

# Thèse de Doctorat

Mathilde CLAUDE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : VENAM

Discipline : *Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment*

Unité de recherche : *INRA, UR 1268 BIA (Biopolymères, Interactions, Assemblages)*

Soutenue le 21 octobre 2016

## Agrégation thermique de l'ovalbumine et modulation de l'allergénicité

### JURY

Président : **Joël FLEURENCE**, Professeur des Universités, Université de Nantes

Rapporteurs : **Didier DUPONT**, Directeur de recherche, INRA, UMR 1253 STLO  
**Blaise CORTHESEY**, Professeur, Université de Lausanne

Examineurs : **Gaëlle BOUDRY**, Chargé de recherche, INRA, UR 1341 ADNC  
**Fabrice BATTAIS**, Chargé de recherche, INRS  
**Françoise NAU**, Professeur, Agrocampus Ouest

Directeur de Thèse : **Sandra DENERY-PAPINI**, Chargé de recherche, INRA, UR 1268 BIA

Co-encadrante de Thèse : **Chantal BROSSARD**, Chargé de recherche, INRA, UR 1268 BIA



## Résumé

L'allergie alimentaire est un problème de santé publique. Si de nombreux allergènes ont été identifiés, les formes sous lesquelles ces protéines doivent être consommées pour être mieux tolérées par le système immunitaire restent méconnues. L'œuf, aliment fréquemment responsable d'allergies alimentaires chez l'enfant, entre dans la composition de nombreux produits alimentaires et subit des traitements thermiques variés. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'effet de l'agrégation thermique sur l'allergénicité de l'ovalbumine (OVA), un allergène majeur de l'œuf. Une étude a mis en évidence que l'agrégation thermique de l'OVA module son allergénicité en augmentant la production d'IgG spécifiques lors de la sensibilisation dans un modèle murin et en diminuant le déclenchement par la modification de la capacité de liaison aux IgE et la capacité de dégranulation des basophiles avec les sérums de patients allergiques ou de souris sensibilisées. Au-delà du phénomène d'agrégation, la structure même des agrégats module l'allergénicité de l'OVA. Les petits agrégats formés en conditions électrostatiques répulsives induisent une production plus faible d'IgE chez la souris et diminuent le déclenchement par rapport aux larges agrégats formés en conditions répulsives minimales. L'agrégation de l'OVA modifie également sa capacité à activer des basophiles après digestion ou passage de la barrière intestinale. Ces résultats apportent des éléments de compréhension sur la tolérance aux formes cuites d'œuf et mettent en évidence un rôle de la structure des agrégats dans l'allergénicité de l'OVA.

**Mots clés :** Allergie alimentaire, Œuf, Agrégation protéique, Ovalbumine, IgE, Modèle murin d'allergie, Activation de basophiles



## **Abstract**

Food allergies constitute a public health problem. Many allergens were identified but the way proteins should be consumed in order to be better tolerated by the immune system remains unknown. Egg, one of the major causes of food allergy among children, is present in a wide range of food products and undergoes various thermal treatments. This work aimed at evaluate the effects of thermal aggregation on the allergenicity of ovalbumin (OVA), one major egg white allergen. A first study using murine model allowed highlighting that aggregation of OVA modulates allergenicity by influencing both phases of the allergic reaction. During the sensitization, specific IgG production increased. OVA aggregation also decreased its IgE-binding capacity and basophil activation ability with both mice sera and sera from egg allergic patients. Structure of the aggregates also modified the OVA allergenicity. Small aggregates (few tens nanometers) formed under repulsive electrostatic conditions (induced a lower IgE production during the sensitization phase that resulted in decreased symptoms during elicitation phase compared to larger aggregates (few tens micrometers) formed under non-repulsive conditions. OVA aggregation also modified the basophil degranulation ability after digestion or transport across the epithelial barrier. All these results give some comprehensive elements about tolerance to cooked egg and allowed evidencing that aggregates structures should be taken into account in allergenicity studies.

**Keywords:** Food allergy, Egg, Protein Aggregation, Ovalbumin, IgE, Murine model of allergy, Basophil activation



## Liste des publications et communications

### Publications

Claude, M., Lupi, R., Bouchaud, G., Bodinier, M., Brossard, C., & Denery-Papini, S. (2016). The thermal aggregation of ovalbumin as large particles decreases its allergenicity for egg allergic patients and in a murine model. *Food Chemistry*, 203, 136–144.

Claude, M., Bouchaud, G., Lupi, R., Castan, L., Tranquet, O., Denery-Papini, S., Bodinier, M., Brossard, C. How protein aggregates can reduce allergenicity: comparison of ovalbumin heated under opposite electrostatic conditions. (Soumis).

Claude, M., Picariello, G., Lupi, R., Rogniaux, H., Ménard S., Larré, C., Brossard, C., Denery-Papini, S. Degranulation ability of native and aggregated ovalbumin after *in vitro* simulated digestion or transcytosis. (En rédaction)

### Communications orales

Claude M., Lupi R., Bouchaud G., Bodinier M., Brossard C., Denery-Papini S. Allergenicity of thermally aggregated ovalbumin as large agglomerated particles in a murine model. First International Conference – COST Improving Allergy Risk Assessment Strategy for new food proteins, Belgrade (Serbie), 24-26 Novembre 2015

Claude M., Lupi, R., Rogniaux, H., Larré, C., Denery-Papini, S., Brossard, C. Agrégats protéiques et allergénicité, effet de l'agrégation sur les interactions allergènes-IgE dans l'allergie alimentaire. Journée scientifique Analyse structurale et métabolomique, Angers (France), 16 juin 2016

Claude, M., Bouchaud, G., Lupi, R., Castan, L., Tranquet, O., Denery-Papini, S., Bodinier, M., Brossard, C. Agrégation thermique et modulation de l'allergénicité. Journée Jeunes Chercheurs INRA Unité BIA, Nantes (France), 21 juin 2016

Claude, M., Lupi, R., Picariello, G., Rogniaux, H., Larré, C., Brossard, C., Denery-Papini, S. Degranulation ability of native and aggregated ovalbumin after *in vitro* simulated digestion. Second International Conference – COST Improving Allergy Risk Assessment Strategy for new food proteins, Varsovie (Pologne), 20-22 Septembre 2016

## Communications affichées

Claude M., Lupi, R., Bouchaud, G., Bodinier, M., Brossard, C., & Denery-Papini, S. Compared allergenicity in mice of native and thermally aggregated ovalbumin as large agglomerated particles. 6<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Allergology, Lisbonne (Portugal), 19-21 Novembre 2015

Claude M., Lupi R., Bouchaud G., Bodinier M., Brossard C., Denery-Papini S. Compared allergenicity in mice of native and thermally aggregated ovalbumin as large agglomerated particles. First International Conference – COST Improving Allergy Risk Assessment Strategy for new food proteins, Belgrade (Serbie), 24-26 Novembre 2015

Claude M., Lupi R., Bouchaud G., Bodinier M., Brossard C., Denery-Papini S. Allergenicity of thermally aggregated ovalbumin for egg allergic patients and in a murine model. Journée de recherché en allergologie, Paris (France), 19 Avril 2015

Claude M., Lupi R., Bouchaud G., Bodinier M., Brossard C., Denery-Papini S. L'agrégation de l'ovalbumine induite par traitement thermique modifie son allergénicité. Congrès francophone d'allergologie, Paris (France), 20-22 Avril 2016

Claude M., Bouchaud G., Lupi R., Castan L., Tranquet O., Denery-Papini S., Bodinier M., Brossard C. Aggregation of ovalbumin and allergenicity. Food Allergy and Anaphylaxis Meeting, Rome (Italie), 13-15 Octobre 2016

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du Jury. A Monsieur Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes qui a accepté de présider mon jury, Messieurs Didier Dupont et Blaise Corthésy pour le temps précieux pris à évaluer ce manuscrit et Mesdames Gaëlle Boudry et Françoise Nau et Monsieur Fabrice Battais d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens ensuite à remercier Sandra Denery-Papini, ma directrice de thèse. J'ai beaucoup apprécié sa gentillesse, son écoute, ses précieux conseils, son soutien au quotidien et son calme qui a su m'apaiser dans les moments difficiles. Je remercie également mes encadrantes, Chantal Brossard pour sa gentillesse, sa présence, le temps passé à me former et à échanger, et sa disponibilité de tout instant et Marie Bodinier, pour son aide et ses conseils. Si je suis arrivée jusqu'au bout de cette thèse, c'est en grande partie grâce à vous.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Sandrine Ménard et Philippe Aubert qui ont pris le temps de me donner des conseils avisés, une aide et un regard critique au cours de ces trois années.

J'aimerais aussi remercier les autres membres de l'équipe allergie Colette Larré, Olivier Tranquet, Florence Pineau, Grégory Bouchaud, Valérie Echasseriau-Laporte, Laurence Lavenant, Gilbert Deshayes pour m'avoir accueillie dans une ambiance chaleureuse et aidée tout au long de ma thèse. Merci d'avoir supporté mes humeurs et mon humour!

A toutes les autres personnes ayant croisé mon chemin à BIA, merci pour ces moments de détente, d'écoute et d'échanges scientifiques.

A Gianluca Picariello, merci de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à Avellino en Italie et pris le temps de me montrer différentes techniques.

A mes maitres de stage, Amélie Deglaire, Claire Bourlieu et Olivia Ménard qui m'ont donné le goût pour la recherche et leur aide pour continuer en thèse. Tout a commencé avec vous.

Merci également aux personnes de passage dans l'équipe, Laure, Clélia et Audrey. Bon courage pour la suite des aventures. Merci Manon Pietri, pour ton aide technique mais surtout morale au début de ma thèse. Et merci à Glenn et Mathieu, pour tous ces moments de décompression. Un remerciement particulier à Roberta, qui au-delà de son aide professionnelle, a toujours été là pour moi dans les bons et les mauvais moments. Ma thèse aurait été beaucoup plus difficile sans toi et j'ai gagné une véritable amie.

A ma famille et mes amis qui ont su me soutenir pendant toute ma vie étudiante et surtout dans ces dernières années. Merci surtout à mes parents, pour les conseils, le soutien, les pensées positives, la baguette magique très utile en fin de thèse. Merci pour tout. Une mention spéciale, pour toi Kévin qui m'a supportée pendant ces trois années.

# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	9
<b>Liste des tableaux</b> .....	11
<b>Liste des figures</b> .....	12
<b>Chapitre 1 – Introduction</b> .....	17
1. Généralités sur les allergies alimentaires .....	19
1.1. Définition de l’allergie et classification .....	19
1.2. Prévalence .....	20
1.3. Facteurs influençant le développement des allergies alimentaires .....	20
1.3.1. Facteurs génétiques .....	20
1.3.2. Epigénétique .....	21
1.3.3. Période et voie d’introduction de l’aliment .....	22
1.3.4. Hypothèse hygiéniste .....	23
1.3.5. Facteurs alimentaires .....	24
1.4. Symptômes cliniques et diagnostic des allergies alimentaires IgE-médiées .....	24
1.4.1. Symptômes .....	24
1.4.2. Diagnostic .....	25
1.5. Gestion, traitement et prévention de l’allergie alimentaire .....	27
1.5.1. Gestion .....	27
1.5.2. Traitement .....	27
1.5.3. Prévention .....	28
1.6. Aliments, allergènes et épitopes .....	28
1.6.1. Aliments .....	28
1.6.2. Définition et caractéristiques des allergènes alimentaires .....	28
1.6.3. Classification des allergènes alimentaires .....	30
1.6.4. Les épitopes .....	32

1.7.	L'allergie à l'œuf .....	33
1.7.1.	Prévalence et caractéristiques cliniques .....	33
1.7.2.	Les différents allergènes de l'œuf, l'ovalbumine et l'ovomucoïde .....	34
1.7.3.	Epitopes de l'ovalbumine .....	36
<b>2.</b>	<b>Mécanismes de la tolérance et de l'allergie IgE-médiée .....</b>	<b>38</b>
2.1.	Capture et présentation de l'antigène .....	38
2.2.	Mécanisme de la tolérance .....	39
2.3.	Balance et déséquilibre Th1/Th2 .....	40
2.4.	Mécanisme de l'allergie alimentaire IgE médiée .....	41
2.4.1.	Phase de sensibilisation .....	42
2.4.2.	Phase de déclenchement .....	43
2.5.	Evaluation de l'allergénicité .....	43
2.5.1.	Tests <i>in vitro</i> .....	44
2.5.2.	Modèle animal .....	45
<b>3.</b>	<b>Digestion et passage des allergènes .....</b>	<b>46</b>
3.1	Le tractus gastro-intestinal et la structure de l'intestin .....	47
3.2.	Le système immunitaire associé à l'intestin .....	48
3.3.	Digestion des protéines .....	49
3.3.1.	Mécanisme de digestion des protéines .....	49
3.3.2.	Modèles de digestion <i>in vitro</i> .....	50
3.4.	Passage de la barrière intestinale .....	50
3.4.1.	Passage chez des individus non sensibilisés .....	51
3.4.2.	Passage chez des individus sensibilisés .....	52
3.4.3.	Modèles d'étude du passage de l'allergène .....	53
<b>4.</b>	<b>Traitements thermiques et allergénicité .....</b>	<b>55</b>
4.1.	Traitement thermique, structure des protéines et agrégation .....	55
4.2.	Modifications structurales et allergénicité .....	59
4.3.	Modifications chimiques et allergénicité .....	61

4.4.	Traitement thermique et allergénicité de l'œuf .....	61
4.4.1.	Capacité de sensibilisation .....	62
4.4.2.	Capacité de déclenchement.....	63
4.4.3.	Digestibilité.....	64
4.4.4.	Passage de la barrière intestinale .....	65
5.	Conclusion, objectif du travail et démarche expérimentale .....	66
<b>Chapitre 2 – Matériel et Méthodes .....</b>		<b>69</b>
1.	Agrégation .....	71
2.	Sérums patients .....	73
3.	Modèle murin d'allergie à l'ovalbumine.....	74
3.1.	Description du modèle.....	74
3.2.	Evaluation de la phase de sensibilisation.....	75
3.3.	Evaluation de la phase de déclenchement.....	76
3.3.1.	Evaluation des symptômes et mesure de la température .....	76
3.3.2.	Mesure du gonflement de l'oreille.....	77
3.3.3.	Dosage médiateurs sanguins.....	77
4.	Modèles <i>in vitro</i> d'activation des basophiles.....	77
4.1.	Lignées cellulaires .....	78
4.2.	Description du test.....	78
4.3.	Expression des résultats.....	80
5.	Evaluation de l'aptitude à induire une dégranulation après digestion ou passage de la barrière intestinale.....	80
5.1.	Protocole de digestion .....	80
5.2.	Protocole de passage et évaluation de la perméabilité paracellulaire .....	81
5.3.	Evaluation capacité d'activation des basophiles après digestion ou passage .....	81

<b>Chapitre 3 – Allergénicité de l’ovalbumine native et agrégée sous forme de larges particules.....</b>	<b>83</b>
1. Introduction .....	85
2. Material and methods.....	88
2.1. The preparation and characterization of native and aggregated OVA .....	88
2.2. Sera from egg-allergic patients and controls .....	89
2.3. Sensitization and oral challenge of mice with N-OVA and A-OVA .....	89
2.4. Measurement of Ig-binding to native and aggregated OVA in patient or mice sera by F-ELISA.....	90
2.5. Activation of Rat basophil leukemia (RBL) cells by native and aggregated OVA in the presence of patient or mice sera .....	90
2.6. Statistical analyses .....	91
3. Results .....	92
3.1. Characterization of the aggregate size distribution.....	92
3.2. IgE and IgG <sub>4</sub> -binding to native and aggregated OVA in sera from egg-allergic patients .....	92
3.3. RBL-SX38 cell activation by native and aggregated OVA in presence of patient IgE ..	94
3.4. Immunoglobulin production in mice sensitized with native and aggregated OVA ....	95
3.5. RBL cell activation by native and aggregated OVA in presence of mouse IgE .....	97
3.6. Elicitation potency by native and aggregated OVA in mice .....	98
4. Discussion .....	98
5. Bilan de l’étude sur l’effet de larges agrégats sur l’allergénicité de l’ovalbumine .....	102

<b>Chapitre 4 – Allergénicité de petits et de larges agrégats de l’ovalbumine</b> .....	105
1. Introduction .....	107
2. Materials and Methods.....	110
2.1. Protein preparation and characterization of OVA aggregates.....	110
2.2. Mouse model of food allergy .....	110
2.3. Food allergic reaction evaluation.....	111
2.4. Histological analysis .....	111
2.5. RBL test.....	111
2.6. Immunoglobulin analyses .....	111
2.7. Flow cytometry.....	112
2.8. Immunoglobulin-E binding to solid-phase synthetic peptides (Pepscan).....	112
2.9. Statistical analysis.....	113
3. Results .....	113
3.1. Size distribution of the aggregates.....	113
3.2. Allergenic potential of aggregates in response to N.....	114
3.2.1. Elicitation with N after sensitization with the aggregates .....	114
3.2.2. Ig production upon sensitization with the aggregates.....	116
3.2.3. Cell phenotypes induced by sensitization with the aggregates.....	117
3.3. Specificity of induced IgE.....	118
4. Discussion .....	119
5. Bilan de l’étude sur l’allergénicité de petits et de larges agrégats....	122

<b>Chapitre 5 – Effet de la digestion ou du passage sur la capacité antigénique de l’ovalbumine native ou agrégée .....</b>	<b>125</b>
1. Introduction .....	127
2. Material and Methods .....	129
2.1. Protein preparation and characterization OVA aggregates .....	129
2.2. Sera from egg-allergic patients .....	129
2.3. Measurement of IgE-binding to native and aggregated OVA in patient by F-ELISA. ....	130
2.4. <i>In vitro</i> digestion.....	130
2.4.1. Simplified gastroduodenal digestion.....	130
2.4.2. Complete digestion .....	130
2.5. Peptides identification by LC-MS/MS.....	131
2.6. RP-HPLC.....	132
2.7. Ussing Chambers.....	132
2.8. Activation of Rat basophil leukemia (RBL) cells by native and aggregated OVA in the presence of patient sera .....	133
2.9. Statistical analysis.....	133
3. Results .....	134
3.1. Visual observation of the macrostructure and characterization of the aggregated samples .....	134
3.2. IgE-binding to native and OVA aggregates in sera from egg allergic patients.....	134
3.3. Characterization of the digests .....	135
3.3.1. Peptidomic analysis of the composition of digests from the simplified digestion protocol .....	135
3.3.2. Comparisons of the digests at the end of the complete digestion .....	136

3.4.	Impact of the digestion on the ability of native and aggregated OVA to induce the RBL-SX38 cell activation .....	137
3.4.1.	Comparison of the degranulation ability of native and aggregated OVA after gastric and intestinal digestion in the simplified and complete protocols .....	137
3.4.2.	Impact of the digestion steps with the complete protocol on the degranulation ability of native and aggregated OVA .....	138
3.5.	Transport through the intestinal barrier and degranulation ability after transcytosis ..	139
3.5.1.	Paracellular permeability .....	139
3.5.2.	RBL-SX38 cell activation by native and aggregated OVA after transcytosis by jejunum or Peyer's patches in presence of patient IgE.....	139
4.	Discussion .....	140
5.	Bilan de l'étude de la capacité antigénique de l'ovalbumine native et sous forme agrégée après digestion ou passage de la barrière intestinale...	143
	<b>Chapitre 6 - Discussion, conclusions et perspectives.....</b>	<b>145</b>
1.	Discussion .....	147
1.1.	Capacité de sensibilisation .....	147
1.2.	Capacité de déclenchement.....	149
1.3.	Capacité antigénique et épitopes .....	152
1.4.	Capacité antigénique après digestion et passage.....	153
2.	Conclusions .....	157
3.	Perspectives.....	157
	<b>Références .....</b>	<b>163</b>



## Liste des abréviations

A-L	Larges agrégats d'ovalbumine
A-OVA	Ovalbumine agrégée
A-s	Petits agrégats d'ovalbumine
BBM	Enzymes de la bordure en brosse
BCR	Récepteur exprimé à la surface des lymphocytes B
Cellules M	Cellules Microfold
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DC	Cellule dendritique
DLS	Dynamic light scattering
D <sub>2</sub> O	Eau deutérée
EC50	Concentration en protéine nécessaire pour induire 50% du maximum de libération de la $\beta$ -hexosaminidase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EW	Blanc d'œuf
GALT	Système immunitaire associé à l'intestin
IF	Intensité de fluorescence
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide – Spectrométrie de masse en tandem
LLS	Laser light scattering
MaxD	Maximum de dégranulation des basophiles
mMCP-1	mouse mast cell protease-1
N-OVA ou N	Ovalbumine native
OVA	Ovalbumine
OVM	Ovomucoïde
RBL	Rat Basophil Leukemia
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute pression en phase inverse
TCR	Récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T naïfs
Th	Lymphocyte T helper ou T auxiliaire
T reg	Lymphocytes T régulateurs



## Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Principales super-familles et familles d'allergènes d'origine végétale

**Tableau 2 :** Familles d'allergènes d'origine animale

**Tableaux 3 :** Prévalence de la sensibilisation aux principaux allergènes majeurs de l'œuf (D'après Matsuo et al., 2015) chez des nourrissons et enfants avec allergie à l'œuf suspectée pour Gal d 1 à 5 et chez une population de 2 à 74 ans pour Gal d 6

**Tableau 4 :** Effets du traitement thermique de l'OVA ou du blanc d'œuf sur la phase de sensibilisation par rapport à la forme non cuite. 1 (Watanabe et al., 2014), 2 (Golias et al., 2012), 3 (Rupa et al., 2015)

**Tableau 5 :** Effets du traitement thermique de l'OVA ou du blanc d'œuf sur la phase de déclenchement par rapport à la forme non cuite. 1 (Martos et al., 2011) ; 2 (Joo and Kato, 2006) ; 3 (Bloom et al., 2014) ; 4 (Shin et al., 2013) ; 5 (Jiménez-Saiz et al., 2011) ; 6 (Golias et al., 2012)

**Tableau 6 :** Effets du traitement thermique sur la digestibilité de l'OVA et son allergénicité après digestion par rapport à la forme non cuite. 1 (Martos et al., 2011) ; 2 (Joo and Kato, 2006) ; 3 (Jiménez-Saiz et al., 2011) ; 4 (Nyemb et al., 2014a) ; 5 (Nyemb et al., 2016)

**Tableau 7 :** Effets du traitement thermique sur le passage de l'OVA et son allergénicité après passage par rapport à la forme non cuite. 1 (Martos et al., 2011) ; 2 (Joo and Kato, 2006) ; 3 (Watanabe et al., 2014)

**Tableau 8 :** Capacité de liaison aux IgE humaines des 8 sérums sélectionnés pour le pool

**Tableau 9 :** Marquage extracellulaire et intracellulaire des populations cellulaires étudiées

**Tableau 10 :** Grille de notation des symptômes

**Table 11 :** Populations of intestinal immune cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches (expressed as % of CD4+ T cells) of mice sensitized with large (A-L) and small (A-s) aggregates and mice sensitized with native ovalbumin (N) as the positive control and non-sensitized mice as the negative control.

**Tableau 12 :** Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats : A-L) par rapport à la forme native (N) sur la phase de sensibilisation

**Tableau 13 :** Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats : A-L) par rapport à la forme native (N) sur les populations cellulaires induites au cours de la phase de sensibilisation

**Tableau 14 :** Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats: A-L) par rapport à la forme native (N) sur la phase de déclenchement

**Tableau 15 :** Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats: A-L) par rapport à la forme native (N) sur la digestibilité et sur la capacité antigénique après digestion

**Tableau 16 :** Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats: A-L) par rapport à la forme native (N) sur la capacité antigénique après passage par le jéjunum ou les plaques de Peyer (PP)

**Tableau 17 :** Bilan des résultats obtenus sur l'effet de l'agrégation et de la structure de l'OVA sur la sensibilisation, le déclenchement et l'antigénicité avant et après digestion ou passage par comparaison de l'OVA native (N), de petits agrégats de type linéaire (A-s), de gros agrégats de type sphérique aggloméré (A-L) et de contrôles.

## Liste des figures

**Figure 1 :** Classification des hypersensibilités (adapté de Johansson et al., 2001)

**Figure 2 :** Fenêtre d'exposition possible pour l'introduction d'aliments par rapport au risque de développer une allergie alimentaire ( D'après S. L. Prescott et al., 2008)

**Figure 3 :** Etapes du diagnostic de l'allergie alimentaire

**Figure 4 :** Représentation schématique d'épitopes linéaires et conformationnels

**Figure 5 :** Séquence d'acides aminés de l'OVA et épitopes identifiés chez l'homme. Les séquences soulignées en rouge et vert correspondent respectivement à l'étude de Mine & Rupa en 2003 et de Benedé et al. en 2014. Les séquences soulignées en vert correspondent à celles reconnues par au moins 40% des patients.

**Figure 6 :** Localisation des épitopes IgE identifiés sur la structure tertiaire de l'OVA (Mine and Rupa, 2003)

**Figure 7 :** Séquence d'acides aminés de l'OVA et épitopes identifiés chez la souris en fonction de la voie de sensibilisation. Les séquences soulignées en vert, rouge et bleu correspondent respectivement à la voie intrapéritonéale, la voie orale et la voie sous-cutanée (D'après Mine & Yang, 2007)

**Figure 8 :** Capture et présentation de l'antigène et différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T helper (Th)

**Figure 9 :** Activation des lymphocytes B et différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgE

**Figure 10 :** Fixation des IgE sur les mastocytes et les basophiles

**Figure 11:** Dégranulation des basophiles et des mastocytes

**Figure 12 :** Anatomie du tractus gastro-intestinal (D'après Coudeyras & Forestier, 2010)

**Figure 13 :** Système immunitaire associé à l'intestin (D'après Magalhaes et al., 2007)

**Figure 14:** Fonctions du tractus gastro-intestinal dans la digestion (Guerra et al., 2012)

**Figure 15 :** Mécanisme de passage de l'antigène chez un individu non sensibilisé (D'après Perrier & Corthésy, 2011)

**Figure 16 :** Mécanisme de passage de l'antigène chez un individu sensibilisé (D'après Perrier, Thierry, Mercenier, & Corthésy, 2010)

**Figure 17 :** Représentation schématique des chambres de Ussing

**Figure 18 :** Différenciation des cellules Caco-2

**Figure 19 :** Modifications de la structure de la protéine en fonction de la température au cours d'un traitement thermique (D'après Davis & Williams, 1998)

**Figure 20 :** Modèle de dénaturation thermique et d'agrégation de l'OVA (D'après Koseki, Kitabatake, & Doi, 1989)

**Figure 21 :** Schéma de l'agrégation de l'OVA en fonction de la charge de la molécule (Weijers et al., 2008)

**Figure 22 :** Schéma de l'agrégation de l'OVA en fonction du pH et de la force ionique (Nyemb et al., 2014a)

**Figure 23 :** Schéma des modifications induites par traitement thermique sur les épitopes

**Figure 24 :** Effets potentiels du chauffage sur la digestion, l'absorption et la réactivité immunitaire d'allergène alimentaire (Rahaman et al., 2016)

**Figure 25 :** Caractéristiques des deux agrégats sélectionnés (Nyemb et al., 2014a)

**Figure 26 :** Macrostructure des deux types d'agrégats sélectionnés : dispersion translucide pour les agrégats formés à pH 9/0,03M et dispersion opaque pour les agrégats formés à pH5/0,8M

**Figure 27 :** Schéma du protocole d'étude à l'aide du modèle souris d'allergie alimentaire

**Figure 28 :** Etapes du test cellulaire de dégranulation des basophiles

**Figure 29:** Particle size distributions of the aggregated ovalbumin samples prepared for sensitization (dotted line) and challenge (solid line) measured by LLS.

**Figure 30:** Human immunoglobulins binding, IgE and IgG4, to native ovalbumin (N-OVA) and aggregated ovalbumin (A-OVA) detected in the sera from 47 egg allergic children by indirect ELISA assay. Results are expressed as the ratio of fluorescence intensities to A-OVA on to N-OVA. Means of ratios (for all the sera) are represented by grey bars and results of comparison (one sample t-test) to theoretical value of 1 shown at the top. Sera used in degranulation tests are colored in grey.

**Figure 31:** ELISA inhibition assay performed with human sera and native ovalbumin (N-OVA, close symbols) and aggregated ovalbumin (A-OVA, open symbols) used as inhibitors of IgE-binding to N-OVA (squares) and A-OVA (triangles). (A) Inhibition curves for one serum with inhibitors from 0.02 to 50µg/ml. (B) Percentage of inhibition calculated for 14 sera at 50µg/ml inhibitor concentration, data from serum used in A are colored in grey. Individual data, means ± SEM and results of comparison tests (Wilcoxon test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ )

**Figure 32:** Basophil activation assay with human sera. RBL-SX38 cells were stimulated with native OVA (N-OVA, close symbol) or aggregated OVA (A-OVA, open symbol) at concentrations from  $2 \cdot 10^{-2}$  to  $2 \cdot 10^5$  ng/ml. (A) Degranulation curves for one serum from an egg allergic child (black) and one control serum (grey). (B) Max D and (C) EC50 data calculated for sera from 8 egg allergic children (data from serum shown in A are colored in grey). Individual data, means ± SEM and results of statistical tests (B: Paired t-test; C: Wilcoxon test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

**Figure 33:** Immunoglobulins production and binding upon sensitization detected by indirect ELISA assay. *Left:* Allergen specific IgE (A), IgG2a (B) and IgG1 (C) on native ovalbumin (N-OVA) and aggregated ovalbumin (A-OVA) in sera from mice sensitized with N-OVA (n=20, green), A-OVA (n=20, red) or control mice (CTL, n=10, grey). Results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured to A-OVA or N-OVA (IF) on fluorescence intensity measured to PBS (IF<sub>0</sub>). *Right:* Ratios of Ig binding to A-OVA on to N-OVA calculated by mouse for IgE (D), IgG2a (E) and IgG1 (F) as a function of sensitization. Individual data, means ± SEM and results of statistical tests (A,B,C: Kruskal-Wallis with a subsequent Dunn's test; D,E,F: Mann-Whitney and Wilcoxon test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figure 34:** Basophil activation assay with mice sera. RBL-2H3 cells were stimulated with native OVA (N-OVA, dark colors) or aggregated OVA (A-OVA, light colors) at concentrations between  $2 \cdot 10^{-3}$  and  $2 \cdot 10^5$  ng/ml. (A) Degranulation curves with pools of sera from mice sensitized with N-OVA (green squares) or A-OVA (red triangles) and from control mice (gray circles). (B) MaxD and (C) EC50 data, means ± SEM for two repetitions in quadruplicate and results of statistical tests (ANOVA with a subsequent Bonferonni post-test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figure 35:** Characterization of the aggregates. Particle size distributions of the ovalbumin (OVA) aggregates formed by heating an OVA solution at 80°C for 6 h under different physicochemical conditions (mean ± SEM; n = 9). Small aggregates measured by dynamic light scattering formed at pH9, NaCl 0.03 M (left in blue), and large aggregates measured by laser light scattering formed at pH 5, NaCl 0.8 M (right in red).

**Figure 36:** Evaluation of the allergic reaction upon challenge of the mice with 20 mg of native ovalbumin (N). Ear thickness was measured 1 h after elicitation of the allergic reaction (A) along with the mMCP-1 level in sera (B) for mice sensitized with large (A-L, in red) and small (A-s, in blue) aggregates. Right and left ear thickness of the mice and mean data of two determinations for the mMCP-1 level with the mean ± SEM per group and the results of statistical tests are presented (A: unpaired t-test; B; Mann-Whitney test; \*\*\* p < 0.001). The lines correspond to the mean values for the positive control (mice sensitized with non-aggregated OVA solution) and the negative control (non-sensitized mice).

**Figure 37:** Basophil activation assay with pools of sera from mice sensitized with native ovalbumin (N, green squares), large aggregates (A-L, red triangles), small aggregates (A-s, blue diamonds) or non-sensitized mice (grey circles). RBL-2H3 cells were stimulated with N at concentrations between  $2 \cdot 10^{-2}$  and  $2 \cdot 10^3$  ng/ml. Degranulation curves (A), MaxD (B) and EC50 (C) data show the mean ± SEM for six repetitions and the results of Mann-Whitney tests (\*\* p < 0.01; \* p < 0.05). The line corresponds to the mean values for the positive control (mice sensitized with non-aggregated OVA solution).

**Figure 38:** Evaluation of the immune response upon sensitization with the aggregates. Ovalbumin (OVA)-specific IgE (A), IgG<sub>2a</sub> (B) and IgG<sub>1</sub> (C) were detected by an indirect ELISA in sera from mice sensitized with the large (A-L, in red) and small (A-s, in blue) aggregates. The results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured for native OVA (IF) over fluorescence intensity measured for PBS (IF<sub>0</sub>). Individual data, along with the mean ± SEM and the results of statistical tests, are presented (A, B: Mann-Whitney tests; C: unpaired t-test; ns p > 0.05; \*\*\* p < 0.001). The lines correspond to the mean values for the positive control (mice sensitized with non-aggregated OVA solution) and the negative control (non-sensitized mice).

**Figure 39:** Specificity of the ovalbumin (OVA)-specific IgE. IgE-binding to (left) and degranulation ability for (right) native ovalbumin (N, dark), large aggregates (A-L, medium) or small aggregates (A-s, light) of sera from mice sensitized with (A) N (green), (B) A-L (red) and (C) A-s (blue). Individual data, along with the mean ± SEM and the results of the statistical tests (A-B: Friedman test with a subsequent Dunn's multiple comparison test; C: repeated measures ANOVA with a subsequent Bonferroni multiple comparison test; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01) are presented on the left, and degranulation curves with the pools of sera are presented on the right (mean ± SEM of triplicates).

**Figure 40:** Particle size distributions of the ovalbumin (OVA) aggregates formed by heating an OVA solution at 80°C for 6h under different physicochemical conditions used for digestion (A) and for Ussing chambers (B) (mean ± SEM; n=9). Small aggregates formed at pH9, NaCl 0.03 M measured by dynamic light scattering (left in blue), and large aggregates formed at pH 5, NaCl 0.8M measure by laser light scattering (right in red).

**Figure 41:** IgE-binding and basophil degranulation ability of native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates of ovalbumin (A-s). Human IgE binding to N, A-L and A-s was detected with 100 sera from egg allergic children by indirect ELISA assay (A). Results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured to N, A-L or A-s (IF) on fluorescence intensity measured to PBS (IF<sub>0</sub>). Bars stand for mean ± SEM and results of statistical comparison for paired data by Friedman test and Dunn's post-test (\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01). (B) Basophil activation assay with the pool of 8 human sera. RBL-SX38 cells were stimulated with N (green), A-s (blue) or A-L (red) at concentration from  $2 \cdot 10^{-3}$  to  $2 \cdot 10^3$  ng/ml.

**Figure 42:** Venn diagram showing the numbers of peptides specific or common to native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates (A-s) after the gastric phase (left) or intestinal phase (right) of the simplified digestion protocol.

**Figure 43:** RP-HPLC Chromatogram of final digest obtained using the complete *in vitro* model with native ovalbumin (N) in blue, large aggregates of ovalbumin (A-L) in red and small aggregates (A-s) in green. \*enzyme inhibitor

**Figure 44:** Comparison of the basophil activation abilities of native ovalbumin (N, green), large aggregates of ovalbumin (A-L, red) and small aggregates of ovalbumin (A-s, blue) after the gastric (left) and intestinal (right) digestion steps using the simplified (A) and complete (B) digestion protocols.

**Figure 45:** Comparison of the basophil activation abilities of native ovalbumin (A), large aggregates of ovalbumin (B) and small aggregates of ovalbumin (C) before digestion (dark solid line) and after gastric (dark dotted line), intestinal (light solid line) and BBM (light dotted line) digestion steps using the complete digestion model.

**Figure 46:** Paracellular permeability assessed from the final concentration of FITC-sulfonic acid in the basal compartment of Ussing chambers mounted with jejunum (A) or Peyer's patches (B) in the presence of native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates of ovalbumin (A-s) or no protein (Ctrl) for 2h30. Bars stand for mean  $\pm$  SEM and data were compared using an ANOVA test ( $p < 0.001$  in A,  $p > 0.05$  in B) and Bonferonni post-test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ )

**Figure 47:** Basophil activation abilities of native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates of ovalbumin (A-s) after transcytosis through jejunum or Peyer's patches. Degranulation curve for one set of samples at 4 dilutions with N (green), A-L (red) or A-s (blue) and control without protein (gray) after transcytosis through jejunum (A) and Peyer's patches (B). Net percentages of degranulation at the dilution 1:50 for N, A-s and A-L after transcytosis through jejunum or Peyer's patches (C). Individual data corrected by subtracting mean of controls, means  $\pm$  SEM and results of statistical tests (2-way ANOVA and Bonferroni post-tests, \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ )

**Figure 48 :** Bilan de l'effet de l'agrégation sur la capacité sensibilisante et antigénique avant ou après digestion et passage de la barrière intestinale par rapport à la forme native

**Figure 49 :** Bilan de l'effet de la structure des agrégats sur la capacité sensibilisante et antigénique après digestion passage de la barrière intestinale au niveau du jéjunum



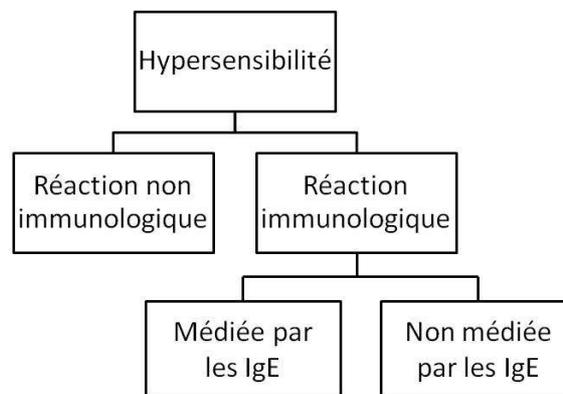
# **Chapitre 1 – Introduction**



## 1. Généralités sur les allergies alimentaires

### 1.1. Définition de l'allergie et classification

Le terme hypersensibilité alimentaire décrit une réaction responsable de l'apparition de symptômes ou de signes objectivement reproductibles et provoquée par l'exposition à un aliment à une dose tolérée par les sujets sains (Johansson et al., 2004). En fonction des mécanismes impliqués, une classification des hypersensibilités a été proposée par l'EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) et différencie les réactions faisant intervenir le système immunitaire et celles dont les mécanismes immunologiques sont exclus comme l'intolérance au lactose (Johansson et al., 2001) (Figure 1).



