaines constants ( $C\epsilon 1-4$ )) ; et deux chaînes légères ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ) elles-mêmes composées de deux domaines (1 domaine variable ( $V_L$ ) et un domaine constant ( $V_H$ ), Figure 1). Il n'existe pas de sous classe d'IgE et les chaînes légères de types  $\kappa$  composent environ les deux tiers des IgE.

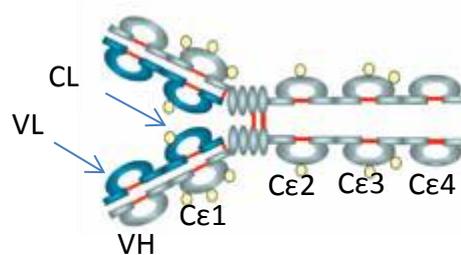


Figure 1 : Structure de l'IgE.

D'après Coline Plé, IPL, Université de Lille 2

La synthèse des IgE se fait grâce à un terrain cytokinique primordial que l'on retrouve en général chez les patients atopiques. En effet, l'interleukine de type 4 produite par le lymphocyte T après le contact avec l'antigène induit la stimulation de la différenciation des lymphocytes Th<sub>0</sub> en Th<sub>2</sub>.

Les IgE ont une demi-vie très faible, puisqu'on l'estime à 2,5 jours : cela justifie leur faible proportion parmi les immunoglobulines circulantes. Cependant, ces IgE sont des anticorps cytophiles qui ont la capacité de se fixer à la surface des basophiles et des mastocytes, ce qui permet ainsi d'augmenter considérablement leur durée de demi-vie, puisque celle-ci peut atteindre 3 à 12 semaines (Renauld, J. C. 2002).

*b. Les récepteurs FcεRI et FcεRII*

La fixation des IgE à la surface des différentes cellules se fait grâce à deux types de récepteurs : FcεRI (de haute affinité) et FcεRII ou CD23 (de faible affinité). Les parties C-terminales des chaînes lourdes forment la région Fc et contiennent le site de liaison aux anticorps.

Le FcεRI est fortement exprimé sous la forme d'un tétramère αβγ<sub>2</sub> et d'un trimère αγ<sub>2</sub> à la surface des cellules présentatrices d'antigène (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, éosinophiles et cellules de Langerhans) (Blank, U. et al. 1989). Les IgE ont une très forte affinité pour ces récepteurs avec une constante de dissociation évaluée entre 10<sup>-9</sup> et 10<sup>-11</sup> mol.L<sup>-1</sup> et favorise ainsi la liaison des IgE malgré leur très faible concentration sérique. Le récepteur FcεRI a une structure complexe (Figure 2). Il est formé :

-D'une chaîne α formée de 3 domaines : un domaine transmembranaire, un court domaine cytoplasmique et un domaine extracellulaire (ECα) lui-même constitué de deux sous-domaines de type immunoglobulinique (D1 et D2). C'est le domaine ECα qui permet la fixation de l'IgE.

-D'une chaîne β avec 4 segments transmembranaires. Cette protéine est très hydrophobe et ses extrémités N et C-terminales sont cytoplasmiques. Cette chaîne a un rôle amplificateur de la signalisation. (Une étude de Donnadieu, E. et al. (2000) a montré que le signal d'activation d'un récepteur tétramérique αβγ<sub>2</sub> dans une cellule transfectée est 3 à 5 fois plus importante qu'avec le trimère αγ<sub>2</sub>). Cette étude a aussi montré que l'expression de la chaîne β dans le récepteur FcεRI implique une augmentation significative des niveaux d'expression de ce même récepteur à la surface des cellules

-D'un dimère de chaînes  $\gamma$  reliées entre elles par un pont disulfure. Ces protéines transmembranaires possèdent un court domaine extracellulaire et une région C-terminale cytoplasmique relativement longue. Cette dernière est essentielle à la transduction du signal via les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif -Figure 2).

Chez l'Homme, l'interleukine-4, cytokine de type Th2, a la capacité d'induire l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du Fc $\epsilon$ RI par les mastocytes (Toru, H. et al. 1996) et les CPA (Cellules présentatrices d'antigènes) (Novak, N. et al. 2003). Il a été montré par Sihra, B. S. et al. (1997) qu'il existait une corrélation positive entre la concentration d'IgE circulantes et la densité des récepteurs Fc $\epsilon$ RI à la surface des basophiles et monocytes. Cette régulation positive qui induit une surexpression des récepteurs Fc $\epsilon$ RI provoque une augmentation des capacités effectrices des cellules : dégranulation des mastocytes et présentation des antigènes par les CPA. Ce cercle vertueux conduit à l'apparition d'un nombre supérieurs de récepteurs Fc $\epsilon$ RI à la surface des mastocytes, basophiles, monocytes, éosinophiles et cellules dendritiques chez les patients atopiques par rapport aux sujets « normaux ».

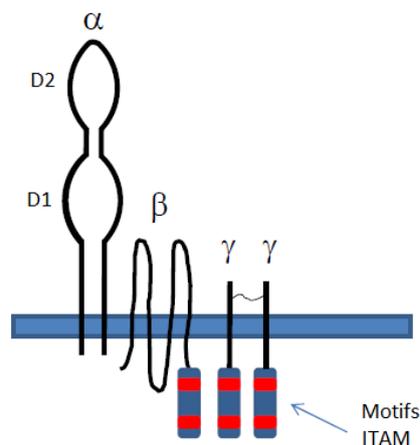


Figure 2 : Schéma d'un récepteur tétramérique  $\alpha\beta\gamma_2$  Fc $\epsilon$ RI

Le récepteur Fc $\epsilon$ RII dit de faible affinité, CD23 selon la nomenclature, est le deuxième récepteur capable de lier les IgE. Il existe sous deux formes : CD23a et CD23b qui ne diffèrent que par leur région N-terminale cytoplasmique. Le CD23a est exprimé sur les cellules B activées avant leur différenciation en plasmocytes. L'expression du CD23b est induite par l'IL-4 sur les cellules T, les cellules de Langerhans, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles (Yokota, A. et al. 1988). Le récepteur Fc $\epsilon$ RII a une faible affinité pour les IgE sériques, mais une forte affinité avec le complexe immun IgE-antigène. Il joue un rôle important dans la production des IgE : il participe à la présentation des antigènes et à la

stimulation des lymphocytes T. Il prend également part à la génération de médiateurs de l'inflammation, spécialement par les éosinophiles.

## **2. Phase de sensibilisation ou production d'IgE**

L'allergène introduit dans l'organisme par contact cutané ou après ingestion est reconnu par le système immunitaire en cas de susceptibilité : il est capté par les cellules dendritiques et autres cellules présentatrices d'antigène. Les mécanismes de dégradation et d'apprêtement se mettent alors en jeu : les allergènes exogènes sont endocytés par les CPA qui les dégradent via le protéasome et associent les peptides avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Ce complexe est ensuite transporté vers la membrane plasmique pour être présenté aux lymphocytes T CD4+ (aussi appelés lymphocytes helper, auxiliaires ou Th0). Chez les individus sans terrain atopique, la différenciation des Th0 sera dirigée vers les Th1, et la réaction sera médiée par les IgG (réaction immunitaire classique). Chez les individus prédisposés aux allergies, la différenciation se dirigera préférentiellement vers le phénotype Th2. Dans cette dernière configuration, la sécrétion des interleukines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 stimulera la commutation de classe vers la production d'IgE. Plus particulièrement, l'IL-4 joue un rôle important dans la transformation de lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE spécifiques et favorise la prolifération de cellules B tout en inhibant la voie Th1. Le CD40 porté à la surface des cellules B est stimulé par la fixation du Th2 (porteur du CD40L ou CD154) et cette interaction est nécessaire à la commutation de classe vers l'IgE. Les IgE ainsi produits circulent dans le sang et se fixent aux récepteurs FcεRI exprimés à la surface des basophiles (circulants) et mastocytes (muqueuses). C'est la fin de la phase de sensibilisation, aucun symptôme clinique n'est visible, mais l'organisme est prêt à réagir de façon immédiate lors d'un contact ultérieur avec l'allergène.

## **3. Phase de déclenchement**

Lors du deuxième contact avec l'allergène, il est directement reconnu par les IgE spécifiques fixés à la surface des cellules effectrices. L'allergène multivalent (présentant plusieurs épitopes) pontes les IgE et entraîne une cascade biochimique. Ainsi, les granulations présentes au sein des mastocytes vont fusionner avec la membrane plasmique et libérer leurs médiateurs. On peut distinguer deux phases avec des rapidités différentes. La première

consiste en la libération d'histamine, d'héparine, de protéases et de divers facteurs chimiotactiques et conduit à la phase spasmogène : c'est la réaction immédiate. Les symptômes sont variés et impliquent la vasodilatation, la sécrétion de mucus et l'œdème de Quincke dû à la fuite de protéines plasmatiques hors des vaisseaux. Parallèlement, des médiateurs lipidiques sont synthétisés par le mastocyte/basophile et agissent un peu plus tardivement : ce sont des leucotriènes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE). On compte aussi parmi ces médiateurs les prostaglandines (PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), et le facteur activant les plaquettes (PAF). Toutes ces molécules agissent sur les voies aériennes périphériques ce qui peut provoquer une bronchoconstriction, augmentent la perméabilité vasculaire ce qui peut conduire au collapsus vasculaire.

Dans un second temps, deux à huit heures après la dégranulation, des cytokines pro-inflammatoires sont produites par les mastocytes et basophiles (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-5). Ces cytokines vont favoriser le recrutement d'éosinophiles, de monocytes et de lymphocytes au niveau de l'inflammation. Les cellules recrutées libèrent des protéases qui contribuent à la lésion tissulaire (Figure 3).

Toutes ces réactions participent à un processus physiologique habituellement rencontré lors d'une infection parasitaire.

## **1. Les cellules immunitaires impliquées dans la réaction allergique**

### *a. Cellules présentatrices d'antigène*

Les CPA interviennent lors la phase de sensibilisation. Elles appartiennent à la lignée des monocytes. Elles prennent en charge et appréhendent les antigènes à leur surface, sous forme de peptides couplés au CMH II. Cette appellation selon la fonction regroupe en fait différents types de cellules : les cellules dendritiques, les macrophages activés ou les lymphocytes B activés : toutes expriment les molécules de co-stimulation capables d'activer les cellules Th. Cependant, seules les cellules dendritiques sont capables de stimuler un lymphocyte naïf : ce sont les seules CPA à exprimer, de manière constitutive, une forte densité de CMH II et de molécules de co-stimulation. Les cellules dendritiques représentent trois populations différentes : les cellules de Langerhans, présentes au niveau de l'épiderme et de l'épithélium muqueux; les cellules dendritiques myéloïdes, présentes dans les tissus interstitiels, notamment au niveau du derme ; et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, situées dans les organes lymphoïdes et dans le sang.

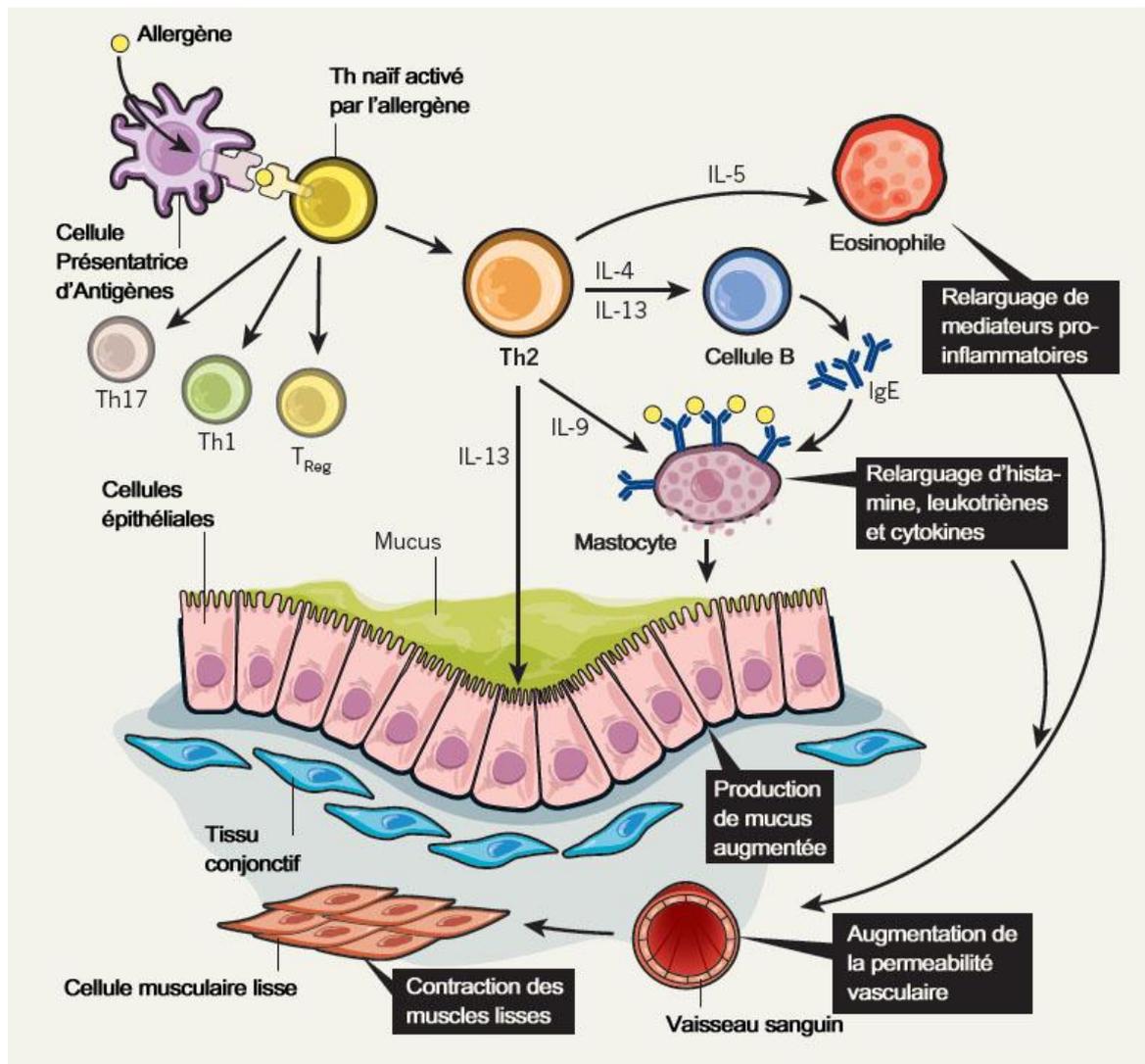


Figure 3 : Schéma global de la réaction allergique.

D'après Nature Outlook, 2011

*b. Les lymphocytes B et les plasmocytes*

Les lymphocytes B sont à la base de la production des anticorps dirigés contre un antigène spécifique. Dans le cadre de l'hypersensibilité de type 1, la prolifération des lymphocytes B est activée par les interleukines délivrées par les Th2, ainsi que par l'interaction entre l'antigène CD40, exprimé à la surface des lymphocytes B, et le CD154, glycoprotéine exprimée à la surface de Th. Le lymphocyte B activé migrera alors vers un follicule lymphoïde qui évoluera en centre germinatif. Une commutation de classe a alors lieu, et les cellules B nouvellement produites vont convertir les chaînes lourdes  $\mu$  en chaînes lourdes  $\epsilon$ , pour, après expansion clonale des lymphocytes B activés, produire des IgE.

*c. Les granulocytes*

Ces cellules font partie des leucocytes : elles sont caractérisées par leur noyaux polylobé et la présence dans leur cytoplasme de granulations, ce qui justifie leur nom de granulocytes. Les basophiles sont les plus rares des granulocytes (0,5%) et sont présents essentiellement dans le sang. Leurs inclusions cytoplasmiques sont riches en médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine et l'héparine. Ils expriment à leur surface un très grand nombre de récepteur FcεRI (~30,000 récepteurs/cellule).

Les mastocytes sont localisées principalement dans les tissus muqueux et épithéliaux. A leur surface, est exprimée la forme tétramérique ( $\alpha\beta\gamma_2$ ) du récepteur FcεRI à raison de  $10^5$  par cellule. Les très nombreuses granulations cytoplasmiques qu'ils possèdent contiennent elles aussi différents médiateurs chimiques, notamment l'histamine et des enzymes. Une fois les mastocytes activés par l'antigène suite à la fixation des IgE sur les récepteurs FcεRI, le contenu de ces granulations est libéré dans le milieu extracellulaire. Une fois activés, les mastocytes synthétisent et relarguent des médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandine, PAF) ainsi que des cytokines (IL-4 et IL-3) qui vont participer au maintien de la réponse Th2.

Les éosinophiles sont essentiellement présents dans les tissus et présentent à leur surface les récepteurs d'IgE de faible affinité : les FcεRII. Suite à leur activation par les allergènes par le complexe IgE-récepteur, ils libèrent des médiateurs de l'inflammation et des cytokines qui entretiennent la réponse de type Th2.

**2. Balance Th1/Th2 chez le patient allergique**

Les lymphocytes T (T pour Thymo-dépendant) doivent leur nom à l'endroit où leur « éducation » s'achève : le thymus. Une première catégorie de lymphocytes sont les Th (pour lymphocytes T helper) qui portent à leur surface le marqueur spécifique CD4. Lorsque ce lymphocyte est à l'état naïf, c'est-à-dire n'a subi aucun contact avec des peptides couplés au CMH II, ils sont capables de se différencier soit en Th1, soit en Th2. Les lymphocytes Th1 peuvent sécréter des cytokines de type IL-2 ou INF- $\gamma$  (interféron gamma) et sont impliqués dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires, *via* l'activation des macrophages et la production de lymphocytes T cytotoxiques. Ils favorisent aussi la production d'anticorps de type IgG. Quant à eux, les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et sont impliqués dans la lutte contre des pathogènes extracellulaires. La balance entre la

différenciation vers les Th1 ou les Th2 est principalement due à l'environnement cytokinique : les Th1 sécrètent des IFN $\gamma$ , inhibant la différenciation vers les Th2 ; et les Th2 sécrètent des IL-4 et IL-10 qui inhibent la différenciation vers les Th1 (Figure 4).

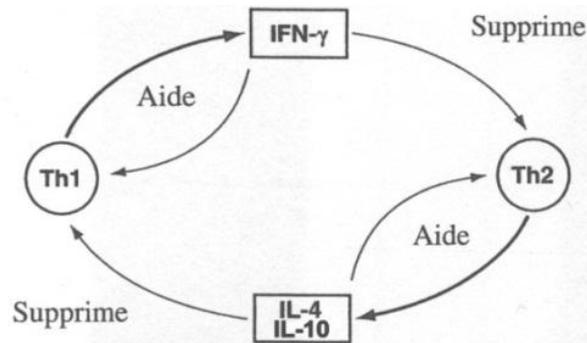


Figure 4 : Dialogue moléculaire entre Th1 et Th2

Chez les patients allergiques, la voie de différenciation des Th0 est déplacée vers les Th2 lors de la première présentation de l'antigène par les CPA. Les mécanismes qui contrôlent cette étape cruciale dans la réponse immunitaire sont assez mal compris. Il semblerait que l'environnement cytokinique peut fortement influencer celle-ci. Par exemple, des études récentes ont montré l'influence des lymphocytes T régulateurs ( $T_{reg}$ ) lors de la régulation de la balance Th1/Th2, qui sont garantes du maintien de l'homéostasie dans les réponses immunitaires induites (Figure 5).

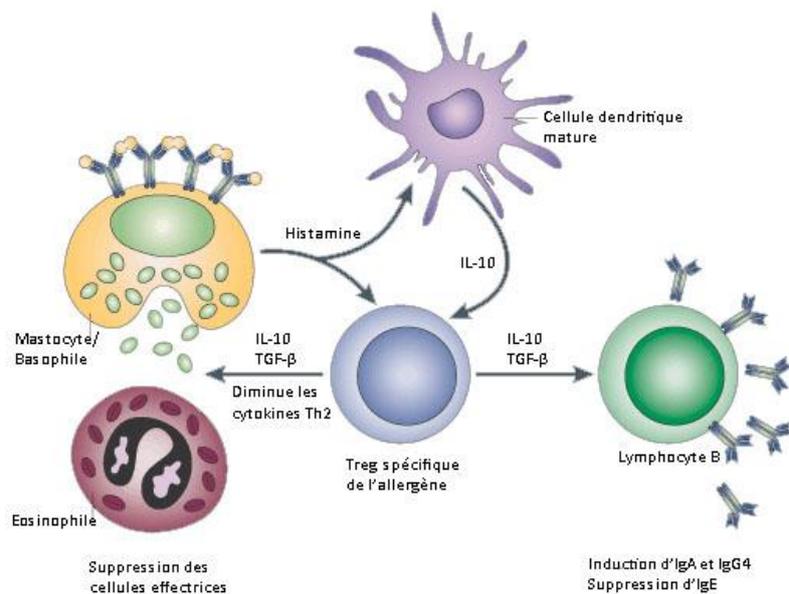


Figure 5 : Influence des  $T_{reg}$  sur la différenciation en Th2

D'après Nature Reviews Immunology – 2003

Les  $T_{reg}$  sécrètent des cytokines régulatrices TGF- $\beta$  et de l'IL-10 lors de leur activation par les cellules dendritiques présentant un antigène. Une fois activés, ils peuvent alors à leur tour modifier les conditions de la présentation antigénique par les cellules dendritiques, mettant ainsi en place une boucle amplificatrice de tolérance (Figure 5). Il a été montré que les patients allergiques présentent un déficit fonctionnel de  $T_{reg}$  stimulés *in vitro* par l'allergène par rapport à des volontaires sains (Ling, E. M. et al. 2004). Un autre facteur qui a été avancé est la densité d'antigène présenté au Th0 par la CPA. Un modèle murin présentant un terrain atopique a été soumis à un test de sensibilisation par de l'ovalbumine. Une concentration faible d'ovalbumine induit la production d'IL-4 et d'IL-5 qui orientent une réponse plutôt vers Th2 alors qu'une dose plus forte induit la production IFN- $\gamma$ , qui oriente une réponse vers les Th1 (Sakai, K. et al. 1999). D'autres hypothèses impliquant des considérations hygiénistes ont été proposées (Yu, Z. et al. 2011) mais ne font pas l'unanimité dans le milieu des allergologues.

## II. L'arachide comme aliment allergénique

### A. Considérations botaniques



Figure 6 : Dessin botanique d'un plant d'arachide

L'arachide (*Arachis Hypogaea*) fait partie de la famille des Légumineuses ou *Fabaceae*, tout comme le pois, la lentille, le haricot ou le lupin. Elle est originaire d'Amérique du sud et est aujourd'hui cultivée dans les régions tropicales et subtropicales. Sa production mondiale s'élève à 35,4 millions de tonnes pour l'année 2009/2010 (FAO, 2010). Le mot plus commun pour désigner la graine est « cacahuète », issu du nahuatl *tlālcacahuatl* en langue aztèque, signifie cacao de terre. Le mot « arachide » désigne quant à lui aussi bien la plante que la graine avec ou sans la gousse.

L'arachide est une plante annuelle d'environ 45cm de hauteur. Ses feuilles sont de forme ovale et les fleurs jaunes se développent sur la partie basse de la plante. Les fleurs s'autofécondent et perdent ensuite leurs pétales alors que l'ovaire fécondé commence à grossir. Le gynophore se développe et l'ovaire est porté en terre. Le fruit mûrit jusqu'à 3-5 cm dans le sol (Figure 6). La culture en France est anecdotique, puisqu'un seul champ de 3 hectares est cultivé dans la région des Landes, à Soustons (Figure 7). L'arachide a en effet besoin d'un sol léger et bien drainé afin que les fruits puissent se développer, et aussi pour faciliter la récolte.



**Figure 7 : Champ planté d'arachides et récolte d'un pied d'arachide mature dans les Landes (Soustons, 2012)**

Le temps de culture varie selon les espèces, et s'étale entre 90 et 140 jours. L'arachide est une légumineuse, et sa culture ne nécessite donc pas d'apport azoté : la symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium* permet la réduction de l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par la plante. Afin de faciliter cette symbiose, l'épandage de souches de *Rhizobium* est effectué au moment du semis. En outre, l'arachide est très intéressante d'un point de vue nutritionnel, de par sa très forte teneur en protéines et lipides (cf. Tableau 2).

	Energie (kcal)	Protéines (g)	Lipides (g)	Glucide (g)	Fibres (g)
<b>Pour 100 g d'arachide</b>	564	28,8	49,5	9,9	7,7

**Tableau 2 : Composition nutritionnelle de l'arachide, d'après Souci, S. W. et al. (2008)**

## **B. Les allergènes de l'arachide**

A ce jour, les allergènes de l'arachide identifiés sont au nombre de 13 et sont désignés par les symboles Ara h 1 à Ara h 13 selon la nomenclature de l'IUIS (International Union of Immunological Societies) (Finkelman, F. D. 2010). Ces noms sont issus des trois premières lettres du nom du genre (*Arachis*), de la première lettre du nom de l'espèce (*hypogaea*) suivi d'un chiffre qui correspond à l'ordre chronologique de leur identification. Les allergènes de l'arachide sont des protéines de réserve (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4, Ara h 6, Ara h 7, la lectine de l'arachide PNA pour PeaNut Agglutinin, aussi dénommée Ara h agglutinin), des protéines structurales comme les oléosines (Ara h 10 et Ara h 11) et les profilines (Ara h 5), des protéines de transfert des lipides ou LTP (Ara h 9), et des protéines de défense de la plante contre les phytopathogènes (Ara h 8 une Bet v 1 - like), et de petites protéines (8 kDa), les défensines, impliquées dans la défense des plantes (Ara h 12 et Ara h 13). Les

protéines de réserves sont les plus abondantes et sont stockées dans les corps protéiques, répartis uniformément au sein des cotylédons. Ces corps protéiques sont des organites spécialisés qui présentent une forme sphérique d'un diamètre moyen de 20  $\mu\text{m}$  environ. Les protéines de réserves des graines se classent en grandes familles selon les critères de solubilité définis par Osborne, T. (1924) :

- Les albumines solubles dans l'eau. (Ara h 2, Ara h 6 et Ara h 7)
- Les globulines solubles dans les solutions saline. (Ara h 1, Ara h 3/4, lectines)

Les globulines Ara h 1 et Ara h 3/4 appartiennent à la superfamille des cupines, décrites par des feuilletts  $\beta$  organisés en un motif cupine (du latin *cupa*, en forme de coupe). Les globulines sont très répandues chez les plantes dicotylédones, leur structure et séquence sont largement conservées d'une espèce à l'autre et leur composition est très élevée en acide aspartique, glutamine et tryptophane.

Les albumines appartiennent à la famille des prolamines, décrites par des motifs cystéines conservés et une structure tertiaire contenant 3 à 4 hélices  $\alpha$ . Les albumines sont, quant à elles, plus riches en acides aminés soufrés et en lysine.

Lors de la germination, les corps protéiques sont réhydratés et les protéines sont hydrolysées. Ainsi, les réserves d'azote, de carbone, de nitrogène et de soufre deviennent accessibles à l'embryon et permettent sa croissance.

L'immunoréactivité d'un allergène réside dans sa capacité à induire une réponse immunitaire caractérisée par la synthèse d'IgE spécifiques. Ce caractère immunogène est dû à la présence de déterminants antigéniques répartis à la surface de la protéine. Ils sont de deux sortes :

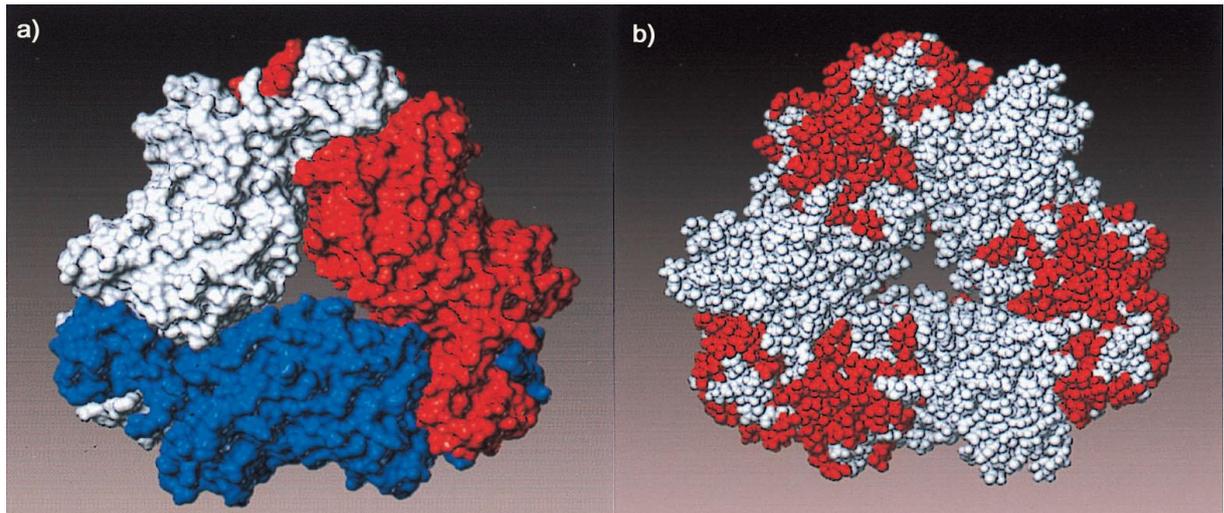
Les épitopes B, qui sont généralement des épitopes conformationnels de 16 à 20 acides aminés, interviennent dans les mécanismes où l'antigène natif est reconnu par le fragment F (a, b) des immunoglobulines de type E.

Les épitopes T, petits peptides de 8 à 9 acides aminés sont reconnus par le récepteur T et induisent une différenciation des Th0 vers la voie Th2.

## 1. Ara h 1

Ara h 1 est une viciline ou globuline 7S, de structure homotrimérique avec un poids moléculaire total de 190 kDa et un point isoélectrique acide de l'ordre de 4,55 (Burks, A. W. et al. 1991). Chaque monomère ou protomère est constitué d'un cœur formé de deux

motifs cupine (deux feuillets de brins  $\beta$  disposés en coupe (cupa)), prolongé de part et d'autre par deux bras constitués d'hélice  $\alpha$ . Les trois protomères s'associent par leurs bras grâce à des liaisons non-covalentes pour former un homotrimère aplati de forme triangulaire (Figure 8). C'est un des allergènes de l'arachide les mieux connus et les plus étudiés. Ara h 1 représente près de 12 à 16% des protéines de l'arachide (Koppelman, S. J. et al. 2001), et en est ainsi l'allergène majoritaire. Cette glycoprotéine de 63,5 kDa par monomère possède de nombreux épitopes.



**Figure 8 : Modèle moléculaire de l'homotrimère d'Ara h 1**

a) Représentation des trois trimères de couleurs différentes.

b) Représentation des épitopes immunodominants en rouge.

D'après Maleki, S. J. et al. (2000)

Des études de caractérisations ont permis d'en dénombrer 23 avec des motifs de séquences d'acides aminés non communes (Shin, D. S. et al. 1998). Leur répartition n'est pas uniforme sur la séquence linéaire de la protéine (Burks, A. W. et al. 1997). Sur le modèle tridimensionnel de la protéine construit par homologie, les épitopes B sont principalement localisés dans 2 régions, sièges de contact entre les monomères (Maleki, S. J. et al. 2000) et ceux de l'extrémité C-terminale de la séquence sont les mieux exposés sur la surface moléculaire de l'allergène (Barre, A. et al. 2005)

Les monomères sont principalement assemblés en trimères par les interactions hydrophobes. L'hypothèse a été avancée par van Boxtel, E. et al. (2006) que les trimères s'assemblaient lors de l'extraction pour former des oligomères de 600-700 kDa, et que cette forme était prédominante par rapport à la forme trimérique. Cet assemblage en structures plus complexes était dû à la présence d'interactions protéines-proanthocyanidines. Au

niveau cellulaire, les proanthocyanidines sont synthétisés dans le cytosol et stockés dans les vacuoles, tandis que les protéines de réserves sont stockées les corps protéiques. Ainsi, protéines et proanthocyanidines ne sont pas en contact lors de la maturation de la graine, ce qui rend impossible l'interaction proanthocyanidines-protéines. Dès que les deux molécules sont mises en contact (lors de la mastication, par exemple) les oligomères se forment et c'est sous cette forme qu'ils sont donc majoritairement ingérés par l'Homme (van Boxtel, E. L. et al. 2007). Cependant, il n'est pas certain que lors du rôtissage des graines d'arachide, la résistance à la chaleur des proanthocyanidines soit suffisante pour éviter leur dégradation et qu'elles puissent jouer ce rôle.

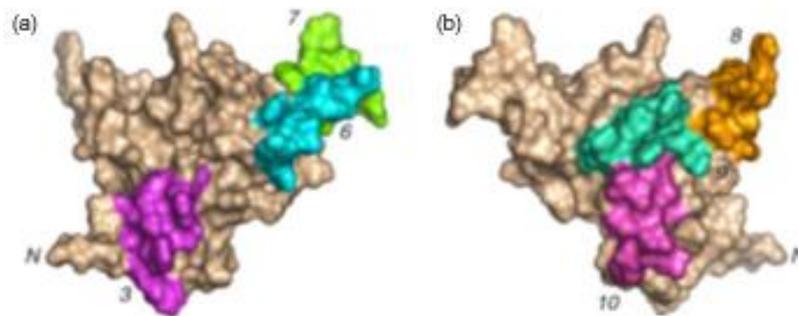
Ara h 1 est une protéine glycosylée, et les oses sont fixés sur des séquences consensus N-X-S/T. Les vicilines 7S en général possèdent un à deux sites de glycosylation dans le domaine C-terminal de la protéine. Dans le cas d'Ara h 1, les glycosylations sont constituées d'un mélange hétérogène de N-glycanes comprenant  $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}$  et  $\text{Man}_{3-4}\text{XylGlcNAc}$  (van Ree, R. et al. 2000).

D'un point de vue allergologique, Ara h 1 est un allergène majeur puisqu'il est reconnu par 70% à 90% des patients allergiques à l'arachide (Burks, A. W. et al. 1991; Clarke, M. et al. 1998). Sa structure oligomérique le rend résistant à la digestion dans le tractus gastro-intestinal, et peut conduire au passage de fragments portant des épitopes B *via* le l'intestin grêle. Les travaux de van Boxtel, E. L. et al. (2008) ont montré que de 2 à 6 épitopes B étaient résistants à la digestion pepsique, et qu'ils étaient tous localisés sur la partie N-terminale de la protéine qui ne présente d'homologie avec aucune autre viciline (Bown, D. et al. 1988). Néanmoins, d'autres épitopes B de la région C-terminale de l'allergène seraient également résistants à la pepsine car dépourvus des sites de clivage reconnus par l'enzyme.

## 2. Ara h 2 et Ara h 6

Ara h 2 est une albumine 2S présente dans les corps protéiques sous la forme de deux isomorphes de poids moléculaire 17 et 20 kDa (Ara h 2.01 et Ara h 2.02 respectivement) initialement découvert par Burks, A. W. et al. (1992). Ara h 2 représente 5,9 à 9,3% des protéines de l'arachide (Koppelman, S. J. et al. 2001). D'un point de vue structural, Ara h 2 est constituée de 5 hélices  $\alpha$  et de 4 ponts disulfures qui stabilisent fortement la structure secondaire, limitant ainsi sa susceptibilité à la protéolyse. Cette structure présente une homologie et une fonction similaire à un inhibiteur de la trypsine (Maleki, S. J. et al. 2003).

Ara h 2.02 possède une séquence identique à Ara h 2.01 avec une insertion de 12 acides aminés après la position 54 et deux substitutions aux acides aminés 40 et 142 (Chatel, J. M. et al. 2003). Cette séquence additionnelle présente le motif DPYSPS qui a été référencé comme épitope immunodominant (Stanley, J. S. et al. 1997). On retrouve ce motif deux fois chez Ara h 2.01 et trois fois chez Ara h 2.02. De ce fait, Hales, B. J. et al. (2004) ont montré que la fréquence de reconnaissance par les IgE était plus forte pour Ara h 2.02 que pour Ara h 2.01 (81,4% et 77,1% respectivement sur une population de 70 enfants allergiques à l'arachide).



**Figure 9 : Surfaces moléculaire de l'albumine 2S Ara h 2**

a) Représentation des épitopes B majeurs – 3, 6 et 7 (N-terminal à gauche)

b) Représentation des épitopes B majeurs - 8, 9 et 10 (N-terminal à droite)

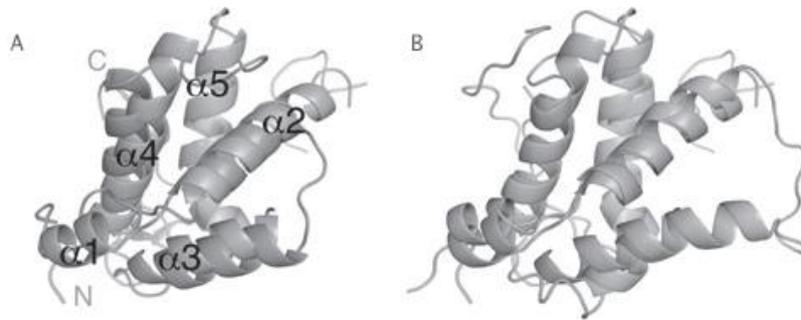
D'après (Barre, A. et al. 2005)

Les épitopes linéaires d'Ara h 2 ont été mis en évidence par le greffage de peptides chevauchants sur cellulose (carte épitopique), reconnus par un pool de sérums de patients allergiques à l'arachide (Stanley, J. S. et al. 1997) et modélisés sur la structure tertiaire de la protéine (Barre, A. et al. 2005). Les 10 épitopes présentent une assez bonne répartition à la surface de la protéine, et leur structure conformationnelle n'est pas retrouvée dans les autres albumines 2S, et n'est donc pas apte à provoquer une réaction croisée (Figure 9).

La digestion enzymatique d'Ara h 2 dans un milieu non réducteur par la trypsine, la chymotrypsine ou la pepsine a produit un certain nombre de peptides résistants à toute dégradation ultérieure. Parmi ces peptides, on retrouve des séquences épitopiques qui conservent un site de reconnaissance par les IgE de patients allergiques et peuvent conduire à une réaction allergique *in vivo*. La digestion en milieu réducteur conduit à une meilleure dégradation de la protéine puisque les ponts disulfures ne maintiennent plus la structure compacte. Cependant, après analyse d'un peptide résiduel de 10 kDa après digestion enzymatique, il a été montré que sa séquence contient 3 des épitopes d'Ara h 2 (dont DPYSPS) et qu'il conservait son immunogénicité. (Sen, M. et al. 2002)

Comparé à Ara h 1 et Ara h 3, il a été démontré par Blanc, F. et al. (2009) chez une population de 12 patients allergiques que les albumines 2S Ara h 2 et Ara h 6 induisaient une bien plus forte dégranulation des basophiles de rats humanisées avec le récepteur FcεR1. L'étude de Koppelman, S. J. et al. (2004) porte sur un panel de 32 patients allergiques à l'arachide. Les études menées portent à la fois sur des conditions *ex vivo*, *in vivo* et *in vitro*, sur l'allergénicité des protéines Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 purifiées : les résultats ont montré qu'Ara h 2 était le plus fréquemment reconnu dans tous les tests, qu'il induisait une réponse positive en provocation cutanée et qu'il provoquait la dégranulation à plus faible concentration qu'Ara h 1 et Ara h 3.

Ara h 6 possède une importante homologie de séquence avec Ara h 2, et on retrouve chez les deux protéines 4 épitopes qui présentent une forte homologie (Figure 10).



**Figure 10 : Comparaison des modèles moléculaires d'Ara h 2 (A) et Ara h 6 (B)**

D'après (Mueller, G. A. et al. 2011)

Des études d'inhibitions sur les interactions d'IgE avec Ara h 2 et Ara h 6 ont été menées avec des sérums de patients allergiques par immunoblots. La préincubation de sérums avec Ara h 6 n'inhibe pas totalement la réaction des IgE avec Ara h 2 alors que la préincubation du sérum avec Ara h 2 inhibe la réaction IgE/Ara h 6. Apparemment, Ara h 2 possède des épitopes que l'on ne retrouve pas chez Ara h 6, et la comparaison des séquences montre qu'effectivement le motif DPYSPS est présent exclusivement dans Ara h 2 et peut ainsi expliquer les réactions d'inhibition constatées (Koppelman, S. J. et al. 2005). La capacité d'Ara h 6 de résister à la protéolyse ainsi qu'à la dégradation thermique ont été mis en avant par Suhr, M. et al. (2004). La comparaison de l'immunoréactivité entre Ara h 2 et Ara h 6 effectuée par Koppelman, S. J. et al. (2005) grâce à des immunoblots ne permet pas d'évaluer l'allergénicité intrinsèque d'Ara h 6. Flinterman, A. E. et al. (2007) ont réalisé une série de prick tests sur une population de 20 enfants allergiques à 20 mois d'intervalle. Ils

ont constaté qu'Ara h 6 montrait une plus forte réactivité en prick test qu'Ara h 2, et que cette réactivité ne diminuait pas avec le temps. Pour justifier de cette réactivité d'Ara h 6, ils ont proposé une meilleure exposition de leurs épitopes. D'un point de vue épidémiologique, la même étude présentant un pool représentatif de patients a chiffré la reconnaissance d'Ara h 6 par 85% des enfants (100% pour Ara h 2).

Ara h 2 et plus généralement les albumines 2S feraient donc partie des allergènes les plus reconnus et les plus à même de provoquer une réaction allergique chez les patients.

### 3. Ara h 3/4

Ara h 3 appartient à la famille des globulines 11S, que l'on retrouve en tant qu'allergènes dans nombre de fruits à coques et légumes.

Initialement, Eigenmann, P. A. et al. (1996) identifièrent un nouvel allergène nommé Ara h 3 comme une protéine de 14 kDa, qui s'avéra par la suite n'être en fait que la partie N-terminale de la sous-unité acide de la protéine Ara h 3 mature. Quelques années plus tard, les travaux de Rabjohn, P. et al. (1999) montrèrent grâce à la biologie moléculaire que la protéine recombinante codant Ara h 3 atteignait 60kDa. Simultanément, Kleber-Janke, T. et al. (1999) identifièrent un nouvel allergène, nommé Ara h 4 par l'IUIS (International Union of Immunological Societies) Allergen Nomenclature Sub-Committee qui a une homologie de séquence de 91% avec Ara h 3. Les deux allergènes peuvent donc être considérés comme des isoallergènes et seront traités indifféremment par la suite. Les globulines 11S sont souvent présentes sous plusieurs isoformes, codés par différents gènes (on en compte 5 chez Ara h 3 (Yan, Y.-S. et al. 2005)). Chaque traduction de gène conduit à la formation d'un précurseur de la protéine qui subit un clivage post-traductionnel et la formation d'un pont disulfure entre les sous-unités N-terminale et C-terminale de la protéine, appelées plus communément sous-unités acide (~40kDa) et basique (~20kDa) respectivement. Dans la graine mature, les globulines 11S existent sous la forme d'hexamère, ou de l'empilage de deux homotrimères similairement orientés. Comme dans Ara h 1, l'homotrimère d'Ara h 3 résulte de l'association non covalente des trois protomères par leurs extrémités. L'hexamère, qui est en réalité un dimère de trimères, résulterait de l'association par des liaisons essentiellement électrostatiques, des deux homotrimères. En effet, la répartition des charges électrostatiques dans l'homotrimère, montre une face à prédominance électro négative (acide) et une face à prédominance électro positive (basique). Cette

structure à été résolue par radiocristallographie en 2009 (Jin, T. et al. 2009). La séquence d'Ara h 3 présente deux sites de N-glycosylation putatifs : Asn267-Glu-Ser and Asn349-Arg-Ser. Cependant, l'analyse biochimique et spectrométrique montre qu'Ara h 3 n'est apparemment pas glycosylée.

La caractérisation biochimique d'Ara h 3 par Koppelman, S. J. et al. (2003) a montré que la protéine subissait un clivage protéolytique conduisant à l'apparition de nombreux polypeptides en complément des deux sous-unités majeures. Ainsi, en séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes, on retrouve des peptides de 45 et 42 et 14 kDa qui ont leur séquence N-terminales identiques avec le peptide de 14 kDa identifié par Eigenmann, P. A. et al. (1996). On retrouve aussi d'autres peptides de 28, 25 (sous-unité basique), et 16 kDa. Un travail complémentaire utilisant la spectrométrie de masse comme outil d'analyse a permis à Piersma R.S. et al. (2005) de définir les sites de clivage post-traductionnel d'Ara h 3. Ils ont montré que les coupures protéolytiques ne se produisent exclusivement qu'au sein de la sous-unité acide et conduisaient à la formation de peptides de masses moléculaires réparties entre 13 et 45 kDa. La sous-unité basique, est représentée par une unique bande à 23 kDa, contrairement à l'analyse de Koppelman, S. J. et al. (2003) qui l'avait identifiée comme un doublet aux alentours de 25 – 28 kDa.

La plupart des différentes études épidémiologiques réalisées dans des pays industrialisés ont montré que sur une population de patients allergiques, plus de 50% des patients reconnaissent Ara h 3, le classant ainsi comme un allergène majeur de l'arachide.

Pays	Population allergique	Pourcentage de patients qui reconnaissent Ara h 3	Source
<b>Allemagne</b>	40 patients	53%	(Kleber-Janke, T. et al. 1999)
<b>Pays-Bas</b>	14 patients	60%	(de Jong, E. C. et al. 1998)
<b>Etats-Unis</b>	18 patients	44%	(Rabjohn, P. et al. 1999)

**Tableau 3: Données épidémiologiques sur Ara h 3 dans l'allergie à l'arachide.**

Les chiffres présentés dans le Tableau 3 sont cependant moins élevés que ceux obtenus pour Ara h 1 ou les albumines 2S Ara h 2 et Ara h 6. Ainsi, même si Ara h 3 peut être considéré comme un allergène majeur, son rôle dans l'allergie à l'arachide est moindre comparé aux autres allergènes.

Différentes études ont porté sur l'identification des épitopes de la protéine : initialement, (Rabjohn, P. et al. 1999) identifiaient quatre épitopes de 10 à 15 acides aminés liant les IgE de patients grâce à la méthode des peptides 15-mer synthétiques chevauchants avec un recouvrement de 8 acides aminés (carte épitopique). Ces épitopes séquentiels ont été amenés au nombre de 8 par l'équipe de Rouge, P. et al. (2009) en utilisant la même technique avec un recouvrement d'acides aminés porté à 12. Parmi ces 8 épitopes, deux d'entre eux recouvrent en partie les épitopes identifiées par Rabjohn, P. et al. (1999). Cette différence peut être expliquée par l'utilisation de deux séquences peptidiques légèrement différentes, mais aussi par l'utilisation de séra de deux groupes de patients différents entre les études. La mise en exergue d'épitopes qui sont reconnus par un groupe de patients mais pas par un autre peut être expliqué par le petit effectif des groupes utilisés : 7 et 8 patients allergiques pour Rabjohn, P. et al. (1999) et Rouge, P. et al. (2009), respectivement. Dans l'étude de ces derniers, les zones épitopiques correspondent majoritairement à des zones d'électropositivité réparties à la surface de la protéine, et sont répartis aussi bien sur la sous-unité acide que sur la sous-unité basique de la protéine.

#### 4. Autres allergènes

Parmi les allergènes mineurs de l'arachide, on retrouve Ara h 5, une profiline de 15 kDa (Kleber-Janke, T. et al. 1999), Ara h 7, une albumine 2S de 16 kDa (Schmidt, H. et al. 2010) assez différente d'Ara h 6 par sa séquence, Ara h 8, protéine PR-10 un homologue de Bet v 1 de 16,9 kDa (Riecken, S. et al. 2008), Ara h 9 une protéine de transfert de lipides (ou LTP pour Lipid Transfert Protein) de 10 kDa (Asero, R. et al. 2000), Ara h 10 et Ara h 11, deux oléosines de poids moléculaires compris entre 18 et 14 kDa, et Ara h 12 et Ara h 13 qui correspondent à des défensines donc les ARNm ont été caractérisés dans les gousses d'arachide. Citons enfin la lectine (PNA) ou Ara h Agglutinin donc le caractère allergénique a été démontré par Burks, A. W. et al. (1994) et confirmé par Rougé, P. et al. (2010) (Tableau 4). Les études de reconnaissance immunologique par les IgE de patients allergiques à l'arachide ont montrées que la profiline Ara h 5 est reconnue par 16 et 13 % des patients sur des cohortes de 50 et 40 patients, respectivement (Kleber-Janke, T. et al. 1999; Kleber-Janke, T. et al. 2001). Cette protéine joue un rôle structural et de régulation de la dynamique de polymérisation des microfilaments d'actine. Elle est thermolabile et résiste mal à la digestion protéolytique (Hauser, M. et al. 2008). C'est un panallergène.

Allergène	Famille	Poids moléculaire (kDa)	Source
<b>Ara h 5</b>	Profiline	15	(Hauser, M. et al. 2008)
<b>Ara h 7</b>	Albumine 2S	16	(Schmidt, H. et al. 2010)
<b>Ara h 8</b>	Homologue de Bet v 1	16,9	(Breiteneder, H. and Mills, E. N. C. 2005)
<b>Ara h 9</b>	Protéine de transfert de lipide (nSLTP)	10	(Hauser, M. et al. 2008)
<b>Ara h 10</b>	Oléosine	16 ,18 (isoformes)	(Cabanos, C. et al. 2011)
<b>Ara h 11</b>	Oléosine	14	(Cabanos, C. et al. 2011)

Tableau 4 : Les allergènes mineurs de l'arachide référencés selon l'IUIS ([www.allergen.org](http://www.allergen.org))

L'albumine 2S Ara h 7 est une protéine difficile à isoler, car peu abondante et du fait de son poids moléculaire voisin de celui de nombreuses autres protéines de l'arachide (entre autres, les albumines 2S) elle se colocalise dans la même gamme de séparation électrophorétique. De plus, il n'existe aucun sérum ni anticorps monoclonal dirigé exclusivement contre cette protéine, qui permettrait une purification immunologique de la protéine. Cependant, les études de Schmidt, H. et al. (2010) ont permis la caractérisation en spectrométrie de masse de deux isoformes d'Ara h 7. Les essais de Codreanu, F. et al. (2011) utilisant l'allergène recombinant rAra h 7 pour l'étude de l'immunoréactivité des sérums de patients allergique à l'arachide ont montré que sur une cohorte de 166 patients, 43,37% des patients reconnaissent la protéine rAra h 7.

Ara h 8, protéine PR-10 l'homologue de l'allergène majeur du pollen de bouleau Bet v 1, est une protéine de la famille des PR-10 (plant pathogenesis-related protein), dont la production est induite par le stress. Cet allergène est identifié comme mineur, puisqu'il est reconnu par moins de 50% des patients allergiques à l'arachide. Cependant, chez les patients allergiques au pollen de bouleau, donc sensibilisés à la protéine Bet v 1, l'étude de Mittag, D. et al. (2004) a montré que 80% d'entre eux produisaient des IgE dirigés contre la protéine recombinante rAra h 8.

Les LTP sont des protéines de transfert de lipides qui permettent de transporter les lipides depuis le réticulum endoplasmique vers les différents organites de la cellule dont les membranes sont constituées de lipides (chloroplastes, mitochondries, membrane plasmique). La protéine Ara h 9 est une protéine de transfert non spécifique, qui est classée comme mineure par l'IUIS. L'étude de Vereda, A. et al. (2011) basée sur trois populations

différentes de patients allergiques à l'arachide (Espagne, USA et Suède) montre que la protéine recombinante rAra h 9 n'est pas reconnue de manière homogène selon la population testée : 60%, 7,7% et 14,3% des espagnols, américains et suédois reconnaissent rAra h 9, respectivement. De manière globale et en ramenant les populations à une seule et même cohorte de patients, la protéine rAra h 9 est reconnue par 33,3% des patients allergiques, justifiant ainsi son appartenance à la catégorie des allergènes mineurs.

Les oléosines Ara h 10 et Ara h 11 sont de petites protéines fortement hydrophobes mais néanmoins amphiphiles qui constituent la membrane des globules lipidiques des cellules de la graine. Leur immunoréactivité a été étudiée dans une cohorte de 14 patients allergique à l'arachide, et seulement 3 d'entre eux ont reconnu la protéine de 18 kDa identifiée comme Ara h 10, allergène mineur de l'arachide (Pons, L. et al. 2002).

La PNA fait partie de la famille des lectines, protéines très répandues dans le monde végétal. La PNA possède un poids moléculaire d'environ 30 kDa et une structure quaternaire formée de quatre protomères qui présentent chacun une structure de 7 feuillets  $\beta$  incurvés (face avant) et de 6 feuillets  $\beta$  aplatis (face arrière), reliés entre eux par 4 feuillets  $\beta$ . Le sommet du protomère est formé par 4 boucles convergentes qui constituent le site de liaison aux sucres. La PNA montre une forte résistance à la dégradation par les enzymes digestives et à la dénaturation par la chaleur. Sur l'analyse tridimensionnelle réalisée par l'équipe de Rougé, P. et al. (2010), ceux-ci ont mis en avant les sites de reconnaissances par les IgE de patients allergiques, amenant ainsi le nombre d'épitopes à 6.

### **C. Les corps protéiques : organe de stockage des protéines de réserve**

Dans le but de fournir à l'embryon et à la jeune plante les nutriments nécessaires à leur développement lors de la germination, la graine d'arachide accumule des réserves lors de sa maturation. Ces réserves sont constituées par des substances azotées (protéines) et des lipides, et en moindre quantité dans le cas de l'arachide d'amidon. Les protéines stockées dans les corps protéiques, appelées protéines de réserve (seed storage proteins), forment un réseau que l'on désignait auparavant comme « grain d'aleurone », réparti uniformément dans tout l'organe de réserve (Aldon, D. 2012). Chez l'arachide, ces corps protéiques sont des organites de forme sphérique d'un diamètre moyen de 20  $\mu\text{m}$  entourés d'une membrane analogue à celle du tonoplaste.

## 1. Biosynthèse et assemblage des protéines de réserve

Les études de biologie structurale mettent en œuvre des techniques d'observation *in vitro* afin d'obtenir des informations précises sur la protéine et la matrice de la graine de l'arachide. Ainsi, la localisation subcellulaire des protéines de réserve de l'arachide a montré que ces protéines étaient présentes dans les graines exclusivement, et absente dans les feuilles, les fleurs et les racines. La technique d'impression sur membrane des tissus de l'arachide (tissue printing) suivi d'un marquage immunologique a permis de localiser les protéines de réserves dans les cotylédons et dans une moindre quantité au sein des axes embryonnaires (Kang, I. H. et al. 2007). La synthèse des protéines de réserve se déroule dans le réticulum endoplasmique rugueux. Les protéines synthétisées possèdent initialement un peptide signal qui permet la translocation de la chaîne polypeptidique dans la lumière du réticulum endoplasmique et guide l'adressage futur de ces polypeptides. Durant le séjour dans le réticulum endoplasmique, les ponts disulfures sont formés, plusieurs polypeptides peuvent être assemblés selon une structure oligomérique et les vicillines (Ara h 1) sont glycosylées (Herman, E. M. and Larkins, B. A. 1999). Dans le cas de la globuline 11S, c'est la conservation du peptide signal qui empêche sa trimérisation *in vitro*, ce qui montre ainsi l'importance du clivage de cette courte séquence lors des étapes d'assemblage protéique (Dickinson, C. D. et al. 1987). Les protéines synthétisées peuvent s'accumuler selon deux voies : la voie réticulaire et la voie vacuolaire. Dans le cas de l'arachide, c'est la voie vacuolaire qui est largement favorisée. Après le passage dans le réticulum endoplasmique, les polypeptides sont inclus dans des vésicules primaires qui sont acheminées vers les dictyosomes, qui composent l'appareil de Golgi. Cette voie peut être guidée par la présence d'une séquence d'adressage vacuolaire que l'on retrouve au sein des séquences des polypeptides : la séquence NTTP (séquence consensus NPIR en position N-terminale) ou CTPP (séquence hydrophobe en position C-terminale). Au niveau des dictyosomes (appareil de Golgi), les protéines subissent les étapes de maturation (terminaison de la glycosylation qui a débuté dans le réticulum) avant d'être transportées au sein de vésicules de Golgi vers les vacuoles où se déverse le contenu par fusion des membranes. Une fois dans la vacuole, les protéines peuvent subir de nouvelles étapes de maturation. Par exemple, la globuline 11S passe de la forme trimérique à la forme hexamérique sous l'action de la VPE (Vacuolar Processing Enzyme). Cette endopeptidase permet le clivage de la chaîne peptidique  $\alpha$ - $\beta$  en deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , liées par un pont disulfure formé dans le réticulum endoplasmique.

Cette étape permet d'aboutir à l'assemblage final des globulines 11S en hexamères. Ainsi, lors de la maturation de la graine, les vacuoles de réserve s'enrichissent en protéines et se déshydratent. L'empilement des globulines à motif cupine, vicilines et légumine, crée un véritable réseau pseudo-cristallin, extrêmement riche en protéines, à l'intérieur du corps protéique. On pense que l'hydratation de la graine au moment de sa germination entrainerait l'hydrolyse progressive des globulines, qui libèreraient les acides nécessaires au développement de la jeune plante avant qu'elle ait pu acquérir son autotrophie.

## 2. L'aspect matriciel de l'arachide reliée à l'allergénicité

Les graines matures possèdent des protéines de réserves stockées de façon dense et compacte au sein des corps protéiques. Les protéines peuvent présenter une organisation amorphe ou cristalline et différenciées en sous-domaines contenant différents types de protéines. Ces sous-domaines peuvent être formés d'inclusion de phytine, de cristaux protéiques, ou d'autres vésicules intravacuolaires. La plupart des analyses de corps protéiques en microscopie électronique montrent que les protéines de réserves sont agrégées en cristaux ou de manière amorphe et déposées de façon adjacente à la surface interne (Herman, E. M. and Larkins, B. A. 1999).

La sensibilisation d'un patient par un allergène provoque une chaîne de réactions immunologiques encore peu connue à ce jour. Cependant, l'hypothèse où les fragments d'allergènes ou les allergènes entiers doivent franchir la muqueuse gastro-intestinale pour interagir avec le système immunitaire est couramment acceptée. Ainsi, afin de pouvoir parvenir à une sensibilisation, les protéines doivent pouvoir résister à la dégradation par la pepsine de l'estomac, franchir le duodénum (protéases pancréatiques) avant d'atteindre la barrière épithéliale de l'intestin. L'étude de Chambers, S. J. et al. (2004) a montré que les peptides immunoréactifs atteignent les surfaces séreuses soit par les entérocytes, les cellules dendritiques ou les cellules M des plaques de Peyer. La digestibilité des allergènes par dégradation *in vitro* simulant la digestion stomacale a été réalisée sur les allergènes majeurs de l'arachide (Koppelman, S. J. et al. 2010). Ara h 2 et Ara h 6 montrent une excellente résistance à la dégradation pepsique. Cela est expliqué par la présence des 4 ponts disulfure qui stabilisent la structure tertiaire de la protéine. En ce qui concerne Ara h 1 et Ara h 3, leur stabilité par rapport à la pepsine est moindre, puisqu'ils sont dégradés en moins d'une minute dans les conditions de concentration pepsique et de pH de l'estomac.