**Figure 1 :** Classification des hypersensibilités (adapté de Johansson et al., 2001)

L'allergie alimentaire est une réaction d'hypersensibilité à un aliment initiée par des mécanismes immunologiques (Johansson et al., 2001). Les allergies alimentaires peuvent être médiées par les immunoglobulines de type E (IgE) à l'origine des réactions immédiates et de l'anaphylaxie, non médiées par les IgE dont les mécanismes et médiateurs sont peu caractérisés et induisant des réactions avec des symptômes plus tardifs ou par une combinaison des deux (Burks et al., 2012a). Les allergies alimentaires médiées par les IgE sont les allergies les plus fréquentes et celles dont le mécanisme est le mieux caractérisé à l'heure actuelle (Benedé et al., 2016) et sera décrit dans le paragraphe 2. Même si ces différents types d'allergie présentent des symptômes variés, ils partagent un même processus avec la déviation du système immunitaire de la tolérance vers une réponse allergique vis-à-vis d'un antigène (Wang and Sampson, 2011).

## **1.2. Prévalence**

Les allergies alimentaires constituent actuellement un problème de santé publique majeur car elles affectent entre 2% et 10% de la population mondiale et atteignent plus précisément dans les pays occidentaux 5 à 8% des enfants et 2 à 4% des adultes (Cianferoni and Spergel, 2009; Prescott et al., 2013; Sicherer and Sampson, 2010). Ces données sont cependant à prendre avec précaution puisqu'il est difficile d'estimer la prévalence du fait de l'hétérogénéité des données recueillies, du manque de données dans certains pays et des différences de méthodes utilisées pour évaluer l'état allergique (challenge oral, historique clinique, dosage IgE spécifiques ou questionnaire à remplir par la famille ou le patient) (Nwaru et al., 2014; Prescott et al., 2013).

La prévalence des allergies alimentaires semble toutefois augmenter ces quinze-vingt dernières années, notamment dans les pays industrialisés (Benedé et al., 2016; Kulis et al., 2015; Prescott and Allen, 2011). Les raisons de cette augmentation ne sont encore pas connues mais plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène, parmi lesquelles un changement dans le diagnostic et des temps de résolution de l'allergie plus longs (Nwaru et al., 2014).

## **1.3. Facteurs influençant le développement des allergies alimentaires**

Plusieurs facteurs peuvent influencer le développement d'allergies alimentaires. Une étude de 581 familles américaines a montré que le développement d'allergies alimentaires IgE-médiées est influencé à la fois par des facteurs génétiques et par des facteurs environnementaux (Tsai et al., 2009).

### **1.3.1. Facteurs génétiques**

Le terme atopie est utilisé pour décrire une prédisposition familiale ou personnelle à produire des IgE spécifiques après exposition à des allergènes, et à souffrir de symptômes allergiques (Johansson et al., 2001). L'hérédité de l'allergie alimentaire a été mise en évidence dans plusieurs études. En Finlande, un lien entre l'allergie de parents et des symptômes d'allergie alimentaire chez leurs enfants a été clairement établi (Pyrhönen et al., 2011). Aux Etats-Unis, la présence d'allergies chez au moins deux personnes de la famille augmenterait significativement le risque de développer une allergie alimentaire chez l'enfant (Koplin et al., 2013). Dans le cas de l'allergie à la

cacahuète, une étude menée sur des jumeaux a montré que 64,3% des jumeaux monozygotes partageaient cette allergie contre 6,8% pour les jumeaux dizygotes (Sicherer et al., 2000). Ainsi, les prédispositions génétiques semblent être un facteur déterminant dans le développement d'allergies alimentaires et plus d'une centaine de gènes ont été identifiés comme potentiellement impliqués dans le développement d'allergies alimentaires (Tsai et al., 2009). Une des modifications génétiques incriminée est la perte ou la mutation du gène de la filagrine, protéine impliquée dans la régulation de la perméabilité de la peau à différentes substances, y compris aux allergènes (Carrard et al., 2015; van Ginkel et al., 2015). Certains autres gènes mis en cause sont impliqués directement dans le mécanisme de la réaction allergique ou de la tolérance par leur implication dans l'induction des cellules immunitaires (Tan et al., 2012).

Cependant, les facteurs de risques génétiques ne permettent pas à eux seuls d'expliquer le développement d'allergies alimentaires et notamment l'augmentation récente de la prévalence (Lack, 2012). Des facteurs liés à l'environnement sont donc également à considérer.

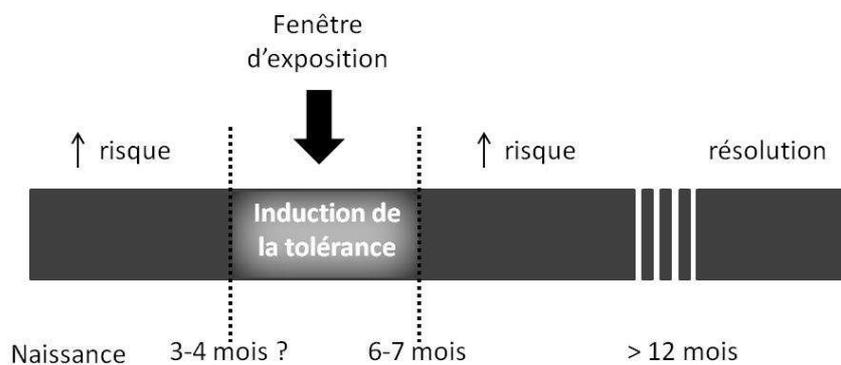
### **1.3.2. Epigénétique**

L'épigénétique est définie comme tout changement dans l'expression des gènes induit indépendamment des modifications de l'ADN. L'épigénétique peut expliquer comment des facteurs environnementaux (alimentation, tabac, pollution) qui modifient l'expression de gènes conduisent à des dérégulations de la tolérance immunitaire et par conséquent au développement d'allergies alimentaires (Martino et al., 2016). Le développement du système immunitaire est soumis à l'environnement via des modifications épigénétiques dès le développement du fœtus pendant la grossesse et jusqu'à la première année de vie (Martino et al., 2014a). Actuellement, certaines études montrent un lien entre l'épigénétique et les allergies respiratoires, mais peu de données sont disponibles sur les allergies alimentaires (Quake and Nadeau, 2015). L'un des mécanismes épigénétique est la méthylation de l'ADN qui empêche ou au contraire augmente l'expression de gènes lors de la croissance et de la différenciation cellulaire (Martino et al., 2014a). Une dérégulation de la méthylation de l'ADN pendant

le développement contribuerait à une réponse immunitaire des lymphocytes T CD4+ chez le nourrisson associée à l'allergie alimentaire (Martino et al., 2014b).

### 1.3.3. Période et voie d'introduction de l'aliment

La période optimale d'introduction des aliments n'est pas connue mais des études rétrospectives ont indiqué qu'une introduction entre l'âge de 4 et 6 mois chez le nourrisson permettait de limiter le développement d'allergie (Figure 2). Cette fenêtre optimale d'introduction semble coïncider avec l'établissement d'un microbiote intestinal sain et être en lien avec l'allaitement maternel (Prescott et al., 2008).



**Figure 2 :** Fenêtre d'exposition possible pour l'introduction d'aliments par rapport au risque de développer une allergie alimentaire ( D'après S. L. Prescott et al., 2008)

Une étude des 6 aliments allergéniques majeurs chez l'enfant (lait, cacahuète, blanc d'œuf, sésame, poisson et blé) a montré qu'une introduction précoce dès 3 mois chez les enfants allaités diminuait le développement d'allergie alimentaire à ces 6 aliments par rapport à une diversification alimentaire plus tardive, à l'âge de 6 mois : 5,6% contre 7,1% d'enfants allergiques (Perkin et al., 2016). Cet effet a été confirmé pour différents aliments individuellement. Deux études sur l'introduction de la cacahuète ont montré qu'une consommation précoce diminuait le risque de développer une allergie alimentaire pour une population générale (Du Toit et al., 2008) et également chez les enfants à risque élevé de développer cette allergie (eczéma et/ou allergie à l'œuf) (Du Toit et al., 2015). Une exposition précoce aux protéines de lait de vache associée à un allaitement contribue également à induire une tolérance (Katz et al., 2010). Cela a aussi été montré pour l'œuf dans la population globale (Koplin et al., 2010) et chez des individus à risque (Palmer et al., 2013).

Au-delà de la période d'introduction, la voie d'introduction lors d'un premier contact avec l'allergène semble également jouer un rôle dans le développement d'allergies alimentaires. Une hypothèse appelée hypothèse de la double exposition suggère que la sensibilisation allergique aux aliments peut se produire à de faibles doses par voie cutanée alors que la consommation de protéines alimentaires par voie orale induit une tolérance. La balance entre l'exposition orale et cutanée pourrait déterminer le développement d'allergies chez l'enfant (Lack, 2012). Plusieurs études ont montré qu'un défaut de la barrière cutanée pouvait favoriser une première exposition à l'allergène par cette voie et ainsi augmenter le risque d'allergies alimentaires. En cas d'une dermatite atopique, les protéines alimentaires peuvent pénétrer la barrière cutanée, ce qui peut conduire à la production d'IgE spécifiques (Dubrac et al., 2010). Le niveau de perte d'eau au niveau de l'épiderme dans les premiers jours après la naissance est un facteur prédictif du développement d'allergies alimentaires chez les enfants âgés de deux ans (Kelleher et al., 2016). Il a également été montré que chez les nourrissons présentant de l'eczéma, un sur 5 développera une allergie alimentaire contre 1 sur 25 pour les nourrissons sans eczéma (Martin et al., 2015).

#### **1.3.4. Hypothèse hygiéniste**

L'augmentation de la prévalence dans les pays occidentaux concorde avec la diminution des infections chez les nourrissons et les enfants, laissant supposer une relation de cause à effet. Cette théorie, appelée hypothèse hygiéniste a été formulée pour la première fois en 1989 et suggère que le manque d'exposition à des agents infectieux et parasites augmente la susceptibilité aux allergies alimentaires (Strachan, 1989). Plusieurs études ont illustré cette hypothèse. Une enfance à la campagne diminue la fréquence de sensibilisation atopique et de développement de maladies allergiques (Remes et al., 2005) et la consommation de lait de ferme chez les enfants de moins d'un an est associée à une fréquence plus faible (12% contre 29%) de développer une sensibilisation atopique (Riedler et al., 2001). L'environnement rural agirait chez le nourrisson sur la colonisation de l'intestin par les microorganismes. Une augmentation de la diversité du microbiote par la présence d'animaux pourrait notamment expliquer ce phénomène (Azad et al., 2013).

### **1.3.5. Facteurs alimentaires**

La forme sous laquelle l'aliment est ingéré peut également jouer un rôle sur le développement d'allergies. Les aliments sont sujets à de nombreux traitements technologiques qui peuvent altérer les caractéristiques structurales des allergènes et ainsi augmenter ou atténuer leur potentiel antigénique, leur digestibilité, leur absorption à travers la barrière intestinale ou bien encore leur présentation par et aux cellules du système immunitaire. Cet aspect sera détaillé par la suite dans ce chapitre, dans le paragraphe 3.

Il semble également de plus en plus évident, que l'ingestion de certains composés alimentaires comme l'acide rétinoïque, la vitamine D, les fibres alimentaires/prébiotiques, les polyphénols, ou les acides gras polyinsaturés influence le maintien et probablement le développement de la tolérance orale et donc inversement le développement d'allergies alimentaires (Benedé et al., 2016; Lepski and Brockmeyer, 2013). L'effet de ces facteurs alimentaires n'est pas toujours clairement établi chez l'homme mais des études utilisant des modèles animaux démontrent leur rôle. Par exemple, dans un modèle murin d'allergie, une supplémentation en fibres alimentaires chez des femelles au cours de la gestation et de l'allaitement a un effet protecteur contre l'allergie alimentaire dans la descendance de ces souris (Bouchaud et al., 2016).

## **1.4. Symptômes cliniques et diagnostic des allergies alimentaires IgE-médiées**

### **1.4.1. Symptômes**

Les symptômes de l'allergie alimentaire se produisent dans les minutes ou les heures après ingestion de l'aliment et varient en sévérité en fonction des patients mais aussi en fonction de différents paramètres : la quantité ingérée, l'ingestion d'autres composés, des traitements éventuels de l'aliment et la rapidité d'absorption qui peut être modifiée par un estomac vide ou un exercice physique (Burks et al., 2012a). Les réactions allergiques peuvent entraîner de nombreux symptômes, allant de simples démangeaisons à des réactions systémiques comme le choc anaphylactique qui peut engager le processus vital du patient. Elles touchent différents organes, principalement

la peau (urticaire, angiodème), le tractus gastro-intestinal (nausées, douleurs abdominales, vomissements, diarrhées) et les voies respiratoires (toux, dyspnée, œdème au niveau des voies respiratoires) ; plus rarement le système cardiovasculaire et le système nerveux (Kulis et al., 2015).

#### 1.4.2. Diagnostic

Le diagnostic d'une allergie alimentaire IgE-médiée se réalise en différentes étapes qui permettent de valider la présence ou non d'une allergie alimentaire chez le patient, et de caractériser l'aliment et les allergènes responsables : un bilan des antécédents médicaux est dressé pour mettre en évidence une potentielle allergie alimentaire, puis des tests sanguins et cutanés sont réalisés pour identifier une sensibilisation à un aliment/allergène (dosage des IgE spécifiques et prick test cutané) et enfin, une éviction suivie d'une réintroduction et/ou un test de provocation orale avec l'aliment mis en cause est réalisée pour confirmer le diagnostic (Figure 3).

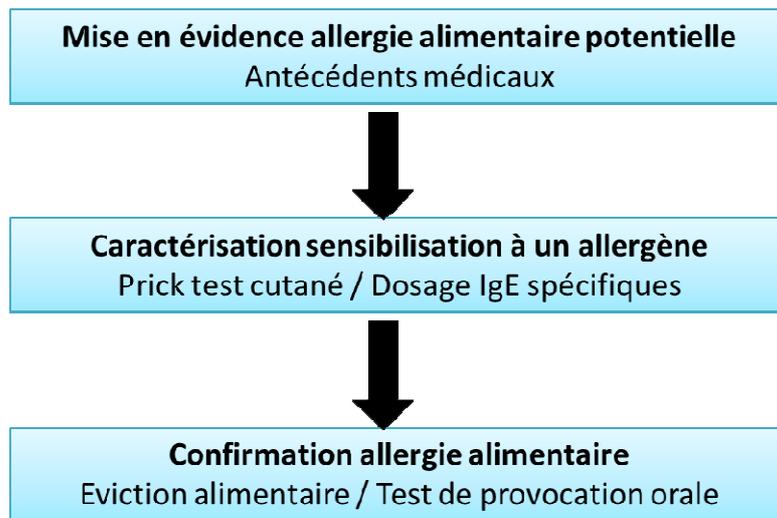


Figure 3 : Etapes du diagnostic de l'allergie alimentaire

**Le diagnostic de l'allergie alimentaire** implique tout d'abord une étude des antécédents médicaux du patient : les aliments et la quantité ingérée, leurs ingrédients, la description des symptômes, leur moment d'apparition et leur fréquence, la présence de facteurs associés (exercice, alcool, infections, ...). Cependant, les antécédents médicaux seuls ne permettent pas de diagnostiquer une allergie alimentaire (Luyt et al., 2016).

**La caractérisation de la sensibilisation** à un aliment s'effectue via les tests prick cutanés et le dosage d'IgE spécifiques dans le sérum.

Le test prick cutané est une méthode rapide et peu coûteuse permettant de déterminer une sensibilisation à un aliment. Une petite quantité d'extrait est placée dans l'épiderme ; la formation d'une papule, liée à la libération d'histamine par les mastocytes, est signe de réaction allergique. Le diamètre de la papule est mesuré après 15 minutes puis est comparé avec un contrôle positif (histamine) et un contrôle négatif (tampons salins) (Kulis et al., 2015). Les tests pricks cutanés permettent de détecter les allergies alimentaires avec un niveau élevé de sensibilité mais nécessitent une grande qualité des extraits utilisés afin d'éviter des faux-positifs qui peuvent conduire à des restrictions alimentaires injustifiées (Sampson et al., 2014).

Le dosage de la quantité d'IgE spécifiques dans le sérum peut être réalisé par le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), CAP System ou puce ISAC. Le niveau d'IgE spécifiques contre certains extraits d'allergènes, allergènes purifiés ou recombinants peut être utilisé pour prédire une susceptibilité de réponse à une provocation avec un aliment (Kulis et al., 2015).

La détection d'IgE spécifiques et les prick test cutanés permettent d'identifier une sensibilisation mais ces tests ne permettent pas de prédire une possible réaction allergique (Carrard et al., 2015) ni sa sévérité (Perry et al., 2004). Il est donc nécessaire de **confirmer le diagnostic d'allergie alimentaire**. Les tests de provocation orale permettent de compléter les résultats obtenus avec les autres techniques et ainsi valider l'allergie alimentaire en fournissant des preuves cliniques (Valenta et al., 2015). L'éviction alimentaire pendant quelques semaines suivie d'une réintroduction peut également être utilisée pour mettre en évidence une allergie alimentaire (Bidat, 2006). D'autres techniques permettent aussi d'apporter des arguments pour confirmer le diagnostic de l'allergie alimentaire. Par exemple, le test d'activation des basophiles est parfois proposé comme un test de provocation *ex vivo* (Hoffmann et al., 2015) et son intérêt clinique est en cours d'étude.

## **1.5. Gestion, traitement et prévention de l'allergie alimentaire**

### **1.5.1. Gestion**

La gestion de l'allergie alimentaire consiste à identifier l'aliment responsable, puis à apprendre au patient d'une part, à éviter la consommation de cet aliment mis en cause et d'autre part, à le préparer à d'éventuelles expositions accidentelles afin de traiter la réaction allergique dès les premiers signes (Carrard et al., 2015; Wang and Sampson, 2011).

L'éviction stricte d'aliments est une contrainte difficile à respecter pour les patients, notamment dans le cas du lait ou de l'œuf, ingrédients entrant dans la composition de nombreux produits alimentaires. La moitié des enfants allergiques alimentaires a rapporté une ingestion accidentelle à l'allergène dans les 5 ans après le diagnostic et 75% dans les 10 ans (Luyt et al., 2016). En cas de prise accidentelle de l'aliment source de l'allergie, une trousse d'urgence est donnée à chaque patient contenant de l'adrénaline qui après injection permet de traiter les symptômes de l'anaphylaxie et d'autres médicaments comme des antihistaminiques en réponse aux premiers symptômes (Burks et al., 2012a). Cette trousse doit également contenir une copie du projet d'accueil individualisé qui précise les conditions d'accueil en milieu scolaire d'enfants à risque et explique les premiers signes cliniques et les soins à effectuer lors de réactions allergiques (Kanny et al., 2002).

### **1.5.2. Traitement**

Un régime d'éviction strict n'est pas curatif et correspond à un risque pour le patient de s'exposer accidentellement à l'aliment mis en cause. Pour cela, des approches thérapeutiques sont utilisées pour traiter le patient.

L'immunothérapie présente un grand intérêt comme potentiel traitement curatif. Cette technique consiste à administrer des doses croissantes de l'allergène par voie orale, sublinguale ou épicutanée ce qui induit une désensibilisation ou une tolérance à long terme (De Silva et al., 2014a). La désensibilisation est caractérisée par la capacité d'un individu à ingérer l'aliment mis en cause sans réaction clinique mais nécessite une consommation continue de cet aliment pour maintenir cet état alors que la tolérance à long terme est définie par plusieurs années sans réponse à un aliment en absence d'ingestion intentionnelle de l'allergène (Chinthrajah et al., 2016). Cependant, cette

méthode notamment par administration orale présente un risque de réactions allergiques.

L'utilisation d'agents biologiques est également étudiée dans le traitement de l'allergie. Ces molécules ciblent des médiateurs spécifiques de la réaction allergique comme les cytokines ou les anticorps (Boyman et al., 2015).

### **1.5.3. Prévention**

Mettre en place des stratégies de prévention nécessite de savoir quand et pourquoi la sensibilisation et le déclenchement se produisent afin d'établir la meilleure période d'action. Les premières manifestations d'allergies alimentaires sont les plus fréquentes dès la petite enfance et il semble donc, que la prévention des allergies alimentaires doit idéalement commencer dès cette période. Les stratégies de prévention sont cependant difficiles à mettre en place mais des résultats commencent à être publiés (De Silva et al., 2014b).

## **1.6 Aliments, allergènes et épitopes**

### **1.6.1. Aliments**

Plus de 170 aliments ont été identifiés comme étant responsables d'allergies alimentaires (Burks et al., 2012a). Mais, la plupart des réactions allergiques sont associées à un nombre limité d'aliments variant selon les zones géographiques. Cette différence entre les régions peut s'expliquer par des différences environnementales, de régimes alimentaires ou génétiques (Lack, 2012). En Europe, le lait de vache, les œufs et l'arachide sont les aliments les plus allergéniques chez les enfants, alors que les fruits de mer, les fruits et les légumes le sont plus fréquemment chez l'adulte (Gómez et al., 2013; Luyt, Ball, Kirk, & Stiefel, 2016).

L'allergénicité d'un aliment est en général lié à plusieurs protéines allergéniques, que l'on caractérise par leur reconnaissance par les IgE de patients allergiques dans les réactions dépendantes des IgE.

### **1.6.2. Définition et caractéristiques des allergènes alimentaires**

En pratique, un allergène est défini comme une molécule, souvent une protéine, reconnue par des IgE présentes dans le sérum de patients allergiques. Cependant, le terme allergène « complet » ou allergène de classe I désigne une molécule capable à la

fois de sensibiliser et de déclencher une réaction allergique (Ruitter and Shreffler, 2012a). A l'inverse, certaines protéines sont capables de déclencher des symptômes allergiques mais sans être capables de sensibiliser, on parle alors d'allergène incomplet ou d'allergène de classe II.

La réaction allergique sans sensibilisation au préalable est une allergie croisée liée à une forte homologie de séquences et généralement à une homologie de structure entre un allergène de type I et un allergène de type II. Les allergies croisées les plus connues sont celles qui se produisent entre un allergène respiratoire qui induit une sensibilisation allergique et des allergènes alimentaires de classe II (Untersmayr and Jensen-Jarolim, 2008). Par exemple, Mal d 1, allergène de la pomme est un allergène incomplet capable d'induire des symptômes chez des individus préalablement sensibilisés à Bet v 1, allergène présent dans le pollen de bouleau (Aalberse, 2000).

On distingue également les allergènes majeurs et les allergènes mineurs. Cette distinction est établie sur la base de la prévalence de la sensibilisation IgE spécifiques au sein d'une cohorte d'individus allergiques. Ainsi un allergène majeur est un allergène pour lequel au moins 50% des patients allergiques testés montrent une liaison des IgE spécifiques à cet allergène par opposition aux allergènes mineurs (Bredehorst and David, 2001). Cette distinction n'est pas pleinement satisfaisante car elle ne fait pas référence à la capacité des allergènes à déclencher une réaction allergique, ni à sa sévérité et elle dépend de la réactivité des patients inclus dans la cohorte.

Différents termes sont utilisés pour décrire les capacités biologiques des allergènes. L'allergénicité est définie comme la capacité d'un antigène à induire la production d'IgE et des symptômes cliniques et l'immunogénicité correspond au potentiel d'une protéine à activer le système immunitaire et par conséquent initier une réponse immunitaire (Verhoeckx et al., 2015).

Parmi un nombre important de protéines que l'homme ingère, seule une petite proportion est allergène (Ruitter and Shreffler, 2012a). Cela suppose que certaines protéines alimentaires possèdent des caractéristiques intrinsèques à l'origine de leur capacité allergénique. Une question majeure est donc de savoir pourquoi certaines protéines sont plus allergéniques que d'autres. Les allergènes sont très hétérogènes

d'un point de vue structural (Aalberse, 2000) et les propriétés physicochimiques qui rendent une protéine allergénique sont encore mal connues (Lepski and Brockmeyer, 2013). Cependant, la plupart des allergènes alimentaires partagent certaines caractéristiques communes notamment physicochimiques qui leur permettent d'atteindre après digestion et passage à travers la barrière intestinale le système immunitaire sous une forme capable d'induire une réponse immunologique (Bannon, 2004; Scheurer et al., 2015).

La plupart des allergènes résistent partiellement à la digestion gastroduodénale, contrairement aux protéines non-allergéniques plus rapidement digérées (Poulsen and Hau, 1987) et sont également résistants aux traitements thermiques (Kosti et al., 2013). De nombreux allergènes sont des glycoprotéines solubles dans l'eau avec une taille comprise entre 5 et 100 kDa. La glycosylation contribue à la stabilité des protéines et améliore leur immunogénicité. De nombreux allergènes sont également capables de se lier aux lipides, ce qui les protège de la dégradation et améliore le passage à travers la barrière intestinale (Ruiter and Shreffler, 2012a). Une autre caractéristique des allergènes est leur abondance dans les aliments, ce qui leur permet d'augmenter la probabilité de leur rencontre avec le système immunitaire par rapport à des protéines plus rares dans les aliments (Bannon, 2004). Toutes ces caractéristiques ne sont pas partagées par l'ensemble des allergènes et à l'inverse, certaines protéines qui n'induisent pas d'allergie présentent ces caractéristiques. Il est donc difficile de prédire l'allergénicité d'une protéine à partir de ces paramètres.

Au-delà de ces caractéristiques, pour être allergénique, une protéine doit être capable d'interagir avec les cellules immunitaires innées comme les cellules présentatrices d'antigène en se liant à leurs récepteurs. De nombreux allergènes possèdent également la propriété d'interagir avec les cellules épithéliales en les activant puis en étant transportés pour ensuite activer le système immunitaire (Scheurer et al., 2015).

### **1.6.3. Classification des allergènes alimentaires**

Environ 400 allergènes alimentaires ont actuellement été décrits. Sur les 12000 familles protéiques structurales, seules 71 sont représentées parmi les allergènes alimentaires et environ 80% des protéines allergéniques se retrouvent dans uniquement une vingtaine de familles protéiques (Masilamani et al., 2012).

Environ 65% des allergènes d'origine végétale se retrouvent dans quatre superfamilles sur la base de leurs homologues de séquence en lien avec la conservation de leur structure et leurs possibles fonctions biologiques : la superfamille des prolamines qui inclut notamment des protéines de stockage des céréales, les LTP (Lipid Transfer Proteins), les albumines 2S, les inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase et de trypsines; la superfamille des cupines contenant les protéines de stockage des légumineuses et oléagineuses ; la superfamille des profilines et la superfamille de Bet v 1 incluant les PR10 (Pathogenesis-related proteins 10) (Radauer and Breiteneder, 2007) (Tableau 1). Des familles d'allergènes d'origine végétale plus mineures ont aussi été caractérisées comme les lectines ou encore les chitinases (Sampson et al., 2014).

**Tableau 1** : Principales super-familles et familles d'allergènes d'origine végétale

Super-familles	Familles	Principales sources	Exemples d'allergènes
Prolamines	Protéines de réserve des céréales	Céréales, Arachide, fruits à coques	Tri a 19 (w5-gliadin, Blé) Tri a 26 (LMW gluténines, Blé)
	LTP		Tri a 14 (Blé), Ara h 8 (cacahuète), Cor a 8 (Noisette) ...
	Albumine 2S		Ara h 2 (Cacahuète)
	Inhibiteurs $\alpha$ -amylase et trypsine		Tri a 20, 28, 29 (Blé)
Cupines	Globulines 11S, 12S	Légumineuses, Oléagineuses	Ara h 3 (Cacahuète)
	Globulines 7S		Ara h 1 (Cacahuète)
Profillines		Fruits, Légumes	Api g 4 (Céleri)
Bet v 1	PR-10	Fruits, Légumes	Mal d 1 (Pomme)

Environ 60% des allergènes d'origine animale ont été classés en trois familles principales : les tropomyosines, les parvalbumines et les caséines et d'autres familles plus mineures d'allergènes ont également été identifiées comme les lipocalines, les lysozymes, les transferrines et les serpines (Jenkins et al., 2007; Sampson et al., 2014) (Tableau 2). Pour être allergène, les protéines animales doivent être suffisamment différentes de leurs homologues humains (Jenkins et al., 2007).

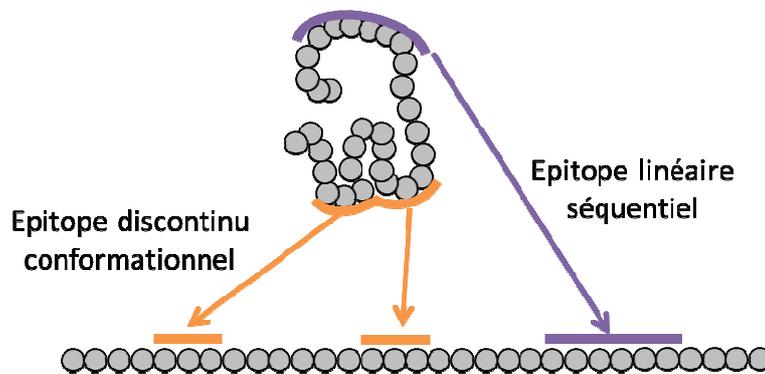
**Tableau 2** : Familles d'allergènes d'origine animale

Familles	Principales sources	Exemples d'allergènes
Tropomyosines	Crustacés, mollusques	Pen a 1 (Crevette)
Parvalbumines	Poissons, amphibiens	Sal s 1 (Saumon)
Caséines	Lait	Bos d 8 (Vache)
Serpines	Oeuf	Gal d 2 (Poule)

#### 1.6.4. Les épitopes

Un allergène possède certains sites spécifiques appelés épitopes ou déterminants antigéniques. On distingue deux types d'épitopes : les épitopes de type B capables de se lier aux IgE produites par les lymphocytes B et les épitopes de type T capables d'interaction avec les lymphocytes T.

Parmi les épitopes de type B, on différencie en fonction des méthodes utilisées pour leur identification, les épitopes linéaires ou séquentiels formés par une séquence continue d'acides aminés et les épitopes conformationnels formés par des acides aminés proches spatialement dans la structure de la protéine mais distants dans la séquence protéique et qui sont donc liés à la structure secondaire et tertiaire de la protéine (Figure 4).



**Figure 4 :** Représentation schématique d'épitopes linéaires et conformationnels

Pour comprendre et mettre au point des stratégies pour le diagnostic, le traitement et la prévention des allergies alimentaires, il est nécessaire de connaître des informations détaillées sur la molécule allergénique. L'identification des épitopes et de leur structure permet de comprendre l'immunogénicité d'une protéine. Des techniques simples permettent d'identifier les épitopes de types linéaires (SPOT membranes) alors que l'identification des épitopes conformationnels nécessite des techniques plus complexes comme la cristallographie (Matsuo et al., 2015).

Une grande diversité d'épitopes de type B est reconnue par les patients allergiques. Comme les allergènes, tous les épitopes d'une protéine ne sont pas reconnus par tous les patients sensibilisés à la protéine, certains épitopes sont immuno-dominants alors que d'autres sont reconnus par seulement quelques patients. Pour induire une réaction allergique, une protéine doit posséder au moins deux épitopes capables de se lier aux IgE (Lehrer et al., 2002).

## **1.7. L'allergie à l'œuf**

L'œuf est un aliment fréquemment consommé et présent dans de nombreux produits industriels pour sa valeur nutritionnelle, ses propriétés organoleptiques et surtout pour ses propriétés fonctionnelles. Au-delà de sa présence dans de nombreux produits alimentaires, l'œuf entre également dans la composition de médicaments, vaccins et produits cosmétiques.

### **1.7.1. Prévalence et caractéristiques cliniques**

En Europe, l'allergie au blanc d'œuf touche 1% des enfants des moins de deux ans et jusqu'à 2% dans le nord-ouest de l'Europe (Xepapadaki et al., 2016) et représente la deuxième cause d'allergies alimentaires chez l'enfant après le lait de vache (Rona et al., 2007). En Chine et au Japon, l'allergie à l'œuf est l'allergie alimentaire la plus fréquente chez l'enfant (Ohtani et al., 2016) et en Australie, la prévalence atteint 8,9% des enfants âgés d'un an (Osborne et al., 2011). La prévalence de cette allergie est fortement augmentée chez les enfants présentant une dermatite atopique ou d'autres types d'allergie alimentaire.

L'allergie au blanc d'œuf apparaît généralement pendant la première année de vie. Une étude européenne a montré que l'âge moyen d'apparition des symptômes est de 12 mois avec des variations en fonction des pays qui s'expliquent par des différences dans l'âge d'introduction de l'œuf dans l'alimentation (Xepapadaki et al., 2016). Cette allergie évolue naturellement avec l'âge vers une rémission d'où une prévalence plus faible chez les adultes. Une étude réalisée sur une cohorte de 213 enfants allergiques à l'œuf aux Etats-Unis a montré un taux de résolution de 50% à l'âge de 6 ans (Sicherer et al., 2014). Les enfants présentant un taux d'IgE plus élevés que les autres montrent une persistance plus importante de l'allergie alimentaire (Benhamou et al., 2010). Il semble également que de plus en plus, l'allergie à l'œuf persiste jusqu'à l'adolescence (Savage et al., 2007).

Les symptômes d'une allergie à l'œuf sont cutanés chez 90% des patients et gastro-intestinaux dans environ 40% des cas (Boyano Martínez et al., 2001). Les symptômes peuvent apparaître lors d'une première ingestion connue à l'œuf et la présence d'IgE spécifiques de l'œuf, avant même l'introduction de cet aliment dans l'alimentation a été observée chez des enfants présentant une dermatite atopique (Monti et al., 2002).

Cette observation laisse supposer une sensibilisation en amont de cette première ingestion par voie cutanée ou au cours de la grossesse via le placenta ou par le lait maternel (Benhamou et al., 2010).

La réaction allergique peut être provoquée par la consommation d'œuf cru ou cuit cependant, la majorité (45%-80%) des enfants avec une allergie alimentaire tolèrent l'œuf fortement cuit dans des biscuits (Lemon-Mulé et al., 2008; Osborne et al., 2011). Ainsi, deux phénotypes d'allergie alimentaire à l'œuf existent, les patients allergiques à l'œuf cru qui tolèrent l'œuf cuit et les patients allergiques à l'œuf sous toutes ses formes. La tolérance à l'œuf cuit et la fréquence de consommation de l'œuf sous cette forme sont des facteurs prédictifs du développement de la tolérance à l'œuf cru (Peters et al., 2014). Actuellement, aucune valeur seuil d'IgE spécifiques et de prick test cutané ne permet de réaliser un diagnostic certain d'une allergie à l'œuf cru et cuit ou à l'œuf cru uniquement sans un test de provocation orale (Calvani et al., 2015).

Le traitement curatif de l'allergie à l'œuf par immunothérapie est actuellement étudié. Une immunothérapie orale avec de la poudre de blanc d'œuf pendant 10 mois entraîne pour 28% des personnes allergiques à l'œuf une désensibilisation permanente qui correspond à une non réponse à un régime alimentaire contenant de l'œuf (Burks et al., 2012b). Un traitement plus long pendant 4 ans induit une désensibilisation chez 50% des patients (Jones et al., 2016).

### **1.7.2. Les différents allergènes de l'œuf, l'ovalbumine et l'ovomucoïde**

Le blanc d'œuf est constitué majoritairement d'eau et contient environ 11% de protéines. Le jaune quant à lui, est constitué de 16% de protéines et de 30% de lipides associés en structures lipoprotéiques. Les 4 allergènes majeurs de l'œuf sont des protéines contenues dans le blanc : l'ovomucoïde (Gal d 1), l'ovalbumine (Gal d 2), l'ovotransferrine (Gal d 3) et le lysozyme (Gal d 4). Deux autres allergènes mineurs sont également présents dans le jaune comme l'alpha livétine (Gal d 5) et le fragment C-terminal de vitellogénine-1 YGP42 (Gal d 6) (De Silva et al., 2016). La prévalence des IgE spécifique de chaque allergène est présentée dans le tableau 3 (Matsuo et al., 2015).

**Tableaux 3** : Prévalence de la sensibilisation aux principaux allergènes majeurs de l'œuf (D'après Matsuo et al., 2015) chez des nourrissons et enfants avec allergie à l'œuf suspectée pour Gal d 1 à 5 (D'Urbano et al., 2010) et chez une population de 2 à 74 ans pour Gal d 6 (Amo et al., 2010)

Allergène	Prévalence (%)
Gal d 1	43,5
Gal d 2	52,1
Gal d 3	13,0
Gal d 4	36,9
Gal d 5	4,3
Gal d 6	18,5

Les deux protéines de l'œuf les plus étudiées en lien avec l'allergénicité sont l'ovalbumine (OVA) et l'ovomucoïde (OVM).

L'OVM représente 11% des protéines du blanc d'œuf. Cette glycoprotéine appartient à la famille des inhibiteurs des sérines protéases et est un inhibiteur de la trypsine et de l'élastase. Elle est constituée de 3 domaines homologues, chacun étant stabilisé par 3 ponts disulfures et possède 5 sites de glycosylation. Elle est fortement résistante au chauffage et à la digestion par les protéases. L'OVM peut être chauffé à 100°C en conditions acides pendant de longues périodes sans aucune modification apparente de ses propriétés physiques ou chimiques et ne s'agrège pas lors du chauffage du blanc d'œuf (Mine, 1995). Il s'agit d'un allergène immunodominant dans l'œuf de poule. L'OVM est impliqué dans l'allergie au blanc d'œuf fortement chauffé (Benhamou Senouf et al., 2015). En effet, la plupart des patients allergiques à l'œuf cuit sont capables de consommer du blanc d'œuf chauffé s'il ne contient pas d'OVM (Urisu et al., 1997). Cependant, aucune valeur seuil de concentration en IgE spécifiques de l'OVM ne peut être utilisée pour prédire une tolérance à l'œuf cuit (Bartnikas et al., 2013).

L'OVA, protéine la plus abondante du blanc d'œuf (environ 54%) appartient à la superfamille des serpins, identifiée comme une famille d'allergènes d'origines animale et végétale. Cette protéine globulaire est un allergène dominant dans l'allergie à l'œuf. Cette phosphoglycoprotéine constituée de 385 acides aminés correspond à un poids moléculaire d'environ 45 kDa (Nisbet et al., 1981). Son point isoélectrique est de 4,5. L'OVA contient six résidus cystéine, dont deux forment un pont disulfure. Elle présente donc quatre groupements SH libres permettant la formation de ponts disulfures intermoléculaires lors des traitements thermiques.

### 1.7.3. Epitopes de l'ovalbumine

La caractérisation des épitopes de type B fournit des informations importantes sur l'allergénicité de la protéine. Nous nous intéresserons dans cette partie uniquement aux épitopes B de l'OVA, protéine modèle utilisée dans cette thèse. Différents épitopes de l'OVA ont été identifiés chez l'homme et chez la souris.

Chez l'homme, deux études (Benedé et al., 2014; Mine and Rupa, 2003) ont identifié respectivement 5 et 8 épitopes séquentiels de l'OVA dont un seul commun (Figure 5).

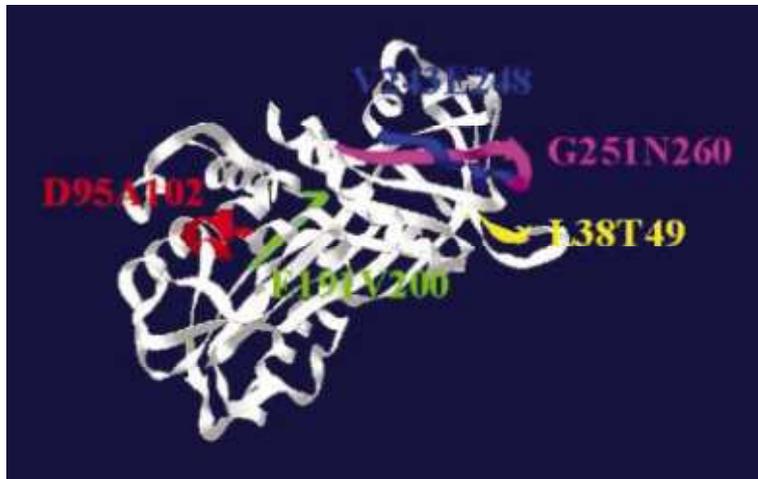
1	GSIGAASMEF	CFDVFKEKLV	HHANENIFYC	PIAIMSALAM	<u>VYLGAKDSTR</u>
51	TQINKVVRFD	KLPGFGDSIE	AQCGTSVNV	HSSLRDILNQL	<u>TKPNDVYSFS</u>
101	<u>LASRLYAEER</u>	YPILPEYLQC	VKELYRGGLE	PINFQTAADQ	<u>ARELINSWVE</u>
151	<u>SQTNGIIRNV</u>	<u>LQPSSVDSQT</u>	<u>AMVLVNAIVF</u>	<u>KGLWEKAFKD</u>	<u>EDTQAMPFRV</u>
201	TEQESKPVQM	MYQIGLFRVA	SMASEKMKIL	ELPFASGTMS	<u>MLVLLPDEV</u> S
251	<u>GLEQLESIIN</u>	FEKLTWTSS	NVMEERKIKV	YLPRMKMEEK	YNLTSVLMAM
301	GITDVFSSA	NLSGISSAES	LKISQAVHAA	<u>HAEINEAGRE</u>	VVGSAAEAGVD
351	AASVSEEFRA	DHPFLFCIKH	<u>IATNAVLFFG</u>	<u>RCVSP</u>	

**Figure 5 :** Séquence d'acides aminés de l'OVA et épitopes identifiés chez l'homme. Les séquences soulignées en rouge et vert correspondent respectivement à l'étude de Mine & Rupa en 2003 et de Benedé et al. en 2014. Les séquences soulignées en vert correspondent à celles reconnues par au moins 40% des patients.

Ces deux études n'utilisent pas les mêmes sérums de patients mais ont aussi utilisé des méthodes d'identification distinctes qui peuvent expliquer ces différences. En effet, les épitopes de l'étude de Mine and Rupa (2003) ont été identifiés par une technique de SPOT membranes qui prend en compte toute la séquence de la protéine. Dans l'étude de Benedé et al. (2014), 27 peptides identifiés par spectrométrie de masse en fin de digestions *in vitro* ont été synthétisés pour étudier leur capacité de liaison aux IgE humaines de 10 patients allergiques. Sur ces 27 peptides, tous sauf deux sont reconnus par les IgE de patients et 8 peptides sont reconnus par plus de 40% des patients. Le peptide P370-385, reconnu par 80% des sérums de patients contient au moins un

épitope immunodominant (Benedé et al., 2014). Une étude plus ancienne avait également identifié des épitopes de l'OVA dans la partie C-terminale de la protéine (résidu 347-385). Le fragment composé de cette séquence est capable d'induire la libération d'histamine de basophiles de patients allergiques à l'œuf, mécanisme qui nécessite au moins deux épitopes (Honma et al., 1996).

Les cinq épitopes linéaires identifiés en 2003 ont été localisés sur la structure tertiaire de la protéine (Figure 6). La majorité des épitopes reconnus par les IgE se situe au niveau de structures particulières, les feuillets  $\beta$  et 4 des 5 épitopes identifiés sont exposés à la surface de la protéine (Mine and Rupa, 2003).



**Figure 6** : Localisation des épitopes IgE identifiés sur la structure tertiaire de l'OVA (Mine and Rupa, 2003)

Chez la souris, différents épitopes ont été identifiés en fonction de la voie d'exposition de l'allergène (orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée) lors de la phase de sensibilisation (Mine and Yang, 2007) (Figure 7). Certaines parties de séquences identifiées sont communes aux trois voies, d'autres à la voie orale et sous-cutanée et enfin certains épitopes sont uniquement spécifiques de la voie orale. Il est intéressant de noter que certains épitopes identifiés chez la souris sont retrouvés chez l'homme.

1	GSIGAASMEF	CFDVFKEKLV	HHANENIFYC	PIAIMSALAM	VYLGAKDSTR
51	<u>TQINKVVRFD</u>	KLPFGDSIE	AQCGTSVNV	<u>HSSLRDILNQI</u>	TKPNDVYSFS
101	<u>LASRLYAEER</u>	YPILPEYLQC	VKELYRGGLE	<u>PINFQTAADQ</u>	ARELINSWVE
151	SQTNGIIRNV	LQPSSVDSQT	AMVLVNAIVF	KGLWEKAFKD	EDTQAMPFRV
201	TEQESKPVQM	MYQIGLFRVA	SMASEKMKIL	ELPFASGTMS	MLVLLPDEVS
251	GLEQLESIIN	FEKLTEWTSS	<u>NVMEERKIKV</u>	<u>YLPRMKMEEK</u>	YNLTSVLMAM
301	<u>GITDVFSSSA</u>	NLSGISSAES	<u>LKISQAVHAA</u>	<u>HAEINEAGRE</u>	VVGSAEAGVD
351	AASVSEEFRA	DHPFLFCIKH	<u>IATNAVLFFG</u>	<u>RCVSP</u>	

**Figure 7 :** Séquence d'acides aminés de l'OVA et épitopes identifiés chez la souris en fonction de la voie de sensibilisation. Les séquences soulignées en vert, rouge et bleu correspondent respectivement à la voie intrapéritonéale, la voie orale et la voie sous-cutanée (D'après Mine & Yang, 2007)

## 2. Mécanismes de la tolérance et de l'allergie IgE-médiée

Dans ce paragraphe, nous désignerons sous le terme allergie, les allergies alimentaires médiées par les IgE.

La réponse normale du système immunitaire aux antigènes alimentaires est la tolérance mais les antigènes sont parfois responsables d'une stimulation délétère du système immunitaire.

### 2.1. Capture et présentation de l'antigène

Les mécanismes de tolérance et d'allergies alimentaires commencent par une étape commune, la capture et la présentation de l'antigène.

Les cellules présentatrices d'antigène (CPAs) captent l'antigène, l'hydrolysent en peptides antigéniques et les présentent associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) à la surface des cellules. Plusieurs types cellulaires sont capables de présenter des peptides antigéniques. Les cellules dendritiques (DCs) sont reconnues comme les plus importantes CPAs. Elles présentent

une large surface de contact pour faciliter leurs principales fonctions, la capture et la présentation d'antigène (Ruitter and Shreffler, 2012b). Différents sous-types de DCs ont été identifiés. Par exemple, certaines DCs sont capables de capter l'antigène directement dans la lumière intestinale mais ne sont pas capables de migrer vers les ganglions mésentériques, les DCs CD103<sup>+</sup> (Chinthrajah et al., 2016). A l'inverse, d'autres sous-types de DCs sont capables de migrer de la lamina propria vers les ganglions mésentériques, les DCs CX3CR1<sup>+</sup> (Pabst & Mowat, 2012).

La présentation du complexe CMH II-peptide entraîne l'activation des lymphocytes T naïfs. Cette étape nécessite la reconnaissance et la liaison du complexe CMH II-peptide par les récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T naïfs (TCRs) (Ruitter and Shreffler, 2012b). La présentation de l'antigène peut se produire au niveau local, au niveau de l'intestin par exemple ou après migration dans des sites du système immunitaire comme les ganglions. Les CPAs ont un rôle fondamental dans le type de réponse induite : tolérance ou allergie alimentaire en fonction de 1) l'expression du complexe CMH II-peptide, 2) l'expression de molécules de co-stimulation à leur surface et 3) par la sécrétion de cytokines.

## **2.2. Mécanisme de la tolérance**

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'induction de la tolérance orale : la régulation par les lymphocytes T régulateurs (Treg), la délétion ou l'anergie des lymphocytes T (Pabst & Mowat, 2012). Chez la souris, il a été montré que la tolérance peut être induite par une dose élevée unique ou par de faibles doses répétées d'allergène. Différents mécanismes sont impliqués en fonction de la dose. La tolérance induite par dose élevée est due à une anergie ou une délétion des lymphocytes alors que les faibles doses d'antigène induisent des Treg (Chehade and Mayer, 2005).

Les Treg jouent un rôle primordial dans l'induction de la tolérance. Ces cellules peuvent agir localement ou après migration vers les organes lymphoïdes où ils inhibent la différenciation de cellules effectrices par sécrétion de cytokines : l'interleukine-10 (IL-10) et le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (Hogan and Rothenberg, 2008). Les Treg peuvent être divisés en différents sous-groupes : les Treg effecteurs et les Treg mémoires (Rosenblum et al., 2015).

Les cytokines inhibitrices augmentent également la production d'IgA au niveau local. Les IgA, Ig les plus abondantes dans le corps humain sont des acteurs clés dans le maintien de l'homéostasie de l'intestin et dans le développement de la tolérance (Frossard et al., 2004; Singh et al., 2014). La liaison des antigènes aux IgA empêche leur absorption et permet en cas de passage de l'antigène, une sécrétion de ce complexe dans la lumière intestinale (Berin, 2012).

D'autres Ig, les IgG4 semblent avoir un rôle dans le développement de la tolérance. Par exemple, le développement de la tolérance au lait de vache est associé à une augmentation d'IgG4 (Ruiter et al., 2007). De plus, lors de traitement par immunothérapie, l'acquisition de la tolérance à l'œuf est accompagnée par une augmentation d'IgG4 spécifiques (Jones et al., 2016).

### 2.3. Balance et déséquilibre Th1/Th2

Au cours de la présentation du complexe CMH II-peptides au TCR, la présence des signaux de co-stimulation comme l'interaction du CD28 sur les lymphocytes avec le CD80/86 par les CPA entraine une différenciation en lymphocytes T auxiliaire (T helper ou Th) de type 1 (Th1) ou de type 2 (Th2) en fonction de l'environnement cytokiniques (Chehade and Mayer, 2005) (Figure 8).

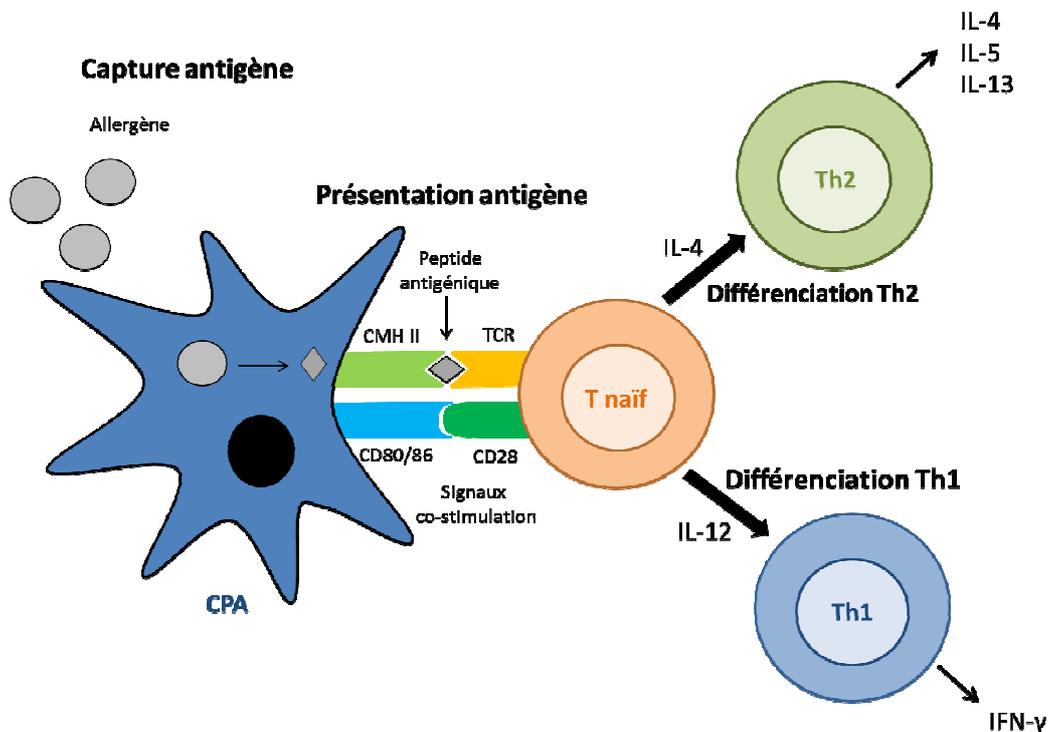


Figure 8 : Capture et présentation de l'antigène et différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T helper (Th)

La différenciation en lymphocyte Th1 ou Th2 dépend du signal donné par les APCs. L'IL-4 semble jouer un rôle clé dans la différenciation des Th2 alors que l'IL-12 est la cytokine de différenciation des lymphocytes Th1 (Murphy and Reiner, 2002). Les lymphocytes Th2 activés produisent principalement trois types de cytokines : l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et les lymphocytes Th1 produisent de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

La réaction allergique est conduite principalement par les lymphocytes Th2 dont la réponse est modulée par les lymphocytes Th1. Il existe une « balance Th1/Th2 ». En effet, l'IL-4 produite par les Th2 inhibe la synthèse de cytokines par les Th1 et réciproquement, l'IFN- $\gamma$  produit par les Th1 inhibe la prolifération des Th2 (Woodfolk, 2007). Cette balance Th1/Th2 est régulée par les Treg. Plus récemment, un autre type de lymphocyte Th, les Th17 ont été identifiés comme agissant sur cette balance (Steinman, 2007). Leur rôle dans l'inflammation tissulaire a été démontré (Oboki et al., 2008) mais leur fonction dans l'allergie alimentaire n'est encore pas clairement identifiée. Une étude réalisée chez des enfants allergiques à la cacahuète a montré un rôle des Th17 dans le contrôle de l'allergie alimentaire et une implication de l'IL-17, cytokine sécrétée par les Th17, dans la tolérance (Dhuban et al., 2013). Une autre étude réalisée dans un modèle murin a cependant montré qu'une augmentation des cytokines produites par les Th17 contribuait à une réponse de type Th2 (Li et al., 2014).

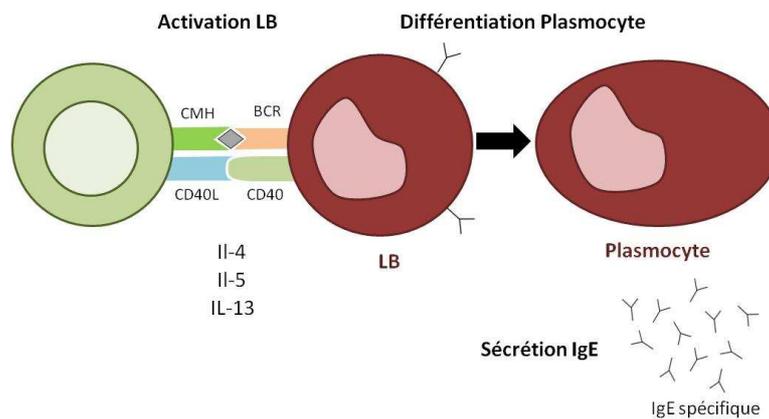
#### **2.4. Mécanisme de l'allergie alimentaire IgE médiée**

Le contact d'un antigène avec le système immunitaire peut entraîner la perte de la tolérance et déclencher une réaction allergique. Dans le cas du mécanisme d'allergie alimentaire, la réponse immunitaire est orientée vers le phénotype Th2 plutôt que vers une réponse Th1 ou une tolérance. Les raisons qui induisent cette différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocyte Th2 ne sont pas toutes élucidées.

Les réactions d'allergie se divisent en deux phases : la première phase asymptomatique, premier contact avec l'allergène est appelée phase de sensibilisation ; la deuxième phase, le déclenchement correspond à l'apparition de symptômes.

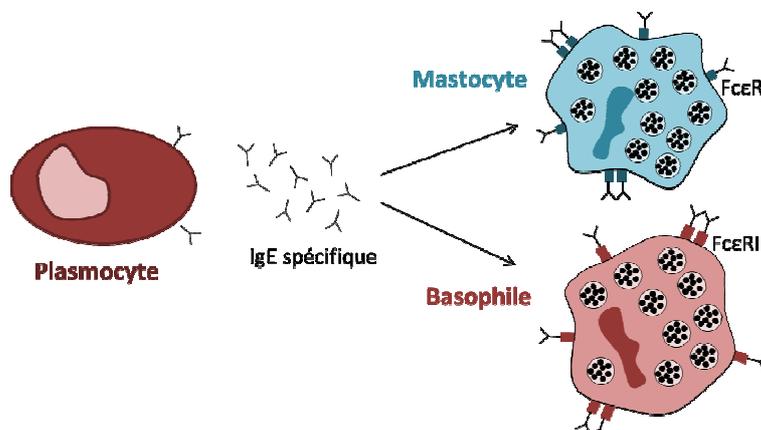
### 2.4.1. Phase de sensibilisation

Différentes voies de sensibilisation ont été mises en évidence pour les protéines alimentaires: la voie de sensibilisation orale via le tractus gastro-intestinal, la voie respiratoire et plus récemment la voie cutanée (Valenta et al., 2015) mais le mécanisme de sensibilisation aux allergènes reste similaire. Cette phase commence par la présentation de l'antigène par les CPA qui induit la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 sécréteurs d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. En présence de ces trois cytokines, l'interaction du ligand CD40 présent sur les lymphocytes Th2 avec le CD40 sur les lymphocytes B et du complexe CMH-peptide avec le récepteur des lymphocytes B (BCR) induit l'activation des lymphocytes B naïfs qui se différencient alors en plasmocytes sécréteurs d'IgE spécifiques de l'antigène (Boyman et al., 2015; Pabst and Mowat, 2012) (Figure 9).



**Figure 9 :** Activation des lymphocytes B et différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgE

Les IgE sécrétés sont fixés par les récepteurs de haute affinité, FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles dans l'ensemble de l'organisme (van Wijk and Knippels, 2007) (Figure 10).



**Figure 10 :** Fixation des IgE sur les mastocytes et les basophiles

Ces deux types cellulaires sont des granulocytes. Les mastocytes sont retrouvés notamment dans le tractus gastro-intestinal au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse alors que les basophiles sont des cellules présentes dans le sang (Boyman et al., 2015).

La phase de sensibilisation est asymptomatique et prépare l'organisme à réagir lors des contacts ultérieurs avec l'allergène.

#### 2.4.2. Phase de déclenchement

Après la phase de sensibilisation, l'exposition à l'allergène entraîne le déclenchement de la réaction allergique immédiatement après l'exposition à l'aliment. L'allergène se lie aux IgE présentes à la surface des cellules effectrices. L'agrégation des récepteurs induit une cascade de signaux qui aboutit 1) à la fusion des granules avec la membrane et la libération de leur contenu, 2) à la synthèse de nouveaux composés. Ces cellules libèrent ainsi des médiateurs chimiques comme l'histamine, des cytokines et des protéases, responsables de l'apparition de symptômes (Gómez et al., 2013) (Figure 11).

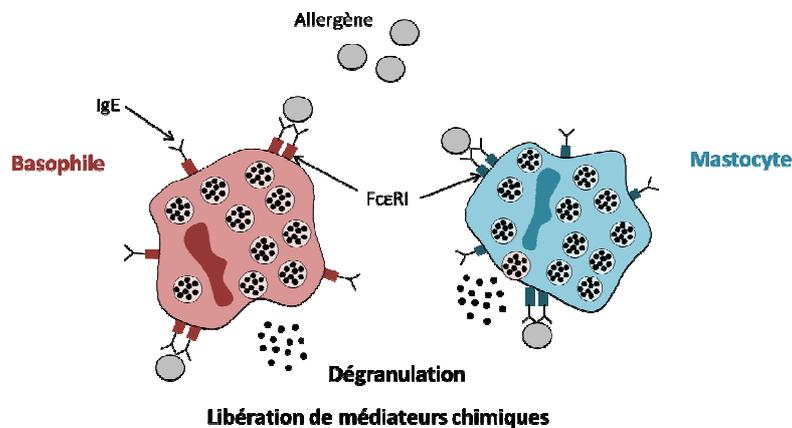


Figure 11: Dégranulation des basophiles et des mastocytes

#### 2.5. Evaluation de l'allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité des protéines prend en compte les différentes phases de l'allergie alimentaire, de la capacité de sensibilisation à la capacité de déclenchement. Cette évaluation peut être effectuée avec des sérums de patients allergiques, via des modèles *in vitro* faisant intervenir des cellules impliquées dans le mécanisme de l'allergie ou en utilisant des modèles animaux d'allergie alimentaire.

### **2.5.1. Tests *in vitro***

Les modèles *in vitro* permettent d'étudier certaines étapes de l'allergie alimentaire : la capacité de liaison d'un allergène aux Ig, son aptitude à être capté, présenté par les CPAs et à activer les lymphocytes T et enfin sa capacité à faire dégranuler les basophiles.

#### **Capacité de liaison de l'allergène aux immunoglobulines**

L'étude de la liaison allergène-Ig peut être réalisée par des tests ELISA avec des sérums de patients allergiques présentant des IgE spécifiques d'allergènes. Ces tests évaluent la sensibilisation à un allergène et mesurent une simple liaison des IgE à une protéine et ne reflètent donc pas une activité allergénique qui nécessite la liaison simultanée à au moins deux IgE de deux épitopes sur le même allergène (Blanc et al., 2011).

#### **Capture et présentation antigène**

L'utilisation de lignées de DCs permet de donner une information sur la capacité sensibilisante des allergènes en étudiant l'effet sur la capture de l'antigène et sa présentation (dos Santos et al., 2009). La co-culture *ex vivo* de lymphocytes T CD4+ et des DCs en présence d'antigène permet via le dosage des cytokines secrétées d'évaluer la capacité d'un antigène à induire la différenciation en lymphocytes T après capture et présentation par les DCs (Rupa and Mine, 2006).

#### **Capacité des allergènes à induire dégranulation des basophiles**

Des modèles cellulaires permettent d'étudier la capacité d'un allergène à induire la dégranulation. Des lignées de basophiles de rats (RBL : Rat Basophil Leukemia) peuvent être utilisés directement avec du sang de souris ou rats sensibilisés ou s'ils sont transfectés pour exprimer le récepteur aux IgE humaines avec des sérums de patients. Les cellules peuvent également provenir de patients allergiques qui possèdent ainsi déjà des IgE à leur surface ou de personnes non allergiques et être utilisés avec des sérums de patients (Butler et al., 2010). Après mise en contact de l'allergène avec les cellules sensibilisées, la dégranulation des cellules peut être évaluée par dosage des médiateurs chimiques libérés ( $\beta$ -hexosaminidase, histamine) ou en cytométrie en flux, par des marqueurs de l'activation comme le CD63 initialement à la surface des granules et qui se retrouve exposé à la surface des basophiles après dégranulation (MacGlashan, 2013).

### 2.5.2. Modèle animal

Les tests *in vitro* ne permettent pas seuls de répondre à toutes les questions que pose l'allergie alimentaire et il est difficile de maîtriser ou d'évaluer de nombreux paramètres lors des études chez l'homme, qui sont également pour des raisons éthiques plus délicates à mettre en place. De plus, les quantités et les types d'échantillons (tissus, sérum) qui peuvent être collectés sont limités. Pour ces raisons, les modèles animaux constituent un bon moyen d'étudier les mécanismes de l'allergie alimentaire (Liu et al., 2016).

L'espèce la plus utilisée dans les modèles d'allergie alimentaire est la souris. Sa petite taille et son cycle de reproduction court facilitent la réalisation des tests. Les souris présentent de nombreuses similitudes avec l'homme sur le plan physiologique, génétique et immunologique et les réactifs et outils utilisés pour analyser la réponse immunitaire sont nombreux pour cette espèce (Bøgh et al., 2016). Il existe cependant des différences entre le modèle murin d'allergie alimentaire et l'homme. Contrairement à l'homme, la souris ne sécrète pas d'IgG<sub>4</sub> (Mestas and Hughes, 2004). Dans un modèle murin, la réponse Th2 entraîne la production d'IgE et d'IgG<sub>1</sub> induite par l'IL-4 et la réponse Th1 correspond à une production d'IgG<sub>2a</sub> en présence d'IFN- $\gamma$  (Halstensen, 1997; Taylor et al., 2012).

Les modèles animaux permettent d'évaluer l'allergénicité d'une protéine lors des deux phases de la réaction allergique : la sensibilisation et le déclenchement. De nombreux protocoles de modèles murins d'allergie à des protéines alimentaires existent avec une large diversité concernant la souche de la souris, la voie de sensibilisation, la nature de l'allergène, l'utilisation d'adjuvant, la dose, le nombre et la fréquence d'administration. Chacun de ces paramètres peut impacter les niveaux de réponse de l'allergie alimentaire (Liu et al., 2016).

La voie de sensibilisation orale permet de prendre en compte les effets de la digestion et du passage de l'allergène à travers l'épithélium intestinal mais, en absence d'adjuvants, cette voie est associée au développement de la tolérance orale. Ainsi pour induire une sensibilisation allergique par voie orale, l'utilisation d'un adjuvant comme la toxine cholérique est requise (Aldemir et al., 2009). Cette technique nécessite également une forte quantité de protéines de façon répétée. La voie de sensibilisation

intrapéritonéale permet une évaluation plus directe de la capacité de sensibilisation d'une protéine et permet par rapport à la voie orale, de ne pas induire une tolérance (Aldemir et al., 2009). A l'heure actuelle la voie de sensibilisation qui permet de prédire au mieux le potentiel allergénique d'une protéine alimentaire chez l'homme n'est pas clairement identifiée (Bøgh et al., 2016).

L'allergénicité d'une protéine est caractérisée par l'étude de différents paramètres chez la souris. Tout d'abord, la capacité de sensibilisation d'un allergène est évaluée en mesurant la production d'IgE. La mesure des IgG<sub>1</sub> permet comme les IgE de caractériser un profil pro-Th2 alors que la production d'IgG<sub>2a</sub> permet de caractériser un profil pro-Th1. Ensuite, l'évaluation des cellules impliquées et des cytokines sécrétées complète les données de caractérisation de la phase de sensibilisation. Enfin, suite à une provocation, l'évaluation de symptômes cliniques ou de marqueurs de la réaction allergique comme les protéases libérées par les mastocytes (Mouse mast cell protease-1, mMCP-1) permet d'évaluer la capacité de déclenchement des allergènes.

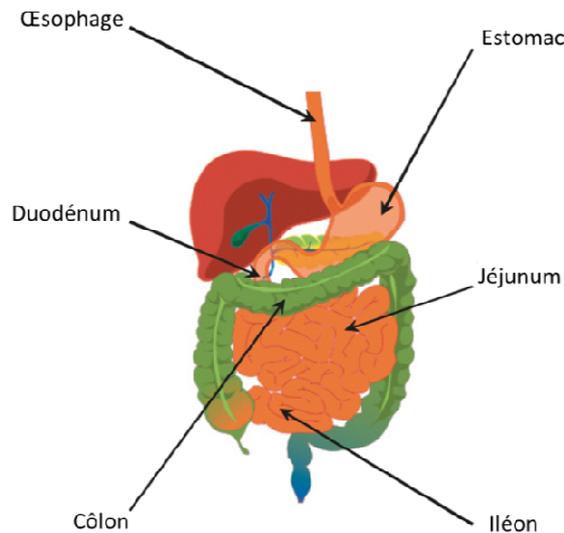
### **3. Digestion et passage des allergènes**

Le tractus gastro-intestinal présente la plus grande interface entre notre corps et l'environnement extérieur et exerce différentes fonctions comme la digestion, l'absorption des nutriments, le maintien de l'homéostasie (Groschwitz and Hogan, 2009). Normalement, le tractus gastro-intestinal discrimine les substances étrangères dangereuses de celles qui sont bénéfiques pour l'organisme.

Les protéines ingérées subissent des étapes de digestion et de passage pour entrer en contact avec le système immunitaire, potentiellement lors de la phase de sensibilisation et lors de la phase de déclenchement. La compréhension des étapes de digestion et de passage dans l'étude de l'allergénicité est donc essentielle car elles peuvent jouer un rôle déterminant dans le potentiel allergénique des protéines alimentaires. Afin de comprendre ces deux étapes, la description du tractus gastro-intestinal et du système immunitaire associé à l'intestin est nécessaire.

### 3.1 Le tractus gastro-intestinal et la structure de l'intestin

Le tractus gastro-intestinal s'étend de la bouche à l'anus et comprend la cavité orale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le colon. L'intestin grêle est lui-même divisé en trois sous-parties : le duodénum qui fait suite à l'estomac, puis le jéjunum et l'iléon (Coudeyras and Forestier, 2010) (Figure 12).



**Figure 12** : Anatomie du tractus gastro-intestinal (D'après Coudeyras & Forestier, 2010)

L'intestin assure trois fonctions principales : la digestion, l'absorption et la motilité du contenu intestinal. L'absorption s'effectue principalement au niveau du jéjunum et à un niveau moins élevé dans l'iléum. Pour assurer la fonction d'absorption, l'intestin présente une structure particulière constituée de replis, les villosités. Sa paroi est principalement constituée d'une monocouche de cellules épithéliales présentant elles-mêmes des replis appelés microvillosités qui forment la bordure en brosse. Les villosités et microvillosités augmentent considérablement la surface d'absorption (Pabst, 1987).

D'autres types cellulaires sont également présents comme les cellules de Goblet qui sécrètent de la mucine, molécule assurant une protection de la muqueuse digestive, les cellules de Paneth qui sécrètent des enzymes digestives et des peptides antimicrobiens et les cellules « microfold » (cellules M) (Magalhaes et al., 2007).

### 3.2. Le système immunitaire associé à l'intestin

L'intestin est en permanence exposé à des antigènes alimentaires et à des microorganismes. Sa protection est assurée par un système immunitaire spécifique, le GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) (van Wijk and Knippels, 2007). Dans des conditions normales, le système immunitaire associé à l'intestin est capable de répondre de manière appropriée aux antigènes et aussi d'induire une protection immunitaire aux éventuels pathogènes qui utilisent l'intestin comme site d'entrée et d'infection (Pearson et al., 2012). Le GALT peut être divisé en deux compartiments, le compartiment inducteur qui contient les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les ganglions mésentériques, et le compartiment effecteur qui correspond aux lymphocytes dispersés au niveau de l'épithélium et de la lamina propria (Magalhaes et al., 2007; van Wijk and Knippels, 2007) (Figure 13).

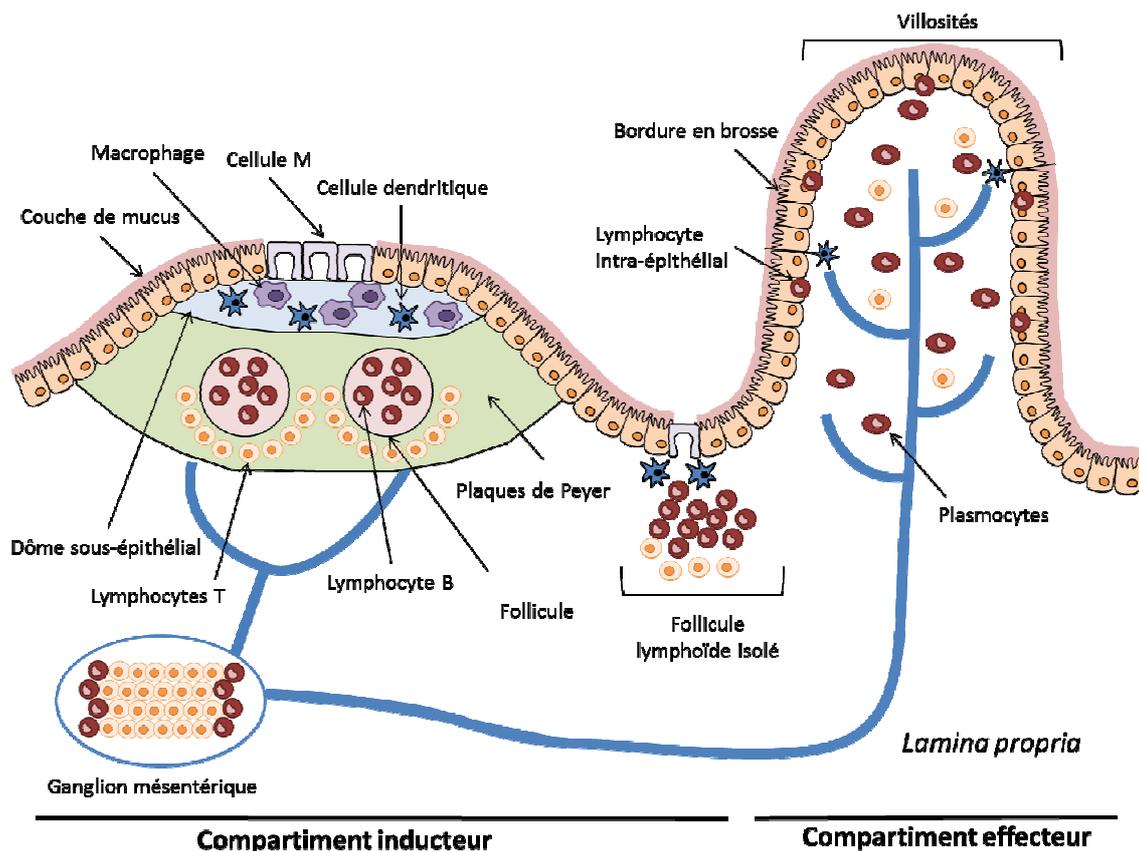


Figure 13 : Système immunitaire associé à l'intestin (D'après Magalhaes et al., 2007)

Les plaques de Peyer sont des follicules lymphoïdes spécialisés qui sont composés de DCs et de follicules de lymphocytes B entourés par une zone de lymphocytes T. La zone lymphoïde est séparée de la lumière intestinale par une couche de cellules épithéliales

qui se différencie de l'épithélium des villosités par: la présence d'entérocytes spécialisés, les cellules M (*microfold*), qui présentent un niveau plus bas d'enzymes digestives et une bordure en brosse moins prononcée et un nombre important de lymphocytes B et T, de macrophages et de DCs à proximité (Magalhaes et al., 2007; Pabst and Mowat, 2012).