Cependant, cette étude a utilisé des allergènes natifs purifiés, et fait donc fi de l'aspect matriciel de l'aliment et de la structure des corps protéiques. En effet, une étude de Oria, M. P. et al. (2000) a montré l'importance de la structure des corps protéiques sur la digestibilité des protéines. Leur modèle est basé sur une variété du sorgho (P851171), dont la modification des corps protéiques conduit à de larges invaginations et une forme irrégulière. En comparant la digestibilité des protéines de réserve de la variété P851171 et celle cultivée classiquement, il a été montré que les protéines de P851171 sont nettement mieux dégradées. Des études complémentaires d'immunohistochimie ont révélé des changements de la compartimentation des protéines chez P851171, conduisant à une plus grande surface d'échange justifiant la plus grande digestibilité, sans pour autant que la localisation des protéines de réserve au sein des corps protéiques soit modifiée. Cette étude est déterminante pour la compréhension de l'effet matriciel sur la digestibilité des protéines de réserve.

## **D. Arachide et Industrie alimentaire**

### **1. Comme aliment ou additif**

L'arachide est un aliment que l'on retrouve couramment dans les procédés utilisés dans l'industrie alimentaire. Ses qualités nutritionnelles liées à sa forte teneur en protéines s'ajoutent aux propriétés fonctionnelles qui donnent aux aliments leur qualité organoleptique et changent leurs caractéristiques. Par exemple, la solubilité, l'hydratation, la coagulation, la viscosité ou la texturation d'un aliment peut être modifiée par l'addition d'arachide sous forme de farine, ou d'isolat de protéines. En ce qui concerne les liquides, les propriétés émulsifiantes ou moussantes sont aussi des propriétés fonctionnelles qui peuvent être modifiées par l'addition d'arachide au produit de base. Ces propriétés fonctionnelles sont aussi fonction de l'environnement physico-chimique des protéines : pH, température, force ionique, agitation, présence d'enzymes, etc (Franck, P. 2008).

L'utilisation croissante de l'arachide comme auxiliaire de fabrication conduit à une augmentation des risques pour les sujets allergiques, et à une augmentation de la sensibilisation parmi la population générale due à une exposition à l'aliment plus importante (Dubuisson, C. et al. 2002)

Afin d'éviter le plus possible les risques de réaction allergique chez les patients sensibilisés, un étiquetage stricte des aliments en contenant a semblé nécessaire. Avant 1999, le Codex Alimentarius, organisme international qui édicte un ensemble de normes générales destinées à assurer la qualité et l'innocuité des aliments, n'avait pas édicté de règles précises quant à la signalisation de la présence d'allergènes dans les aliments, et l'information était largement insuffisante pour les consommateurs souffrant d'allergies.

Depuis Novembre 2005, deux nouvelles normes ont été adoptées par le Codex Alimentarius relatives à l'étiquetage des denrées alimentaires pré-emballées, et rendent ainsi obligatoire la signalétique des aliments reconnus comme allergéniques, dont l'arachide. L'avantage de ces nouvelles normes place les allergènes à un statut particulier : ils doivent être indiqués sur les aliments ayant dérogation à l'obligation générale d'étiquetage (chocolat, vin, etc...), il faut préciser clairement l'ingrédient incriminé et non pas sa catégorie, et ils doivent être étiqueté même s'ils sont utilisés en tant qu'additif alimentaire ou auxiliaire technologique sans fonction technologique dans le produit final. Toutes ces mesures permettent au consommateur allergique de faciliter son régime d'éviction totale, même si l'ubiquité de l'arachide dans l'industrie alimentaire rend la tâche de plus en plus compliquée.

Une directive européenne (Annexe III a de la Directive 2003/89/CE) signale l'étiquetage obligatoire de différentes catégories d'allergènes qui peuvent être présents dans les aliments commercialisés (les céréales contenant du gluten, le poisson, les crustacés, les œufs, les cacahuètes, le soja, le lait et produits laitiers y compris le lactose, les noix, le céleri, la moutarde, les graines de sésame, le lupin, les mollusques et les sulfites). En France, cet étiquetage est rendu obligatoire par l'article R-112-16-1 du code de la consommation.

## **2. Influence des traitements industriels sur les propriétés des protéines**

L'arachide existe sous différentes formes et aspects, et est donc soumise à une très grande variabilité de conditions lors de la mise en œuvre des procédés industriels. Le but de ces traitements est d'améliorer la qualité de goût, de texture, d'apparence, d'odeur, mais aussi de parvenir à obtenir des « farines », des huiles, des isolats de protéines, ou plus généralement d'extraire certaines classes de composés à partir de l'aliment initial. Ces procédés peuvent être mécaniques, impliquer des procédés de séparation, de purification, faire appel à des sollicitations thermiques, utiliser des agents biochimiques, ou mettre en

œuvre des traitements sous haute pressions ou d'irradiation, par exemple. De façon générale, tous ces procédés peuvent être classés en deux domaines : ceux utilisant de la chaleur, et ceux n'en utilisant pas. Les analyses menées pour évaluer les modifications des propriétés (digestibilité, allergénicité, agrégation...) apportées aux protéines lors de la mise en œuvre de procédés utilisent différents modèles, mais rarement l'arachide entière telle qu'elle est consommée communément. Ainsi, les résultats présentés ne prennent que rarement en compte l'effet matriciel des protéines de l'arachide dans leur environnement, et ne sont de ce fait que des simulations plus ou moins réalistes des modifications réelles.

### 3. Les procédés thermiques

Les procédés thermiques sont variés, et dans le cas de l'arachide, ils se limitent principalement au rôtissage, à la friture, au grillage, à l'ébouillantage. L'action de la température sur les protéines induit une dénaturation qui déstructure la configuration native de la protéine. A température ambiante, la protéine possède une conformation qui tend à diminuer l'énergie totale pour atteindre un équilibre. Lors de l'augmentation de la température, la dénaturation provoque la perte de la structure tertiaire (55-70°C), la perte du repliement caractéristique des structures secondaires (70-80°C). A partir de 80-90°C, les ponts disulfures peuvent se cliver et à partir de 90-100°C, apparaît la formation de liaisons intra- et intermoléculaires entre les protéines et le réarrangement des ponts disulfures. Au-delà de 100°C, les protéines forment un réseau covalent : l'agrégat (Davis, P. and Williams, S. 1998). Cependant, ces modifications sont dépendantes de l'environnement physico chimique des protéines et de leurs propriétés intrinsèques, et peuvent conduire à des changements de leur allergénicité. La dénaturation thermique des protéines reste un phénomène complexe, et très dépendant de la nature des protéines. Par exemples, les protéines fibrillaires résistent bien mieux que les protéines globulaires à la dénaturation thermique, même si des exceptions existent. L'étude d'enzymes d'organismes extrémophiles montrent des résistances à la dénaturation a des températures de l'ordre de 100°C dans les résurgences marines d'eau chaude. Ces protéines servent de modèle pour comprendre le mécanisme de résistances aux températures élevées.

Maleki, S. J. et al. (2000) ont montré que lors d'un fort chauffage d'un milieu contenant les protéines et des sucres de l'arachide, la capacité de liaison aux IgE de patients allergiques était augmentée de 90 fois pour l'arachide traitée thermiquement par rapport à l'arachide

crue. A l'inverse, l'étude de Burks, A. W. et al. (1992) ne met en avant aucune modification de la liaison des IgE de patients avec des protéines thermiquement traitées ou non traitées. La disparité dans les résultats obtenus peut être expliquée par la différence des protocoles mis en œuvre (dans la deuxième étude, Burks, A. W. et al. (1992) n'ajoutent pas de sucres aux protéines purifiées avant de réaliser le chauffage). Ces deux études ne permettent cependant pas d'obtenir des résultats que l'on pourrait mettre en relation avec un rôtissage « classique » puisque la perte de l'effet matriciel et de la réactivité entre protéines et autres composants de la graine n'est pas prise en compte.

a. Réaction de Maillard – Chaleur sèche

L'arachide avant d'être consommée est conventionnellement grillée à sec dans les pays occidentaux, alors qu'elle est plutôt consommée bouillie ou frite en Asie. Le rôtissage se fait classiquement à des températures élevées de l'ordre de 140°C, et pendant une durée variable de 10 à 20 minutes. Ce rôtissage entraîne les modifications physiques que nous avons énumérées ci-avant. Mais de telles températures provoquent aussi des modifications chimiques qui sont à l'origine de la formation des liaisons covalentes entre les résidus lysine et les résidus glutamine et asparagine des protéines, de la formation d'un pont lysino-alanine par substitution de la fonction OH de la sérine ou SH de la cystéine sur la fonction N-terminale de la lysine (Figure 11), et de la formation de produits de Maillard qui conduisent à la formation d'adduits. (Franck, P. 2008).

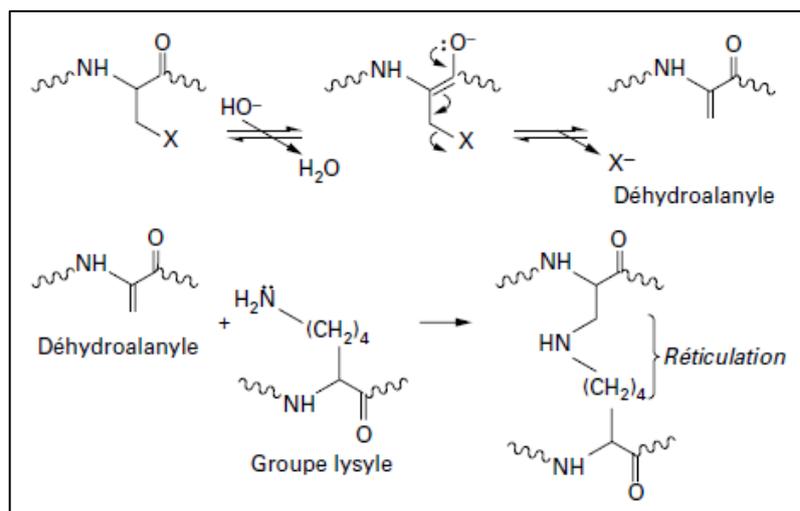


Figure 11 : Formation d'un pont lysino-alanyle (D'après Lorient, D. (2010))

La réaction de Maillard (ou brunissement non enzymatique, ou glycation) est initiée par l'attaque nucléophile d'un groupe aminé de résidu lysyle de protéine sur un groupement

carbonyle. Il en résulte la formation d'une base de Schiff qui s'isomérisse en glycosylamine N-substituée, et qui, après réarrangement d'Amadori donne une cétosamine. Ce dernier composé peut connaître différents chemins réactionnels selon les conditions du milieu, et en particulier la teneur en eau (Figure 12).

La réaction de Maillard permet de modifier la couleur d'un aliment (brunissement non enzymatique), de modifier le goût et l'arôme par l'apparition de molécules volatiles (aldéhydes, cétones, pyrazines, furanes et furanones, thiophènes, etc...). Ainsi, le rôtissage de l'arachide provoque d'importantes modifications chimiques : les protéines et des sucres tels que le glucose, le mannose, le xylose, l'arabinose, et le galactose que l'on retrouve dans l'arachide (Maleki, S. J. et al. 2000) réagissent entre eux pour former des produits de Maillard. La formation finale d'agrégats en fin de réaction de Maillard induit une insolubilisation partielle des protéines (Schmitt, D. A. et al. 2009; Vissers, Y. M. et al. 2011). Ainsi, Ara h 1 perd 95% de sa solubilité après chauffage en présence de glucose, et Ara h 2 perd 42% de sa solubilité, avec ou sans addition de glucose. Le nombre de résidus de cystéines dans les albumines 2S peut expliquer cette agrégation sans présence de glucose : à partir de 100°C, on assiste à des réarrangements des ponts disulfures qui peuvent conduire à des ponts intermoléculaires, liant les protéines entre elles jusqu'à l'insolubilisation. La réaction de Maillard sur les protéines de l'arachide entraîne une modification de leur allergénicité : lors du chauffage d'Ara h 2 native en présence de différents sucres, la réaction de Maillard se produit et la réactivité des IgE de patients allergiques par rapport à Ara h 2 est augmentée (Maleki, S. J. et al. 2003). Plus précisément, la fixation des IgE de patients allergiques à la surface de la protéine Ara h 2 est augmentée après la réaction de Maillard au niveau des épitopes 6 et 7, sites de la glycation non enzymatique lors du chauffage (Gruber, P. et al. 2005).

D'autre part, il a été aussi montré que le rôle d'inhibiteur de trypsine d'Ara h 2 est 4 fois plus important après chauffage impliquant la réaction de Maillard (Maleki, S. J. et al. 2003), et menait à entraîner une altération de la digestibilité des protéines de l'arachide (Mills, E. N. C. et al. 2009). En ce qui concerne Ara h 1, l'étude de Vissers, Y. M. et al. (2011) montre que sa capacité de liaisons aux IgE de patients allergiques est réduite par la réaction de Maillard en dosage EAST (Enzyme Allergo-Sorbent Test), alors que la capacité de dégranulation des basophiles sensibilisés avec les mêmes sérums devient bien plus importante vis-à-vis de la protéine Ara h 1 chauffée. L'agrégation des protéines par la chaleur entraîne la diminution

de la surface d'exposition par le masquage possible de certains épitopes, ce qui pourrait justifier la diminution du signal en dosage EAST : pour la même quantité de protéines, le fait que celles-ci soient agrégées diminue la quantité d'épitopes à la surface, et diminue ainsi le nombre de sites de fixation des IgE de patients allergiques, ce qui diminue le signal obtenu. Toutefois, la formation d'agrégats par la réaction de Maillard provoque une augmentation de volume des groupements protéiques, et induit alors la présence d'épitopes sur une plus grande surface d'exposition. Cette propriété favoriserait ainsi le pontage des IgE fixés à la surface des basophiles sensibilisés et augmenterait ainsi la capacité de dégranulation de l'histamine. Ainsi, les protéines agrégées montrent une plus grande facilité à provoquer la dégranulation que les protéines natives, due principalement à la taille des particules par rapport au pontage des IgE. Cette hypothèse avait déjà été avancée par Kopper, R. A. et al. (2005) qui avaient prouvé qu'une augmentation du temps de grillage de l'arachide diminuait la solubilité d'Ara h 1 par la formation d'interactions entre les produits de Maillard conduisant à l'agrégation des protéines par la chaleur sans que pour autant que les tests immunologiques confirment l'augmentation de l'allergénicité. Les procédés thermiques mis en œuvre avant de consommer l'arachide varient selon les régions du monde. En Chine, où l'arachide est consommée frite ou bouillie, les sujets allergiques à l'arachide sont largement minoritaires comparés à ceux allergiques aux fruits de mer (Kim, J. S. et al. 2008). Aux Etats-Unis, où l'arachide est consommée le plus souvent grillée à sec, l'arachide occupe la première place des allergies alimentaires. Ces données épidémiologiques laissent à penser que la façon de cuire l'arachide avant la consommation peut influencer sur la sensibilisation des populations, et donc agir sur l'allergénicité des arachides. Il a été montré que, lors du chauffage, la teneur en eau avait une grande influence sur la réaction de Maillard. En effet, en présence d'eau, les interactions entre les protéines et les sucres réducteurs sont amoindries par l'effet de solvant. Gekko, K. and Timasheff, S. N. (1981) ont montré que les interactions protéines-protéines sont réduites par la présence d'eau, et facilitait la dénaturation thermique des protéines. Beyer, K. et al. (2001) ont réalisés des essais de cuissons selon différents procédés utilisés pour cuire les arachide : friture, ébouillantage et rôtissage. Les protéines extraites après ces traitements thermiques ont montrés des différences dans les profils électrophorétiques et dans l'immunoréactivité par rapport à des séra de patients allergiques. Évalué par Western Blot, les allergènes majeurs Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 présentent une allergénicité réduite pour les traitements de friture et

ébullantage comparé au rôtissage. Mondoulet, L. et al. (2003) ont poussé l'étude sur l'ébullantage des arachides un peu plus loin, puisqu'ils ont analysé les protéines dans les graines ainsi que dans l'eau de cuisson, et les ont comparés en dosage de la réponse des IgE spécifiques par rapport à des arachides crues et grillées. Les résultats obtenus ne font pas apparaître de différences majeures dans les profils électrophorétiques obtenus. Cependant, les médianes des réactivités IgE vis-à-vis des extraits protéiques montrent une réduction du signal comprise entre 1,5 et 2 pour l'extrait bouilli comparé aux extraits crus et grillés.

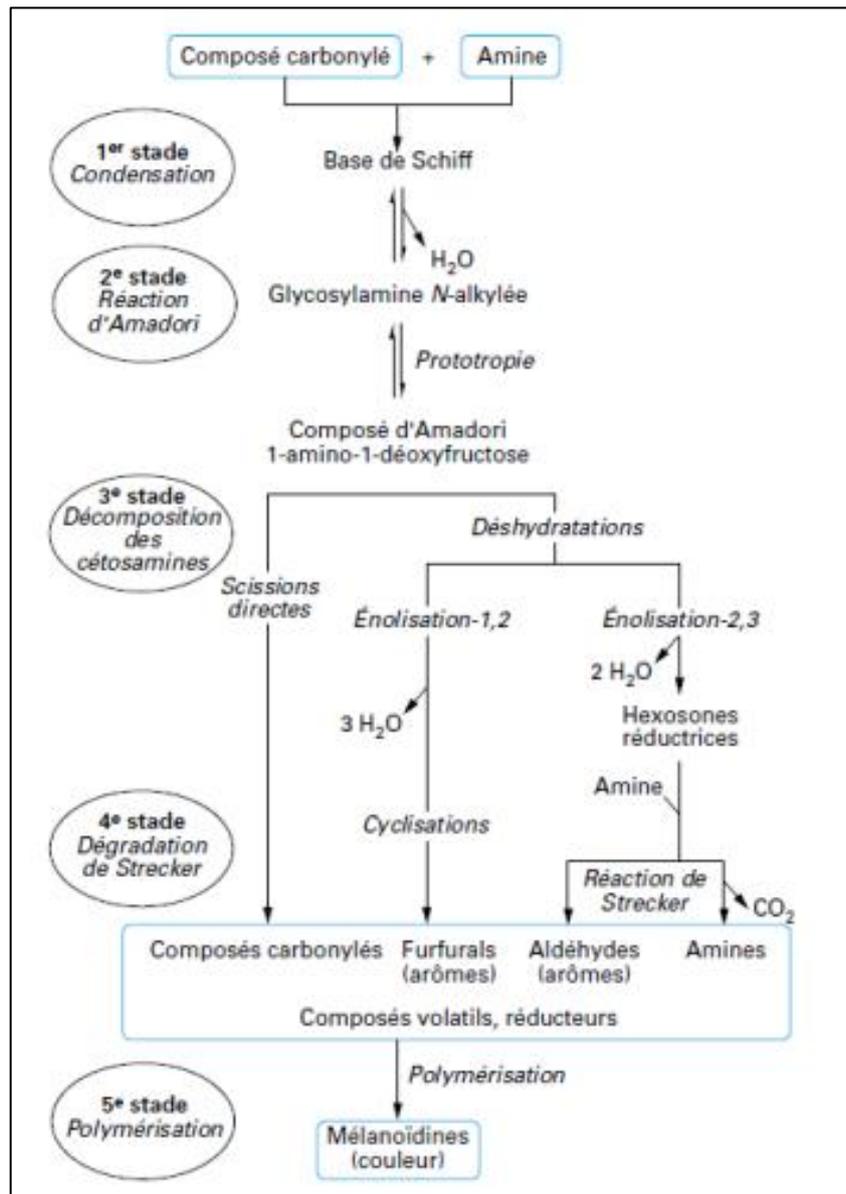


Figure 12 : Schéma général des réactions de Maillard (D'après Lorient, D. (2010))

*b. Procédé thermique par voie humide*

La technique de chauffage de l'arachide par voie humide permet donc, si ce n'est de réduire de peu l'allergénicité de l'aliment, au moins de limiter l'augmentation de l'allergénicité qui a été constaté lors d'un chauffage à sec.

### **III. Réduction de l'allergénicité**

#### **A. Définition**

L'apparition de la notion d'hypoallergénicité remonte aux années 1970, et s'appliquait initialement à des produits industriels qui ont des contenus réduits ou sont exempts de réactogènes chimiques connus comme les lessives et cosmétiques, principalement. A partir de 1977, la Food and Drug Administration américaine (FDA) a réclamé des études concernant le bienfondé de cette allégation, et la cour d'appel du district de Columbia a invalidé le terme même d'hypoallergénicité. La notion est restée employée à titre publicitaire, et s'est étendue plus tard aux allergènes protéiques avec la prise en compte des allergènes du latex, puis des allergènes des laits infantiles à base de lait de vache (Moneret-Vautrin, D. A. and Kanny, G. 2007). Depuis une dizaine d'années, la réduction de l'allergénicité des protéines alimentaires est devenue une préoccupation majeure et a donné lieu à de nombreux projets de recherche à travers le monde. Cependant, la notion d'hypoallergénicité appliquée à un aliment est compliquée, puisque l'allergénicité intrinsèque varie énormément d'un aliment à l'autre (l'épinard est, par exemple, l'aliment typique hypoallergénique). De plus, la réaction allergique est très dépendante de chaque patient, et il n'existe pas de « dose minimal nocive » (Lower Amount of Offending Food) standard.

Ainsi, il n'existe pas vraiment de règle applicable de façon universelle pour définir l'hypoallergénicité d'un aliment, et prédire si une protéine présente non un caractère allergénique par l'étude de sa séquence reste de l'ordre de l'hypothèse (Bannon, G. 2004). Depuis les dernières années, l'hypoallergénicité est définie par rapport aux patients et non plus par rapport aux protéines : si la protéine alimentaire modifiée présente une absence ou une diminution de liaison aux IgE spécifiques, on peut alors prétendre que la protéine en question présente un caractère hypoallergénique (Moneret-Vautrin, D. A. and Kanny, G. 2007). De nombreuses voies ont été explorées depuis les dix dernières années, et certaines des modifications apportées aux protéines allergènes des aliments semblent prometteuses

pour conduire à des aliments hypoallergéniques. Le principal but visé est l'inactivation des épitopes B de façon à réduire ou à supprimer l'interaction de ces épitopes avec les IgE qui entraîne une réaction allergique. En ce qui concerne les épitopes T, responsables de la sensibilisation, la difficulté est plus importante encore puisque ceux-ci sont reconnus ou non selon les génotypes HLA (human leukocyte antigen) de classe 2 des patients allergiques.

## **B. Etat de l'art des recherches actuelles dans le domaine**

Dans cette partie, nous présenterons les principaux axes de recherche mis en œuvre afin de réduire la teneur en allergène d'aliments courants, et plus particulièrement l'arachide.

### **1. Modifications physico-chimiques**

Nous avons vu précédemment (II.D.3) que les procédés thermiques de rôtissage appliqués à l'arachide conduisaient à une augmentation de l'allergénicité, et ne provoquait pas de dénaturation des allergènes qui auraient pu conduire à une diminution de l'allergénicité. Par contre, le fait de faire bouillir les arachides entraînait une diminution des allergènes et pourrait être une piste de production d'arachides hypoallergéniques.

Les travaux de l'équipe du Dr Si-Yin Chung (Food Processing and Sensory Quality Research) à la Nouvelle-Orléans, USA se basent sur une modification de l'allergénicité des protéines de l'arachide par l'addition de molécules diverses. Le but de leurs essais est de former des complexes de hauts poids moléculaires entre protéines et additifs, afin de masquer les épitopes B et de diminuer ainsi la reconnaissance par les IgE de patients allergiques. Dans une première étude, ils utilisent une peroxydase pour catalyser le pontage de deux protéines *via* leurs résidus de tyrosine. Les résultats obtenus montrent une réduction de l'allergénicité d'Ara h 1 et Ara h 2 dans les extraits protéiques préparés à partir d'arachides grillées, mais cette réduction n'apparaît pas dans les extraits obtenus à partir de l'arachide crue (Chung, S.-Y. et al. 2004). Dans une étude ultérieure utilisant un mélange de polyphénol oxydase et d'acide caféique pour ponter les protéines, l'allergénicité des protéines Ara h 1 et Ara h 2 semble atténuée mais là encore, uniquement dans les extraits préparés à partir d'arachides grillées (Chung, S. Y. et al. 2005). Ils ont ensuite essayé d'appliquer un mélange d'ions cuivriques et de peroxyde d'hydrogène ( $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) afin de réaliser le pontage des protéines et diminuer l'allergénicité (Chung, S. et al. 2007). Finalement, leurs travaux les plus récents décrivent l'addition de polyphénols (acide

phytique et acide tannique) à du beurre d'arachide. Les résultats obtenus montrent, dans différents contextes chimiques, la formation de complexes polyphénols-protéines qui ne sont plus capables de franchir la barrière intestinale. La réduction de la reconnaissance des allergènes ainsi complexés par les IgE de patients allergiques est estimée à 75% et 72% pour l'acide tannique et l'acide phytique, respectivement (Chung, S. Y. and Champagne, E. T. 2007; Chung, S.-Y. and Reed, S. 2012).

La formation de complexes entre protéines et additifs permettrait de limiter la phase de déclenchement de l'allergie en limitant le passage des complexes dans la barrière intestinale, et diminuer ainsi les risques encourus par les patients allergiques. Ces agrégats peuvent aussi être soustraits et ainsi conduire à un extrait protéique ou un beurre d'arachide appauvri en allergènes. Par ailleurs, aucun n'essai n'a été mené sur la digestibilité de ces complexes : ceux-ci pourrait se dégrader lors du passage dans les différents organes digestifs et perdre leur organisation structurale qui limite le passage au niveau de la barrière intestinale et ainsi retrouver leur caractère allergénique.

Un essai utilisant un procédé physique innovant a aussi été réalisé par la même équipe : la lumière UV pulsée a été appliquée à des extraits protéiques d'arachide, ainsi qu'à du beurre d'arachide. Ce traitement diminue d'un facteur 7 la reconnaissance des allergènes par les IgE de patients mesurée en ELISA, comparativement à un extrait protéique ou un beurre d'arachide non traité (Chung, S.-Y. et al. 2008). Cependant, ce procédé reste encore méconnu du grand public et un tel traitement industriel pourrait être confronté à des problèmes d'acceptation par le consommateur.

Des essais physico-chimiques de réduction de la teneur en allergènes ont été menés sur d'autres matrices alimentaires, telles que le riz ou le soja. Pour le riz, un traitement alcalin a permis de réduire la reconnaissance par les IgE de patients allergiques, vraisemblablement par dénaturation des protéines allergéniques du riz (Ikezawa, Z. et al. 1999). L'ultrafiltration d'un lait de soja infantile entraîne une hypoallergénicité, probablement liée à l'élimination des allergènes de taille importante (Franck, P. et al. 2002).

## **2. Modifications génétiques et sélection de variants agronomiques**

Une des voies envisagées pour l'obtention d'arachide hypoallergénique est la sélection d'une variété de graine qui contiendrait une teneur moindre en allergènes. Différentes études réalisées au cours des dix dernières années ont abouti à des résultats très variés.

Dans un premier temps, Koppelman, S. J. et al. (2001) ont réalisé une étude portant sur quatre variétés d'arachides couramment cultivées (Runner, Virginia, Spanish et Valencia) originaires de différents pays. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences majeures pour les allergènes Ara h 2 et Ara h 1 en termes de quantité et d'allergénicité. De la même manière, Chung, S.-Y. et al. (2002) ont mis en évidence l'absence de variation de l'allergénicité entre une variété à forte teneur en acides gras (SunOleic 97R) et quatre autres variétés à teneurs plus réduites en acides gras (Florunner, Georgia Green, NC 9, and NC 2). Quelques années plus tard, Guo, B. et al. (2008) ont montré l'existence de deux variétés (GT-C9 et GT-C20) qui présentent naturellement une carence en protéines de stockage, couplée à une allergénicité induite par la protéine Ara h 3 plus faible que dans d'autres variétés. Schmidt, H. et al. (2009) ont analysé une variété d'arachide indonésienne qui présente un plus faible taux d'Ara h 1 et Ara h 2, ainsi qu'une allergénicité réduite mesurée par Western Blot vis-à-vis de sérums de patients allergiques à l'arachide. Ces quelques résultats montrent clairement que la découverte de variétés naturellement hypoallergéniques reste une éventualité très aléatoire, dans la mesure où il n'y a que très peu de chances qu'une variété d'arachide n'exprime quasiment plus les allergènes majeurs Ara h 1, Ara h 2/6 et Ara h 3 qui, en tant que protéines de réserve, restent absolument indispensables à son développement. Un cas intéressant dans le croisement de variétés pourrait être la possibilité de produire une arachide hybride à partir de deux variétés d'*Arachis* (*Arachis hypogaea* et *Arachis duranensis*) En effet, cette dernière variété paraît synthétiser une protéine Ara d 2 équivalente à Ara h 2, mais dépourvu d'allergénicité.

L'autre voie envisagée repose sur des manipulations génétiques. La technique utilisée consiste en une répression post-transcriptionnelle par interférence de RNA (RNAi). Selon l'étude de Dodo, H. W. et al. (2008), l'hypocotyle d'une plantule d'*Arachis hypogaea* est transformé *via Agrobacterium tumefaciens* par un plasmide contenant des motifs inversés d'un fragment de cDNA (Acide désoxyribonucléique complémentaire) d'Ara h 2. Ces fragments sont transcrits et forment un motif en épingle à cheveu, qui sont ensuite divisés en trois parties : la « tête » de l'épingle et les « jambes » par l'enzyme Drosha (RNase de classe II). S'en suivent plusieurs coupures réalisées par diverses enzymes pour obtenir finalement un fragment d'ARN interférent (miRNA), qui vient s'appareiller à l'ARNm et empêche la traduction du gène *Ara h 2* en protéine Ara h 2. Après récolte des graines, le contenu protéique des graines analysé montre une réduction de 25% de la teneur d'Ara h 2

chez la plante transformée. Cette diminution entraîne une réduction de l'IgE-réactivité vis-à-vis de sérums de patients allergiques réagissant spécifiquement avec Ara h 2. Cependant, la possibilité d'une surexpression compensatoire d'autres protéines de réserve allergéniques par ces graines modifiées n'a pas été étudiée. De plus, les tests sont réalisés sur une seule génération, on ne dispose d'aucun recul pour apprécier la stabilité du phénotype transgénique sur de multiples générations.

La même année, l'équipe de Chu, Y. et al. (2008) ont réalisés un essai de « gene silencing » utilisant la même technologie, mais portant sur les gènes codant pour les allergènes Ara h 2 et Ara h 6. Ils ont poussé l'étude un plus loin, puisqu'ils ont analysés deux générations successives de plantes transformées. Ils ont constaté une diminution de la teneur en Ara h 2 et Ara h 6 qui aboutit à une réduction de la reconnaissance par les IgE de patients allergiques. Du reste, ils n'ont pas enregistré de différences notables dans les teneurs en Ara h 1 et Ara h 3 et dans la composition protéique globale des graines transformées. Ces résultats sur la réduction en teneur d'Ara h 2 sont encourageants mais restent toutefois insuffisants pour fabriquer une arachide hypoallergénique, puisque les protéines Ara h 1 et Ara h 3, qui sont des allergènes majeurs au même titre qu'Ara h 2 et Ara h 6, sont toujours présentes dans les graines transformées

Le travail récent de Yang, Z. et al. (2012) présente une idée intéressante de modifications génétiques dans le but de réduire l'allergénicité. En effet, leur travail a consisté à réassocier des fragments moléculaires d'un allergène majeur du blé noir pour modifier sa conformation structurale native. Le produit obtenu présente une allergénicité moindre, et l'hydrolyse de protéine modifiée par les enzymes digestives est nettement améliorée.

### **3. Méthodes biologiques**

#### *a. Utilisation d'enzymes*

Une autre voie explorée pour produire des aliments hypoallergéniques est une dégradation des protéines allergéniques par des protéases. Ces enzymes appartiennent à deux familles : les exopeptidases qui libèrent les acides aminés en positions *N* et *C* terminales (carboxy-, aminopeptidases, dipeptidases), et les endopeptidases qui rompent certaines liaisons peptidiques en milieu de chaîne (sites de clivage spécifiques) et libèrent ainsi des peptides de tailles variables. La classification de ces dernières est basée sur la structure du centre actif (protéases à sérine, à groupe sulfhydryle, aspartyle protéinases...).

Certaines de ces endopeptidases sont très spécifiques et effectuent le clivage au niveau de séquences consensus : la trypsine pancréatique (hydrolyse au niveau des groupes carbonyle de résidus arginyle et lysyle), ou la chymosine (hydrolyse de la liaison entre groupes phénylalanyle et méthionyle de la caséine  $\gamma$ ). Les protéases sont présentes dans tous les organismes : végétaux, animaux ou les microorganismes. Leur utilisation pour réduire (voire supprimer) l'allergénicité des aliments est explorée depuis 1991, où Jost, R. et al. (1991) ont été les premiers à appliquer ce traitement aux protéines du petit-lait. Une protéolyse en deux étapes a permis à l'équipe de Watanabe, M. et al. (2000) de réduire le taux d'allergènes présents naturellement dans le riz, tout en conservant un aspect textural satisfaisant. En ce qui concerne l'arachide, l'étude de Yu, J. M. et al. (2011) complétée par leurs brevets (Ahmedna, M. et al. 2008; Ahmedna, M. et al. 2010) utilise les endopeptidases trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine pour dégrader les protéines de l'arachide et obtenir un aliment hypoallergénique. Les résultats qu'ils présentent sont prometteurs : sur une arachide grillée traitée par un mélange des deux protéases, les taux de reconnaissance par des anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines Ara h 1 et Ara h 2 sont réduits de 100 et 98,01%, respectivement. Ces résultats sont confirmés par l'analyse en Western Blot qui montre une réduction des allergènes Ara h 1 et Ara h 2. Les anticorps utilisés pour cette étude sont cependant des anticorps produits chez le poulet et dirigés contre les allergènes majeurs de l'arachide, et ne traduisent pas réellement la reconnaissance par les IgE de patients allergiques. L'intérêt de cette étude repose sur la matrice utilisée : l'arachide entière est traitée telle quelle, sans que soient extraites les protéines, ce qui a le mérite de prendre en compte l'aspect matriciel de l'arachide.

Quelques années auparavant, Hong, S. J. et al. (1999) avaient réalisé une étude sur la digestion pepsique d'extraits protéiques d'arachide qui montrait une diminution de la reconnaissance des arachides traitées par les IgE de patients allergiques à l'arachide. Plus récemment, (Cabanillas, B. et al. 2012) ont réalisé une étude sur la dégradation enzymatique d'extraits protéiques provenant d'arachides grillées, montrant que l'alcalase permet de réduire la reconnaissance des extraits protéiques par les IgE de patients allergiques évaluée en Western Blot. Là, encore, la matrice arachide n'est pas prise en compte puisque l'étude porte uniquement sur les extraits protéiques.

Une autre étude récente (Dong, X. H. et al. 2011) a montré une plus grande dégradabilité des protéines par l'alcalase après traitement par des hautes pressions dynamiques. Aucune

étude complémentaire n'a été menée sur l'allergénicité résiduelle des protéines dégradées, ce qui reste un facteur important à considérer dans ce genre d'études.

*b. Fermentation par les microorganismes*

La fermentation par des microorganismes est un procédé ancestral initialement utilisé dans les pays asiatiques pour la conservation des aliments. On estime que la fermentation du soja, par exemple, remonte à 3000 ans av. JC en Chine (Yokotsuka, T. and Sasaki, M. 1985). A l'origine, ces procédés de transformation étaient réalisés sans grande connaissance en microbiologie, et étaient uniquement basés sur l'empirisme. De nos jours, ces procédés sont toujours utilisés en Asie, mais ont été optimisés et modernisés par l'industrie alimentaire pour permettre une production de masse de produits alimentaires fermentés (Beuchat, L. R. 2001). Parmi les matrices alimentaires utilisées communément pour ces fermentations, on retrouve en premier lieu le soja, qui est utilisé pour fabriquer le tempeh en Indonésie, le douchi en Chine, le natto et le miso au Japon. Toutes ces fermentations utilisent des microorganismes spécifiques et identifiés, qu'il s'agisse de champignons ou de bactéries. Le Tableau 5 recense les principaux microorganismes utilisés pour réaliser des fermentations solides alimentaires en Asie. L'avantage de ces procédés au niveau industriel réside dans leur simplicité de mise en œuvre, le coût relativement faible de l'installation industrielle, et élément non négligeable : leur validation sanitaire pour une utilisation alimentaire. En effet, toutes les souches utilisées dans l'étude sont des souches GRAS (Generally Recognized As Safe), et ne présentent pas de contre-indication pour une utilisation dans l'industrie agro-alimentaire. L'activité protéolytique mise en œuvre lors de ces fermentations en fait un choix idéal pour l'obtention d'une matrice à base d'arachide appauvrie en allergènes.

Microorganisme					
<b>Bactéries</b>	Lactobacillus sp.	<b>Levures</b>	Endomycopsis burtonii	<b>Champignons</b>	Aspergillus sp.
	Clostridium sp.		Saccharomyces cerevisiae		Mucor sp.
	Pediococcus sp.		Zygosaccharomyces rouxii		Rhizopus sp.
	Tetragenococcus halophilus		Candida sp.		Actinomucor sp.
					Amylomyces sp.
					Neurospora sp.

Tableau 5 : Principaux microorganismes utilisés pour les fermentations alimentaires en Asie

### *i. Les champignons*

Les champignons utilisés pour réaliser les fermentations possèdent un métabolisme saprophyte : ils dégradent la matière organique extérieure pour se procurer les nutriments nécessaires à leur croissance. Ainsi, leur mode de nutrition implique la sécrétion de nombreuses enzymes de dégradation extracellulaire qui vont dégrader la matière organique complexe en nutriments assimilables. Les enzymes secrétées les plus courantes sont des hydrolases, en particulier des glucohydrolases (amylases) et des protéases (endo- et exo-peptidases) (Branger, A. 2009). La grande quantité de protéases synthétisées et secrétées par les champignons lors du processus fermentaire leur confère une place de choix dans la production et l'utilisation industrielle de protéases variées (Rao, M. B. et al. 1998). La fermentation par les champignons peut être réalisée aussi bien sur substrat solide qu'en milieu liquide. En effet, les enzymes sont excrétées et donc peuvent être solubilisés lorsque la fermentation se déroule en phase liquide. En phase solide, la croissance des champignons se fait par les hyphes qui peuvent pénétrer et coloniser le substrat afin de libérer les enzymes.

#### *(a) Aspergillus oryzae*

Parmi les souches les plus communément utilisées en Asie pour assurer la fermentation des produits alimentaires, on retrouve *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn, qui est impliquée dans la fabrication du douchi, entre autres. Ce champignon fait partie des Deuteromycètes (champignons imparfaits à reproduction majoritairement asexuée) et est caractérisée par la formation de conidiophores dressés supportés par les thalles, qui lui donnent un aspect duveteux. *A. oryzae* est une souche GRAS qui ne présente apparemment aucun risque dans la fabrication de produits alimentaires (Sandhya, C. et al. 2005), contrairement à *Aspergillus flavus* ou *fumigatus*, qui sécrètent des aflatoxines hautement cancérigènes (Leitao, J. et al. 1998). L'étude de la production de protéases par les souches d'*Aspergillus oryzae* a été menée en fermentation solide et liquide sur de nombreux substrats (son de blé, enveloppe de riz, son de riz, résidus après brassage, tourteau de noix de coco, tourteau de noyaux de palmes, tourteau de sésame, poudre de jaquier, tourteau d'olive) (Sandhya, C. et al. 2005). Elle conduit systématiquement à une production significative de protéases en fermentation solide, avec toutefois une plus grande quantité de protéases synthétisées sur son de blé (Chutmanop, J. et al. 2008). Ce résultat démontre le caractère ubiquitaire de la production

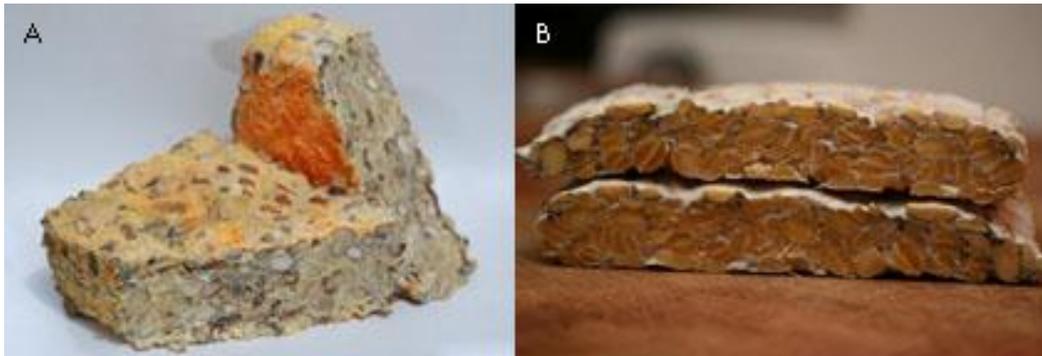
de protéases qui ne dépend pas du substrat utilisé. Les différents types de protéases produites par *Aspergillus oryzae* ont été étudiées ; ce sont des protéases neutres, acides et basiques (Shankar, S. 2010) . Les protéases neutres sont utilisées dans l'industrie alimentaire car elles possèdent des sites spécifiques d'hydrolyse des liaisons peptidiques : le clivage s'effectue au niveau des acides aminés hydrophobes à un pH neutre, ce qui réduit l'amertume des hydrolysats obtenus. Les enzymes produites par *Aspergillus oryzae* sont nombreuses et variées. Par exemple, l'entreprise Dafa propose trois enzymes commerciales dont le pH optimum d'activité est compris entre 5 et 10,5 (Dafazyme PR-F, Enzeco Fungal Protease 180 et Enzeco Fungal Proteinase Conc.) (Shankar, S. 2010).

Le protocole utilisé pour réaliser la fermentation du soja est relativement simple : les graines sont imbibées dans une solution légèrement acide durant la nuit. Le lendemain, les graines sont cuites dans un autocuiseur et inoculées avec *Aspergillus oryzae*. La fermentation dure 48h sur une large plaque poreuse à température et humidité contrôlées. Cette fermentation de soja conduit à une dégradation des protéines de réserve de la graine : une étude de Cherry, J. P. et al. (1976) montre une protéolyse poussée des protéines de réserve de l'arachide après fermentation associée à une augmentation significative de la quantité de petits peptides néoformés. L'impact de cette dégradation sur l'immunoréactivité du produit fermenté a été étudié. La fermentation solide de soja par *Aspergillus oryzae* provoque une diminution de la reconnaissance du produit fermenté par les IgE de patients allergiques de 68% (Frias, J. et al. 2008), ce qui confirme bien l'impact de la fermentation sur la dégradation des allergènes et sur la diminution de l'allergénicité du produit fermenté.

#### **(b) *Rhizopus oligosporus***

*Rhizopus oligosporus* (*Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*) fait partie des souches utilisées communément pour la fermentation d'aliments en Asie. Par exemple, l'ontjom en Indonésie, est fabriqué à partir de tourteau d'arachide ou de tapioca fermenté avec *Rhizopus oligosporus*. Le tempeh est aussi originaire d'Indonésie, mais consiste en une fermentation de soja entier ou concassé avec la souche de *Rhizopus oligosporus* (Figure 13). Le champignon *Rhizopus oligosporus* appartient à l'ordre des Mucorales, et se reproduit aussi bien de façon sexuée qu'asexuée, bien que cette dernière soit prédominante. Le mycélium se différencie en stolons, rhizoïdes et sporangiophores isolés en bouquets de 2 à 6, qui renferment les spores. Le support de ces sporangiophores, la columelle, est large et

globuleuse. Cette souche est aussi reconnue comme non dangereuse pour l'utilisation dans l'industrie alimentaire. Comme *Aspergillus oryzae*, cette souche de champignon présente un important panel de protéases synthétisées lors de la fermentation en phase solide sur des substrats variés (farine de tournesol, son de riz, son de blé (Ikasari, L. and Mitchell, D. A. 1994; Haq, I. and Mukhtar, H. 2004; Rauf, A. et al. 2010)), mais aussi en fermentation liquide sur substrat synthétique (Sarao, K. L. et al. 2010).



**Figure 13 : Exemples de fermentations solides réalisées avec *Rhizopus oligosporus***

A : ontjom

B : tempeh

Les protéases sont synthétisées quel que soit le milieu de culture utilisé, avec un plus ou moins bon rendement. Dans le cas du tempeh, une étude plus spécifique a montré que lors de la croissance du champignon, des protéases acides, neutres et basiques étaient synthétisées, contribuant à la dégradation des protéines de soja (Heskamp, M. L. and Barz, W. 1998). Dans l'industrie, *Rhizopus oligosporus* est cultivé pour la synthèse de protéases utilisées dans divers domaines (alimentaires, détergents, tanneries...) et les protéases commerciales disponibles sont variées. De la même manière que pour *Aspergillus oryzae*, une étude a été réalisée sur la protéolyse des protéines pendant la fermentation avec *Rhizopus oligosporus*. Les résultats avancés par Beuchat, L. R. (1976) sur la fermentation d'un tourteau d'arachide montrent une dégradation poussée des protéines de réserve et une augmentation significative de protéines de faibles poids moléculaires, corrélée à la diminution de protéine de hauts poids moléculaires. L'étude de l'IgE-réactivité d'un produit de fermentation a été réalisée sur une matrice constituée de blé noir, contenant donc des allergènes. Les résultats obtenus montrent une importante diminution de la reconnaissance par les IgE de patients allergiques à partir de 16h de fermentation et une quasi-intégrale absence d'IgE-réactivité à partir de 24h de fermentation (Handoyo, T. et al. 2006). Une autre étude réalisée sur le pois montre une réduction de 10% de l'allergénicité de l'aliment fermenté avec *Rhizopus oligosporus* (Barkholt, V. et al. 1998). Ce résultat démontre qu'à

partir d'une matrice amylacée ou protéagineuse, la fermentation par *Rhizopus oligosporus* conduit à une diminution de l'allergénicité, ce qui permet d'envisager la production d'un aliment hypoallergénique à partir d'une matrice oléagineuse d'arachide.

## ii. Les bactéries

La bactérie utilisée pour l'obtention de nattō à partir de la fermentation du soja est *Bacillus subtilis* (Figure 14). Le nattō est consommé majoritairement au Japon comme accompagnement du riz nature. Il présente un aspect gluant et une forte odeur fermentée ou ammoniaquée, ce qui le rend difficilement acceptable d'un point de vue organoleptique dans les pays occidentaux. Dans le nord de la Thaïlande, le Thua Nao est un aliment issu de la fermentation de soja concassé par *Bacillus subtilis*.



Figure 14 : Soja fermenté avec *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* est un bacille à Gram + strictement aérobie. Dans les conditions optimales de température et de pH, son temps de génération est d'environ 26 minutes, et cette capacité à croître rapidement en fait un outil idéal pour la production d'enzymes au niveau industriel. Par exemple, les protéases Aroase AP-10 (protéase acide), Aroase NP-10 (protéase neutre) et Aroase NS sont commercialisées par Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. La fermentation du soja avec *Bacillus subtilis* apporte un effet bénéfique sur la santé : la présence d'un agent chimiopréventif contre le cancer (Messina, M. J. et al. 1994), la synthèse d'acide  $\gamma$ -polyglutamique qui augmente l'absorption de calcium dans l'intestin grêle (Tanimoto, H. et al. 2001), et réduit le taux de cholestérol (Tsuji, K. and Tsuji, E. 1986), la présence d'agents antioxydants (Esaki, H. et al. 1990) et anti-tumoraux (Takahashi, C. et al. 1995). D'autre part, la fermentation de farine de soja avec *Bacillus subtilis* entraîne une amélioration des qualités nutritionnelles du soja : la teneur en inhibiteurs de trypsine est réduite de 96% et la concentration en protéines de petites tailles plus assimilables est augmentée de 5% à 63%. De façon complémentaire, le taux de protéines de grande taille passe de 40% à 8 % des protéines totales (Teng, D. et al. 2012). Cette réduction de la taille

des protéines a été complétée par une étude sur allergénicité résiduelles des protéines dégradées. Yamanishi, R. et al. (1995) ont montré par Western Blot et Dot Blot qu'à partir de 8 heures de fermentation, la reconnaissance du produit fermenté par les IgE de patients allergiques au soja a totalement disparue.



# **Matériel et Méthodes**



## I. Productions d'anticorps polyclonaux chez le lapin

### A. Extraction et purification des protéines

#### 1. Ara h 1

##### a. *Extraction*

Les arachides crues sont décortiquées afin d'éliminer le tégument, qui contient des polyphénols, lesquels peuvent être à l'origine de la précipitation des protéines lors de l'extraction. Les arachides sont ensuite broyées dans un moulin à café électrique jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. Les lipides sont éliminés par solubilisation dans l'éther de pétrole 95° (1 :2 (m/v)). La suspension est placée sur agitateur magnétique pendant 15 minutes à température ambiante et filtrée sur un filtre de nylon (0,2 µm de taille de pores). La poudre récupérée est de nouveau suspendue dans de l'éther de pétrole (ratio 1 :1 (m/v)) et mise à agiter pendant 5 minutes. Après filtration, la poudre délipidée est disposée dans un cristallisateur et placée la nuit sous la sorbonne.

L'arachide délipidée (ratio 1 :10 (m/v)) est suspendue dans le tampon d'extraction (Tris 20 mM pH 7,4, PVPP 1% (m/v)) et placée en chambre froide (4°C) pendant deux heures sous agitation magnétique. La suspension est ensuite filtrée sur Mira cloth afin d'éliminer les plus grosses particules. Le filtrat est centrifugé à 30,000xg pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant (extrait brut) obtenu est une solution limpide.

Afin d'enrichir cette solution protéique en Ara h 1, une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium est réalisée. L'extrait brut est placé dans un bain de glace sous agitation. Le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement pour éviter une précipitation non uniforme des protéines : 23,34g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> / 100mL est ajouté, pour arriver au final à une solution à 40% de saturation en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

La solution est mise à agiter pendant 2 heures à 4°C afin que l'équilibre thermodynamique soit atteint. Après une étape de centrifugation à 4000xg pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant est dialysé pendant 3 jours contre un tampon Tris 20mM pH 7,4 (seuil de coupure de 3,5 kDa). L'extrait protéique est dosé et stocké à -20°C.

*b. Purification sur colonne Concanavaleine A*

La phase stationnaire de la colonne de purification est constituée d'une métalloprotéine, la Concanavaleine A, couplée à du sépharose par la méthode du bromure de cyanogène (Con A Sepharose 4B, Amersham). La Con A fixe les molécules contenant le motif glucidique  $\alpha$ -D-mannopyranosyl et permet ainsi la purification des glycoprotéines.

La phase stationnaire est suspendue dans de l'eau milliQ et versée dans une colonne de chromatographie (IBF-Biostat) de 50 mL. Après le tassement et l'élimination toutes les bulles d'air, la phase stationnaire a un volume de 22 mL de de colonne (VC). L'extrait protéique est dilué au 1 :10 dans le tampon de fixation (Tris 20 mM, NaCl 500 mM,  $MnCl_2$  1mM,  $CaCl_2$  1mM, pH 7,4) pour un volume final de 100mL.

La purification se fait grâce à un système FPLC (Äkta, GE Healthcare) à 4°C. Toutes les solutions sont filtrées sur PES à 0,2 $\mu$ m et désaérées par pompe à vide. La colonne est équilibrée avec le tampon de fixation (5 fois le VC) à un débit de 1mL/min. L'échantillon est fixé sur la nuit en circuit fermé à un débit de 0,3mL/min (5-6 passages de la solution).

La colonne est ensuite lavée avec le tampon de fixation à un débit de 0,5 mL/min pour éliminer les protéines non fixées. Le retour de l'absorbance à 280nm à la ligne de base sert d'indicateur pour la fin du lavage.

L'élution se fait dans un tampon glucose (Tampon de fixation, Glucose 200 mM) à un débit de 1mL/min avec un gradient croissant en teneur de glucose (0 à 50mM, plateau à 50mM, puis 200mM). Les fractions d'élutions de 1mL sont récupérées et la teneur en protéines des fractions est suivie par la mesure de l'absorbance à 280nm. Les fractions sont ensuite analysées en gel SDS-PAGE : les fractions contenant Ara h 1 sont poolées.

La colonne est lavée dans le tampon de fixation et stockée dans une solution  $H_2O$ /Ethanol (80:20) à 4°C.

*c. Elimination de la Concanavaleine A résiduelle*

Lors de l'élution par le glucose des protéines de Con A se sont détachées et se retrouvent présentes dans les fractions obtenues. La mise en contact de la Con A avec un motif Dextran (type Sephadex) permet la fixation de la métalloprotéine et conduit à séparer Ara h 1 de la Con A.

Les fractions poolées contenant Ara h 1 sont dialysées contre un tampon Tris 20 mM, pH 7,4 pendant 3 jours (seuil de coupure de 3,5 kDa) dans un boudin de dialyse afin d'éliminer

le glucose. La solution est passée en boucle fermée dans une colonne PD-10 (Amersham), composée de Sephadex G-25 à un débit de 0,5mL/min (10 passages sur colonne). Le non-fixé récupéré est exempt de Con A et contient à 95% notre protéine d'intérêt, Ara h 1. La solution est alors dialysée contre de l'eau milliQ pendant 3 jours dans un boudin de dialyse (seuil de coupure à 3,5 kDa) puis lyophilisée et stockée à -20°C.

## 2. Ara h 2 et Ara h 3

### a. *Extraction*

Les arachides crues sont décortiquées afin d'éliminer le tégument. Les arachides sont ensuite broyées dans un moulin à café électrique jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. Dans un ratio 1 :10 (v/m), le tampon d'extraction (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, PVPP 1% (m/v)) est ajouté au broyat d'arachide, et mis à agiter pendant 2 heures à 4°C. La suspension est filtrée sur Miracloth pour éliminer les plus grosses particules, puis centrifugée (30,000xg, 4°C, 30 min). Les lipides présents dans le surnageant sont ensuite éliminés par solubilisation dans du chloroforme. Dans une ampoule à décanter, le CHCl<sub>3</sub> est ajouté au surnageant (ratio 3 :1 (v/v)) et le mélange est agité vivement en dégazant régulièrement. Après décantation, le CHCl<sub>3</sub> contenant les lipides est éliminé. L'opération est répétée 2 fois afin d'avoir le maximum de lipides extraits. Le surnageant exempt de lipides est ensuite centrifugé (4000xg, 4°C, 5min) afin d'éliminer le CHCl<sub>3</sub> résiduel.

L'extrait protéique est dialysé pendant 3 jours contre un tampon Tris 20 mM, pH 8 dans un boudin de dialyse (seuil de coupure 3,5 kDa). L'extrait obtenu est dosé et stocké à -20°C.

### b. *Purification*

Les protéines Ara h 2 et Ara h 3 présentent des pI acides (5,2 et 5,5 respectivement), et sont ainsi chargées négativement lorsqu'elles sont en solution dans le tampon Tris 20 mM, pH 8. Ce caractère physico-chimique est utilisé pour pouvoir mettre en place une chromatographie d'échange d'ions, basées sur les interactions électrostatiques entre les ions de la phase stationnaire et les protéines en solution. Ces interactions peuvent être modifiées par des solutions de force ionique plus élevées ou une modification de la valeur du pH. Dans le cas présent, la colonne utilisée est une colonne échangeuse d'anions forte (HiTrap Q FF 5mL, GE Healthcare), composée d'une phase stationnaire sépharose sur laquelle a été greffé

de façon covalente des groupes  $-N^+(CH_3)_3$ . Le taux de greffage est de 6%, et la capacité de fixation de la colonne est de 120 mg d'HSA par mL de phase stationnaire.

La fixation de l'échantillon par les motifs triméthylamines se fait dans un tampon à faible concentration en ions  $Cl^-$  (ou tout autre anion) afin de favoriser les interactions électrostatiques entre les protéines et les groupements triméthylamines. Le pH du tampon de fixation est fixé à au moins deux unités de plus que la valeur de pI de la protéine, ce qui permet d'avoir une charge nettement négative à la surface des protéines et d'ainsi favoriser leur interaction avec les motifs triméthylamines.

L'échantillon protéique est dilué dans le tampon de fixation (Tris 20 mM, pH 8) pour une quantité finale de 15 mg protéines à fixer par millilitre de phase stationnaire de colonne. La purification des protéines est réalisée grâce à un système Äkta (GE Healthcare) maintenu à 4°C. Toutes les solutions sont filtrées sur PES 0,2  $\mu m$  et désaérées par une pompe à vide. La colonne HiTrap Q FF 5mL (GE Healthcare) est préalablement équilibrée dans le tampon de fixation à un débit de 5mL/min (10 VC). La conductimétrie de la solution est mesurée, et permet de s'assurer de sa faible force ionique. Les protéines contenues dans la solution sont fixées sur la colonne à un débit de 5mL/min avec un passage unique. Le non fixé est éliminé par rinçage de la colonne avec le tampon de fixation à un débit de 5mL/min jusqu'au retour de l'absorbance à 280 nm à la ligne de base et de la conductimétrie à la valeur initiale (5 à 7 VC).

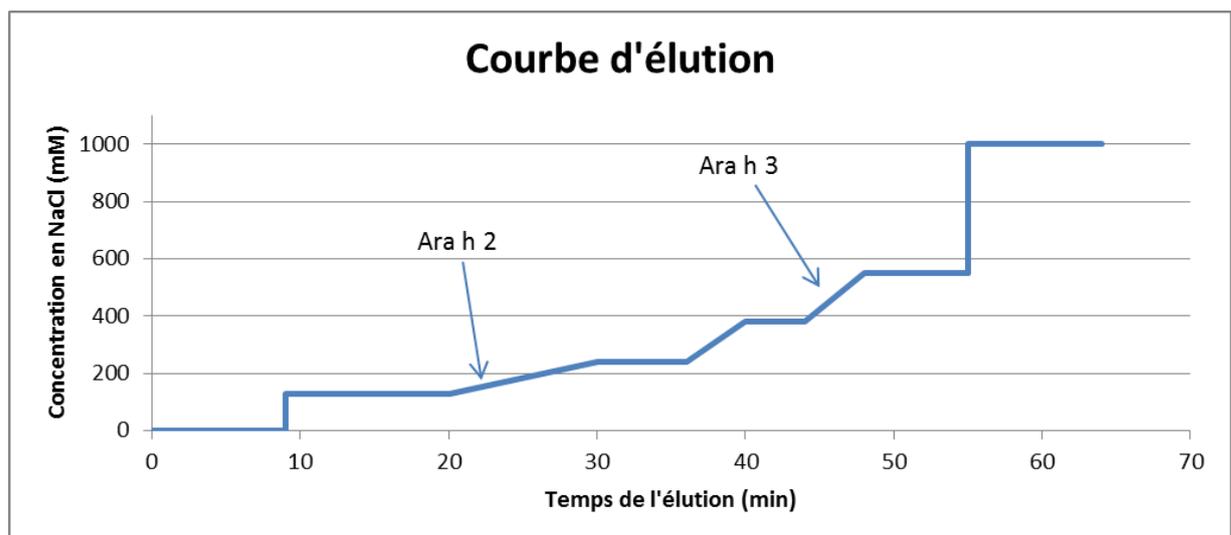


Figure 15 : Courbe d'élution des protéines sur HiTrap Q FF 5 mL

Le tampon d'élution (Tris 20 mM, NaCl 1M, pH 8) permet de décrocher les protéines fixées aux groupements triméthylamines par compétition. Les anions  $Cl^-$  présents dans le tampon d'élution vont prendre la place des protéines fixées : les protéines décrochées sont

recupérées. Le gradient de concentration en NaCl mis en place est représenté Figure 15. Ara h 2 et Ara h 3 sont élués à des concentrations de 240 mM et 400 mM respectivement. Les fractions contenant les deux allergènes sont respectivement poolées, dialysées pendant 3 jours contre de l'eau milliQ à 4°C (seuil de coupure à 3,5 kDa) et lyophilisées.