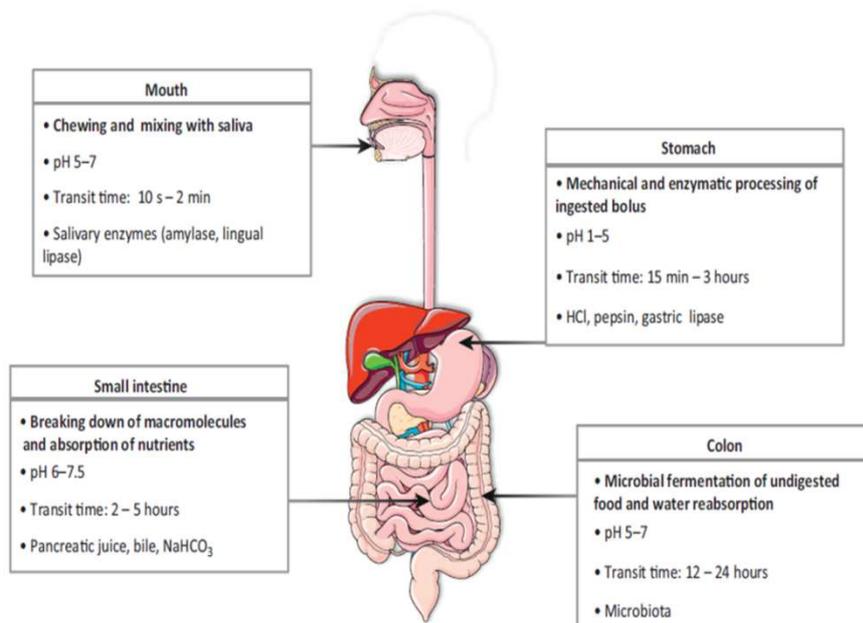
Les ganglions mésentériques sont les plus gros ganglions lymphatiques de l'organisme. Ils jouent un rôle crucial dans l'induction de la tolérance. Dans les heures suivant l'ingestion d'une protéine, la reconnaissance de l'antigène et l'activation des lymphocytes T naïfs a lieu principalement dans ces ganglions (Pabst & Mowat, 2012).

### 3.3. Digestion des protéines

La digestion des antigènes alimentaires joue un rôle dans l'allergie car elle est susceptible de libérer des protéines plus ou moins dégradées et donc potentiellement immunogènes (Untersmayr, 2015; Untersmayr and Jensen-Jarolim, 2008). L'étude de l'allergénicité d'une protéine prend en compte l'évaluation de sa résistance à la digestion (Moreno, 2007).

#### 3.3.1. Mécanisme de digestion des protéines

Chaque partie du tractus gastro-intestinal a sa propre fonction dans la digestion des aliments (Figure 14).



**Figure 14:** Fonctions du tractus gastro-intestinal dans la digestion (Guerra et al., 2012)

La digestion commence avec la mastication des aliments dans la bouche et par leur imprégnation avec la salive. Cette étape a pour but de transformer les aliments ingérés en particules plus petites contenues dans un bol visqueux qui se retrouve ensuite transporté dans l'estomac où il est stocké et malaxé. Les protéines alimentaires sont exposées à un pH de plus en plus acide et à différentes protéases, les pepsines qui hydrolysent les protéines en polypeptides. Le contenu gastrique est vidangé dans l'intestin où il est soumis aux protéases et peptidases produites par le pancréas (trypsine, chymotrypsine, élastase, et carboxypeptidases) et par la bordure en brosse de l'intestin (aminopeptidases, di et tri-peptidases). Ces enzymes libèrent un mélange d'acides aminés, de di- et tri-peptides et d'autres produits de protéolyse (Guerra et al., 2012; Reitsma et al., 2014). Certaines protéines échappent au mécanisme de digestion en totalité ou partiellement et se retrouvent intactes au niveau de barrière intestinale.

### **3.3.2. Modèles de digestion *in vitro***

Il existe deux principaux modèles de digestion *in vitro* : les modèles statiques et les modèles dynamiques. Les modèles de digestion statique sont les plus fréquemment utilisés du fait notamment de la facilité de mise en œuvre et de leur coût peu élevé. Ces modèles ne prennent pas en compte la dynamique du processus de digestion. Les modèles de digestion dynamique permettent de prendre en compte certains paramètres non considérés dans les modèles statiques comme les modifications progressives de pH et de quantité d'enzymes, ou les flux entre les différentes parties du tractus gastro-intestinal. Ces modèles sont plus proches du comportement digestif observé *in vivo* (Guerra et al., 2012) mais nécessitent un appareillage plus complexe qui ne peut réaliser qu'une cinétique à la fois et requièrent des quantités importantes de produit à digérer et enzymes. Il est aussi nécessaire de disposer de données *in vivo* afin de paramétrer au mieux ces systèmes.

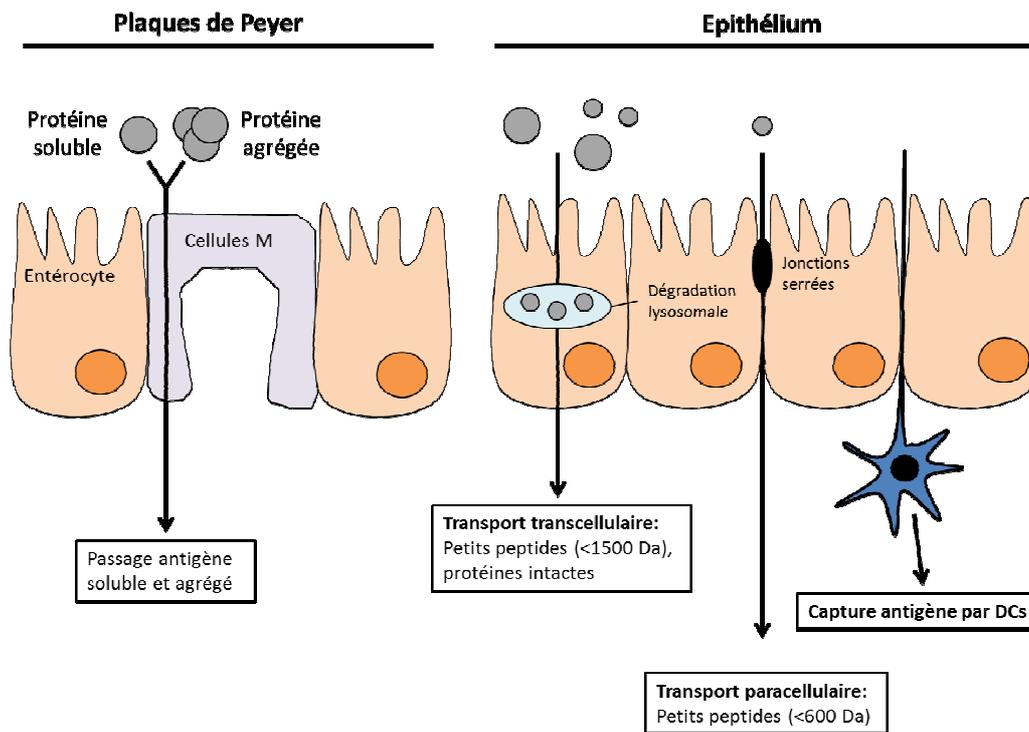
### **3.4. Passage de la barrière intestinale**

Les protéines ayant survécu aux étapes de digestion dans l'intestin et les peptides peuvent passer la barrière intestinale via plusieurs voies et mécanismes qui impliquent différentes cellules. Le passage des antigènes dépend de certaines caractéristiques de l'allergène comme la taille, la forme, la polarité et la structure 3D de la molécule et

diffère selon l'état de sensibilisation du patient, selon la maturité de la muqueuse, le statut médical et la microflore (Perrier and Corthésy, 2011).

### 3.4.1. Passage chez des individus non sensibilisés

Chez les individus non sensibilisés, où l'épithélium est intact, l'allergène peut passer via différentes cellules (Figure 15).



**Figure 15 :** Mécanisme de passage de l'antigène chez un individu non sensibilisé (D'après Perrier & Corthésy, 2011)

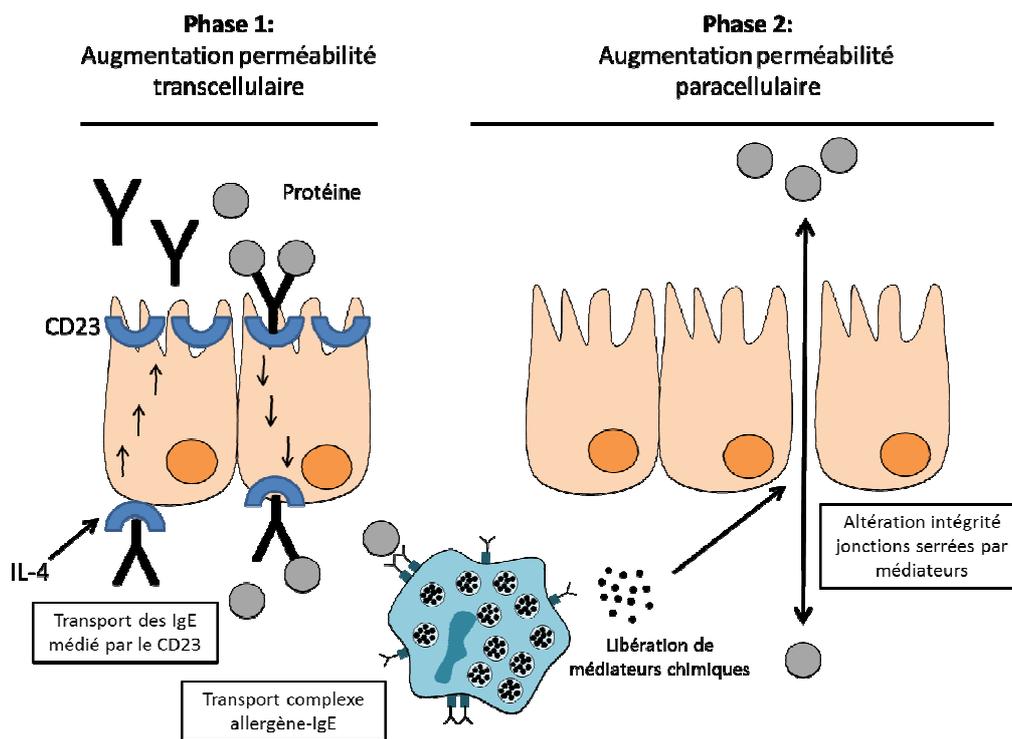
Le passage peut s'effectuer par les entérocytes. La structure même de ces cellules présentant des microvillosités favorise l'absorption des molécules au niveau de la lumière intestinale par une augmentation de la surface d'échange. Les acides aminés et petits peptides inférieurs à 600 Da obtenus après digestion sont absorbés par la muqueuse intestinale via un mécanisme de diffusion paracellulaire. Les peptides les plus gros, inférieurs à 1500 Da, qui possèdent une activité immunologique et les protéines intactes peuvent traverser la barrière intestinale par transcytose dans le compartiment lysosomal pour être dégradés avant leur libération (Perrier and Corthésy, 2011). Une faible partie des protéines et peptides est libérée sans dégradation et peut être retrouvée dans le sang de la veine porte ou de la circulation générale.

Les antigènes peuvent également être captés par des cellules spécialisées, les cellules M (« Microfold ») se situant au niveau des plaques de Peyer. Les cellules M transportent préférentiellement les particules et les protéines digérées devenues insolubles ou qui forment des agrégats. Par exemple, il a été démontré pour le lait, que les protéines sous formes d'agrégats passent la barrière intestinale via les plaques de Peyer (Roth-Walter et al., 2008).

Les DCs peuvent directement prélever l'antigène par extension des dendrites dans la lumière intestinale et ainsi capter l'antigène sous une forme intacte non digérée ou sous forme de fragments (Ruiter and Shreffler, 2012b).

### 3.4.2. Passage chez des individus sensibilisés

Chez les individus sensibilisés, les mécanismes de passage de l'allergène peuvent être différents et il a été rapporté chez ces patients une augmentation de la perméabilité intestinale (Ventura et al., 2006) (Figure 16).



**Figure 16 :** Mécanisme de passage de l'allergène chez un individu sensibilisé (D'après Perrier, Thierry, Mercenier, & Corthésy, 2010)

La perméabilité intestinale peut être augmentée par un mécanisme en deux phases. Lors d'une première phase, le passage transépithélial des allergènes est tout d'abord facilité par le CD23 (FcεRII), récepteur de faible affinité aux IgE humaines qui protège

les allergènes de la dégradation lysosomale (Ménard et al., 2010). Ensuite, lors d'une deuxième phase, la dégranulation des mastocytes au niveau de l'intestin lors de la réaction allergique libère des médiateurs chimiques qui vont altérer les jonctions serrées situées entre les entérocytes et augmenter ainsi la perméabilité paracellulaire. Ainsi, chez les individus sensibilisés, l'allergène peut également traverser la barrière intestinale sous forme intacte via un transport paracellulaire possible uniquement pour les petites molécules chez les individus non sensibilisés (Perrier and Corthésy, 2011).

La voie de transport paraît donc importante pour la réponse immunitaire. La quantité d'allergène influence le type de réponse du système immunitaire sans que l'on sache réellement définir actuellement les propriétés de l'allergène qui vont favoriser une voie ou l'autre chez des individus non sensibilisés.

### 3.4.3. Modèles d'étude du passage de l'allergène

L'étude du passage de l'allergène peut s'effectuer *ex vivo* et *in vitro*. Dans les deux cas, des marqueurs peuvent être utilisés pour évaluer la perméabilité para et transcellulaire de l'épithélium dans son état basal en enregistrant les modifications liées à la présence d'une protéine. La mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER, *Transeptihelial electrical resistance*) permet notamment d'étudier le passage des ions à travers la voie paracellulaire (Perrier and Corthésy, 2011).

#### Modèle *ex vivo*

Un modèle *ex vivo* d'étude de la perméabilité intestinale, appelé chambres de Ussing, se compose d'un tissu épithélial où chaque face de la membrane est isolé dans des chambres séparées. Les chambres sont remplies d'une solution physiologique (Figure 17).

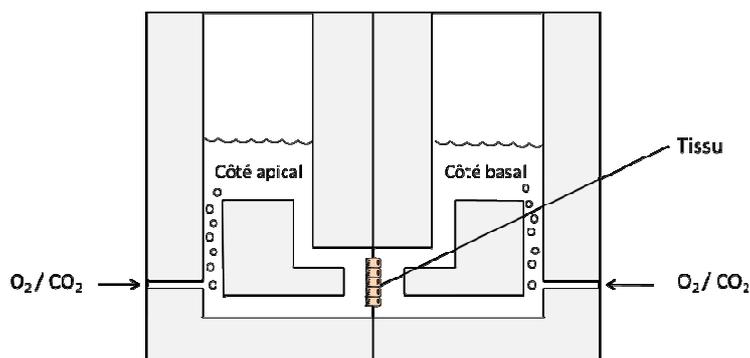


Figure 17 : Représentation schématique des chambres de Ussing

Un système de bullage permet l'oxygénation du milieu et du tissu et une légère homogénéisation de la solution. Le système entier est chauffé à 37°C.

Cette technique permet de prendre en compte l'ensemble des fonctionnalités physiologiques et morphologiques de l'intestin par rapport à des modèles cellulaires qui ne considèrent qu'un ou deux types cellulaires. Cette méthode donne donc une meilleure représentation des différents mécanismes de passage. La limitation de cette technique est la disponibilité limitée des segments intestinaux et la viabilité des tissus limitée à quelques heures (Verhoeckx et al., 2015).

### Modèles cellulaires

Les cellules épithéliales de l'intestin sont très difficiles à cultiver comme cellules primaires. Récemment, une technique a été mise en place permettant la croissance en culture d'organoïdes intestinaux en 3D. Cependant, les modèles *in vitro* les plus utilisés sont des lignées cellulaires comme les Caco-2 et les HT29-MTX (Balimane and Chong, 2005).

Les cellules Caco-2 sont des cellules de carcinome humain qui possèdent la propriété de se différencier spontanément en une monocouche de cellules présentant de nombreuses propriétés typiques d'entérocytes comme une bordure en brosse comparable à celle trouvée dans l'intestin. A confluence, les cellules Caco-2 commencent à se différencier spontanément en cellules polarisées avec des microvillosités au pôle apical et des jonctions serrées (Lea, 2015) (Figure 18).

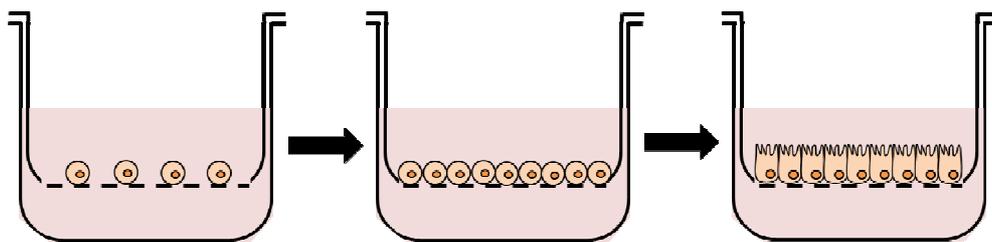


Figure 18 : Différenciation des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 expriment également de nombreuses enzymes des cellules épithéliales primaires et des protéines de transports. Cependant les Caco-2 ne produisent pas de mucine contrairement aux HT29. Les HT29-MTX à confluence développent des jonctions serrées fonctionnelles mais pas au même niveau que les cellules Caco-2 (Martinez-Maqueda et al., 2015).

Ainsi, les cellules Caco-2 sont plus souvent utilisées pour étudier les fonctions barrières de l'épithélium et le transport transcellulaire que les HT29. Une co-culture de ces deux types cellulaires a été développée pour compenser le manque de mucus pour le modèle Caco-2 (Lea, 2015).

#### **4. Traitements thermiques et allergénicité**

Les aliments subissent différents traitements avant leur consommation dans le but d'améliorer leurs qualités fonctionnelles, nutritionnelles et sensorielles et leur conservation. Ces traitements peuvent altérer la structure des protéines de l'aliment et par conséquent modifier leur allergénicité. En fonction de l'aliment et du traitement appliqué, le potentiel allergique de chacune des protéines peut être augmenté, diminué ou inchangé.

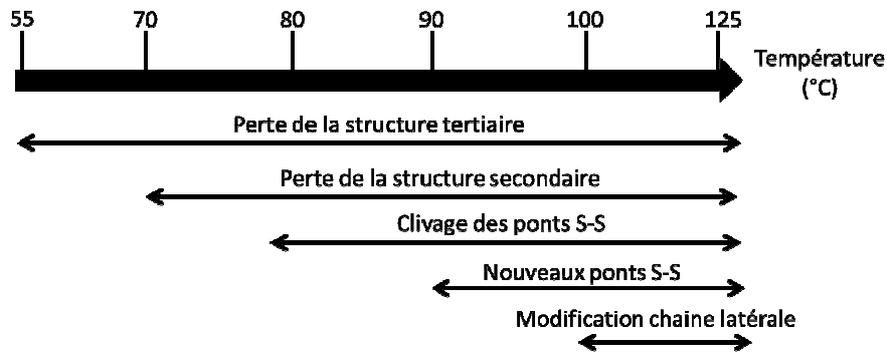
La prédiction de l'allergénicité en fonction des traitements appliqués est difficile à effectuer puisque non seulement le type de traitement mais, également les autres composants de la matrice alimentaire (polyphénols, lipides, sucres) peuvent modifier le potentiel allergénique des protéines. De plus, il est nécessaire de considérer l'impact des traitements sur les deux phases de la réaction allergique : la phase de sensibilisation et le déclenchement (Lepski and Brockmeyer, 2013).

##### **4.1. Traitement thermique, structure des protéines et agrégation**

Les aliments sont souvent soumis à des traitements thermiques afin de réduire le niveau de pathogènes, d'augmenter la durée de vie de l'aliment et d'améliorer la qualité des produits. Des traitements thermiques variés notamment en termes de température et durée sont utilisés. Dans sa forme native, une protéine globulaire est repliée sous une configuration particulière déterminée par la structure primaire qui correspond à la séquence d'acides aminés. Certaines régions de la protéine présentent des structures secondaires particulières, hélice  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ . Ces régions participent à la structure 3D. Les groupes hydrophobes sont situés à l'intérieur de la structure alors que les groupes hydrophiles interagissent avec l'eau sont à la surface de la protéine. Cette configuration native est stabilisée par les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques et les ponts disulfures. Avant

chauffage, la protéine est majoritairement sous cette forme, où l'état d'énergie est minimum.

Au cours d'un traitement thermique, différents mécanismes vont intervenir et modifier la structure de la protéine (Figure 19).



**Figure 19 :** Modifications de la structure de la protéine en fonction de la température au cours d'un traitement thermique (D'après Davis & Williams, 1998)

Les traitements thermiques entraînent successivement la perte de la structure 3D (dès 55°C), la perte de la structure secondaire (dès 70°C), la rupture des ponts disulfures (dès 80°C), la formation de nouveaux ponts disulfures (dès 90°C) et des modifications de la chaîne latérale (dès 100°C) (Davis and Williams, 1998).

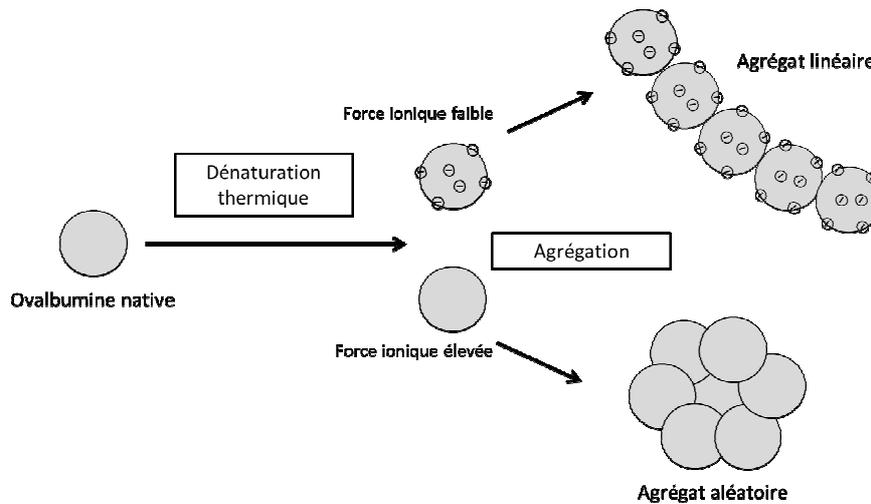
Lors d'un traitement thermique, une protéine au-delà d'une température se dénature : la chaîne polypeptidique en se dépliant expose les groupes hydrophobes avec le milieu aqueux environnant. Cette disposition défavorable du point de vue thermodynamique conduit la protéine à adopter un état d'énergie plus faible, principalement atteint par une association des protéines via des interactions mutuelles hydrophobes et la formation de nouveaux ponts disulfures intermoléculaires. Ce phénomène est appelé agrégation protéique (Davis and Williams, 1998).

La dénaturation correspond à un dépliement de la protéine sans rupture des liaisons covalentes, il s'agit donc d'un phénomène réversible. A l'inverse, l'agrégation protéique est un processus irréversible. Lorsque la concentration protéique est suffisante, l'association des agrégats entre eux conduit à la formation d'un gel (Nicolai and Durand, 2013).



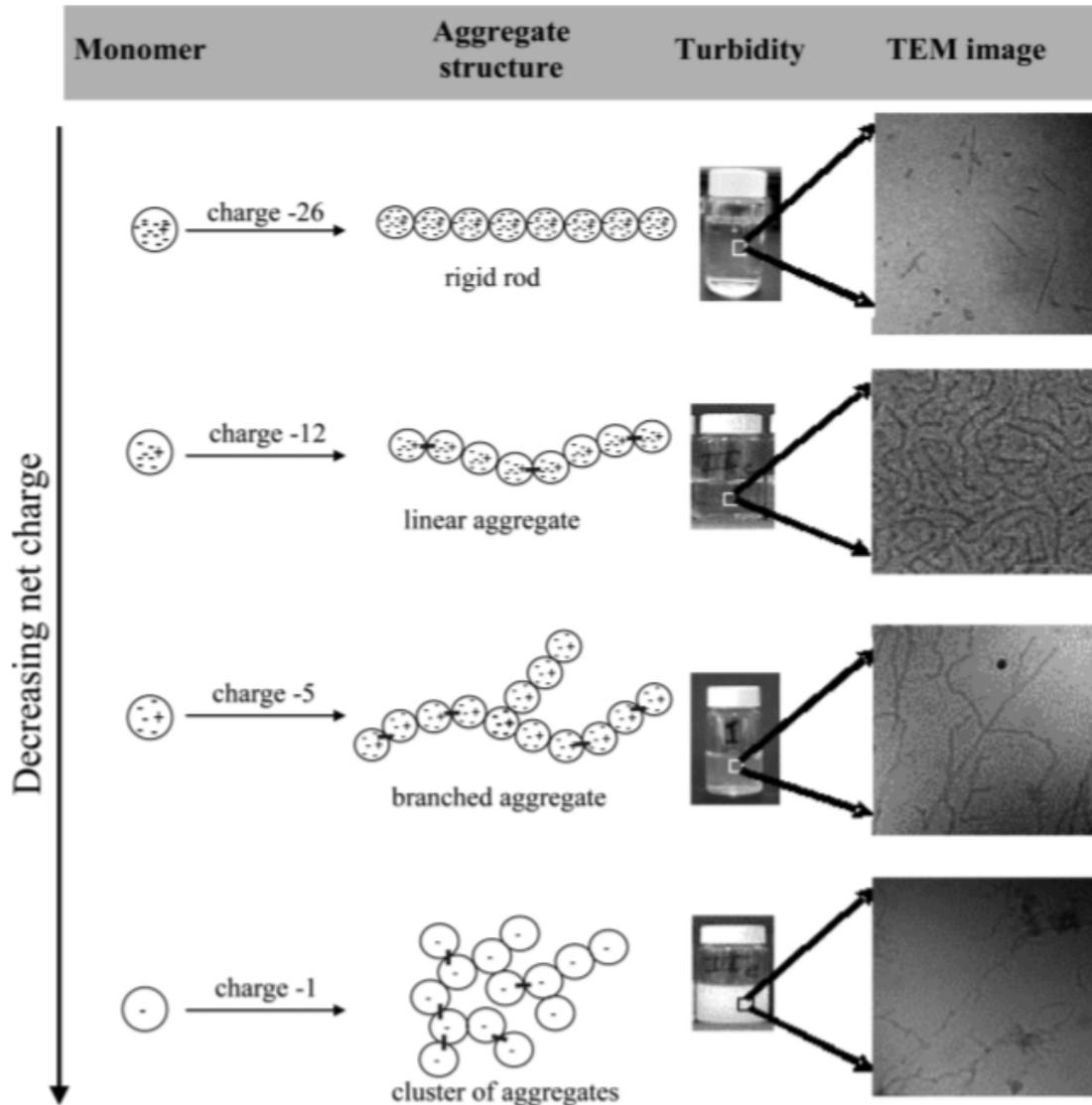
### Exemple de l'OVA

Le processus d'agrégation et la structure des gels qui en résulte dépendent des conditions externes comme le pH, la force ionique, la concentration en protéines et la température (Durand et al., 2002). La charge électrostatique de la protéine détermine la structure des agrégats (Weijers et al., 2008). Les agrégats présentent une structure d'autant plus linéaire que les répulsions électrostatiques résiduelles sont élevées (pH éloigné du point isoélectrique et faible force ionique) (Bryant and McClements, 1998; Koseki et al., 1989; Weijers et al., 2002) (Figure 20).



**Figure 20** : Modèle de dénaturation thermique et d'agrégation de l'OVA (D'après Koseki, Kitabatake, & Doi, 1989)

Il a été démontré pour l'OVA que l'apparence visuelle des agrégats en solution, notamment leur turbidité, est fortement associée à leur organisation morphologique. Des solutions transparentes correspondent à des structures fibrillaires alors que des solutions turbides correspondent à des structures branchées (Figure 21) (Weijers et al., 2008).



**Figure 21** : Schéma de l'agrégation de l'OVA en fonction de la charge de la molécule (Weijers et al., 2008)

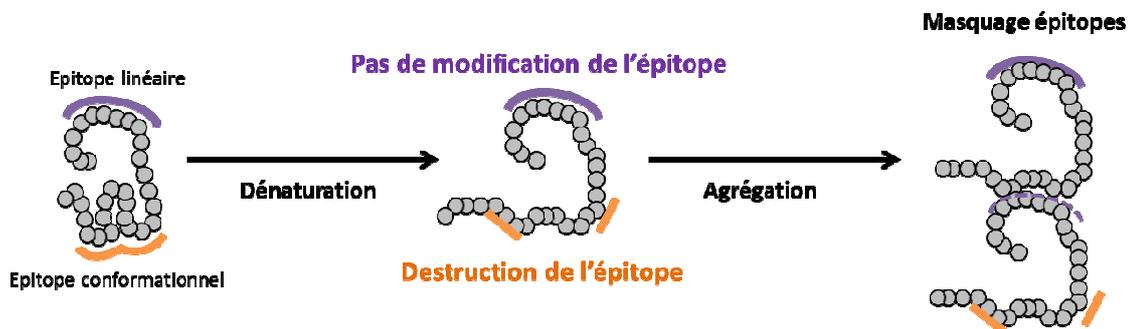
Suivant ce principe, pour un même traitement thermique, en modifiant les conditions de pH et de force ionique, la taille et la structure des agrégats sont modifiées. Un chauffage de 6h à 80°C d'une solution d'OVA forme des agrégats linéaires de quelques dizaines de nm à pH9-0,03M, des agrégats linéaires-branchés à pH7-0,03M, des agrégats sphériques de taille plus importante à pH7-0,3M et des agrégats sphériques-agglomérés de plusieurs dizaines de µm à pH pH5-0,08M (Nyemb et al., 2014a) (Figure 22).

Treatment conditions	Macrostructure	Microstructure (TEM)	Morphology	Mean particle size
pH 9/IS 0.03 M			Linear	33 nm*
pH 7/IS 0.03 M			Linear-branched	16 nm*
pH 7/IS 0.3 M			Spherical	30 μm**
pH 5/IS 0.8 M			Spherical-agglomerated	80 μm**

**Figure 22** : Schéma de l'agrégation de l'OVA en fonction du pH et de la force ionique (Nyemb et al., 2014a)

#### 4.2. Modifications structurales et allergénicité

L'antigénicité de la protéine peut être modifiée lors des traitements thermiques par la destruction des épitopes conformationnels qui représentent une forte proportion des épitopes contre lesquels sont dirigés les anticorps lors de la dénaturation de la protéine ou par le masquage des épitopes lors des phénomènes d'agrégation (Nowak-Wegrzyn and Fiocchi, 2009) (Figure 23).

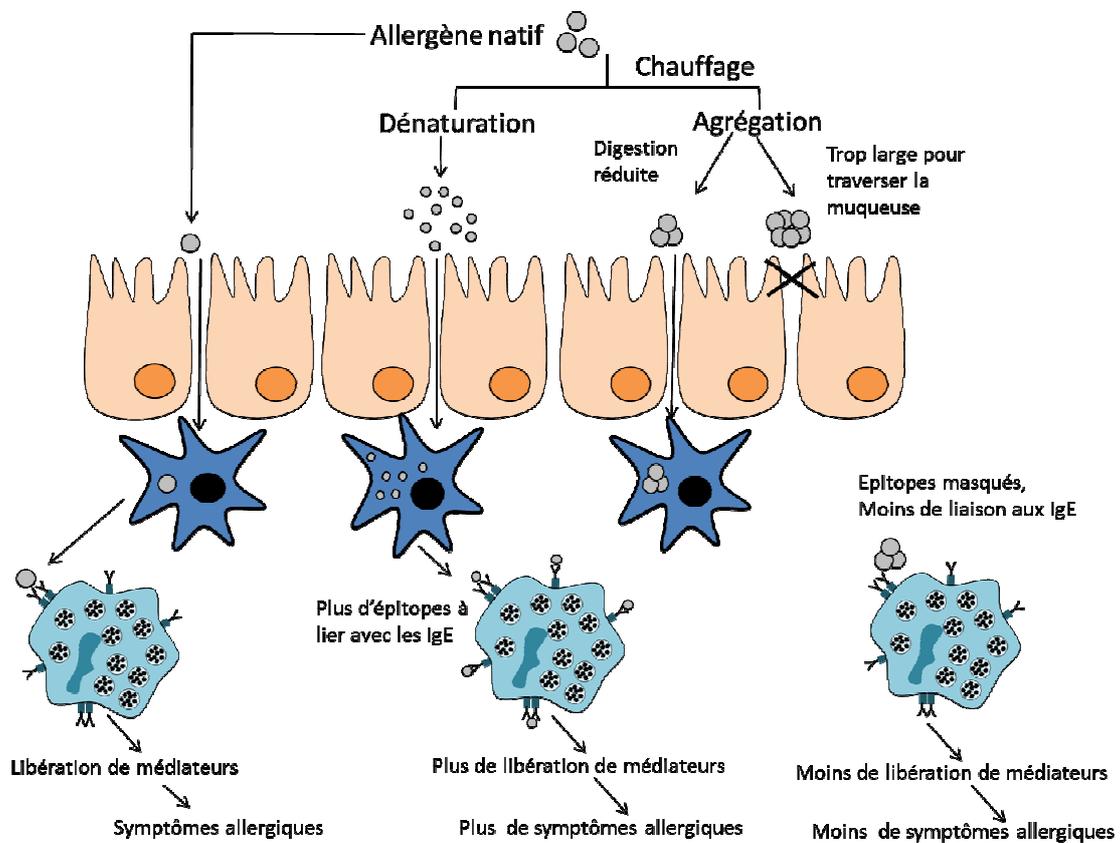


**Figure 23** : Schéma des modifications induites par traitement thermique sur les épitopes

Les modifications de la structure de la protéine peuvent également entraîner la formation de nouveaux épitopes conformationnels. Les épitopes linéaires ne sont pas directement impactés par les changements de structure mais leur exposition à la

surface de la protéine peut être modifiée ; ils peuvent se retrouver lors de phénomène d'agrégation ou au contraire se retrouver exposés lors de la dénaturation de la protéine.

Les traitements thermiques peuvent via des processus de dénaturation ou d'agrégation modifier la digestibilité, l'absorption et la présentation des allergènes au système immunitaire (Figure 24). En agissant sur tous ces paramètres, la réaction allergique peut être augmentée ou diminuée (Rahaman et al., 2016). Ces effets dépendent de l'allergène et du traitement appliqué. L'exemple de l'œuf sera abordé plus précisément dans la partie suivante.



**Figure 24 :** Effets potentiels du chauffage sur la digestion, l'absorption et la réactivité immunitaire d'allergène alimentaire (Rahaman et al., 2016)

### **4.3. Modifications chimiques et allergénicité**

Au-delà de l'effet sur la structure même des protéines, les traitements thermiques peuvent également entraîner des modifications chimiques. La plus fréquente est la réaction de Maillard ou brunissement non enzymatique. Cette réaction se produit entre un groupement aminé libre d'une protéine et un sucre réducteur principalement au-delà de 100°C. La modification des protéines par la réaction de Maillard peut modifier leur allergénicité (Mills and Mackie, 2008). Cette réaction aboutit à la formation de nouveaux produits appelés produits finaux de glycation avancés qui peuvent correspondre à de nouveaux antigènes. La réaction de Maillard peut également améliorer l'immunogénicité et augmenter l'activation des lymphocytes T par les DCs (Lepski and Brockmeyer, 2013). Les traitements thermiques peuvent s'accompagner d'autres réactions (oxydation, nitration, désamidation...) affectant certains acides aminés. En modifiant la structure primaire des allergènes, ces réactions modifient les épitopes existants ou conduisent à de néo-épitopes, et modifient ainsi l'allergénicité.

### **4.4. Traitement thermique et allergénicité de l'œuf**

L'œuf est un produit qui peut être consommé sous une forme crue ou cuite, ce qui peut modifier son allergénicité. Le blanc d'œuf est un aliment soumis aux phénomènes de dénaturation, agrégation et gélification. L'agrégation du blanc d'œuf commence vers 60°C, température de dénaturation de l'ovotransferrine et atteint son maximum vers 70°C, température de dénaturation de l'OVA (Campbell et al., 2003). L'OVA, est fortement impliquée dans le processus d'agrégation du blanc d'œuf : c'est la protéine majeure du blanc d'œuf (54%) et elle possède des groupements SH libres capables de former des liaisons covalentes avec d'autres protéines.

L'impact du traitement thermique sur l'allergénicité a principalement été étudié sur le blanc d'œuf et des protéines isolées, majoritairement l'OVA et l'OVM. Nous ne présenterons ici que les principaux résultats obtenus pour le blanc d'œuf et l'OVA.

#### 4.4.1. Capacité de sensibilisation

Cette phase ne pouvant être étudiée chez l’homme que par des études rétrospectives, les données disponibles proviennent principalement de modèles animaux et de modèles *ex vivo*. Les résultats des principaux travaux sont présentés dans le tableau 4<sup>1</sup>.

**Tableau 4 :** Effets du traitement thermique de l’OVA ou du blanc d’œuf sur la phase de sensibilisation par rapport à la forme non cuite. 1 (Watanabe et al., 2014), 2 (Golias et al., 2012), 3 (Rupa et al., 2015)

Ref	Fraction protéique	Chauffage	Nature du produit chauffé	Conditions	Données structurales		Allergénicité
					Caractérisation		
<b>Modèle murin</b>							
1	Chauffage blanc d’œuf puis étude OVA	100°C/5 min	Blanc d’œuf liquide	Naturelles du blanc d’œuf	Agrégat	Induction tolérance (↘ réponse T et IgE)	↘ symptômes
		80°C/15 min			Agrégat	↘ inflammation intestinale	
2	OVA	70°C/10 min	Poudre			Réponse de type Th1: - production ↘ IgE et ↗ d’IgG2a - sécrétion ↘ d’IL-4, d’IL-5 et d’IL-13 par les splénocytes → Symptômes ↘	
<b>Modèle <i>ex vivo</i></b>							
3	OVA	100°C/5 min	Solution 1 mg/ml			Modifications profil cytokinique : - production ↗ d’IL-17 et d’IL-10 - production ↘ d’IL-4	

De façon générale, le traitement thermique de l’OVA diminue la sensibilisation allergique en modifiant le type de réponse induite au niveau cellulaire et tissulaire et les Ig produites. En fonction des traitements thermiques appliqués, la différence de réponse est plus ou moins marquée avec la forme native. Ainsi un traitement thermique de 80°C pendant 15 min du blanc d’œuf induit toujours une réponse de type Th2 mais diminue l’inflammation au niveau tissulaire et les symptômes allergiques. D’autres traitements induisent une réponse de type Th1 ou l’induction d’une tolérance. Chez l’homme, les données comparant la capacité de sensibilisation de l’œuf cuit par rapport à l’œuf cru manquent. L’étude rétrospective de Koplin et al.

<sup>1</sup> Dans ce tableau ainsi que les suivants, les informations disponibles dans les publications ont été collectées, les cases vides signifient l’absence d’information correspondante

2010 indique qu'une première introduction de l'œuf sous forme cuite (œuf dur, poché, brouillé, frit) chez le nourrisson entre l'âge de 4 et 6 mois réduirait le risque de développer une allergie à l'œuf par rapport à l'introduction sous forme de gâteaux/biscuits.

#### 4.4.2. Capacité de déclenchement

L'effet des traitements thermiques sur la capacité de déclenchement ou la liaison aux IgE a été évalué *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles animaux ou chez l'homme (Tableau 5).

La capacité de déclenchement des formes chauffées peut être inchangée ou diminuée par rapport à la forme native en fonction des traitements appliqués et des tests effectués.

**Tableau 5 :** Effets du traitement thermique de l'OVA ou du blanc d'œuf sur la phase de déclenchement par rapport à la forme non cuite. 1 (Martos et al., 2011) ; 2 (Joo and Kato, 2006) ; 3 (Bloom et al., 2014) ; 4 (Shin et al., 2013) ; 5 (Jiménez-Saiz et al., 2011) ; 6 (Golias et al., 2012)

Ref	Fraction protéique	Chauffage	Nature du produit chauffé	Conditions	Données structurales	Allergénicité
					Caractérisation	
<b>Modèle murin</b>						
1	OVA	100°C/ 30 min	Solution			Symptômes ↓
2	OVA	100°C/ 15 min	Solution 50 mg/ml	PBS	Gel déstructuré par Polytron	Symptômes ↓ Maintien de l'activité physique volontaire
<b>Sérums humains</b>						
3	OVA	260°C/ 3 min	Pâte à gaufre			Liaison IgE ↓  Classement (+ au - allergène) : Brouillé> Dur > Gaufre > Muffin
		176°C/30 min	Pâte à muffin			
		90°C/8-10 min	Œuf dur	Naturelles		
		4-6 min	Œuf brouillé	Naturelles		
4	Blanc d'œuf	Frit 3 min	Blanc d'œuf	Naturelles		Liaison IgE ↓
		170°C/20 min	Blanc d'œuf	Naturelles		Liaison IgE ↓
		100°C/30 min	Blanc d'œuf	Naturelles		Liaison IgE ↓
		100°C/10 min	Blanc d'œuf	Naturelles		Liaison IgE =
5	OVA	90°C/15 min	Solution 5mg/ml	pH7, eau	Agrégat	Liaison IgE ↓
<b>Test activation basophiles humains</b>						
1	OVA	100°C/30 min	Solution			Capacité =
<b>Test activation basophiles avec sérum souris sensibilisées</b>						
6	OVA	95°C/10 min				Capacité ↓
		70°C/10 min	Poudre			Capacité =

Chez la souris, l'OVA chauffée entraîne par rapport aux formes natives, une réaction allergique plus faible caractérisée par une baisse de température corporelle moins importante (Martos et al., 2011). Chez l'homme, la majorité des patients tolère l'œuf cuit (Lemon-Mulé et al., 2008; Turner et al., 2013) et la capacité de liaison des IgE de sérum de patients aux protéines au blanc d'œuf ou à l'œuf entier est généralement diminuée après cuisson (Bloom et al., 2014; Jiménez-Saiz et al., 2011).

#### 4.4.3. Digestibilité

Peu d'études sont disponibles sur l'influence des traitements thermiques sur la digestibilité d'une part et le lien avec la capacité allergénique d'autre part (Tableau 6).

**Tableau 6:** Effets du traitement thermique sur la digestibilité de l'OVA et son allergénicité après digestion par rapport à la forme non cuite. 1 (Martos et al., 2011) ; 2 (Joo and Kato, 2006) ; 3 (Jiménez-Saiz et al., 2011) ; 4 (Nyemb et al., 2014a) ; 5 (Nyemb et al., 2016)

Ref	Chauffage	Conditions	Données structurales	Digestibilité	Allergénicité après digestion
			Caractérisation		
1	100°C/ 30 min			OVA chauffée > OVA N	Capacité ↓ à activer basophiles de patients allergiques
2	100°C/15 min	50 mg/ml, PBS + polytron	Gel déstructuré	Pas d'activité antigénique (IgG anti-OVA) des contenus gastriques (fraction soluble) ou intestinaux, Maintien d'une activité de la fraction gastrique insoluble	
3	90°C/ 15 min	Solution 5mg/ml pH7, eau	Agrégat	OVA chauffée > OVA native	Capacité de liaison IgE humaines ↓
	65°C/ 30 min		OVA chauffée= OVA native		
4	65°C/ 30 min	pH 9/0.03 M	Agrégat	Digestibilité : Linéaire > Linéaire branché > Sphérique > Sphérique aggloméré	Nature peptides libérés différentes selon les agrégats
			linéaire 33nm		
		pH 7/0.03 M	Agrégat		
			linéaire branché 16nm		
pH 7/0.3 M	Agrégat				
	sphérique 30µm				
pH 5/0.8 M	Agrégat				
	sphérique aggloméré 80µm				
5	80°C/1h	pH 9/0.05 M	Gel	Digestibilité : Granuleux > Intermédiaire > Rigide = Fracturable	Nature peptides libérés différentes selon les gels
			rigide lisse		
		pH 7/0.05 M	Gel		
			intermédiaire		
		pH 5/1 M	Gel		
			spongieux granuleux		
pH 2/0.05 M	Gel				
	fracturable				

La gélification du blanc d'œuf induit des modifications de digestibilité qui dépendent de la structure même du gel. Plus le réseau est lâche, plus le degré de digestion est élevé et la structure même du gel influence également les peptides libérés au cours de la digestion (Nyemb et al., 2016). De la même façon, l'agrégation de l'OVA par traitement thermique induit des modifications de digestibilité. L'hydrolyse de l'OVA agrégée est supérieure à l'OVA native. De plus, les niveaux d'hydrolyse ainsi que la nature des peptides obtenus libérés dépendent de la structure des agrégat (Nyemb et al., 2014a, 2014b). Ces différences de structure de gels et d'agrégats et par conséquent, de digestibilité peuvent entraîner des modifications de l'allergénicité. Les traitements thermiques en améliorant la digestibilité de l'OVA dans le tractus gastro-intestinal peuvent avoir un effet bénéfique chez les patients allergiques. L'OVA chauffée a une capacité plus faible à activer les basophiles de patients allergiques à l'œuf par rapport à la forme native après digestion gastroduodénale (Martos et al., 2011).

#### 4.4.4. Passage de la barrière intestinale

Le passage de protéines chauffées et/ ou leur capacité biologique après absorption semblent être diminués par rapport aux protéines natives (Tableau 7).

**Tableau 7:** Effets du traitement thermique sur le passage de l'OVA et son allergénicité après passage par rapport à la forme non cuite. 1 (Martos et al., 2011) ; 2 (Joo and Kato, 2006) ; 3 (Watanabe et al., 2014)

Ref	Chauffage	Nature du produit chauffé	Conditions	Données structurales		Passage	Allergénicité après passage
				Caractérisation			
<b>Modèle <i>in vitro</i> (Caco-2)</b>							
1	100°C/30 min	Solution d'OVA					Capacité à faire dégranuler les basophiles ↘
<b>Modèle <i>in vivo</i> : Administration orale chez souris puis dosage sanguin de l'OVA</b>							
2	100°C/15 min	Solution 50 mg/ml	PBS puis polytron			Pas d'activité antigénique (IgG anti-OVA) dans le sang portal	
3	100°C/5 min	Blanc d'œuf	naturelles du blanc d'œuf	Agrégat		Dans la circulation : retardé, et plus élevé que non chauffé à 60 min	
	80°C/15 min			Agrégat		Dans la circulation : = non chauffé	

Le traitement thermique de l'OVA induit *in vivo* une absorption plus lente par rapport à l'OVA native (Watanabe et al., 2014). L'OVA chauffée présente *in vitro*, une capacité à faire dégranuler les basophiles plus faible que l'OVA native après passage à travers un tapis de cellules Caco-2 et *in vivo*, le traitement thermique de l'OVA empêche son

passage sous une forme capable d'induire la différenciation des lymphocytes T effecteurs (Martos et al., 2011). Pour l'OVA native, les formes retrouvées dans le sang sont la forme intacte (45 kDa), et une autre tronquée de 40kDa (Matsubara et al., 2008) mais on ne sait pas sous quelles formes passe l'OVA après chauffage.

## **5. Conclusion, objectif du travail et démarche expérimentale**

Ces données de la littérature mettent en évidence, que tant du point de vue clinique qu'expérimental à l'aide des divers modèles animaux et cellulaires ou de méthodes immunochimiques, les traitements thermiques peuvent moduler l'allergénicité d'un aliment. Cette modulation est susceptible d'intervenir au cours des étapes de digestion, passage de la barrière intestinale, sensibilisation ou déclenchement de la réaction allergique. Les traitements thermiques très variés appliqués dans ces études, la description souvent incomplète des conditions physicochimiques et surtout l'absence de caractérisation des structures moléculaires et supra-moléculaires obtenues après chauffage conduisent à une vision parcellaire de ces effets. Ainsi, face à l'hétérogénéité des traitements thermiques appliqués et à l'absence de caractérisation des structures protéiques formées lors de ces traitements (taille, morphologie, ...), le rôle joué par les structures moléculaires et supra-moléculaires sur l'allergénicité reste difficile à évaluer.

Afin de progresser sur la connaissance des effets de l'alimentation sur les réactions allergiques, ce travail de thèse avait pour but de préciser les liens entre l'agrégation thermique des protéines et l'allergénicité en prenant l'OVA du blanc d'œuf comme protéine modèle.

Plusieurs types d'agrégats peuvent être obtenus en fonction des conditions physicochimiques appliquées lors du chauffage de l'OVA. Une caractérisation de leurs structures et le lien avec la digestibilité ont été détaillés (Nyemb et al., 2014a). S'appuyant sur ces travaux, deux conditions physico-chimiques pour l'agrégation de l'OVA conduisant à deux types d'agrégats présentant des structures et digestibilités différentes ont été retenues pour cette étude. Le traitement thermique à pH 9 (pH proche du pH naturel du blanc d'œuf) et faible force ionique (0.03M) soit en conditions de répulsions électrostatiques maximales, conduit à la formation de petits agrégats linéaires ayant une taille de l'ordre du nm. Le traitement thermique à pH 5 (pH proche

du point isoélectrique de l'OVA et de celui de nombreux produits alimentaires) en force ionique élevée (0.8M), soit en conditions de répulsion électrostatiques minimales conduit à la formation de larges agrégats de type sphériques agglomérés d'une taille de l'ordre du  $\mu\text{m}$ .

L'objectif de la thèse était d'étudier la modulation de l'allergénicité par ces deux agrégats par rapport à la forme native en prenant en compte différents aspects : leur capacité de sensibilisation, leur capacité de déclenchement et leur capacité antigénique après digestion ou passage.

Les techniques employées pour ce travail sont détaillées dans le chapitre 2. En bref, la capacité sensibilisante a été évaluée en modèle murin en mesurant la production de différentes Ig et l'induction de populations cellulaires. La capacité de déclenchement a été étudiée *in vivo*, par l'évaluation des symptômes et de marqueurs sanguins et *in vitro*, par un test d'activation des basophiles.

Une première étude (chapitre 3) comparant les larges agrégats à la protéine native a mis en évidence le rôle de l'agrégation dans l'allergénicité de l'OVA. Cette première étude a permis de tester la faisabilité et les limites techniques des agrégats en modèle murin et de réaliser une comparaison des réactivités des sérums des souris sensibilisées avec celle de sérums humains de patients allergiques à l'œuf. L'effet du type d'agrégation a ensuite été abordé en comparant en modèle murin, avec un protocole modifié, les deux types d'agrégats sélectionnés (chapitre 4).

L'effet de la digestion et celui du passage de la barrière intestinale sur la capacité antigénique des trois formes d'OVA ont été évalués en associant un modèle *in vitro* de digestion statique ou un modèle *ex vivo* de passage à un test de dégranulation des basophiles (chapitre 5). Une synthèse des résultats obtenus dans ce travail sera finalement présentée (Chapitre 6).



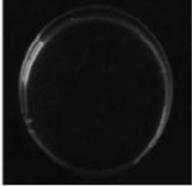
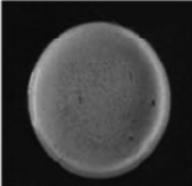
## **Chapitre 2 – Matériel et Méthodes**



## 1. Agrégation

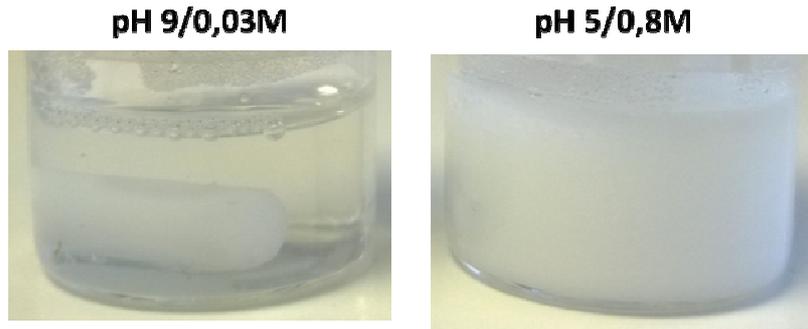
La fraction d'OVA purifiée utilisée pour ce travail de thèse a été fournie par le laboratoire STLO (Science et technologie du lait et de l'œuf) de Rennes. Il s'agit d'une fraction purifiée par Kéra Nyemb lors de son travail de thèse et qui a été utilisée pour étudier l'effet des conditions physico-chimiques pendant le traitement thermique sur la structure et la digestibilité des agrégats d'OVA. La pureté de l'OVA caractérisée par RP-HPLC est de 87%. De petites quantités d'autres protéines du blanc d'œuf ont été identifiées dans cette fraction purifiée et notamment l'ovotransferrine (Nyemb et al., 2014a).

Parmi les différents agrégats obtenus et caractérisés par Nyemb et al. (2014a), les conditions de pH proches du pH naturel du blanc d'œuf et les conditions aboutissant aux agrégats les plus éloignés d'un point de vue structural et de taille apparente ont été sélectionnés pour étudier le rôle joué par l'agrégation de l'OVA sur l'allergénicité (Figure 25).

Treatment conditions	Macrostructure	Microstructure (TEM)	Morphology	Mean particle size
pH 9/IS 0.03 M			Linear	33 nm*
pH 5/IS 0.8 M			Spherical-agglomerated	80 µm**

**Figure 25** : Caractéristiques des deux agrégats sélectionnés (Nyemb et al., 2014a)

L'agrégation thermique de l'OVA a été réalisée dans les deux conditions retenues en chauffant les solutions d'OVA (15-20 mg/ml) pendant 6h à 80°C, traitement thermique qui assure un niveau d'agrégation maximum. La concentration maximale de 20 mg/ml permet d'éviter la gélification des échantillons qui serait incompatible avec les études en modèle murin, ELISA ou dégranulation. La macrostructure des dispersions agrégées: une dispersion translucide pour les agrégats linéaires et une dispersion opaque blanche pour les agrégats sphériques-agglomérés était facilement vérifiée pour chaque préparation (Figure 26).



**Figure 26** : Macrostructure des deux types d'agrégats sélectionnés : dispersion translucide pour les agrégats formés à pH 9/0,03M et dispersion opaque pour les agrégats formés à pH5/0,8M

La micro-structure de ces agrégats ayant déjà été caractérisée et nécessitant des techniques lourdes non utilisables en routine, nous avons fait le choix de vérifier la taille apparente des agrégats par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light scattering, DLS) pour les agrégats linéaires et par diffusion laser de la lumière (Laser Light scattering, LLS) pour les agrégats sphériques agglomérés.

La technique de DLS consiste à mesurer les modifications de la diffusion de la lumière par les particules soumises au mouvement brownien, c'est-à-dire à un mouvement aléatoire dans un fluide. Les plus petites particules se déplaçant plus rapidement que les grosses, une relation est effectuée entre leur taille et leur mouvement. Cette technique est adaptée pour les particules d'une taille de l'ordre du nm.

La technique de LLS consiste quant à elle, à mesurer la variation angulaire de l'intensité de la lumière induite par les particules. Les grosses particules diffusent la lumière aux petits angles et les petites particules diffusent la lumière à des angles plus grands.

La taille des particules est considérée comme égale au diamètre de la sphère équivalente calculé à partir de modèles mathématiques. Ces deux types de techniques de diffusion de la lumière considèrent ainsi que les particules analysées sont sphériques, ce qui constitue un biais par rapport à nos agrégats notamment les agrégats linéaires non sphériques. Elles nous permettent néanmoins d'évaluer une taille apparente des agrégats et de positionner nos résultats par rapport à ceux obtenus précédemment avec ces mêmes techniques.

## 2. Sérums patients

Des sérums d'enfants allergiques à l'œuf ont été utilisés afin d'étudier la capacité de liaison des différentes formes d'OVA aux Ig humaines (IgE et IgG<sub>4</sub>) et leur capacité à induire la dégranulation des basophiles de la lignée SX-38. Ces sérums appartiennent à la collection de sérums humains de l'unité BIA constituée à des fins de recherche sur les allergies alimentaires (déclaration DC-2008-809). Lors de leur entrée dans la collection, les sérums d'enfants allergiques à l'œuf avaient été caractérisés sur les différents allergènes de l'œuf. Des sérums présentant des IgE spécifiques de l'OVA à des concentrations variables ont été sélectionnés pour cette étude. Afin de comparer la capacité de liaison des IgE spécifiques aux différentes formes par ELISA et que la zone de concentration en IgE soit proche entre les sérums et se situe dans la partie linéaire où l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'IgE, la dilution adéquate des sérums a été déterminée pour se situer entre 2 et 25 ng/ml d'IgE pour la forme native. Les données cliniques concernant la tolérance des formes cuites n'étant disponibles que pour une faible part de ces patients, ceci n'a pas permis de faire un lien entre nos observations sur les formes agrégées et ces données cliniques.

Un volume important de sérum étant nécessaire pour les tests de dégranulation des basophiles, un pool de 8 sérums a été constitué. Ces sérums ont été choisis sur la base de la capacité de liaison des IgE aux différentes formes d'OVA. Les 8 sérums présentent des capacités de liaison aux formes natives et agrégées différentes et ont été sélectionnés pour être représentatifs des 4 groupes de sérums observés (Tableau 8). Leur capacité à induire la dégranulation des basophiles a ensuite été vérifiée.

**Tableau 8 :** Capacité de liaison aux IgE humaines des 8 sérums sélectionnés pour le pool

Sérum	IF		
	Forme native	Gros agrégats	Petits agrégats
Capacité de liaison IgE : Native > Gros agrégats > Petits agrégats			
875	6,15	4,30	2,36
Capacité de liaison IgE : Native > Gros agrégats ≈ Petits agrégats			
1373	10,31	5,53	5,55
Capacité de liaison IgE : Native ≈ Gros agrégats ≈ Petits agrégats			
1443	4,54	4,84	4,84
1427	2,68	2,43	2,76
Capacité de liaison IgE : Native ≈ Gros agrégats > Petits agrégats			
1131	11,52	9,84	5,59
1158	12,47	12,45	6,36
1391	16,27	17,87	11,75
1294	12,63	14,71	9,81

N'ayant pas accès à une cohorte de patients sur laquelle réaliser des tests cutanés ou une provocation orale et ne pouvant pas évaluer la phase de sensibilisation chez l'homme, les modèles animaux se sont révélés nécessaires pour évaluer l'allergénicité au cours des deux phases de la réaction allergique.

### **3. Modèle murin d'allergie à l'ovalbumine**

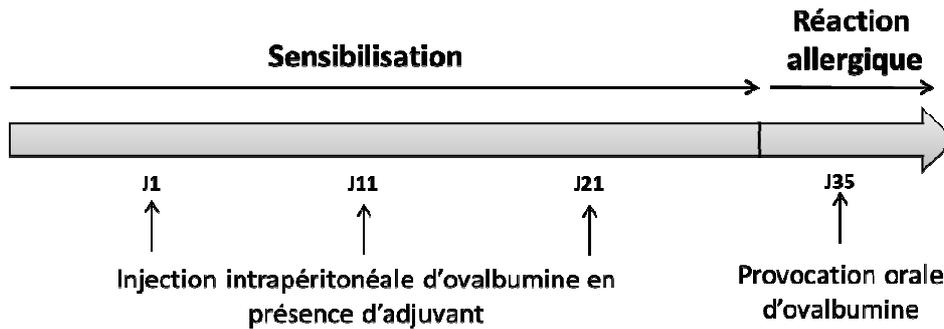
#### **3.1. Description du modèle**

Pour évaluer l'allergénicité des agrégats protéiques, un modèle murin d'allergie alimentaire a été utilisé. Le principe de ce modèle consiste à sensibiliser des souris à une protéine puis à déclencher la réaction allergique avec cette même protéine. Différentes souches de souris peuvent être utilisées, et nous avons choisi de travailler avec des souris Balb/c, fréquemment utilisées dans des modèles murins d'allergie alimentaire pour leur prédisposition à produire des IgE et des cytokines impliquées dans la réponse Th2 (Bøgh et al., 2016).

Des souris femelles Balb/c âgées de trois semaines ont été acclimatées pendant trois semaines en conditions stériles dans le but notamment de se positionner dans un contexte d'hypothèse hygiéniste évoquée précédemment. Les souris sont nourries avec un aliment irradié dépourvu d'œuf afin de limiter les processus de tolérance à l'OVA et disposant *ad libitum* d'eau autoclavée.

Nous avons réalisé une sensibilisation par injection intrapéritonéale qui permet de mettre en contact directement l'allergène avec le système immunitaire et permet de travailler avec des quantités plus faibles d'allergène compatibles avec notre concentration d'agrégation. Il n'était ainsi pas possible de réaliser une sensibilisation par voie orale car nous étions limités par la quantité d'OVA agrégée pouvant être administrée. L'OVA injectée est absorbée sur l'hydroxyde d'aluminium ou alum, adjuvant qui permet de favoriser une réponse Th2 avec notamment une production d'IgG<sub>1</sub> et une sécrétion d'IL-4 (Comoy et al., 1997).

La sensibilisation a été effectuée après la phase d'acclimatation par trois injections intrapéritonéales de 10 µg d'OVA espacées de dix jours. Deux semaines après la dernière injection, un test de provocation de la réaction allergique a été effectué par gavage oral d'OVA (Figure 27).



**Figure 27** : Schéma du protocole d'étude à l'aide du modèle souris d'allergie alimentaire

Du fait de la concentration limitée lors de l'agrégation (afin d'éviter la gélification) et du volume maximum pouvant être délivré par gavage à la souris, la quantité d'agrégats d'OVA administrée est au maximum de 3 mg par gavage. Pour l'OVA native, une quantité plus importante peut être administrée, dans notre étude, la quantité retenue lors du second protocole est de 20 mg. Une heure après le gavage, le sang est récupéré par prélèvement intracardiaque sur souris anesthésiée. Le sang est alors centrifugé, 4500 rpm pendant 5 min pour récupérer le sérum qui est ensuite stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### 3.2. Evaluation de la phase de sensibilisation

L'efficacité de la sensibilisation est évaluée en dosant les Ig spécifiques de l'OVA (IgE, IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2a</sub>) dans le sérum des souris par ELISA. La technique détaillée est décrite dans les chapitres 3 et 4.

Pour compléter les données sur la phase de sensibilisation, nous avons analysé les populations cellulaires induites au niveau systémique, dans la rate, et au niveau local, dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques et inguinaux. Le protocole consiste à réaliser un marquage extracellulaire et intracellulaire des cellules en présence de l'anti CD13/CD32 (Fc bloqueur) pour inhiber le marquage non spécifique. Le marquage spécifique permet de différencier les cellules en fonction de leurs récepteurs et des cytokines sécrétées après activation non spécifique pendant 5 heures avec du PMA/Ionomycine. Le marquage intracellulaire nécessite préalablement une étape de perméabilisation de la membrane cellulaire et se fait en présence d'inhibiteur de transport (bréfeldine A) pour inhiber la sécrétion des cytokines par la cellule. Après marquage par des anticorps fixés à un fluorochrome, la suspension de

cellules est analysée par cytométrie en flux. Pour cela, les lymphocytes vivants sont sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulométrie, puis la fréquence des différentes populations est mesurée à l'aide de l'expression de récepteurs membranaires et la production de cytokines (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Marquage extracellulaire et intracellulaire des populations cellulaires étudiées

Population cellulaire	Marquage extracellulaire		Marquage intracellulaire
Th2	CD3 et CD4		IL-4
Th1	CD3 et CD4		IFN- $\gamma$
Th17	CD3 et CD4	CCR6	IL-17
Treg	CD3 et CD4	CD25	FoxP3

Nous avons tenté à deux reprises d'effectuer ce protocole d'évaluation de l'induction des cellules, réalisé pour la première fois dans notre laboratoire récemment équipé d'un cytomètre. Lors d'un premier protocole d'expérimentation animal, la technique de marquage intracellulaire n'a pas fonctionné et nous n'avons donc pas obtenu de résultats pour cette étude. Au cours d'un deuxième protocole, nous avons obtenu des résultats mais nous avons parfois été limités par la quantité de cellules disponibles et nous n'avons donc pas pu analyser tous les échantillons notamment, pour le pool constitué des cellules des plaques de Peyer et des ganglions.

### 3.3. Evaluation de la phase de déclenchement

#### 3.3.1. Evaluation des symptômes et mesure de la température

L'évaluation des symptômes a été réalisée au cours des 30 premières minutes puis une heure après challenge suivant une grille de notation préalablement décrite par Li et al. (1999) (Tableau 10).

**Tableau 10 :** Grille de notation des symptômes

Symptômes observés	Score attribué
Pas de symptômes	0
Démangeaison autour des zones de la tête et du nez	1
Gonflements des yeux et de la bouche, diarrhées, poils redressés, activité réduite et/ou augmentation de la respiration	2
Respiration difficile, cyanose autour de la langue et de la queue	3
Plus d'activité même après stimulation, tremblements ou convulsion	4
Mort	5

Cette évaluation nécessite un nombre important d'observateurs, l'isolement des souris pendant la phase d'observation et donc limite le nombre d'animaux. Au bout d'une heure, la température rectale des souris est mesurée à l'aide d'une sonde, et une baisse peut être observée en cas de réaction allergique anaphylactique.

Dans notre étude, lors d'un premier protocole d'expérimentation animale, nous n'avons observé ni baisse de la température des souris, ni de différences significatives de symptômes entre les groupes (Chapitre 3). Ceci peut être lié à la faible dose d'OVA administrée. La réaction allergique induite a été visiblement faible et l'absence de symptômes importants a rendu l'observation d'autant plus compliquée. Pour ces raisons, nous avons testé dans un second protocole, un autre paramètre permettant d'évaluer la réaction allergique et ne faisant pas intervenir d'observateurs (Chapitre 4).

### **3.3.2. Mesure du gonflement de l'oreille**

La mesure du gonflement de l'oreille est une technique déjà utilisée pour évaluer la réaction allergique lors d'une provocation dermique (Bøgh et al., 2016). Pour la première fois dans cette thèse, nous avons mesuré sous anesthésie, le gonflement de l'oreille des souris trois jours avant et une heure après provocation orale. Cette technique semble permettre d'évaluer et de quantifier l'intensité de la réaction allergique.

### **3.3.3. Dosage médiateurs sanguins**

Afin d'évaluer la libération de médiateurs chimiques par les cellules impliquées dans le déclenchement de la réaction allergique, différents médiateurs peuvent être dosés. Dans les deux études réalisées, nous avons dosé l'histamine et mMCP-1 en utilisant des kits commerciaux. Le dosage de l'histamine n'a pas donné de résultats significatifs entre les groupes de souris sensibilisées ou non après provocation ce qui peut être lié à un décalage entre la sécrétion de ce médiateur et le prélèvement de sang.

## **4. Modèles *in vitro* d'activation des basophiles**

Des modèles cellulaires permettant d'évaluer l'activation des basophiles mimant la phase de déclenchement de la réaction allergique ont été utilisés. Nous avons utilisé cette technique d'une part, avec les sérums humains puisqu'il n'était pas possible de faire des challenges oraux chez les enfants et d'autre part, avec les sérums de souris

des protocoles animaux car la quantité d'agrégats pouvant être dispensée lors des provocations était techniquement limitée (3mg) et n'entraînait qu'une faible réaction allergique. Ces tests ont également permis d'évaluer la capacité antigénique des différentes formes après digestion ou passage de la barrière intestinale.

#### 4.1. Lignées cellulaires

Deux lignées de basophiles ont été utilisées pour cette étude : les cellules RBL-2H3 (Rat Basophil Leukemia) utilisées avec les sérums provenant des souris sensibilisées lors des protocoles animaux et les RBL-SX38 utilisés avec les sérums humains, les cellules RBL-SX38 étant des cellules transfectées pour exprimer le récepteur aux IgE humaines (Bodinier et al., 2008).

#### 4.2. Description du test

Le test de dégranulation se divise en quatre étapes quel que soit le type cellulaire (Figure 28).

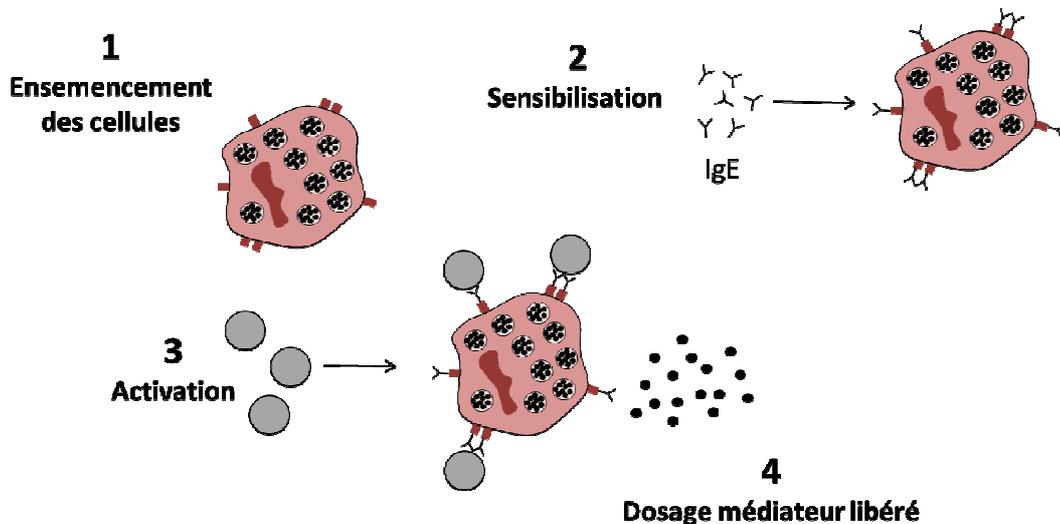


Figure 28 : Etapes du test cellulaire de dégranulation des basophiles

#### Ensemencement des cellules

Les cellules sont ensemencées en plaques de culture 96 puits dans du milieu de culture complet à  $1.2 \cdot 10^4$  cellules/ml et mises en culture en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Cette concentration cellulaire permet d'obtenir un état de confluence le jour de l'étape de dégranulation.

### **Sensibilisation**

Au préalable de la sensibilisation, une étape de décomplémentation des sérums humains est nécessaire. Pour cela, les sérums sont chauffés pendant 45 min à 56°C, dilués au ½ avec du glucose 4M pour protéger les IgE lors du chauffage. Les sérums sont ensuite dilués dans le milieu de culture et mis en contact avec les cellules pendant 48h (Binaghi and Demeulemester, 1983).

### **Activation**

Après incubation avec les IgE, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS. Puis, les cellules sont mises en contact avec l'allergène contenant 50% d'eau deutérée (D<sub>2</sub>O). La présence de D<sub>2</sub>O dans le tampon de dégranulation augmente la sécrétion de  $\beta$ -hexosaminidase par les cellules (Maeyama et al., 1986).

Trois types de contrôle sont effectués :

- La dégranulation basale : les cellules sont incubées uniquement avec le tampon de dégranulation
- Le contenu total en  $\beta$ -hexosaminidase : obtenu par lyse des cellules par ajout de triton x100 (10%) et une action mécanique
- La dégranulation maximum spécifique (IgE-dépendante) : cette donnée n'est disponible que pour les sérums humains

### **Dosage du médiateur libéré**

L'intensité de la dégranulation est estimée par le dosage dans le surnageant d'un médiateur libéré par les basophiles : la  $\beta$ -hexosaminidase. Ce dosage repose sur une réaction colorimétrique enzymatique entre ce médiateur et son substrat, le paranitrophényl-acétyl- $\beta$ -glucosamine, libérant du para-nitrophénol. Après changement du pH du milieu, sa base conjuguée, l'ion p-nitrophénolate absorbe à 405 nm.

### 4.3. Expression des résultats

Deux pourcentages de dégranulation peuvent être calculés à partir des DO obtenues:

- Le pourcentage de dégranulation par rapport au contenu total en  $\beta$ -hexosaminidase :

$$\% \text{ dégranulation} = \frac{DO \text{ dégranulation échantillon sérum testé} - DO \text{ dégranulation basale}}{DO \text{ dégranulation totale} - DO \text{ dégranulation basale}} \times 100$$

- Le pourcentage de dégranulation par rapport à l'anti-IgE:

$$\% \text{ dégranulation} = \frac{DO \text{ dégranulation échantillon sérum testé} - DO \text{ dégranulation basale}}{DO \text{ dégranulation maximum spécifique} - DO \text{ dégranulation basale}} \times 100$$

En appliquant différentes concentrations d'allergène lors de la phase d'activation, une courbe de dégranulation est obtenue. Deux paramètres caractéristiques des courbes de dégranulations ont été déterminés sous GraphPad Prism : le maximum de dégranulation (MaxD) et la concentration correspondant à la dose d'allergène nécessaire pour induire 50% de ce maximum (EC50).

## 5. Evaluation de l'aptitude à induire une dégranulation après digestion ou passage de la barrière intestinale

### 5.1. Protocole de digestion

Dans une première étude , nous avons appliqué le même protocole de digestion statique que Nyemb et al. (2014) en ne modifiant que les temps de digestion. Afin de se situer dans un contexte allergique où les symptômes peuvent survenir dans les minutes qui suivent l'ingestion d'aliments, nous avons choisi de réaliser des digestions sur des temps courts (10 min de digestion gastrique, 10 min de digestion intestinale) au lieu de 60 min de digestion gastrique et 30 min de digestion intestinale. La composition en peptides dans les digestats des différentes formes d'OVA a été analysée par spectrométrie en masse.

Nous avons aussi utilisé le protocole de digestion complet harmonisé au niveau européen (Minekus et al., 2014) sur des temps plus longs (30 min pour les phases gastrique et intestinale) auquel nous avons ajouté une phase de digestion avec les BBM (enzymes de la bordure en brosse) de 2h. La digestibilité des différentes formes a été analysée par RP-HPLC dont le protocole est détaillé dans le chapitre 5. L'extraction des BBM, la réalisation des digestions et leur caractérisation ont été effectuées à

l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione, à Avellino en Italie lors d'une mission de courte durée dans le cadre du COST Improving Allergy Risk Assessment Strategy for new food proteins (ImpARAS) encadrée par Gianluca Picariello.

### **5.2. Protocole de passage et évaluation de la perméabilité paracellulaire**

Nous avons décidé de travailler sur un modèle *ex vivo* en chambres de Ussing qui présente l'avantage, par rapport au modèle *in vitro* Caco-2 d'être un tissu constitué de plusieurs types cellulaires. Par rapport à notre objectif, il était intéressant de comparer le passage par le jéjunum sans plaques de Peyer et par les plaques de Peyer. Le prélèvement des tissus a été effectué après euthanasie des souris par dislocation cervicale. La surface exposée de tissus est de 0.1 cm<sup>2</sup> et chaque chambre contient 1 ml de milieu. La solution de protéine est ajoutée à une concentration de 2 mg/ml et le système est laissé pendant 2h30.