## **B. Caractérisation des protéines purifiées par spectrométrie de masse**

### **1. Principe**

Lors de la séparation sur gels SDS-PAGE des protéines issues des diverses chromatographies, seuls les poids moléculaires permettent de statuer si les protéines recherchées sont présentes. Cependant, la multiplicité des protéines dans l'extrait brut d'arachide peut conduire à une mauvaise interprétation sur l'identité de la protéine discernée. La spectrométrie de masse permet d'obtenir des informations sur la séquence des protéines, ainsi que de certifier la présence de peptides éloquentes qui sont autant de preuves de l'identité des protéines purifiées.

La technique de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) génère des molécules protonées et, à l'aide d'un analyseur du temps de vol des molécules générées (TOF), permet de détecter précisément la masse moléculaire des peptides générés. La limite de détection est inférieure à la picomole et cette technique permet l'analyse de mélanges complexes.

Les résultats obtenus grâce à cette technique consistent en une carte de peptides répartis selon la distribution de leur masse après la digestion trypsique de la protéine mère.

Les fragments peptidiques sont co-cristallisés avec une matrice qui permet la fixation sur un support inerte et l'ionisation des peptides lors de l'irradiation par le laser. Ce laser provoque un transfert de protons de la matrice vers le fragment peptidique, ce qui conduit à la libération d'ions en phase gazeuse tout en limitant la destruction moléculaire par pyrolyse. La forte différence de potentiel appliquée au niveau de la source permet de provoquer l'accélération des ions. Ils se déplacent alors à l'intérieur du tube de vol ce qui permet de les séparer en fonction de leur charge : plus l'ion est chargé, plus sa vitesse sera grande, mais au vue de son importante masse, la vitesse en est réduite. La vitesse est donc inversement proportionnelle au rapport  $m/z$  (masse/charge). C'est cette donnée que l'on retrouve dans le spectre de distribution et qui nous permet d'analyser les résultats. Les

séquences de fragments peptidiques issus de la digestion trypsique théorique sont ensuite confrontées aux données m/z des peptides obtenus par l'analyse MALDI-TOF à l'aide du logiciel Protein Prospector®.

## 2. Protocole

Après séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, pour chaque bande d'intérêt les spots colorés au bleu de Coomassie sont découpés à l'aide d'une pipette pasteur et regroupés dans un tube eppendorf de 0,5mL. Deux additions successives de 100µL d'acétonitrile/bicarbonate d'ammonium 25 mM (1 :1) suivies d'une agitation vigoureuse sur vortex pendant 10 minutes permettent de décolorer les spots. Après chaque étape, les surnageants sont éliminés. Afin de perméabiliser le réseau d'acrylamide pour pouvoir réaliser la digestion trypsique, les spots sont séchés à l'évaporateur rotatif pendant 20 minutes à 45°C. Les spots déshydratés sont ensuite additionnés d'une solution trypsique (Promega) (solution stock à 25 ng/µL dilué au 1 :5 dans du bicarbonate d'ammonium 25mM) et incubés à 37°C sur la nuit. Après centrifugation, 1 µL du surnageant de digestion est déposé sur une place en acier inoxydable adapté à l'analyse en MALDI-TOF. Après séchage partiel, 1 µL de matrice est ajouté (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique saturée à 5 mg/mL dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile/TFA 50/50/0,1 (v/v/v), Sigma Aldrich) et co-cristallise avec l'échantillon directement sur la plaque MALDI. Trois dépôts supplémentaires d'un mélange de peptides de masses connues sont réalisés pour servir d'étalonnage externe (Calibration Mixture 1 + 2, Applied Biosystems®).

L'acquisition est réalisée avec un spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager-DE<sup>TM</sup> STR, Perspective Biosystems®) en mode réflectron positif avec une tension d'accélération appliquée de 20kV. Les masses m/z détectées vont de 800 à 3000. La liste de masses m/z obtenue est confrontée à la base de données protéique à l'aide du logiciel Protein Prospector®. Des digestions trypsiques des séquences des protéines recherchées sont générées à partir de la séquence entière grâce au logiciel MS-Digest® et comparées aux peptides identifiés, utilisés par Protein Prospector® pour déterminer la protéine d'intérêt.

### C. Immunisation des lapins

Après que les protéines d'intérêts aient été purifiées, identifiées par spectrométrie de masse et lyophilisées, elles peuvent alors être inoculées aux lapins afin de produire des IgG polyclonales dirigées contre ces protéines. Afin d'éviter la variabilité génétique intra-espèce et d'assurer le meilleur taux d'anticorps, les immunisations sont réalisées sur des lapins Néo-Zélandais blancs. La première injection contient 150 µg de protéines additionné d'Adjuvant Complet de Freund. Cet adjuvant associe une mycobactérie inactivée par la chaleur, *Mycobacterium tuberculosis*, à l'émulsion huileuse que constitue l'Adjuvant Incomplet de Freund. L'injection est réalisée à J=0 en voie intradermique en 10 points dorsaux. Avant cette injection, 1mL de sérum pré-immun est prélevé pour s'assurer de l'absence d'IgG dirigées contre notre protéine au début du programme d'immunisation.

A J=14, J=28 et J=42, 150 µg de protéines couplées à de l'adjuvant incomplet de Freund est injecté aux lapins en voie sous-cutanées en 10 points dorsaux. A J=49, 20 mL de sérum est prélevé et un dosage ELISA est réalisé afin de s'assurer de la production d'anticorps dirigés contre la protéine. Finalement, à J=63, le lapin est exsanguiné et le sérum prélevé. Un dosage ELISA final permet de certifier la teneur en anticorps, et les sérums sont conservés à -80°C. Toutes les immunisations sont réalisées sur deux lapins différents pour chaque protéine purifiée.

Les immunisations ont été réalisées par la société Millegen®, Toulouse.

## II. Location immunohistochimique des allergènes de l'arachide

Les expériences de microscopie ont été réalisées au sein de la FR3450, Plateforme d'Imagerie Cellulaire, sous la responsabilité du Dr. Alain Jauneau.

### A. Principe de la microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser utilise un microscope optique qui présente la propriété de pratiquer des coupes virtuelles dans la profondeur de l'échantillon et de ne récupérer le signal que pour ces sections optiques. La faible profondeur de champ appliqué permet de réaliser des séries d'images accumulées suivant l'axe z, et d'ainsi pouvoir obtenir une représentation tridimensionnelle de l'échantillon étudié.

Dans la microscopie optique classique, le fait d'analyser des objets présentant une structure tridimensionnelle soulève le problème de la mise au point. En effet, sur de tels échantillons, il n'est pas possible de faire la mise au point à différents niveaux de profondeurs de champ, et seule une partie de l'échantillon est nette à l'objectif.

Dans la microscopie confocale à balayage laser, la source lumineuse est un laser avec une longueur d'onde préalablement définie, et est concentré par une lentille. Cette source lumineuse balaye l'échantillon à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Le signal fluorescent récupéré passe par un diaphragme variable (ou « pinhole ») qui élimine le signal provenant d'autres plans que celui observé. Ces rayons passent ensuite dans un bloc de filtrage des longueurs d'onde avant d'arriver au système de détection par photomultiplicateurs. Grâce à cet assemblage, seuls les photons provenant du plan focal atteignent le détecteur et limitent ainsi la superposition de plans que l'on retrouve classiquement dans la microscopie optique.

Via l'acquisition monofocale, hormis la possibilité de pouvoir reconstituer une image tridimensionnelle de l'échantillon étudié, la microscopie confocale à balayage laser permet une augmentation de la résolution axiale et latérale, un traitement de l'image facilité (contraste, luminosité, agrandissement...), mais aussi la possibilité d'observer simultanément plusieurs sondes fluorescentes. Cette technique permet donc une étude de location subcellulaire des protéines, et donc d'analyser la distribution spatiale des allergènes majeurs de l'arachide.

## **B. Préparation des échantillons**

Des échantillons d'arachide sans téguments sont chimiquement fixés dans une solution tampon de cacodylate de sodium ( $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 M (pH 7,1) contenant 2,5% de glutaraldéhyde pendant 96 heures à 4°C. Ils sont par la suite déshydratés dans des bains de concentrations d'éthanol croissantes (40, 60, 80% éthanol pendant 12 heures à 4°C suivi de deux bains d'éthanol à 100% pendant 12h chacun). Les échantillons sont ensuite progressivement imprégnés par des concentrations croissantes de résine de type acrylique LRW (London Resin White) en solution éthanolique (ratio 1 :1 puis 3 :1 pendant 24 heures à 4°C avec un renouvellement) puis deux bains de résine pure pendant 24 heure à 4°C. Les échantillons sont ensuite placés dans des capsules en gélatine et mis à polymériser au four à 70°C sur la nuit.

### C. Expériences réalisées en microscopie confocale

Après polymérisation, la pellicule en gélatine de la capsule est éliminée et la résine est découpée avec une épaisseur de 1 $\mu$ m grâce à un couteau en diamant fixé sur un ultramicrotome (Reichert, Ultra-cut E). Les coupes sont placées sur des lames de verres couvertes de Téflon présentant des puits de 7 mm de diamètre. Pour chaque puits, 3 à 4 coupes sont disposées. Une lame est colorée au bleu de toluidine et observée au microscope optique à fond clair afin de vérifier la conservation de la structure des cellules et l'intégrité des tissus.

Les coupes sont saturées pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de PBS 20 mM (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,2) contenant 1% de Tween-20 (v/v) et 1% de BSA (m/v). Elles sont ensuite incubées en chambre humide sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires de lapin anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3 dilués au 1 :5,000ème dans le tampon de saturation. Les coupes sont ensuite lavées avec le tampon de saturation trois fois 10 minutes sous légère agitation, puis incubées avec l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplés à un fluorochrome Alexa 633, Molecular Probes®), dilués au 1 :1,000ème dans le tampon de saturation pendant deux heures à température ambiante et dans le noir. Les coupes sont ensuite rincées 2 fois 10 minutes dans le tampon de saturation et 10 minutes dans de l'eau distillée. En parallèle de ces différentes incubations, différents témoins négatifs sont réalisés : pas d'anticorps primaire et secondaire, ou anticorps secondaire seul. Elles sont stockées à 4°C dans le noir jusqu'à observation au microscope confocal à balayage laser.

Les coupes sont observées avec un microscope confocal (Leica SP2) équipé d'un objectif 40x (PL APO, AN 1.25) sous deux longueurs d'onde de laser. La première longueur d'onde, à 488nm est produite par un laser argon-ion et permet de collecter l'autofluorescence des tissus. La deuxième, à 633nm, est produite par un laser hélium-néon et permet de récupérer le signal émis par la sonde Alexa 633 à une longueur d'onde aux alentours de 647nm. Les paramètres d'acquisition (puissance des lasers, gain des photomultiplicateurs, ouverture du pinhole) sont conservés pour chaque observation de coupes marquées par les mêmes anticorps. Pour chaque anticorps, une série d'images de 10 à 15 plans focaux (suivant l'axe Z avec un incrément de 0,2 à 0,5  $\mu$ m entre chaque plan focal) est réalisée.

La superposition des deux canaux de fluorescence (autofluorescence à 488nm et fluorescence de la sonde Alexa 633) est obtenue après projection des plans focaux sur un plan XY par projection maximale.

### III. Traitement des arachides par homogénéisation haute pression

#### A. Principe

C'est lors de l'exposition universelle de Paris en 1900, qu'Auguste Gaulin présenta au public le premier homogénéisateur haute pression. Utilisé principalement dans l'industrie laitière, il est aujourd'hui fréquemment utilisé comme étape de process dans le secteur des produits liquides ou pâteux alimentaires. L'homogénéisation à haute pression est un traitement physique au cours duquel un produit liquide ou pâteux est projeté sous forte pression (30 à 1 000 bar) à travers une tête d'homogénéisation de géométrie particulière. Elle se traduit par une réduction de taille des particules solides de la phase dispersée. Cette opération permet des modifications sensibles du produit et permet de réduire la granulométrie jusqu'à 0,5 $\mu$ m.

L'homogénéisation résulte de la détente d'un débit continu de liquide à travers une tête d'homogénéisation dont la forme génère certains phénomènes permettant une modification du système dispersé. Une tête d'homogénéisation comporte trois parties : le siège, le clapet et l'anneau de choc.

Le produit à homogénéiser, après être entré le long de l'axe du siège est rejeté radicalement à angle droit et est laminé dans l'étroite lumière qui sépare le siège et le clapet (le clapet est décollé de son siège en raison de la pression du produit). Il est alors projeté à une vitesse de l'ordre de 100 à 400 m/s sur l'anneau de choc avant d'être refoulé à l'extérieur. La contre-pression qui est créée par la lumière du clapet est maintenue, soit par un ressort puissant disposé à l'arrière du clapet, soit par un dispositif hydraulique. Compte tenu que l'action prend place dans un volume très restreint, le temps de séjour du produit dans la tête est très court :  $3 \times 10^{-6}$  s environ.

Durant ce laps de temps, l'énergie délivrée par la pompe haute pression est convertie en énergie cinétique. Une part de cette énergie est reconvertie en pression à la sortie de la tête d'homogénéisation et une autre partie est convertie en chaleur. Chaque tranche de 40 bars de pression conduit à une élévation de la température d'environ 1°C.

La mise en place du procédé provoque de nombreuses contraintes mécaniques subies par le fluide et conduisent à la réduction de la taille des éléments dispersés :

- Les variations brutales de la vitesse du produit couplé au laminage déclenchent des forces de cisaillement et des chocs entre particules.
- Les alternances accélération/décélération ainsi que les variations de directions imposées au fluide conduisent à la formation de micro-turbulence dans la tête d'homogénéisation. La force de cette contrainte mécanique est proportionnelle à la vitesse appliquée au fluide : plus la vitesse est grande, plus les particules obtenues en sortie d'homogénéisateur seront petites.
- La percussion du fluide sur l'anneau de choc conduit à l'éclatement des particules et à la réduction de la granulométrie.

La pompe en entrée de process induit une vitesse de propulsion de la suspension dans l'axe du siège. C'est l'écart entre le clapet et le siège de la tête d'homogénéisation qui définit la valeur de la pression appliquée au fluide. Plus la lumière entre les deux composants est étroite, plus la contre pression appliquée au fluide sera grande, et plus les contraintes mécaniques induites seront sévères et conduiront à une diminution de la granulométrie.

## **B. Mise en œuvre du procédé**

Les arachides crues sont décortiquées afin d'éliminer le tégument et suspendue dans de l'eau (1 :5 w/v). La suspension est broyée à l'aide d'un mélangeur à immersion de laboratoire (Silverson®, Série L5) équipée d'une tête de travail composée d'une grille à trous carrés, idéale pour la réduction rapide de la taille des solide grâce à son fort taux de cisaillement. La vitesse de rotation de la tête de travail est portée à 700 tours/min pendant 5 minutes afin d'obtenir une granulométrie homogène au sein de l'échantillon. La suspension est ensuite introduite dans l'homogénéisateur haute pression et soumise à un premier passage à 30 bars afin de diminuer la granulométrie et de faciliter le passage à des pressions supérieures. En effet, comme la pression appliquée dépend de l'espacement entre le clapet et le siège de la tête de l'homogénéisation, si la lumière est trop faible lors du premier passage, il est possible de se retrouver avec des particules qui colmatent cet espace et empêche le clapet de se détacher du siège, bloquant ainsi l'appareil.

Enfin, deux passages successifs de la suspension à une pression de 500 bars chacun permet d'obtenir une suspension avec une granulométrie homogène et suffisamment faible. Le lait d'arachide ainsi obtenu est stocké à -20°C pour les expériences futures.

## C. Analyse

### 1. Analyse structurale

Après homogénéisation, quelques millilitres de lait d'arachide sont lyophilisés et réduit en poudre. En parallèle, de la poudre d'arachide obtenue après délipidation est utilisée comme témoin avant homogénéisation. Les échantillons sont fixés chimiquement, déshydratés et imprégnés par la résine LRW (cf II.B) Les coupes de 1µm sont réalisées avec l'ultramicrotome (Reichert, Ultra-cut E) et disposées sur des lames de verre non traitées. Les coupes sont colorées afin de mettre en évidence des protéines et des parois cellulaires à l'aide de la technique de la coloration au vert lumière-iode améliorée par (Ben-Hdech, E.-H. 1993). L'utilisation de trois colorants successifs permet le marquage des différentes structures cellulaires de l'arachide. L'orange acridine est un colorant qui présente une affinité pour les molécules chargées négativement (groupement actif de type  $N^+Cl^-$ ) et qui précipite par addition de bases. Ainsi, en présence de rouge congo (famille des diazo-colorants) qui possède deux groupements basiques de types  $SO_3^-Na^+$ , l'orange acridine précipite pour donner une coloration rouge-orange, principalement située au niveau des parois cellulaires. Le vert lumière FCF (famille des aminotriarylméthane) possède le même type de groupement que le rouge congo, mais a une affinité d'association élevée avec les protéines, et déstabilise et exclu ainsi le précipité orange acridine/rouge congo des sites protéiques. Ainsi, l'ordre dans lequel doivent être ajoutés les colorants est important.

Les coupes sont réhydratées et colorées à l'acridine orange à 1% (m/v) dans l'eau pendant 5 minutes. Après lavage à l'eau distillée, l'acridine orange fixée est précipitée par le rouge congo à 1% (m/v) dans l'eau pendant 5 minutes. Après un lavage abondant à l'eau distillée, la coloration est finalisée par un bain dans du vert lumière à 1% (w/m) dans l'eau iodée (0,02M) pendant 5 minutes. Après un dernier rinçage à l'eau distillée, les coupes sont couvertes d'une lamelle en verre et examinées en microscopie à fond clair. Les protéines sont vertes à vert-bleu, les parois sont orangées à brun.

## 2. Analyse granulométrique

Afin d'obtenir une information sur la taille des particules obtenues après l'homogénéisation à haute pression, une analyse granulométrique est effectuée. L'appareil utilisé est le MasterSizer 2000 de chez Malvern Instruments® qui fonctionne sur le principe de la diffraction de la lumière en fonction de la taille des particules et permet d'étudier une population de particules de 0,02 $\mu\text{m}$  à 2000 $\mu\text{m}$ .

La diffraction est un phénomène qui se produit chaque fois qu'un obstacle (c'est-à-dire un corps d'indice optique différent du milieu environnant) s'interpose dans la propagation de la lumière incidente. Plus l'obstacle est petit, plus la déviation angulaire de la lumière est importante : il en est ainsi pour les particules, considérées comme des obstacles à la propagation de la lumière incidente. Les particules en suspensions sont éclairées par un faisceau laser, ce qui provoque une diffraction du rayon incident et l'apparition de franges visibles sur le disque de diffraction à l'infini.

L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les disques de diffractions à l'infini obtenus ne dépendent que de l'intensité du rayonnement diffracté et de l'angle de diffraction, et est indépendant de l'indice de réfraction de la particule. L'obtention de la taille de particules se calcule à partir de la formule de Fraunhofer qui considère les particules comme sphériques et non poreuses, suffisamment éloignées les unes des autres, animées d'un mouvement aléatoire et qui diffractent la lumière avec la même efficacité, quelle que soit leur taille.

La suspension de particules est diluée dans de l'eau et soumise à la diffraction laser par l'appareil. Les résultats obtenus se présentent sous la forme de graphique de répartition de populations de taille.

## IV. Fermentation par les souches de champignons et bactéries

### A. *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oligosporus*

#### 1. Mise en culture

*Aspergillus oryzae* (Collection de l'Institut Pasteur, *Aspergillus oryzae*, UMIP 1042.72) et *Rhizopus oligosporus* (Collection de l'Institut Pasteur, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, UMIP 1126.45) sont cultivés en milieu solide sur PDA (Extrait de Pomme de terre 10.3%,

Dextrose 51.3%, Agar 38.4% (% massique), Fluka®). Le PDA est repris dans de l'eau milliQ à raison de 39g/L. La solution est autoclavée pendant 15 minutes à 120°C, puis coulée dans des boîtes de Pétri rondes en atmosphère stérile. Après gélification à température ambiante, un prélèvement issu d'une boîte de pétri d'une culture mère est positionné au centre de la boîte de pétri contenant le PDA gélifié vierge. La croissance et la sporulation du champignon se fait dans une enceinte climatique maintenue à 37°C et à 90% d'humidité relative pendant 7 jours. A la fin de la culture, le PDA est recouvert de mycélium et les spores sont visibles à l'œil nu et se situent au niveau des têtes conidiennes (*Aspergillus oryzae*) ou des sporocystes (*Rhizopus oligosporus*).

Afin d'isoler ces spores et de pouvoir les inoculer à la préparation d'arachide, 10 mL d'eau stérile additionnés d'une goutte de Tween 20 (Sigma-Aldrich) sont versés dans la boîte de pétri contenant la culture. A l'aide d'un râteau en verre, le mycélium est décollé et les spores suspendues dans la phase aqueuse. Après filtration pour séparer le mycélium des spores, la suspension de spores est diluée au 1 :10<sup>ème</sup> dans de l'eau et dénombrée dans une cellule de Fuchs-Rosenthal.

## 2. Fermentation en milieu solide

### a. Protocole de fermentation en boîte de pétri

Les téguments des arachides entières sont éliminés, et les arachides sont mises à tremper dans une solution aqueuse selon un ratio 1 :4 (m/v) contenant 0,2% (v/v) d'acide acétique pur sur la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, les arachides sont égouttées et autoclavées à 120°C pendant 15 minutes puis disposées dans un cristalliseur et mises dans une étuve à 65°C pendant 2 heures afin d'éliminer l'excédent d'eau. Après broyage au moulin à café, les arachides sont additionnées de maïs concassé (ratios variables).

Les boîtes de pétri utilisées lors de la fermentation sont régulièrement percées à l'aide d'une aiguille par le fond afin de favoriser l'aération. Dans des conditions stériles, le broyat d'arachide est disposé dans ces boîtes de pétri à raison de 20 g/boîte et additionné d'une solution de spores (10<sup>6</sup> spores pour 1 g de broyat). Après répartition homogène de la solution de spores dans les boîtes de pétri, le broyat d'arachide inoculé est disposé dans une enceinte climatique à 30°C, 94% d'humidité relative pendant 24h, 48h, 72h avec un retournement de la galette d'arachide toutes les 24h.

Les fermentations sont réalisées en triplicat pour chaque condition, et pour chaque prélèvement, le fermentât est récupéré, lyophilisé, et stocké à -20°C pour les analyses futures.

*b. Extraction des protéines*

Le lyophilisat est récupéré et broyé au mortier. La poudre est reprise dans un tampon d'extraction Tris 20 mM pH 8,5, NaCl 150 mM (ratio 1 :10 m/v) et mise à agiter sur roue pendant une heure à température ambiante. Après centrifugation à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C, la phase lipidique est éliminée et le surnageant est récupéré et correspond à la fraction protéique soluble. Le culot est repris dans un tampon dénaturant (Tris 125 mM, SDS 2%, Glycérol 10%, DTT 5 mM) dans un ratio de 1 :10. Après vortexage de la suspension, celle-ci est mise à chauffer à 100°C pendant 5 minutes. Après centrifugation à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré et correspond à la fraction protéique insoluble.

### **3. Fermentation liquide**

*a. Protocole de fermentation*

Le lait d'arachide obtenu après homogénéisation à haute pression est porté à un pH de 4,5 avec de l'acide acétique pur. Du glucose est ajouté à raison de 0,2% (m/v). Les spores de champignons sont inoculées à raison de  $10^6$  spores/mL de lait d'arachide. La fermentation se déroule dans un agitateur mécanique (MaxQ 4000, Fisher Scientific) réglé à 150 rpm, 30°C, avec des prélèvements à 24h, 48h et 72h. Chaque temps de fermentation est réalisé en triplicat pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. Après fermentation, les fermentâts sont stockés à -20°C jusqu'à l'extraction protéique.

*b. Extraction des protéines*

Après décongélation du fermentât, le pH est ajusté à 6,7 avec une solution de soude 0,1M. Un volume de 1,5 mL est introduit dans un tube Eppendorf de 2 mL, puis centrifugé à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C. La phase lipidique est éliminée et le surnageant prélevé correspond au surnageant protéique après fermentation. Le culot est repris dans 1 mL de tampon Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 8,5. Après homogénéisation, le tube est mis à agiter sur roue pendant une heure à température ambiante, puis est centrifugé à 16,100 x g

pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et correspond à la fraction protéique soluble. Le culot est repris dans 1 mL d'un tampon dénaturant (Tris 125 mM, SDS 2%, Glycérol 10%, DTT 5 mM) et homogénéisé avant d'être chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Après centrifugation à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est prélevé et correspond à la fraction protéique insoluble.

## **B. *Bacillus subtilis***

### **1. Mise en culture**

La culture mère issue de la collection de l'institut Pasteur (*Bacillus subtilis* subsp *subtilis*, CIP 52.65) est mise en culture sur un milieu gélosé CASO (Fluka®) à 37°C en conditions stériles. Après le développement des colonies à la surface de la gélose, une d'entre elle est prélevée et mise en culture dans un erlenmeyer contenant 100 mL de milieu CASO à 37°C sous agitation 150 rpm sur la nuit. Le lendemain, les ampoules contenant les cultures mères de *Bacillus subtilis* sont préparées à partir de ces 100 mL de cultures, et conservées dans leur milieu additionné de 20% de glycérol dans un congélateur à -80°C.

### **2. Fermentation en milieu liquide**

Une ampoule de culture de *Bacillus subtilis* est mise à décongeler à température ambiante, et est reprise dans 2 mL de milieu CASO et mise en culture pendant 2h à 37°C. La totalité de la culture est ensuite transférée dans 100 mL de milieu de culture au sein d'un erlenmeyer de 250 mL stérile, et incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (150 rpm).

Le lendemain, l'homogénéisat d'arachide est chauffé à 100°C pendant 10 minutes afin d'éviter la croissance indésirée d'autres souches bactériennes. Le lait est ensuite transféré dans un tube de 50 mL et additionné de 2% (m/v) de maltose. La culture de bactérie est ajoutée au lait d'arachide dans un ratio 1 :2 (v/v) et mise à incuber pendant 48h à 37°C. Après fermentation, le fermentât est prélevé et stocké à -20°C pour les analyse futures.

### **3. Dégradation par les protéases de *Bacillus subtilis***

Une ampoule de culture de *Bacillus subtilis* est mise à décongeler à température ambiante, et est reprise dans 2 mL de milieu CASO et mise en culture pendant 2h à 37°C. La

totalité de la culture est ensuite transférée dans 100 mL de milieu de culture au sein d'un erlenmeyer de 250 mL stérile, et incubée pendant la nuit à 37°C sous agitation (150 rpm).

Le lendemain, ces 100 mL de culture bactérienne sont centrifugés à 10,000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans du tampon PBS pour obtenir une concentration massique de bactéries de 0,2g/mL de PBS. Dans un erlenmeyer stérile de 250 mL, 100 mL de milieu CASO est introduit et inoculé avec 600µL de la solution bactérienne à 0,2g/mL. L'incubation se déroule pendant 4h à 37°C sous agitation à 250 rpm pour la production de protéases.

Le milieu de culture est centrifugé à 9000 x g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est récupéré. Dans un erlenmeyer de 100 mL, le lait d'arachide et le surnageant de la culture bactérienne est mélangé selon un ratio de 1 :10 (v/v). Cette dernière étape est réalisée en triplicat.

La dégradation des protéines d'arachide se déroule sans agitation à 37°C pendant 48h. Les extractions et analyses sont réalisées immédiatement après la dégradation pour éviter la poursuite de la protéolyse par les protéases de *Bacillus subtilis*.

#### 4. Extraction des protéines

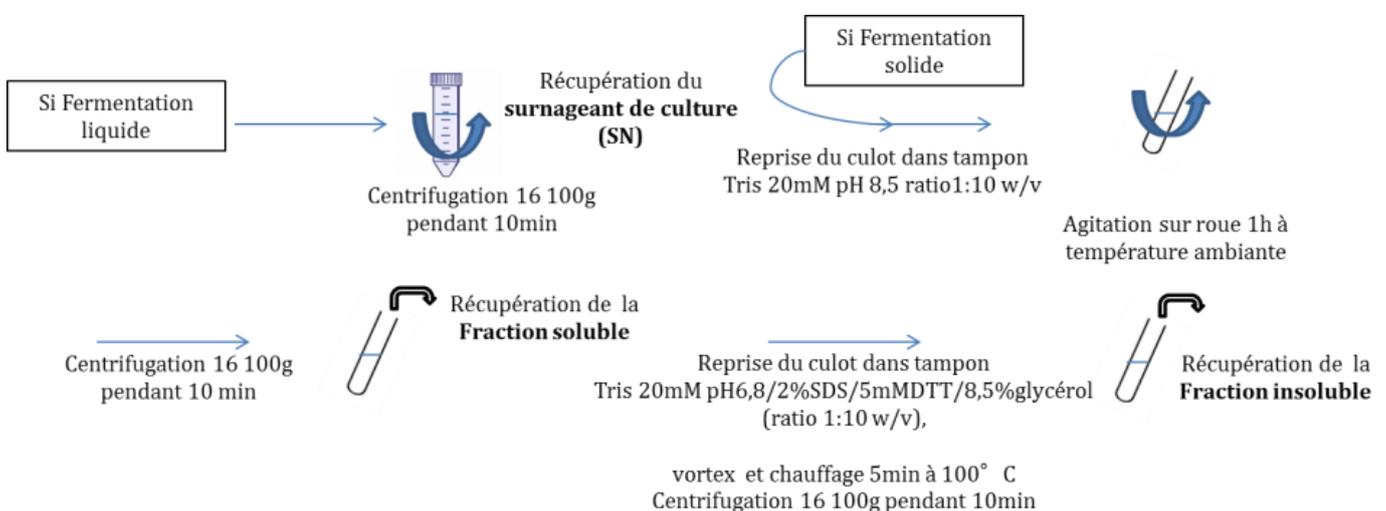


Figure 16 : Protocole expérimental pour l'extraction des protéines après fermentation.

Après décongélation du fermentât ou des protéines dégradées, 1,5 mL sont introduits dans un tube Eppendorf de 2 mL, puis centrifugé à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C. La phase lipidique est éliminée et le surnageant prélevé correspond au surnageant protéique après fermentation. Le culot est repris dans 1 mL de tampon Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH

8,5. Après homogénéisation, le tube est mis à agiter sur roue pendant une heure à température ambiante, puis est centrifugé à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et correspond à la fraction protéique soluble. Le culot est repris dans 1 mL d'un tampon dénaturant (Tris 125 mM, SDS 2%, Glycérol 10%, DTT 5 mM) et homogénéisé avant d'être chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Après centrifugation à 16,100 x g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est prélevé et correspond à la fraction protéique insoluble.

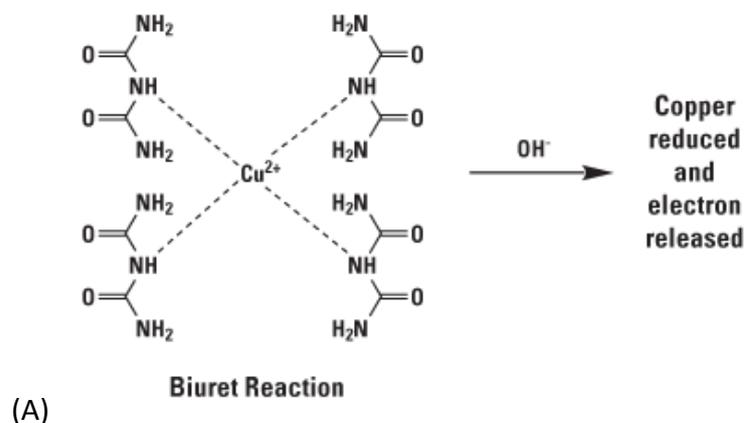
## V. Analyse des fractions protéiques après fermentation

### A. Dosage par la méthode de l'acide bicinchoninique

#### 1. Principe

La méthode de dosage à l'acide bicinchoninique est une technique de dosage colorimétrique des protéines qui supporte la présence de SDS (jusqu'à 5%) et autres détergents et agents réducteurs (DTT entre autres). Le principe repose sur la réduction du cuivre en milieu alcalin en présence de protéines, formant ainsi des ions cuivreux qui vont se complexer avec l'acide bicinchoninique. La première étape est appelée la réaction du Biuret : les peptides contenant deux, trois ou plus acides aminés vont complexer les ions cuivriques en ions cuivreux dans un milieu alcalin en présence de tartrate de potassium-sodium. La deuxième étape consiste en l'ajout de l'acide bicinchoninique, qui réagit avec l'ion cuivreux : deux molécules de BCA se complexent avec un ion cuivreux pour former un composé d'une couleur intense pourpre soluble en milieu aqueux qui absorbe à une longueur d'onde de 562 nm.

La présence de cystéine, tyrosine et tryptophane dans les séquences protéiques influence la détectabilité des protéines par cette méthode de dosage. Cependant, contrairement à d'autres méthodes de dosage, le squelette peptidique favorise aussi la formation colorée, ce qui permet de minimiser les variabilités de signal dû à la différence de composition des protéines.



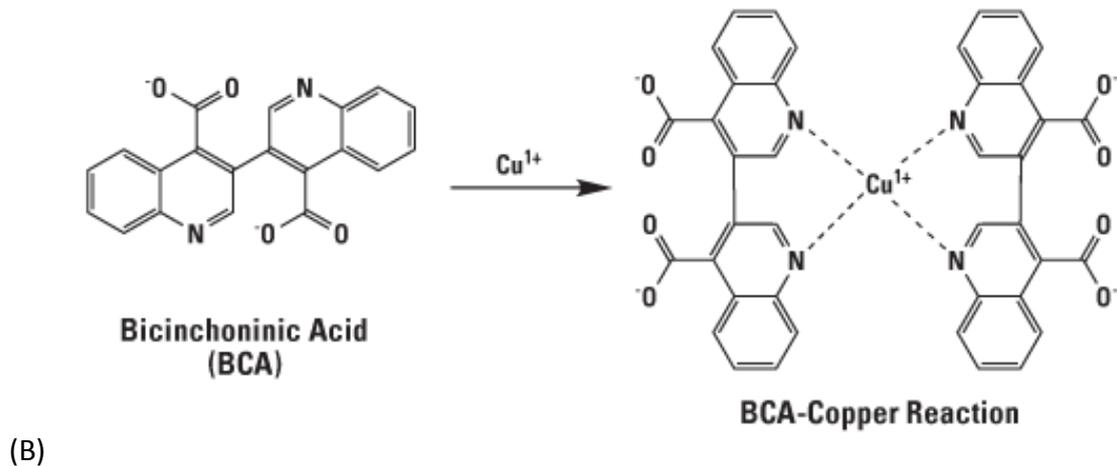


Figure 17 : Réaction chimique du dosage au BCA

A/ Schéma réactionnel de la réaction du Biuret B/ Formation du complexe BCA-Cu<sup>+</sup>

## 2. Protocole

Les dosages de protéines sont réalisés dans une plaque à fond plat 96 puits (Greiner®). Les extraits protéiques ne contenant pas de DTT sont dilués au 1 :20<sup>e</sup> dans de l'eau milliQ et déposé à raison de 25µL par puits en triplicatas. Les extraits protéiques contenant du DTT sont dilués au 1 :20<sup>e</sup> dans de l'eau milliQ en présence de 50 mM d'iodoacétamide. La solution est mise à l'étuve à 37°C pendant 15 minutes afin de bloquer les sites -SH du DTT par carboxyamidométhylation et d'ainsi éliminer les interférences possibles avec les réactions mises en œuvre dans le dosage au BCA. Après cette réaction de carboxyamidométhylation, 25µL sont déposés par puits en triplicatas. La gamme étalon est réalisée grâce à des dilutions en cascade d'une solution de BSA de concentrations croissantes entre 0 mg/mL et 2 mg/mL, déposées à raison de 25µL par puits.

A ces solutions protéiques est ajouté 200 µL de réaction au BCA (Kit BCA, Pierce®) et la plaque 96 puits est mise à incuber à 37°C pendant 30 minutes avant d'être lue au lecteur de microplaque (PolarStar, BMG Labtech®) à 562 nm.

### B. Analyse électrophorétique en conditions dénaturantes

Afin de suivre la dégradation des protéines, de vérifier la pureté des protéines après les différentes étapes mises en œuvre lors de la purification, d'effectuer des immunorévélation (Western Blot), des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes sont

réalisés. Afin d'avoir une séparation correcte dans les hauts et les bas poids moléculaire, un maillage du gel de séparation de 12,5% en acrylamide est utilisé. [Acrylamide 12.5%, Bis-Acrylamide 0.4%, Tris-HCl 125 mM pH 8.8, SDS 0.1%]. Le gel de concentration est préparé à 4,8% d'acrylamide [Acrylamide 4.8%, Bis-Acrylamide 0.3%, Tris-HCl 375 mM pH 6,8, SDS 0.1%]. Le tampon de charge pour les extraits ne contenant pas de DTT est concentré 4 fois [Tris 1M, Glycérol 40%, SDS 8%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 20%]. Pour les extraits contenant du DTT et du SDS, le même tampon concentré 4 fois est préparé sans SDS ni  $\beta$ -mercaptoéthanol. La migration se déroule dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, a un ampérage de 30 mA par gel, pendant environ 1h. Après migration, les gels sont soit transférés sur membrane de nitrocellulose, soit fixés dans une solution Ethanol 40%, Acide Acétique 10%, Eau 60% pendant 30 minutes, puis colorés dans une solution de bleu de Coomassie R250 [1g de bleu de Coomassie R250, Ethanol 25%, Acide acétique 8%, Eau 67%] pendant une heure. Les gels sont ensuite rapidement rincés avec la solution de décoloration [Ethanol 25%, Acide Acétique 8%, Eau 67%] et mis à décolorer dans la même solution pendant la nuit en présence d'un papier absorbant afin de capter le bleu de Coomassie.

## **VI. Analyses immunologiques après fermentation**

### **A. Western Blot**

#### **1. Principe**

Le nom de Western Blot a été donné par W. Neal Burnette en 1981 à partir d'un jeu de mot sur la technique de détection de l'ADN : le Southern Blot, découverte par Edwin Southern. Le point commun de ces techniques réside dans l'étape de transfert sur membrane, comparé à une empreinte sur buvard (blot en anglais). Les étapes préparatoires pour le Western Blot utilisent l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes pour séparer les protéines selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF ou nitrocellulose et se fixent via des liaisons hydrophobes et ioniques à la surface de celles-ci. Cette étape permet de faciliter les fixations des différents anticorps aux protéines, qui sont nettement plus accessibles à la surface d'une membrane qu'à l'intérieur d'un gel de polyacrylamide. L'immunodétection est effectuée avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme (la peroxydase de raifort) qui, en présence du substrat génère une réaction chimioluminescente visible par exposition sur film

photo ou par caméra. Cette technique permet de vérifier la présence d'une protéine dans l'extrait, de suivre leur dégradation, et de détecter la reconnaissance des peptides issus de la dégradation des protéines par les anticorps.

## 2. Protocole

Les fractions protéiques obtenues selon les protocoles d'extraction (cf. paragraphes « Extraction des protéines ») sont séparées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad), et électrotransférées (Trans-Blot Turbo, BioRad) sur une membrane de nitrocellulose de 0,2µm d'épaisseur (Protran, GE Healthcare). Le transfert se fait en milieu semi sec dans un tampon de transfert [Tris 48 mM, Glycine 39 mM, Méthanol 20% (v/v)] selon le programme prédéfini par l'appareil. La membrane est ensuite colorée par une solution de rouge Ponceau [Rouge Ponceau 0,2% (m/v), Acide Trichloroacétique 0,3% (m/v)] pendant 5 minutes et décolorée dans une solution 0,3% TCA afin de vérifier le bon déroulement du transfert et la présence de protéines. La membrane est ensuite saturée dans une solution [PBS 1x, Tween-20 0,1% (v/v), lait écrémé en poudre 5% (m/v)] sur la nuit sous agitation à 4°C. Cette étape permet de fixer les protéines de lait sur la membrane où aucune protéine n'a été électrotransférée, et d'éviter ainsi que lors de l'incubation avec les anticorps, ceux-ci viennent se fixer sur les sites libres de la membrane.

Les anticorps de lapins produits selon le protocole défini en I.C sont dilués dans une solution dans le tampon de saturation : (Anticorps Anti-Ara h 1 : dilution 1:250,000; Anticorps Anti-Ara h 2 : dilution 1:5,000; Anticorps Anti-Ara h 3 : dilution 1:10,000) et déposé sur la membrane. L'incubation se déroule pendant une heure à température ambiante en chambre humide afin que la membrane ne dessèche pas. La membrane est ensuite rincée avec le tampon de saturation trois fois dix minutes, puis incubée dans l'anticorps anti-Rabbit-IgG couplé à la peroxydase de raifort, dilué au 1 :2,000 dans le tampon de saturation, pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.

Après trois lavages dans un tampon [PBS 1x, Tween-20 0,1%], la membrane est incubée avec un substrat (Immobilon, Merck Millipore) et révélée à la camera ChemiDoc MP (BioRad).

## B. ELISA

### 1. Principe

L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permet d'avoir une approche quantitative de la réaction immuno-enzymatique entre allergènes et anticorps réalisée sur support solide. Nombre de possibilités est envisageable dans cette technique : directe, en sandwich, en double sandwich ou en compétition. Afin de pouvoir doser la dégradation des protéines et quantifier leur reconnaissance par les anticorps de lapins dirigés contre les allergènes, la technique adoptée a été le dosage ELISA directe. Les anticorps utilisés en tant qu'anticorps primaires sont les anticorps dirigés spécifiquement contre les allergènes de l'arachide Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 produits chez le lapin. Ces anticorps vont reconnaître les fragments épitopiques résiduels de l'arachide après fermentation. Grâce à un deuxième anticorps couplé à une enzyme (la phosphatase alcaline) qui reconnaît les fragments constants des IgG de lapins, la révélation par l'ajout du substrat permet de quantifier la quantité d'anticorps primaires fixés sur la protéine coatée.

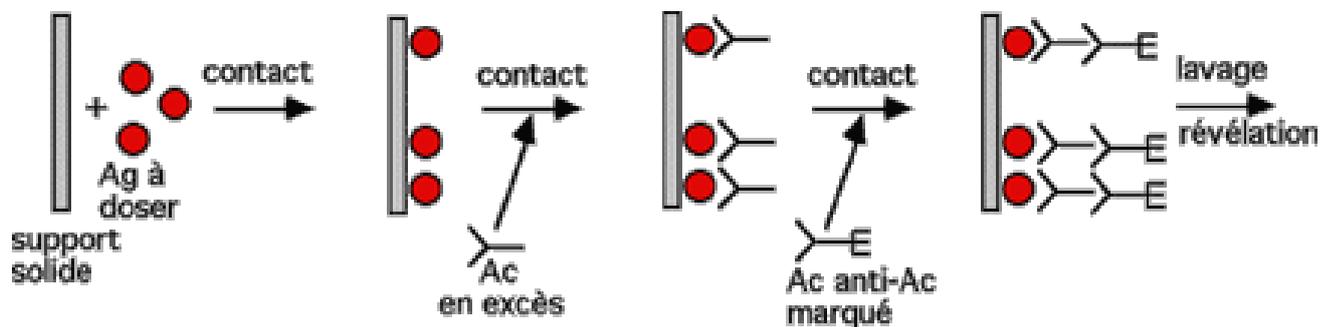


Figure 18 : Principe de la technique ELISA directe

De façon plus générale, la technique ELISA est très utilisée, peu chère et facile d'emploi. Elle est mise en œuvre pour prouver la présence d'un antigène (dosage HIV par exemple), mais peut être aussi utilisée pour détecter des traces d'allergènes sur les lignes de production dans l'industrie agro-alimentaire.

### 2. Protocole

Les différentes dilutions de protéines issues des extractions réalisées après fermentation sont fixées sur une plaque ELISA à fond plat 96 puits (Greiner) pendant une nuit à 4°C en triplicata avec un dépôt de 50µL/puits. Les dilutions sont réalisées dans un tampon PBS 1x et les gammes varient entre 0 et 800 ng par dépôt. La gamme étalon qui sert de référence est

issue des dilutions réalisées sur les extractions successives réalisées sur l'arachide avant fermentation. Après le coating des extraits protéiques sur la nuit, les puits sont rincés 3 fois dans un tampon PBS 1x (200 µL/puits/rinçage), et saturés avec une solution de saturation [PBS1x, Tween 20 0,1%, BSA, 1%] à raison de 100µL/puits pendant une heure à température ambiante sous agitation. Comme pour la technique du Western Blot, cette étape permet de saturer les sites de fixations des protéines à la surface des puits, et ainsi éviter que l'anticorps primaire se fixe à la paroi et crée un faux signal positif.

Après saturation, les puits sont vidés par retournement et les anticorps dirigés contre les allergènes de l'arachide produits chez le lapin sont utilisés comme anticorps primaires et dilués dans la solution de saturation (Anticorps Anti-Ara h 1 : dilution 1:10,000; Anticorps Anti-Ara h 2 : dilution 1:5,000; Anticorps Anti-Ara h 3 : dilution 1:20,000) pour être déposés à raison de 50 µL par puits, incubés pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Après fixation de l'anticorps primaire, les puits sont vidés et rincés 3 fois avec la solution de saturation (200µL/puits/rinçage). L'anticorps produit chez la chèvre et dirigé contre le fragment constant des IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline sert d'anticorps secondaire. Il est dilué à 1 :2,000 dans la solution de saturation et déposé à raison de 50 µL/puits. L'incubation se déroule pendant une heure à température ambiante sous agitation. Les puits sont ensuite vidés par retournement et lavés trois fois avec la solution de saturation, et le substrat (SIGMAFAST, p-nitrophényl phosphate, Sigma) est rajouté dans chaque puits (100 µL). Après trente minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la réaction est bloquée par l'ajout de 50 µL de NaOH 3N, et la plaque est lue à 405 nm avec le lecteur de plaque Polastar.(BMG Labtech®).

## **Résultats et discussion**



Dans cette partie, nous allons présenter les principaux résultats obtenus pour l'obtention d'une arachide hypoallergénique. La première partie, intitulée « Outils d'analyse de la dégradation des allergènes » présente les résultats obtenus pour la mise en place des outils d'analyses. Dans un premier temps, nous exposerons la pureté des protéines purifiées correspondant aux allergènes majeurs de l'arachide, confirmée par une analyse en spectrométrie de masse. Dans un second temps, les anticorps dirigés contre ces mêmes allergènes seront caractérisés par Western Blot et ELISA, et leur dilution optimale sera définie pour la suite de notre étude. Ces outils sont indispensables pour pouvoir analyser les différents extraits que nous obtiendrons lors des expériences de dégradation des allergènes.

Dans la seconde partie, intitulée « Dégradation des allergènes », seront présentés les résultats obtenus pour la dégradation des allergènes *via* les protocoles utilisant les microorganismes. Pour chaque condition testée, le schéma de présentation restera le même : tout d'abord, la séparation électrophorétique en gel SDS-PAGE montrera la composition protéique des extraits réalisés après fermentation. Par la suite, un Western Blot permettra d'avoir une approche qualitative sur l'immunoréactivité des protéines présentes après la mise en œuvre de la fermentation. Pour finir, un dosage ELISA permettra d'affiner le résultat présenté par le Western Blot, et l'approche quantitative obtenue sera présentée sous forme d'histogramme.

Cette structure de ce chapitre « Résultats et discussion » permettra d'avoir une approche relativement chronologique du travail effectué, et la comparaison des résultats obtenus selon les fermentations mettant en œuvre différentes souches sera facilitée par la structure de la seconde partie.

Les résultats obtenus lors de ce travail de recherche ont conduit au dépôt d'un brevet disponible en annexe de ce manuscrit.



## **Partie 1 : Outils d'analyse de la dégradation des allergènes**

### **I. Purification des allergènes majeurs de l'arachide**

La purification des allergènes de l'arachide est une étape clé déterminante pour la production d'anticorps spécifiques : plus la protéine obtenue est d'une pureté élevée, plus les anticorps obtenus par immunisation seront spécifiques. Ainsi, l'objectif fixé lors des différentes étapes de purification est d'obtenir une pureté d'au moins 95%, qui est couramment estimée comme suffisante pour considérer que les anticorps seront suffisamment spécifiques. La purification se fait à partir de graines d'arachide crues, de la variété Flo Runner, fournies par l'entreprise SOFICOR. La grande quantité de protéines présentes dans une graine d'arachide conduit à limiter la quantité de matière première nécessaire à l'obtention d'une quantité de protéines purifiées suffisante.

#### **A. Ara h 1**

La glycosylation portée par Ara h 1 est une propriété majeure dans la capacité de fixation de la protéine sur la colonne de purification greffée avec la concanavaline A. C'est cette interaction spécifique qui nous permet de séparer exclusivement Ara h 1 du reste des protéines de l'arachide. La mise en œuvre des étapes de préparation de l'extrait protéique total d'arachide (dont la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium) nous permet d'introduire en entrée de colonne un échantillon déjà enrichi en Ara h 1. La séparation des protéines de l'extrait total après précipitation au sulfate d'ammonium est montrée dans la Figure 19. Lors du chargement des pistes, la quantité de protéine déposée est, selon le dosage au BCA, de 20 µg de protéines pour chacune des deux pistes. Cette étape préparatoire de la purification montre que la quantité de protéine dans le surnageant de la précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$  contient majoritairement Ara h 1, que l'on retrouve à un poids moléculaire de 63,5 kDa. La présence d'un doublet pour la protéine Ara h 1 peut s'expliquer par la présence de glycosylations : le motif glucidique porté par la structure de la protéine peut entraîner une variation du poids moléculaire, visible en gel SDS-PAGE. Après fixation sur la colonne de Concanavaline A de l'extrait après précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ , l'élution est provoquée par un gradient de glucose et permet de récupérer Ara h 1 (Figure 20).

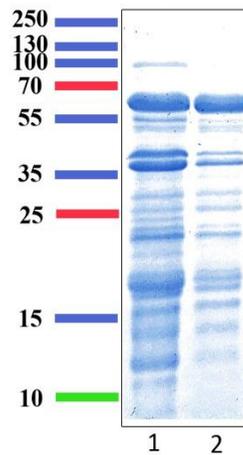


Figure 19 : Séparation des protéines de l'extrait brut par précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$

La piste 1 contient l'extrait brut avant précipitation au sulfate d'ammonium, et la piste 2 l'extrait contenu dans le surnageant après précipitation à 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$  et dialyse contre le tampon Tris 20 mM pH 7,4.

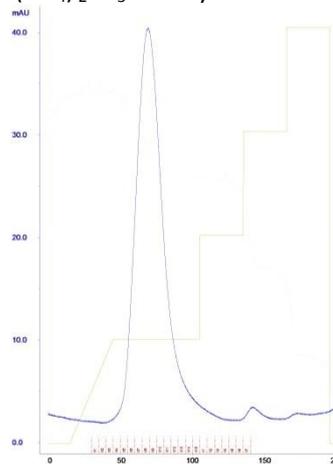


Figure 20 : Chromatogramme d'éluion d'Ara h 1 sur colonne de Con A.

Le pic unique de suivi de l'absorbance à 280 nm sur la courbe bleue correspond à une concentration en glucose de 200 mM (courbe verte).

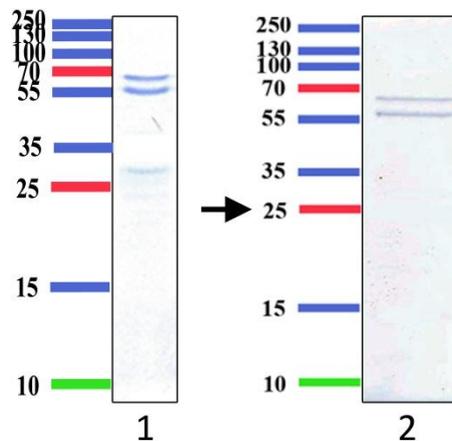


Figure 21 : Gels SDS PAGE des fractions après passage sur colonnes Con A et PD-10

La piste 1 correspond au profil obtenu en sortie de colonne et la piste 2 après passage sur PD-10.

Cependant, comme constaté sur le gel SDS-PAGE des fractions recueillies (Figure 21, Piste 1), lors de l'élution, la protéine concanavaleine A se retrouve dans l'éluât. Cette protéine est un homotétramère de 110 kDa dont on retrouve les monomères représenté par la bande présente à ~25 kDa. Le caractère réducteur et dénaturant du tampon de charge peut expliquer la présence du monomère sur le gel SDS-PAGE. Afin de pouvoir séparer la Con A d'Ara h 1, un passage sur une colonne PD-10 est réalisé. Le motif Dextran du Sephadex G-25 (Amersham) qui compose cette colonne qui permet la fixation la Con A, et ainsi d'obtenir dans l'éluât la protéine Ara h 1 purifiée (Figure 21, Piste 2).

La lyophilisation permet de concentrer la protéine et de définir par pesée la quantité exacte obtenue. Les étapes de purification ont été répétées 3 fois sur 20 mL d'extraits bruts d'arachide avant précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$  et ont permis d'obtenir 3,1 mg de protéines purifiées.

### **B. Ara h 2 et Ara h 3**

La définition du profil d'élution a permis la séparation d'Ara h 2 et d'Ara h 3 des protéines de l'arachide en un seul passage sur colonne, et d'ainsi obtenir les deux protéines avec une pureté suffisante pour l'immunisation des lapins. La délipidation préalable est nécessaire pour éviter d'encrasser la colonne, ce qui pourrait entraver la fixation des protéines. L'étape d'extraction et de fixation se déroule dans un tampon Tris 20 mM exempt de sels afin de ne pas gêner la fixation des protéines aux groupements triméthylamines, et à pH 8 pour s'assurer que les protéines d'intérêts sont chargées négativement ( $\text{pH} > \text{pI}$ ).

La figure Figure 22 représente le chromatogramme obtenu lors de l'élution par le gradient croissant en NaCl. La courbe bleue indique l'absorbance à 280 nm et reflète donc la quantité de protéines éluées à une concentration donnée. La courbe verte représente le profil de concentration en NaCl et la courbe marron l'évolution de la conductimétrie. Les fractions (1mL/fraction) H2 à H6 et I7 à I11 sont récupérées et analysées en gel SDS-PAGE.

L'élution se déroule avec un gradient de NaCl croissant et l'analyse des gels SDS-PAGE des fractions obtenues (de H<sub>2</sub> à H<sub>6</sub>, Figure 23) montrent trois bandes pour des polypeptides à 20, 17 et 14 kDa (Figure 23) qui correspondent au doublet d'Ara h 2 et à la protéine Ara h 6, respectivement.

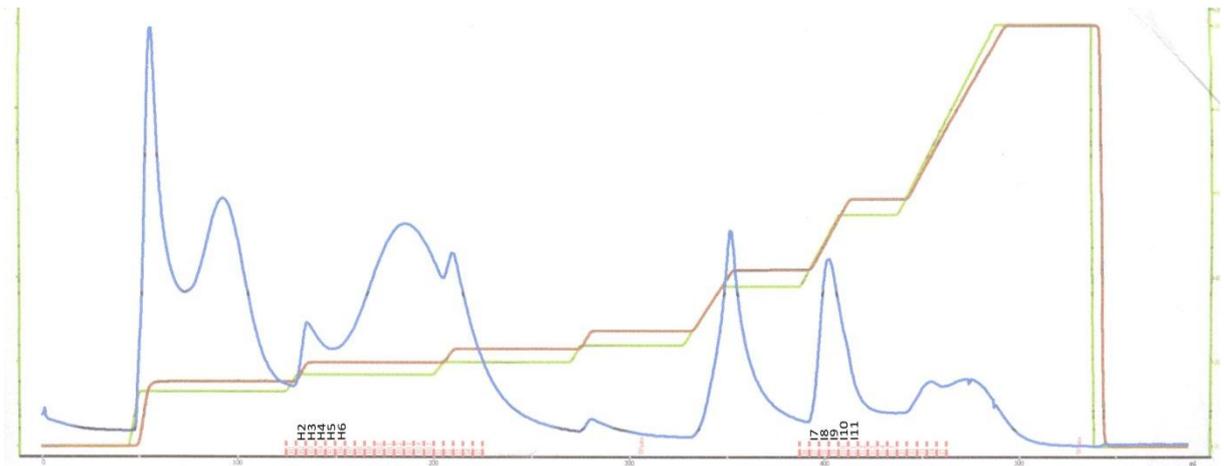


Figure 22 : Chromatogramme d'élué pour la purification sur HiTrap Q FF de 5 mL

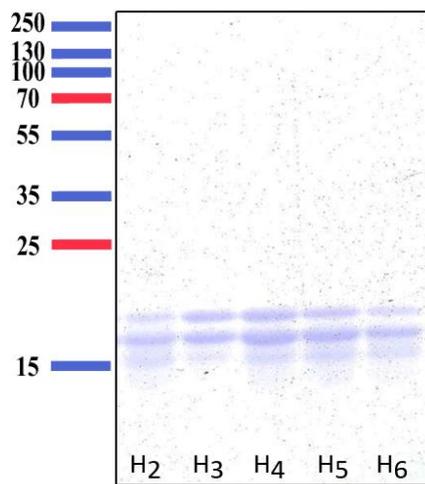


Figure 23 : Profil électrophorétique sur gel SDS-PAGE des fractions H2 à H6 après purification sur HiTrap Q FF

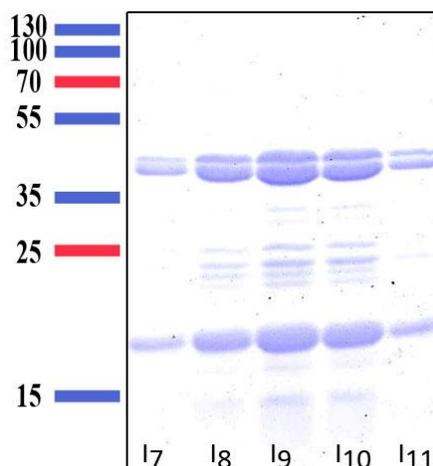


Figure 24 : Profil électrophorétique sur gel SDS-PAGE des fractions I7 à I11 après purification sur HiTrap Q FF

Pour les fractions I7 à I11 (Figure 22), l'analyse en gel SDS-PAGE montre 5 bandes majoritaires : 2 doublets à 42 et 45 kDa, 28 et 25 kDa et une bande unique aux alentours de 22 kDa (Figure 24). Les 4 bandes aux poids moléculaires les plus élevés correspondent à ce qui est décrit dans la littérature pour la protéine Ara h 3. L'identification de la bande à 20 kDa doit être réalisée par spectrométrie de masse.