Nous avons utilisé l'acide sulfonique-FITC (332 Da) comme marqueur de la perméabilité paracellulaire et qui permet de vérifier l'intégrité du tissu. Le passage de ce marqueur dans le compartiment basal a été suivi au cours du temps puis la concentration finale a été évaluée. Cela nous a permis également d'évaluer l'effet des différentes formes d'OVA sur ce paramètre. Ne disposant pas de test suffisamment sensible permettant de doser les formes agrégées, il n'était pas possible d'évaluer la quantité des différentes formes passées à travers la barrière intestinale.

### **5.3. Evaluation capacité d'activation des basophiles après digestion ou passage**

La lignée SX38 et le pool de sérums humains ont été utilisés pour mettre en évidence la présence de fragments aptes à induire la dégranulation des basophiles dans les différents digestats ou dans le milieu basal des chambres d'Ussing après passage de la barrière épithéliale.



# **Chapitre 3 – Allergénicité de l’ovalbumine native et agrégée sous forme de larges particules**

Basé sur la publication suivante :

Claude, M., Lupi, R., Bouchaud, G., Bodinier, M., Brossard, C., & Denery-Papini, S. (2016). The thermal aggregation of ovalbumin as large particles decreases its allergenicity for egg allergic patients and in a murine model. *Food Chemistry*, 203, 136–144.



## **Abstract**

Most egg-allergic children can tolerate extensively cooked eggs. Ovalbumin, a major allergen in egg whites, is prone to aggregate upon heating. This study compares ovalbumin's allergenicity when it is aggregated as large particles to ovalbumin in its native form. Immunoglobulins (Ig)-binding and the degranulation capacities of native and aggregated ovalbumin were measured with sera from egg-allergic children and from mice sensitized to native or aggregated ovalbumin. The influence of ovalbumin structure on Ig production upon sensitization and elicitation potency by challenge was also studied. We showed that heat aggregation of ovalbumin as large particles enhances IgG production and promotes IgG<sub>2a</sub> production (a shift toward the T helper 1 profile). Aggregated ovalbumin displayed lower Ig-binding and basophil-activation capacities for sera from both allergic patients and mice. This work illustrates the links between ovalbumin structure after heating and allergenicity potential using parameters from both the sensitization and elicitation phases of the allergic reaction.

## **1. Introduction**

Hen eggs are one of the most important causes of food allergy in children (Sampson, 2004), with an estimated prevalence of 1.8-2% among children younger than five years of age (Sicherer, 2011). Some egg-allergic children react to both heated and raw eggs, whereas the majority (50-85%) can tolerate baked or extensively heated eggs (Bartnikas et al., 2013; Lemon-Mulé et al., 2008; Turner et al., 2013). This phenomenon is not completely understood, but it might be linked both to how children are sensitized to eggs (individual susceptibility factors, the route and timing of exposure and possibly the form of the food) and to how foods are processed in the digestive tract and activate the immune mechanism during elicitation.

The thermal treatment of food modifies protein structures to various extents (Davis and Williams, 1998), including the following: the loss of tertiary and secondary structures; disulfide bond cleavage; the formation of new disulfide bonds leading to irreversible modifications (e.g., aggregation), which is commonly observed upon heat processing of globular proteins (Nicolai and Durand, 2013); side chain additions. These phenomena modify the panel of epitopes exposed to immune cells or antibodies and

consequently, they can either decrease or increase a food's allergenic potential (Berin and Sampson, 2013; Kosti et al., 2013).

The major allergens in hen-egg whites include OVA, the most abundant protein in egg white; OVM; ovotransferrin; and lysozyme. Of those allergens, it was the first two (i.e., OVA and OVM) that were mostly studied in relation to thermal processing. OVM, a globular glycoprotein, denatured above 77°C (Mine, 1995), undergoing irreversible structural changes without aggregation, whereas OVA, with its four sulfhydryl groups and a single disulfide bridge, is prone to aggregate upon heat treatment. Most of the patients allergic to heated egg white were able to ingest heated OVM-depleted egg white (Urisu et al., 1997); that shows that OVM is involved in the non-tolerance of extensively heated egg whites. However, no threshold value for concentration in OVM specific IgE can be used to predict tolerance to baked egg (Bartnikas et al., 2013), thus highlighting the influence of the heating effect on other egg proteins, including OVA, in the allergy context.

It is noteworthy that the properties of proteins that confer the ability to sensitize are not fully known and may not be the same as the properties required to elicit an allergic reaction in a sensitized individual (Roth-Walter et al., 2008). A protein's capacity to withstand heat is an important factor to consider in allergen characterization (Mills and Mackie, 2008). Thermal processing may have an impact on the ability to induce sensitization (e.g., Ig and cytokines production), IgE binding capacity, and the ability to elicit allergic reactions upon exposure. The influence of thermal treatment on the susceptibility to digestive enzymes and matrix effects (i.e., interaction with other constituents of the food product) are additional parameters to consider (Verhoeckx et al., 2015).

The structure of OVA during sensitization might affect allergenicity. In a mouse model of allergy, mild structural modifications of OVA produced by heating at 70°C for 10 min were sufficient first to induce a shift towards a Th1 response upon sensitization compared to unheated OVA and thereafter to decrease allergic symptoms (i.e., diarrhea) (Golias et al., 2012). It has also been shown that an *in vitro* culture of T cells and dendritic cells stimulated by heat-denatured OVA (at 100°C for 5 min) displayed a skewed Th1 cytokine response (more Il-12 and less Il-4) (Rupa et al., 2015).

OVA heat treatment also affects the elicitation phase in mice. Symptoms were weaker (i.e., mice sensitized with native OVA had higher body temperatures) after a challenge with heated OVA than with native OVA (Martos et al., 2011). Moreover, feeding mice with heated egg whites (EW) modified symptoms and even, depending on the heating treatment, induced tolerance: heating EW at 80°C for 15 min decreased intestinal inflammation compared to native EW; a stronger thermal treatment (100°C for 5 min) did not induce inflammation and induced tolerance markers; and a more intensive treatment (121°C for 40 min) was able to stimulate a Th1 type response with no tolerance (Watanabe et al., 2014).

Ig's capacity to bind to EW proteins was generally reported to decrease upon heating. For example, Shin, Han, and Ahn (2013) have highlighted that 4 thermal treatments of EW (fried, boiled for 10 min, boiled for 30 min and baked for 20 min at 170°C) resulted in decreased human IgE-binding capacity of OVA, except in the case of boiled EW for 10 min, which showed the same results as raw EW. Rabbit IgG-binding and human IgE-binding to OVA decreased by heating at 90°C for 15 min (Jiménez-Saiz et al., 2011). Bloom et al. (2014) have confirmed these results by showing stronger human IgE-binding to raw EW than to heated EW (regardless of the thermal processing, waffle - 176°C for 30 min, muffin - 260°C for 3 min or hard-boiled egg - 90°C for 10 min).

It was also shown that heating can change the basophil activation capacity of protein. OVA heated at 70°C for 10 min had a similar degranulation capacity to that of native OVA (Golias et al., 2012), whereas boiled OVA (intensive heating) at 95°C for 10 min showed reduced capacity. Very different results have been found by Martos et al. (2011), who have shown that intensive heating (100°C-30min) resulted in the same basophil activation capacity as that of native OVA. Heating changed OVA digestion to various extents. Intensive heating (above 80°C) enhanced OVA digestion by pepsin (Jiménez-Saiz et al., 2011; Lassé et al., 2015; Martos et al., 2011; Nyemb et al., 2014a), but OVA heated at temperatures of under 70°C was found to be either less sensitive (Golias et al., 2012) or as sensitive (Jiménez-Saiz et al., 2011) as native OVA to pepsin digestion.

Discrepancies could probably be caused by differences in underlying structures of the allergen that besides the temperature and duration of the thermal treatment depend on pH, salt and protein concentrations (Nicolai and Durand, 2013).

Applying the same thermal treatment to OVA (80°C for 6 hours), various aggregate structures are formed depending on physicochemical conditions (pH and ionic strength, which modify the electrostatic interactions and protein net charge). These various morphologies (from small linear aggregates—i.e., tens of nanometers to large spherical agglomerated aggregates—tens of micrometers) showed different behavior during *in vitro* digestion studies in terms of the nature of the generated peptides and digestion kinetics (Nyemb et al., 2014a, 2014b).

We hypothesized that the structure of the aggregates could be a relevant parameter with respect to OVA's sensitizing or eliciting potencies. In previous studies that examined the effect of heating on OVA allergenicity, either aggregation was not considered or characterization of the aggregated state of OVA was lacking. We then chose to study the effect of the aggregated state of OVA on its allergenicity, beginning with the largest aggregates, displaying the most different conformation compared to the native OVA, among the four different structures reported by Nyemb, Guérin-Dubiard, et al. (2014).

The purpose of this study was to examine the effect of OVA aggregation as large structures on antigenicity, on Ig production during sensitization and on the triggering of allergies. This was done by making the following comparison for native and aggregated OVA: (1) Ig binding (IgE and IgG4) and degranulation capacities using sera from children allergic to eggs; and (2) production of Ig upon mouse sensitization by the intraperitoneal route, Ig binding and degranulation capacities with the sera of sensitized mice, along with the results of oral challenges administered to mice.

## **2. Material and methods**

### **2.1. The preparation and characterization of native and aggregated OVA**

OVA purified from EW was kindly provided by INRA, UMR1253 "Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf" (Rennes, France). According to Nyemb et al., 2014, OVA solution was prepared (15 mg/ml in 0.8 M NaCl and adjusted to pH 5) and heated for 6 h at 80°C in a controlled temperature water bath to obtain large aggregates (A-OVA). The size distribution of the A-OVA was determined by laser light scattering (LLS) using a Mastersizer MS 3002 (Malvern instruments, Malvern UK); measurements were run at least in triplicate on three aliquots for each preparation with obscuration set at 8%.

Native solution (N-OVA) and A-OVA were adjusted to 0.15 M NaCl and pH 7.6 and required concentration by dilution with water and phosphate-buffered saline (PBS).

## **2.2. Sera from egg-allergic patients and controls**

Sera from 47 egg-allergic children with OVA-specific IgE and 4 control sera with total IgE (from 320 to 6200 ng/ml) but no detectable OVA-specific IgE were selected for this study. The sera belong to the registered sera collection implemented through clinical studies with the informed consent of patients or their caregivers (DC-2008-809; of INRA, UR1268 BIA Biopolymères, Interactions, Assemblages, Nantes, France) and were stored at -80°C until use.

## **2.3. Sensitization and oral challenge of mice with N-OVA and A-OVA**

Three week-old Balb/c female mice from the Centre d'Élevage René Janvier (Saint Berthevin, France) were housed in a ventilated cage system (IVC Racks Allentown, PA, USA) under controlled temperature and humidity conditions with a 12 h light/dark cycle with daily supervision. Food (an irradiated semi-synthetic OVA-free diet, Safe, Augy, France) and water were available *ad libitum*. Three weeks later, the mice were sensitized by three intraperitoneal injections every 10 days of 10 µg of N-OVA (n=20) or A-OVA (n=20) in 100 µl of aluminum hydroxide (Alum; Alhydrogel, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavien, France) or PBS for the control mice (n=10). Each sensitization group was divided into three subgroups for the challenge performed two weeks after the final sensitization by intra-gastric administration of 3 mg of N-OVA, A-OVA or PBS. Elicitation was assessed by rectal temperature measurement before and after the challenge (1 h) and symptom scoring according to Li et al. (1999). Blood samples were collected 1 h after the challenge by cardiac puncture under anesthesia and the animals were sacrificed by vertebral dislocation. The Ethics Committee in Animal Experimentation of Pays de la Loire (CEEA-PdL n°6) approved the experimental protocol. The sera were stored at -80°C until use. The level of mMCP-1 was determined on sera diluted at 1:100 using a commercial kit (eBiosciences, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions.

#### **2.4. Measurement of Ig-binding to native and aggregated OVA in patient or mice sera by F-ELISA**

Allergen-specific Ig were determined using indirect fluorimetric-ELISA as previously described (Gourbeyre et al., 2012; Lupi et al., 2014), using Biomek<sup>®</sup> NXP Laboratory Automation Workstation (BEKMANCoulter, France); white NuncMaxiSorp 384 well microtiter plates (Fischer Scientific, Illkirch, France); porcine gelatin as a blocking agent; alkaline-phosphatase-conjugated anti-human IgE (A3525, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-human IgG4 (401468, Merck Millipore, Molsheim, France) or anti-mouse IgE, IgG<sub>1</sub> or IgG<sub>2a</sub> (Southern Biotechnology, Montrouge, France); and 4-Methylumbelliferyl phosphate as a substrate (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Measurements were run in triplicate on N-OVA, A-OVA (coated at 5 µg/ml in carbonate buffer, 100 mM, pH 9.6) and PBS. Pretests were performed with N-OVA to determine adequate dilutions of human sera for IgE (1:2 to 1:200) and IgG4 (1:2 to 1:1,500). Mice sera were diluted 1:100 for IgE, 1:1,000 for IgG<sub>2a</sub> and 1:100,000 for IgG<sub>1</sub>. The fluorescence was measured at 440 nm (excitation 360 nm) using Synergy, HT reader (Bio-tek instruments, Colmar, France).

Specific Ig-bindings are expressed by the ratios of mean fluorescence intensities measured with A-OVA or N-OVA (IF) on mean fluorescence intensity measured with PBS (IF<sub>0</sub>) to take background signal into account. The ratio of Ig-bindings to the A-OVA on to N-OVA of human or mouse serum is expressed by the ratio of mean fluorescence intensities to A-OVA on to N-OVA.

IgE inhibition experiments were carried out using the same procedure, except that the patient sera (diluted as above) were incubated for 4 h in the presence of inhibitors (a serial dilution from 50 to 0.02 µg/ml of N-OVA or A-OVA for one serum; a constant concentration 50 µg/ml of N-OVA or A-OVA for 13 other sera).

#### **2.5. Activation of Rat basophil leukemia (RBL) cells by native and aggregated OVA in the presence of patient or mice sera**

Eight out of 47 patients' sera were selected based on their total and OVA-specific IgE levels and degranulation capacity with N-OVA. G418-selected RBL-SX38 cells expressing human FcεRI, kindly provided by Pr Kinet (Harvard Medical School, New York, USA), were seeded at 1.2x10<sup>4</sup> cells/ml and cultured at 37°C in a humidified

atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Sera, heated for 45 min at 56°C in the presence of 4 M glucose to reduce cytotoxicity (Binaghi and Demeulemester, 1983) and diluted (1:50-1:300 depending on IgE content), were added to the cells for 48 h. IgE-sensitized cells were stimulated in triplicate for 45 min at 37°C by N-OVA or A-OVA diluted from 2x10<sup>-2</sup> to 2x10<sup>-5</sup> ng/ml in Tyrode buffer containing 50% deuterium oxide (D<sub>2</sub>O, Sigma) (Blanc et al., 2009).

Mice sera from each sensitization group were pooled and tested for their ability to induce the degranulation of 2H3 RBL cells (ATCC, Manassas, USA) seeded at 1x10<sup>5</sup> cells/ml, as described by Gourbeyre et al. (2012). The pools were diluted one hundred times and the N-OVA or A-OVA was diluted from 2x10<sup>-3</sup> to 2x10<sup>-5</sup> ng/mL. Measurements were run in quadruplicate for each sera pool and replicated once.

β-hexosaminidase release was measured as described previously by Bodinier et al. (2008). For each serum, spontaneous release was obtained with unstimulated cells and total release after lysis with Triton X100 (10%). The percentage of degranulation was expressed by the ratio between the sample value and total value, both corrected by the spontaneous release. The highest mediator release value (MaxD) and the allergen concentration corresponding to 50% of that highest release (EC50) for each serum and each allergen were determined using GraphPad Prism 5.02 for Windows software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

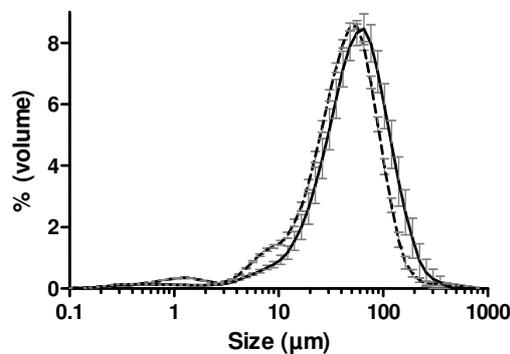
## **2.6. Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.02 for Windows software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and p values below 0.05 were considered significant. Data are expressed as the mean ± SEM. Data per group were first analyzed for normality using D'Agostino and Pearson's omnibus normality test; next, differences between medians/means were analyzed by Kruskal-Wallis/ANOVA with a subsequent Dunns/Bonferroni post-test (more than 2 groups) or Mann-Whitney/unpaired t-tests with Welch's correction, when necessary. When comparing data related to N-OVA and A-OVA by serum, Wilcoxon/paired t-tests were performed.

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of the aggregate size distribution

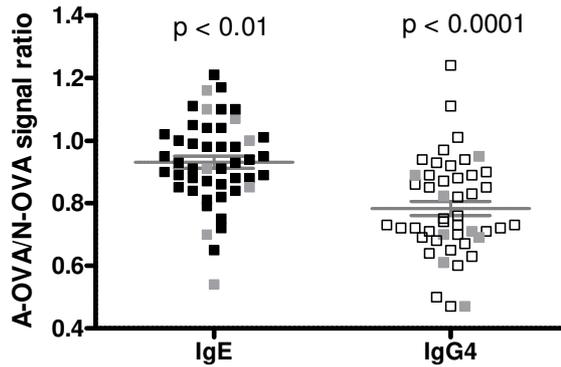
The particle size distributions of A-OVA samples prepared for the immunization and challenge were determined by LLS (Figure 29). The largest population of aggregates spanned between 3  $\mu\text{m}$  and 300  $\mu\text{m}$  for both preparations; the sample prepared for immunization had a particle size distribution that shifted toward smaller sizes and a higher proportion of smaller particles. However, the mean particle sizes did not differ significantly between samples prepared for sensitization ( $55.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ ) and those prepared for the challenge ( $65.9 \pm 4.6 \mu\text{m}$ ) (Unpaired t-test with Welch's correction).



**Figure 29:** Particle size distributions of the aggregated ovalbumin samples prepared for sensitization (dotted line) and challenge (solid line) measured by LLS.

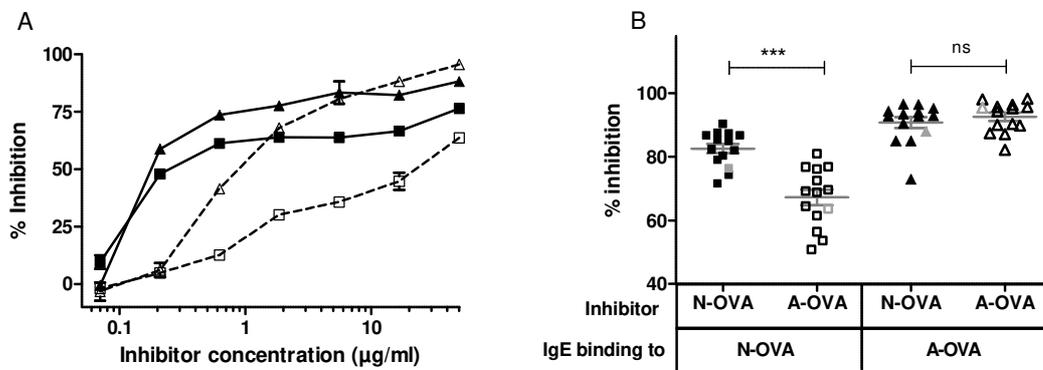
#### 3.2. IgE and IgG<sub>4</sub>-binding to native and aggregated OVA in sera from egg-allergic patients

IgE and IgG<sub>4</sub>-binding to N-OVA and A-OVA were compared by ELISA using 47 sera from egg-allergic children. As shown in figure 30, the mean ratios of the fluorescence values of A-OVA/N-OVA were found to be significantly lower than 1 for both IgE and IgG<sub>4</sub>: A-OVA had reduced IgE and IgG<sub>4</sub> binding capacities compared to N-OVA for the majority of the patient sera analyzed. The IgE ratio was closer to 1 than the IgG<sub>4</sub> ratio ( $0.93 \pm 0.02$  and  $0.78 \pm 0.02$ , respectively), meaning that the difference between the N-OVA and A-OVA binding capacities was more important for IgG<sub>4</sub> than for IgE: 24 sera of 47 showed a reduction greater than 25% for IgG<sub>4</sub>, whereas only six sera out of 47 did so in the case of IgE.



**Figure 30:** Human immunoglobulins binding, IgE and IgG4, to native ovalbumin (N-OVA) and aggregated ovalbumin (A-OVA) detected in the sera from 47 egg allergic children by indirect ELISA assay. Results are expressed as the ratio of fluorescence intensities to A-OVA on to N-OVA. Means of ratios (for all the sera) are represented by grey bars and results of comparison (one sample t-test) to theoretical value of 1 shown at the top. Sera used in degranulation tests are colored in grey.

IgE-binding to the two forms of OVA was also analyzed by inhibition experiments using both N-OVA and A-OVA either as coated antigens or as inhibitors. The serum from one allergic patient and a range of protein concentrations were used; 13 other sera were used in competitive ELISA with a protein concentration (50 µg/ml) selected to obtain the maximum inhibition percentage (Figure 31).



**Figure 31:** ELISA inhibition assay performed with human sera and native ovalbumin (N-OVA, close symbols) and aggregated ovalbumin (A-OVA, open symbols) used as inhibitors of IgE-binding to N-OVA (squares) and A-OVA (triangles). (A) Inhibition curves for one serum with inhibitors from 0.02 to 50µg/ml. (B) Percentage of inhibition calculated for 14 sera at 50µg/ml inhibitor concentration, data from serum used in A are colored in grey. Individual data, means ± SEM and results of comparison tests (Wilcoxon test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ )

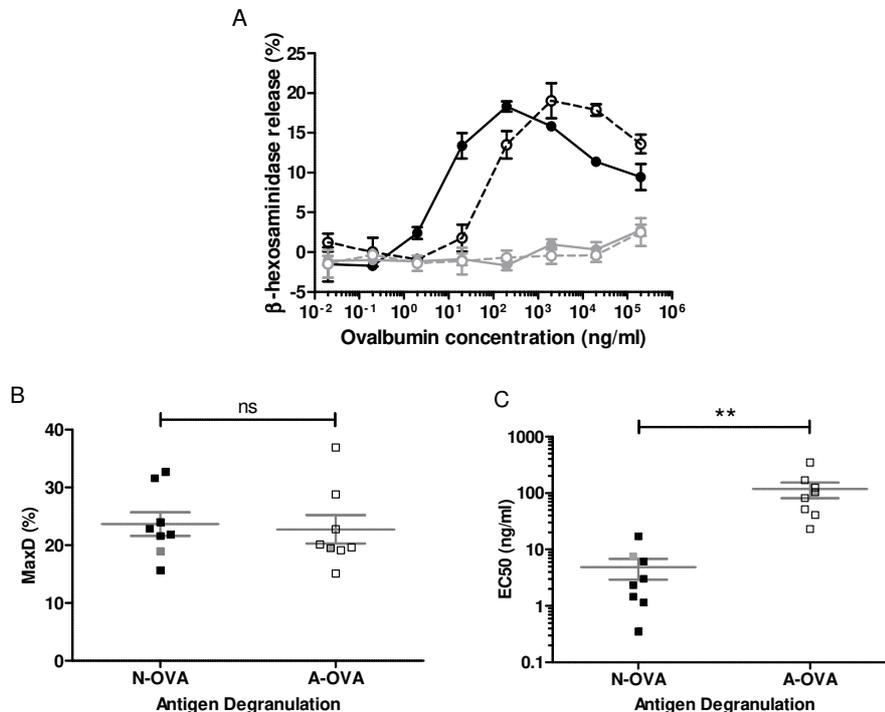
N-OVA showed higher inhibition capacities than A-OVA for IgE-binding to both N-OVA and A-OVA (Figure 31A), and the slope of the inhibition curve of IgE binding to N-OVA by A-OVA was notably lower than the slopes of the three other curves. A low concentration of N-OVA as inhibitor ( $< 1 \mu\text{g/ml}$ ) was needed to nearly reach the

plateau of the inhibition curves of IgE-binding to both A-OVA and N-OVA; a slightly higher concentration of A-OVA (6  $\mu\text{g/ml}$ ) as inhibitor was needed to inhibit IgE-binding to A-OVA. Conversely, even at the highest A-OVA concentration (50  $\mu\text{g/ml}$ ), no inhibition plateau was reached when N-OVA was coated on the plate.

This last result was confirmed with 13 other sera (Figure 31B). At a 50  $\mu\text{g/ml}$  inhibitor concentration, A-OVA displayed a lower capacity than N-OVA to inhibit IgE-binding to N-OVA ( $67.3 \pm 2.5 \%$  versus  $82.6 \pm 1.5 \%$ ), whereas both forms inhibited to the same extent of the IgE binding to A-OVA ( $92.6 \pm 1.3 \%$  versus  $90.8 \pm 1.7 \%$ ). We also calculated ratios of inhibition (A-OVA/N-OVA) by serum, and the means were found to be  $0.82 \pm 0.03$  and  $1.02 \pm 0.02$  for IgE binding to N-OVA and A-OVA, respectively.

### 3.3. RBL-SX38 cell activation by native and aggregated OVA in presence of patient IgE

RBL-SX38 activation assay using N-OVA or A-OVA as an antigen was performed with 12 sera (8 from egg-allergic children sensitized to OVA and 4 controls from atopic children with no OVA-specific IgE) (Figure 32).



**Figure 32:** Basophil activation assay with human sera. RBL-SX38 cells were stimulated with native OVA (N-OVA, close symbol) or aggregated OVA (A-OVA, open symbol) at concentrations from  $2.10^{-2}$  to  $2.10^5$  ng/ml. (A) Degranulation curves for one serum from an egg allergic child (black) and one control serum (grey). (B) Max D and (C) EC50 data calculated for sera from 8 egg allergic children (data from serum shown in A are colored in grey). Individual data, means  $\pm$  SEM and results of statistical tests (B: Paired t-test; C: Wilcoxon test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

No  $\beta$ -hexosaminidase release was induced by N-OVA or A-OVA with control sera from atopic patients (Figure 32A), whereas anti-IgE did (data not shown). Both the N-OVA and A-OVA induced cells sensitized with sera from the 8 egg-allergic patients to degranulate. Similar highest mediator-release values (MaxD) were observed with N-OVA and A-OVA (Figure 32C,  $23.6 \pm 2.1$  % and  $22.7 \pm 2.5$ , respectively), but heat-aggregation resulted in a significantly reduced degranulation ability of OVA, as reflected by increased EC50 values for all sera. A more-than-20-fold increase in the mean EC50 value was found (Figure 32B, mean EC50 values of  $4.9 \pm 2.0$  and  $117.8 \pm 37.0$  ng/ml, respectively).

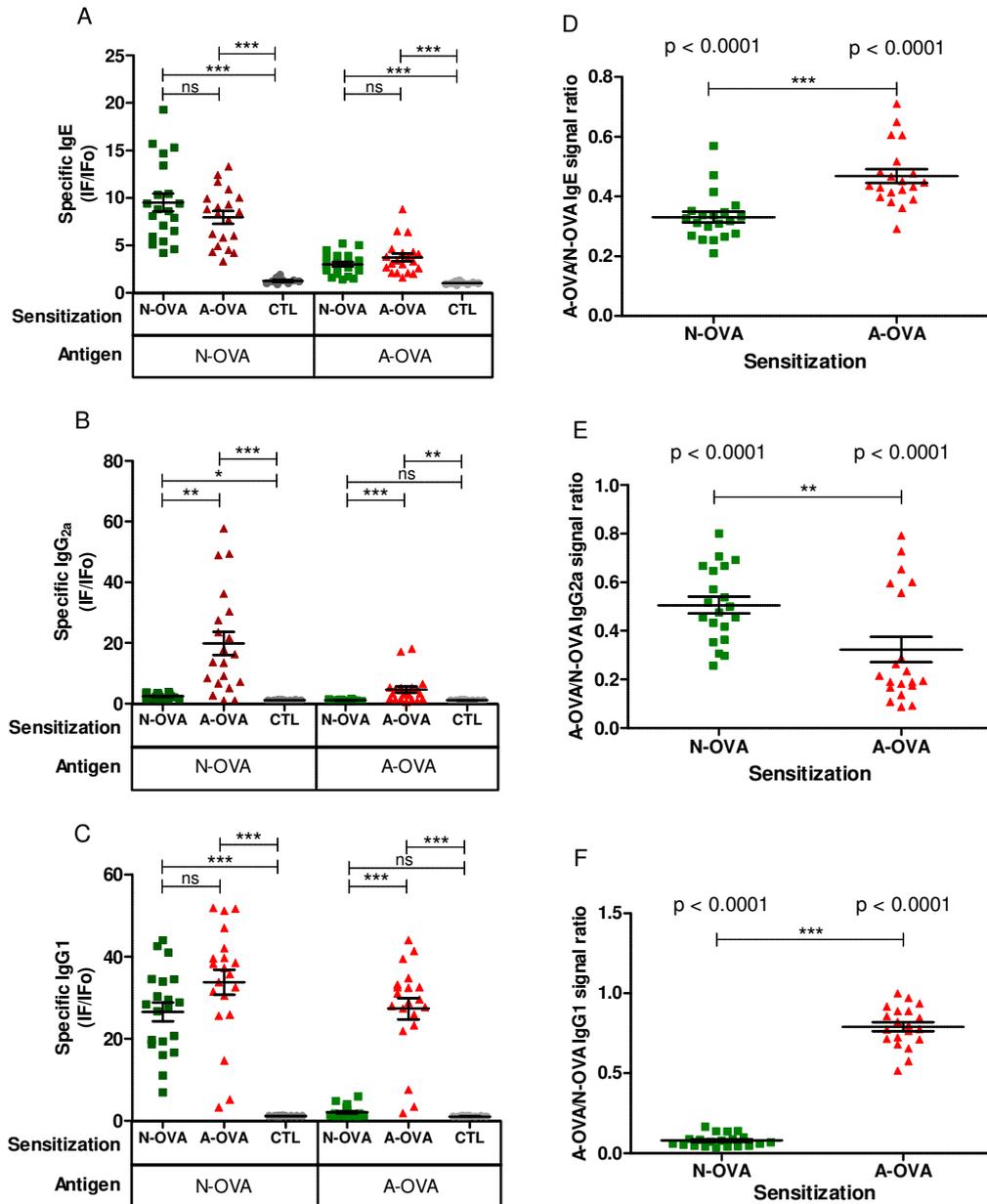
### **3.4. Immunoglobulin production in mice sensitized with native and aggregated OVA**

The mouse model of sensitization was used to study effect of heat aggregation on IgE, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>1</sub> production. As expected, the control mice showed no production of OVA-specific Ig (Figure 33 A-B-C), as illustrated by the ratios of fluorescence intensities IF/IF<sub>0</sub>, which were set at  $1.16 \pm 0.06$ ,  $1.10 \pm 0.02$  and  $1.09 \pm 0.02$  for IgE, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively.

N-OVA and A-OVA sensitizations induced similar production of OVA-specific IgE (Fig 5A), but there were significant differences when looking at IgG<sub>2a</sub> (Fig 5B) and IgG<sub>1</sub> production (Fig 5C). Indeed, mice sensitized with A-OVA displayed significantly higher levels of OVA-specific IgG<sub>2a</sub> than did mice sensitized with N-OVA, with the latter exhibiting very low IgG<sub>2a</sub> production. Although not significant for N-OVA specific IgG<sub>1</sub>, the mean specific IgG<sub>1</sub> level of the A-OVA sensitized group was still higher than that of the N-OVA sensitized group.

Ig bindings to N-OVA and A-OVA antigens were compared in each mouse. Whatever the sensitizing form, A-OVA/N-OVA ratios were found to be significantly ( $p < 0.0001$ ; Wilcoxon test) lower than 1 for every Ig class (Fig 5D-E-F). Ig-binding capacities were thus reduced for A-OVA compared to N-OVA, consistent with the results found for patient IgE and IgG4. Mean A-OVA/N-OVA ratios were found significantly higher (Mann-Whitney test) for A-OVA sensitization when looking at IgE and especially IgG<sub>1</sub>, whereas the reverse was observed for IgG<sub>2a</sub> (Fig 5D-E-F). Thus, A-OVA sensitization resulted in lower differences in IgE and IgG<sub>1</sub> binding capacities and in a higher

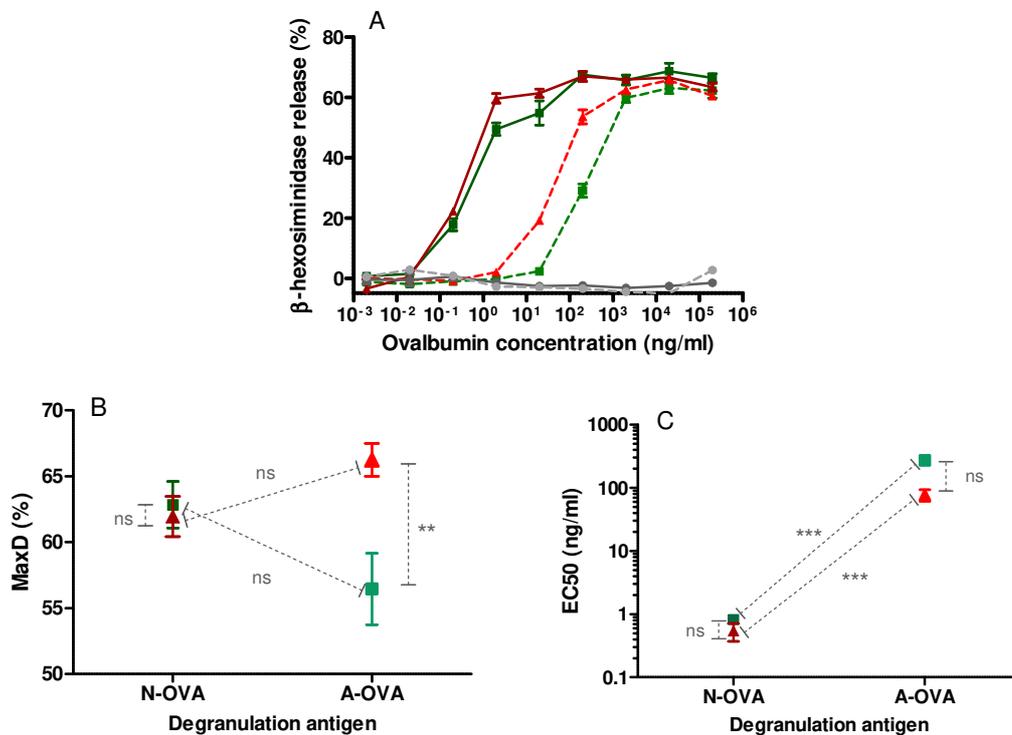
difference in IgG<sub>2a</sub> binding capacities between A-OVA and N-OVA than for N-OVA sensitization. Although statistically significant, differences remained low for IgE and IgG<sub>2a</sub>, but the gap was large for IgG<sub>1</sub>. Conversely, sensitization with A-OVA gave rise to IgG<sub>1</sub> with the ability to bind to both forms of OVA, although sensitization with N-OVA induced IgG<sub>1</sub> that primarily bound N-OVA.



**Figure 33:** Immunoglobulins production and binding upon sensitization detected by indirect ELISA assay. *Left:* Allergen specific IgE (A), IgG<sub>2a</sub> (B) and IgG<sub>1</sub> (C) on native ovalbumin (N-OVA) and aggregated ovalbumin (A-OVA) in sera from mice sensitized with N-OVA (n=20, green), A-OVA (n=20, red) or control mice (CTL, n=10, grey). Results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured to A-OVA or N-OVA (IF) on fluorescence intensity measured to PBS (IF<sub>0</sub>). *Right:* Ratios of Ig binding to A-OVA on to N-OVA calculated by mouse for IgE (D), IgG<sub>2a</sub> (E) and IgG<sub>1</sub> (F) as a function of sensitization. Individual data, means ± SEM and results of statistical tests (A,B,C: Kruskal-Wallis with a subsequent Dunn's test; D,E,F: Mann-Whitney and Wilcoxon test) are presented (ns: p > 0.05; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001).

### 3.5. RBL cell activation by native and aggregated OVA in presence of mouse IgE

To confirm the relevance of the detected IgE antibodies, RBL activation assays using N-OVA or A-OVA as the triggering antigen were performed with pools of sera either from mice sensitized with N-OVA or A-OVA or from control mice (Figure 34). No  $\beta$ -hexosaminidase release was observed with the pool of sera from the control mice, whereas degranulation occurred with pools of sera from the mice sensitized with either N-OVA or A-OVA (Figure 34A).



**Figure 34:** Basophil activation assay with mice sera. RBL-2H3 cells were stimulated with native OVA (N-OVA, dark colors) or aggregated OVA (A-OVA, light colors) at concentrations between  $2 \cdot 10^{-3}$  and  $2 \cdot 10^5$  ng/ml. (A) Degranulation curves with pools of sera from mice sensitized with N-OVA (green squares) or A-OVA (red triangles) and from control mice (gray circles). (B) MaxD and (C) EC50 data, means  $\pm$  SEM for two repetitions in quadruplicate and results of statistical tests (ANOVA with a subsequent Bonferonni post-test) are presented (ns:  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

No significant difference was found in the Max D values between N-OVA and A-OVA as triggering antigens for each sensitization group (Figure 34B), but a tendency to a higher degranulation with the sensitizing form emerged. This resulted only in a significant higher mean value of Max D with triggering by A-OVA as a function of sensitization ( $56.5 \pm 2.7$  % for N-OVA sensitization and  $66.3 \pm 1.2$  % for A-OVA sensitization).