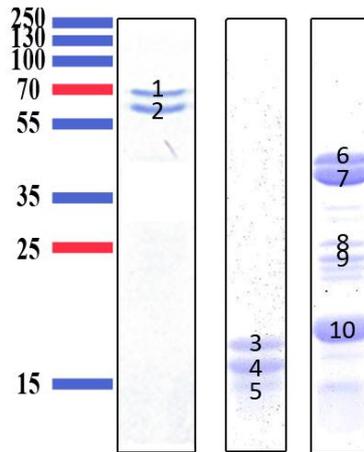
Les étapes de la purification sont réalisées 5 fois (à partir de 10 mL d'échantillon) pour obtenir après pool des fractions et lyophilisation 1,5 et 1,7 mg de protéines pour Ara h 2 et Ara h 3, respectivement.

## II. Caractérisation des protéines purifiées par spectrométrie de masse

L'identification des protéines purifiées est primordiale avant de procéder à l'immunisation des lapins. Il faut en effet s'assurer que la production des anticorps est dirigée contre les bonnes protéines et ainsi permettre d'obtenir des sérums spécifiques. Cette identification est réalisée en spectrométrie de masse : les protéines issues des fractions d'élution séparées sur gels SDS-PAGE sont prélevées et digérées à la trypsine dans le but d'obtenir des fragments peptidiques qui sont ensuite analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 25). Les peptides identifiés par l'analyseur ressortent sous la forme d'une liste de masses, et sont soumis au logiciel Data Explorer (Applied Biosystems). Les spots contenant les étalons de calibrations externes (Mix 1+2) sont préalablement traités afin de rétablir la différence qui pourrait exister entre les données réelles et les données collectées par l'analyseur. Une fois cette calibration externe réalisée, les spectres de m/z sont analysés un à un, et pour chacun d'entre eux, une calibration interne est réalisée avec les pics de masse correspondants aux peptides issus de l'autodigestion de la trypsine que l'on retrouve systématiquement dans les échantillons (842,51 ; 1006,4879 ; 1045,5642 ; 2283,1807 ; 2286,1254 m/z). Le logiciel Data Explorer permet de corriger la ligne de base, de supprimer le bruit de fond et les pics isotopiques, et la liste de m/z obtenues est réduite par l'ajustement du seuil de détection.

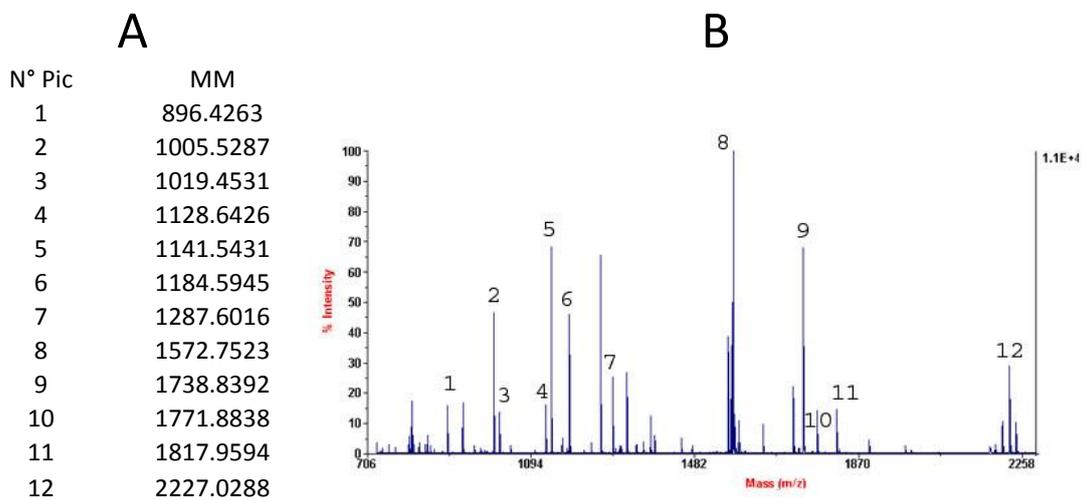
La liste des pics est alors soumise à Protein Prospector (<http://194.199.55.210/ProteinProspector/ucsfhtml3.2/msfit.htm>) et comparée à une base de données contenant les listes des masses de digestions tryptiques putatives des allergènes des fruits à coque.

Les conditions d'analyses sont paramétrées : pas de modification des cystéines, oxydation possible des méthionines, et un delta ppm (qui permet de prendre en compte le



**Figure 25 : SPS-PAGE des protéines purifiées et numéros des spots analysés en spectrométrie MALDI-TOF**

La piste 1 contient la protéine issue de la purification sur Concanavoline A, la piste 2 contient le doublet à 17 et 20 kDa ainsi qu'une protéine à 14 kDa après purification sur HiTrap Q FF, et la piste 3 contient majoritairement deux doublets autour de 40 et 25 kDa et une bande à 22 kDa.



**Figure 26 : Profil massique du digestat tryptique n°1 après analyse**

A : liste des m/z identifiés par Protein Prospector comme appartenant à la séquence de la protéine Ara h 1  
 B : Pics correspondants aux m/z du tableau A et placés sur le spectre.

décalage possible entre la  $m/z$  obtenue et la masse réelle du peptide) défini entre 20 et 200, selon les protéines.

Les pics majoritaires représentent les peptides les plus fréquemment rencontrés par l'analyseur, et indiquent donc la présence dans l'échantillon d'une majorité de peptides appartenant, par exemple ici (Figure 26) à la protéine Ara h 1.

Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'une liste de protéines potentielles, contenant leur rang d'identification basé sur le score MOWSE calculé à partir d'un algorithme et qui traduit un « score d'identification », ainsi que le pourcentage de séquence recouvert par les peptides identifiés. Ces informations permettent de sélectionner les protéines favorablement classées et d'analyser leur carte peptidique plus en détail. Dans un premier temps, la liste des masses des peptides identifiés est détaillée : la masse du peptide issue du spectre est corrélée avec la masse putative des acides aminés de la séquence protéique, et l'erreur de mesure entre les deux valeurs est donnée. Il convient d'avoir une erreur évaluée qui ne varie pas excessivement chez les peptides majeurs identifiés comme appartenant à la protéine. Ensuite, la liste des masses identifiées est corrélée au spectre dans Data Explorer et les pics identifiés sont annotés avec leur masse précise correspondante (Figure 26). Si les pics identifiés par Protein Prospector sont quantitativement majoritaires dans le spectre de masse (axe des ordonnées, % d'intensité), alors la protéine analysée est statuée comme correspondant à celle identifiée.

Le Tableau 6 recense les résultats obtenus pour l'analyse des spots de la Figure 25 avec le taux de recouvrement peptidique obtenu pour chaque protéine identifiée, traduit sur la séquence de la protéine par les peptides rouges. Les taux de recouvrement obtenus pour les spots ne sont pas très importants (<46%) ce qui peut s'expliquer par le fait que certains peptides générés par l'hydrolyse enzymatique *via* la trypsine ne sont pas facilement ionisables par le laser de désorption et donc absent au niveau de l'analyseur. Le doublet à ~63 kDa (Figure 25, Piste 1, Spots 1 et 2) est donc identifié comme étant Ara h 1, protéine de la famille des globulines 7S chez l'arachide. La présence de cette protéine sous la forme d'un doublet assez diffus a été montré par Burks, A. W. et al. (1991) comme une particularité électrophorétique due aux glycosylations existantes sur cette structure protéique.

Les Albumines 2S sont représentées par les spots 2, 3 et 4 (Figure 25, Piste 2) et sont restreintes dans une zone de poids moléculaires qui varie entre 14 et 20 kDa. Ces protéines sont présentes dans la graine d'arachide sous plusieurs isoformes. La présence d'Ara h 2

N° Spot	Protéine identifiée	Poids moléculaire	Peptides	% de recouvrement de la séquence	Séquence
1	Ara h 1	70283.4 Da	96/105-124/130-138-145-153/166-172 / 180-186/192-205/213-255/265-278/284-308/318-319/333-335/348-387/401-402/413-461/471-472/477-560/572	29%	MGRVSLML LGLVLASV SATQAKSPYR KTEPNCQARC LOSCOQEPDD LKQKACESRC TKLEYDPRCV YDTGATNGRHR PPGERTGRQ PGDYDDRRQ PRRLEGRWGW SATQAKSPYR KTEPNCQARC LOSCOQEPDD LKQKACESRC TKLEYDPRCV YDTGATNGRHR EETSRRNP FY FFSRRSTRY GNONGRIRVL QRFDRSKQF RHPHQQRPK IRPEGREGEQ IRPEGREGEQ EWWRQPREDDW EWGTPGSEVR VANGNRKSF NIDEGHALRI PSFGFYLIN QGRRRSTR SSNEGWVVK KEGALMLPHF HPVAINASSE ENNRHIFLAG KAFN AEFNEIRVL LEENA GGQEE ERGORRRSTR LDMMMLTVEI KEGALMLPHF HPVAINASSE ENNRHIFLAG KAFN NMFGRLEFVK POKKNPOLQD EYRYTARLK EGVDFIMPAA EDDEEESNR RPSQSPSP EKEQEENQ EKEQEENQ SGEQEKLK NQRESHVSA SATQAKSPYR PRRLEGRWGW GNONGRIRVL QRFDRSKQF RHPHQQRPK IRPEGREGEQ IRPEGREGEQ EWWRQPREDDW EWGTPGSEVR MGRVSLML LGLVLASV PGDYDDRRQ PRRLEGRWGW GNONGRIRVL QRFDRSKQF RHPHQQRPK IRPEGREGEQ IRPEGREGEQ EWWRQPREDDW EWGTPGSEVR
2	Ara h 1	70283.4 Da	77/91-138/145-147/152-153/166-172 / 180-186/192-205/213-255/265-278 / 284-288/307-308/318-319/333-335 / 348-387/401-402/413-414/421-440 / 451-461/471-472/477-480/495-541 / 556-560/572	41%	MGRVSLML LGLVLASV SATQAKSPYR KTEPNCQARC LOSCOQEPDD LKQKACESRC TKLEYDPRCV YDTGATNGRHR PPGERTGRQ PGDYDDRRQ PRRLEGRWGW SATQAKSPYR KTEPNCQARC LOSCOQEPDD LKQKACESRC TKLEYDPRCV YDTGATNGRHR EETSRRNP FY FFSRRSTRY GNONGRIRVL QRFDRSKQF RHPHQQRPK IRPEGREGEQ IRPEGREGEQ EWWRQPREDDW EWGTPGSEVR VANGNRKSF NIDEGHALRI PSFGFYLIN QGRRRSTR SSNEGWVVK KEGALMLPHF HPVAINASSE ENNRHIFLAG KAFN AEFNEIRVL LEENA GGQEE ERGORRRSTR LDMMMLTVEI KEGALMLPHF HPVAINASSE ENNRHIFLAG KAFN NMFGRLEFVK POKKNPOLQD EYRYTARLK EGVDFIMPAA EDDEEESNR RPSQSPSP EKEQEENQ EKEQEENQ SGEQEKLK NQRESHVSA SATQAKSPYR PRRLEGRWGW GNONGRIRVL QRFDRSKQF RHPHQQRPK IRPEGREGEQ IRPEGREGEQ EWWRQPREDDW EWGTPGSEVR
3	Ara h 2.02	20114 Da	23/31-23/32-33/39-40/52-56/62-93/102-136/142-147/155-160/169	42%	MAKLTVAL ALFLAHAHS ARQOWELOGD ROPSPSPYD RFGAGSSQH QY RY RPPSPSPYD RFGAGSSQH QY RY MAKLTVAL ALFLAHAHS ARQOWELOGD ROPSPSPYD RFGAGSSQH QY RY
4	Ara h 2.01	18558.7 Da	21/29-21/30-31/37-54/60-79/88-88/101-122/128-133/141-146/155	46%	MULTIVAL FLAAHASAR CQWELQDRR ROPSPSPYD RFGAGSSQH QY RY GSSQHRCC NEAENFENNQ RY MULTIVAL FLAAHASAR CQWELQDRR ROPSPSPYD RFGAGSSQH QY RY
5	Ara h 6	14960.7 Da	42/50-42/51-52/58-75/81-99/109-100/109	24%	GPWRERGRQ GDSSCERQ DRVNLKPEQ ELVSIPOQCN MENCQRLQ DRQVQDQKR GPWRERGRQ GDSSCERQ DRVNLKPEQ ELVSIPOQCN
6	Allergen Ara h 3/4	61738.1 Da	209-214/304-310/278-284/122-129/37-45 / 121-129/122-130/25-36/196-208/285-299/195-208/131-146/82-98/130-146	21%	MGLKLSVC FCFLVIGASS ISFROQPEEN IFRQPEEN RRPFSNAPQ EFCQGRG FYGLFGCP GYAFWVNDH DTDVAVSIT DTNNNDQLD DTNNNDQLD QHGRRERAQ EGEEENFNG SGTFFPLAQ AFOVDDRQL AFOVDDRQL EYDEDEYE YDEERQDR RRRGSRGG NGEICTA SFKKNGRNR SPDYNPAQ SIKTANELLQ NLLIURW/LGL SAEYGNLYRN ALFPHYMTN AHSIALRG RAHVQVDSN GORVDEELQ EGHVLPVQIN NPFFVPPS EFSRAVA
7	Arachin Athy-4	60735.9 Da	209-214 / 281-287 / 122-129 / 37-45 / 25-36 / 196-208 / 220-233 / 288-302 / 195-208 / 82-98 / 315-334	22%	MGLKLSVC FCFLVIGASS ISFROQPEEN IFRQPEEN RRPFSNAPQ EFCQGRG FYGLFGCP GYAFWVNDH DTDVAVSIT DTNNNDQLD DTNNNDQLD PRGQSRRRR AGQEEENFNG SGTFFPLAQ AFOVDDRQL AFOVDDRQL EYDEDEYE EDRRRGRGS RRGNGEET ICTASV KNI GRNRPDIYN POAGSLKTAN DLNLLURW/LGL RNALFPHYN TNASHIYAL RGRAHVQVDD SNGNRVDEE LQEGHVLVPP QNFVAAGKSK QNFVAAGKSK AGENSVDNL PEEVANSYG LQEQARQL PPQQSPRAV A
8	Trypsin inhibitor [Arachis hypogaea]	25499.3 Da	27-38 / 39-47 / 84-100 / 124-131 / 123-131 / 133-148 / 198-210 / 197-210 / 211-216	38%	NYLHMIALS VECFVLVIGASS SSSFRQPE EYDFLQGR GYGLFGCP ALRPPFSYNA PDEFIQGR GYGLFGCP PTGFAWVNYN DHDTDVAVS LDTNNNDQLD MGLKLSVC FCFLVIGASS ISFROQPEEN IFRQPEEN RRPFSNAPQ EFCQGRG FYGLFGCP GYAFWVNDH DTDVAVSIT DTNNNDQLD DTNNNDQLD PRGQSRRRR AGQEEENFNG SGTFFPLAQ AFOVDDRQL AFOVDDRQL EYDEDEYE YDEERQDR RRRGSRGG NGEICTA SFKKNGRNR SPDYNPAQ SIKTANELLQ NLLIURW/LGL RNALFPHYN TNASHIYAL RGRAHVQVDD SNGNRVDEE LQEGHVLVPP QNFVAAGKSK QNFVAAGKSK AGENSVDNL PEEVANSYG LQEQARQL PPQQSPRAV A
9	Storage protein (homologue Ara h 3)	58485.2 Da	345-357 / 358-368 / 369-381 / 404-415 / 439-450 / 497-507	13%	MGLKLSVC FCFLVIGASS ISFROQPEEN IFRQPEEN RRPFSNAPQ EFCQGRG FYGLFGCP GYAFWVNDH DTDVAVSIT DTNNNDQLD DTNNNDQLD QHGRRERAQ EGEEENFNG SGTFFPLAQ AFOVDDRQL AFOVDDRQL EYDEDEYE YDEERQDR RRRGSRGG NGEICTA SFKKNGRNR SPDYNPAQ SIKTANELLQ NLLIURW/LGL RNALFPHYN TNASHIYAL RGRAHVQVDD SNGNRVDEE LQEGHVLVPP QNFVAAGKSK QNFVAAGKSK AGENSVDNL PEEVANSYG LQEQARQL PPQQSPRAV A
10	Chain A, Crystal Structure Of Peanut Major Allergen Ara H 3	58485.2 Da	358-368 / 497-507 / 404-415 / 345-357 / 439-450 / 369-381 / 416-438	18%	MGLKLSVC FCFLVIGASS ISFROQPEEN IFRQPEEN RRPFSNAPQ EFCQGRG FYGLFGCP GYAFWVNDH DTDVAVSIT DTNNNDQLD DTNNNDQLD QHGRRERAQ EGEEENFNG SGTFFPLAQ AFOVDDRQL AFOVDDRQL EYDEDEYE YDEERQDR RRRGSRGG NGEICTA SFKKNGRNR SPDYNPAQ SIKTANELLQ NLLIURW/LGL RNALFPHYN TNASHIYAL RGRAHVQVDD SNGNRVDEE LQEGHVLVPP QNFVAAGKSK QNFVAAGKSK AGENSVDNL PEEVANSYG LQEQARQL PPQQSPRAV A

Tableau 6 : Résultats d'identification protéique des spots analysés par spectrométrie de masse MALDI-

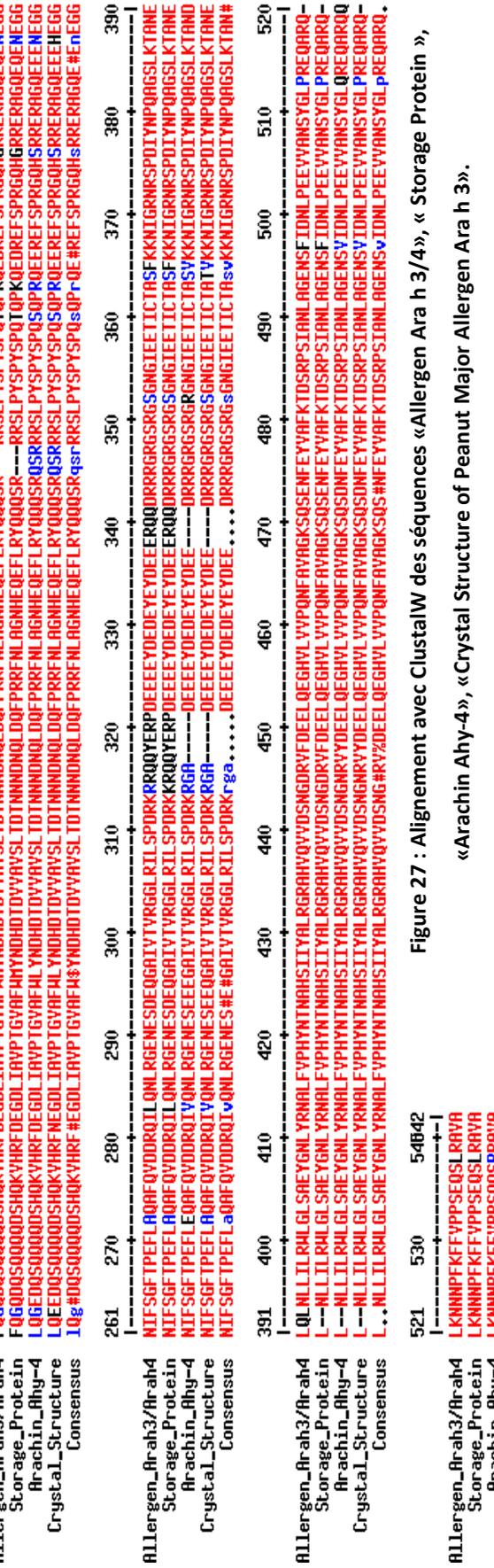
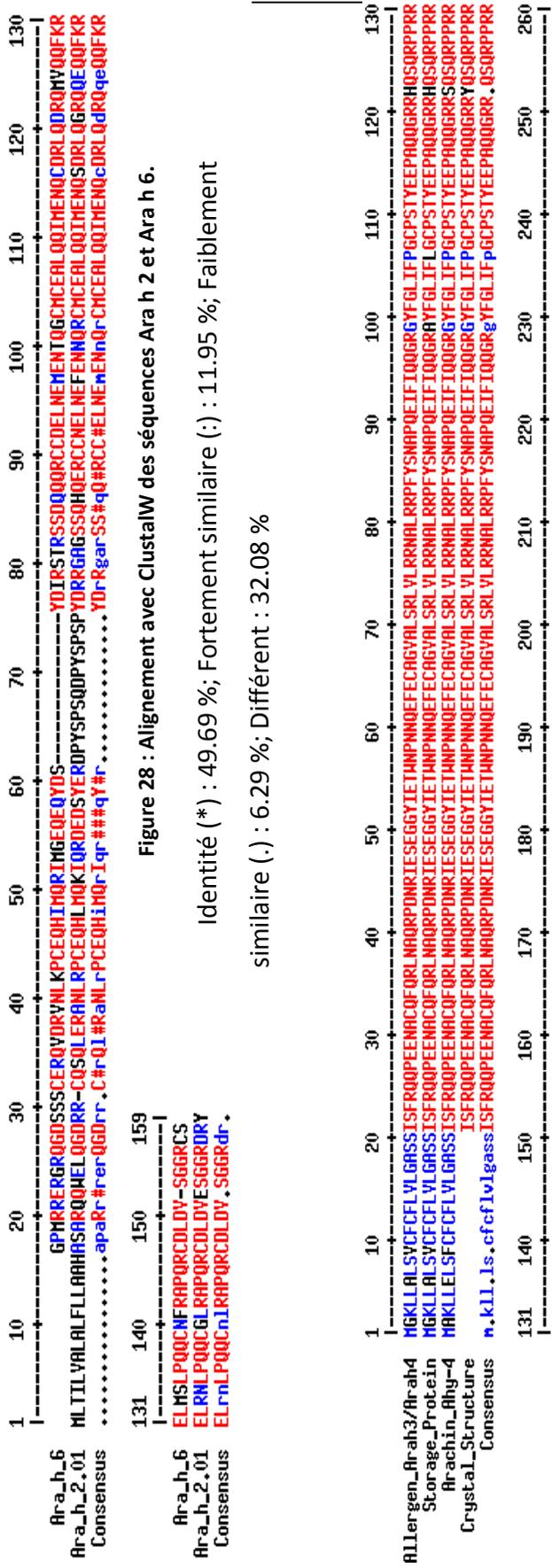
TOF (Figure 25)

sous la forme d'un doublet a été initialement démontré par Burks, A. W. et al. (1992) avant d'être bien caractérisé par Chatel, J. M. et al. (2003), qui expliquent la différence de masse par l'insertion de 12 AA dans la séquence, que l'on retrouve transcrite dans le Tableau 6. La caractérisation d'Ara h 2.01 et Ara h 2.02 par MALDI-TOF donne un taux de recouvrement des séquences de 46 et 42% respectivement. Cependant, la séquence « QDPDRRDPYSPS » qui différencie les deux isoformes ne fait pas partie des peptides identifiés par la spectrométrie de masse. Ainsi, c'est en se basant sur le poids moléculaire des protéines identifiées que l'on a pu différencier Ara h 2.01 d'Ara h 2.02 lors de l'analyse des données. Le spot 5 présente un faible taux de recouvrement de la protéine Ara h 6 (24%) compte tenu de petite taille de la protéine (127 AA), mais son identification par MALDI-TOF reste valable grâce à la connaissance de son poids moléculaire entre autres.

La comparaison des séquences d'Ara h 2 et Ara h 6 ([ClustalW](#), ) met en avant une bonne homologie de séquence, et l'appartenance à la même famille des albumines 2S se traduit par une forte homologie de structure (5 hélices  $\alpha$  et 4 ponts disulfures). Il est donc attendu que l'élution réalisée sur HiTrap Q FF à une teneur en NaCl qui élut Ara h 2 soit aussi vectrice de l'élution d'Ara h 6. Ainsi, l'identification de cette protéine par spectrométrie de masse est confirmée par le fait que la protéine soumise fait partie de la famille des albumines 2S, que son élution soit couplée avec Ara h 2 et qu'elle possède un poids moléculaire de ~14kDa. Ara h 6 est une albumine 2S qui a été identifiée par Kleber-Janke, T. et al. (1999) et les différents isoformes existants référencés depuis sont répertoriés dans la base de données NCBI.

La multiplicité des bandes visibles sur la piste 3 de la Figure 25 est caractéristique des globulines 11S. Dans cette famille, Ara h 3 est une protéine hétéro-multimérique de 400 kDa qu'il n'a pas été possible d'analyser sous sa forme native (Koppelman, S. J. et al. 2003). En effet, la traduction du gène codant pour Ara h 3 conduit à la synthèse d'une préprotéine qui se retrouve ensuite clivée lors de sa maturation *in planta*.

Lors de la séparation sur SDS-PAGE, Ara h 3 se présente sous la forme de polypeptides classifiés en sous-unités acides et sous-unités basiques avec des masses visibles entre 45 et 14 kDa. Ces polypeptides sont séparés au détriment de la protéine multimérique native. Les bandes visibles sur la Figure 25 sont analysées en spectrométrie de masse MALDI-TOF, et les peptides issus de la digestion trypsique sont confrontés à la base de données contenant tous les digestats tryptiques putatifs des allergènes des fruits à coque. Or, les digestions



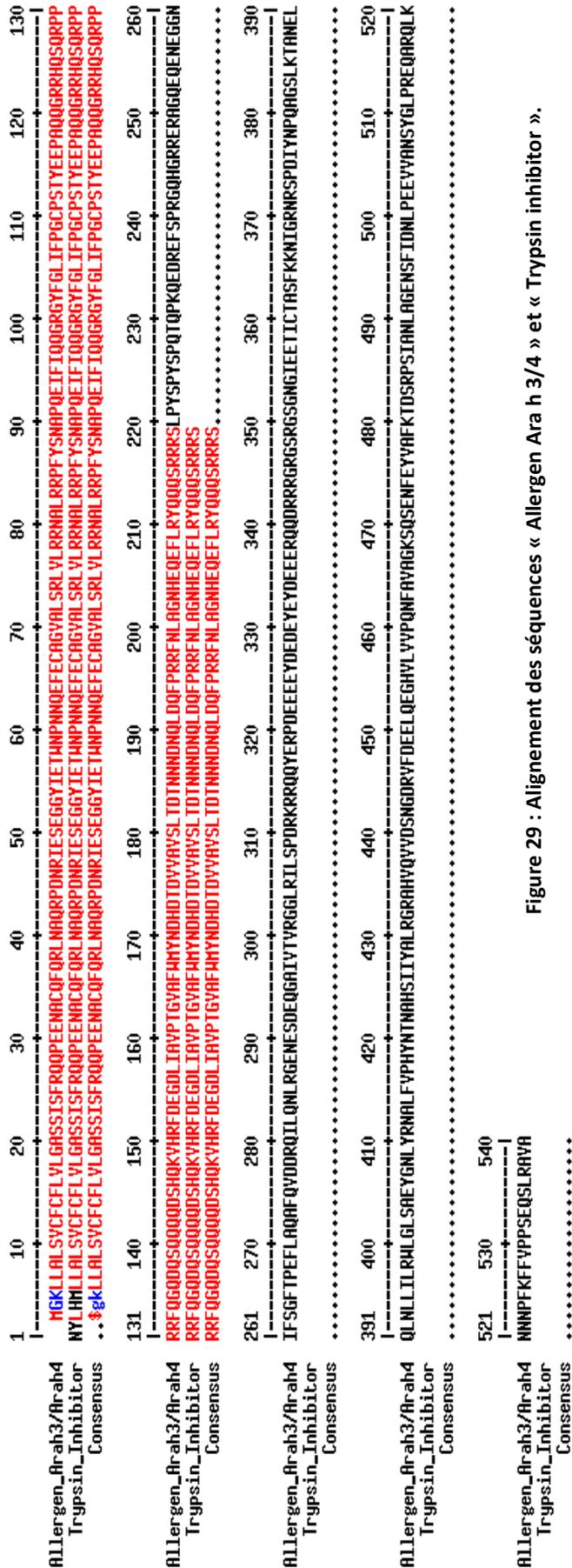


Figure 29 : Alignement des séquences « Allergen Ara h 3/4 » et « Trypsin inhibitor ».

putatives sont basées sur les séquences entières des protéines et ne tient pas compte de l'hydrolyse naturelle d'Ara h 3. Il est donc logique de retrouver des taux de recouvrement faible des polypeptides par rapport à la séquence de la protéine entière pour les spots 6 à 10 (Tableau 6), identifiés comme Ara h 3.

Parmi les spots 6 à 10 (Figure 25, Piste 3), l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF permet de caractériser les bandes électrophorétiques comme polypeptides des protéines «Allergen Ara h 3/4» (SwissProt Q8LKN1), « Storage Protein » (GenBank AAR02860.1) «Arachin Ahy-4» (SwissProt Q5I6T2), «Crystal Structure of Peanut Major Allergen Ara h 3» (PDB 3C3V\_A).

Les séquences de ces quatre protéines ont été récupérées sur NCBI et alignées avec ClustalW afin de voir les homologies et les différences de séquences (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les acides aminés identiques ressortent en rouge et les différents en bleu. L'homologie de séquence entre ces 4 protéines est de 87,64%. Au niveau N-terminal des protéines Q8LKN1, Q5I6T2 et AAR02860.1 on retrouve une séquence de 20 AA qui n'est pas présente dans la protéine 3C3V\_A. L'outil PrediSi (<http://www.predisi.de>) permet de définir la présence de peptide signal à l'extrémité N-terminale d'une protéine. En lui soumettant les protéines Q8LKN1, Q5I6T2 et AAR02860.1 il en ressort que les trois possèdent un peptide signal que l'on ne retrouve pas chez 3C3V\_A.1. En omettant la présence de ce peptide signal, les quatre protéines présentent une identité proche de 90%, et peuvent être toutes les trois assimilées à Ara h 3. Par ailleurs, la protéine « Trypsin inhibitor » (GenBank AAM93157.1) a été identifiée au niveau du spot n°7 et l'alignement de sa séquence avec celle de la protéine Q8LKN1 est représenté en Figure 29. On remarque que leurs séquences sont identiques pour les 220 acides aminés N-terminaux de la protéine Q8LKN1, hormis quelques variations au niveau du peptide signal (Dodo, H. W. et al. 2004). Les peptides identifiés lors de l'analyse en spectrométrie de masse du spot n°7 appartiennent donc bien à la séquence de la protéine Ara h 3. Le doublet à 45, 42 kDa et la bande à 23kDa correspondent aux sous-unités acide et basique de la protéine Ara h 3, respectivement, et les polypeptides correspondants possèdent la séquence N-terminale « ISFRQ » (AA 1-6), « ISFRQQ » (AA 1-6) (Koppelman, S. J. et al. 2003) et « GIEETI » (AA 326-331) (Piersma R.S. et al. 2005), respectivement.

Dans l'analyse en spectrométrie de masse des spots n°6 et 7, la majorité des peptides identifiés sont situés dans la moitié N-terminale de la protéine Ara h 3, et correspondent

donc bien à la sous-unité acide d'Ara h 3. Pour le spot n°8, les peptides qui ont permis d'identifier le spot 8 comme appartenant à la protéine AAM93157.1 sont tous situés en amont de la séquence « GIEETI » et appartiennent donc à la séquence correspondant à la sous-unité acide de la protéine.

La digestion tryptique du spot n°9 (~25 kDa) a généré des peptides qui sont identifiés comme appartenant en majorité en aval de la séquence « GIEETI » (AA 326-331) (Tableau 6), et en intégralité en aval de la séquence « EEDQ » (AA 311-314) que l'on retrouve légèrement modifiée chez la protéine AAR02860.1 avec une insertion du motif « ERQQ » (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). D'après Koppelman, S. J. et al. (2003), ces séquences initient les parties N-terminales des sous-unités basiques que l'on retrouve à 25 et 28 kDa, respectivement. La bande correspondant au spot n°9 peut donc être reconnue comme appartenant à la sous-unité basique d'Ara h 3. Cependant, d'après Piersma R.S. et al. (2005), la sous-unité basique est présente uniquement sous la forme d'une bande unique aux alentours de 23 kDa, puisqu'elle ne subit pas de clivage lors de la maturation. L'appartenance exclusive du polypeptide correspondant au spot n°9 à la sous-unité acide ou à la sous-unité basique est donc difficile à statuer, d'autant plus que les peptides obtenus par spectrométrie de masse recouvrent les deux sous-séquences de la protéine.

Pour le spot n°10, la bande correspondante se situe aux alentours des 22 kDa. Les peptides identifiés après digestion tryptique sont exclusivement situés en aval de la séquence « GIEETI » (AA 326-331), qui initie la séquence de la sous-unité basique de la protéine Ara h 3, et confirme donc l'assertion de Piersma R.S. et al. (2005).

La spectrométrie de masse permet d'identifier les spots 6 à 10 comme polypeptides de la protéine Ara h 3 qui, associés entre eux, forment la protéine hétéro-multimérique.

L'identification des protéines Ara h 1, Ara h 2 / Ara h 6 et Ara h 3 par spectrométrie de masse prouve la bonne identité des protéines purifiées, et permet de passer à l'étape d'immunisation des lapins.

### III. Validation immunologique des anticorps de lapin

#### A. Spécificité immunologique

Les anticorps obtenus par l'immunisation des lapins et exsanguination au 63<sup>ème</sup> jour sont contenus dans les sérums, que l'on obtient après coagulation du sang et récupération du surnageant suite à une légère centrifugation. Les anticorps obtenus sont titrés en dosage ELISA contre la protéine purifiée avec lequel le lapin a été immunisé. Ce titrage se fait sur le sérum pré-immun, avant la première injection, au 49<sup>ème</sup> jour et au 63<sup>ème</sup> jour pour permettre un suivi du taux de spécificité. Dans les Figure 30, Figure 31, Figure 32 la courbe ELISA réalisée pour le prélèvement au 63<sup>ème</sup> jour est donnée en exemple. Le titre obtenu est déterminé par la plus forte dilution d'anticorps pour laquelle la DO obtenue est supérieure à la valeur 1. Dans les Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 9, on voit que pour chaque lapin immunisé avec la protéine purifiée, le titre augmente au cours de l'immunisation (sauf pour le lapin G24173) indiquant une production d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt croissante avec le temps d'immunisation. Ce titre servira de base pour définir les dilutions d'anticorps nécessaires à la réalisation des Western Blot et dosages ELISA.

L'anticorps dirigé contre Ara h 1 présente un une très bonne immunoréactivité face à la protéine injectée, avec un titre supérieur à 1/120 000. Cependant, le choix de l'anticorps pour les expériences en Western Blot et ELISA ne dépendra pas uniquement de son titre, mais aussi de sa spécificité qui est déterminée par une analyse qualitative en Western Blot.

Les immunisations des lapins contre Ara h 2 sont réalisées avec deux protocoles différents :

- les protéines sont, après purification sur HiTrap Q FF, lyophilisées et injectées,
- les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE, et les bandes à 17 et 20 kDa sont prélevées, broyées et lyophilisées avant d'être injectées aux lapins.

Les résultats obtenus avec la deuxième méthode sont médiocres (résultats non montrés), alors que les titres obtenus pour les anticorps Anti- Ara h 2 chez les lapins G45117 et G45201 sont très bons.

En ce qui concerne Ara h 3, les immunoréactivités des séra de lapins sont relativement faible avec un titre inférieur à 1/2400.

### A. Mise au point du Western Blot

Tous les séra qui présentent un titre suffisamment élevé sont testés en Western Blot contre un extrait brut total d'arachide. Pour les séra des lapins G24101 et G24168, les dilutions sont effectuées au 1 :50,000, 1 :250,000, 1 :1,000,000. Pour les séra des lapins G45117 et G45201, les dilutions sont effectuées au 1 :5,000, 1 :10,000 et 1 :20,000. Pour les séra des lapins G24123 et G24173, les dilutions sont effectuées au 1 :10,000, 1 :50,000 et 1 :100,000. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 33 pour chaque sérum de lapin qui a la plus grande spécificité chez le couple de lapin immunisé avec la même protéine. Pour le lapin présentant les anticorps Anti-Ara h 1, le signal est concentré sur la bande à 63 kDa, qui a été identifié comme étant Ara h 1 par spectrométrie de masse. La dilution qui donne le meilleur signal en Western Blot pour cet anticorps est de 1 :250,000 pour le lapin G24168. En ce qui concerne l'anticorps Anti-Ara h 2 produit par le lapin G45201, le signal est assez fort pour les trois bandes correspondantes aux albumines 2S (20, 17 et 14 kDa), mais il y a cependant un signal assez faible sur de nombreux poids moléculaires compris entre 130 et 30 kDa. Aucune de ces bandes visibles n'a pourtant l'intensité de celles que l'on retrouve aux bas poids moléculaires, et montre donc une relativement bonne spécificité de l'anticorps. La dilution au 1 :5,000 est celle qui donne le meilleur résultat. Pour l'anticorps anti-Ara h 3, le lapin G24173 est retenu. Le doublet à 45 kDa montre des bandes nettement visibles, tandis que le doublet à 25 kDa est un peu moins net. Dans les bas poids moléculaires, quelques bandes sont décelables. La dilution retenue est de 1 :10,000 pour cet anticorps.

La dilution des anticorps à 1 :250,000, 1 :5,000 et 1 :10,000 pour les anticorps Anti-Ara h 1, Anti-Ara h 2 et Anti-Ara h 3 respectivement, permet d'avoir un marquage en Western Blot des allergènes majeurs de l'arachide sur une seule piste avec un signal satisfaisant (Figure 33), sans interaction d'interférences entre les différents anticorps.

Ces dilutions d'anticorps poolés définissent les dilutions standards utilisées pour réaliser les Western Blots afin de suivre la dégradation des allergènes par rapport à un témoin non traité.

Antigène	Jour(s)	Lapin G24101	Lapin G24168
Ara h1	J0	< 1/50	< 1/50
	J49	1/54000	1/65000
	J63	1/120000	1/180000

Tableau 7 : Evolution du titre des anticorps au cours de l'immunisation des lapins G24101 et G24168 avec la protéine Ara h 1

Antigène	Jour(s)	Lapin G45117	Lapin G45201
Ara h 2	J0	< 1/50	< 1/50
	J49	1/200000	1/60000
	J63	1/355000	1/80000

Tableau 8 : Evolution du titre des anticorps au cours de l'immunisation des lapins G45117 et G45201 avec la protéine Ara h 2

Antigène	Jour(s)	Lapin G24123	Lapin G24173
Ara h3	J0	< 1/50	< 1/50
	J49	1/1000	1/2500
	J63	1/1200	1/2400

Tableau 9 : Evolution du titre des anticorps au cours de l'immunisation des lapins G24123 et G24173 avec la protéine Ara h 3

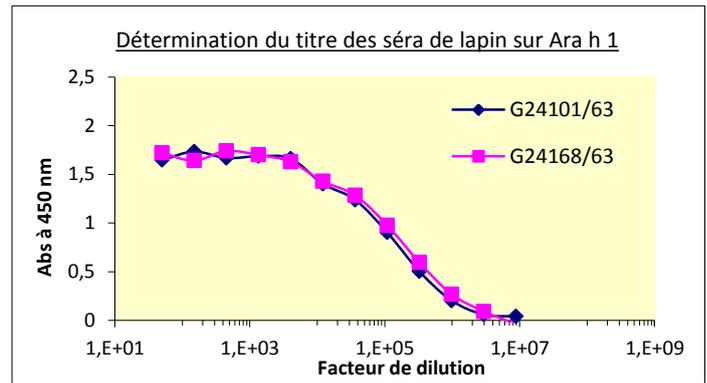


Figure 30 : Courbe du titrage des séras de lapins G24101 et G24168 à J63

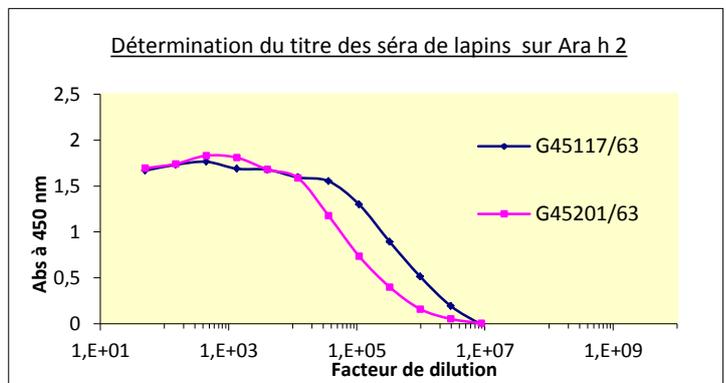


Figure 31 : Courbe du titrage des séras de lapins G45117 et G45201 à J63

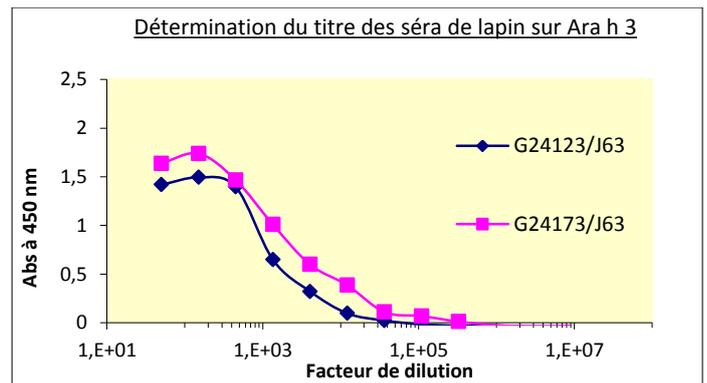


Figure 32 : Courbe du titrage des séras de lapins G24123 et G24173 à J63

## B. Mise au point de l'ELISA

Le Western Blot permet d'avoir une approche qualitative de la dégradation des protéines, tandis que le dosage ELISA permet d'avoir une réponse chiffrée du taux de reconnaissance des protéines allergènes par les anticorps des lapins. Afin de définir les dilutions d'anticorps les plus adaptées au dosage ELISA ainsi que la gamme de concentration en protéines qui permet d'atteindre le plateau de saturation du signal colorimétrique, différents essais sont menés. Les protéines fixées sur la plaque 96 puits vont de 0 à 140 ng/puits après extraction sur l'arachide au Tris 20 mM pH 8,5 et dosage au BCA. La lecture à 405 nm permet d'obtenir un signal colorimétrique proportionnel à la liaison allergène-anticorps. La Figure 35 ne représente que les dilutions retenues pour chaque sérum (anti-Ara h 1 1 :10,000 ; anti-Ara h 2 1 :5,000 ; anti-Ara h 3 1 :20,000). La mise au point de ces dilutions de séra permet d'établir une gamme étalon qui sert de référence pour quantifier la reconnaissance des protéines de l'arachide après dégradation.

### I. Localisation des allergènes par immunohistochimie

Les séra de lapins dirigés spécifiquement contre les trois allergènes majeurs de l'arachide peuvent être utilisés pour réaliser une localisation fine de ces protéines par immunohistochimie en microscopie confocale. Les protéines interagissent avec les IgG de lapins qui sont eux même reconnus par un anticorps anti IgG de lapin couplé à un fluorochrome (Alexa 633). L'excitation par un laser à une longueur d'onde de 633 nm permet de récupérer un signal à 647 nm émis par l'anticorps anti -IgG, et donc de localiser les protéines allergènes de l'arachide.

Les tissus végétaux sont souvent le siège d'une forte autofluorescence qui peut amener à fausser les résultats, et l'analyse dans les mêmes conditions d'un échantillon qui n'a subi aucun marquage avec un anticorps fluorescent anti - IgG de lapins sert de témoin négatif. La mesure de la différence d'intensité de fluorescence entre le témoin négatif et l'échantillon marqué est réalisée dans des conditions strictement identiques au niveau du réglage du microscope (ouverture du pinhole : position 1 de Airy, intensité du laser à 30%, gain fixé à 2, objectif 100x immergé dans l'huile).

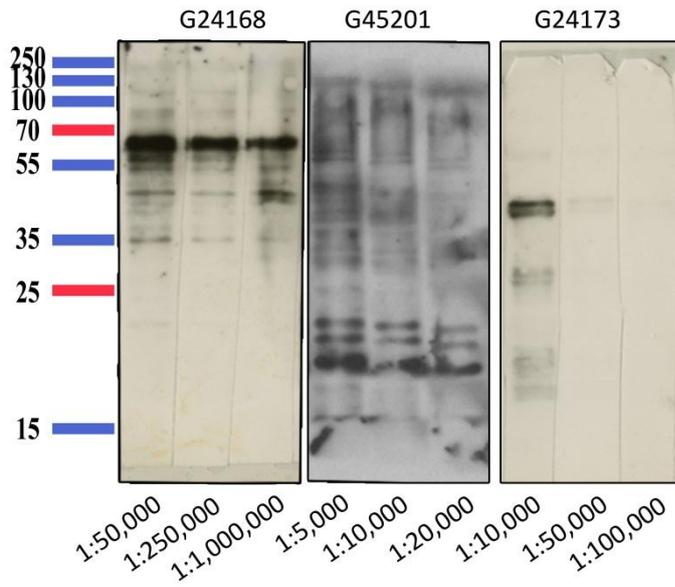


Figure 33 : Western Blot des séras de lapin avec l'extrait brut d'arachide

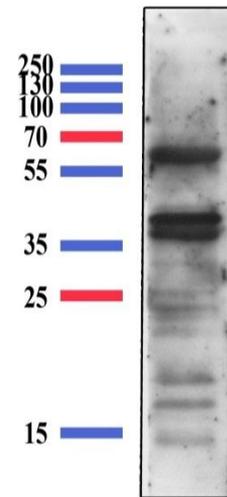


Figure 34 : Western Blot du pool de séras de lapins avec l'extrait total d'arachide

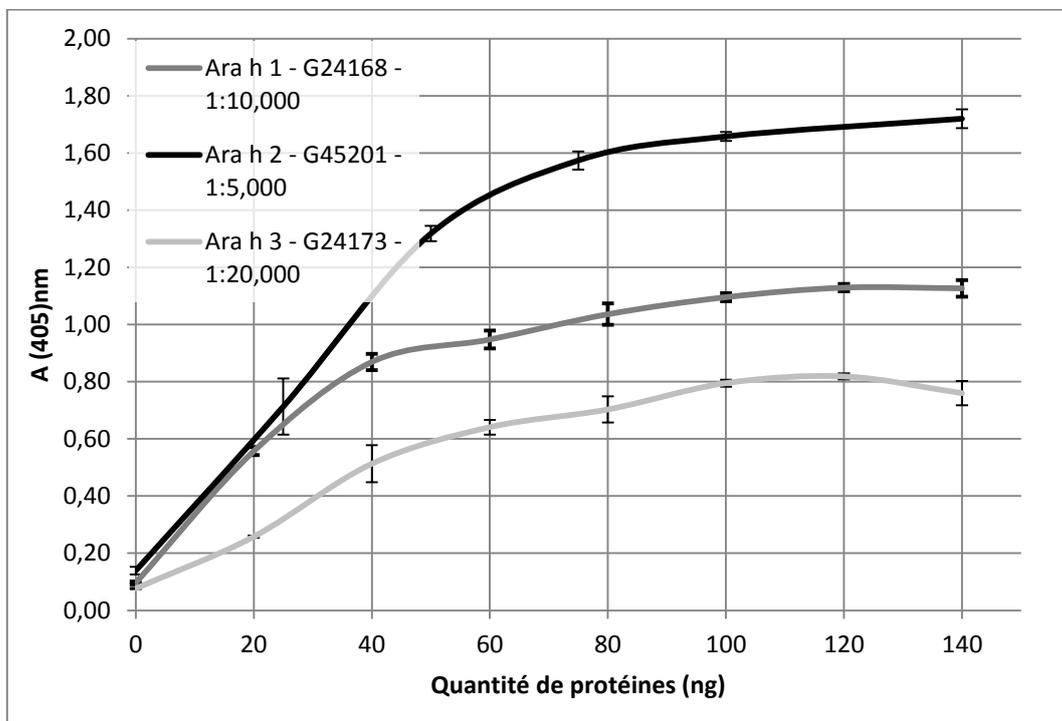


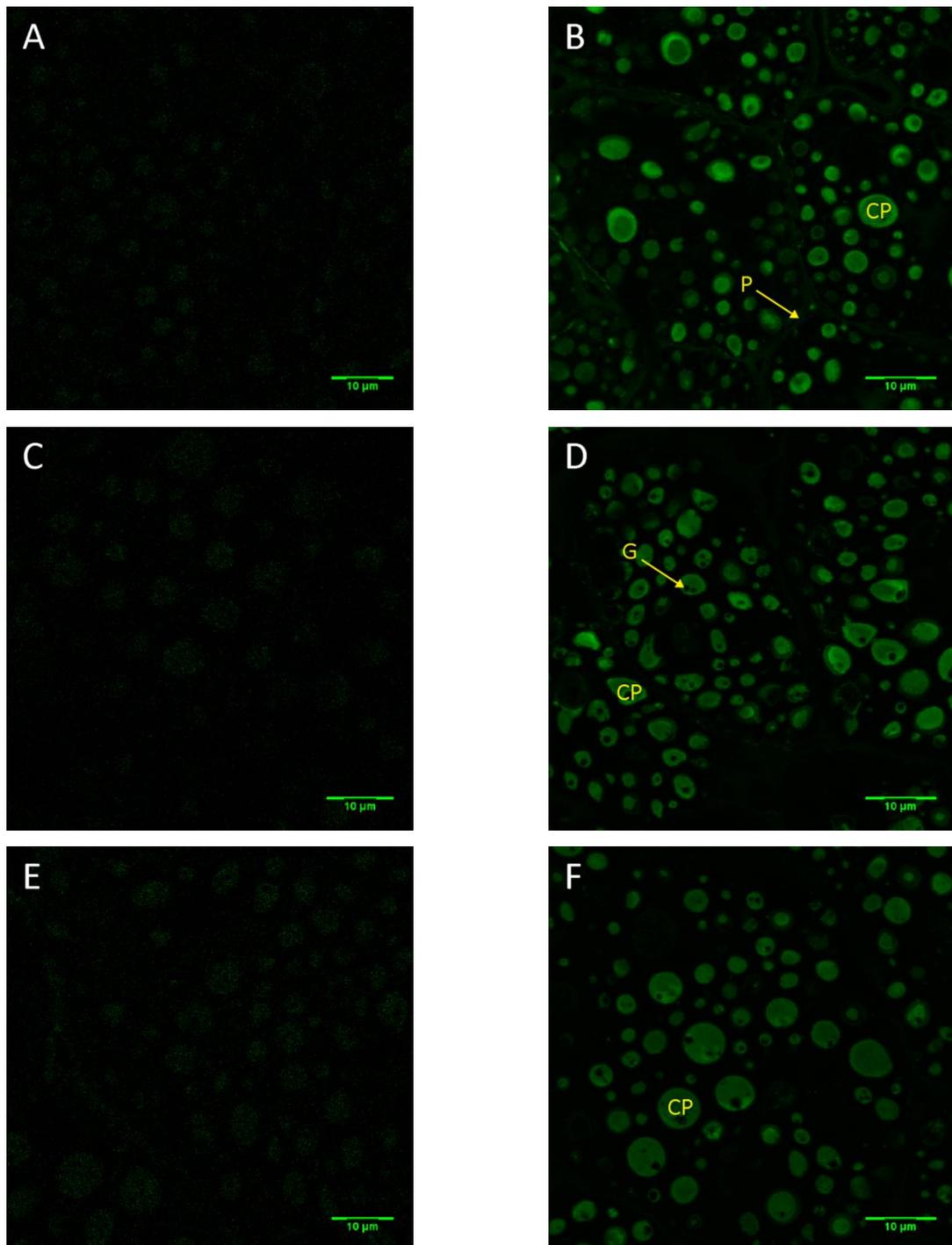
Figure 35 : Courbes étalons des dosages ELISA des protéines d'arachide contre les différents séras anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3.

Les images de la Figure 36 montrent que le marquage immunofluorescent des trois allergènes majeurs de l'arachide avec les anticorps primaires et secondaires conduit à un signal bien supérieur que celui induit par l'autofluorescence des tissus végétaux. Les zones immunofluorescentes des images B, D et F expriment la présence des allergènes Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3, respectivement, et localisent leur répartition au sein de la cellule d'arachide.

Les images initiales obtenues par la microscopie confocale ont été acquises sur plusieurs plans suivant l'axe Z. Par souci de meilleure lisibilité des résultats, les images présentées en Figure 36 sont obtenues en calculant la moyenne de l'intensité de fluorescence pixel par pixel sur les différents plans et en la projetant sur une image plane.

Les trois allergènes majeurs sont clairement localisés dans la structure subcellulaire de la graine. Comme attendu, ces protéines de réserves sont toutes stockées dans les corps protéiques qui possèdent des diamètres variables, compris entre 1 et 8  $\mu\text{m}$  pour la plupart d'entre eux. Les corps protéiques sont des organites sphéroïdes, principalement composés de protéines, et entourés d'une biomembrane qui les protège de l'action de protéases (Nultsch, W. 1998). A l'intérieur de certains corps protéiques, des inclusions de cristaux sont visibles : les globoïdes. Ces cristaux sont composés principalement d'acides phytique et oxalique, de magnésium, manganèse et de calcium. Ces réserves en sels minéraux sont utilisées lors de la germination de la graine.

Les protéines de l'arachide constituent environ 20 % de la masse de l'arachide et sont, pour la grande majorité d'entre elles, des protéines de réserve, stockées dans les corps protéiques. Ces organites, issus de la déshydratation des vacuoles, ont une très faible hydrométrie. Lors de la diminution de la teneur en eau de la vacuole, les protéines adoptent une organisation quasi cristalline qui favorise la compacité du corps protéique. Cet arrangement des protéines les uns par rapport aux autres permet de retrouver tous les allergènes majeurs Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 à l'intérieur de ces corps protéiques. Cette compacité, nous allons le voir plus tard, peut se présenter comme un frein à la dégradabilité des protéines. Ainsi, l'étude par immunohistochimie de l'arachide permet d'avoir des informations sur la localisation des allergènes majeurs et la structure des corps protéiques, pistes qui seront exploitées lors de la définition du procédé à mettre en place pour parvenir à une dégradation poussée des allergènes.



**Figure 36 : Marquage immunofluorescent des allergènes par microscopie confocale.**

Les images A, C et E représentent l'autofluorescence des témoins négatifs où les coupes microscopiques n'ont pas été incubées avec l'anticorps secondaire couplé avec l'Alexa 633, mais uniquement avec les anticorps primaires anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3 respectivement.

Les images B, D et F représentent la fluorescence de l'anticorps secondaire Alexa 633 fixé sur les anticorps de lapin anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3 respectivement. (CP : corps protéique, P : paroi végétale, G : globoïde)

## Partie 2 : Dégradation des allergènes

Nous avons vu dans l'introduction que l'un des moyens mis en œuvre pour atteindre l'hypoallergénicité d'un aliment consistait à lui faire subir une fermentation par différentes souches de microorganismes. Nous avons procédé à des essais sur des substrats à base d'arachide afin de parvenir à la dégradation des protéines.

### I. La fermentation solide

La fermentation solide dans les pays orientaux est réalisée la plupart du temps sur un substrat à base de soja (tempeh, natto, koji, etc.). L'absence de liquide interstitiel lors de la fermentation solide par les champignons induit l'orientation apicale de leur développement dans toutes les directions de l'espace, phénomène que l'on retrouve lors de la croissance des champignons sur leurs milieux naturels (terre, végétaux en décomposition). Cette croissance du mycélium est initiée par des spores fortement attachées à la surface du substrat. Ce mycélium forme par la suite de véritables ponts entre les particules qui confèrent la compacité au produit fermenté. Afin de favoriser la croissance du champignon par le développement du mycélium, puis finalement atteindre la phase de sporulation, il est important que la souche soit cultivée dans les conditions optimales de développement. Le substrat utilisé comme support de la culture du champignon filamenteux influe sur la croissance et le développement du champignon, donc sur la synthèse de protéases.

Dans la sous partie correspondant à la fermentation solide ici expliquée, nous ne présenterons que les résultats obtenus pour la fermentation avec la souche *A. oryzae* qui a donné les meilleurs résultats du point de vue de la dégradation des allergènes de l'arachide.

L'étude de Frias, J. et al. (2007) a montré que la fermentation solide sur un substrat à base de soja avec une souche d'*Aspergillus oryzae* ou *Rhizopus oligosporus* conduisait à une diminution de l'allergénicité grâce à l'action protéolytiques des hydrolases secrétées. Ainsi, pour parvenir à des résultats similaires pour la mise en œuvre de nos expériences de fermentations sur un substrat basé sur la matrice arachide, nous allons comparer les compositions biochimiques de l'arachide et du soja, afin de pouvoir ainsi déterminer où réside la plus grande différence entre les deux matrices.

En comparant la composition biochimique générale de l'arachide et du soja (Figure 37), on remarque des différences majeures : les lipides sont présents en bien plus grande

quantité dans l'arachide que dans le soja, contrairement aux fibres et sucres disponibles qui sont plus importants chez le soja. Les lipides entrent dans le catabolisme des champignons, puisqu'ils sont dégradés en acides gras et glycérol par les lipases. Le glycérol rentre ensuite dans la voie de la glycolyse et les acides gras sont convertis en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs. Les glucides disponibles sont directement assimilés par les micro-organismes, tandis que les sucres complexes (amidon, cellulose, par exemple) sont préalablement dégradés par voie enzymatique avant d'être catabolisés. Ces deux voies de métabolisme permettent l'apport en carbone. La composition en protéines est sensiblement différente entre les deux aliments. Les protéines sont hydrolysées par les protéases des micro-organismes et représentent la principale source d'azote.

Ainsi, afin de rapprocher la composition biochimique de l'arachide à celle du soja, nous avons fait le choix de rajouter à la matrice arachide des ratios variables de maïs qui compensent le déficit en sucres disponibles, présents en plus grande quantité chez le soja.

#### **A. Séparation Electrophorétique**

Afin de procéder à la fermentation sur l'arachide, nous avons choisi de nous rapprocher de la composition en sucres disponibles dans le soja par addition d'une quantité variable de maïs. Ce maïs est texturé par cuisson-extrusion afin de gélatiniser l'amidon et est ensuite stocké à température ambiante. La fermentation d'arachide additionné de ratio variables de maïs (0,2% ; 0,5% et 1% m/m) pendant des durées de 24h, 48h et 72h a conduit à l'apparition au bout de 48h de spores brunes à vertes sur la surface de la galette. Cette apparition de spores est corrélée à la phase de stationnement de la croissance du champignon, et aussi au pic de production de protéases, comme montré dans l'étude de Klapper, B. F. et al. (1973). Cela montre aussi que le substrat à base d'arachide est un substrat suffisamment nutritif pour favoriser la croissance et le développement du champignon.

Les extraits protéiques réalisés sur l'arachide fermentée sont dosés par la méthode du BCA et séparés en SDS-PAGE à raison de 20 µg de protéines/puits, selon les résultats du dosage réalisé. Les extraits sont au nombre de deux par temps de fermentation (extrait non dénaturant dans tampon Tris 20 mM pH 8,5, et extrait dénaturant dans un Tampon Tris/SDS/DTT). Les profils électrophorétiques obtenus montrent, pour les extraits d'arachide non fermentés, de légères différences lors des traitements. L'imbibition (piste 2) ne semble

pas avoir d'influence sur l'extractibilité des protéines, que ce soit dans les extraits dénaturant ou non, puisque l'on retrouve globalement le même profil avant et après l'imbibition.

L'autoclavage suivi du séchage (pistes 3 et 4, respectivement) conduit à la formation d'un groupement protéique que l'on retrouve dans les extraits non dénaturants (gel A) à un poids moléculaire d'environ 250 kDa. Ce phénomène est sûrement dû à l'agrégation des protéines en groupement polymérique issu de la réaction de Maillard. Les bandes correspondantes à Ara h 3 (doublet à 45 kDa) varient peu lors des traitements préliminaires à la fermentation dans les extraits dénaturants ou non. En ce qui concerne Ara h 2, les bandes correspondant au doublet (17 et 20 kDa) sont peu visibles, et l'influence du traitement préliminaire est donc peu discernable. Au bout de 24 heures de fermentation, quelle que soit la quantité de maïs additionnée, le profil reste inchangé (pistes 5, 6 et 7, gels A et B, Figure 38). Au niveau visuel de la galette de fermentation, aucune sporulation n'est visible et le mycélium commence à peine à se développer. A partir de 48 heures, les profils évoluent. A 48 heures de fermentation et dans les profils correspondant aux extraits dénaturants (gel B), les bandes protéiques correspondant à Ara h 1 et Ara h 3 sont très faiblement représentées pour les conditions à 0,5 et 1 % de maïs (pistes 9 et 10), et quasiment invisibles pour la condition à 0,2% de maïs ajouté (piste 8).

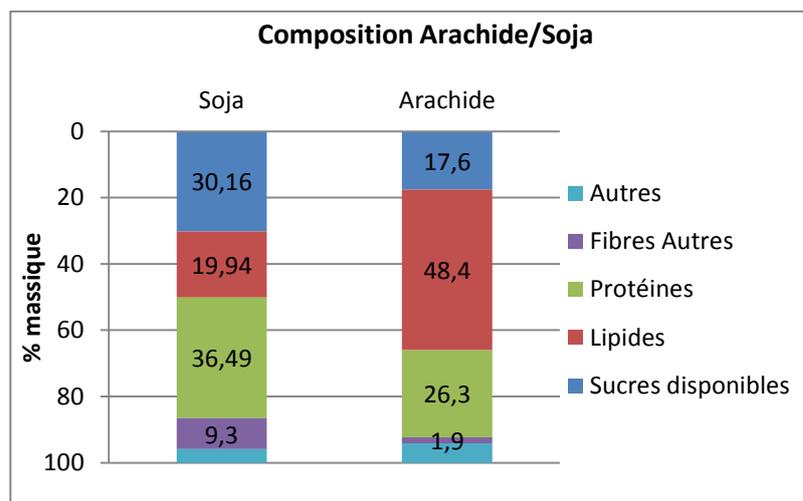
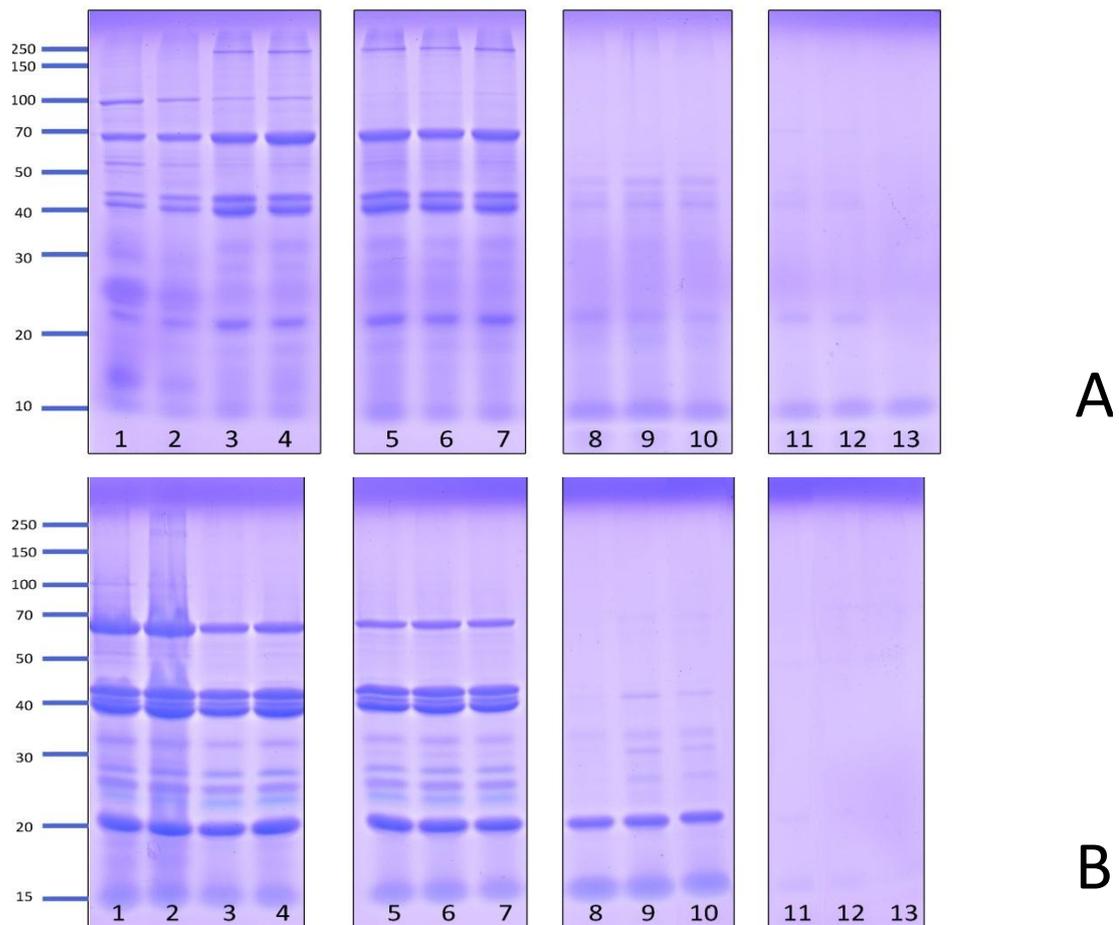


Figure 37 : Graphique de comparaison de composition du soja et de l'arachide.

D'après U.S. Department of Agriculture



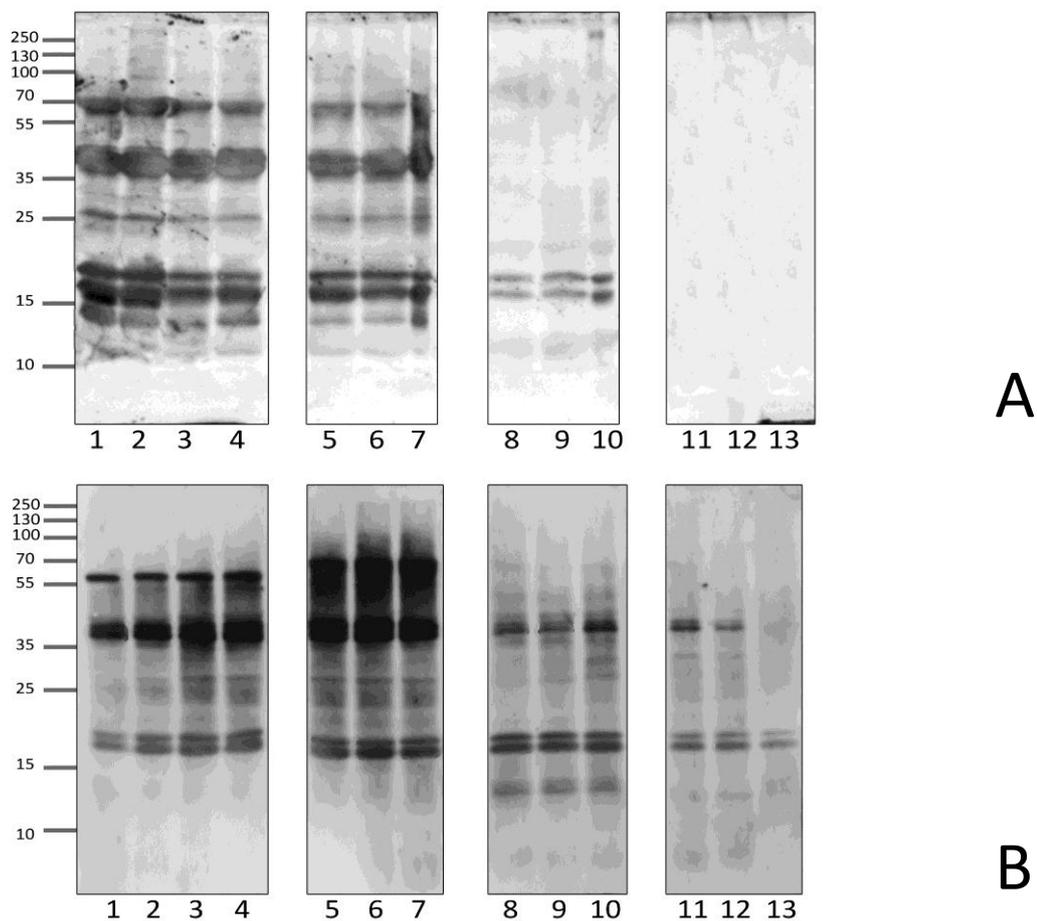
**Figure 38 : Gels SDS PAGE des extraits réalisés sur l'arachide fermentée avec *Aspergillus oryzae* en présence de maïs extrudé**

A : extrait non dénaturants      B : extraits dénaturants  
 1, 2, 3, 4 : Extraits d'arachide, d'arachide imbibée, autoclavée et séchée, respectivement  
 5, 6, 7 : fermentation (24h) à 0,2 ; 0,5 et 1 % de maïs additionné, respectivement  
 8, 9, 10 : fermentation (48h) à 0,2 ; 0,5 et 1 % de maïs additionné, respectivement  
 11, 12, 13 : fermentation (72h) à 0,2 ; 0,5 et 1 % de maïs additionné, respectivement

La bande à 20 kDa reste cependant nettement visible, quel que soit la quantité de maïs additionnée. Pour les extraits non dénaturants au même stade de la fermentation (gel A), la bande à 63 kDa (Ara h 1) est absente pour toutes les conditions d'ajout de maïs. Aux alentours de 45 kDa (Ara h 3), le doublet est toujours discernable, mais nettement moins intense que dans l'extrait réalisé avant la mise en fermentation. La bande à 250 kDa est elle aussi absente. La bande à 20 kDa est très amoindrie. Les quantités variables de maïs additionné ne semblent pas influencer sur la dégradation pour les extraits non dénaturants. Au niveau visuel de la galette de fermentation, le mycélium est très développé et la sporulation commence à être uniformément répartie sur la surface de la galette.

Au bout de 72 heures de fermentation, que ce soit dans les extraits non dénaturants ou dénaturants, presque aucune bande n'est visible, ce qui laisse penser que les protéines ont été dégradées en peptides inférieurs à la limite de séparation du système SDS-PAGE et ne sont donc pas visibles dans le gel d'acrylamide. Cependant, au bout de 72h de fermentation, il est possible de voir une bande visible au niveau des faibles poids moléculaires pour le gel contenant les extraits non dénaturants (gel A).

Ces polypeptides peuvent être issus de la dégradation des protéines allergènes de l'arachide, et la révélation en Western Blot de cette séparation protéique permettra de révéler si les bandes résiduelles sont reconnues par les anticorps de lapin dirigés contre les allergènes majeurs de l'arachide.



**Figure 39 : Western Blot des extraits d'arachide fermentée avec *Aspergillus oryzae***

A : extrait non dénaturants

B : extraits dénaturants

1, 2, 3, 4 : Extraits d'arachide, d'arachide imbibée, autoclavée et séchée, respectivement

5, 6, 7 : fermentation (24h) à 0,2 ; 0,5 et 1 % de maïs additionné, respectivement

8, 9, 10 : fermentation (48h) à 0,2 ; 0,5 et 1 % de maïs additionné, respectivement

11, 12, 13 : fermentation (72h) à 0,2 ; 0,5 et 1 % de maïs additionné, respectivement

## B. Western Blot

Les extraits réalisés sur les arachides non fermentées (crue, imbibée, autoclavée et séchée, pistes 1 à 4 des membranes A et B) montrent des profils très similaires. Les protéines Ara h 1 (bande à 63 kDa), Ara h 2 (doublet à 17 et 20 kDa) et Ara h 3 (doublet à 45 kDa) sont facilement discernables. Contrairement au signal obtenu sur les séparations électrophorétiques colorées au bleu de Coomassie des mêmes extraits, Ara h 2 est bien présent dans les extraits réalisés, révélé par les anticorps de lapin spécifiques.

Pour la fermentation de 24 heures, les compositions protéiques des extraits réalisés sont peu modifiées par rapport au témoin non fermenté. En effet, les bandes correspondant aux trois allergènes majeurs sont présentes quelle que soit la condition d'ajout de maïs, que ce soit dans les extraits dénaturants ou non.

A partir de 48 heures, la reconnaissance des protéines de l'arachide par les anticorps de lapins présente une profonde modification. A 48 heures dans les extraits non dénaturants (membrane A), les bandes correspondant aux protéines Ara h 1 et Ara h 3 sont imperceptibles, tandis que le signal pour Ara h 2 est simplement diminué (pistes 8, 9 et 10). La quantité de maïs additionné ne semble pas avoir d'impact sur la quantité des protéines dégradées puisque les trois pistes sont très similaires. Dans les extraits dénaturants (membrane B), la dégradation des protéines est moins nette. Le signal correspondant à Ara h 1 est imperceptible, mais celui pour Ara h 3 reste visible, même si affaibli. En ce qui concerne Ara h 2, il semble que la fermentation à 48 heures n'a pas eu d'effet dégradant, puisque le signal reste identique comparé aux extraits réalisés sur l'arachide avant la fermentation. Au niveau des poids moléculaires entre 10 et 15 kDa, l'apparition d'une bande assez mal définie montre que la dégradation des protéines par les protéases des champignons conduit à la formation de polypeptides de faible taille qui conservent les épitopes reconnus par les anticorps de lapin. Dans les extraits réalisés en conditions dénaturantes à 48h de fermentation, il ne semble pas que l'influence de la quantité de maïs soit significative.

Au bout de 72h de fermentation, au niveau des extraits dans des conditions non dénaturantes, on ne décèle aucune bande visible sur la membrane, et on peut donc penser que les allergènes ont été dégradés par les enzymes produites par les champignons lors de la fermentation. Cependant, il est possible d'apercevoir au niveau des bas poids moléculaires de la piste 13, membrane A, une fine bande visible. Cette bande peut contenir des polypeptides de taille inférieure à la gamme de résolution du gel SDS-PAGE reconnus par les

anticorps de lapin dirigés contre les allergènes majeurs de l'arachide. Dans les conditions dénaturantes, des profils différents sont obtenus selon la teneur en maïs. Pour une teneur inférieure à 1%, on remarque sur la membrane la présence des doublets correspondant à Ara h 3 et Ara h 2, alors qu'aucun signal n'est visible pour Ara h 1. Pour les conditions de fermentation à 1% de maïs, seul le doublet correspondant à Ara h 2 est visible.

### C. ELISA

Le dosage ELISA montre une tendance générale à la diminution de la reconnaissance des protéines allergènes majeurs de l'arachide au cours de la fermentation solide avec *Aspergillus oryzae*. Le signal obtenu en absorbance à 405 nm est rapporté en pourcentage à la valeur du signal obtenu pour l'extrait non fermenté d'arachide. En ce qui concerne Ara h 1, la diminution est progressive en fonction de la durée de la fermentation, et on arrive après 72h de fermentation à une diminution du signal de près de 80% pour l'extrait dénaturant par rapport au signal obtenu avant la fermentation.

L'extrait non dénaturant montre une encore plus grande diminution du signal : 7 à 9% du signal résiduel par rapport l'extrait avant fermentation. Le signal obtenu pour Ara h 2 dans les extraits non dénaturants diminue proportionnellement avec la durée de la fermentation, pour avoir au bout de 72h, un signal résiduel entre 1 et 2%. Pour les extraits dénaturants, la diminution est initiée dès 24h de fermentation. Cependant le signal entre 48h et 72h reste sensiblement identique, avec une diminution comprise entre 60 et 40 %. Ara h 2 est donc toujours reconnu assez fortement par les anticorps de lapin, ce qui laisse penser que sa dégradation par les enzymes excrétées par les champignons n'est que partielle. Les protéines d'Ara h 2 solubles dans l'extrait non dénaturant n'ont sûrement pas subi de modification de structures ou de polymérisation avec d'autres protéines lors de la phase préparatoire des échantillons, ce qui explique leur disponibilité à la dégradation, qui augmente avec le temps de fermentation par les protéases de champignons. En ce qui concerne les extraits réalisés dans les conditions dénaturantes, la structure d'Ara h 2 a pu être modifiée par les traitements thermiques mis en œuvre avant la fermentation, soit par un réarrangement des ponts disulfures, par la réaction de Maillard ou une par une polymérisation avec d'autres protéines qui peut conduire à une augmentation de la résistance à l'hydrolyse par les protéases des champignons, justifiant ainsi la moindre diminution du signal dans les extraits dénaturants par rapport aux extraits non dénaturants.

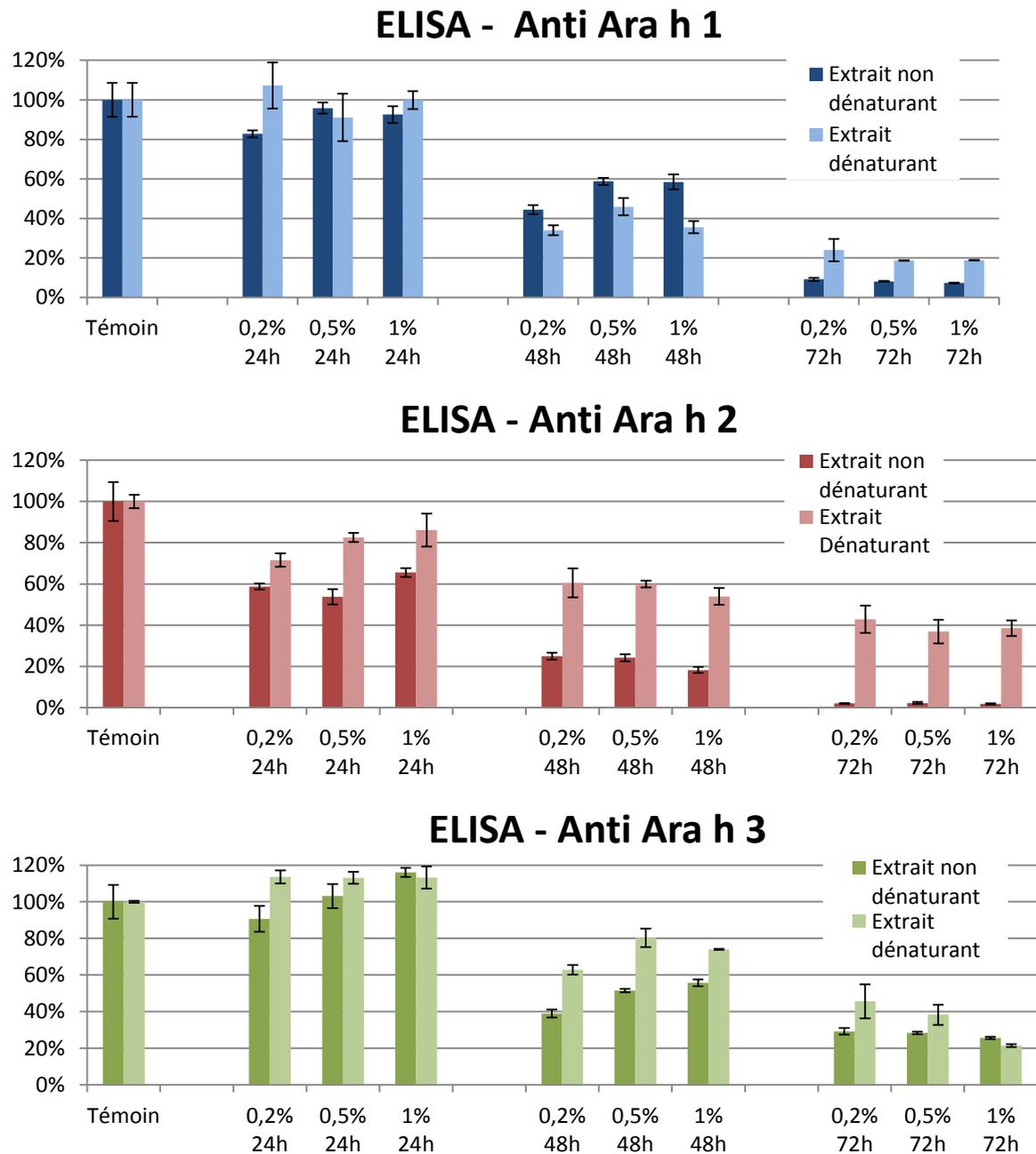


Figure 40 : Dosages ELISA des extraits de fermentation solide avec *Aspergillus oryzae*

Ara h 3 présente elle aussi une diminution globalement proportionnelle du signal en fonction de la durée de la fermentation. La diminution maximale est obtenue après 72h de fermentation sur de l'arachide additionnée de 1% de maïs, avec un signal compris entre 21 et 25% du signal témoin. De la même manière que pour signal obtenu pour Ara h 2, les extraits dénaturants montrent une plus forte reconnaissance par les anticorps de lapin par rapport aux extraits non dénaturants aux temps de fermentation de 48h et 72h, même si

cette différence est moins flagrante que chez Ara h 2. Les mêmes raisons peuvent être à l'origine de cette différence de signal, à savoir le traitement thermique.

#### **D. Conclusion**

De façon générale, l'addition de maïs suivant des ratios variables ne semble pas avoir une grande influence sur la dégradation des protéines et donc sur la sécrétion d'enzymes par les champignons. Les gels et les Western Blots montrent une importante dégradabilité des protéines au cours de l'avancée de la fermentation avec la souche *Aspergillus oryzae*, ce qui n'a pas été confirmé par les résultats obtenus en dosage ELISA. En effet, ce dosage permet de chiffrer la diminution de la quantité de protéines reconnues par les anticorps de lapins spécifiques aux trois allergènes majeurs de l'arachide. Après 72h de fermentation, les diminutions des signaux pour Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 sont de 80%, 65% et 55% dans les extrait dénaturants, respectivement. Cette diminution est déjà significative, mais insuffisante pour pouvoir commercialiser un produit exempt d'allergènes. Cette fermentation sur substrat solide a toutefois montré son efficacité pour la réduction de la quantité d'allergènes dans l'arachide traitée. Afin de poursuivre dans cette voie, nous allons définir des conditions qui peuvent conduire à une dégradation plus importante des allergènes de l'arachide et la mise en place de procédés de traitement préliminaires pour y parvenir.

## **II. Les procédés technologiques de déstructuration**

La dégradation des protéines en fermentation solide a montré ses limites, et les taux de reconnaissance des allergènes par les IgG de lapins ne sont pas suffisamment réduits pour pouvoir prétendre à l'obtention d'un aliment sans allergène. Même si aucun test n'a été effectué sur la réactivité des IgE de patients sur ces fermentats, les résultats en dosage ELISA et Western Blot suffisent à déduire que la dégradation n'est pas assez poussée.

### **A. L'accessibilité des protéines**

Les protéases sécrétées par les champignons sont peu spécifiques et sont capables de dégrader de nombreuses protéines. La résistance de certaines protéines (les albumines 2S par exemple) à des endoprotéases avec des sites d'hydrolyse spécifiques (la trypsine, par

exemple) peut expliquer la mauvaise dégradation obtenue par l'hydrolyse enzymatique mettant en jeu ces couples protéines/protéases. Cependant, lors de la mise en contact d'une protéine avec une protéase fongique, qui présente une faible spécificité des sites d'hydrolyse, on s'attend à ce que la dégradation soit plus poussée qu'avec une protéase qui possède des sites de clivage spécifiques. Ainsi, si la protéolyse mise en œuvre pendant 72h lors de la fermentation de l'arachide avec une souche fongique qui secrète des protéases en quantité importante ne conduit pas à la dégradation de la majorité des protéines, la question de l'accessibilité des protéines pour la protéolyse se pose. En effet, nous avons vu dans l'introduction que les protéines de réserve étaient stockées à l'intérieur de corps protéiques et présentent une organisation pseudo-cristalline, qui forme un réseau très peu hydraté. Cette organisation qui conduit à une faible solubilité des protéines allergènes de l'arachide peut conduire à diminuer leur accessibilité aux protéases fongiques, et empêcher ainsi leur dégradation. De la sorte, nous avons procédé à différents essais de modifications physico-chimiques de l'arachide en amont de la fermentation pour parvenir à une meilleure solubilisation des protéines dans le but de les rendre plus disponibles à la protéolyse.

## **A. Procédé technologique comme solution technique**

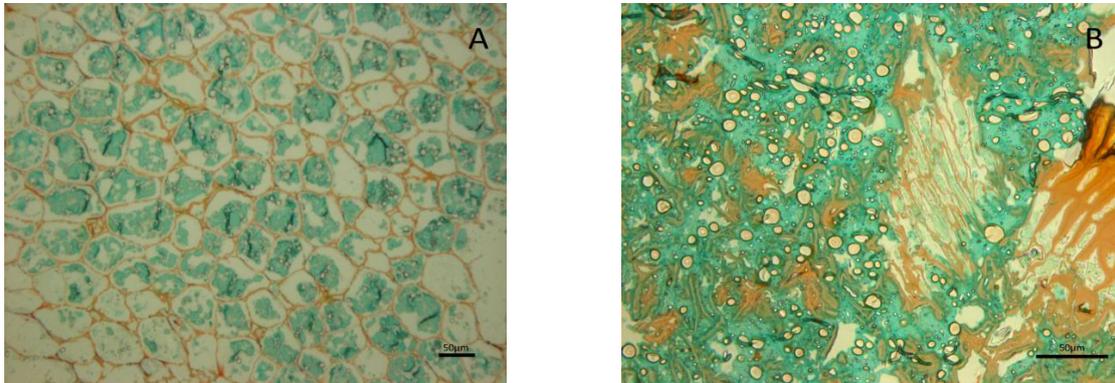
### **1. L'extrusion**

De nombreux procédés technologiques utilisés en industrie alimentaires contraignent et déstructurent la matière. Par exemple, l'extrusion est un procédé qui combine une très forte augmentation de pression avec une augmentation de la température pour conduire à une texturisation. Ce procédé est utilisé dans la fabrication des pâtes, par exemple. L'étude de Ben-Hdech, E.-H. (1993) a montré que la texturisation d'une farine de pois par cuisson-extrusion conduisait à la formation d'un réseau protéique dense. Pour l'arachide, ce procédé est classiquement utilisé de façon industrielle pour extraire l'huile brute, et est alors appelé trituration. Nous avons analysé microscopiquement l'impact de ce procédé sur la texturisation des protéines pour statuer si cette cuisson-extrusion pouvait conduire à meilleure disponibilité des protéines de l'arachide à la protéolyse.

Comme le montre les acquisitions en microscopie en fond clair (Figure 41), la texturisation par cuisson-extrusion de l'arachide conduit à la formation d'un réseau protéique étalé et quasi-continu.

L'application d'une forte pression a conduit à déstructurer totalement les corps protéiques, et libère les protéines de leur organisation pseudo-cristalline, tout en créant par ailleurs la formation d'un réseau amorphe consolidé par des liaisons interprotéiques, induites par l'application de la pression et de la chaleur. Les extractions successives des protéines par un tampon Tris 20 mM pH 8,5 puis par un tampon dénaturant Tris/SDS/DTT/Glycérol sont présentées Figure 42. Cette séparation des protéines en SDS-PAGE montre que les protéines issues du tourteau présentent une bien moins bonne extractibilité que les protéines de l'arachide non traitée. Dans les pistes 1 et 2, les protéines correspondant à Ara h 1, Ara h 3 et le doublet mal défini à 17-20 kDa d'Ara h 2 sont clairement visibles, quel que soit le tampon d'extraction utilisé. Pour la piste 3, aucune protéine n'est visible, ce qui permet de dire que les protéines du tourteau issu de la trituration ne sont pas solubles dans un tampon Tris pH 8,5 20 mM, ce qui peut être dû à la formation d'interactions protéines-protéines ou des protéines avec d'autres composants de la matrice. Dans la piste 4, les bandes correspondantes à Ara h 3 et Ara h 2 sont discernables, alors que la bande correspondant à Ara h 1 est à peine visible. Il a été montré dans la littérature qu'Ara h 1 avait tendance à former des agrégats de hauts poids moléculaire sous des contraintes de chaleur (Kopper, R. A. et al. 2005). De plus, au niveau des hauts poids moléculaires, un amas protéique est présent sous la forme d'une fine bande colorée : les protéines agrégées n'ont pas pénétré dans le gel de séparation car leur poids moléculaire est trop important. Cette analyse du gel SDS-PAGE montre que même dans un tampon dénaturant et réducteur, les protéines texturées par l'extrusion-cuisson sont faiblement solubles et que le réseau protéique formé est lié de manière covalente. Effectivement, lors d'un traitement thermique, du fait de l'organisation « en paquet » des protéines, les liaisons inter protéiques sont facilitées et conduisent à la formation des agrégats *via* la réaction de Maillard. Ces réactions s'expliquent par le fait que les groupements hydrophobes, naturellement situés au cœur des protéines de réserve de l'arachide, se retrouvent exposés à la surface lors d'une augmentation de la température. Une fois exposés à la surface, les groupements hydrophobes réagissent les uns avec les autres et *via* des liaisons hydrophobiques, s'unissent pour former un réseau de protéines. On peut aussi assister à la formation de nouvelles interactions faibles de type Van der Waals, ou de création de ponts disulfures interprotéiques, voire de liaisons covalentes inter protéiques. Ces résultats montrent que la texturisation des protéines ne conduit pas à une

meilleure solubilité des protéines, et que la formation du réseau protéique réduit considérablement la disponibilité des protéines. Ainsi, l'extrusion comme procédé de mise en œuvre de l'arachide en vue d'augmenter la solubilité protéique n'est pas envisageable.

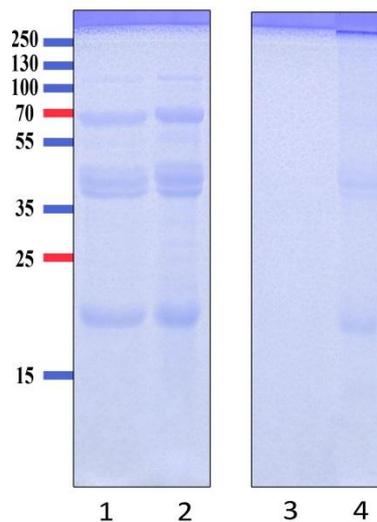


**Figure 41 : Microscopie en fond clair de l'arachide non traitée et traitée par extrusion-cuisson**

A : Arachide non traitée

B : Arachide après trituration

Les protéines sont vertes à vert bleu, les parois sont orangées à brun, coloration selon le protocole de Ben-Hdech, E.-H. (1993).



**Figure 42 : SDS-PAGE des protéines d'arachide avant et après l'extrusion-cuisson**

Piste 1 et 2 : extraits Tris pH 8,5 20 mM (1) et SDS/DTT/Tris/Glycérol (2) d'arachide non traitée

Piste 3 et 4 : extraits Tris pH 8,5 20 mM (3) et SDS/DTT/Tris/Glycérol (4) de tourteau d'arachide après trituration.

Extraits réalisés dans les mêmes conditions, et dépôts sur gel à volumes égaux (20µL) de la solution protéique obtenue après dilution au 1 :10<sup>ème</sup> dans de l'eau.

## 1. L'homogénéisation ultra haute pression

Toutefois, l'application de hautes pressions est envisagée dans le but de déstructurer la matrice arachide, et plus particulièrement les corps protéiques afin d'augmenter la disponibilité des protéines à la dégradation par les protéases de microorganismes. Cette pression appliquée peut être isostatique ou dynamique. Sur un fluide statique à l'équilibre, on montre que la pression est la même en tout point, on parle de «pression isostatique ou hydrostatique». Lorsqu'il est mis en mouvement, le fluide subit des contraintes tangentielles ou cisaillements qui sont liées à sa viscosité. L'énergie cinétique conférée au fluide peut être localement convertie en augmentation de pression. C'est pourquoi, on parle de «pression dynamique». Dans le cadre d'une forte pression isostatique, des études préliminaires ont montré l'augmentation de la digestibilité de protéines de soja par des protéases digestives (Peñas, E. et al. 2004). Aucune étude n'a cependant porté sur l'aspect structurel et l'effet de l'application de la haute pression statique sur la conservation de la structure protéique des oléo-protéagineux. Pour notre étude, nous avons choisi d'appliquer une haute pression dynamique, qui permet d'atteindre des seuils de pression plus élevés que l'application statique, en limitant toutefois l'échauffement du milieu pressurisé. Industriellement, la haute pression dynamique est obtenue par le passage d'un fluide dans un homogénéisateur haute pression.

Le passage de l'arachide préalablement broyée dans l'eau dans la tête d'homogénéisation permet d'appliquer une pression dynamique de 500 bars, ce qui contraint ainsi sévèrement la matière. L'analyse microscopique de l'arachide avant et après homogénéisation présentée en Figure 43 montre que la structure obtenue est complètement éclatée et que les corps protéiques ont perdu leur intégrité sans que toutefois on assiste à la formation d'un réseau protéique dense.

Ainsi, contrairement à l'aspect texturé que l'on avait obtenu avec la trituration, on se retrouve ici avec une perte de structure des corps protéiques qui favorise la dispersion des protéines, et désorganise leur agencement semi-cristallin. L'analyse granulométrique (Figure 44) confirme l'étude microscopique, puisque les résultats obtenus avec le diffractomètre MasterSizer 2000 de chez Malvern Instruments® montrent une nette réduction de la granulométrie des particules de l'arachide suspendue dans l'eau et homogénéisée à haute pression (1 passage à 30 bars et 2 passages à 500 bars).

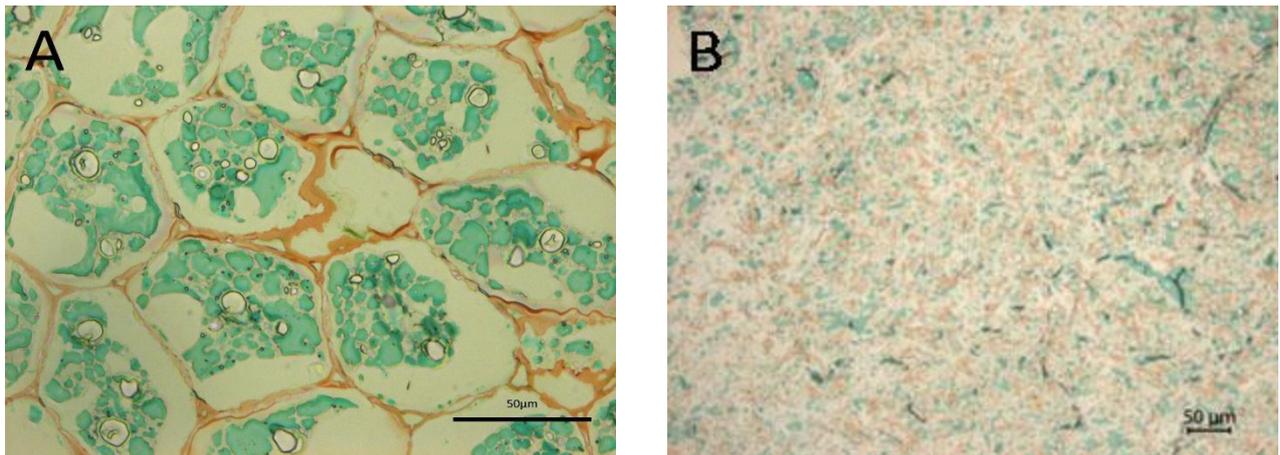


Figure 43 : Microscopie en fond clair de l’arachide avant et après passage dans l’homogénéisateur haute pression

A-Arachide suspendue dans l’eau (20:80) et broyée avec le Silverson® à 700 rpm (5 min)

B- Arachide suspendue dans l’eau (20:80) et broyée avec le Silverson® à 700 rpm (5 min) et homogénéisée

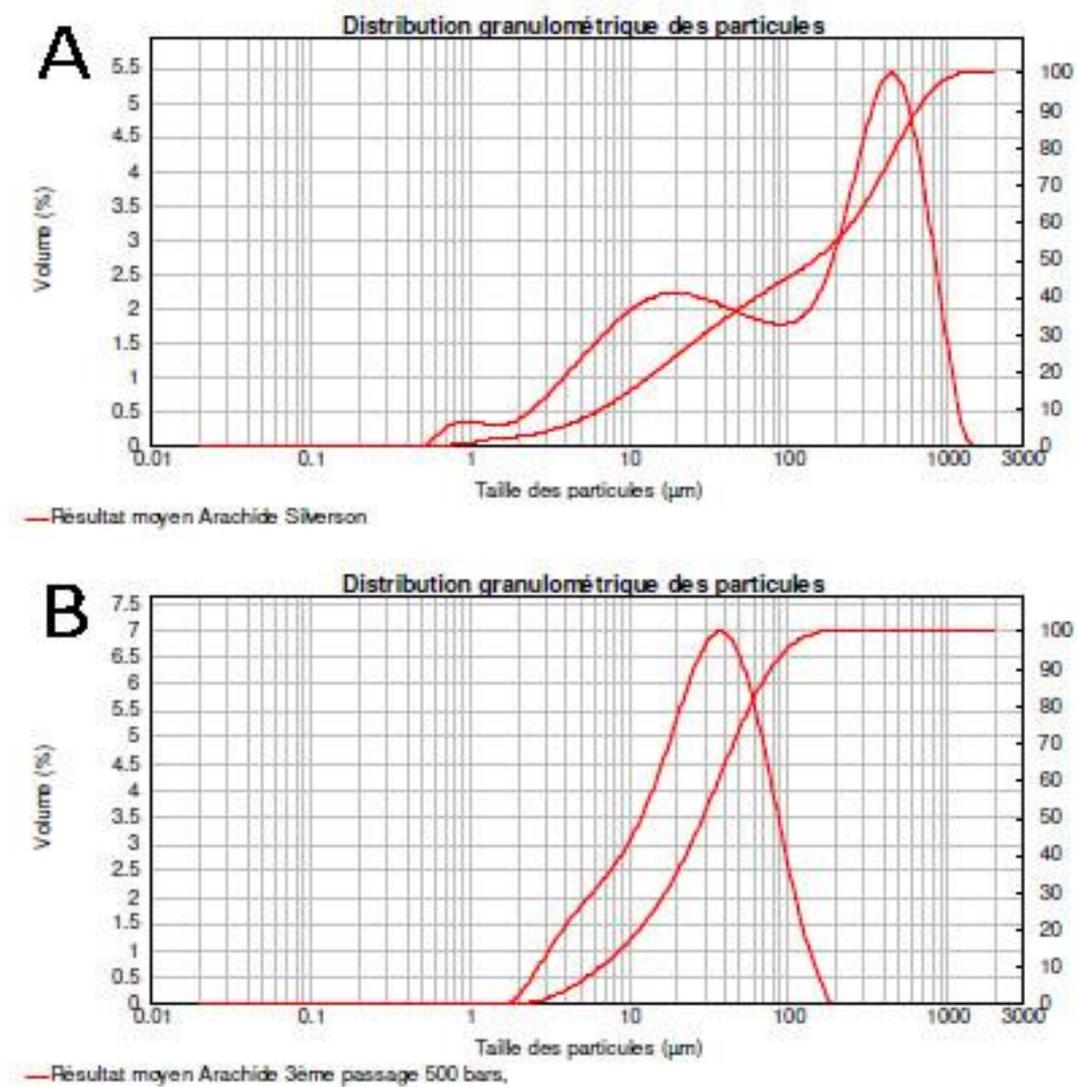


Figure 44 : Analyse granulométrique de l’arachide avant et après passage dans l’homogénéisateur

A-Arachide suspendue dans l’eau (20:80) et broyée avec le Silverson® à 700 rpm (5 min)

B- Arachide suspendue dans l’eau (20:80) et broyée avec le Silverson® à 700 rpm (5 min) et homogénéisée

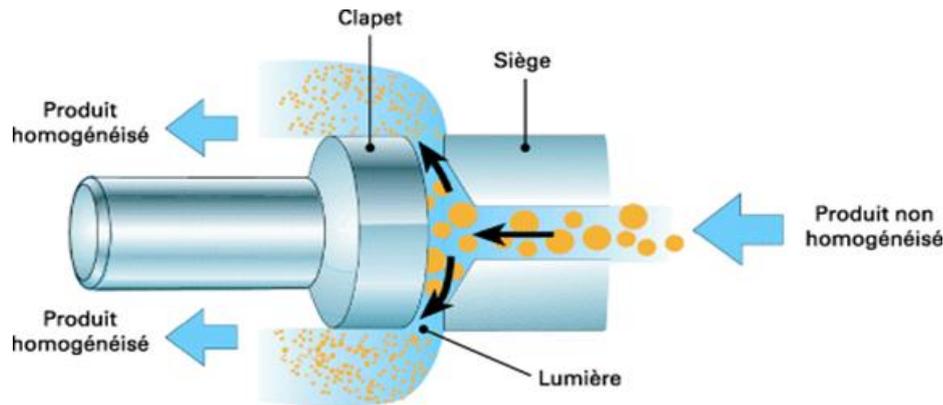
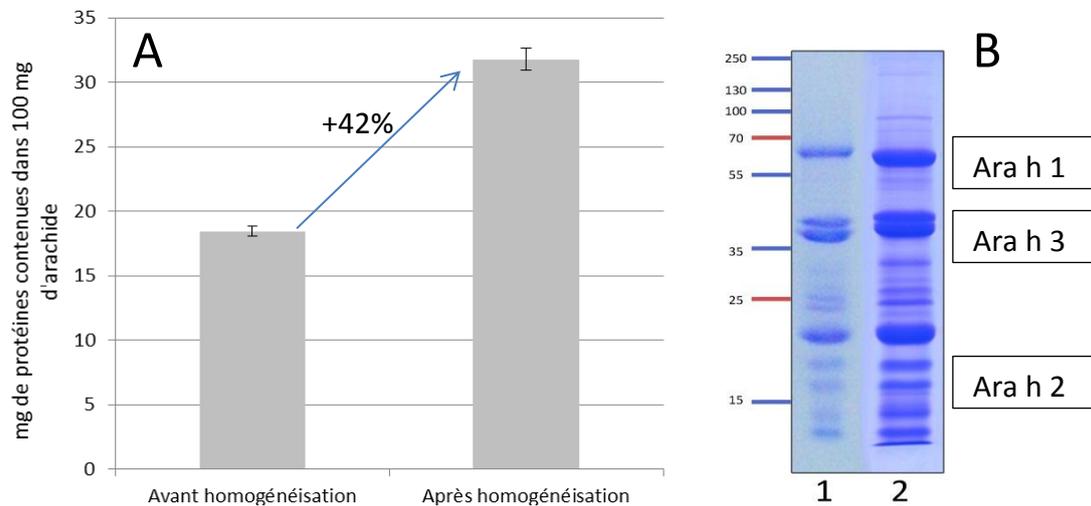


Figure 45 : Schéma de la tête d'homogénéisation

Les particules avant homogénéisation se présentent sous la forme de deux sous-populations avec une moyenne de taille de 20 et 450  $\mu\text{m}$ , respectivement. Après homogénéisation, la population obtenue se situe autour d'une moyenne de granulométrie à 38  $\mu\text{m}$ , et aucune particule n'est plus grande que 200  $\mu\text{m}$ .

De plus, l'analyse du diamètre moyen pondéré montre une réduction de taille de 250  $\mu\text{m}$  à 27  $\mu\text{m}$  par homogénéisation de l'arachide broyée. Toutefois, la diffraction de la lumière comme outil de mesure de la granulométrie ne fait pas de différence entre les particules solides et les particules émulsionnées. En effet, il est à noter que l'arachide est homogénéisée sans délipidation préalable, et que les corps lipidiques sont de fait toujours présents lors du passage dans l'homogénéisateur. Ce procédé d'homogénéisation est couramment utilisé dans l'industrie pour favoriser les émulsions, et il est donc logique que les lipides et les protéines forment des micelles de taille variables qui sont mesurées par le diffractomètre. De plus, les parois cellulaires et autres composants de la cellule peuvent aussi présenter des granulométries supérieures à celles des corps protéiques après homogénéisation. Ainsi, l'analyse granulométrique seule ne permet pas de déterminer uniquement la taille et la perte de l'intégrité des corps protéiques mais uniquement d'avoir une approche globale sur la réduction de la taille des particules au cours de l'homogénéisation haute pression. Globalement, et comme le confirme l'analyse microscopique en Figure 43, ces indications granulométriques nous permettent de prédire l'éclatement de la structure cellulaire et la perte d'intégrité des corps après le passage de l'arachide dans l'homogénéisateur haute pression.

Afin d'étudier l'impact de ce procédé sur la solubilité des protéines, nous avons procédé à deux extractions parallèles sur de l'arachide homogénéisée ajustée à un pH 8,5 avec un tampon Tris 1M pH 8,5 pour une concentration finale en Tris à 20 mM, et de l'arachide broyée au Silverson ajustée de la même manière avec un tampon Tris pH 8,5 1M. Les deux extraits protéiques ont été dosés et séparés sur gel SDS-PAGE (Figure 46).



**Figure 46 : Analyse des protéines avant et après passage dans l'homogénéisateur haute pression**

A – Dosage BCA des protéines après extraction dans un tampon Tris 20 mM final, pH 8,5 des solutions avant et après homogénéisation

B – Gel SDS-PAGE 12,5% des extraits protéiques avant homogénéisation (piste 1) et après homogénéisation (piste 2) avec des dépôts de volumes égaux (1 $\mu$ L d'extrait déposé).

Les deux extraits protéiques montrent une différence de concentration protéique assez importante, puisque l'extrait obtenu après homogénéisation contient 42% de protéines en plus par rapport à l'extrait réalisé sur l'arachide avant homogénéisation (Figure 46, A). Comme les protéines de réserves sont la principale source de protéines contenues dans la graine d'arachide, il est donc évident que cette augmentation de la solubilité est en grande partie due à la meilleure solubilisation des protéines de réserves, donc des allergènes de la graine. Il est admis que l'arachide contient entre 25% et 30 % massiques de protéines selon les variétés concernées. Ainsi, pour un dosage qui montre que les protéines extraites sont de l'ordre de 30 mg pour 100mg d'arachide, on peut estimer que l'extraction est quasiment totale, et que la grande majorité des protéines extraites sont présentes dans la solution d'extraction. Une séparation en gel SDS-PAGE permet de confirmer ce résultat, puisque les profils électrophorétiques obtenus en Figure 46 (B) montrent de nettes différences en intensité de protéines. En effet, sur la piste 1 (extrait avant homogénéisation), les bandes correspondants aux protéines Ara h 1 (63 kDa), Ara h 2 (doublet à 17 et 20 kDa) et Ara h 3

(doublet à 45 kDa) sont visibles, alors que les autres sont juste discernables, voire indécélables entre 25 et 35 kDa, qui correspondent à la sous-unité basique d'Ara h 3. Pour la piste 2 (extrait après homogénéisation), les bandes protéiques correspondantes aux protéines Ara h 1 (63 kDa), Ara h 2 (doublet à 17 et 20 kDa) et Ara h 3 (doublet à 45 kDa) sont plus intenses, et les bandes correspondants à la sous-unité basique d'Ara h 3 sont nettement visibles. De nombreuses autres bandes apparaissent, que ce soit dans les hauts poids moléculaires (bande visible à environ 90 kDa) que dans les bas poids moléculaires (deux bandes visibles entre 15 et 10 kDa). Ainsi, tous ces résultats concordent pour statuer que l'homogénéisation haute pression favorise la solubilisation des protéines de réserve de la graine, déstructure la matrice et désorganise les corps protéiques, ce qui peut jouer en la faveur d'une meilleure dégradabilité par les protéases des micro-organismes.

De plus, ce procédé à l'avantage de chauffer très peu, puisqu'on estime que pour chaque tranche de 40 bars, le fluide augmente de 1°C. Ici, dans les conditions mises en œuvre, le fluide est donc chauffé d'une température de 12,5°C supérieur à la température ambiante, ce qui ne provoque pas de réaction de Maillard et de réarrangement protéique. Ce procédé est donc appliqué à l'arachide comme étape préliminaire d'aide à la protéolyse avant mise en place de la fermentation en phase liquide par les micro-organismes.

### III. La fermentation par les micro-organismes en milieu liquide

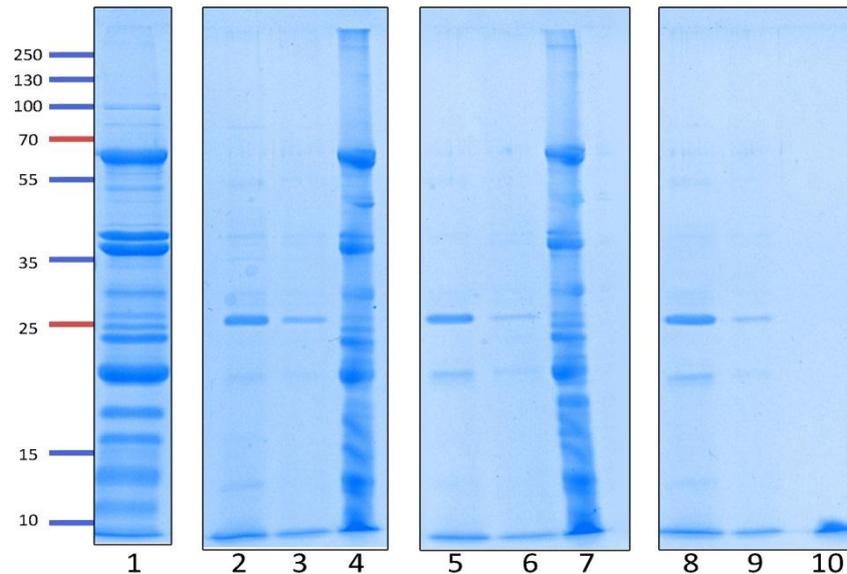
#### A. *Aspergillus oryzae*

Afin de favoriser la croissance du champignon et de mettre à disposition tous les nutriments nécessaires à son développement, nous avons choisi d'ajouter du glucose en faible quantité (0,2%) à l'arachide homogénéisée, puisque les sucres sont peu présents dans l'arachide. Aussi, le pH de l'homogénéisat est ajusté à 4,5 pour éviter les croissances microbiennes indésirables sans toutefois freiner la croissance fongique. En effet, les champignons sont beaucoup plus tolérants à des pH acides que les bactéries. La fermentation est réalisée en triplicat à des temps de fermentation de 24h, 48h et 72h. La croissance du champignon en milieu liquide est moins visible qu'en fermentation solide, puisque le champignon ne développe pas de mycélium ni de spores à la surface. La croissance du champignon en milieu liquide se fait par la formation de « pelotes ». La coloration de l'arachide homogénéisée au cours de la fermentation varie pour devenir de plus en plus brune/verte, ce qui semble indiquer que le champignon se développe correctement au cours de l'avancée de la fermentation.

#### 1. Gel SDS PAGE

Après extraction des protéines selon le protocole établi et présenté dans le chapitre « Matériel et méthodes », les différents extraits obtenus sont dosés avec la méthode du BCA et séparés sur gel SDS-PAGE de 12,5% à raison de 20µg de protéines dosées/puits. Sur la

Figure 47, dès 24h de fermentation, les protéines présentes dans les surnageants et extraits non dénaturants sont très peu abondantes (pistes 2 et 3). La bande la plus intense se situe aux alentours de 26 kDa, et ne semble pas correspondre à une protéine de l'arachide. Il est possible que cette protéine soit une protéine synthétisée par le champignon lors de sa croissance. Les mêmes résultats sont observables à 48h et 72h pour les surnageants et extraits non dénaturants issus des fermentations (pistes 5, 6, 8 et 9). En ce qui concerne les extraits dénaturants, le profil des protéines de l'arachide est retrouvé de façon évidente pour les extraits réalisés sur les temps de fermentation de 24 et 48h (pistes 4 et 7). Cela montre que la dégradation n'est pas totale sur les temps de fermentation les plus courts.



**Figure 47 : Gels SDS PAGE des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *Aspergillus oryzae***

1 : Extrait d'arachide non traitée

2, 3, 4 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (24h)

5, 6, 7 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (48h)

8, 9, 10 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (72h)

A 72h, plus aucune bande n'est visible dans l'extrait dénaturant (piste 10). Cependant, sur le front de migration, un léger smear apparait, ce qui laisse penser que les protéines sont dégradées en petits polypeptides. Toutefois, les protéines d'arachides sont présentes dans les extraits dénaturants à 24h et 48 de fermentation. L'homogénéisation haute pression fait subir à l'arachide d'importantes contraintes physiques, dont le cisaillement, qui sont être à l'origine de la diminution de la granulométrie. Ces contraintes peuvent conduire toutefois à des réarrangements protéiques : lors du passage dans l'homogénéisateur peuvent se former de nouvelles structures protéiques issues d'une réorganisation par la création de nouvelles liaisons interprotéiques de faibles intensités (de type Van der Waals). Ces réorganisations sont toutefois limitées par l'absence de hausse importante de la température qui ne conduit pas à la formation d'interactions de type covalente. Ces interactions protéiques de faible intensité sont déstabilisées par l'utilisation d'un tampon dénaturant et réducteur, et permet de retrouver dans l'extrait protéique le profil initial des allergènes de l'arachide.

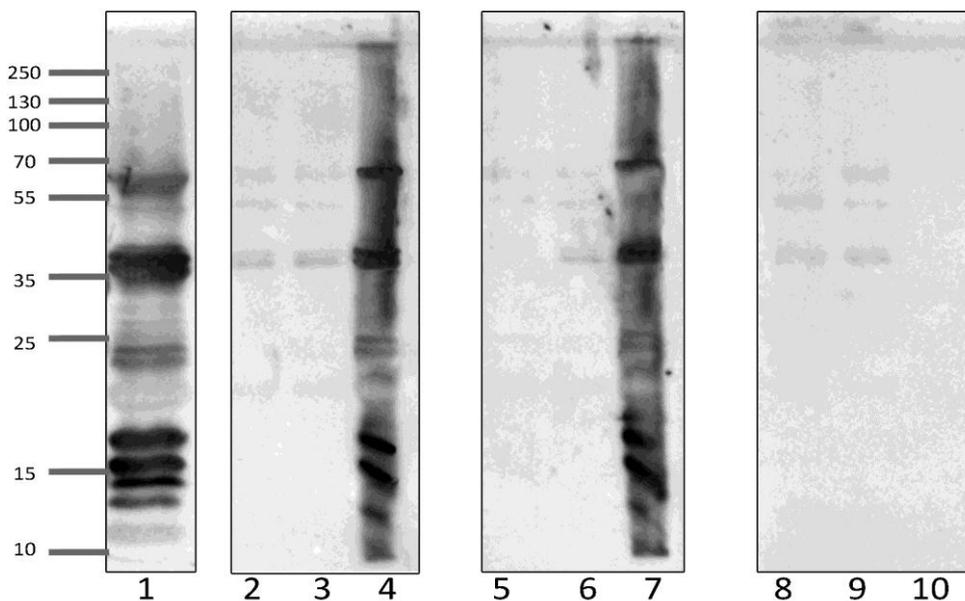
La réorganisation de ces protéines lors de l'homogénéisation est cependant assez limitée, puisque le dosage au BCA après la réalisation des extraits montre que la grande

majorité des protéines se retrouve dans le surnageant et l'extrait non dénaturant (résultat non montré).

Cette dégradation des protéines dans les différents extraits doit être vérifiée comme étant suffisante pour caractériser la perte d'allergénicité par les méthodes de Western Blot et ELISA.

## 2. Western Blot

Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose suit du marquage par un pool des anticorps de lapin dirigés spécifiquement contre les allergènes Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 permet de mettre en évidence les allergènes de l'arachide présents dans les extraits au cours de la fermentation (Figure 48).



**Figure 48 : Western Blot des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *A. oryzae***

1 : Extrait d'arachide non traitée

2, 3, 4 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (24h)

5, 6, 7 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (48h)

8, 9, 10 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (72h)

Le signal obtenu en Western Blot confirme les résultats du gel SDS-PAGE des mêmes échantillons. Dans les surnageants et extraits non dénaturants (pistes 2, 3, 5, 6, 8 et 9), la bande visible sur gel à 26 kDa n'est pas reconnue par les anticorps de lapin, et n'appartient donc pas aux protéines allergènes de l'arachide, ce qui confirme l'hypothèse émise sur l'origine fongique de cette protéine.

Dans les mêmes extraits, quelle que soit la durée de la fermentation, on décèle l'apparition des bandes correspondant à Ara h 1 et Ara h 3. Ara h 2, absentes en gel SDS-PAGE.

Pour les extraits dénaturants à 24h et 48h (pistes 4 et 7), les protéines Ara h 1, Ara h 3 et Ara h 2 apparaissent clairement, alors qu'elles sont absentes dans l'extrait à 72h (piste 10). On peut donc en déduire que la dégradation des protéines intervient entre 48h et 72h. De plus, le smear visible sur le gel SDS-PAGE en fin de piste 10 n'est pas reconnu par les anticorps de lapin, ce qui laisse penser que les polypeptides obtenus *via* la dégradation par les protéases des champignons ne présentent plus les épitopes reconnus, et ne sont donc plus immunoréactifs.

En conclusion, il est ici mis en évidence qu'au bout de 72h de fermentation liquide en présence de la souche d'*Aspergillus oryzae*, les protéines contenues dans les différents extraits réalisés sur le fermentât ne sont plus reconnus par les anticorps de lapins dans la gamme de protéines visibles par la séparation SDS-PAGE d'un gel à 12,5%. Il est important de procéder à un dosage ELISA complémentaire afin de vérifier l'immunoréactivité des protéines résiduelles ou polypeptides présents à la fin de la fermentation et situés en dehors de la gamme de résolution du gel SDS-PAGE à cause de leurs faibles poids moléculaires.

## 1. ELISA

Un dosage ELISA sur les extraits réalisés après fermentation à trois temps successifs permet d'affiner le résultat obtenu en Western Blot et de quantifier la diminution de la reconnaissance des allergènes par les IgG de lapins. Les résultats obtenus après immunodosage des protéines et polypeptides reconnus par les anticorps de lapin dirigés spécifiquement contre les trois allergènes majeurs de l'arachide sont présentés sous forme de pourcentage de signal résiduel ramené au signal obtenu pour un témoin d'arachide avant fermentation. Ainsi, dans les extraits dénaturants, à 24h et 48h, le signal obtenu pour les trois allergènes majeurs est similaire au signal de l'arachide non traitée. Ce résultat concorde avec les pistes 4 et 7 des

Figure 47 où ces protéines sont nettement visibles. Les signaux obtenus pour Ara h 1 dans le surnageant et l'extrait non dénaturant montrent une diminution dès 24h de fermentation. A 48h, cette diminution est encore plus poussée pour finalement atteindre des valeurs de signal très faibles au bout de 72h de fermentation.