EC50 values were found to be significantly lower for N-OVA than for A-OVA as the triggering antigen (Figure 34C). The difference tended to be larger upon N-OVA sensitization because means of the ratios of EC50 (A-OVA/N-OVA) calculated by the pool were  $345 \pm 29$  and  $193 \pm 48$  for N-OVA and A-OVA sensitizations, respectively. Higher EC50 tended to be measured with the pool from mice immunized with N-OVA compared to A-OVA (Figure 34C).

### **3.6. Elicitation potency by native and aggregated OVA in mice**

Mice from each sensitization group were challenged by the oral route with 3 mg of N-OVA or A-OVA or PBS. In these conditions, only weak symptoms were registered and no significant differences between groups for scores and rectal temperature were found (data not shown). mMCP-1 levels of mice challenged with PBS or control mice were  $28.5 \pm 0.8$  ng/ml. Among the sensitized mice challenged with OVA, mMCP-1 levels were only significantly different for N-OVA sensitized mice ( $p < 0.05$ ; Mann-Whitney test): mice challenged with N-OVA had higher levels ( $274.4 \pm 140.0$  ng/ml) than mice challenged with A-OVA ( $38.3 \pm 18.0$  ng/ml). For A-OVA sensitized mice, the tendency was the same ( $115.6 \pm 17.8$  ng/ml and  $77.2 \pm 13.6$  ng/ml for mice challenged with N-OVA and A-OVA, respectively). mMCP-1 levels as a function of the challenging form tended to be higher in the group of mice sensitized with that form. More mice per group and larger amounts of OVA given in the challenge are probably required to reach statistical significance.

## **4. Discussion**

Several studies have evaluated the effect of heat treatments of eggs (or more specifically, OVA) on allergies using a mouse model or sera from egg-allergic patients, and the reported data are sometimes contradictory. Heat treatment of globular proteins may generate various aggregated structures depending on heating parameters (temperature, duration, kinetics) and on the physico-chemical environment of proteins (Nicolai and Durand, 2013; Nyemb et al., 2014a). There is still limited information that relates allergenicity parameters to the precise morphological characteristics of OVA aggregates. This study demonstrated that compared to native OVA, large aggregates showed lower IgE-binding and IgG-binding capacities when

analyzed using either sera from egg-allergic patients or sera from OVA-sensitized mice. IgE-binding capacity and the ability to induce RBL cells were consistent: A-OVA displayed a lower triggering potential than N-OVA. We have also shown that heat aggregation of OVA as large aggregates increased in mice IgG<sub>2a</sub> production and changed the Ig repertory, i.e., by generating IgG antibodies with the ability to bind both forms of OVA, unlike native OVA.

Aggregated samples were obtained as in the study of Nyemb, Guérin-Dubiard, et al. (2014) under specific conditions of pH and ionic strength (pH5, 0.8 M) to generate large particles of tens of micrometers by an intensive heat treatment (80°C for 6 hours to ensure that OVA aggregation was as complete as possible). It is not easy to repeat such large structures, which must be handled cautiously because they are prone to disrupt under shearing. The samples prepared in our laboratory had measured mean indicative diameters that were somewhat smaller (56 µm and 66 µm for the samples used for sensitization and for challenge, respectively), but that had the same order of magnitude as those reported by Nyemb, Guérin-Dubiard, et al. (2014), with a mean indicative diameter of 80 µm.

The heating conditions that we used differed from those described in other studies of the effect of OVA thermal treatment on allergenicity; thus, the morphologies and extent of aggregation might be quite different. For example, Golias et al., 2012, exposed OVA to 70°C for 10 minutes before its dissolution, and irreversible denaturation was observed by circular dichroism. Martos et al. (2011) heated OVA in a boiling water bath for 30 minutes, but did not report either the concentration or the physico-chemical conditions. In both studies, unlike in our work, no structural characterization of possible aggregates was carried out; therefore, it is impossible to compare those samples to ours.

Using sera from a large population of egg-allergic children or immunized mice, we showed that these large aggregates displayed reduced human IgE and IgG<sub>4</sub>-binding capacities, reduced mouse Ig-binding (IgE-, IgG<sub>2a</sub>- and IgG<sub>1</sub>-) capacities compared to native OVA and had a lower triggering potential with both human and mouse sera.

The reduced Ig-binding capacity to aggregates may result from a lower affinity of antibodies for these structures, from the loss during the heating of some epitopes that were present on native OVA or from a reduced accessibility to the epitopes within

these entities. Inhibition experiments suggested several clues: (1) human IgE's lower avidity toward aggregates; and (2) that all of the epitopes recognized by IgE antibodies in aggregates were present in N-OVA, whereas the opposite was not the case. These results indicated that the heating conditions applied in this study and the formation of large aggregates did not destroy all ovalbumin IgE-binding epitopes, but instead resulted in the loss or inaccessibility of some of these epitopes. The results also indicated that there were no epitopes specific to large aggregates that could be recognized by patient IgE. Most of the patients' tolerance or reactivity to baked (boiled) eggs was unknown and therefore, we could not go further in this analysis. A decreased IgE-binding with heated OVA but persistent epitopes recognized by IgE has been found by Martos et al. (2011), and reduced Ig-binding capacities to thermally treated OVA are consistent with other results (Bloom et al., 2014; Jiménez-Saiz et al., 2011; Shin et al., 2013).

IgE-binding capacity *in vitro* is not always correlated with the ability to cross-link IgE on basophils (Cabanillas et al., 2015). Indeed, more than one IgE-binding site is needed to induce degranulation, and modification of the allergen structure could either increase or decrease the number of IgE-binding epitopes (Vissers et al., 2011). The large aggregates of ovalbumin generated in this study exhibited a reduced degranulation capacity of RBL-SX38 compared to N-OVA. This result contrasts with that of Martos *et al.* (2011), who have found no difference in degranulation capacity between native and heated OVA (30 min in boiling bath) using a human basophil activation test. In addition to the differences in methods, this discrepancy may also originate from differences in heating conditions and generated structures. This emphasizes the importance of the characterization of structures generated upon thermal treatment when studying links between heating and allergenicity.

We used a mouse model of allergy to compare Ig production upon sensitization with native and large aggregates of OVA. The mouse model of sensitization by intraperitoneal injections in the presence of an adjuvant has been shown to be a relevant and sensitive method for inducing IgE antibodies, and this entry route provided the ability to overcome tolerance compared to oral exposure (Aldemir et al., 2009; Bihouée et al., 2014; Mine and Yang, 2007). Sensitization with N-OVA or large aggregates of OVA resulted in different Ig profiles: whereas specific IgE production

appeared similar, marked differences were evidenced for specific IgG classes. Sensitization with N-OVA induced a high level of specific IgG<sub>1</sub> corresponding to a pro-Th2 profile, whereas with large aggregates, high levels of both IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>1</sub> were obtained, thus corresponding to a mixed pro-Th1 and pro-Th2 profile. Similar to our results, Golias et al. (2012) have previously shown that immunization with OVA heated at 70°C for 10 min induced a shift from a Th2-type response to a Th1-type response: i.e., lower OVA-specific IgE, higher OVA-specific IgG<sub>2a</sub> levels, lower production of Th2-cytokines in mesenteric lymph nodes and higher production of IFN- $\gamma$  in spleen levels than native OVA. In line with these results, Rupa et al. (2015) have shown that stimulating CD4<sup>+</sup>T cells with heated OVA skewed the cytokine response to type 1 (increased IL-10, IL-12, IL-17 and decreased IL-4). Watanabe et al. (2014) have also found a shift from a Th2-type response to a Th1-type response by increasing thermal treatment.

We also found that sensitization with large aggregates resulted in the production of IgG with the ability to bind both native and aggregates of OVA, whereas sensitization with the native form produced IgG that primarily had the ability to bind the native form. Moreover, specific Ig G titers were equivalent or higher for sensitization with aggregates compared to the native form. These results highlighted that heat aggregates produce more IgG than the native form and induced Ig with the ability to bind both forms of OVA.

This study performed with large aggregates shows that such structured samples may be used with classical protocols; however, it also provides evidence of a methodological limit. Because OVA could not be aggregated at a concentration higher than 15-20 mg/ml to avoid gelling of the sample, a limited quantity (3-4 mg) could be given during the challenge to the mice, thus preventing clear symptoms from developing and preventing the attainment of significance with mMCP-1 dosing. Another point to consider is that mice were sensitized by intraperitoneal route. Both digestion and transcytosis were not involved during sensitization. As the extent of OVA digestion changed with heat-induced aggregated morphologies (Nyemb et al., 2014a, 2014b) and that heating could prevent transcytosis of intact allergen across intestinal epithelium (Martos et al., 2011), sensitization through the oral route could lead to different results.

Further investigations are needed to study impact of heating and generated morphologies on allergenicity. This study provides data on one aggregated structure (spherical-agglomerated particles) of OVA, and it would be interesting in future work to study other aggregated morphologies. Other parameters linked to allergy mechanisms would also be worth comparing as induction of immune cells during sensitization.

To sum up, this study highlights the links between thermal aggregation of OVA and allergenicity both in humans and a mouse model. The thermal aggregation of OVA as large particles decreases allergenicity. IgE production remains unchanged in mice but IgE-binding and degranulation decrease in mice and humans. Large aggregates of OVA also increase the production of IgG. Furthermore, it seems that sensitization with aggregated OVA produces IgG with the ability to bind both forms of OVA, whereas sensitization with the native form produces IgG that primarily opposes the native form.

## **5. Bilan de l'étude sur l'effet de larges agrégats sur l'allergénicité de l'ovalbumine**

Dans cette thèse, nous supposons que l'agrégation thermique de l'OVA peut moduler son allergénicité et nous cherchons à mettre en évidence comment les phases de sensibilisation ou déclenchement sont modifiées. Dans ce premier travail, nous avons comparé l'OVA sous forme de larges agrégats à la forme native.

Nous avons ainsi montré que l'agrégation de l'OVA sous forme de larges particules augmente la production d'IgG dont les IgG<sub>2a</sub> impliqués dans la réponse Th1 lors de la sensibilisation chez la souris. L'OVA ainsi agrégée présente également, pour des sérums de patients allergiques à l'œuf ou de souris sensibilisées, des capacités plus faibles de liaison aux Ig et d'activation des basophiles. Ce travail illustre que l'agrégation thermique de l'OVA en larges agrégats modifie son potentiel allergénique lors des deux phases de la réaction allergique, la sensibilisation et le déclenchement. Pour aller plus loin dans la compréhension du lien entre les modifications de structure induites par les traitements thermiques et l'allergénicité de l'OVA, une deuxième étude a été réalisée pour évaluer l'effet de la structure des agrégats (chapitre 4).

Du point de vue méthodologique, nous avons vérifié lors de ce premier travail que de telles dispersions agrégées peuvent être utilisées dans les tests ELISA, le test de

dégranulation et en modèle murin avec cependant quelques limites. Lors de ce premier protocole animal, nous avons réalisé des provocations croisés entre la forme sensibilisante et la forme déclenchante chez la souris et en test de dégranulation. La concentration limite d'agrégation (15-20 mg/ml) afin d'éviter la gélification des préparations a pour conséquence de limiter à 3-4 mg/souris la quantité qui peut être délivrée lors d'une provocation orale unique. Dans ces conditions, les symptômes des souris sont restés très faibles (même pour les souris sensibilisées et challengées avec la forme native) et les marqueurs sanguins n'ont pas montré de différences significatives. Nous avons donc choisi dans le second protocole de provoquer les souris uniquement avec la forme native à une dose plus élevée (20 mg/souris) et d'évaluer le gonflement des oreilles lors du déclenchement et de réaliser les challenges croisés par le test de dégranulation.



# **Chapitre 4 – Allergenicité de petits et de larges agrégats de l'ovalbumine**

Basé sur la publication suivante :

Claude, M., Bouchaud, G., Lupi, R., Castan, L., Tranquet, O., Denery-Papini, S., Bodinier, M., Brossard, C. How protein aggregates can reduce allergenicity: comparison of ovalbumin heated under opposite electrostatic conditions. (Soumis).



## **Abstract**

Depending on the physicochemical conditions during heating, heated proteins aggregate differently. We investigated whether the way a protein aggregates can modulate its allergenicity.

Heating ovalbumin in opposite electrostatic conditions led to small (A-s, about 50 nm) and large (A-L, about 65  $\mu$ m) aggregates that were used to sensitize mice. The symptoms upon oral challenge and RBL degranulation with native ovalbumin differed based on which aggregates were used during the sensitization. IgE production, but not IgG production, was significantly lower with A-s. The aggregates were bound and cross-linked by IgE either similarly or differently, although two common linear IgE-epitopes were found by pepscan analysis.

These results showed that A-s formed under repulsive electrostatic conditions displayed a lower allergenic potential than A-L formed under non-repulsive conditions. This work further demonstrates that food structure modulates the immune response during the sensitization phase with some effects on the elicitation phase of an allergic reaction.

## **1. Introduction**

A food allergy is defined as an adverse reaction mediated mainly by an IgE response. There is growing research interest in these allergies because the number of people who develop them is increasing in western countries (Sicherer and Sampson, 2010). One possible cause of this increase could be the rising presence of complex foods in the western diet. Most of these foods are processed by heating, hydrolysis, and high pressure that could affect allergenicity (Verhoeckx et al., 2015). Hen egg is one of the most common foods responsible for allergies, and it has an estimated allergy prevalence of 1% in European children younger than 2 years old that reaches up to 2% of this population in north-western Europe (Xepapadaki et al., 2016). Egg is a ubiquitous ingredient in many commercially available foods, and most of these foods undergo thermal treatment that could change the allergenic potential of the egg (Davis et al., 2001). Many patients who are allergic to eggs can tolerate heated egg-containing foods (Lemon-Mulé et al., 2008; Leonard et al., 2015), and consuming a

cooked egg rather than egg in a baked product was reported to better prevent an allergy from developing (Koplin et al., 2010).

When studying the effect of heating on the allergenicity of egg or ovalbumin (OVA), a major allergen in egg white, thermal treatments with various durations and temperatures were applied, and differences in allergenicity were observed (Claude et al., 2016; Golias et al., 2012; Shin et al., 2013; Watanabe et al., 2014). IgE-binding to heated egg proteins and to OVA was generally lower in heated eggs than in non-processed eggs (Bloom et al., 2014; Claude et al., 2016; Shin et al., 2013). Heating can result in the loss or masking of epitopes as well as the formation of new ones (Shin et al., 2013), which modifies the panel of epitopes exposed to immune cells or antibodies and thus changes the allergenic potential (Kosti et al., 2013). Different, but also common, linear epitopes of OVA were reported in mice (Mine and Yang, 2007) and humans (Benedé et al., 2014).

Murine models are good tools to study allergenicity and IgE specificity upon sensitization with various forms of an allergen (Liu et al., 2016). The sensitization of mice with heated OVA locally induced a lower Th2 response compared to unheated OVA and resulted in lower allergic symptoms upon challenge with native OVA (Golias et al., 2012). The mechanisms responsible for this decrease were partly studied by stimulating T cells with heated OVA, which resulted in a shift from a Th2 cytokine to a Th1 cytokine response (Rupa et al., 2015). In mice sensitized with native OVA, the elicitation reaction after oral challenge with heated OVA also decreased compared to native OVA (Martos et al., 2011).

Heating a protein above its denaturation temperature leads to unfolding and, depending on attractive and repulsive interactions, may lead to aggregation through hydrophobic interactions, disulfide bonds and electrostatic interactions, which are sensitive to pH and the ionic strength of the solution (Nicolai and Durand, 2013). The gelation of egg white and OVA as a function of temperature, pH and ionic strength has been the subject of extensive study (Hegg et al., 1979; Kitabatake et al., 1987). The unfolding of OVA exposes hydrophobic areas, which participate in intermolecular associations. Electrostatic repulsion by counterbalancing these hydrophobic interactions modulates the aggregation kinetics and leads to aggregates of different sizes (from oligomers to polymers) and morphology (from linear, more or less

branched to spherical) (Hegg et al., 1979; Nyemb et al., 2014a), which leads to critical concentrations in gels with various structures (fine strands or fibrillar gels to particulate gels), coagulum, turbid sol or precipitate (Bryant and McClements, 1998; Kitabatake et al., 1987). Near the natural pH of stored egg white, a homogeneous gel network forms that is composed of particles ranging in size from 60 to 80 nm that are comprised of OVA with embedded aggregated ovotransferrin, whereas ovomucoid does not tend to aggregate (Croguennec et al., 2002; Handa et al., 1998; Nyemb et al., 2016).

The aggregation of OVA as large particles near its isoelectric point reduced its allergenicity by shifting towards a Th1 profile and displaying lower Ig-binding and lower basophil-activation capacities compared to the native form of OVA (Claude et al., 2016). Aggregation was found to reduce IgE-binding and the ability to induce mediator release of Ara h 1, which is a major peanut allergen (Blanc et al., 2011). Moreover, aggregation was also reported to promote sensitization with  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin and to decrease antigenicity (Roth-Walter et al., 2008). OVA aggregates of various structures showed differences in the kinetics of digestion and generated peptides (Nyemb et al., 2014a), but there is currently no information available on whether the manner in which OVA aggregates changes its allergenicity.

This study aimed to be the first study to evaluate the effect of the aggregation process on OVA allergenicity by comparing OVA aggregates formed under opposite electrostatic conditions in a murine model of allergy and using an RBL assay. We examined how these aggregates changed Ig production in mice, T-helper differentiation at the intestinal level, the specificity of produced IgE and the elicitation phase upon challenge with native OVA. We showed that the small aggregates (A-s) formed under conditions in which electrostatic repulsions counterbalanced by hydrophobic attractions (basic pH and low ionic strength) had a lower allergenicity than the large aggregates (A-L) that formed when the electrostatic repulsions were minimal.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Protein preparation and characterization of OVA aggregates**

OVA purified from egg white was kindly provided by INRA, UMR 1253 “Science et Technologie du Lait et de l’œuf” (Rennes, France). Non-aggregated OVA solution (N) was prepared in PBS (pH 7.6, 0.15 M NaCl). OVA solutions were prepared at 15 mg/ml in 0.8 M NaCl, pH 5 for A-L or in 0.03 M NaCl, pH 9 for A-s and were heated for 6 h at 80°C in a controlled temperature water bath to form aggregates as previously described (Nyemb et al., 2014a). The size distributions of A-L and A-s were determined by laser light scattering using a Mastersizer MS 3002 (Malvern instruments, UK) or by dynamic light scattering on a Zetasizer (Malvern instruments, UK). Measurements were collected in triplicate from three aliquots of each preparation. The aggregated samples were diluted with NaCl 2 M or Milli-Q water and PBS to adjust the solution to pH 7.6, 0.15 M NaCl and to the required concentration for the subsequent experiments.

### **2.2. Mouse model of food allergy**

Three-week-old Balb/cJ female mice from the Centre d’Elevage René Janvier (France) were acclimatized for 3 weeks prior to immunization and were housed in a ventilated cage system (IVC Racks Allentown, PA, USA) under pathogen-free husbandry conditions. All of the experiments were performed according to the Ethics Committee in Animal Experimentation of Pays de la Loire (CEEA-PdL n°6; accreditation number 4049). Sensitizations were performed every 10 days by three intraperitoneal injections of 10 µg of OVA adsorbed on aluminum hydroxide. Four groups of mice (n=9-10) were established: two groups sensitized with A-s or A-L and two control groups, including a positive control sensitized with N and a negative control with non-sensitized mice.

Two weeks after the last sensitization, a challenge was performed by the intra-gastric administration of 200 µl of N (100 mg/ml; 20 mg OVA). Blood samples were collected 1 h after the challenge by cardiac puncture under anesthesia, and the animals were sacrificed by vertebral dislocation. Sera were stored at -80°C until use.

### **2.3. Food allergic reaction evaluation**

Mouse ear swelling upon oral challenge with 20 mg of N was assessed by measuring ear thickness under anesthesia a few days before and 1 h after challenge using a digital micrometer (Guilman SA, Saint-Herblain, France) (Sakai et al., 2010).

The blood level of mMCP-1 was determined in sera diluted at 1:100 using a commercial kit (eBiosciences, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **2.4. Histological analysis**

Jejunum samples were collected after sacrifice and were immediately immersed in paraformaldehyde (4% in PBS) for at least 48 h at 4°C, followed by the standard procedures for paraffin embedding. Sections were cut and stained with hematoxylin eosin or toluidine blue. The sections were observed under a microscope (Zeiss Axiovert 135 Inverted Fluorescence Phase microscope). Histological analysis was randomly performed by a person blind to the sample conditions using ImageScope software (Aperio Technologies, Inc.). Morphological alterations were assessed by considering villi atrophy, the number of goblet and inflammatory cells, the height of the crypts and the number of mast cells (Wang et al., 2013).

### **2.5. RBL test**

The degranulation of 2H3 RBL cells (ATCC, Manassas, USA) was evaluated in vitro by measuring  $\beta$ -hexosaminidase release as previously described (Claude et al., 2016). Sera from each sensitization group were pooled and diluted 1:100. The highest mediator release value (MaxD) and the allergen concentration corresponding to 50% of the highest release (EC50) were determined using GraphPad Prism 5.02 for Windows software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The measurements were performed in triplicate for each pool and were replicated six times.

### **2.6. Immunoglobulin analyses**

The efficiency of sensitization was evaluated by measuring the levels of IgE, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>. Allergen-specific Ig was measured by indirect F-ELISA using the Biomek<sup>®</sup> NXP Laboratory Automation Workstation as described previously (Claude et al., 2016).

Measurements were performed in triplicate on N, A-L, A-s and PBS. The results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensities measured with OVA (IF) over the mean fluorescence intensity measured with PBS (IF<sub>0</sub>) to take into account background differences between the sera.

### **2.7. Flow cytometry**

Crushed and filtered mesenteric lymph nodes and Peyer's Patches, pooled by mouse, were diluted in RPMI buffer (RPMI medium with 5% SVF and 1% EDTA) and transferred to a 96-well plate at a concentration of  $1.10^6$  cells per well. The FACS markers and buffers were obtained from BD Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France). The cells were stimulated for 5 h at 37°C with 10 ng/ml of phorbo-12-myristate-13-acetate and 2 µg/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) with Golgi Plug containing Brefeldine A. Then, the cells were stained with surface markers: CD3-FITC, CD4-PE, CD196-APC, and CD25-BV510 in RPMI Buffer containing Fc blocker CD16/32. The cells were next fixed in 4% paraformaldehyde (Science services, Munich, Germany) and stained with intracellular markers, including IL-4-PE, IFN-γ-APC, FoxP3-PE, and IL-17-APC-Cy-7, after permeabilization with Perm/Wash buffer as described previously (Bouchaud et al., 2016). The antibodies and buffers were obtained from BD Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France). The cells were acquired on a BD FACS Canto II with BD FACSDiva Software (BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), and the percentages of the cell populations were analyzed with FlowJow software (TreeStar, Williamson Way, Ashland, USA).

### **2.8. Immunoglobulin-E binding to solid-phase synthetic peptides (Pepscan)**

Mice sera pooled by sensitization group were used in a pepscan analysis as described previously (Denery-Papini et al., 2011). Decapeptides, overlapping by eight amino acids, spanned the sequence (excluding the signal amino acid) of OVA (UniProt ID P01012). HRP conjugated anti-mouse IgE antibodies (Southern Biotechnology, Montrouge, France) diluted 1:100,000 were used to reveal mouse IgE binding to peptides with a chemiluminescent substrate (WesternBright™ Quantum, Advansta, Menio Park, CA, USA). Luminescence was acquired with a CCD camera (Luminescent Image Analyzer LAS 3000; Fujifilm, Tokyo, Japan), and a semi-quantitative evaluation of

IgE binding was performed with Multi Gauge version 3.0 software (Fujifilm). For each pool, the spot detected with the highest intensity was used as a reference. IgE-binding to peptides was classified as positive (>20%) and binding under 20% was ignored.

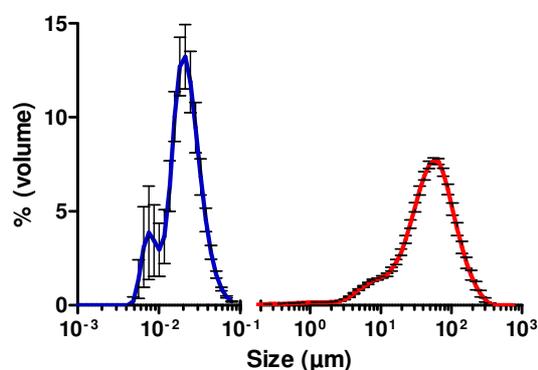
## 2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.02 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and p values below 0.05 were considered significant. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data for each group were first analyzed for normality using D'Agostino and Pearson's omnibus normality test. Next, planned comparisons between medians or means of the groups sensitized with aggregates were analyzed by the Mann-Whitney test or unpaired t-tests with Welch's correction, when necessary. When comparing data related to the specificity of the IgE binding, Friedman's test with subsequent Dunn's post-tests or repeated-measures ANOVA with subsequent Bonferroni's posts-tests were performed.

## 3. Results

### 3.1. Size distribution of the aggregates

The particle size distributions of A-L and A-s that were prepared for sensitization and analyzed by laser light scattering or dynamic light scattering, respectively, are shown in Figure 35. The mean particle size was  $49.7 \pm 3.5$  nm for A-s with a distribution size between 5 and 80 nm and  $66.4 \pm 2.9$   $\mu$ m for A-L with a distribution size between 3 and 300  $\mu$ m.

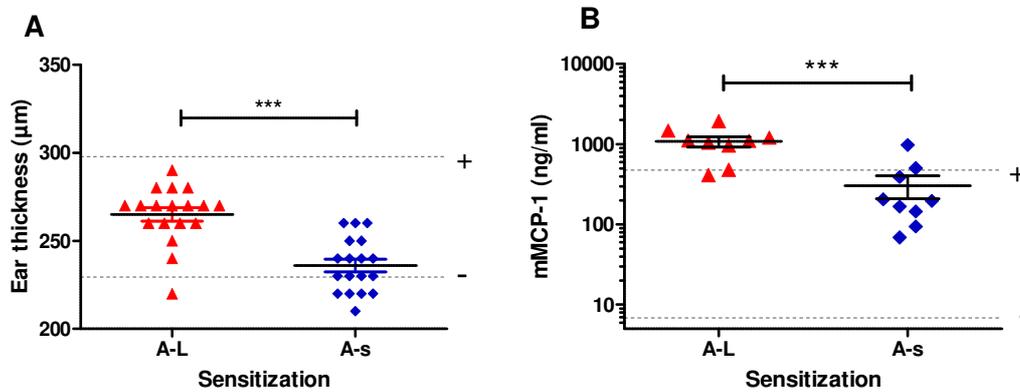


**Figure 35:** Characterization of the aggregates. Particle size distributions of the ovalbumin (OVA) aggregates formed by heating an OVA solution at 80°C for 6 h under different physicochemical conditions (mean  $\pm$  SEM; n = 9). Small aggregates measured by dynamic light scattering formed at pH9, NaCl 0.03 M (left in blue), and large aggregates measured by laser light scattering formed at pH 5, NaCl 0.8 M (right in red).

### 3.2. Allergenic potential of aggregates in response to N

#### 3.2.1. Elicitation with N after sensitization with the aggregates

We first investigated the effect of sensitization with the aggregates on elicitation following an oral challenge with N (Figure 36).



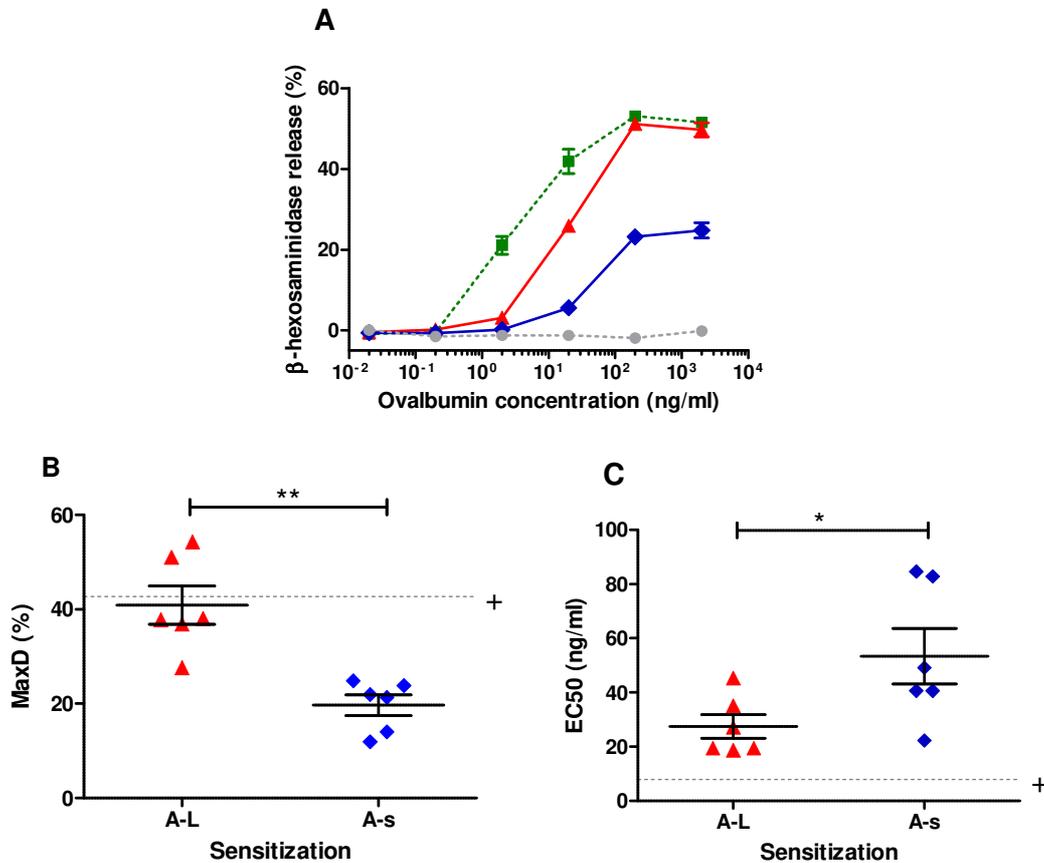
**Figure 36:** Evaluation of the allergic reaction upon challenge of the mice with 20 mg of native ovalbumin (N). Ear thickness was measured 1 h after elicitation of the allergic reaction (A) along with the mMCP-1 level in sera (B) for mice sensitized with large (A-L, in red) and small (A-s, in blue) aggregates. Right and left ear thickness of the mice and mean data of two determinations for the mMCP-1 level with the mean  $\pm$  SEM per group and the results of statistical tests are presented (A: unpaired t-test; B; Mann-Whitney test; \*\*\*  $p < 0.001$ ). The lines correspond to the mean values for the positive control (mice sensitized with non-aggregated OVA solution) and the negative control (non-sensitized mice).

The ear thickness of the mice was measured a few days before and 1 h after the challenge to evaluate ear swelling as a symptom of elicitation. Before challenge, no differences in ear thickness were observed between the groups of mice ( $230.0 \pm 3.7 \mu\text{m}$  for A-L and  $234.4 \pm 4.4 \mu\text{m}$  for A-s). After the challenge, a significant difference in ear thickness was only observed in mice sensitized with A-L ( $p < 0.0001$ ). These mice displayed a higher mean ear thickness after challenge ( $265.0 \pm 3.8 \mu\text{m}$ ) than the mice sensitized with A-s ( $236.1 \pm 3.6 \mu\text{m}$ ) (Figure 36A).

The mMCP-1 levels in sera significantly increased in the mice that were sensitized with A-L ( $1077.5 \pm 154.4 \text{ ng/ml}$ ) compared to the mice that were sensitized with A-s ( $304.6 \pm 96.0 \text{ ng/ml}$ ) (Figure 36B).

The histological analysis of intestinal fragments did not show any significant differences for the five tested parameters between the groups of mice sensitized with the aggregates, and no significant differences were found between the controls either (data not shown).

The biological functionality of sera as a function of the aggregates was also investigated with the RBL activation assay. RBL cells were sensitized with pools of sera from each group of mice and activated with N (Figure 37).



**Figure 37:** Basophil activation assay with pools of sera from mice sensitized with native ovalbumin (N, green squares), large aggregates (A-L, red triangles), small aggregates (A-s, blue diamonds) or non-sensitized mice (grey circles). RBL-2H3 cells were stimulated with N at concentrations between  $2 \cdot 10^{-2}$  and  $2 \cdot 10^3$  ng/ml. Degranulation curves (A), MaxD (B) and EC50 (C) data show the mean  $\pm$  SEM for six repetitions and the results of Mann-Whitney tests (\*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.01$ ). The line corresponds to the mean values for the positive control (mice sensitized with non-aggregated OVA solution).

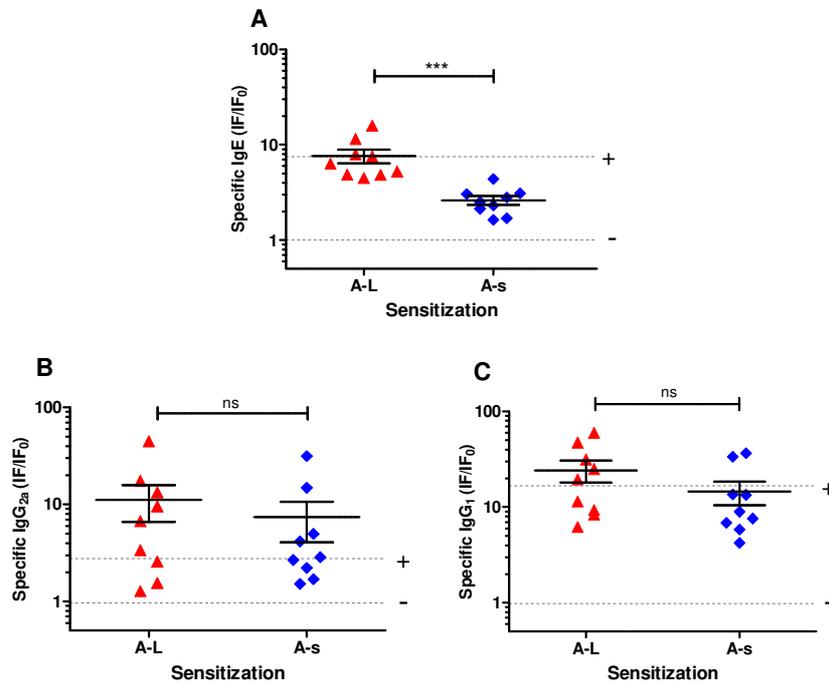
No  $\beta$ -hexosaminidase release by RBL cells was observed with the pool from non-sensitized mice, whereas degranulation occurred with the pools from the sensitized mice (Figure 37A).

The pool from the mice sensitized with A-L displayed a higher MaxD ( $41.2 \pm 2.2\%$ ) and a lower EC50 ( $29.5 \pm 4.2$  ng/ml) than the pool from the mice sensitized with A-s ( $20.1 \pm 1.3\%$  and  $54.9 \pm 6.7$  ng/ml, respectively) (Figure 37B-C).

Thus, upon N-stimulation, A-L-sensitized mice had higher *in vivo* elicitation and *in vitro* degranulation than A-s-sensitized mice.

### 3.2.2. Ig production upon sensitization with the aggregates

Ig production in mice sensitized with aggregated OVA is reported in Figure 38.



**Figure 38:** Evaluation of the immune response upon sensitization with the aggregates. Ovalbumin (OVA)-specific IgE (A), IgG<sub>2a</sub> (B) and IgG<sub>1</sub> (C) were detected by an indirect ELISA in sera from mice sensitized with the large (A-L, in red) and small (A-s, in blue) aggregates. The results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured for native OVA (IF) over fluorescence intensity measured for PBS (IF<sub>0</sub>). Individual data, along with the mean ± SEM and the results of statistical tests, are presented (A, B: Mann-Whitney tests; C: unpaired t-test; ns p > 0.05; \*\*\* p < 0.001). The lines correspond to the mean values for the positive control (mice sensitized with non-aggregated OVA solution) and the negative control (non-sensitized mice).

As expected, non-sensitized mice challenged with N showed no production of OVA-specific Ig, as illustrated by the ratios of fluorescence intensities IF/IF<sub>0</sub> set at 1.00 ± 0.06, 0.96 ± 0.04 and 0.98 ± 0.03 for specific IgE, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively. A-s induced a significantly lower production of OVA-specific IgE than A-L, which was at the same level as the positive control (Figure 38A). Sensitization with A-L and A-s induced a similar amount of IgG<sub>2a</sub> which tended to be higher than sensitization with N (Figure 38B), whereas no difference was observed in IgG<sub>1</sub> production between the two sensitizations with aggregated OVA, which displayed the same levels as the positive control (Figure 38C).

Thus, IgG production was not influenced by aggregate morphology, whereas A-s promoted less IgE production than A-L.

### 3.2.3. Cell phenotypes induced by sensitization with the aggregates

Because allergic reactions to food are linked to an increase in the differentiation of T helper cells in sub-populations such as Th2 and Th17, and because food allergies are associated with a defect in Th1 and regulatory T cells, we assessed the intestinal differentiation of CD4+ T cells in the intestine (mesenteric lymph nodes and Peyer's patches) by flow cytometry after sensitization and non-specific stimulation of a pool of cells from each mouse. The results are shown in Table 11 as the mean value for each mouse group.