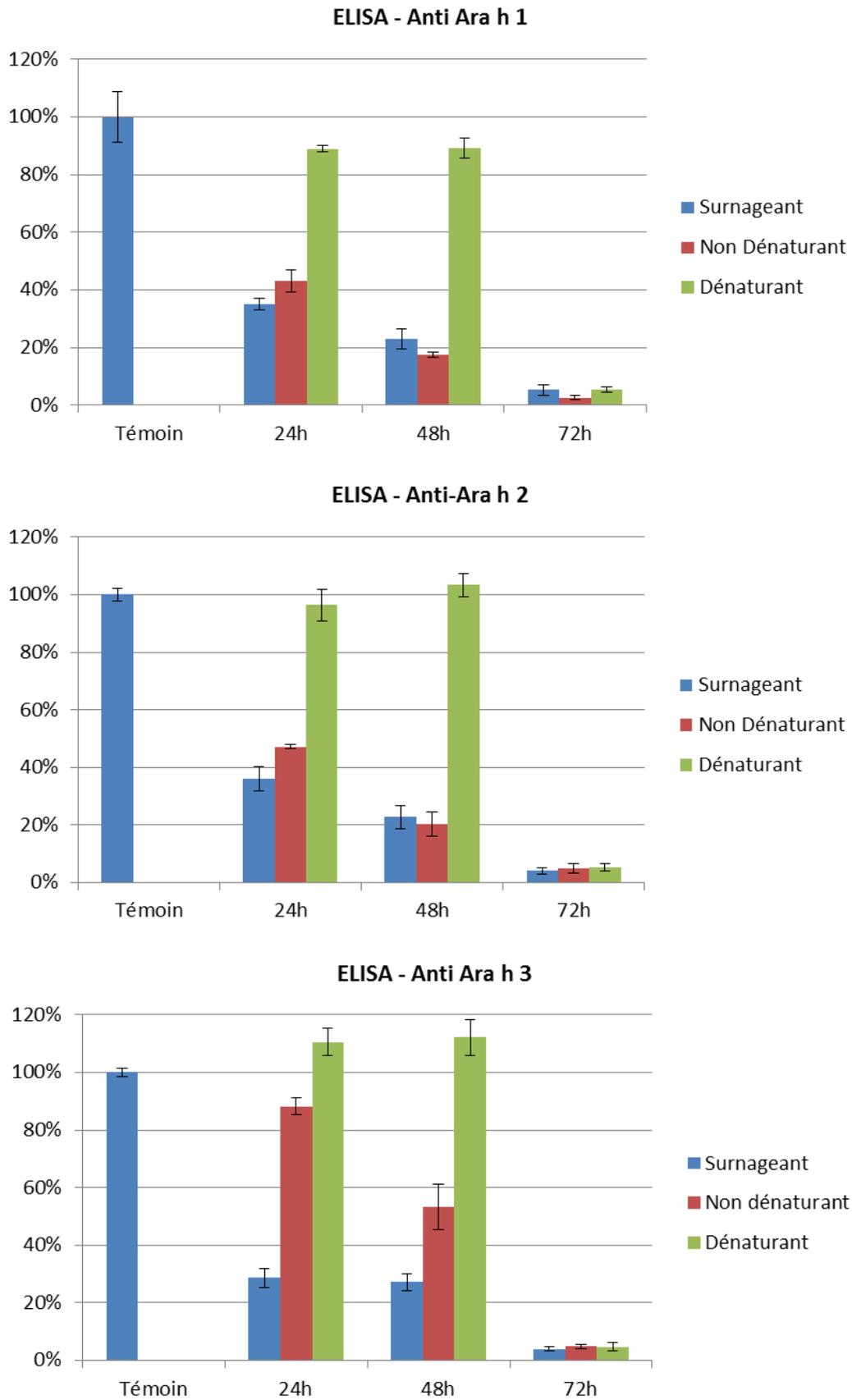


Figure 49 : Dosages ELISA des extraits de la fermentation liquide avec *A. oryzae*

L'évolution du signal pour la protéine Ara h 2 lors de la fermentation présente la même tendance, où la diminution de la liaison IgG-protéine est diminuée dès 24h pour finalement atteindre des valeurs entre 4 et 5 % au bout de 72h.

Le signal pour Ara h 3 présente un profil un peu différent, puisque la diminution du signal dans l'extrait non dénaturant à 24h de fermentation représente 88% du signal obtenu pour l'arachide non traitée, et montre ainsi une moins nette dégradation que chez les protéines Ara h 1 ou Ara h 2. Cependant, le signal dans l'extrait non dénaturant à 48h de fermentation ne représente plus que 53% du signal témoin, pour finalement atteindre 4,74% au bout de 72h de fermentation. Ce résultat pourrait montrer une plus grande résistance à la dégradation d'Ara h 3 par les protéases produites par le champignon *A. oryzae*

A 72h, pour les trois allergènes concernés, la réactivité des protéines vis-à-vis des anticorps de lapin est drastiquement diminuée puisque le signal résiduel est compris entre 4,7 et 5,4 % du signal témoin. On retrouve d'ailleurs cette diminution pour l'intégralité des extraits réalisés sur le temps de fermentation de 72h, puisque les protéines des surnageants, extraits dénaturants et non dénaturants présentent des réactivités très basses (Tableau 10).

	Ara h 1		Ara h 2		Ara h 3	
	% signal	+/-	% signal	+/-	% signal	+/-
<b>Surnageant</b>	5,25%	1,96%	4,06%	1,15%	3,94%	0,68%
<b>Extrait non dénaturant</b>	2,58%	0,70%	4,94%	1,50%	4,74%	0,82%
<b>Extrait dénaturant</b>	5,43%	0,77%	5,27%	1,42%	4,70%	1,47%

**Tableau 10 : Récapitulatifs des signaux obtenus en ELISA pour la fermentation liquide avec *A. oryzae* pendant 72h**

Ces signaux compris entre 2,58% et 5,43% montrent une importante diminution de l'immunoréactivité des protéines et polypeptides présents dans les différents extraits après 72 heures de fermentation vis-à-vis des IgG de lapins.

La fixation des IgG de lapins sur les allergènes de l'arachide est répartie sur des zones spécifiques à la surface des protéines. En effet, c'est lors de l'immunisation des lapins que les IgG sont synthétisés pour reconnaître spécifiquement les protéines injectées dans l'organisme, et plus particulièrement les déterminants antigéniques répartis à leur surface. Lors de la dégradation des protéines de l'arachide par les protéases d'*A. oryzae*, ces zones épitopiques peuvent subir des clivages hydrolytiques. Ainsi, cette baisse de signal en dosage

immunologique après la fermentation prouve la dégradation des protéines qui implique la dégradation des zones d'interactions avec les IgG.

### 1. Conclusion

La fermentation en milieu liquide conduit à une dégradation des protéines au bout de 72h de mise en contact de la souche d'*A. oryzae* avec l'arachide homogénéisée. La cinétique de dégradation est considérablement différente de celle obtenue avec la fermentation en phase solide avec la même souche et sur la même durée. En effet, lors de la fermentation solide, les profils des extraits protéiques réalisés à 24h, 48h et 72h (Figure 38) sont nettement différents les uns des autres tandis que pour la fermentation en milieu liquide, les profils des extraits protéiques entre 24h et 48h ne varient quasiment pas, tandis qu'à 72h la fermentation semble totale. De plus, il est à noter qu'en fermentation liquide, dès 24h de mise en contact de l'arachide homogénéisée avec la souche d'*A. oryzae*, la dégradation des protéines est initiée puisque dans les surnageants et extraits non dénaturants, les protéines de l'arachide ne sont presque plus visibles (Figure 47). Cette augmentation de la vitesse de dégradabilité des protéines peut être reliée à l'étape préliminaire d'homogénéisation haute pression, qui permet d'éclater la structure des corps protéiques et de favoriser la solubilisation des protéines et de les rendre ainsi plus accessibles à la protéolyse.

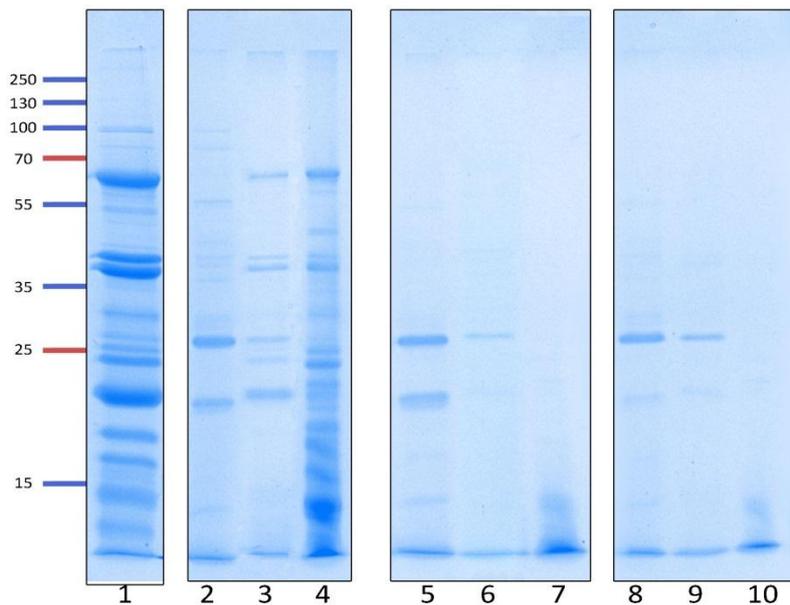
### B. *Rhizopus oligosporus*

De la même manière que la fermentation réalisée avec *A. oryzae* en milieu liquide, nous avons précédé préalablement à une homogénéisation haute pression sur de l'arachide crue dans un volume d'eau de 80% (v/m) avant d'acidifier le milieu à un pH de 4,5 et d'inoculer les souches de *R. oryzae* pour une fermentation sur 72h. Le pH a été rétabli à 6,7 avant de procéder aux extractions protéiques successives.

#### 1. Gel SDS-PAGE

Dans un premier temps, les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE (Figure 50) à 12,5% à raison de 20µg/puits selon le dosage BCA (Figure 50). Le gel SDS-PAGE permet de suivre la dégradation des protéines de l'arachide au cours de l'avancement de la fermentation liquide avec *R. oryzae*.

Dès 24h de mise en contact des spores avec l'arachide homogénéisée, le profil des différents extraits est modifié (pistes 2, 3 et 4). Dans le surnageant, les allergènes majeurs de l'arachide sont quasiment absents, tandis que dans l'extrait non dénaturant, les bandes correspondant à Ara h 1 et Ara h 3 sont visibles. Par contre, dans l'extrait dénaturant, toutes les protéines allergènes sont présentes, avec la bande à 63 kDa, les doublets à 45 kDa et 20 kDa qui correspondent à Ara h 1, Ara h 3 et Ara h 2, respectivement. A partir de 48 h de fermentation, le profil des protéines contenues dans le surnageant n'est pas modifié par rapport à celui obtenu au bout de 24h de fermentation (pistes 2, 5 et 8) et présente deux bandes visibles aux poids moléculaires de 25 et 23 kDa. La bande visible à 25 kDa ne semble pas être une protéine d'arachide, mais pourrait correspondre à une protéine synthétisée par le champignon lors de son développement.



**Figure 50 : Gels SDS PAGE des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *R. oryzae***

- 1 : Extrait d'arachide non traitée
- 2, 3, 4 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (24h)
- 5, 6, 7 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (48h)
- 8, 9, 10 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (72h)

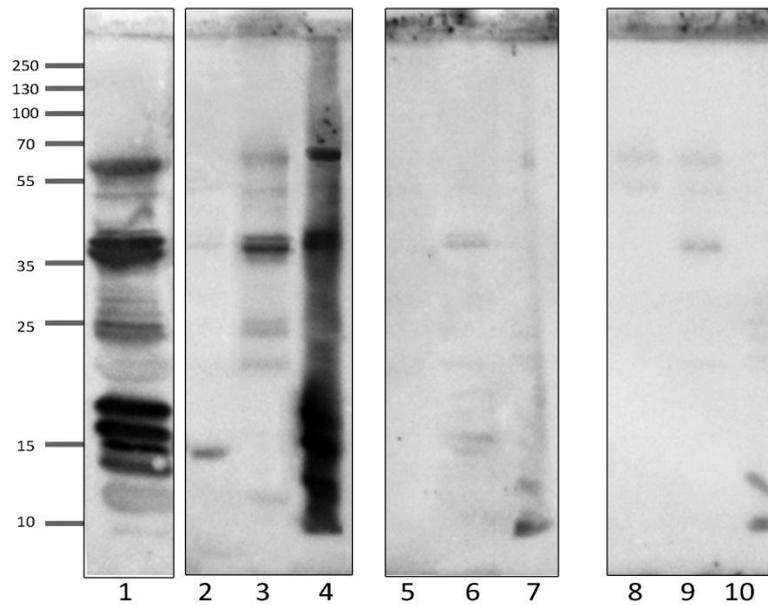
On retrouve d'ailleurs cette protéine à une plus faible intensité dans les extraits non dénaturants, qui, à partir de 48h de fermentation, ne semblent plus contenir de protéines d'arachide (pistes 6 et 9). En ce qui concerne les protéines présentes dans les extraits dénaturants, à partir de 48h de fermentation on ne discerne plus aucune protéine d'arachide (pistes 7 et 10), et l'apparition d'un smear en fin de piste qui pourrait correspondre à la présence de polypeptides issus de l'hydrolyse des protéines. Ainsi, la

dégradation des protéines d'arachide par la sécrétion d'hydrolases protéiques du champignon *R. oryzae* semble plus rapide que celle du champignon *A. oryzae*, puisque dès 48h de fermentation, les protéines de l'arachide contenues dans les différents extraits semblent dégradées. Ce résultat doit être confirmé par Western Blot, afin de s'assurer de l'absence effective de ces protéines allergènes et de vérifier la réactivité des smears en fin de pistes 7 et 10. En effet, le marquage des protéines par Western Blot utilisant les anticorps de lapin dirigés spécifiquement contre les allergènes de l'arachide permet de vérifier qualitativement la perte d'immunoréactivité des protéines résiduelles.

## 2. Western Blot

L'évolution de la composition en protéines allergènes des différents extraits au cours de l'avancement de la fermentation par une approche qualitative réalisée par Western Blot (Figure 51) permet de vérifier la dégradation des protéines par les protéases secrétées par *R. oryzae*. Les profils obtenus par le marquage des protéines avec les anticorps de lapin permettent de vérifier les hypothèses émises avec l'analyse du gel SDS-PAGE (Figure 50). En effet, pour la fermentation sur une durée de 24h, le surnageant (piste 2) présente une très faible immunoréactivité vis-à-vis des anticorps de lapins. Le signal pour Ara h 1 est absent, une légère bande apparaît pour le doublet correspondant à Ara h 3 et une protéine semble marquée au poids moléculaire de 15 kDa, probablement un polypeptide issu de la dégradation d'une protéine allergène. Dans l'extrait non dénaturant (piste 3), les signaux pour Ara h 1 et Ara h 3 sont nettement visibles, alors qu'Ara h 2 ne semble pas présent. Par contre, dans l'extrait dénaturant (piste 4), toutes les protéines allergènes sont retrouvées, avec un marquage fort pour Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3. A 48h de fermentation, le surnageant (piste 5) ne semble contenir aucune protéine allergène alors qu'à 72h (piste 8), le signal pour Ara h 1 est sensiblement visible.

L'absence de ce signal pour le temps de fermentation de 48h peut être expliquée par le bruit de fond plus fort dans cette zone de la membrane, lequel pourrait masquer la présence du faible signal induit par Ara h 1. Pour l'extrait non dénaturant à 48h de fermentation (piste 6), la protéine Ara h 1 ne semble plus présente alors qu'elle apparaît faiblement à 72h. Là aussi, le bruit de fond pourrait être à l'origine du masquage de cette bande dans l'extrait non dénaturant à 48h.



**Figure 51 : Western Blot des extraits réalisés sur l'arachide homogénéisée fermentée avec *Rhizopus oligosporus***

1 : Extrait d'arachide non traitée

2, 3, 4 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (24h)

5, 6, 7 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (48h)

8, 9, 10 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (72h)

Dans ce même extrait, la protéine Ara h 3 est visible au niveau du doublet à 45 kDa et le signal pour Ara h 2 apparaît très faiblement, alors qu'il était absent dans l'extrait à 24h. Nous avons vu précédemment que le traitement préliminaire par l'homogénéisation haute pression pouvait entraîner des modifications physico-chimiques dans l'organisation des protéines de l'arachide. Lors de la fermentation, les protéases secrétées par les champignons peuvent désorganiser ces assemblages grâce à l'hydrolyse de liaisons peptidiques qui déstabilise les interactions de faible intensité, et ainsi conduire à la libération de protéines qui n'étaient pas disponibles avant. Ainsi, ce phénomène pourrait expliquer la présence d'Ara h 2 dans l'extrait non dénaturant à 48h, alors qu'il était absent à 24h. De plus, l'extrait dénaturant à 48h (piste 7) semble ne plus contenir de protéines allergènes, ce qui corrobore le fait qu'Ara h 2 puisse être présent dans cet extrait non dénaturant suite à l'hydrolyse des protéines organisées par l'homogénéisation haute pression, qui sont solubles dans l'extrait dénaturant à 24h.

L'extrait dénaturant à 48h (piste 7) présente une légère bande visible à 63 kDa (Ara h 1) et un marquage en fin de piste, qui pourrait correspondre au smear visible sur le gel SDS-PAGE (Figure 50, piste7). La trainée visible le long de cette piste est vraisemblablement un

artefact. Pour le temps de fermentation de 72h et dans l'extrait non dénaturant (piste 9), le doublet correspondant à Ara h 3 est faiblement présent, en plus de la bande correspondant à Ara h 1. La piste 10 correspondant à l'extrait dénaturant à 72h de fermentation présente une bande visible en fin de piste, qui pourrait correspondre au smear visible sur le gel SDS-PAGE (Figure 50, piste 10).

Ainsi, l'analyse du Western Blot sur les extraits réalisés à des temps de fermentation variables de l'arachide avec *R. oryzae* semble conduire à des extraits moins dégradés qu'avec *A. oryzae*, ce qui doit être vérifié de façon quantitative en dosage ELISA en utilisant les mêmes anticorps de lapins dirigés contre les allergènes majeurs de l'arachide.

### 3. ELISA

L'aspect quantitatif du dosage ELISA permet d'obtenir des informations complémentaires sur les résultats qualitatifs obtenus en Western Blot. De façon générale, l'approche quantitative du dosage ELISA (Figure 52) montre des résultats en accord avec les résultats du Western Blot (Figure 51).

Pour la protéine Ara h 1, la tendance globale va vers une diminution du signal au cours de la fermentation. A 24h, le signal obtenu pour l'extrait dénaturant représente près de 100% du signal témoin, alors qu'il tend à diminuer pour l'extrait à 48h et atteindre une valeur plus faible pour la durée de 72h. Dans le surnageant et l'extrait non dénaturant, le signal pour 24h est plus fort que pour les temps de fermentation supérieurs, mais le signal stagne entre 48h et 72h, ce qui justifie l'hypothèse émise lors de l'analyse du Western Blot, à savoir le masquage du au fort bruit de fond de la bande correspondant à Ara h 1 au temps de fermentation de 48h. En ce qui concerne Ara h 2, le profil d'évolution de la reconnaissance de la protéine par les anticorps de lapin présente un très fort signal dans les extraits dénaturants, qui ne semble pas ou peu affecté par la durée de la fermentation.

Ainsi, la bande visible dans les bas de pistes du Western Blot (Figure 51, pistes 7 et 10) pourrait en fait correspondre à des polypeptides issus de l'hydrolyse de la protéine Ara h2, qui conservent leur caractère immunogène. Le profil d'Ara h 2 dans l'extrait non dénaturant confirme aussi l'hypothèse émise précédemment, à savoir la déstructuration de l'organisation des protéines entre elles issu de l'homogénéisation haute pression, qui conduit à la libération d'Ara h 2 et à l'augmentation de son signal entre 24h et 48h. Le dosage d'Ara h 3 dans les extraits présente une diminution générale au cours de

l'avancement de la fermentation. Dans le surnageant, le signal est dès 24h bien diminué. Dans les extraits non dénaturant et dénaturant, la diminution est proportionnelle à la durée de la fermentation, et la valeur atteinte à 72h représente moins de 20% du signal initial.

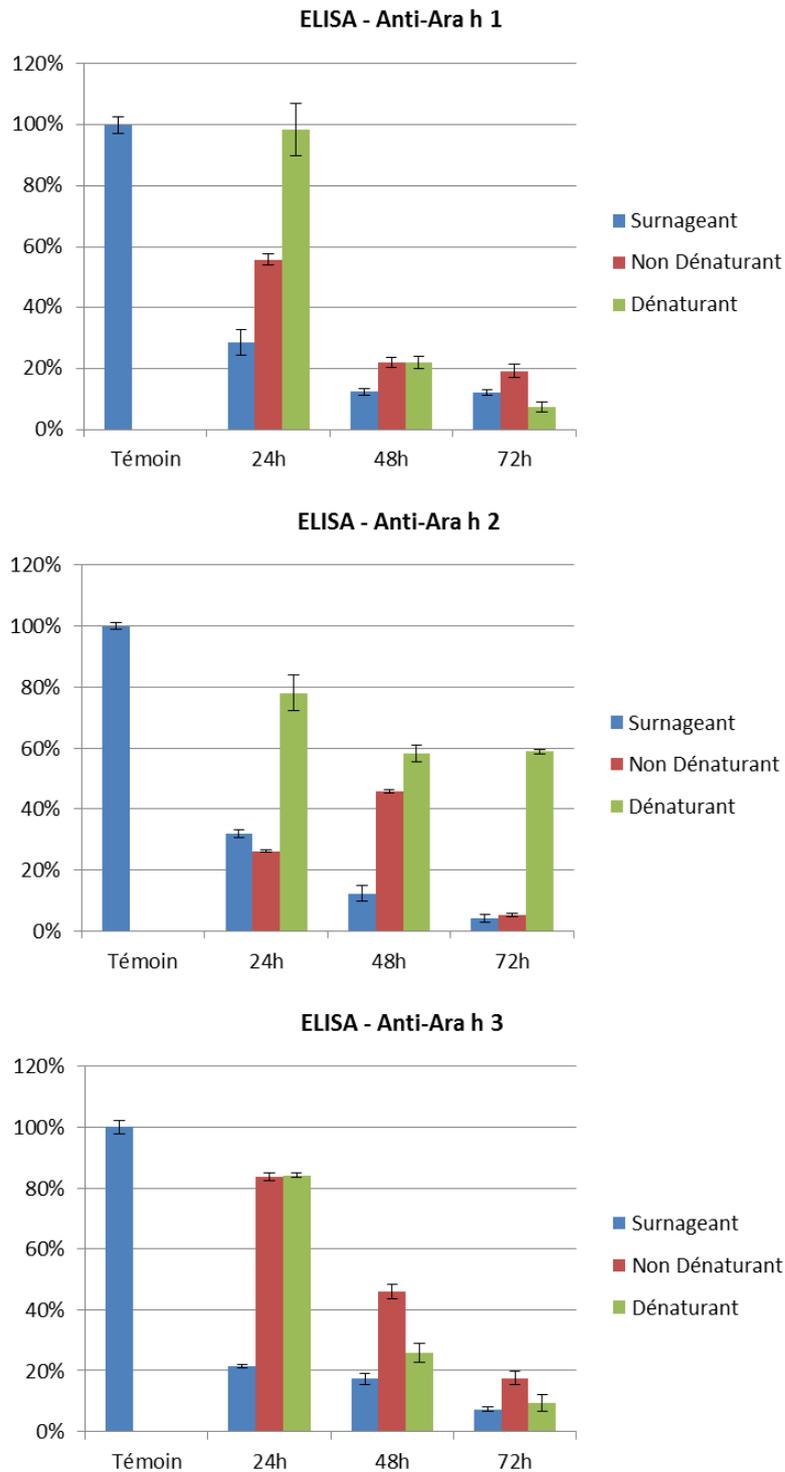


Figure 52 : Dosages ELISA des extraits de la fermentation liquide avec *Rhizopus oligosporus*

#### 4. Conclusion

La fermentation d'arachide homogénéisée en milieu liquide avec la souche de *Rhizopus oligosporus* montre une cinétique différente de la fermentation réalisée avec *Aspergillus oryzae*. Dès 48h, avec *R. oryzae*, les profils des trois extraits protéiques présentent une forte dégradation des protéines. Cependant, pour la même durée de fermentation de 72h, les valeurs quantitatives obtenues en dosage ELISA montrent que les protéines d'arachide présentent une plus grande résistance aux protéases de *R. oryzae* qu'à celle d'*A. oryzae*, surtout pour la protéine Ara h 2 qui conserve son pouvoir immunogène dans l'extrait dénaturant après la fermentation. Ainsi, le dosage immunoréactif obtenu pour les extraits après 72h de fermentation présente un signal moindre par rapport à un extrait non traité, mais reste cependant particulièrement élevé pour l'obtention d'une arachide exempte d'allergènes.

### **C. *Bacillus subtilis***

Une souche d'origine bactérienne a été utilisée pour procéder à la fermentation d'arachide en milieu liquide. Deux protocoles ont été mis en place pour parvenir à cette fermentation. Dans le premier protocole, nous avons inoculé directement les bactéries à l'homogénéisat d'arachide pendant des temps variables pour suivre la dégradation des protéines. Sa mise en œuvre est contraignante car les conditions stériles doivent être respectées afin d'éviter toute contamination, et implique que l'arachide doit être traitée thermiquement avant l'inoculation des souches de *Bacillus subtilis*. Ce traitement thermique préliminaire provoque la réaction de Maillard et provoque la formation d'agrégats, comme nous l'avons vu dans l'introduction. Dans le deuxième protocole, le surnageant de culture des bactéries contenant les protéases synthétisées est récupéré et additionné à l'arachide homogénéisée pendant 72h sans traitement thermique préalable.

#### **1. Fermentation avec les micro-organismes**

Le premier protocole mis en place a permis de suivre la dégradation des protéines allergènes par les protéases synthétisées par les bactéries lors de leur croissance dans un milieu composé d'arachide homogénéisée. Cette fermentation est conduite sur 72h avec des prélèvements toutes les 24h. Les échantillons sont extraits selon le protocole établi, et les protéines sont dosées avec la méthode du BCA.

##### *a. Gel SDS-PAGE*

Après extraction et dosage des protéines, les extraits sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12,5% à raison de 20µg de protéines/puits.

Le temps de fermentation semble avoir un impact sur la dégradation des protéines, sans pour autant que la dégradation soit proportionnelle à la durée de la fermentation. En effet, lors des étapes préparatoires pour la mise en place de la fermentation, nous avons dû procéder à un traitement thermique afin de stériliser l'homogénéisat d'arachide. Ce traitement thermique induit la formation d'agrégats qui ne sont pas solubilisés, même dans les conditions dénaturantes et réductrices, et se retrouvent dégradés au cours de l'avancement de la fermentation.

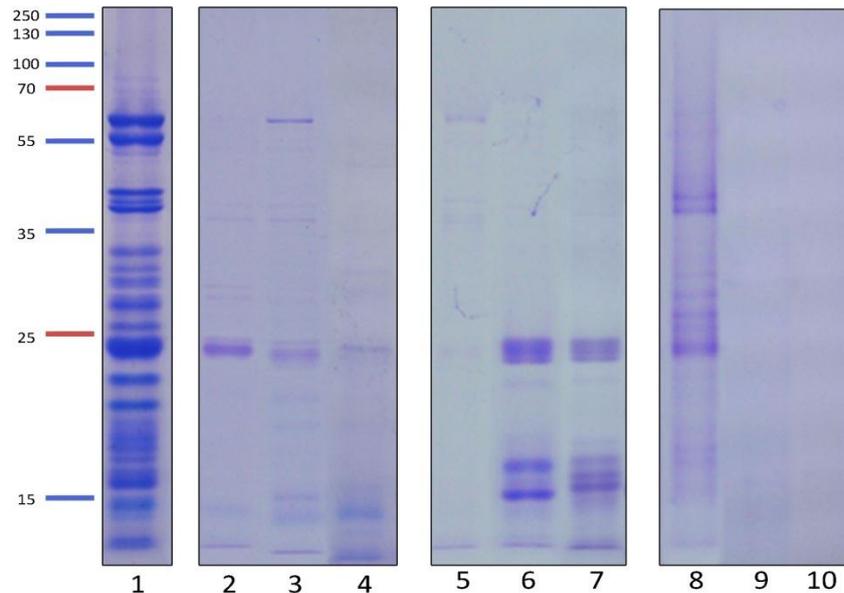


Figure 53 : Gel SDS-PAGE des extraits après fermentation par les bactéries *Bacillus subtilis*

1 : Extrait d'arachide non traitée

2, 3, 4 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (24h)

5, 6, 7 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (48h)

8, 9, 10 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (72h)

Au demeurant, la création de nouvelles liaisons interprotéiques covalentes lors de la formation de ces agrégats ne peut être déliée par le tampon utilisé, celui-ci n'ayant pas d'influence sur les liaisons covalentes.

Ainsi, au cours de l'avancement de la fermentation, les protéases de la souche de *Bacillus subtilis* hydrolysent les liaisons protéiques et conduisent à la libération des entités qui constituent les agrégats. C'est de cette manière que des protéines qui n'étaient pas présentes dans les extraits à 24h se retrouvent dans les extraits à des temps supérieurs. Par exemple, pour les surnageants de fermentation, à 24h (piste 2, Figure 53), presque aucune protéine n'est visible dans l'extrait, si ce n'est une bande à 23 kDa. Dans le temps de fermentation de 48h (piste 5) aucune protéine n'est présente alors que à 72h (piste 8), des bandes sont visibles, celles correspondant à la protéine Ara h 3 entre autres. On peut en déduire que lors du chauffage de l'homogénéisat d'arachide, les protéines se sont retrouvées emprisonnées dans les agrégats, et n'ont retrouvé leur solubilité qu'à partir du moment où les liaisons covalentes les unissant ont été rompues par les protéases. Il en va de même pour les extraits non dénaturants, où la faible présence de protéines au temps de fermentation de 24h (piste 3) se voit modifiée pour le temps de fermentation de 48h (piste 6). En effet, à 24h, la protéine Ara h 1 est faiblement visible, ainsi que la protéine à 23 kDa. A

48h, on remarque l'intensification de la bande à 23 kDa et l'apparition du doublet correspondant à Ara h 2 à 17 et 20 kDa. A 72h, plus aucune protéine n'est visible dans cet extrait. On peut ainsi en déduire qu'entre 24h et 48h, les protéases de *Bacillus subtilis* ont permis de libérer les protéines d'Ara h 2 empaquetées dans les agrégats, provoquant leur solubilisation puis leur dégradation. Les extraits dénaturants montrent des profils très similaires aux extraits non dénaturants, avec l'absence de protéines dans l'extrait à 24h (piste 4) et 72h (piste 10), alors que des protéines sont nettement visibles dans l'extrait à 48h (piste 7), à savoir majoritairement la protéine à 23 kDa et Ara h 2.

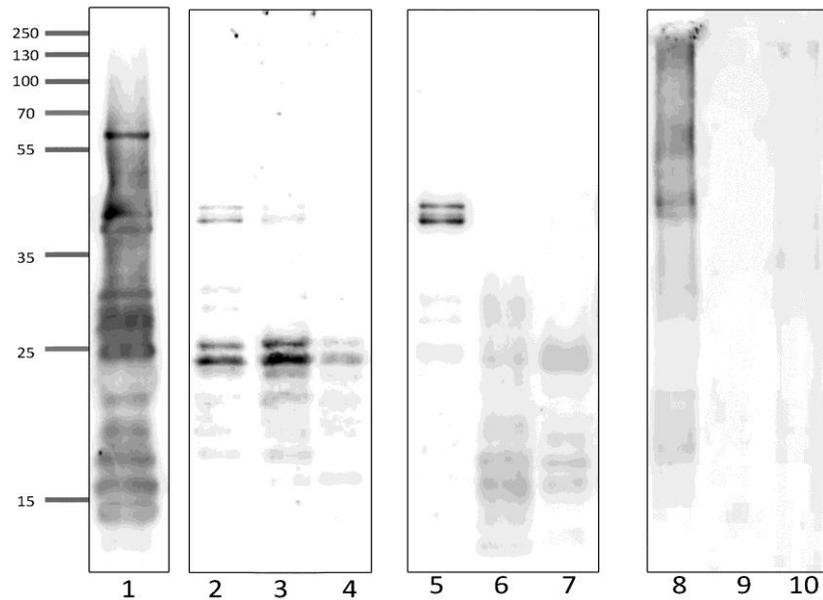
Finalement, ces résultats amènent à soulever la question de savoir si toutes les protéines ont pu être libérées de ces formations agglomérées de protéines, ou si seulement une partie d'entre elles a été dissociée et solubilisée dans le tampon non dénaturant. La séparation des protéines sur gel SDS-PAGE ne permet pas de répondre à cette question, et seule la reconnaissance des protéines par les anticorps de lapin *via* le dosage ELISA pourra montrer la présence de groupements protéiques immunoréactifs dans les extraits.

Afin d'avoir une réponse sur l'immunoréactivité des protéines solubilisées par les différents tampons d'extraction, un Western Blot est réalisés sur les extraits séparés en gel SDS-PAGE présenté dans la Figure 53.

#### *b. Western Blot*

La reconnaissance des protéines extraites après la fermentation par *Bacillus subtilis* par les anticorps de lapin dirigés contre les allergènes majeurs de l'arachide permet d'avoir une première approche de l'efficacité de la dégradation des protéines sur leur immunoréactivité.

Dans les extraits surnageant et non dénaturant des fermentations à 24h (pistes 2 et 3, Figure 54), la bande à 23 kDa apparait immunoréactive sous la forme d'un doublet. On retrouve la bande supérieure dans l'extrait non traité. Ce doublet pourrait correspondre à la sous unité basique d'Ara h 3. On retrouve par ailleurs un signal pour la sous unité acide d'Ara h 3 dans les deux extraits, ce qui pourrait confirmer la présence de la protéine Ara h 3 dans l'extrait dès 24h de fermentation.



**Figure 54 : Western Blot des extraits après fermentation par les bactéries *Bacillus subtilis***

1 : Extrait d'arachide non traitée

2, 3, 4 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (24h)

5, 6, 7 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (48h)

8, 9, 10 : Surnageant, extrait non dénaturant et dénaturant de la fermentation (72h)

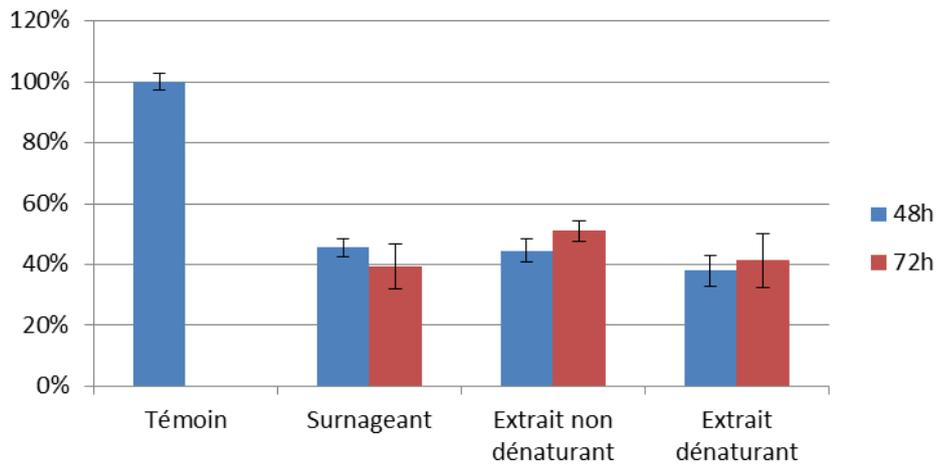
A 48h, le surnageant (piste 5) ne contient plus le doublet correspondant à la sous unité basique d'Ara h 3, et l'extrait non dénaturant (piste 6) montre de nombreuses bandes aux bas poids moléculaires, dont le doublet correspondant à la sous unité d'Ara h 3 ainsi que le doublet correspondant à Ara h2, ce qui est en adéquation avec ce qui était obtenu sur le gel SDS-PAGE. L'extrait dénaturant (piste 7), montre aussi la présence de ces deux doublets. Dans les extraits réalisés à 72h, seules les protéines du surnageant présente une immunoréactivité, avec un signal diffus pour la sous unité acide d'Ara h 3.

Ces résultats obtenus en Western Blot montrent que les protéines extraites à différents temps de fermentation conservent leur immunoréactivité vis-à-vis des anticorps de lapin, et que la dégradation n'est pas suffisante à 72h pour que les différents extraits perdent leur immunoréactivité. Le dosage ELISA permettra de confirmer cette hypothèse, et de quantifier le signal résiduel des protéines après la fermentation avec *Bacillus subtilis*.

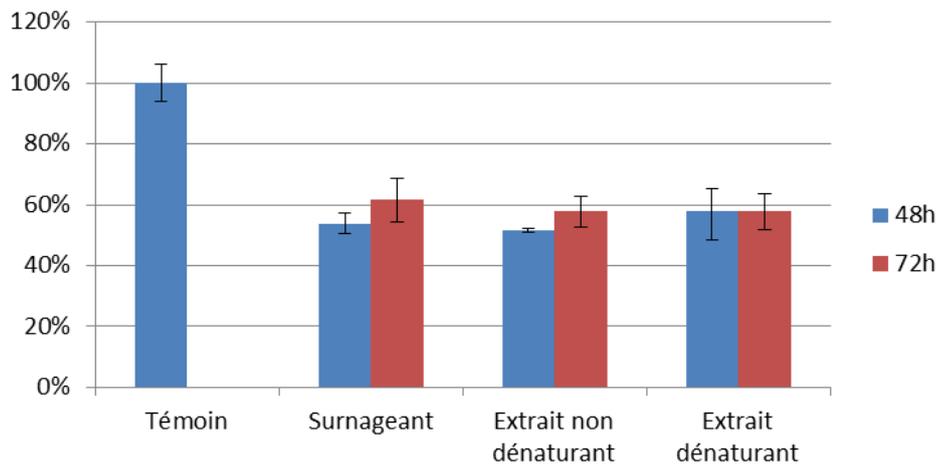
### c. ELISA

Les dosages ELISA sont réalisés sur les extraits qui semblent présenter le moins de réactivité vis-à-vis des anticorps de lapin dirigés contre les allergènes majeurs de l'arachide. Ainsi, seuls les extraits réalisés à 48h et 72h sont dosés (Figure 55).

### ELISA - Anti Ara h 1



### ELISA - Anti Ara h 2



### ELISA - Anti Ara h 3

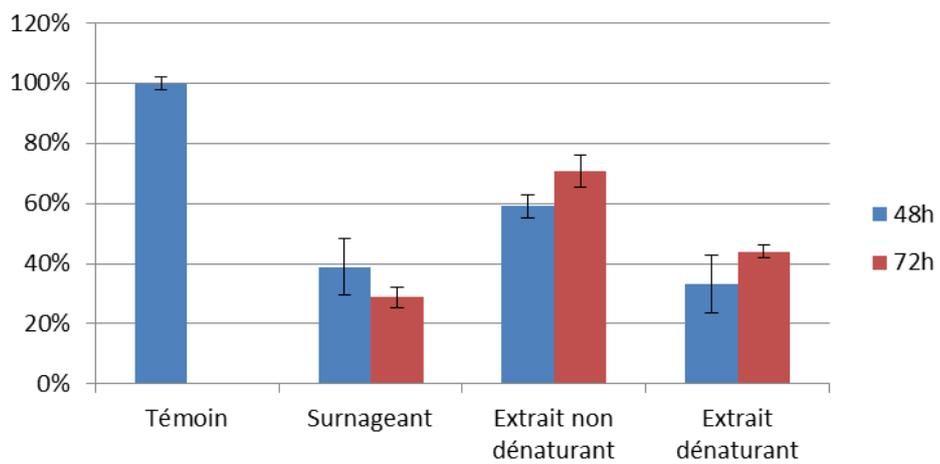


Figure 55 : Dosages ELISA des extraits de la fermentation liquide avec *Bacillus subtilis*

Les résultats obtenus pour la quantification de la protéine Ara h 1 montre que quel que soit l'extrait et la durée de la fermentation, le signal ne descend pas en dessous des 40% du signal témoin obtenu pour l'arachide non traitée, alors que le Western Blot ne montrait pas de réactivité pour la bande à 63 kDa. Pour le signal correspondant à Ara h 3, les résultats sont similaires, puisque ni la durée, ni le caractère de l'extrait n'influe sur la quantité de protéine allergène quantifiée. En ce qui concerne la variation d'Ara h 2 au cours du temps de fermentation, on s'aperçoit que globalement, le signal est sensiblement plus élevé pour la fermentation à 72h qu'à 48h. Tous ces résultats concordent à dire que les protéines séparées sur gel SDS-PAGE ne sont pas représentatives de la composition réelle des extraits réalisés. En effet, pour le temps de fermentation de 72h, dans les extraits non dénaturant et dénaturant, on pourrait s'attendre à une absence de signal en dosage ELISA alors que le signal est le même que pour les extraits réalisés à 48h et ne traduit donc pas de diminution. L'explication de la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires au cours de la préparation par traitement thermique de l'arachide homogénéisée pour la stérilisation peut être à l'origine de ce masquage des allergènes extraits, puisque les agrégats de haut poids moléculaires ne peuvent pas être séparés en gel SDS-PAGE avec une concentration de 12,5%. Ainsi, de nombreux allergènes se retrouvent absents dans la séparation électrophorétique tout en gardant leur structure qui peut être reconnue par les anticorps de lapin.

Lors de l'avancée de la fermentation, la dégradation des allergènes isolés est initiée par les protéases secrétées par *Bacillus subtilis*. En parallèle, les agrégats subissent aussi des clivages protéolytiques qui peuvent dissocier les structures polymériques et conduire à la libération des allergènes au cours de la fermentation. Ces processus en parallèle peuvent être à l'origine de la stagnation du signal quantifié en ELISA dans les différents extraits au cours de la fermentation. Pour Ara h 2, on assiste même à une inversion de la diminution théorique du signal au cours de la fermentation qui pourrait être justifiée par la nature des protéases impliquées. En effet, il est possible que la dégradation des structures polymériques présente une cinétique supérieure à la dégradation même des allergènes isolés, ce qui justifierait la présence d'un signal supérieur dans les extraits à 72h comparés à ceux réalisés à 48h de fermentation.

#### d. Conclusion

En conclusion de cet essai mené sur de l'arachide crue homogénéisée traitée thermiquement pour stérilisation, il est montré ici que ce traitement thermique induit de profondes modifications dans les profils électrophorétiques et dans l'organisation des protéines présentes dans les extraits. Les tests en gel SDS-PAGE et Western Blot sont insuffisants pour statuer sur l'immunoréactivité résiduelle des extraits réalisés. De plus, nous avons vu dans l'étude de Vissers, Y. M. et al. (2011) que le chauffage induisait par la formation d'agrégats une diminution du signal en dosage EAST, alors qu'il augmentait la dégranulation des basophiles. Ainsi, le dosage ELISA que nous avons réalisé ici est peut être faussé par la présence de ces agrégats et ne traduit pas forcément une diminution de l'allergénicité de l'arachide. En outre, la formation d'agrégats entrave l'hydrolyse des protéines allergènes de l'arachide ce qui conduit à la forte présence de protéines non dégradées au bout des 72h de fermentation. De plus, lors de la fermentation de la matrice arachide avec la bactérie *Bacillus subtilis* se développent de nombreux composés aromatiques malodorants qui sont très peu tolérables pour notre odorat occidental. En effet, cette bactérie est souvent à l'origine des contaminations d'aliments et conduit à une intolérabilité gustative, sans être toutefois nocive pour l'humain.

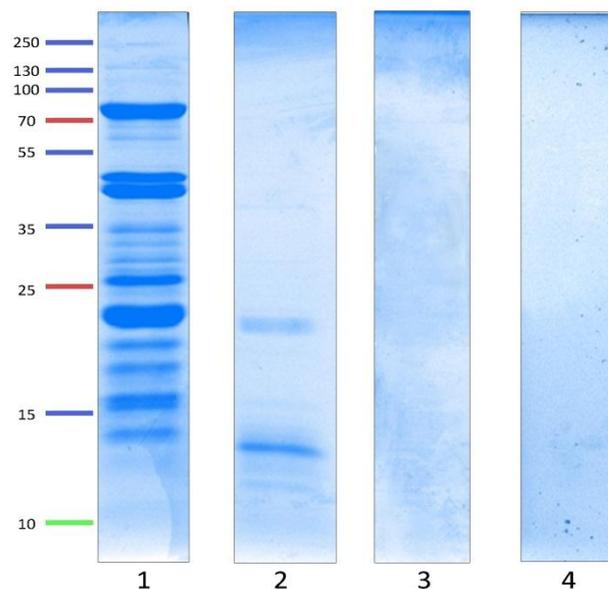
## 2. Dégradation par les protéases

Le second protocole se réfère au brevet déposé par Ahmedna, M. et al. (2010) qui consiste en l'utilisation de protéases pour parvenir à la dégradation des allergènes de l'arachide et conduire à son hypoallergénicité. Ce protocole évite la stérilisation de l'arachide homogénéisée puisque les bactéries sont cultivées en amont dans le but de produire des protéases. Ainsi, l'arachide est mise en contact d'un milieu contenant les protéases en s'affranchissant de la présence de bactéries. Cette mise en contact a été réalisée avec un ratio 1 :10 (v arachide/v protéases) après une durée de production de protéases de 4 heures dans un milieu de culture CASO. La mise en contact du surnageant de culture et de l'arachide homogénéisée se déroule directement après la production de protéases sans étape de congélation pour éviter la perte d'activité des enzymes protéolytiques. Cette mise en contact est réalisée sur 48h à 37°C sans agitation.

*a. Gel SDS-PAGE*

Après mise en contact du surnageant de culture et de l'arachide homogénéisée, les extraits protéiques sont réalisés, dosés, et séparés sur gel SDS-PAGE 12,5% à raison de 20 µg/puits. Les caractéristiques du protocole ont été établies selon différents essais qui ont montré que la production de protéases était suffisante au bout de 4h de culture de *Bacillus subtilis*. Ces protéases ont été mises en contact avec l'arachide homogénéisée selon plusieurs ratios, et le ratio 1 :10 a montré les meilleurs résultats. De la même manière, l'étude du temps de contact entre les protéases et l'arachide homogénéisée a montré que le temps de 48h était suffisant pour avoir une dégradation poussée. Ainsi, les résultats présentés ici ne montrent que les conditions les plus favorables à la dégradation des protéines de l'arachide.

Directement après la mise en contact de 48h entre l'arachide homogénéisée et les protéases, les protéines sont extraites, dosées par la méthode du BCA et séparées en gels SDS-PAGE à raison de 20µg de protéines déposées par puits.



**Figure 56 : Gel SDS-PAGE des protéines d'arachide après dégradation par les protéases de *Bacillus sub.***

1 : Extrait d'arachide non traité

2, 3, 4 : Surnageant, Extrait non dénaturant, Extrait dénaturant de la dégradation à un ratio 1 :10 pendant 48h

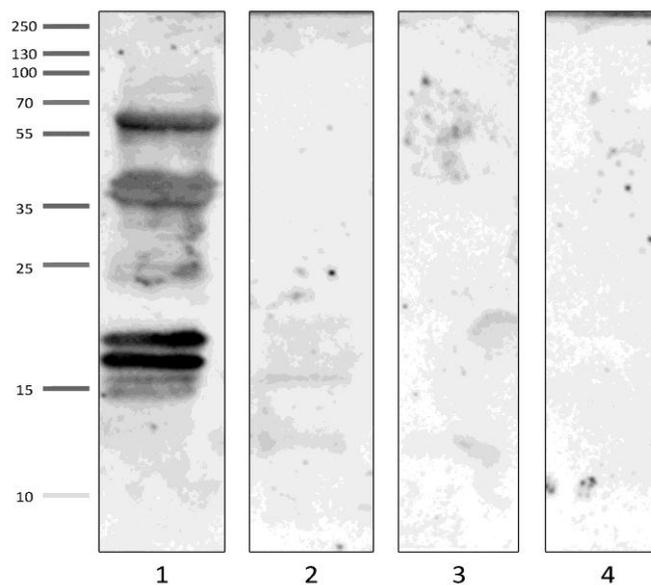
Le gel SDS-PAGE montre des profils différents selon le caractère de l'extrait réalisé. Dans le surnageant (piste 2, Figure 56), deux bandes majeures sont visibles : une bande à environ 20 kDa et une bande à 13 kDa. Ces protéines peuvent correspondre à des protéases de *Bacillus subtilis* qui n'ont pas été dégradées, ou bien à des polypeptides issus de la

dégradation des protéines de l'arachide. Dans les pistes correspondant aux extraits non dénaturant et dénaturant, aucune piste n'est visible, ce qui laisse penser que les protéines solubles dans ces extraits ont été totalement dégradées en polypeptides de tailles réduites, puisque même au niveau des bas poids moléculaires, aucune protéine n'est visible.

Ces résultats montrent que la dégradation des allergènes par les protéases de *Bacillus subtilis* paraît totale dans les conditions mises en œuvre. Cependant, les polypeptides résiduels obtenus ne sont pas tous visibles dans le gel qui n'a pas une résolution suffisante pour voir les groupements protéiques inférieurs à 10 kDa, mais ce premier résultat donne une piste sur la bonne dégradation des protéines.

### b. Western Blot

Les résultats apportés par l'analyse en Western Blot des protéines d'arachide dégradées par les protéases de *Bacillus subtilis* marquées avec les anticorps de lapin confirment les résultats obtenus en analyse SDS-PAGE.



**Figure 57 : Western Blot des protéines d'arachide après dégradation par les protéases de *Bacillus sub.***

1 : Extrait d'arachide non traité

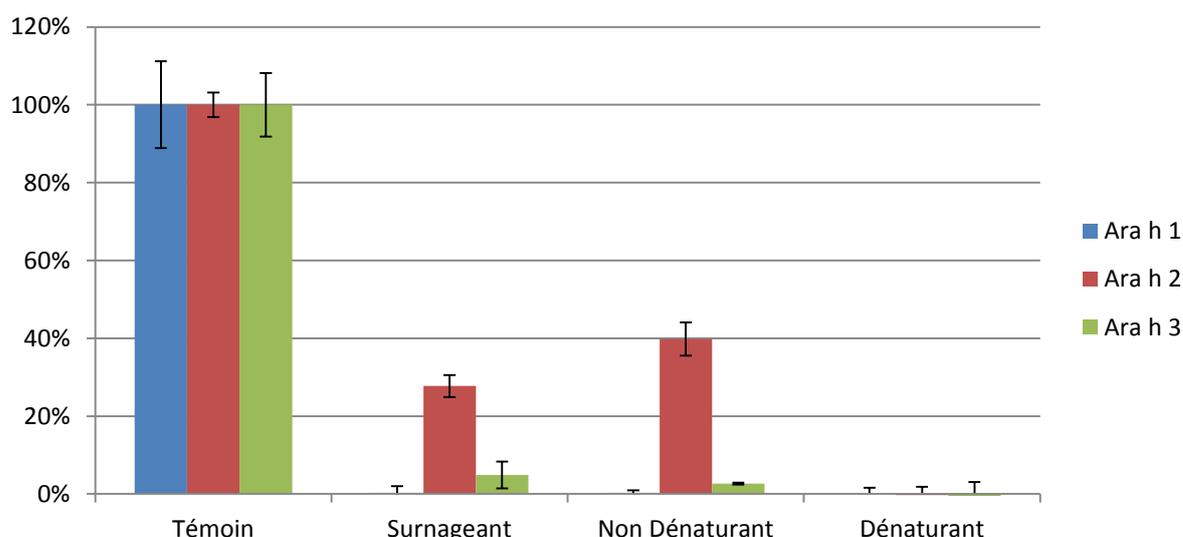
2, 3, 4 : Surnageant, Extrait non dénaturant, Extrait dénaturant de la dégradation à un ratio 1 :10 pendant 48h

La piste 2 (Figure 57) correspondant au surnageant laisse voir que la protéine visible sur le gel SDS-PAGE au poids moléculaire de 20 kDa ne semble pas être reconnue par les anticorps de lapin, ce qui prouve qu'il s'agit bien d'une protéine synthétisée par *Bacillus subtilis* lors de sa culture dans le milieu CASO, et non pas un polypeptide de l'arachide. En ce

qui concerne le polypeptide de 13 kDa visible dans le gel SDS-PAGE (Figure 56), celui-ci est légèrement visible dans la révélation en Western Blot. Ce polypeptide pourrait donc correspondre à un fragment polypeptidique issu de la dégradation d'un des allergènes majeurs de l'arachide lors de la protéolyse. Dans les deux autres extraits (piste 3 et 4, Figure 57), aucune bande n'est visible, ce qui confirme le résultat obtenu en SDS-PAGE sur la très bonne dégradation des protéines solubles dans ces conditions. Cependant, un dosage ELISA doit être effectué afin de quantifier le signal des protéines qui ne sont pas visibles sur les gels et membranes mais qui peuvent être présentes sous la forme de petits polypeptides de poids moléculaires inférieurs à la gamme de résolution des gels en polyacrylamide.

### c. Dosage ELISA

Le dosage ELISA est réalisé sur les différents extraits obtenus après la dégradation de l'arachide grâce à la reconnaissance par les trois anticorps de lapin dirigés spécifiquement contre les allergènes majeurs de l'arachide (Figure 58.)



**Figure 58 : Dosage ELISA des extraits obtenus après dégradation de l'arachide par les protéases de *Bacillus subtilis*.**

Les résultats présentés ici montrent une dégradation totale de la protéine Ara h 1 dans les trois types d'extraits. Dans l'extrait dénaturant, on ne retrouve d'ailleurs aucun des trois allergènes dosés. En ce qui concerne Ara h 3, il est présent très faiblement (4,87% du signal témoin) dans le surnageant et dans l'extrait non dénaturant (2,65%). Par contre, la quantification d'Ara h 2 montre une forte présence dans le surnageant et dans l'extrait non dénaturant. Il est possible que les peptides issus de la dégradation de l'allergène Ara h 2

gardent leur immunogénicité vis-à-vis des anticorps de lapin, sans pour autant être présent dans les séparations électrophorétiques à cause de leur faible poids moléculaire.

*d. Conclusion*

La dégradation par les protéases conduit à de bien meilleurs résultats que la mise en contact des bactéries avec l'arachide homogénéisée. De plus, l'absence de bactéries dans le milieu contenant les protéases permet de s'affranchir du traitement thermique pour la stérilisation, ce qui permet d'éviter les réactions de Maillard et la formation d'agrégats protéiques. Ainsi, les protéines d'arachide sont solubles et facilement hydrolysables par les protéases de *Bacillus subtilis*. Cependant, même si la dégradation semble totale en analyse électrophorétique, le dosage ELISA montre que la protéine Ara h 2 reste fortement reconnue par les anticorps de lapin. En ce qui concerne les deux autres allergènes majeurs, Ara h 1 et Ara h 3, ceux-ci sont totalement dégradés au bout des 48h de mise en contact des protéases avec l'arachide homogénéisée. Ces résultats montrent que le brevet déposé par Ahmedna, M. et al. (2010) conduit bel et bien à une dégradation protéique des allergènes, mais aussi que les seules protéases du microorganisme *Bacillus subtilis* ne sont pas suffisantes pour la dégradation de l'ensemble des allergènes de l'arachide. La dégradation par les protéases sans la présence des bactéries ne conduit pas au développement d'une saveur inacceptable, ce qui est un point largement positif pour une exploitation dans un contexte de production d'aliment pour la consommation humaine.



## **Conclusion et Perspectives**



L'homogénéisation haute pression comme étape préparatoire à la fermentation de l'arachide par différents micro-organismes a montré son impact sur la déstructuration de la matrice, et favorise ainsi la solubilisation des protéines. D'un point de vue industriel, ce procédé technologique présente l'avantage de pouvoir être facilement mis en œuvre par un appareillage unique, ne présente pas un coût excessif d'installation et de maintenance et permet un traitement de volumes importants en un temps réduit (jusqu'à 55 000 litres/heures).

D'un point de vue physique, le passage par la tête d'homogénéisation d'une suspension d'arachide dans un fluide vecteur limite l'échauffement du fluide, et n'accélère ainsi pas la cinétique de la réaction de Maillard qui, nous l'avons constaté, provoque l'agrégation des protéines et limite leur susceptibilité à la protéolyse. C'est pourquoi la fermentation sur substrat solide a montré ses limites dans la protéolyse avec l'utilisation d'une souche de micro-organisme (*Aspergillus oryzae*), principalement dus au traitement thermique initial et à la structuration des protéines au sein des corps protéiques. En utilisant la même matrice et la même souche après le passage dans l'homogénéisateur haute pression, la fermentation en milieu liquide a montré une forte dégradation des protéines, ce qui confirme l'utilité de ce procédé préliminaire pour favoriser l'augmentation de la susceptibilité des protéines d'arachide à la protéolyse.

La comparaison des fermentations réalisées en milieu liquide après homogénéisation de l'arachide avec les souches de *Rhizopus oligosporus* et *Aspergillus oryzae* apporte différents éléments. La cinétique de dégradation de l'arachide par les protéases synthétisées est plus rapide pour la souche *Rhizopus oligosporus*, où dès 48h les protéines contenues dans les 3 extraits (surnageant, non dénaturant et dénaturant) paraissent dégradées. De plus, leurs profils électrophorétiques ne varient presque pas pour les mêmes extraits réalisés à 72h. Toutefois, le dosage ELISA montre que la diminution de la réponse immunologique est limitée, et la protéine Ara h 2 présente une importante résistance à la protéolyse dans les extraits dénaturants. En ce qui concerne la dégradation des protéines par la souche *Aspergillus oryzae*, c'est au bout de 72h que la dégradation des protéines solubles dans les trois extraits est la plus importante, estimée qualitativement par gel SDS-PAGE et Western Blot, et confirmée quantitativement par le dosage ELISA avec les anticorps de lapin. En effet, au bout de 72h de fermentation, les signaux pour les trois protéines allergènes majeurs de

l'arachide sont très réduits, et Ara h 2 ne présente pas de résistance à la protéolyse. En conclusion, la dégradation des protéines par *Rhizopus oligosporus* montre une cinétique supérieure mais une dégradation partielle, tandis qu'*Aspergillus oryzae* montre une cinétique plus lente pour une dégradation totale.

Différentes pistes peuvent ainsi être envisagées pour parvenir plus rapidement à une dégradation des allergènes en utilisant les propriétés des deux souches. Par exemple, il pourrait être possible d'ajouter des nutriments spécifiques à l'arachide homogénéisée pour favoriser le développement d'*Aspergillus oryzae* et ainsi accélérer la production de protéases, afin de parvenir à réduire le temps de fermentation nécessaire à la dégradation des allergènes. Une autre solution pourrait être de procéder à la fermentation en deux étapes, avec une première inoculation de *Rhizopus oligosporus* pour un court temps de fermentation afin de dégrader rapidement et partiellement les allergènes, puis d'inoculer ensuite une souche d'*Aspergillus oryzae* dans le but de poursuivre la dégradation afin d'arriver à un aliment exempt d'allergènes.

La dégradation des protéines de l'arachide par la bactérie *Bacillus subtilis* a montré différents résultats selon le protocole utilisé. Dans un premier temps, lors de l'inoculation directe de bactéries à un milieu composé d'arachide homogénéisée et stérilisée par autoclave, après 72h de fermentation, l'analyse des différents extraits réalisés montrent une faible dégradation des protéines et un fort signal en dosage ELISA. Le chauffage préparatoire a conduit à la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires qui ne sont pas visibles dans les séparations électrophorétiques, mais toutefois responsables du fort signal obtenu en dosage ELISA. Afin de s'affranchir de cette étape qui freine la dégradation des protéases, nous avons mis en place un deuxième protocole qui ne requière pas de stérilisation préalable, et met en jeu les protéases de *Bacillus subtilis* uniquement. Ainsi, nous avons pu mettre en avant la dégradabilité des allergènes de l'arachide par les protéases synthétisées par *Bacillus subtilis*, avec une très bonne dégradation pour les allergènes Ara h 1 et Ara h 3, tandis qu'Ara h 2 montre une certaine résistance à l'hydrolyse. Là aussi, ces résultats sont encourageants et ouvrent d'autres possibilités pour développer des nouveaux protocoles de fermentation.

Par exemple, une dégradation préliminaire des allergènes de l'arachide par l'ajout de protéases produites par *Bacillus subtilis* à de l'arachide homogénéisée, suivi d'une

fermentation avec *Aspergillus oryzae* pendant un temps déterminé pourrait conduire à une arachide qui ne présente plus aucun des trois allergènes majeurs tout en réduisant le temps de fermentation nécessaire avec la souche *Aspergillus oryzae* seule.

Le dosage ELISA des protéines allergènes par les anticorps de lapin permet d'avoir une approche quantitative de la dégradation des allergènes, mais ne permet pas d'avoir une réelle quantification sur la perte de l'allergénicité effective des protéines de l'arachide. En effet, les anticorps de lapin sont dirigés contre des zones spécifiques réparties à la surface de la protéine, qui ne correspondent pas obligatoirement aux zones de reconnaissances épitopiques des IgE humaines d'un patient allergique. Toutefois, une étude de Mouécoucou, J. et al. (2004) a montré que la perte de structure des protéines allergènes dû à leur dégradation contribue à la diminution de la reconnaissance par les IgE de patients ainsi que par les IgG de lapin dirigés contre les protéines de l'arachide, ce qui permet de faire le parallèle entre la dégradation et la perte d'allergénicité. De plus, une étude sur la taille des polypeptides après hydrolyse d'un lait infantile dans le but de le rendre hypoallergénique a montré que pour une taille inférieure à 5 kDa, aucune réponse immunogène n'était obtenue (van Beresteijn, E. C. et al. 1995). Ainsi, même si la quantification de la dégradabilité des allergènes par un dosage ELISA avec les anticorps de lapin n'est pas suffisante, cela permet, par extrapolation, d'obtenir des informations sur la perte d'allergénicité de l'arachide.

Un dosage ELISA des protéines dégradées par des sérums de patients allergiques pourrait confirmer ces résultats, mais cette expérience nécessite un gros volume de sérums que nous n'avons pas à disposition lors de nos analyses. Nous avons pensé alors à mettre en place une quantification *in vitro* de la dégranulation de basophiles de rats par nos extraits fermentés. En effet, ce protocole est moins gourmand en sérums de patients, et permet de simuler la dégranulation des mastocytes et basophiles lors de la réaction allergique chez un patient sensibilisé. Ce protocole est aujourd'hui en cours de développement dans notre laboratoire, mais nous sommes confrontés à des difficultés de mise au point et de reproductibilité des résultats. Une fois que les tests de dégranulation seront optimisés, et s'ils montrent une diminution effective de l'allergénicité de l'arachide par la fermentation, nous pourrions alors procéder à des tests cliniques sur patients allergiques afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

La problématique de l'acceptabilité par les consommateurs ainsi que la commercialisation de l'arachide traitée est importante à considérer d'un point de vue industriel. En effet, il faut que le produit final soit proche des saveurs, saveurs et consistance de l'arachide afin de pouvoir le vendre en tant que produit alimentaire. A ce jour et de par les expériences mises en œuvre, le produit obtenu voit ses caractéristiques gustatives très modifiées. En effet, la fermentation n'est pas un procédé neutre, et provoque souvent une amertume et acidification. Ces deux paramètres sont relativement simples à corriger par des auxiliaires technologiques ou des additifs alimentaires. Des essais de dessiccation sur l'arachide homogénéisée et fermentée ont été réalisés et ont permis d'avoir une première approche sur la qualité gustative du produit obtenu : le chauffage de l'arachide homogénéisée et fermentée par dessiccation ne permet pas de retrouver la saveur de l'arachide grillée, et un travail d'aromatisation est nécessaire pour parvenir à un produit acceptable. La texture du produit obtenu en fin de fermentation peut ne pas présenter un obstacle pour le produit final, en fonction du produit que l'on cherche à commercialiser. Si, par exemple, l'idée de proposer un beurre d'arachide hypoallergénique comme produit après la fermentation est envisagé, un procédé de séchage partiel suivi d'une aromatisation peut suffire à l'obtention du produit final. Il reste donc un important travail à réaliser sur l'arachide fermentée avant de pouvoir parvenir à sa commercialisation.

# **Bibliographie**



- Ahmedna, M.; Yu, J., et al.** (2008). Process for Preparing Hypoallergenic and Non-Allergenic Peanut (*Arachis Hypogaea*) Utilizing an Endopeptidase. S. M. Leatherwood. US. **US2008/0305211A1**.
- Ahmedna, M.; Yu, J., et al.** (2010). Process for Preparing Hypoallergenic and/or Non-Allergenic Peanut Butter and Associated Products. S. M. Leatherwood. US. **US2010/0080870A1**.
- Aldon, D.** (2012) "Biologie Du Développement Des Plantes" Université Paul Sabatier M. A. b. e. b. d. systèmes
- Asero, R.; Mistrello, G., et al.** (2000). "Lipid Transfer Protein: A Pan-Allergen in Plant-Derived Foods That Is Highly Resistant to Pepsin Digestion." International Archives of Allergy and Immunology **122**(1): 20-32.
- Bannon, G.** (2004). "What Makes a Food Protein an Allergen?" Current Allergy and Asthma Reports **4**(1): 43-46.
- Barkholt, V.; Jergensen, P. B., et al.** (1998). "Protein Modification by Fermentation: Effect of Fermentation on the Potential Allergenicity of Pea." Allergy **53**: 106-108.
- Barnett, J.; Leftwich, J., et al.** (2011). "How Do Peanut and Nut-Allergic Consumers Use Information on the Packaging to Avoid Allergens?" Allergy **66**(7): 969-978.
- Barre, A.; Borges, J. P., et al.** (2005). "Homology Modelling of the Major Peanut Allergen Ara H 2 and Surface Mapping of Ige-Binding Epitopes." Immunology Letters **100**(2): 153-158.
- Barre, A.; Borges, J. P., et al.** (2005). "Molecular Modelling of the Major Peanut Allergen Ara H 1 and Other Homotrimeric Allergens of the Cupin Superfamily: A Structural Basis for Their Ige-Binding Cross-Reactivity." Biochimie **87**(6): 499-506.
- Ben-Hdech, E.-H.** (1993). "Texturation D'une Farine De Pois Par Cuisson-Extrusion : Caractérisation Microstructurale, Ultrastructurale Et Physico-Chimique", Faculté des Sciences et Techniques de Nantes.
- Beuchat, L. R.** (1976). "Fungal Fermentation of Peanut Press Cake." Economic Botany **30**(3): 227-234.
- Beuchat, L. R.** (2001). Traditional Fermented Foods. Food Microbiology. T. J. M. L.R.B Michael P. Doyle. Washington DC, ASM Press, American Society of Microbiology: 701-719.
- Beyer, K.; Morrow, E., et al.** (2001). "Effects of Cooking Methods on Peanut Allergenicity." Journal of Allergy and Clinical Immunology **107**(6): 1077-1081.
- Blanc, F.; Adel-Patient, K., et al.** (2009). "Capacity of Purified Peanut Allergens to Induce Degranulation in a Functional in Vitro Assay: Ara H 2 and Ara H 6 Are the Most Efficient Elicitors." Clinical & Experimental Allergy **39**(8): 1277-1285.
- Blank, U.; Ra, C., et al.** (1989). "Complete Structure and Expression in Transfected Cells of High Affinity Ige Receptor." Nature **337**(6203): 187-189.
- Bock, S. A.; Muñoz-Furlong, A., et al.** (2007). "Further Fatalities Caused by Anaphylactic Reactions to Food, 2001-2006." Journal of Allergy and Clinical Immunology **119**(4): 1016-1018.
- Bouvier, M.; Bensaid, B., et al.** (2009). "Particularités De L'allergie À L'arachide Chez L'adulte." Revue Française d'Allergologie **49**(3): 227-229.
- Bown, D.; Ellis, T. H., et al.** (1988). "The Sequence of a Gene Encoding Convicilin from Pea (*Pisum Sativum* L.) Shows That Convicilin Differs from Vicilin by an Insertion near the N-Terminus." Biochemical Journal **251**(3): 717-726.
- Branger, A.** (2009). "Fabrication De Produits Alimentaires Par Fermentation : Les Ferments." Techniques de l'ingénieur **F3500**.

- Breiteneder, H. and Mills, E. N. C.** (2005). "Molecular Properties of Food Allergens." Journal of Allergy and Clinical Immunology **115**(1): 14-23.
- Burks, A. W.; Cockrell, G., et al.** (1994). "Identification of Peanut Agglutinin and Soybean Trypsin Inhibitors as Minor Legume Allergens." International Archives of Allergy and Immunology **105**(2): 143-149.
- Burks, A. W.; Shin, D., et al.** (1997). "Mapping and Mutational Analysis of the Ige-Binding Epitopes on Ara H 1, a Legume Vicilin Protein and a Major Allergen in Peanut Hypersensitivity." European Journal of Biochemistry **245**(2): 334-339.
- Burks, A. W.; Williams, L. W., et al.** (1992). "Identification and Characterization of a Second Major Peanut Allergen, Ara H li, with Use of the Sera of Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenge." Journal of Allergy and Clinical Immunology **90**(6 Pt 1): 962-969.
- Burks, A. W.; Williams, L. W., et al.** (1991). "Identification of a Major Peanut Allergen, Ara H I, in Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenges." Journal of Allergy and Clinical Immunology **88**(2): 172-179.
- Burks, A. W.; Williams, L. W., et al.** (1992). "Allergenicity of Peanut and Soybean Extracts Altered by Chemical or Thermal Denaturation in Patients with Atopic Dermatitis and Positive Food Challenges." Journal of Allergy and Clinical Immunology **90**(6 Pt 1): 889-897.
- Cabanillas, B.; Pedrosa, M. M., et al.** (2012). "Influence of Enzymatic Hydrolysis on the Allergenicity of Roasted Peanut Protein Extract." International Archives of Allergy and Immunology **157**: 41-50.
- Cabanos, C.; Katayama, H., et al.** (2011). "Expression and Purification of Peanut Oleosins in Insect Cells." Protein Journal **30**(7): 457-463.
- Chambers, S. J.; Wickham, M. S., et al.** (2004). "Rapid in Vivo Transport of Proteins from Digested Allergen across Pre-Sensitized Gut." Biochemical and Biophysical Research Communications **325**(4): 1258-1263.
- Chatel, J. M.; Bernard, H., et al.** (2003). "Isolation and Characterization of Two Complete Ara H 2 Isoforms Cdna." International Archives of Allergy and Immunology **131**(1): 14-18.
- Cherry, J. P.; Beuchat, L., et al.** (1976). "Protein and Amino Acid Changes in Peanut (Arachie Hypogaea L.) Seeds Infected with Aspergillus Oryzae." Journal of Agricultural and Food Chemistry **24**(1): 79-85.
- Chu, Y.; Faustini, P., et al.** (2008). "Reduction of Ige Binding and Nonpromotion of Aspergillus Flavus Fungal Growth by Simultaneously Silencing Ara H 2 and Ara H 6 in Peanut." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(23): 11225-11233.
- Chung, S.-Y.; Maleki, S., et al.** (2002). "High-Oleic Peanuts Are Not Different from Normal Peanuts in Allergenic Properties  
Doi:10.1021/Jf011132u." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(4): 878-882.
- Chung, S.-Y.; Maleki, S. J., et al.** (2004). "Allergenic Properties of Roasted Peanut Allergens May Be Reduced by Peroxidase." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(14): 4541-4545.
- Chung, S.-Y. and Reed, S.** (2012). "Removing Peanut Allergens by Tannic Acid." Food Chemistry **134**(3): 1468-1473.
- Chung, S.-Y.; Yang, W., et al.** (2008). "Effects of Pulsed Uv-Light on Peanut Allergens in Extracts and Liquid Peanut Butter." Journal of Food Chemistry **73**(5): C400.
- Chung, S.; Kato, Y., et al.** (2007). Reducing the Allergenic Properties of Peanut Allergens by Copper/Hydrogen Peroxide Recent Progress in Medicinal Plants, Sci Tech Publishing. **15**: 443-453.

- Chung, S. Y. and Champagne, E. T.** (2007). "Effects of Phytic Acid on Peanut Allergens and Allergenic Properties of Extracts." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(22): 9054-9058.
- Chung, S. Y.; Kato, Y., et al.** (2005). "Polyphenol Oxidase/Caffeic Acid May Reduce the Allergenic Properties of Peanut Allergens." Journal of the Science of Food and Agriculture **85**(15): 2631-2637.
- Chutmanop, J.; Chuichulcherm, S., et al.** (2008). "Protease Production by *Aspergillus Oryzae* in Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Substrates." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **83**(7): 1012-1018.
- Clarke, M.; Kilburn, S., et al.** (1998). "Serological Characteristics of Peanut Allergy." Clinical & Experimental Allergy **28**(10): 1251-1257.
- Codreanu, F.; Collignon, O., et al.** (2011). "A Novel Immunoassay Using Recombinant Allergens Simplifies Peanut Allergy Diagnosis." International Archives of Allergy and Immunology **154**(3): 216-226.
- Dalal, I.; Binson, I., et al.** (2002). "Food Allergy Is a Matter of Geography after All: Sesame as a Major Cause of Severe Ige-Mediated Food Allergic Reactions among Infants and Young Children in Israel." Allergy **57**(4): 362-365.
- Davis, P. and Williams, S.** (1998). "Protein Modification by Thermal Processing." Allergy **53**: 102-105.
- de Jong, E. C.; Van Zijverden, M., et al.** (1998). "Identification and Partial Characterization of Multiple Major Allergens in Peanut Proteins." Clinical & Experimental Allergy **28**(6): 743-751.
- Dickinson, C. D.; Floener, L. A., et al.** (1987). "Self-Assembly of Proglycinin and Hybrid Proglycinin Synthesized in Vitro from Cdna." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(16): 5525-5529.
- Dodo, H. W.; Konan, K. N., et al.** (2008). "Alleviating Peanut Allergy Using Genetic Engineering: The Silencing of the Immunodominant Allergen Ara H 2 Leads to Its Significant Reduction and a Decrease in Peanut Allergenicity." Plant Biotechnology Journal **6**(2): 135-145.
- Dodo, H. W.; Viquez, O. M., et al.** (2004). "Cdna Clone of a Putative Peanut (*Arachis Hypogaea* L.) Trypsin Inhibitor Has Homology with Peanut Allergens Ara H 3 and Ara H 4." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(5): 1404-1409.
- Dong, X. H.; Zhao, M. M., et al.** (2011). "Effects of Combined High-Pressure Homogenization and Enzymatic Treatment on Extraction Yield, Hydrolysis and Function Properties of Peanut Proteins." Innovative Food Science & Emerging Technologies **12**(4): 478-483.
- Donnadieu, E.; Jouvin, M.-H., et al.** (2000). "A Second Amplifier Function for the Allergy-Associated Fc $\epsilon$ ri-B Subunit." Immunity **12**(5): 515-523.
- Dubuisson, C.; La Vieille, S., et al.** (2002) "Allergies Alimentaires : Etat Des Lieux Et Propositions D'orientations" AFSSA
- Dutau, G.** (2003). "Epidemiology of Food Allergies." Revue Francaise D Allergologie Et D Immunologie Clinique **43**(8): 501-506.
- Eigenmann, P. A.; Burks, A. W., et al.** (1996). "Identification of Unique Peanut and Soy Allergens in Sera Adsorbed with Cross-Reacting Antibodies." Journal of Allergy and Clinical Immunology **98**(5, Part 1): 969-978.
- Esaki, H.; Nohara, Y., et al.** (1990). "Antioxidative Activity of Natto." Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology **37**(6): 474-477.
- Finkelman, F. D.** (2010). "Peanut Allergy and Anaphylaxis." Current Opinion in Immunology **22**(6): 783-788.

- Flinterman, A. E.; Van Hoffen, E., et al.** (2007). "Children with Peanut Allergy Recognize Predominantly Ara H2 and Ara H6, Which Remains Stable over Time." Clinical & Experimental Allergy **37**(8): 1221-1228.
- Franck, P.** (2008). "Influence Des Procédés Industriels Sur L'allergénicité Des Aliments", Université Henti Poincaré - Nancy I.
- Franck, P.; Moneret Vautrin, D., et al.** (2002). "The Allergenicity of Soybean-Based Products Is Modified Bu Food Technologies." International Archives of Allergy and Immunology **128**(3): 212-219.
- Frias, J.; Song, Y. S., et al.** (2008). "Immunoreactivity and Amino Acid Content of Fermented Soybean Products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(1): 99-105.
- Frias, J.; Song, Y. S., et al.** (2007). "Fermented Soyabean Products as Hypoallergenic Food." Proceedings of the nutrition society **67**.
- Gekko, K. and Timasheff, S. N.** (1981). "Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures." Biochemistry **20**(16): 4667-4676.
- Gell, P. G. H. and Coombs, R. R. A.** (1963). "The Classification of Allergic Reactions Underlying Disease." Clinical Aspects of Immunology.
- Gruber, P.; Becker, W.-M., et al.** (2005). "Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of Rara H 2, a Recombinant Major Allergen from Peanut (*Arachis Hypogaea*), Its Major Epitopes, and Peanut Agglutinin." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(6): 2289-2296.
- Guo, B.; Liang, X., et al.** (2008). "Proteomic Analysis of Peanut Seed Storage Proteins and Genetic Variation in a Potential Peanut Allergen." Protein & Peptide Letters **15**(6): 567-577.
- Hales, B. J.; Bosco, A., et al.** (2004). "Isoforms of the Major Peanut Allergen Ara H 2: Ige Binding in Children with Peanut Allergy." International Archives of Allergy and Immunology **135**(2): 101-107.
- Handoyo, T.; Maeda, T., et al.** (2006). "Hypoallergenic Buckwheat Flour Preparation by *Rhizopus Oligosporus* and Its Application to Soba Noodle." Food Research International **39**(5): 598-605.
- Haq, I. and Mukhtar, H.** (2004). "Biosynthesis of Proteases by *Rhizopus Oligosporus* in Low-Cost Medium by Solid-State Fermentation." Journal of Basic Microbiology **44**(4): 280-287.
- Hauser, M.; Egger, M., et al.** (2008). "Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families." The Open Immunology Journal **1**: 1-12.
- Herman, E. M. and Larkins, B. A.** (1999). "Protein Storage Bodies and Vacuoles." Plant Cell **11**(4): 601-614.
- Heskamp, M. L. and Barz, W.** (1998). "Expression of Proteases by *Rhizopus* Species During Tempeh Fermentation of Soybeans." Food / Nahrung **42**(01): 23-28.
- Hong, S. J.; Michael, J. G., et al.** (1999). "Pepsin-Digested Peanut Contains T-Cell Epitopes but No Ige Epitopes." Journal of Allergy and Clinical Immunology **104**(2): 473-477.
- Hourihane, J. O. B.; Aiken, R., et al.** (2007). "The Impact of Government Advice to Pregnant Mothers Regarding Peanut Avoidance on the Prevalence of Peanut Allergy in United Kingdom Children at School Entry." Journal of Allergy and Clinical Immunology **119**(5): 1197-1202.
- Ikasari, L. and Mitchell, D. A.** (1994). "Protease Production by *Rhizopus Oligosporus* in Solid-State Fermentation." World Journal of Microbiology and Biotechnology **10**(3): 320-324.

- Ikezawa, Z.; Tsubaki, K., et al.** (1999). "Usefulness of Hypoallergenic Rice (Aft-R 1) and Analysis of the Salt Insoluble Rice Allergen Molecule." Arerugi **48**(1): 40-49.
- Ishizaka, K.; Ishizaka, T., et al.** (1966). "Physico-Chemical Properties of Human Reaginic Antibody." The Journal of Immunology **97**(1): 75-85.
- Jin, T.; Guo, F., et al.** (2009). "Crystal Structure of Ara H 3, a Major Allergen in Peanut." Molecular Immunology **46**(8-9): 1796-1804.
- Jost, R.; Meister, N., et al.** (1991). Preparation of a Hypoallergenic Whey Protein Hydrolysate and Food. N. SA. CH.
- Kang, I. H.; Srivastava, P., et al.** (2007). "Temporal and Spatial Expression of the Major Allergens in Developing and Germinating Peanut Seed." Plant Physiology **144**(2): 836-845.
- Kim, J. S.; Ouyang, F., et al.** (2008). "Dissociation between the Prevalence of Atopy and Allergic Disease in Rural China among Children and Adults." Journal of Allergy and Clinical Immunology **122**(5): 929-935 e924.
- Klapper, B. F.; Jameson, D. M., et al.** (1973). "The Purification and Properties of an Extracellular Protease of *Aspergillus Oryzae* Nrrl 2160." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) **304**: 505-512.
- Kleber-Janke, T.; Cramer, R., et al.** (1999). "Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and 2s Albumins, Phage Display Technology." International Archives of Allergy and Immunology **119**: 265-274.
- Kleber-Janke, T.; Cramer, R., et al.** (2001). "Patient-Tailored Cloning of Allergens by Phage Display: Peanut (*Arachis Hypogaea*) Profilin, a Food Allergen Derived from a Rare Mrna." Journal of Chromatography **756**(1-2): 295-305.
- Koppelman, S. J.; De Jong, G. A. H., et al.** (2005). "Purification and Immunoglobulin E-Binding Properties of Peanut Allergen Ara H 6: Evidence for Cross-Reactivity with Ara H 2." Clinical & Experimental Allergy **35**(4): 490-497.
- Koppelman, S. J.; Hefle, S. L., et al.** (2010). "Digestion of Peanut Allergens Ara H 1, Ara H 2, Ara H 3, and Ara H 6: A Comparative in Vitro Study and Partial Characterization of Digestion-Resistant Peptides." Molecular Nutrition & Food Research: n/a.
- Koppelman, S. J.; Knol, E. F., et al.** (2003). "Peanut Allergen Ara H 3: Isolation from Peanuts and Biochemical Characterization." Allergy **58**(11): 1144-1151.
- Koppelman, S. J.; Vlooswijk, R. A., et al.** (2001). "Quantification of Major Peanut Allergens Ara H 1 and Ara H 2 in the Peanut Varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, Bred in Different Parts of the World." Allergy **56**(2): 132-137.
- Koppelman, S. J.; Wensing, M., et al.** (2004). "Relevance of Ara H1, Ara H2 and Ara H3 in Peanut-Allergic Patients, as Determined by Immunoglobulin E Western Blotting, Basophil-Histamine Release and Intracutaneous Testing: Ara H2 Is the Most Important Peanut Allergen." Clinical and Experimental Allergy **34**(4): 583-590.
- Kopper, R. A.; Odum, N. J., et al.** (2005). "Peanut Protein Allergens: The Effect of Roasting on Solubility and Allergenicity." International Archives of Allergy and Immunology **136**(1): 16-22.
- Leitao, J.; De Saint Blanquat, G., et al.** (1998). "Quantitation of Aflatoxins from Various Strains of *Aspergillus* in Foodstuffs." Journal of Chromatography **435**(1): 222-234.
- Ling, E. M.; Smith, T., et al.** (2004). "Relation of Cd4+ Cd25+ Regulatory T-Cell Suppression of Allergen-Driven T-Cell Activation to Atopic Status and Expression of Allergic Disease." The Lancet **363**(9409): 608-615.
- Lorient, D.** (2010) "Modifications Biochimiques Des Constituants Alimentaires." Techniques de l'ingénieur

- Maleki, S. J.; Chung, S. Y., et al.** (2000). "The Effects of Roasting on the Allergenic Properties of Peanut Proteins." Journal of Allergy and Clinical Immunology **106**(4): 763-768.
- Maleki, S. J.; Kopper, R. A., et al.** (2000). "Structure of the Major Peanut Allergen Ara H 1 May Protect Ige-Binding Epitopes from Degradation." Journal of Immunology **164**(11): 5844-5849.
- Maleki, S. J.; Viquez, O., et al.** (2003). "The Major Peanut Allergen, Ara H 2, Functions as a Trypsin Inhibitor, and Roasting Enhances This Function." Journal of Allergy and Clinical Immunology **112**(1): 190-195.
- Mansfield, L.** (2006). "Successful Oral Desensitization for Systemic Peanut Allergy." Annals of Allergy, Asthma & Immunology **97**(2): 266-267.
- Messina, M. J.; Persky, V., et al.** (1994). "Soy Intake and Cancer Risk: A Review of the in Vitro and in Vivo Data." Nutr Cancer **21**(2): 113-131.
- Mills, E. N. C.; Sancho, A. I., et al.** (2009). "Impact of Food Processing on the Structural and Allergenic Properties of Food Allergens." Molecular Nutrition & Food Research **53**(8): 963-969.
- Mittag, D.; Akkerdaas, J., et al.** (2004). "Ara H 8, a Bet V 1-Homologous Allergen from Peanut, Is a Major Allergen in Patients with Combined Birch Pollen and Peanut Allergy." Journal of Allergy and Clinical Immunology **114**(6): 1410-1417.
- Molkhou, P.** (2011). "L'allergie : De L'antiquité À La Découverte De L'ige." Revue Française d'Allergologie **51**(5): 500-505.
- Mondoulet, L.** (2005). "Diversité De La Réponse Ige Dans L'allergie a L'arachide. Caractérisation Des Allergènes Et Devenir De Leur Potentiel Allergénique Lors Des Traitements Thermique Et Des Processus Digestifs." Thèse de doctorat Toulouse(INSA Toulouse): 263 p.
- Mondoulet, L.; Drumare, M.-F., et al.** (2003). "Influence Des Procédés Thermiques Sur L'allergénicité De L'arachide." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **43**(8): 486-491.
- Moneret-Vautrin, D.-A.** (2008). "Épidémiologie De L'allergie Alimentaire." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **48**(3): 171-178.
- Moneret-Vautrin, D. A.** (2000). "Atopie Et Allergie Alimentaire." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **40**(4): 466-472.
- Moneret-Vautrin, D. A. and Kanny, G.** (2007). "Axes De Recherche En Allergologie Alimentaire : Hypoallergénicité Et Vaccins." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **47**(4): 305-313.
- Moneret-Vautrin, D. A.; Kanny, G., et al.** (1998). "A Population Study of Food Allergy in France: A Survey Concerning 33.110 Individuals." Journal of Allergy and Clinical Immunology **101**: p. S87.
- Moneret-Vautrin, D. A.; Petit, N., et al.** (2010). "Efficacité Et Sécurité Des Protocoles De Tolérance À L'arachide (Immunothérapie Orale). Étude Pilote Sur 51 patients." Revue Française d'Allergologie **50**(5): 434-442.
- Morisset, M.; Moneret-Vautrin, D. A., et al.** (2005). "Prevalence of Peanut Sensitization in a Population of 4,737 Subjects--an Allergo-Vigilance Network Enquiry Carried out in 2002." European Annals of Allergy and Clinical Immunology **37**(2): 54-57.
- Morisset, M.; Moneret-Vautrin, D. A., et al.** (2003). "Thresholds of Clinical Reactivity to Milk, Egg, Peanut and Sesame in Immunoglobulin E-Dependent Allergies: Evaluation by Double-Blind or Single-Blind Placebo-Controlled Oral Challenges." Clinical & Experimental Allergy **33**(8): 1046-1051.

- Mouécoucou, J.; Frémont, S., et al.** (2004). "In Vitro Allergenicity of Peanut after Hydrolysis in the Presence of Polysaccharides." Clinical & Experimental Allergy **34**(9): 1429-1437.
- Mueller, G. A.; Gosavi, R. A., et al.** (2011). "Ara H 2: Crystal Structure and Ige Binding Distinguish Two Subpopulations of Peanut Allergic Patients by Epitope Diversity." Allergy **66**(7): 878-885.
- Nelson, H. S.; Lahr, J., et al.** (1997). "Treatment of Anaphylactic Sensitivity to Peanuts by Immunotherapy with Injections of Aqueous Peanut Extract." Journal of Allergy and Clinical Immunology **99**(6, Part 1): 744-751.
- Novak, N.; Tepel, C., et al.** (2003). "Evidence for a Differential Expression of the Fcepsilon1 Chain in Dendritic Cells of Atopic and Nonatopic Donors." Journal of Clinical Investigation **111**(7): 1047-1056.
- Nultsch, W.** (1998). Botanique Générale.
- Oria, M. P.; Hamaker, B. R., et al.** (2000). "A Highly Digestible Sorghum Mutant Cultivar Exhibits a Unique Folded Structure of Endosperm Protein Bodies." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(10): 5065-5070.
- Osborne, T.** (1924). "The Vegetable Proteins." Journal of the Society of Chemical Industry **43**(17): 440-440.
- Peñas, E.; Préstamo, G., et al.** (2004). "High Pressure and the Enzymatic Hydrolysis of Soybean Whey Proteins." Food Chemistry **85**(4): 641-648.
- Piersma R.S.; Gaspari M., et al.** (2005). "Proteolytic Processing of the Peanut Allergen Ara H 3." Molecular Nutrition & Food Research **49**(8): 744-755.
- Pons, L.; Chery, C., et al.** (2002). "The 18 kDa Peanut Oleosin Is a Candidate Allergen for Ige-Mediated Reactions to Peanuts." Allergy **57**: 88-93.
- Rabjohn, P.; Helm, E. M., et al.** (1999). "Molecular Cloning and Epitope Analysis of the Peanut Allergen Ara H 3." Journal of Clinical Investigation **103**(4): 535-542.
- Rancé, F. and Dutau, G.** (2006). "Détermination Des seuils De réactivité Au cours Des allergies Alimentaires." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **46**(2): 107-110.
- Rancé, F. and Dutau, G.** (2007). "Panorama Des Allergènes Alimentaires Chez L'enfant En 2007." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **47**, **Supplement 2**(0): S41-S46.
- Rao, M. B.; Tanksale, A. M., et al.** (1998). "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 597-635.
- Rauf, A.; Irfan, M., et al.** (2010). "Optimization of Growth Conditions for Acidic Protease Production from *Rhizopus oligosporus* through Solid State Fermentation of Sunflower Meal." International Journal of Agricultural and Biological Sciences **1**(1): 40-43.
- Renauld, J. C.** (2002). "Les Mécanismes Immunitaires Impliqués Dans L'allergie." Louvain Médical **121**: 241-245.
- Riecken, S.; Lindner, B., et al.** (2008). "Purification and Characterization of Natural Ara H 8, the Bet V 1 Homologous Allergen from Peanut, Provides a Novel Isoform." Biological Chemistry **389**(4): 415-423.
- Rougé, P.; Culerrier, R., et al.** (2010). "Characterization of Ige-Binding Epitopes of Peanut (*Arachis hypogaea*) Pna Lectin Allergen Cross-Reacting with Other Structurally Related Legume Lectins." Molecular Immunology **47**(14): 2359-2366.
- Rouge, P.; Culerrier, R., et al.** (2009). "Mapping and Conformational Analysis of Ige-Binding Epitopic Regions on the Molecular Surface of the Major Ara H 3 Legumin Allergen of Peanut (*Arachis hypogaea*)." Molecular Immunology **46**(6): 1067-1075.

- Sakai, K.; Yokoyama, A., et al.** (1999). "Effect of Different Sensitizing Doses of Antigen in a Murine Model of Atopic Asthma." Clinical & Experimental Immunology **118**(1): 9-15.
- Sandhya, C.; Sumantha, A., et al.** (2005). "Comparative Evaluation of Neutral Protease Production by *Aspergillus Oryzae* in Submerged and Solid-State Fermentation." Process Biochemistry **40**(8): 2689-2694.
- Sarao, K. L.; Arora, M., et al.** (2010). "Production of Protease by Submerged Fermentation Using *Rhizopus Microsporus* Var *Oligosporus*." The Internet journal of microbiology **9**(1).
- Schmidt, H.; Gelhaus, C., et al.** (2009). "2-D Dige Analysis of the Proteome of Extracts from Peanut Variants Reveals Striking Differences in Major Allergen Contents." PROTEOMICS **9**(13): 3507-3521.
- Schmidt, H.; Krause, S., et al.** (2010). "Detection and Structural Characterization of Natural Ara H 7, the Third Peanut Allergen of the 2s Albumin Family." Journal of Proteome Research **9**(7): 3701-3709.
- Schmitt, D. A.; Nesbit, J. B., et al.** (2009). "Processing Can Alter the Properties of Peanut Extract Preparations." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(2): 1138-1143.
- Sen, M.; Kopper, R., et al.** (2002). "Protein Structure Plays a Critical Role in Peanut Allergen Stability and May Determine Immunodominant Ige-Binding Epitopes." The Journal of Immunology **169**(2): 882-887.
- Shankar, S.** (2010). "Production, Purification and Characterization of Protease from *Beauveria Sp*". PhD, University of Pune.
- Shek, L. P.-C.; Cabrera-Morales, E. A., et al.** (2010). "A Population-Based Questionnaire Survey on the Prevalence of Peanut, Tree Nut, and Shellfish Allergy in 2 Asian Populations." Journal of Allergy and Clinical Immunology **126**(2): 324-331.e327.
- Shin, D. S.; Compadre, C. M., et al.** (1998). "Biochemical and Structural Analysis of the Ige Binding Sites on Ara H1, an Abundant and Highly Allergenic Peanut Protein." Journal of Biological Chemistry **273**(22): 13753-13759.
- Sicherer, S. H.; Muñoz-Furlong, A., et al.** (2010). "Us Prevalence of Self-Reported Peanut, Tree Nut, and Sesame Allergy: 11-Year Follow-Up." Journal of Allergy and Clinical Immunology **125**(6): 1322-1326.
- Sicherer, S. H. and Sampson, H. A.** (2007). "Peanut Allergy: Emerging Concepts and Approaches for an Apparent Epidemic." Journal of Allergy and Clinical Immunology **120**(3): 491-503.
- Sihra, B. S.; Kon, O. M., et al.** (1997). "Expression of High-Affinity Ige Receptors (Fc Epsilon Ri) on Peripheral Blood Basophils, Monocytes, and Eosinophils in Atopic and Nonatopic Subjects: Relationship to Total Serum Ige Concentrations." Journal of Allergy and Clinical Immunology **99**(5): 699-706.
- Souci, S. W.; Fachmann, W., et al.** (2008). La Composition Des Aliments. Tableaux Des Valeurs Nutritives. MedPharm Scientific Publishers.
- Stanley, J. S.; King, N., et al.** (1997). "Identification and Mutational Analysis of the Immunodominant Ige Binding Epitopes of the Major Peanut Allergen Ara H 2." Archives of Biochemistry and Biophysics **342**(2): 244-253.
- Suhr, M.; Wicklein, D., et al.** (2004). "Isolation and Characterization of Natural Ara H 6: Evidence for a Further Peanut Allergen with Putative Clinical Relevance Based on Resistance to Pepsin Digestion and Heat." Molecular Nutrition & Food Research **48**(5): 390-399.

- Takahashi, C.; Kikuchi, N., et al.** (1995). "Possible Anti-Tumor-Promoting Activity of Components in Japanese Soybean Fermented Food, Natto: Effect on Gap Junctional Intercellular Communication." Carcinogenesis **16**(3): 471-476.
- Tanimoto, H.; Mori, M., et al.** (2001). "Natto Mucilage Containing Poly-Gamma-Glutamic Acid Increases Soluble Calcium in the Rat Small Intestine." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **65**(3): 516-521.
- Taylor, S. and Baumert, J.** (2010). "Cross-Contamination of Foods and Implications for Food Allergic Patients." Current Allergy and Asthma Reports **10**(4): 265-270.
- Taylor, S. L.; Hefle, S. L., et al.** (2004). "A Consensus Protocol for the Determination of the Threshold Doses for Allergenic Foods: How Much Is Too Much?" Clinical & Experimental Allergy **34**(5): 689-695.
- Taylor, S. L.; Moneret-Vautrin, D. A., et al.** (2010). "Threshold Dose for Peanut: Risk Characterization Based Upon Diagnostic Oral Challenge of a Series of 286 Peanut-Allergic Individuals." Food and Chemical Toxicology **48**(3): 814-819.
- Teng, D.; Gao, M., et al.** (2012). "Bio-Modification of Soybean Meal with Bacillus Subtilis or Aspergillus Oryzae." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology **1**(1): 32-38.
- Toru, H.; Ra, C., et al.** (1996). "Induction of the High-Affinity Ige Receptor (Fc $\epsilon$ ri) on Human Mast Cells by Il-4." International Immunology **8**(9): 1367-1373.
- Tsuji, K. and Tsuji, E.** (1986). "Effect of Natto-Feeding Cholesterol Level of Rats." Japan Journal of Nutrition **44**: 41-44.
- van Beresteijn, E. C.; Meijer, R. J., et al.** (1995). "Residual Antigenicity of Hypoallergenic Infant Formulas and the Occurrence of Milk-Specific Ige Antibodies in Patients with Clinical Allergy." Journal of Allergy and Clinical Immunology **96**(3): 365-374.
- van Boxel, E.; van Beers, M., et al.** (2006). "Allergen Ara H 1 Occurs in Peanuts as a Large Oligomer Rather Than as a Trimer." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(19): 7180-7186.
- van Boxel, E. L.; Koppelman, S. J., et al.** (2008). "Determination of Pepsin-Susceptible and Pepsin-Resistant Epitopes in Native and Heat-Treated Peanut Allergen Ara H 1." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(6): 2223-2230.
- van Boxel, E. L.; van den Broek, L. A. M., et al.** (2007). "Peanut Allergen Ara H 1 Interacts with Proanthocyanidins into Higher Molecular Weight Complexes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(21): 8772-8778.
- van Ree, R.; Cabanes-Macheteau, M., et al.** (2000). "B(1,2)-Xylose and B(1,3)-Fucose Residues Have a Strong Contribution in Ige Binding to Plant Glycoallergens." Journal of Biological Chemistry **275**(15): 11451-11458.
- Vereda, A.; van Hage, M., et al.** (2011). "Peanut Allergy: Clinical and Immunologic Differences among Patients from 3 Different Geographic Regions." Journal of Allergy and Clinical Immunology **127**(3): 603-607.
- Visser, Y. M.; Iwan, M., et al.** (2011). "Effect of Roasting on the Allergenicity of Major Peanut Allergens Ara H 1 and Ara H 2/6: The Necessity of Degranulation Assays." Clinical & Experimental Allergy **41**(11): 1631-1642.
- Watanabe, M.; Watanabe, J., et al.** (2000). "Novel Method for Producing Hypoallergenic Wheat Flour by Enzymatic Fragmentation of the Constituent Allergens and Its Application to Food Processing." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **64**(12): 2663-2667.
- Yamanishi, R.; Huang, T., et al.** (1995). "Reduction of the Soybean Allergenicity by the Fermentation with Bacillus Natto." Food Science and Technology International, Tokyo **1**(1): 14-17.

- Yan, Y.-S.; Lin, X.-D., et al.** (2005). "Isolation of Peanut Genes Encoding Arachins and Conglutins by Expressed Sequence Tags." Plant Science **169**(2): 439-445.
- Yang, Z.; Li, Y., et al.** (2012). "Synthesis of Hypoallergenic Derivatives of the Major Allergen Fag T 1 from Tartary Buckwheat Via Sequence Restructuring." Food and Chemical Toxicology **50**(8): 2675-2680.
- Yokota, A.; Kikutani, H., et al.** (1988). "Two Species of Human Fc Epsilon Receptor Ii (Fc Epsilon Rii/Cd23): Tissue-Specific and Il-4-Specific Regulation of Gene Expression." Cell **55**(4): 611-618.
- Yokotsuka, T. and Sasaki, M.** (1985). Fermented Protein Foods in the Orient : Shoyu and Miso in Japan. Microbiology of Fermented Foods. B. J. B. Wood. Essex, England, Elsevier Science Publishing. **1**.
- Yu, J. M.; Ahmedna, M., et al.** (2011). "Enzymatic Treatment of Peanut Kernels to Reduce Allergen Levels." Food Chemistry **127**(3): 1014-1022.
- Yu, Z.; Day, D. A., et al.** (2011). "Early Food Allergen Exposure May Be Protective against Food Allergies : An Extention of the Hygiene Hypothesis." The internet journal of epidemiology **10**(1).

**Brevet**





## BREVET D'INVENTION



Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI Direct 0820 210 211

Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)

Vos références pour ce dossier	26002FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b>	
Titre	PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN ALIMENT HYPOALLERGÉNIQUE
LE(S) DEMANDEUR(S)	SOCIETE FINANCIERE CORMOULS HOULES , UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)	
<b>INVENTEUR 1</b>	
Nom	BRUNET
Prénom	Etienne
Rue	2, Avenue Aristide Briand
Code postal et ville	31400 TOULOUSE
Pays	FR
<b>INVENTEUR 2</b>	
Nom	BARRE
Prénom	Annick
Rue	112 quai de Tounis
Code postal et ville	31000 TOULOUSE
Pays	FR
<b>INVENTEUR 3</b>	
Nom	CAZE-SUBRA
Prénom	Stéphanie
Rue	34, rue du médecin Colonel Calbairac
Code postal et ville	31100 TOULOUSE
Pays	FR
<b>INVENTEUR 4</b>	
Nom	CORMOULS-HOULÈS

Prénom	Nicolas
Rue	80, rue du dix avril
Code postal et ville	31500 TOULOUSE
Pays	FR
<b>INVENTEUR 5</b>	
Nom	LE MOUEL
Prénom	Vincent
Rue	52 rue Lancefoc
Code postal et ville	31000 TOULOUSE
Pays	FR
<b>INVENTEUR 6</b>	
Nom	ROUGÉ
Prénom	Pierre
Rue	19 résidence du château
Code postal et ville	31320 AUZEVILLE-TOLOSANE
Pays	FR
<b>DATE ET SIGNATURE</b>	
Signé par	
Date	
Signataire	Mandataire

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6.01.1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI. Les données à caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.

La présente invention s'inscrit dans le domaine de la préparation d'aliments hypoallergéniques. Plus particulièrement, elle concerne un procédé de préparation d'un aliment à allergénicité réduite à partir d'une matrice alimentaire solide à plus forte allergénicité, notamment d'une matrice alimentaire à base de graines d'arachide et/ou de fruits à coque.

L'Organisation Mondiale de la Santé classe à l'heure actuelle les allergies au 3<sup>ème</sup> rang mondial des maladies chroniques les plus répandues. Dans les pays industrialisés, on estime qu'elles touchent près d'un individu sur trois, et une proportion d'un individu sur deux est envisageable à l'horizon 2030 si l'augmentation des cas d'allergie enregistrés durant les dix dernières années devait se poursuivre au même rythme. Les allergies alimentaires représentent environ 5 % des allergies, et jusqu'à 10 % chez les enfants. Elles sont en augmentation constante depuis plusieurs années.

En particulier, les allergies à l'arachide et aux fruits à coque (noix, noisette, noix de cajou, noix de pécan, pistache, etc.) occupent une place importante dans la classe des allergies alimentaires, en raison de leur prévalence élevée et surtout de leur gravité. Elles se traduisent fréquemment par des œdèmes bucopharyngés ou des chocs anaphylactiques généralisés. Ces allergies exigent par conséquent de respecter un régime alimentaire strict, dont sont écartés tous les produits susceptibles de contenir de l'arachide ou des fruits à coque. Certaines réglementations européennes ou internationales imposent la mention de la présence de ces produits dans l'étiquetage des aliments. Les allergènes majeurs en cause dans ces allergies correspondent essentiellement à des protéines de réserve, qui s'accumulent en quantités appréciables dans les graines en maturation, et qui sont indissociables de la graine. Lors de la germination de la graine, ces protéines de réserve ont pour rôle de fournir à la jeune plante les acides aminés nécessaires à sa croissance.

On définit ici comme des allergènes majeurs, les allergènes pour lesquels 50 % au moins des individus allergiques possèdent les anticorps IgE correspondants. La plupart des allergènes protéiques majeurs de l'arachide et des fruits à coque ont à ce jour été identifiés. Ces allergènes majeurs correspondent essentiellement à des vicilines, des légumine et des albumines 2S.

Par exemple, à ce jour, onze protéines allergènes différentes ont été identifiées dans l'arachide, nommées Ara h 1 à Ara h 11. Parmi elles, Ara h 1 (viciline de poids moléculaire

63,5 kDa) et Ara h 2 (albumine 2S de poids moléculaire 16-17 kDa) représentent respectivement environ 12 à 16 %, et 6 à 9 %, des protéines de l'arachide. Plus de 95 % des individus allergiques à l'arachide présentent des anticorps IgE spécifiques de ces deux protéines. Ara h 3, une légumine, a également été identifiée comme un allergène majeur de l'arachide.

Il a été proposé par l'art antérieur différents procédés pour diminuer le degré d'allergénicité des aliments à base de matières premières fortement allergéniques, notamment à base d'arachide.

On peut citer, à titre d'exemples, l'amélioration génétique, par sélection par croisements de variétés pauvres en allergènes, ou l'élaboration d'arachides génétiquement modifiées à faible teneur en allergènes. Ces techniques ne donnent cependant pas des résultats satisfaisants, dans la mesure où la synthèse et l'accumulation des allergènes majeurs de l'arachide obéissent à des systèmes multifactoriels dont l'expression est difficile à modifier. En outre, la modification par les techniques du génie génétique se heurte au problème de l'utilisation des organismes génétiquement modifiés dans le domaine de l'agro-alimentaire.

Diverses méthodes de traitement physico-chimique des graines d'arachide ont également été proposées mais, à l'heure actuelle, aucune n'a donné de résultats probants, qu'il s'agisse notamment de traitements par la chaleur (Davis et al., 1998), par rayonnement UV (Chung et al., 2008), par des protéases digestives telles que la trypsine ou la pepsine (van Boxtel et al., 2008) ou par addition d'autres composés, tels que des agents complexants, par exemple l'acide phytique (Chung et al., 2007).

La présente invention vise à remédier aux inconvénients des procédés de préparation d'aliments d'allergénicité réduite proposés par l'art antérieur, notamment à ceux exposés ci-avant, en proposant un tel procédé qui permette d'obtenir, à partir d'une matrice alimentaire solide présentant naturellement une forte allergénicité, un aliment d'allergénicité fortement réduite, voire nulle.

Un objectif supplémentaire de l'invention est que ce procédé, en plus d'être alimentaires compatibles, soit non polluant, et notamment qu'il ne mette en œuvre aucun solvant ni additif ionisant, de sorte à respecter intégralement non seulement l'innocuité mais aussi les propriétés gustatives et nutritionnelles de la matrice alimentaire initiale.

A cet effet, il est proposé selon la présente invention un procédé de préparation d'un aliment à allergénicité réduite à partir d'une matrice alimentaire solide particulière à plus forte allergénicité, contenant des protéines allergènes. Ce procédé comprend une étape de traitement d'une dispersion de la matrice alimentaire solide dans un véhicule aqueux, par homogénéisation à haute, de préférence à ultra haute, pression, de sorte à obtenir un homogénéisât constitué d'une dispersion de protéines allergènes initialement contenues dans la matrice, en mélange avec des particules solides de la matrice. Avantageusement, cette étape permet d'extraire de la matrice la quasi-totalité des protéines allergènes qui y étaient initialement contenues, et notamment des allergènes majeurs.

Par particulière, on entend ici que la matière alimentaire solide est formée de particules, sans limitation de taille pour ces particules. Ainsi, le terme particules englobe ici les graines, grains, noix, etc. entiers, quelle que soit leur taille. Ce terme englobe également par exemple les cellules, organites cellulaires, etc.

Par matrice alimentaire solide, on entend une matière première comestible sous forme solide, notamment d'origine végétale, ou un dérivé solide d'une telle matière première. Préférentiellement, la matrice alimentaire solide est une matière première brute, c'est-à-dire n'ayant subi aucune étape de purification ou de séparation de ses composants. Plus particulièrement, la matrice alimentaire solide est constituée de graines alimentaires présentant une allergénicité, en particulier de graines d'arachide et/ou de fruits à coque tels que des noix, noisettes, noix de cajou, noix de pécan, noix de macadamia, noix du Brésil, pistaches, amandes, pignons, châtaignes, etc.

Autrement, la matrice alimentaire solide peut être constituée de produits céréaliers tels que le blé, l'orge, le seigle, l'avoine, l'épeautre, le quinoa, etc. ; de graines de légumineuses telles que les pois, les lentilles, les haricots, le soja, etc. ; de graines de sésame, de sarrasin, de fenugrec ; ou à base de tels produits.

Dans le cas où la matrice alimentaire solide est à base d'arachide, elle peut consister en toute forme de l'arachide, qu'il s'agisse des graines, brutes ou grillées, ou de produits dérivés, notamment de beurre ou de farine d'arachide. Il en est de même dans les cas où la matrice alimentaire est à base de fruits à coques, la matrice pouvant alors consister en toute forme du fruit à coque, que ce dernier soit brut ou qu'il ait subi un traitement thermique, ou bien en tout produit qui en est dérivé.

L'allergénicité est ici définie de manière classique en elle-même, comme la capacité d'une substance à provoquer une réaction allergique, c'est-à-dire une réaction problématique du système immunitaire chez certains sujets qui manifestent une hypersensibilité à l'égard de cette substance. La réaction allergique met en jeu plusieurs anticorps, dont les immunoglobulines E (IgE), une classe spécifique d'immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B. En présence de l'allergène, substance biologique ou chimique reconnue par le système immunitaire humain qui provoque une réaction ou une réponse allergique, l'anticorps déclenche la libération de médiateurs chimiques qui causent la réaction allergique, pouvant se traduire par divers symptômes plus ou moins graves tels que des démangeaisons, des éruptions cutanées, une gêne respiratoire, des vomissements, de la diarrhée, un œdème buccopharyngien ou une réaction anaphylactique généralisée (choc anaphylactique).

La technique d'homogénéisation à haute pression mise en œuvre dans le cadre de la présente invention est connue en elle-même, et consiste à projeter à débit constant un produit liquide ou pâteux, sous forte pression, typiquement comprise entre 30 et 40 000 bars, à travers une tête d'homogénéisation, au travers d'un espace de quelques  $\mu\text{m}$  laissé libre par une vanne de contre-pression. La pression en amont de cette vanne devient alors très forte, et la décompression brutale en aval de la vanne provoque des phénomènes entraînant une modification du produit dispersé, notamment des phénomènes de cisaillement, micro-turbulence et cavitation. Cette technique est notamment décrite comme permettant de stabiliser des émulsions grasses ou d'obtenir de faibles granulométries au sein d'une émulsion ou d'une dispersion de solides dans une phase liquide. Son mode de fonctionnement détaillé est notamment décrit dans la publication de Lecluse, 1979.

De manière inattendue, il a maintenant été découvert par les présents inventeurs que le traitement par homogénéisation à haute pression d'une dispersion dans un véhicule aqueux d'une matière alimentaire solide permettait de solubiliser les protéines allergènes contenues dans cette matrice, y compris lorsque, comme dans le cas de la graine d'arachide brute, ces protéines allergènes sont naturellement peu disponibles à l'extraction.

Un traitement ultérieur de l'homogénéisât obtenu, par dégradation de ces protéines allergènes, permet avantageusement d'obtenir, directement ou après transformation, un produit alimentaire hypoallergénique, qui conserve intactes les propriétés gustatives et

nutritionnelles initiales de la matrice alimentaire.

Le terme hypoallergénique est ici employé, en référence à un aliment, comme signifiant une tendance moindre à provoquer une réaction allergique, par rapport à la matrice alimentaire servant de base à sa préparation. Dans des modes de réalisation de l'invention, le procédé de préparation d'un aliment incluant une étape de traitement par homogénéisation à haute pression de la matrice alimentaire solide, notamment d'une matière première brute telle que des graines d'arachide ou des fruits à coque, ou plus généralement toute graine alimentaire présentant une allergénicité, permet d'obtenir une solubilisation importante, supérieure à 95 %, des protéines allergènes initialement contenues dans la matrice. En particulier, dans le cas des graines d'arachide, les trois protéines allergènes majeures, Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3, sont ainsi avantageusement quasiment totalement solubilisées dans le véhicule aqueux. Il en résulte, après une étape ultérieure de dégradation de ces protéines, une diminution significative, jusqu'à plus de 90 %, de l'allergénicité de ces protéines allergènes.

On ne préjugera pas ici des mécanismes sous-tendant un tel résultat avantageux. Dans le cas particulier des graines d'arachide, les protéines allergènes sont stockées dans les vacuoles de la graine qui, une fois saturées, sont ensuite déshydratées pour former les corps protéiques. Cette déshydratation conduit à un emballage des protéines qui s'arrangent alors dans des structures pseudo-cristallines, les rendant ainsi peu disponibles à l'extraction par les tampons utilisés couramment pour solubiliser les protéines. On peut supposer que le traitement par homogénéisation à haute pression, par une déstructuration de la matrice alimentaire solide, augmente la disponibilité et le degré de solvatation de ces protéines, ainsi que leur susceptibilité à subir des modifications biologiques et chimiques visant à leur dénaturation et dégradation.

L'allergénicité de l'aliment obtenu peut être évaluée par tout moyen connu de l'homme du métier, notamment par quantification de sa teneur en allergènes majeurs par des dosages immunologiques, par exemple par la technique connue sous le nom d'ELISA (pour l'anglais Enzyme-Linked ImmunoSorbent **Assay**), au moyen d'anticorps spécifiques de ces allergènes.

Suivant des modes de mise en œuvre préférés, l'invention répond en outre aux caractéristiques suivantes, mises en œuvre séparément ou en chacune de leurs

combinaisons techniquement opérantes.

En particulier, le choix des paramètres opératoires préférentiels est réalisé de sorte à obtenir le meilleur rendement d'extraction des protéines allergènes contenues dans la matrice alimentaire solide lors de l'étape d'homogénéisation à haute pression.

Dans des modes de mise en œuvre de l'invention, la matrice alimentaire solide est soumise à une étape de broyage préalablement à l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression, de préférence après sa dispersion dans le véhicule aqueux. Une telle caractéristique améliore avantageusement le rendement d'extraction des protéines allergènes contenues dans la matrice, notamment dans les cas où la matrice est initialement constituée de graines ou de grains entiers de diamètre relativement élevé.

Préférentiellement, ce broyage est réalisé de sorte à obtenir une granulométrie de la matrice solide inférieure à 1500  $\mu\text{m}$ , en diamètre des particules qui la composent.

A cet effet, il peut notamment être mis en œuvre un mélangeur à rotor, classique en lui-même, qui permet, grâce à des forces de cisaillement, de réduire la granulométrie de la matrice solide et de disperser grossièrement les particules solides dans le véhicule aqueux.

Le broyage peut être réalisé à une température comprise entre 15 et 90 °C, de préférence environ égale à 25 °C. La vitesse du rotor peut être réglée à une valeur comprise entre 100 et 10 000 tours/minute, de préférence à environ 800 tours/minute. La durée de broyage peut être comprise entre 2 et 60 minutes, et est préférentiellement d'environ 10 minutes.

Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, la dispersion de matrice alimentaire solide dans le véhicule aqueux comprend un rapport en poids de matrice alimentaire solide, par volume de véhicule aqueux, compris entre 50/50 et 5/95, et de préférence égal à 20/80.

Le véhicule aqueux est préférentiellement l'eau.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention, l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression est réalisée à une pression comprise entre 100 et 50 000 bars, de préférence entre 200 et 1 000 bars, préférentiellement à environ 500 bars.

L'homogénéisation à haute pression peut être réalisée à une température comprise entre 15 et 90 °C, préférentiellement à environ 35 °C.

Dans des modes de mise en œuvre préférés de l'invention, l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression est réalisée de sorte à obtenir une granulométrie de l'homogénéisât inférieure à 20  $\mu\text{m}$ , de préférence environ égale à 10  $\mu\text{m}$ , en diamètre des particules qui le composent. L'obtention d'une telle granulométrie est avantageusement associée à un rendement optimal d'extraction des protéines allergènes de la matrice. Elle est en outre compatible avec les homogénéisateurs à haute pression couramment proposés sur le marché.

Un seul cycle d'homogénéisation à haute pression suffit généralement à obtenir un rendement d'extraction des protéines allergènes de la matrice alimentaire solide supérieur à 95 %, quel que soit l'état initial de ces protéines dans la matrice.

On obtient à l'issue de cette étape d'homogénéisation à haute pression une dispersion exempte de toute particule décelable à l'œil nu, qui conserve avantageusement la saveur initiale de la matrice alimentaire solide de départ.

Dans des modes de mise en œuvre préférés de l'invention, l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression est suivie d'une étape de traitement de l'homogénéisât obtenu par un agent de dégradation/dénaturation des protéines, pour dégrader les protéines allergènes contenues dans l'homogénéisât et diminuer ainsi leur allergénicité, de préférence d'au moins 74 %, préférentiellement encore d'au moins 95 %.

L'agent de dégradation des protéines peut être un agent chimique ou biologique, notamment un agent protéolytique, et en particulier une protéase. Les agents biologiques sont notamment particulièrement préférés dans le cadre de l'invention.

L'agent de dégradation des protéines peut être un micro-organisme, dont l'activité enzymatique, protéolytique en particulier, peut être supérieure à celles des enzymes isolées, et de préférence un micro-organisme probiotique. Par le terme probiotique, on entend désigner des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont intégrés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé, au-delà des effets nutritionnels normaux.

On évite ainsi avantageusement le recours à des agents ou solvants chimiques, pour cette étape de la préparation de l'aliment hypoallergénique.

Les micro-organismes sélectionnés selon l'invention peuvent être des bactéries ou des champignons, unicellulaires tels que les levures ou pluricellulaires.

Préférentiellement, ils sont choisis de sorte à présenter des propriétés organoleptiques telles qu'ils n'altèrent pas les qualités gustatives initiales de l'homogénéisât.

Des exemples d'espèces de bactéries pouvant être mis en œuvre dans le cadre de l'invention sont *Lactobacillus plantarum* et *Bacillus subtilis*. Des exemples de champignons sont *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* et *Aspergillus oryzae*.

Un ou plusieurs micro-organismes d'espèces ou de genres différents peuvent être mis en œuvre simultanément ou consécutivement.

Dans des modes de mise en œuvre préférés de l'invention, le micro-organisme est inoculé dans l'homogénéisât, et le milieu ainsi obtenu est laissé fermenter pendant une durée suffisante pour diminuer d'au moins 90 % l'allergénicité des protéines allergènes contenues initialement dans l'homogénéisât.

La quantité initiale de micro-organismes utilisée pour l'inoculation et les conditions de fermentation sont notamment déterminées en fonction de la matrice alimentaire solide de départ et des protéines allergènes qu'elle renferme.

Préférentiellement, lorsque le micro-organisme est un champignon, l'inoculation est réalisée à raison de  $1.10^4$  à  $1.10^8$  spores par ml d'homogénéisât. Lorsque le micro-organisme est une bactérie, l'inoculation est par exemple réalisée au moyen d'une culture bactérienne de densité optique à 600 nm d'environ 0,5, qui est ajoutée dans l'homogénéisât dans une concentration de 10 à 70 % en volume, préférentiellement d'environ 50 % en volume. Un tel choix de conditions d'inoculation permet avantageusement d'obtenir la meilleure activité de dégradation des protéines allergènes contenues dans l'homogénéisât par le micro-organisme.

La fermentation peut être réalisée dans un système aéré, avec une agitation orbitale, sous une température comprise entre 20 et 45 °C, de préférence d'environ 37 °C, durant 2 à 300 heures, de préférence durant environ 72 heures.

Avant inoculation, l'homogénéisât est de préférence porté à une température supérieure ou égale à 100 °C, pendant 10 à 30 minutes, puis refroidi à la température ambiante.

Dans des modes de mise en œuvre de l'invention, l'homogénéisât est additionné de sucre, par exemple de saccharose, glucose, maltose ; d'amidon, par exemple de blé, de maïs, de pomme de terre, dans une concentration comprise entre 0,5 et 10 % en poids/volume ;

et/ou d'acide acétique, ou tout autre acide, préalablement à la fermentation, de sorte à favoriser l'activité enzymatique, protéolytique en particulier, du micro-organisme.

Plus généralement, l'étape de traitement par un micro-organisme probiotique, en vue de diminuer l'allergénicité de protéines allergènes contenues dans une matrice solide, peut être réalisée sur toute forme de cette matrice solide, y compris sur des formes n'ayant pas été soumises à homogénéisation à haute pression, mais à tout autre type de traitement préalable, ou à aucun tel traitement. Les caractéristiques de cette étape peuvent être telles que décrit ci-dessus.

Le fermentât obtenu à l'issue de la fermentation peut avantageusement être utilisé en tant qu'aliment en tant que tel, ou comme intermédiaire pour la fabrication d'un aliment.

Par exemple, dans le cas où la matrice alimentaire solide initiale est constituée à base d'arachide, le fermentât peut, après déshydratation éventuelle, être incorporé dans de l'huile d'arachide, qui ne présente pas en elle-même de caractère allergénique, pour la préparation de beurre de cacahuète.

L'aliment final présente une allergénicité fortement réduite par rapport à la matrice alimentaire solide initiale, cette réduction pouvant être jusqu'à supérieure à 95 %. Ses qualités gustatives, organoleptiques et nutritionnelles sont similaires à celles de cette matrice.

Le procédé selon l'invention constitue une avancée majeure dans la gestion quotidienne des évictions alimentaires imposées aux individus allergiques et aux problèmes qui leur sont liés, en particulier concernant l'étiquetage des produits alimentaires.

Les caractéristiques et avantages du procédé selon l'invention apparaîtront plus clairement à la lumière des exemples de mise en œuvre ci-après, fournis à simple titre illustratif et nullement limitatifs de l'invention, avec l'appui des figures 1 à 10, dans lesquelles :

- la figure 1 représente une micrographie à un grossissement de 20x de particules obtenues par un broyage de graines d'arachide crues conforme à des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention ;

- la figure 2 montre une micrographie à un grossissement de 20x de particules d'un homogénéisât obtenu à partir de graines d'arachide crues selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention ;

- la figure 3 est un histogramme montrant la masse en mg de protéines dosées dans une suspension de 100 mg de graines d'arachide crues, respectivement avant et après une étape d'homogénéisation selon un mode de mise en œuvre particulier de l'invention ;

- la figure 4 montre un gel SDS-PAGE (de l'anglais Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) coloré au Bleu de Coomassie, obtenu après migration de, Piste 1 un marqueur de poids moléculaire, Piste 2 un extrait de suspension de graines d'arachide après broyage et avant homogénéisation à haute pression, et Piste 3 un extrait de suspension de graines d'arachide après homogénéisation à haute pression conformément à des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention ;

- la figure 5 montre un gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie, obtenu après migration de, Piste 1 un marqueur de poids moléculaire ; Piste 2 un extrait protéique brut de graines d'arachide crues non traitées ; Pistes 3 à 5, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide crues par des étapes de broyage, homogénéisation à haute pression puis 72 heures de fermentation par *Rhizopus oligosporus*, selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, fraction Surnageant pour la Piste 3, Fraction soluble pour la Piste 4 et Fraction insoluble pour la Piste 5 (dépôt de 20 µg de protéines par puits) ;

- la figure 6 représente un gel SDS-PAGE suivi d'un Western blot obtenu après migration de, Piste 1 un extrait protéique brut de graines d'arachide crues non traitées ; Pistes 2 à 4, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide crues par des étapes de broyage, homogénéisation à haute pression puis 72 heures de fermentation par *Rhizopus oligosporus*, selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, fraction Surnageant pour la Piste 2, Fraction soluble pour la Piste 3 et Fraction insoluble pour la Piste 4 (dépôt de 20 µg de protéines par puits, pool d'anticorps de lapin anti-Ara h 1, anti-Ara h 2, anti-Ara h 3) ; le marqueur de poids moléculaire est représenté à gauche sur la figure ;

- la figure 7 montre un gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie, obtenu après migration de, Piste 1 un marqueur de poids moléculaire ; Piste 2 un extrait protéique brut de graines d'arachide crues non traitées ; Pistes 3 à 5, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide crues par des étapes de broyage, homogénéisation à haute pression puis 72 heures de fermentation par *Aspergillus oryzae*, selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, fraction Surnageant pour la Piste 3, Fraction soluble pour la Piste 4 et Fraction insoluble pour la Piste 5 ; Pistes 6 à 8, des extraits de protéines

obtenus à partir de graines d'arachide grillées par des étapes de broyage, homogénéisation à haute pression puis 72 heures de fermentation par *Aspergillus oryzae*, selon le même mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention, fraction Surnageant pour la Piste 6, Fraction soluble pour la Piste 7 et Fraction insoluble pour la Piste 8 (dépôt de 20 µg de protéines par puits) ;

- la figure 8 représente un gel SDS-PAGE suivi d'un Western blot obtenu après migration de, Piste 1 un marqueur de poids moléculaire ; Piste 2 un extrait protéique brut de graines d'arachide crues non traitées ; Pistes 3 à 5, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide crues par des étapes de broyage, homogénéisation à ultra haute pression puis 72 heures de fermentation par *Aspergillus oryzae*, selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, fraction Surnageant pour la Piste 3, Fraction soluble pour la Piste 4 et Fraction insoluble pour la Piste 5 ; Pistes 6 à 8, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide grillées par des étapes de broyage, homogénéisation à ultra haute pression puis 72 heures de fermentation par *Aspergillus oryzae*, selon le même mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention, fraction Surnageant pour la Piste 6, Fraction soluble pour la Piste 7 et Fraction insoluble pour la Piste 8 (dépôt de 20 µg de protéines par puits, pool d'anticorps de lapin anti-Ara h 1, anti-Ara h 2, anti-Ara h 3) ;

- la figure 9 montre un gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie, obtenu après migration de, Piste 1 un marqueur de poids moléculaire ; Piste 2 un extrait protéique brut de graines d'arachide crues non traitées ; Pistes 3 et 4, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide crues par des étapes de broyage, homogénéisation à ultra haute pression puis 72 heures de fermentation par *Bacillus subtilis*, selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, Fraction soluble pour la Piste 3 et Fraction insoluble pour la Piste 4 (dépôt de 20 µg de protéines par puits) ;

- et la figure 10 représente un gel SDS-PAGE suivi d'un Western blot obtenu après migration de, Piste 1 un extrait protéique brut de graines d'arachide crues non traitées ; Pistes 2 et 3, des extraits de protéines obtenus à partir de graines d'arachide crues par des étapes de broyage, homogénéisation à ultra haute pression puis 72 heures de fermentation par *Bacillus subtilis*, selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, Fraction soluble pour la Piste 2 et Fraction insoluble pour la Piste 3 (dépôt de 20 µg de protéines par puits, pool d'anticorps de lapin anti-Ara h 1, anti-Ara h 2, anti-Ara h

3) ; le marqueur de poids moléculaire est représenté à gauche sur la figure.

EXEMPLE A – Traitement d'une matrice alimentaire solide constituée de graines brutes d'arachide par homogénéisation à haute pression

1/ Matériels et méthodes

On utilise pour le broyage initial de la matrice un mélangeur à immersion à haut cisaillement Silverson®. La vitesse du rotor est fixée à 700 tours/minute, la durée de traitement à 5 minutes. La température est de 25 °C environ.

L'homogénéisation à haute pression est réalisée au moyen d'un homogénéisateur haute pression Lab-1000 de la société APV, à une pression de 500 bars, et à une température de 35 °C.

L'analyse microscopique est réalisée sur une dispersion de la matrice alimentaire solide, respectivement après broyage et après homogénéisation à haute pression. A cet effet, 10 µL de la dispersion sont déposés sur une lame en verre et séchés à une température de 60 °C pendant 10 minutes. Cela permet aux solides résiduels d'adhérer à la lame de verre et de pouvoir procéder à une coloration. Les lames sont alors plongées dans une solution d'acridine orange à 1 % (m/v) pendant 5 minutes à température ambiante. Après lavage à l'eau distillée, les lames sont plongées dans une solution de rouge Congo à 1 % (m/v) pendant 5 minutes, puis rincées intensivement à l'eau distillée. Les lames sont alors plongées dans une solution de vert lumière à 1 % (m/v) pendant 2 minutes puis rincées à l'eau distillée. L'observation est ensuite réalisée au microscope avec un grossissement de 20x, au moyen d'un microscope Leica DM IRBE inversé à champ large et fond clair. La coloration permet d'identifier les différents composants de la dispersion : l'amidon est coloré en violet, les protéines en vert/bleu (visible en gris foncé sur les figures 1 et 2) et les parois cellulaires en marron/orange.

Le dosage des protéines présentes dans la dispersion est réalisé avant et après le traitement par homogénéisation à haute pression. A cet effet, à 980 µL de la dispersion (à des rapports masse/volume identiques) sont ajoutés 20 µL d'une solution tampon de Tris(2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol) à 1 mol/L à un pH de 8,5, dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Les suspensions sont ensuite agitées sur un agitateur orbital à température ambiante pendant 1 h. Les tubes sont centrifugés à 4 °C à une vitesse de 16 100 g pendant

10 minutes, et le surnageant est prélevé. Ce surnageant est dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure, et le dosage des protéines est effectué à l'aide du kit de dosage de protéines BCA (pour l'anglais Bi-Cinchoninic Acid, acide bicinchoninique) de Pierce, sur une microplaque à fond plat de 96 puits. La gamme étalon est une solution de BSA (pour l'anglais Bovine Serum Albumin, albumine de sérum bovin) dans des concentrations allant de 2 mg/mL à 0 mg/mL. Après incubation de la solution protéique (25 µL après dilution) et du réactif du kit (200 µL) pendant 30 minutes à 37 °C, la microplaque est lue sur un lecteur spectrophotométrique à une longueur d'onde de 562 nm. Les concentrations en protéines sont calculées à partir de la gamme étalon.

La séparation des protéines sur gel est réalisée sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les électrophorèses sont réalisées dans des gels plans de porosité 12,5 % d'acrylamide. Ce maillage permet de bien séparer les protéines de poids moléculaires moyens et faibles (entre 100 et 10 kDa).

Les gels sont constitués d'un gel de séparation (acrylamide 12,5 % ; bis-acrylamide 0,4 % ; Tris-HCl 0,125 mol/L pH 8,8 ; sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,1 %) et d'un gel de concentration (acrylamide 4,8 % ; bis-acrylamide 0,3 % ; Tris-HCl 0,375 mol/L pH 6,8 ; SDS 0,1 %). La migration se déroule à un ampérage constant de 30 mA pendant environ 1 heure.

Les solutions protéiques sont déposées à volume constant : 1 µL + 19 µL d'eau ultra pure + 4 µL d'une solution de tampon de charge [2 % SDS ; 0,125 M Tris ; 10 % glycérol ; 5 % β-mercaptoéthanol] et chauffées 5 minutes à 100 °C avant d'être déposées sur le gel.

Les protéines séparées sur gels sont ensuite colorées selon le protocole suivant : fixation dans une solution de 40 % éthanol, 10 % acide acétique et 50 % H<sub>2</sub>O pendant 30 minutes ; coloration dans une solution de Bleu de Coomassie (1 g de bleu de Coomassie R250, 250 mL éthanol, 80 mL acide acétique, 670 mL H<sub>2</sub>O) ; décoloration dans une solution de 25 % éthanol, 8 % acide acétique, 67 % H<sub>2</sub>O, jusqu'à ce que le fond du gel soit clair.

## 2/ Résultats

Des graines d'arachide brutes sont mises en suspension dans l'eau, dans un rapport en poids de graines par volume d'eau égal à 20/80.

Cette suspension est soumise à broyage, selon la méthode indiquée ci-dessus. On obtient à l'issue de cette étape une suspension dans l'eau de particules de graine d'arachide.

Cette suspension est soumise à analyse microscopique, selon la méthode indiquée ci-dessus. Après coloration, on obtient la micrographie représentée sur la figure 1. On y observe que toutes les particules solides présentent un diamètre inférieur à 1500 µm.

La suspension obtenue est soumise à homogénéisation à haute pression, selon la méthode indiquée ci-dessus (passage unique dans l'homogénéisateur).

L'homogénéisât obtenu est soumis à analyse microscopique, selon la méthode indiquée ci-dessus. Après coloration, on obtient la micrographie représentée sur la figure 2. On y observe clairement une désagrégation des corps protéiques, par rapport à la suspension avant homogénéisation faisant l'objet de la figure 1. La grande majorité des protéines allergènes de l'arachide, en particulier Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 8 et Ara h 9, étant contenues dans ces corps protéiques, on peut en déduire que l'homogénéisation à haute pression a conduit à la dispersion de ces protéines dans le véhicule aqueux.

Un dosage de protéines contenues dans la suspension, avant et après homogénéisation, a été réalisé conformément à la méthode décrite ci-dessus. Le résultat, en masse de protéines dosées dans une suspension de 100 mg de graines d'arachide, est montré sur la figure 3.

On y observe qu'après homogénéisation, pour la même quantité en poids initiale de graine d'arachide, on dose une quantité de protéines dans la suspension qui est de 42 % plus élevée qu'avant homogénéisation à haute pression. Ce résultat démontre clairement que l'homogénéisation à haute pression conduit à une solubilisation importante des protéines initialement contenues dans les particules du broyat de graines d'arachide.

Les protéines contenues dans la suspension, respectivement après broyage et avant homogénéisation, et après homogénéisation à haute pression, ont été séparées sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE, selon la méthode indiquée ci-dessus. Après coloration, on obtient le gel montré sur la figure 4. Sur ce gel, la Piste 1 correspond à un marqueur de poids moléculaire, la Piste 2 aux protéines de la suspension avant homogénéisation et la Piste 3 aux protéines de la suspension après homogénéisation à haute pression. Sur cette figure, on a indiqué par des flèches les bandes attribuées aux allergènes majeurs de l'arachide, c'est-à-dire Ara h 1 (de poids moléculaire d'environ 63 kDa), Ara h 3 (sous-unité acide, doublet à des poids moléculaires d'environ 42 et 45 kDa) et Ara h 2 (doublet à des poids moléculaires

d'environ 16 et 17 kDa).

On observe sur cette figure 4 que, pour des conditions opératoires identiques, l'intensité des bandes qui correspondent aux allergènes majeurs de l'arachide, Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3, est nettement plus prononcée pour l'extrait protéique obtenu après homogénéisation à haute pression, que pour celui obtenu à partir du broyat avant l'homogénéisation. On note également la présence, sur la Piste 3, de bandes entre 35 et 20 kDa, entre 55 et 45 kDa et au-delà de 70 kDa, qui ne sont pas visibles sur la Piste 2. On peut en déduire que l'homogénéisation à haute pression a permis de libérer dans le véhicule aqueux une quantité importante de protéines, et en particulier des allergènes majeurs de l'arachide Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3.

L'homogénéisation à haute pression a donc permis d'améliorer de manière significative la disponibilité et le degré de solvatation des protéines de réserve contenues dans les graines d'arachide, et d'augmenter par là-même leur susceptibilité à subir ultérieurement un traitement, notamment biologique, visant à leur dénaturation ou leur dégradation.

EXEMPLE B – Préparation d'anticorps dirigés contre les protéines allergènes Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 de l'arachide

Afin de quantifier la teneur en allergènes majeurs de l'homogénéisât obtenu dans l'Exemple A, on prépare des anticorps dirigés contre les protéines allergènes Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 de l'arachide de la façon suivante.

1/ Purification de la protéine Ara h 1

Des graines d'arachide crues sont dispersées dans du tampon Tris 20 mM de pH 7,4. L'extrait brut ainsi obtenu est soumis à précipitation dans une solution aqueuse de sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 40 % (m/v). Le surnageant est soumis à dialyse contre un tampon phosphate 20 mM de pH 7, à travers une membrane de limite d'exclusion 3,5 kDa.

On obtient un extrait de protéines contenant majoritairement Ara h 1, auquel sont ajoutés 2 % en volume de polyvinylpolypyrrolidone (**PVPP**).

La protéine Ara h 1 est ensuite purifiée au moyen d'une colonne de sépharose à laquelle est greffée de la concanavaline A. Cette lectine permet la fixation des motifs glucidiques, ces

mêmes motifs se trouvant sur la protéine Ara h 1. La fixation s'effectue dans un tampon Tris 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, additionné de 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 1 mmol.L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub>. L'élution se fait dans le même tampon, additionné de 200 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose.

La concanavoline A résiduelle se trouve dans les fractions récupérées. Afin de l'éliminer et d'augmenter la pureté d'Ara h 1, les fractions sont réunies et dialysées pendant 48 h contre du tampon Tris 20 mmol.L<sup>-1</sup> de pH 7,4, afin d'éliminer dans un premier temps le glucose qui empêche la fixation de la Concanavoline A sur le dextran.

Ensuite, les échantillons sont passés sur une colonne Sephadex G-25 en circuit fermé pendant 24 h à 4 °C, à un débit de 0,5 mL/min. La concanavoline A se fixe sur les motifs dextran, et l'éluat contient exclusivement Ara h 1.

L'identité de cette protéine et son état de pureté sont vérifiées par SDS-PAGE et caractérisation des fractions peptidiques obtenues après hydrolyse trypsique par spectrométrie de masse au moyen d'un spectromètre de type MALDI-TOF.

## 2/ Purification de la protéine Ara h 2

Des graines d'arachide crues sont dispersées dans du tampon Tris 20 mM de pH 7,4, additionné de chlorure de sodium (NaCl) 150 mM. L'extrait brut ainsi obtenu est soumis à une délipidation au chloroforme, puis l'extrait brut ainsi délipidé est soumis à dialyse contre un tampon Tris 20 mM de pH 8, à travers une membrane de limite d'exclusion 3,5 kDa.

On obtient un extrait de protéines contenant majoritairement Ara h 2.

La protéine Ara h 2 est ensuite purifiée à partir de cet extrait sur une colonne HiTrap® Q FF (Amersham) de 5 mL, colonne anionique qui permet de séparer les protéines selon leur charge, à un pH légèrement basique.

La fixation se fait par interaction ionique, et l'élution par un gradient croissant de NaCl. La protéine Ara h 2 est éluee à une concentration en NaCl de 240 mmol.L<sup>-1</sup>. Les fractions récupérées en sortie de colonne sont ensuite dialysées contre un tampon Tris 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

L'identité de la protéine Ara h 2 et son état de pureté sont vérifiées par SDS-PAGE et caractérisation des fractions peptidiques obtenues après hydrolyse trypsique par spectrométrie de masse au moyen d'un spectromètre de type MALDI-TOF.

### 3/ Purification de la protéine Ara h 3

Des graines d'arachide crues sont délipidées par l'éther de pétrole dans un extracteur de Soxhlet, puis dispersées dans un tampon Tris 20 mM de pH 8.

On obtient un extrait de protéines contenant majoritairement Ara h 3.

La protéine Ara h 3 est ensuite purifiée à partir de cet extrait en deux étapes, sur deux colonnes distinctes.

La première colonne est celle décrite pour la purification d'Ara h 2 ci-dessus, c'est-à-dire une colonne anionique HiTrap® Q FF de 5 mL. Les conditions mises en œuvre sont les mêmes que pour la purification d'Ara h 2 ci-dessus, mis à part que l'élution d'Ara h 3 a lieu à une concentration en NaCl de 400 mmol.L<sup>-1</sup>.

Suite à ce passage sur la première colonne, et après vérification par séparation des protéines en SDS-PAGE, les fractions contenant Ara h 3 sont réunies et dialysées contre un tampon Phosphate 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 pendant 48 h à 4 °C.

La séparation finale d'Ara h 3 des autres protéines éluées à 400 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl sur HiTrap® Q FF 5 mL est réalisée par chromatographie sur une colonne HiTrap® Phenyl HP 5 mL (Amersham), chromatographie dite « hydrophobe ». Pour la fixation et l'élution des protéines sur ce type de colonne, on joue sur l'hydrophobicité des protéines, affectée par la concentration plus ou moins importante en sels chaotropiques ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par exemple ). Pour cela, suite à la dialyse, on ajoute à l'échantillon une solution de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 mol.L<sup>-1</sup> afin d'obtenir une concentration finale de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1 mol.L<sup>-1</sup>. L'échantillon est ensuite fixé sur la colonne HiTrap® Phenyl HP, et, après lavage, l'élution s'effectue avec un gradient décroissant en sel (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans du tampon Phosphate 50 mM pH 7,0.

Les protéines contenues dans les fractions récupérées sont ensuite précipitées par l'acide trichloroacétique et séparées sur gel SDS-PAGE afin de vérifier leur pureté.

L'identité de la protéine Ara h 3 et son état de pureté sont vérifiées par SDS-PAGE et caractérisation des fractions peptidiques obtenues après hydrolyse trypsique par spectrométrie de masse au moyen d'un spectromètre de type MALDI-TOF.

#### 4/ Immunisation de lapins

Pour chacune des trois protéines allergènes purifiées, la production d'antigènes polyclonaux est réalisée par l'immunisation de deux lapins de Nouvelle-Zélande. Le programme d'immunisation s'étale sur 63 jours, avec 4 injections de 150 à 300 µg de protéines purifiées reprises dans de l'adjuvant complet de Freund. Trois prélèvements sont effectués afin de suivre la production des anticorps désirés : à J0 pour la vérification de la non-réactivité du sérum pré-immun, à J49 et à J63 pour le suivi de la réponse immunitaire et le choix de l'exsanguination totale ou non des lapins.

Après décision de l'exsanguination totale des lapins, ceux-ci sont sacrifiés dans une période ne dépassant pas 40 jours après le programme d'immunisation de 63 jours.

La spécificité et la sensibilité des sérums obtenus, pour la protéine allergène associée, est vérifiée par des analyses en Western blot, contre un extrait total d'arachide.

EXEMPLE C – Traitement de l'homogénéisât de l'Exemple A par des micro-organismes

L'homogénéisât obtenu dans l'Exemple A est soumis à une fermentation respectivement par chacun des micro-organismes probiotiques suivants : *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, *Bacillus subtilis*.

A l'issue de cette fermentation, les protéines contenues dans l'homogénéisât ainsi obtenu sont extraites, dosées et séparées par SDS-PAGE. Elles sont ensuite analysées par Western blot et test ELISA (pour l'anglais Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), afin d'évaluer leur degré d'allergénicité.

#### 1/ Matériel et Méthodes

##### Culture des micro-organismes

*Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oligosporus* sont cultivés sur un milieu PDA (pour l'anglais Potato Dextrose Agar) (pour un litre : Potato infusion 4 g ; Dextrose 20 g, Agar 15 g – stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C / 1 bar) sur boîte de pétri à 37 °C, dans une atmosphère humide (95 % d'humidité relative) pendant 7 jours.

*Bacillus subtilis* est mis en culture dans un milieu CASO (Caséine SOja Trypsique) (pour un litre : peptone de caséine 17,0 g/L ; peptone de farine de soja 3,0 g/L ; D(+)- glucose

2,5 g/L ; chlorure de sodium 5,0 g/L ; phosphate dipotassique 2,5 g/L – stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C / 1 bar) à 37 °C pendant 12 heures.

#### Mise en fermentation

10 mL d'homogénéisât sont traités, dans une fiole erlenmeyer de 100 mL.

Pour *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oligosporus*, le pH de l'homogénéisât est ajusté à 4,5 avec de l'acide acétique. Les spores cultivées sur boîte de Pétri sont récoltées à l'aide d'eau stérile additionnée de quelques gouttes de Tween 20. Après décrochage des spores du milieu de culture à l'aide d'un râteau de verre, la suspension est filtrée sur du Miracloth afin de ne garder que les spores et de les séparer du mycélium. La suspension est soumise à un vortexage et directement dénombrée au microscope grâce à une cellule de dénombrement (cellule de Malassez). Les spores sont ajoutées à l'homogénéisât, à raison de  $1.10^6$  spores/mL, puis le milieu résultant est soumis à chauffage à une température de 100 °C pendant 10 minutes, puis laissé refroidir jusqu'à la température ambiante. La culture est mise à fermenter dans un système aéré avec une agitation orbitale (à la vitesse de 50 tours/minute), sous une température de 37 °C, pendant 72 heures.

Les bactéries *Bacillus subtilis* sont mises en culture dans les milieux de culture correspondants jusqu'à obtenir une densité optique de 0,5 à 600 nm (12 heures à 37 °C). L'homogénéisât est chauffé à 100 °C pendant 10 minutes puis refroidi à température ambiante. Il est en outre additionné de maltose à 2 % (m/v). Les bactéries sont inoculées dans l'homogénéisât à une concentration de 50 % (v/v). La culture est ensuite mise à fermenter sans agitation, à une température de 37 °C, pendant 72 heures.

#### Extraction des protéines après fermentation de l'homogénéisât

Après un temps de fermentation donné, 1,5 mL du fermentât obtenu sont disposés dans un tube Eppendorf de 2 mL, et centrifugés à 16 100 x g pendant 10 minutes à 4 °C. La couche lipidique supérieure est éliminée et le surnageant est prélevé et stocké à -20 °C jusqu'à analyse. Il est désigné ci-après par le terme « Surnageant ».

Le culot est re-suspendu dans 1 mL de tampon Tris 20 mM, pH 8,5 et la solution est soumise à agitation pendant 1 h à température ambiante sur une roue d'agitation, à raison de 20 rotations par minute. La solution est ensuite centrifugée à 16 100 x g pendant

10 minutes à 4 °C. Le surnageant est prélevé et stocké à -20 °C jusqu'à analyse. Il est désigné ci-après par l'expression « Fraction soluble ».

Le culot est alors re-suspendu dans 1 mL d'un tampon dénaturant (500 µL Tris 1,25 M, pH 6,5 ; 500 µL glycérol ; 500 µL SDS 20 % ; 25 µL dithiothréitol 1 M ; 3 475 µL H<sub>2</sub>O) afin de solubiliser les protéines qui auraient pu s'agréger lors d'une quelconque étape de traitement antérieur. La solution est chauffée pendant 5 minutes à 100 °C, et centrifugée à 16 100 x g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est prélevé et stocké à -20 °C jusqu'à analyse. Il est désigné ci-après par l'expression « Fraction insoluble ».

L'arachide crue non traitée est soumise aux mêmes étapes d'extraction des protéines.

#### Dosage des protéines

Les différentes fractions extraites (Surnageant, Fraction soluble et Fraction insoluble) sont soumises à un dosage protéique.

Le Surnageant et la Fraction soluble sont dilués au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra-pure. La Fraction insoluble est diluée au 10<sup>ème</sup> dans une solution d'iodoacétamide 50 mM et chauffée à 37 °C pendant 15 minutes (ce qui permet d'oxyder le dithiothréitol et de ne pas interférer avec les réactifs du dosage BCA). Le dosage des protéines est effectué à l'aide du kit BCA de Pierce, sur une microplaque à fond plat de 96 puits. La gamme étalon est une solution de BSA allant de 0 mg/mL à 2 mg/mL.

Après incubation de la solution protéique (25 µL après dilution) et du réactif de Pierce (200 µL) pendant 30 minutes à 37 °C, l'absorbance est lue au moyen d'un lecteur spectrophotométrique à une longueur d'onde de 562 nm.

Les concentrations en protéines pour les différentes fractions obtenues sont calculées à partir de la gamme étalon.

#### Séparation des protéines sur gel

Les protéines extraites préalablement sont séparées sur des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les gels sont constitués selon les compositions indiquées dans l'Exemple A ci-dessus.

Les solutions protéiques sont déposées à concentrations égales (20 µg par puits) et les dilutions sont calculées à partir du dosage au BCA. Les dilutions sont ramenées à un volume

de 20 µL, avec l'eau comme diluant. Pour les fractions Surnageant et Fraction soluble, à ces 20 µL sont ajoutés 4 µL d'une solution de tampon de charge (2 % SDS ; 0,125 M Tris ; 10 % glycérol ; 5 % β-mercaptoéthanol, quelques cristaux de bleu de bromophénol) et chauffées 5 minutes à 100 °C avant d'être déposées sur le gel. Pour les Fractions insolubles, à ces 20 µL sont ajoutés 4 µL d'une solution (0,125 M Tris ; 10 % glycérol, quelques cristaux de bleu de bromophénol) et directement déposées sur le gel.

Les protéines séparées sur gels sont ensuite colorées selon le protocole indiqué dans l'Exemple A ci-dessus.

#### Western blot des fractions protéiques après fermentation

Pour toutes les fractions (Surnageant, Fraction soluble et Fraction insoluble), après migration des protéines sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE comme indiqué ci-dessus, le gel n'est pas coloré, et les protéines sont électrotransférées depuis ce gel sur une membrane de nitrocellulose en mode semi-sec, dans un tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v)) à 20 volts pendant 20 minutes (TransBlot® Turbo®, Biorad®). La membrane est ensuite colorée dans une solution contenant 0,2 % de rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité du transfert. Après décoloration dans du tampon phosphate salin (PBS) 1x (pour 1 litre : 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), Les sites de fixation potentiels non utilisés sur la membrane sont saturés par une solution de tampon PBS additionnée de 5 % (m/v) de lait écrémé en poudre, pendant une nuit à 4 °C.

La membrane est ensuite exposée à un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, obtenu dans l'Exemple B : l'anticorps primaire (pool de sérums de lapin : Anti-Ara h 1 dilué au 1:40 000, Anti-Ara h 2 dilué au 1:5 000, Anti-Ara h 3 dilué au 1:10 000, dilutions dans le tampon de saturation) est déposé sur la membrane pendant 2 heures en chambre humide à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 minutes dans le tampon de saturation sous agitation (PBS, 5 % (m/v) lait écrémé, 0,1 % Tween 20 (v/v)) puis incubée pendant 1 heure avec un anticorps secondaire (anti-IgG de lapin) couplé à la peroxydase de raifort (dilué au 1:2000 dans la solution de saturation).

Après 2 lavages dans du PBS, 0,1 % Tween 20, et deux lavages dans du PBS seul, les membranes sont incubées avec un substrat générant une réaction chimioluminescente ECL Plus® (Amersham) pendant 1 minute, et le signal chimioluminescent obtenu est enregistré avec une caméra.

### Test ELISA

Le test ELISA permet de quantifier les allergènes résiduels après la fermentation par les microorganismes, dans chacune des fractions Surnageant, Fraction Soluble et Fraction insoluble. Ce test est réalisé en triplicat.

Tous les échantillons sont dilués dans du PBS. Des dilutions des différents extraits (Surnageant, Fraction soluble et Fraction insoluble), ainsi qu'un extrait brut d'arachide non traitée (témoin) sont déposés dans une plaque 96 puits, à raison de 50 µL par puits, et à différentes concentrations comprises entre 0 et 100 ng/µL pour la détection par l'anticorps anti-Ara h 1, 0 et 250 ng/µL pour anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3 en ce qui concerne les fractions Surnageant et Fraction soluble, et entre 0 et 600 ng/µL pour la Fraction insoluble, quel que soit l'anticorps utilisé pour la détection.

Après ce premier dépôt, la plaque est mise à incuber à 4 °C pendant une nuit. Après incubation, la plaque est lavée trois fois (200 µL/puits) avec du PBS. Les puits sont ensuite mis à saturer avec une solution PBS, BSA 1 % (w/v) et Tween 0,1 % (v/v) (100 µL par puits), pendant une heure à température ambiante. Les plaques sont retournées et les puits vidés, et les différents sérums sont alors incubés (anti-Ara h 1 dilué au 1:10 000, anti-Ara h 2 dilué au 1:5 000, anti-Ara h 3 dilué au 1:10 000 dans du PBS/Tween/BSA) pendant 2 h à température ambiante, sous agitation (50 µL/puits). Les plaques sont ensuite retournées et les puits vidés et lavés 3 fois avec une solution PBS/Tween/BSA (200 µL/puits).

L'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline) est ensuite ajouté, à raison de 50 µL par puits après dilution au 1:2 000 dans du PBS/Tween/BSA, et la plaque est mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés trois fois avec du PBS/Tween/BSA (200 µL par puits). Le substrat ajouté est du 4-nitrophényl phosphate (pNPP, Sigma), à raison de 100 µL par puits. La plaque est mise à incuber à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité sous agitation. L'absorbance est ensuite lue à 450 nm dans un spectrophotomètre pour microplaques.

## 2/ Résultats

### 2.1/ Fermentation par *Rhizopus oligosporus*

Après 72 heures de fermentation par *Rhizopus oligosporus*, et extraction protéique, suivant le protocole indiqué ci-dessus, les protéines de chaque fraction obtenue

(Surnageant, Fraction soluble et Fraction insoluble) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Le témoin utilisé est un extrait protéique de graines d'arachide crues.

Le gel obtenu après coloration est montré sur la figure 5.

On y observe que pour toutes les fractions protéiques obtenues après fermentation de l'homogénéisât (Pistes 3 à 5), par rapport à l'extrait brut de graines d'arachide non traitées (Piste 2), les bandes correspondant aux allergènes majeurs de l'arachide (environ 63 kDa pour Ara h, environ 42 et 45 kDa pour Ara h 3 et environ 16 et 17 kDa pour Ara h 2) ont disparu. Ces protéines ne sont plus présentes dans le fermentât obtenu.

Le résultat de l'analyse par Western blot de ces mêmes fractions est montré sur la figure 6. On n'y observe, pour tous les extraits obtenus après traitement par fermentation (Pistes 2 à 4), aucune bande témoin de la liaison de protéines à l'un quelconque des trois anticorps anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 ou anti-Ara h 3.

Les résultats obtenus par dosage ELISA, pour chacun des anticorps anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 ou anti-Ara h 3, après respectivement 24, 48 et 72 heures de fermentation, sont montrés dans le Tableau 1 ci-après. Par rapport à l'extrait protéique obtenu à partir de graines d'arachide non traitées, on observe, dès après 24 h de fermentation, une diminution significative de la teneur en protéines allergènes majeures Ara h 1, Ara h 2, et Ara h 3. Pour toutes les fractions d'extraction, après 72 h de fermentation, cette diminution est supérieure ou égale à 95 % par rapport aux graines d'arachide non traitées.

L'ensemble des résultats ci-dessus montre clairement que le fermentât obtenu après broyage de graines d'arachide crues, homogénéisation à ultra haute pression et fermentation par *Rhizopus oligosporus*, conformément à un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, présente un degré d'allergénicité fortement réduit par rapport à l'arachide crue non traitée de départ. Les principales protéines allergènes de l'arachide, Ara h 1, Ara h 2, et Ara h 3, ont été efficacement extraites de la matrice solide initiale par l'homogénéisation à ultra haute pression, et efficacement dégradées par le micro-organisme. Après 72 heures de fermentation, l'allergénicité de la matrice initiale a été réduite d'au moins 95 %.

	Temps de fermentation	Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Surnageant	Non traité	302,7		337		365	
	24h	55	-82%	94	-72%	79	-78%
	48h	17	-94%	58	-83%	46	-87%
	72h	10	-97%	14	-96%	11	-97%
Fraction soluble	Non traité	602,67		337		365	
	24h	90	-85%	85	-75%	92	-75%
	48h	48	-92%	48	-86%	64	-82%
	72h	18	-97%	13	-96%	16	-96%
Fraction insoluble	Non traité	121,33		190		183,33	
	24h	78	-36%	74	-61%	92	-50%
	48h	34	-72%	42	-78%	36	-80%
	72h	5	-96%	9	-95%	8	-96%

**Tableau 1** – Teneur en Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 des extraits protéiques après fermentation de l'homogénéisât de l'Exemple A par *Rhizopus oligosporus*, déterminée par test ELISA

où A représente l'absorbance à 450 nm

## 2.2/ Fermentation par *Aspergillus oryzae*

Pour ce micro-organisme, des tests ont été réalisés, en appliquant les protocoles expérimentaux ci-dessus, d'une part à partir de graines d'arachide crues, et d'autre part à partir de graines d'arachide grillées. Le protocole décrit dans l'Exemple A a été appliqué à l'identique sur ces dernières, de sorte à obtenir un homogénéisât dit d'arachide grillée. **(protocole de grillage des graines ?)**

Après 72 heures de fermentation par *Aspergillus oryzae*, et extraction protéique, suivant le protocole indiqué ci-dessus, les protéines de chaque fraction obtenue (Surnageant, Fraction soluble et Fraction insoluble) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Le témoin utilisé est un extrait protéique de graines d'arachide crues.

Le gel obtenu après coloration est montré sur la figure 7.

On observe que par rapport à l'extrait brut de graines d'arachide non traitées (Piste

2), pour toutes les fractions protéiques obtenues après fermentation de l'homogénéisât, que ce dernier ait été obtenu à partir de graines d'arachide crues (Pistes 3 à 5) ou grillées (Pistes 6 à 8), les bandes correspondant aux allergènes majeurs de l'arachide (environ 63 kDa pour Ara h, environ 42-45 kDa pour Ara h 3 et environ 16 et 17 kDa pour Ara h 2) ont disparu. Ces protéines ne sont plus présentes dans les fermentâts obtenus, ou en quantité très faible.

Le résultat de l'analyse par Western blot de ces mêmes fractions est montré sur la figure 8. On y observe clairement, pour tous les extraits obtenus après traitement par fermentation de graines d'arachide crues (Pistes 3 à 5) comme de graines d'arachide grillées (Pistes 6 à 8), qu'une quantité nettement moindre de protéines interagissent avec les anticorps anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 ou anti-Ara h 3, par rapport à l'extrait obtenu à partir de graines d'arachide crues non traitées (Piste 2).

Les résultats obtenus par dosage ELISA, pour chacun des anticorps anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 ou anti-Ara h 3, après 72 heures de fermentation, sont montrés dans le Tableau 2 ci-après. Par rapport à l'extrait protéique obtenu à partir de graines d'arachide non traitées, on observe, après 72 h de fermentation par *Aspergillus oryzae*, une diminution très significative de la teneur en protéines allergènes majeurs Ara h 1, Ara h 2, et Ara h 3 dans les extraits protéiques obtenus aussi bien à partir de graines d'arachide crues que de graines d'arachide traitées.

Ces résultats démontrent que les fermentâts obtenus après broyage de graines d'arachide crues ou grillées, homogénéisation à ultra haute pression et fermentation par *Aspergillus oryzae*, conformément à un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, présentent un degré d'allergénicité fortement réduit par rapport à l'arachide crue non traitée. Les principales protéines allergènes de l'arachide, Ara h 1, Ara h 2, et Ara h 3, ont été efficacement extraites de la matrice solide initiale par l'homogénéisation à ultra haute pression, et efficacement dégradées par le micro-organisme. Après 72 heures de fermentation, l'allergénicité de la matrice initiale a été réduite d'au moins 90 %.

		Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Surnageant	Crues Non traitées	450		493		372	
	Crues traitées	26	-94%	24	-95%	28	-92%
	Grillées Non traitées	181		128		134	
	Grillées traitées	26	-86%	23	-82%	21	-84%
Fraction soluble	Crues Non traitées	450		493		372	
	Crues traitées	12	-97%	21	-96%	16	-96%
	Grillées Non traitées	181		128		134	
	Grillées traitées	30	-83%	18	-97%	27	-80%
Fraction insoluble	Crues Non traitées	539		273		280	
	Crues traitées	47	-91%	31	-89%	24	-91%
	Grillées Non traitées	301		293		175	
	Grillées traitées	67	-78%	65	-78%	46	-74%

Tableau 2 – Teneur en Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 des extraits protéiques après fermentation de l'homogénéisât de l'Exemple A (graines crues) et d'un homogénéisât obtenu par un protocole similaire à partir de graines d'arachide grillées, par *Aspergillus oryzae*, déterminée par test ELISA

où A représente l'absorbance à 450 nm

### 2.3/ Fermentation par *Bacillus subtilis*

Après 72 heures de fermentation par *Bacillus subtilis*, et extraction protéique, suivant le protocole indiqué ci-dessus, les protéines de deux fractions obtenues (Fraction

soluble et Fraction insoluble) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Le témoin utilisé est un extrait protéique de graines d'arachide crues.

Le gel obtenu après coloration est montré sur la figure 9.

On y observe que pour les fractions protéiques obtenues après fermentation de l'homogénéisât (Pistes 3 et 4), par rapport à l'extrait brut de graines d'arachide non traitées (Piste 2), les bandes correspondant aux allergènes majeurs de l'arachide (environ 63 kDa pour Ara h, environ 42-45 kDa pour Ara h 3 et environ 16 et 17 kDa pour Ara h 2) ont disparu.

Le résultat de l'analyse par Western blot de ces mêmes fractions est montré sur la figure 10. On n'y observe, pour les extraits obtenus après traitement par fermentation (Pistes 2 et 3), aucune bande témoin de la liaison de protéines à l'un quelconque des trois anticorps anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 ou anti-Ara h 3.

Les résultats obtenus par dosage ELISA, pour chacun des anticorps anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 et anti-Ara h 3, après 72 heures de fermentation, sont montrés dans le Tableau 3 ci-après.

	Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Non Traité	456		351		382	
Traité Surnageant	23	-95%	18	-95%	17	-96%
Traité fraction soluble	24	-95%	19	-95%	21	-95%
Traité fraction insoluble	12	-97%	15	-96%	13	-97%

Tableau 3 – Teneur en Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 des extraits protéiques après fermentation de l'homogénéisât de l'Exemple A par *Bacillus subtilis*, déterminée par test ELISA

où A représente l'absorbance à 450 nm

Par rapport à l'extrait protéique obtenu à partir de graines d'arachide non traitées, on observe, après 72 h de fermentation, une diminution significative de la teneur en

protéines allergènes majeurs Ara h 1, Ara h 2, et Ara h 3. Pour toutes les fractions d'extraction, cette diminution est supérieure ou égale à 95 %.

Les résultats ci-dessus montrent clairement que le fermentât obtenu après broyage de graines d'arachide crues, homogénéisation à ultra haute pression et fermentation par *Bacillus subtilis*, conformément à un mode de mise en œuvre particulier du procédé selon l'invention, présente un degré d'allergénicité fortement réduit par rapport à l'arachide crue non traitée de départ. Les principales protéines allergènes de l'arachide, Ara h 1, Ara h 2, et Ara h 3, ont été efficacement extraites de la matrice solide initiale par l'homogénéisation à ultra haute pression, et efficacement dégradées par le micro-organisme. Après 72 heures de fermentation, l'allergénicité de la matrice initiale a été réduite d'au moins 95 %.

La description ci-avant illustre clairement que par ses différentes caractéristiques et leurs avantages, la présente invention atteint les objectifs qu'elle s'était fixés. En particulier, elle fournit un procédé de préparation d'un aliment hypoallergénique, à partir d'une matrice alimentaire solide à forte allergénicité, qui est non polluant, et qui permet de conserver dans l'aliment les propriétés gustatives, organoleptiques et nutritionnelles de la matrice de départ.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Chung S.-Y., Champagne E.T. (2007) Effects of phytic acid on peanut allergens and allergenic properties of Extracts. J. Agric. Food Chem. 55:9054-9058

Chung S.-Y., Yang W. (2008) Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. J. Food Chem. 73:C400

Davis P., Williams, S (1998) Protein modification by thermal processing. Allergy 53:102-105

Lecluse W.J. (1979) Homogénéisateurs à haute pression. Informations Chimie 191: 1-8

Van Boxtel E.L., Koppelman S.J. et al. (2008) Determination of pepsin-susceptible and pepsin-resistant epitopes in native and heat-treated peanut allergen ara h 1. J. Agric. Food Chem. 56:2223-2230

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un aliment à allergénicité réduite à partir d'une matrice alimentaire solide particulière à plus forte allergénicité, contenant des protéines allergènes, caractérisé en ce que ledit procédé comprend une étape de traitement d'une dispersion de ladite matrice alimentaire solide dans un véhicule aqueux, par homogénéisation à haute pression, de sorte à obtenir un homogénéisât constitué d'une dispersion de protéines allergènes initialement contenues dans la matrice en mélange avec des particules solides de ladite matrice.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matrice alimentaire solide est constituée de graines d'arachide et/ou de fruits à coque.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la matrice alimentaire solide est soumise à une étape de broyage préalablement à l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression, de préférence après dispersion dans le véhicule aqueux.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la dispersion de ladite matrice alimentaire solide dans un véhicule aqueux comprend un rapport en poids de matrice alimentaire solide par volume de véhicule aqueux compris entre 50/50 et 5/95, de préférence égal à 20/80.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression est réalisée à une pression comprise entre 100 et 50 000 bars, de préférence entre 200 et 1 000 bars, préférentiellement à 500 bars.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression est réalisée de sorte à obtenir une granulométrie de l'homogénéisât inférieure à 20  $\mu$ m, de préférence environ égale à 10  $\mu$ m, en diamètre.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce

que l'étape de traitement par homogénéisation à haute pression est suivie par une étape de traitement de l'homogénéisât obtenu par un agent de dégradation des protéines.

**8.** Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'agent de dégradation des protéines est un agent protéolytique.

**9.** Procédé selon l'une des revendications 7 à 8, caractérisé en ce que l'agent de dégradation des protéines est un micro-organisme, de préférence un micro-organisme probiotique.

**10.** Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit micro-organisme est une bactérie ou un champignon.

**11.** Procédé selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que ledit micro-organisme est inoculé dans ledit homogénéisât, et le milieu ainsi obtenu est laissé fermenter pendant une durée suffisante pour diminuer d'au moins 90 % l'allergénicité des protéines allergènes contenues dans l'homogénéisât.

**12.** Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'homogénéisât est additionné de sucre, d'amidon et/ou d'acide acétique préalablement à la fermentation.

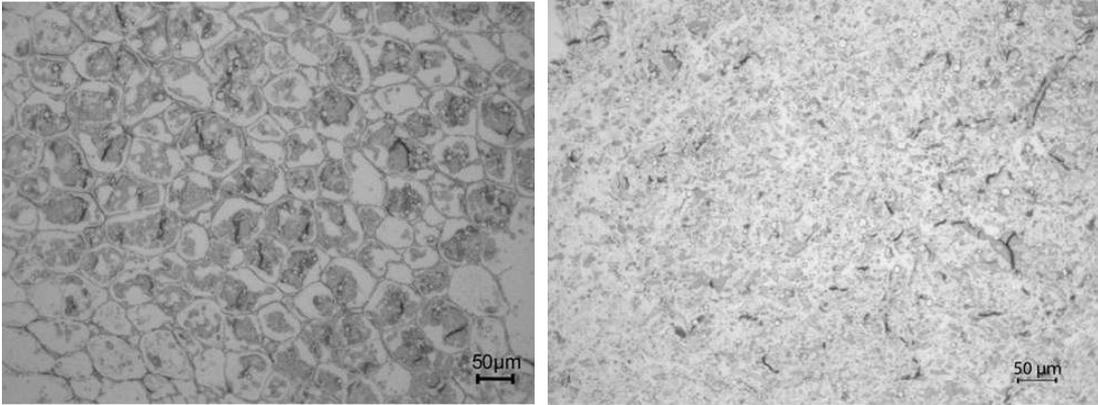


FIG. 1

FIG.2

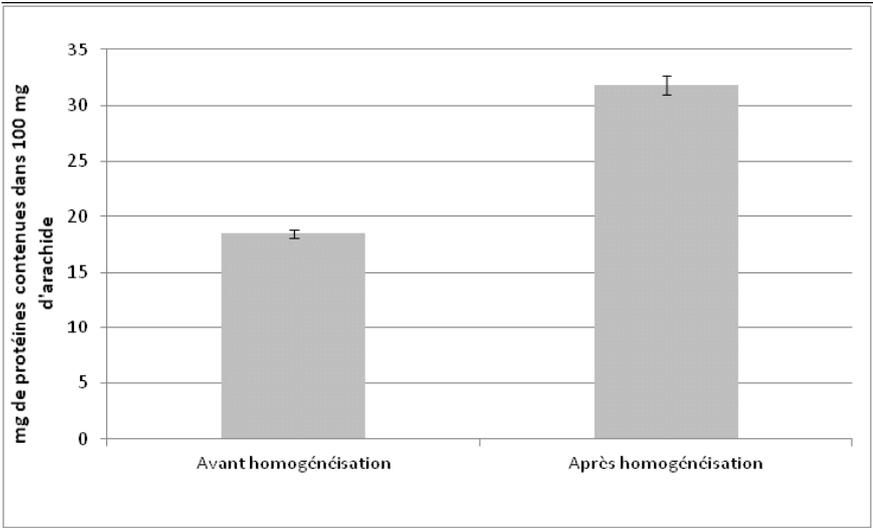


FIG.3

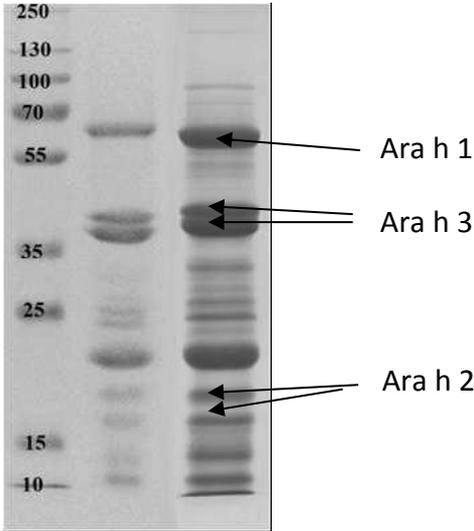


FIG.4

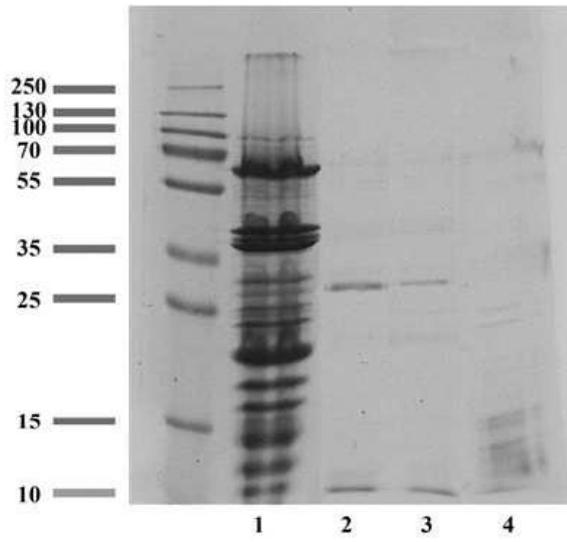


FIG. 5

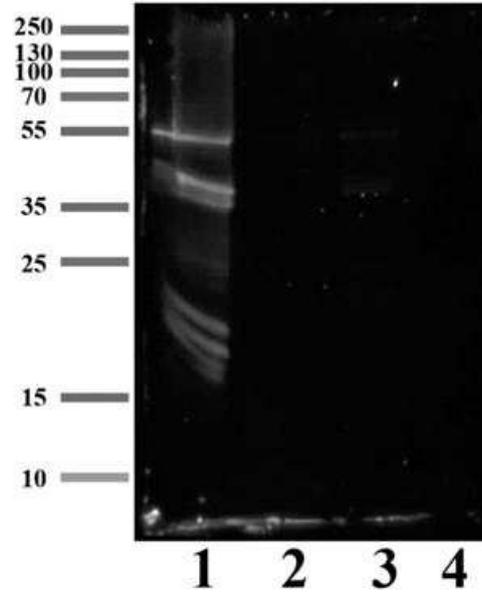


FIG. 6

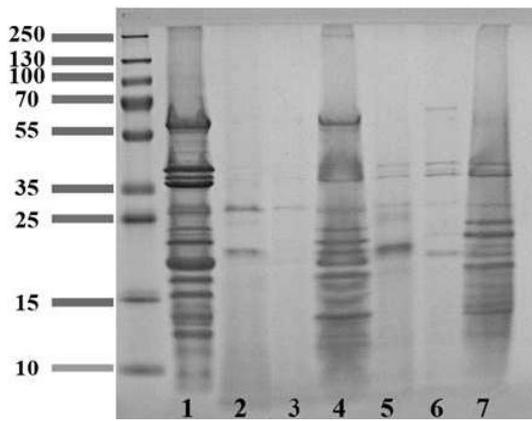


FIG. 7

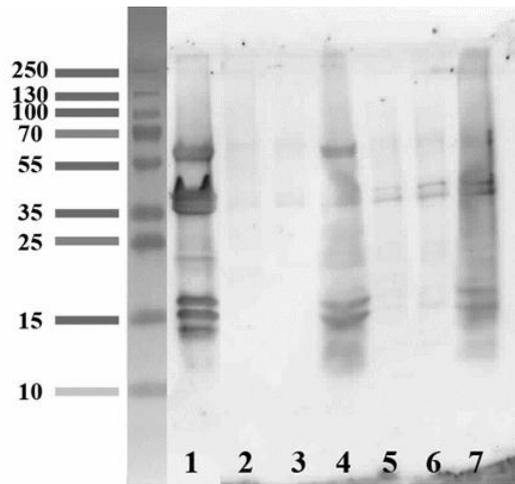


FIG. 8

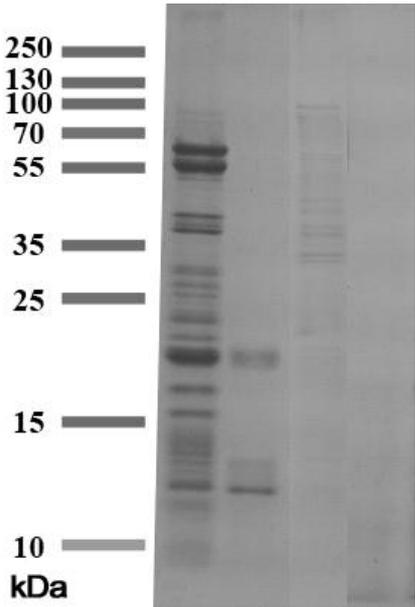


FIG. 9

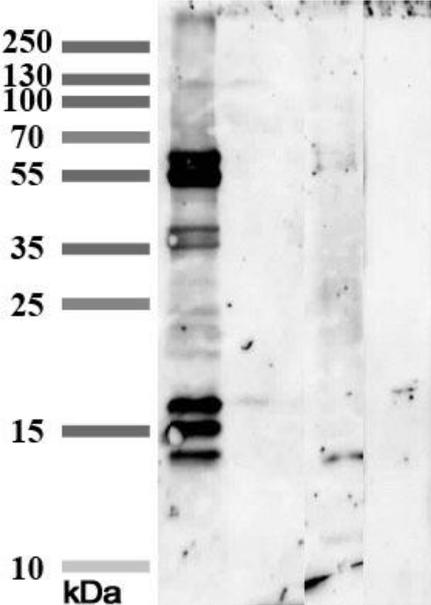


FIG. 10

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

---

**TITRE**

---

**PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN ALIMENT HYPOALLERGÉNIQUE**

**ABREGÉ**

---

L'invention concerne un procédé de préparation d'un aliment à allergénicité réduite à partir d'une matrice alimentaire solide particulière à plus forte allergénicité, contenant des protéines allergènes, notamment d'une matrice à base d'arachide et/ou de fruits à coque, qui comprend une étape de traitement d'une dispersion de ladite matrice alimentaire solide dans un véhicule aqueux, par homogénéisation à haute pression, de sorte à obtenir un homogénéisât constitué d'une dispersion de protéines allergènes initialement contenues dans la matrice en mélange avec des particules solides de cette matrice. Cette étape d'homogénéisation peut être précédée d'une étape de broyage de la matrice en dispersion, et suivie d'une étape de traitement de l'homogénéisât par un agent de dégradation des protéines, notamment par un micro-organisme probiotique.

**AUTHOR :** Etienne BRUNET

**TITLE :** Development of an industrial process to reduce peanut allergenicity

---

**ABSTRACT**

The number of peanut allergic patients has been increased in the last decades in Western countries. The high severity of allergic symptoms when peanut is ingested and the ubiquity use of peanut in food process (sometimes as a hidden food), make complex the all-day life of peanut allergic patients and their specific regime. Peanut proteins responsible for allergic reactions are thirteen (from Ara h 1 to Ara h 13). They show different immunoreactivity towards allergic patients, and three of them are considered as major allergens (Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3). Our study consisted in the definition of an industrial process concluded by the degradation of peanut protein in order to reduce their allergenicity. Our research leads to the breakdown of peanut matrix up to high pressure homogenization. This process reduces the particle size and explodes the protein bodies, so the solubility of proteins is highly increased. The next step uses a microorganism (fungi and bacteria) that produces high quantity of proteases responsible for the peanut proteins degradation. The specific rabbit antibodies towards peanut allergens has shown a reduced signal for the hydrolyzed peanut proteins, and let raise the hypothesis of an allergic diminution. Some complementary tests have to be done in order to confirm this hypothesis. If the results from the clinical study are good, we can expect in a close future the process industrialization.

---

**KEYWORDS :**

**Food Allergy, peanut, process, homogenization, hypoallergenic**

---

**AUTEUR :** Etienne BRUNET

**TITRE :** Mise au point d'un procédé industriel de réduction de l'allergénicité de l'arachide

**DIRECTEURS DE THESE :** Pr. Annick Barre et Pr. Pierre Rougé

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** 6 mai 2013 - Salle du Conseil de la Faculté de Pharmacie

---

**RESUME** en français

Les patients allergiques à l'arachide voient leur nombre augmenter depuis les dernières décennies dans les pays occidentalisés. La sévérité des symptômes allergiques encourus en cas d'ingestion couplée à sa présence dans de nombreuses préparations alimentaires industrielles, parfois comme aliment caché, complexifie grandement le régime d'éviction des patients allergiques. Les protéines de l'arachide responsables des réactions allergiques sont au nombre de 13 (de Ara h 1 à Ara h 13). Elles présentent des réactivités immunogènes différentes, et trois d'entre elles sont considérés aujourd'hui comme des allergènes majeurs : Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3. Notre étude a constitué à définir un procédé industriel pour conduire à la dégradation protéolytique des allergènes de l'arachide en vue de diminuer leur allergénicité. La voie envisagée comprend une déstructuration de la matrice « arachide » grâce à l'homogénéisation haute pression. Cette diminution de la taille des particules permet une déstructuration des corps protéiques qui conduit *in fine* à une meilleure solubilisation des protéines de l'arachide. L'étape suivante met en œuvre une fermentation par des microorganismes fongiques ou bactériens, qui par la production d'enzymes sont responsables de la dégradation des allergènes. L'étude de la reconnaissance des protéines dégradées par des IgG de lapin spécifiques a montré une diminution significative du signal en Western Blot et ELISA, qui permet de poser l'hypothèse d'une diminution de l'allergénicité. Des tests complémentaires doivent être réalisés pour confirmer cliniquement cette hypothèse, et conduire, dans un futur proche, à l'industrialisation du process.

---

**MOTS CLES :**

**Allergie alimentaire, arachide, procédé, homogénéisation, hypoallergénique**

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Immunologie

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

UMR 152 Pharma-Dev, Faculté de Pharmacie, 35 Chemin des Maraichers, 31400 Toulouse