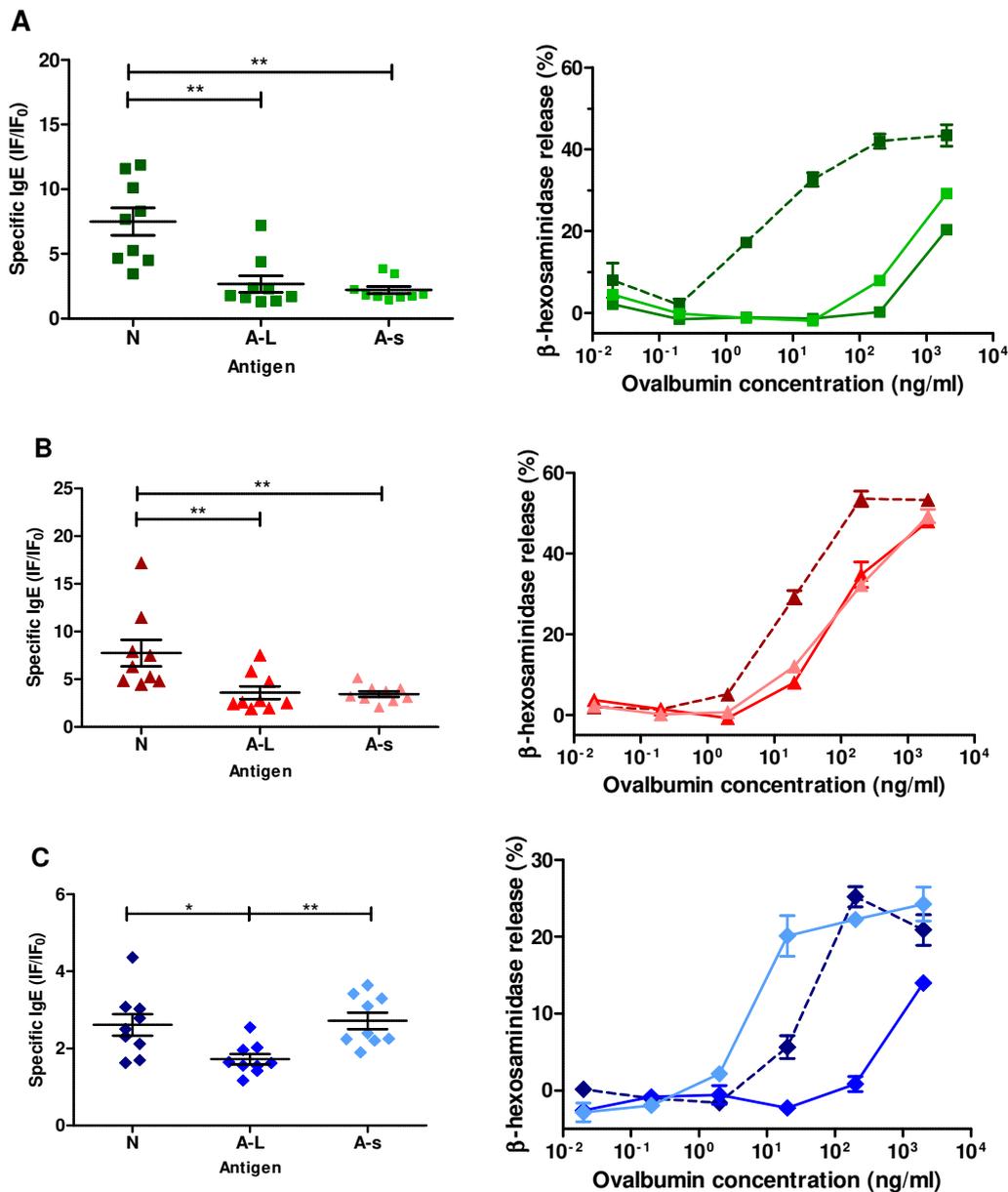
**Table 11:** Populations of intestinal immune cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches (expressed as % of CD4+ T cells) of mice sensitized with large (A-L) and small (A-s) aggregates and mice sensitized with native ovalbumin (N) as the positive control and non-sensitized mice as the negative control.

	A-L	A-s	Controls	
			Positive	Negative
IL-4 producing CD4+ T cells (%)	4.9 ± 0.7	5.7 ± 0.8	5.5 ± 0.9	4.2 ± 0.6
IFN-γ producing CD4+ T cells (%)	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.5
Ratio of Th1/Th2	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.25 ± 0.07
IL-17 producing CD4+CCR6+ T cells (%)	5.0 ± 1.6	2.8 ± 0.8	7.4 ± 2.7	4.8 ± 1.8
CD4+CD25 <sup>high</sup> FoxP3+ regulatory T cells (%)	9.0 ± 0.8	9.0 ± 0.9	7.8 ± 0.7	7.3 ± 0.8
Ratio of Th17/Treg	0.44 ± 0.13	0.34 ± 0.14	1.06 ± 0.38	0.66 ± 0.23

The frequency of CD4+IL-4+ Th2 cells was similar in the two groups sensitized with the aggregates and comparable to both controls, whereas the frequency of CD4+IFN+ Th1 cells tended to be lower in the mice sensitized with A-L compared to those sensitized with A-s. Both sensitizations to aggregates displayed a higher frequency than sensitization with N. There were more CD4+CCR6+IL-17+ Th17 cells in mice sensitized with A-L than in mice sensitized with A-s, and both sensitizations with aggregates displayed a lower frequency than the positive control. By contrast, the frequency of CD4+CD25+Foxp3+Treg was the same in both groups sensitized with aggregates, but the frequency was higher than that in both control groups. Differences in the % of cell populations induced by the aggregates were low. However, the ratio for Th1/Th2 tended to be higher for sensitization with A-s than for sensitization with A-L, whereas the ratio for Th17/Treg tended to be lower in A-s.

### 3.3. Specificity of induced IgE

In each sensitization group, IgE-binding to N, A-L and A-s were compared by an ELISA (Figure 39 left), and the degranulation capacity of N, A-L and A-s was assessed with the RBL degranulation assay (Figure 39 right).



**Figure 39:** Specificity of the ovalbumin (OVA)-specific IgE. IgE-binding to (left) and degranulation ability for (right) native ovalbumin (N, dark), large aggregates (A-L, medium) or small aggregates (A-s, light) of sera from mice sensitized with (A) N (green), (B) A-L (red) and (C) A-s (blue). Individual data, along with the mean  $\pm$  SEM and the results of the statistical tests (A-B: Friedman test with a subsequent Dunn’s multiple comparison test; C: repeated measures ANOVA with a subsequent Bonferroni multiple comparison test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ) are presented on the left, and degranulation curves with the pools of sera are presented on the right (mean  $\pm$  SEM of triplicates).

Looking at sera from the positive control, the aggregates displayed lower IgE-binding and degranulation ability than N (Fig. 39A). A similar trend was found for sera from mice sensitized with A-L, but the gap between N and the aggregates was narrower (Figure 39B) as EC50 increased for N and decreased for the aggregates. Sera from mice sensitized with A-s displayed a very different behavior (Figure 39C): A-s and N had the same IgE-binding ability, which was higher than the A-L ability, and A-s displayed a higher ability to induce degranulation than N and A-L, which was the lowest.

The pepscan analysis performed with pools of sera sensitized with A-L or A-s revealed no differences in IgE-binding. Stretches of 2 or 3 peptides corresponding to two sequential epitopes on the OVA sequence, P57-70 and P189-200, were detected in both cases (data not shown).

#### **4. Discussion**

Heat denaturation is a simple method to change the immunogenic properties of some food proteins. Clinical observations, notably for egg, have revealed that a large proportion of allergic individuals tolerate cooked food better than raw food (Lemon-Mulé et al., 2008). Heated foods also appear to be more effective for inducing desensitization compared to raw foods and can be used more safely in immunotherapy (Johansen et al., 2005; Leonard et al., 2012). Upon heating, aggregated structures may form, and the particulate nature is thought to be involved in immunogenicity. In this study, applying the same heat treatment to OVA solutions under different physicochemical conditions resulted in A-s and A-L (approximately 50 nm and 66 µm, respectively), similar to results from a previous study (Nyemb et al., 2014a), thus confirming the effect of physicochemical conditions in addition to temperature and duration on the aggregation of globular proteins (Bryant and McClements, 1998). The size and morphology of OVA aggregates changes their digestibility, which has been demonstrated by examining the extent of digestion and the nature of generated peptides. Small aggregates were more rapidly and extensively hydrolyzed than large aggregates (Bryant and McClements, 1998; Nyemb et al., 2014a). We previously showed that the aggregation of OVA decreased its allergenicity compared to the native protein (Claude et al., 2016). We therefore show for the first time in this study that the

allergenicity of OVA aggregates is also modified depending on aggregate size, with small aggregates displaying a reduced allergenicity compared to large aggregates.

Using a mouse model of allergy, we showed that compared to mice sensitized with N, sensitization with both aggregates resulted in a shift from a Th2 profile with the production of IgE to a mixed Th2-Th1 profile with increased production of specific IgG<sub>2a</sub> associated with a higher induction of IFN- $\gamma$  and decreased Th17 induction. The induction of pro-inflammatory Th17 associated with allergy is a matter of debate but has previously been reported with OVA in mouse models (Perrier et al., 2010). The allergic reaction measured by ear swelling and the sensitivity of RBL activation (EC50) upon challenge with native ovalbumin (N) were also reduced in groups sensitized with the aggregates compared to N. Several studies reported a similar conclusion about a pro-Th1 shift with various heated OVA (Golias et al., 2012; Rupa et al., 2015; Watanabe et al., 2014), and this pro-Th1 shift was also notably found with glutaraldehyde-polymerized OVA (Gieni et al., 1996). Comparable results for Ig production were observed with the isoform Bet v 1d from birch pollen, which has a tendency to form aggregates and induce similar levels of IgE but higher levels of IgG than the Bet v 1a component (Zaborsky et al., 2010).

Beyond these observations between native and heated/aggregated allergens, the novelty of this work was to show how allergen aggregates could also modulate sensitization. Indeed, we observed that the Th1/Th2 balance and the level of Th17 induction tended to differ between the aggregates. Sensitization with the A-s pushed the Th2/Th1 balance towards a pro-Th1 profile, whereas sensitization with the A-L induced a mixed profile between pro-Th1 and pro-Th2 with a smaller increase in IFN- $\gamma$  and a lower decrease of Th17 induction. This result could be linked to differences in the dendritic cell (DC) profile because some DCs are involved in Th17 stimulation and others are involved in Th2 stimulation (Lim et al., 2013). It would be interesting to analyze the profile of DCs involved in this mouse model as a function of the aggregates in the future. By producing more IgE to bind native and aggregated OVA, sensitization with the A-L was greater than sensitization with the A-s. In agreement with these Ig patterns and intestinal immune cellular populations, the elicitation reaction *in vivo* and *ex vivo* upon challenge with native OVA was reduced in mice sensitized with the A-s compared to mice sensitized with the A-L.

The manner in which OVA aggregated also modified IgE reactivity. Similar to the native form, sensitization with the A-L produced IgE that was able to bind to and cross-link with the native form better than both aggregates, whereas IgE produced A-s that bound and cross-linked native OVA and A-s better than A-L. Although sensitization with the A-s induced lower levels of IgE, these antibodies were directed to particular epitopes present both in N and A-s but not (or masked) in A-L. As previously observed, A-L did not induce IgE directed specifically to this form. Differences in degranulation ability between native and aggregated allergens were previously observed with Ara h 1 (Blanc et al., 2011) and Bet v 1 (Campana et al., 2011), which was explained by differences in flexibility and accessibility to the epitopes in the aggregates as well as differences in the IgE repertoire. IgE produced after sensitization with A-L or A-s was bound to two identical linear epitopes. The specific epitopes would likely be conformational epitopes, which are known to dominate immunogenic responses. Of the two of linear epitopes found for aggregate-sensitized mice, P57-70 had been previously identified as an immunodominant epitope in mice sensitized through different sensitization routes (oral, intraperitoneal and subcutaneous) with raw OVA (Mine and Yang, 2007). P189-204 was identified in humans (Benedé et al., 2014; Mine and Rupa, 2003). Although the sensitization in egg allergic patients was unknown, children were potentially sensitized with heated eggs. Thus, this last epitope (currently identified only in humans) might be a specific epitope recognized by IgE from heated OVA sensitization, as shown in our results.

The mouse model of intraperitoneal sensitization used in this study showed the same results regarding Ig production and reactivity as our previous study examining native OVA and A-L, which demonstrated that the results were repeatable (Claude et al., 2016). The intraperitoneal route enabled a direct interaction between the allergen and the immune system and more likely corresponded to an acute model of sensitization because no modifications in intestinal histology were observed, despite significant elicitation responses. Both the larger and quicker digestion previously reported (Nyemb et al., 2014a) and the presently reported lower immunogenicity suggest that there is a lower allergenicity for the A-s compared to the A-L. However, transport of the antigens across the epithelium and the ability of antigens to prime the immune system after transcytosis are other parameters to consider. Thus, the lower

allergenicity of the A-s must be further investigated with a mouse model of oral sensitization in which both digestion and transcytosis are involved. Concerning the elicitation phase, it was previously shown that heating OVA abrogated its transport across epithelial cells (Caco-2 cells model) in a form able to activate basophils (Martos et al., 2011). Whether this transport occurs for both aggregates is currently being investigated.

In summary, this study highlights some links between the aggregation process of a protein and its allergenicity. For the first time, we show that the physicochemical conditions when heating OVA and the resulting aggregation process and aggregate size are important parameters to consider in the context of allergy. Modifying the way OVA aggregates changed the immune response during the sensitization phase (Ig production and the specificity of produced IgE) led to differences in the elicitation results. This outcome is important because egg presentation also matters to prevent an allergy from developing, and first exposure to cooked egg was reported to be preferable to egg in a baked product (Koplin et al., 2010).

## **5. Bilan de l'étude sur l'allergénicité de petits et de larges agrégats**

Après avoir montré que l'agrégation thermique de l'OVA sous forme de larges agrégats modifie son allergénicité lors des deux phases de la réaction allergique (Chapitre 3), nous avons étudié comment la façon dont une protéine s'agrège peut moduler son potentiel allergénique. Nous avons pour cela comparé chez la souris l'allergénicité des agrégats formés dans des conditions électrostatiques opposées, des petits agrégats d'environ 50 nm et de gros agrégats d'environ 65 µm.

Nous avons ainsi montré que les symptômes après provocation orale et la dégranulation des RBL avec l'OVA native varient en fonction de l'agrégat utilisé pour la sensibilisation et que la production d'IgE est significativement plus faible pour les petits agrégats. Ces résultats montrent que les petits agrégats formés dans des conditions électrostatiques de répulsion montrent un potentiel allergénique plus faible que les gros agrégats formés dans des conditions électrostatiques non-répulsives. De plus, la capacité de liaison des agrégats aux IgE produites lors de la sensibilisation varie en fonction de la forme sensibilisante. Ce travail démontre que la structure des

aliments module la réponse immunitaire pendant la phase de sensibilisation avec des conséquences sur la phase de déclenchement de la réaction allergique.

Les deux études réalisées *in vivo* utilisaient un protocole de sensibilisation des souris par voie intrapéritonéale qui met directement en contact l'allergène et le système immunitaire. Les étapes de digestion et de passage de la barrière intestinale ne sont pas prises en compte dans ces protocoles or la littérature indique qu'elles peuvent moduler l'allergénicité de l'OVA et sont modifiées par les traitements thermiques. Pour aller plus loin dans la compréhension des modifications du potentiel allergénique par l'agrégation, nous avons entrepris l'évaluation par un test RBL de la capacité antigénique de la forme native et des agrégats après digestion *in vitro* ou passage *ex vivo* de la barrière intestinale. Le Chapitre 5 regroupe les premiers résultats obtenus.



# **Chapitre 5 – Effet de la digestion ou du passage sur la capacité antigénique de l’ovalbumine native ou agrégée**

Basé sur la publication suivante

Claude, M., Lupi, R., Picariello, G., Rogniaux, H., Ménard S., Larré, C., Brossard, C., Denery-Papini, S. Degranulation ability of native and aggregated ovalbumin after in vitro simulated digestion or transcytosis. (En rédaction, résultats préliminaires)



Les symptômes de l'allergie alimentaire peuvent se produire dans les minutes après ingestion de l'aliment. Mais le degré de digestion qui entraîne une diminution ou une incapacité à induire la réaction allergique n'est pas connu. Ainsi, aucun protocole de digestion n'est validé pour l'évaluation de l'allergénicité.

Nous avons testé dans cette étude deux protocoles de digestion dans deux laboratoires. Le premier protocole comprenait une étape de digestion gastrique et duodénale dont les paramètres étaient semblables à ceux déjà réalisés sur les agrégats (Nyemb et al., 2014a). Le deuxième protocole, plus complet, considérait l'influence potentielle de toutes les enzymes en prenant en compte, la carboxypeptidase, l'élastase et les BBM. Ces deux protocoles ayant été réalisés dans des laboratoires différents, une première caractérisation des digestats a été réalisée par des méthodes différentes disponibles dans chacun des laboratoires. En priorité, l'aptitude à la dégranulation de tous les digestats a été mesurée par une méthode commune.

Dans un premier temps, afin d'évaluer l'effet de chaque étape, nous avons pris la décision de travailler sur la digestion et le passage séparément. Le passage a donc été réalisé sur les trois formes d'OVA non digérées sur des fragments de jéjunum de souris sans plaque de Peyer et sur les plaques de Peyer.

Les résultats présentés ici sont des résultats préliminaires qui nécessitent d'être complétés mais ils sont présentés dans ce manuscrit sous un format d'article scientifique qui nécessitera d'être modifié pour publication.

## **1. Introduction**

Food allergies affect between 2% and 10% of worldwide population and the prevalence increased over the past years (Prescott et al., 2013; Sicherer and Sampson, 2010). The consumption of processed food also increased in past decades and food processing, depending on the allergen, can enhance, decrease or increase the allergenic potential.

Although resistance to digestion was disputed for allergic risk assessment (Fu et al., 2002), food allergens require to be at least partly resistant to digestion and to be absorbed in an amount sufficient to activate immune system (Bannon, 2004; Scheurer et al., 2015).. Anyway, antigenicity of food antigens after digestion and intestinal

absorption and how food processing affects these steps remains to be further understood (Moreno, 2007).

Hen's egg is one of the most common food responsible for allergy in children with a prevalence estimated to 1 to 2% in Europe (Xepapadaki et al., 2016). Eggs, present in a wide range of products, are consumed most of the time after heating which could modify the structure of protein and thus change the allergenicity. Some children reacted to both heated and raw eggs whereas the majority tolerated extensively cooked eggs (Lemon-Mulé et al., 2008; Leonard et al., 2015).

Ovalbumin (OVA), a major allergen of eggs is, with ovomucoid, the protein mostly studied when evaluating the link between thermal treatment and allergenicity. Heating OVA at 100°C for 30 min (Martos et al., 2011) or at 90°C for 15 min increased its digestibility whereas a treatment at lower temperature (65°C for 30 min) had no impact (Jiménez-Saiz et al., 2011). In parallel, it was shown that the digestion modified the antigenicity of heated OVA by decreasing the basophil activation ability (Martos et al., 2011), and the human IgE-binding or IgG-binding (Jiménez-Saiz et al., 2011; Joo and Kato, 2006).

OVA is prone to aggregate upon heating and depending on physicochemical conditions, aggregates with various morphologies are obtained (Nicolai and Durand, 2013). OVA aggregation and the structure of aggregates were shown to modulate the digestibility and the nature of released peptides (Nyemb et al., 2014a). Thus small linear aggregates formed at pH 9, the natural pH of egg white, were more susceptible to digestion than large spherical aggregates formed at pH5, pH near the OVA isoelectric point and pH of many processed foods, and both aggregates were more susceptible than the native form. Our previous work showed that aggregation changed the sensitization and the elicitation ability in a mouse model (Claude et al., 2016) but data dealing with antigenicity changes during digestion of such aggregated structures compared to native OVA were not investigated.

Raw OVA can at least partly escape to digestion and intact OVA was found in the blood after ingestion both in mice (Wakabayashi et al., 2006) and in human (Husby et al., 1985). The absorption of OVA *in vivo* decreased after heating at 100°C for 5 min, whereas heating at a lower temperature (80°C for 15 min) didn't change the transport across the intestinal barrier compared to the native form (Watanabe et al., 2014). It

was reported that heating at 100°C for 15 or 30 min decreased OVA antigenicity after transport *in vivo* and *in vitro* (Joo and Kato, 2006; Martos et al., 2011). No data were available in these studies on the type of OVA aggregates in link with these activities.

This study aimed to evaluate the impact of aggregation morphology on antigenicity during digestion or after intestinal transport. Antigenicity of two types of OVA aggregates (small and large) were compared to the native form after several steps of digestion and transport through jejunum or Peyer's patches. Antigenicity was assessed using a basophil activation assay with sera from egg allergic children.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Protein preparation and characterization OVA aggregates**

OVA purified from egg white was kindly provided by INRA, UMR 1253 "Science et Technologie du Lait et de l'œuf" (Rennes, France). Non-aggregated OVA solution (N) was prepared in PBS (pH 7.6, 0.15 M NaCl). OVA solutions prepared at 15 mg/ml in 0.8 M NaCl, pH 5 for A-L or in 0.03 M NaCl, pH 9 for A-s and were heated for 6 h at 80°C in a controlled temperature water bath to form aggregates as previously described (Nyemb et al., 2014a). The size distributions of A-L and A-s were determined by laser light scattering using a Mastersizer MS 3002 (Malvern instruments, UK) or by dynamic light scattering on a Zetasizer (Malvern instruments, UK). Measurements were collected in triplicate from three aliquots of each preparation. The aggregated samples were diluted with NaCl 2 M or Milli-Q water and PBS to adjust the solution to pH 7.6, 0.15 M NaCl and to the required concentration for the subsequent experiments.

### **2.2. Sera from egg-allergic patients**

Sera from egg-allergic children with OVA-specific IgE (n=100) were selected for this study. The sera belong to the registered sera collection implemented through clinical studies with the informed consent of patients or their caregivers (DC-2008-809) and had been stored at -80°C until use.

### **2.3. Measurement of IgE-binding to native and aggregated OVA in patient by F-ELISA**

Allergen-specific IgE were determined using indirect fluorimetric-ELISA as previously described (Claude et al., 2016). All measurements were run in triplicates. Specific IgE-bindings were expressed by the ratios of mean fluorescence intensities measured with N, A-L or A-s (IF) on mean fluorescence intensity measured with PBS (IF<sub>0</sub>).

#### **2.4. *In vitro* digestion**

Static digestions were performed with a short simplified protocol and a more complete longer protocol.

##### **2.4.1. Simplified gastroduodenal digestion**

The simplified protocol simulated short gastric (10 min) and intestinal (10 min) digestion in the adult human and was based on that used by Nyemb et al. (2014). For gastric digestion, porcine gastric mucosa pepsin (Sigma, with a determined activity of 4293 U/mg of protein using hemoglobin as a substrate) diluted in simulated gastric fluid (SGF; 0.15M solution NaCl adjusted at pH 2.5) was added at a concentration of 182 U pepsin per mg OVA to OVA samples (concentration of 1 mg/ml, pH 2.5, 37°C) for 10 min under shearing. Pepsin was then irreversibly inactivated by raising the pH to 8 with 1M NaOH.

For intestinal digestion, the pH was adjusted at 6.5 with 0.5 M bis-Tris and chymotrypsin (Sigma-Aldrich, with an activity of 56 U/mg after activation by trypsin) and trypsin (Sigma, with an activity of 10,700 U/mg) from bovine pancreas diluted in simulated intestinal fluid (SIF; 0.15M solution NaCl adjusted at pH 6.5) were added at a concentration of 0.4 U and 34.4 U per mg OVA respectively for 10 min at 37°C under shearing. Proteolysis was stopped by heating samples in boiling water for 1.30 minutes. Each digestion was performed in duplicate and digests were stored at -20°C until use.

##### **2.4.2. Complete digestion**

The complete digestion model involved a buccal phase, a gastric and an intestinal digestion and a step of simulated jejunal digestion using intestinal brush border membrane (BBM) enzymes. The protocol was based on the standardized model

developed in the framework of the Infogest COST Action (Minekus et al., 2014). Simulated salivary fluid (SSF), SGF and SIF were prepared according to the harmonized protocol. OVA solutions at concentration of 1 mg/ml were mixed with SSF to the ratio 50:50 v/v. The oral digest was then mixed with SGF (50:50 v/v) containing phospholipids liposomes prepared with soybean lecithin at 0.17 mM final concentration and pepsin (Sigma, with a determined activity of 3200 U/mg of protein using hemoglobin as a substrate) at 182 U pepsin per mg OVA. The pH of the digesta was adjusted to 3 with HCl 1 M and the incubation was carried out for 30 min in a shaking incubator at 37°C. The reaction was stopped by raising the pH to 7. Gastric digest was added (50:50 v/v) to SIF containing trypsin from porcine pancreas (Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -chymotrypsin from bovine pancreas (Sigma-Aldrich), elastase from porcine pancreas (Sigma-Aldrich), carboxypeptidase A from bovine pancreas (Boehringer Mannheim). Each sample was incubated for 30 min in a shaking incubator at 37°C. The reaction was stopped by heating samples in boiling water for 5 minutes for samples used next with BBM or by adding enzymes inhibitor (Pefabloc, Fluka).

BBM enzymes were prepared from pig jejunum and characterized according to Picariello et al. (2015). The peptidase activity was determined at 1020  $\mu$ U/ $\mu$ L. Samples from gastro-duodenal digestion were incubated with BBM enzymes at ratio of 1:70 w/v for 2h. The reaction was stopped by heating samples in boiling water for 5 minutes.

## **2.5. Peptides identification by LC-MS/MS**

Nanoscale capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of the digested samples were performed using an Ultimate U3000 RSLC system (Dionex) coupled with an LTQ-Orbitrap VELOS mass spectrometer (Thermo Fisher, San Jose, USA). The samples were filtered using Empore C8 extraction disks (3M, St Paul, MN, USA) before chromatographic separation on a reverse-phase capillary column (Acclaim® PepMap™ C18 2 $\mu$ m 100 A, 75  $\mu$ m i.d. x 15 cm long, Thermo-Fisher Scientific/Dionex) at a flow rate of 300nl/min using the following mobile phases: (A) 99.9% water, 0.1% formic acid; (B) 90% ACN, 0.08% formic acid. Mass data acquisitions were performed using Xcalibur 2.1 software. Full MS scans were acquired at 30 000 resolution (FWMH) using the Orbitrap analyzer ( $m/z$  of 300–2000) while the CID

spectra were recorded in the linear LTQ for the eight most intense ions and then excluded from the fragmentation for 20s.

Three runs were performed for each duplicate of short simplified digestion. Raw data collected during LC-MS/MS analyses were processed into mascot generic format files and further searched against Ovalbumin P01012 (*Gallus Gallus*) using the X!Tandem Pipeline (version 3.4.0 Elastine Durcie) available at <http://pappso.inra.fr>. Database search parameters were specified as follow: an unspecific enzyme cleavage; precursor mass and fragment mass tolerance were set at 3.0 ppm and 0.5 Da, respectively; potential modifications of acetylation in N-ter of the protein, phosphorylation of serine, deamidation of glutamine and asparagine and methionine oxidation. Peptides identified with a minimum of 5 ions were considered as valid when they had an E-value below 0.001 and were found at least 6 times in the data set.

## **2.6. RP-HPLC**

The extent of complete digestion was evaluated by RP-HPLC using an HP1100 modular system (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with a C18 RP column, 2.0 mm id × 250 mm, 4 µm particle diameter (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Separation was carried out with a 5-60% gradient of solvent B over 60 min after 5 min of elution at 5% B. Solvent A was 0.01% of TFA in water ; solvent B was 0.1% TFA in acetonitrile. The column was equilibrated at 5% B. The column effluent was monitored by UV detection (220 nm).

## **2.7. Ussing Chambers**

Adult Balb/c female mice, from the centre d'Elevage René Janvier (Saint Berthevin, France) were killed by cervical dislocation under anesthesia. Pieces of jejunum (care was taken to avoid tissue containing Peyer's patches) or Peyer's patches were taken and mounted in Ussing chambers. The chamber opening exposed 0.1 cm<sup>2</sup> of surface area to 2 ml of circulating oxygenated Ussing buffer (DMEM containing 1.2% of glutamine, 3.2% of NaHCO<sub>3</sub>, 2.6% of sterile H<sub>2</sub>O and 0.1% of SVF) at 37°C. The OVA sample and FITC-sulfonic acid were added on the apical side of the Ussing chambers at the concentration of 2 mg/ml and 100 µg/ml respectively. Controls were performed with no protein added. After 2h30, the contents of apical and basal compartments

were collected and stored at -20°C until use. The paracellular permeability was assayed by calculating the final concentration of FITC-sulfonic acid in the basal compartment by fluorimetry. The fluorescence was measured at 516 nm (excitation 485 nm) using Synergy, HT reader (Bio-tek instruments, Colmar, France)

### **2.8. Activation of Rat basophil leukemia (RBL) cells by native and aggregated OVA in the presence of patient sera**

Eight out of 100 patients' sera selected based on their total and OVA-specific IgE levels and degranulation capacity with N were pooled. G418-selected RBL-SX38 cells expressing human FcεRI, kindly provided by Pr Kinet (Harvard Medical School, New York, USA), were seeded at  $1.2 \times 10^5$  cells/ml and cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The pool of sera, heated for 45 min at 56°C in the presence of 4 M glucose to reduce cytotoxicity (Binaghi and Demeulemester, 1983) and diluted 1:100 was added to the cells for 48 h. IgE-sensitized cells were stimulated in triplicate for 45 min at 37°C by N, A-s or A-L diluted from  $2 \times 10^{-3}$  to  $2 \times 10^3$  ng/ml for undigested samples and digests and from 1:50 to 1:400 (v:v) for basal samples from Ussing chambers in Tyrode buffer containing 50% deuterium oxide (D<sub>2</sub>O, Sigma) (Blanc et al., 2009).

β-hexosaminidase release was measured as described previously (Bodinier et al., 2008). For each serum, the maximum release by IgE was obtained with unstimulated cells and specific release after activation with human anti-IgE (Fc Region, Le27-NBS01). The percentage of degranulation was expressed by the ratio between the sample value and specific value, both corrected by the spontaneous release.

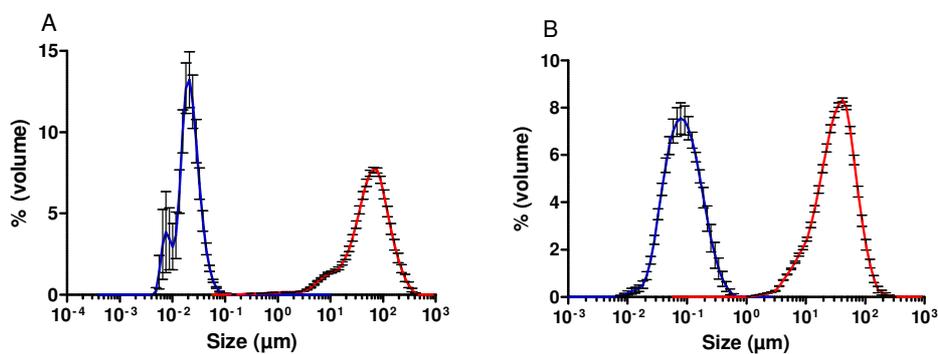
### **2.9. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.02 for Windows software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and *p* values below 0.05 were considered significant. Data are expressed as the mean ± SEM. Data per group were first analyzed for normality using D'Agostino and Pearson's omnibus normality test; next, differences between means/medians were analyzed by ANOVA/Kruskal-Wallis or 2 way ANOVA/Friedman with subsequent Bonferonni/Dunn's post-tests (more than 2 groups) or unpaired t-test.

### 3. Results

#### 3.1. Visual observation of the macrostructure and characterization of the aggregated samples

Two sets of aggregated samples were prepared for the digestion studies and for the protocol in Ussing chamber. The visual observation of the macrostructure showed for both preparations that the small aggregates displayed a translucent dispersion whereas the large aggregates displayed an opaque one. The particle size distributions of the samples were determined by DLS and LLS (Figure 40).



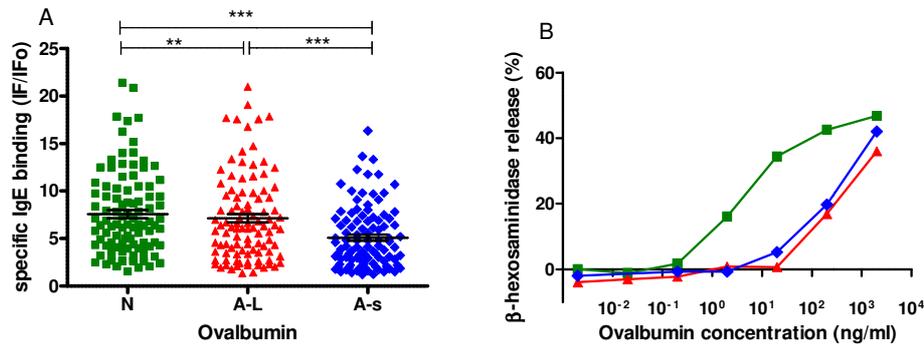
**Figure 40:** Particle size distributions of the ovalbumin (OVA) aggregates formed by heating an OVA solution at 80°C for 6h under different physicochemical conditions used for digestion (A) and for Ussing chambers (B) (mean  $\pm$  SEM; n=9). Small aggregates formed at pH9, NaCl 0.03 M measured by dynamic light scattering (left in blue), and large aggregates formed at pH 5, NaCl 0.8M measure by laser light scattering (right in red).

The mean particle sizes were  $49.7 \pm 3.5$  nm, with a distribution size between 5 and 80 nm, for A-s and  $66.4 \pm 2.9$  μm, with a distribution size between 3 and 300 μm, for A-L samples used in the digestion protocols and  $74.9 \pm 4.0$  nm, with a distribution size between 8 and 500 nm, for A-s and  $43.0 \pm 1.3$  μm, with a distribution size between 2 and 200 μm, for A-L samples used in Ussing chambers.

#### 3.2. IgE-binding to native and OVA aggregates in sera from egg allergic patients

IgE to N, A-s and A-L were compared by ELISA using 100 sera from egg-allergic children. As shown in figure 41A, A-s exhibited reduced IgE binding capacities compared to N and A-L as illustrated by the ratios of fluorescence intensities  $IF/IF_0$ , which were set at  $7.6 \pm 0.4$ ,  $7.1 \pm 0.5$  and  $5.1 \pm 0.3$  for N, A-L and A-s, respectively. For 87 sera, IgE-binding to A-L and N were similar (less than 25% variation) whereas they were only 33 for A-s and N.

RBL-SX38 activation assay using N, A-L or A-s as an antigen was performed with a pool of 8 out of the sera from egg-allergic children sensitized to OVA (Figure 41B).



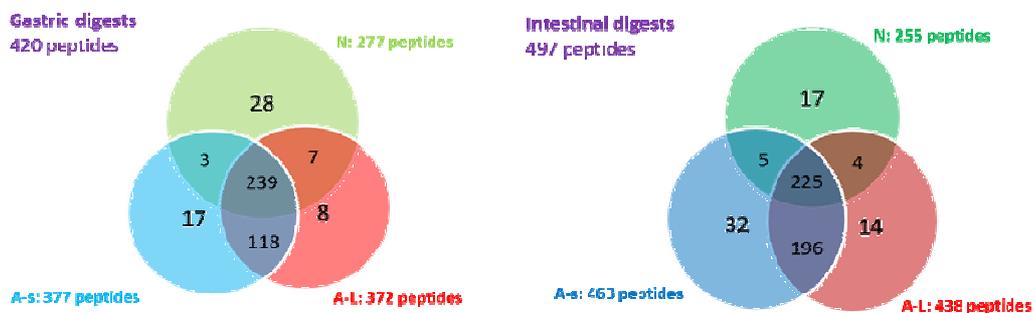
**Figure 41:** IgE-binding and basophil degranulation ability of native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates of ovalbumin (A-s). Human IgE binding to N, A-L and A-s was detected with 100 sera from egg allergic children by indirect ELISA assay (A). Results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured to N, A-L or A-s (IF) on fluorescence intensity measured to PBS (IF<sub>0</sub>). Bars stand for mean ± SEM and results of statistical comparison for paired data by Friedman test and Dunn's post-test (\*\*\*) p < 0.001, \*\* p < 0.01). (B) Basophil activation assay with the pool of 8 human sera. RBL-SX38 cells were stimulated with N (green), A-s (blue) or A-L (red) at concentration from 2.10<sup>-3</sup> to 2.10<sup>3</sup> ng/ml.

N, A-L or A-s induced the degranulation of basophils but both aggregated forms resulted in a significantly reduced degranulation ability compared to the native form. Indeed, the concentration corresponding to 25% of degranulation was about 3.2 ng/ml for N, 350 ng/ml for A-s and 510 ng/ml for A-L.

### 3.3. Characterization of the digests

#### 3.3.1. Peptidomic analysis of the composition of digests from the simplified digestion protocol

Peptides released by proteolysis of N, A-L and A-s in the simplified digestion protocol were evaluated by mass spectrometry (Figure 42).



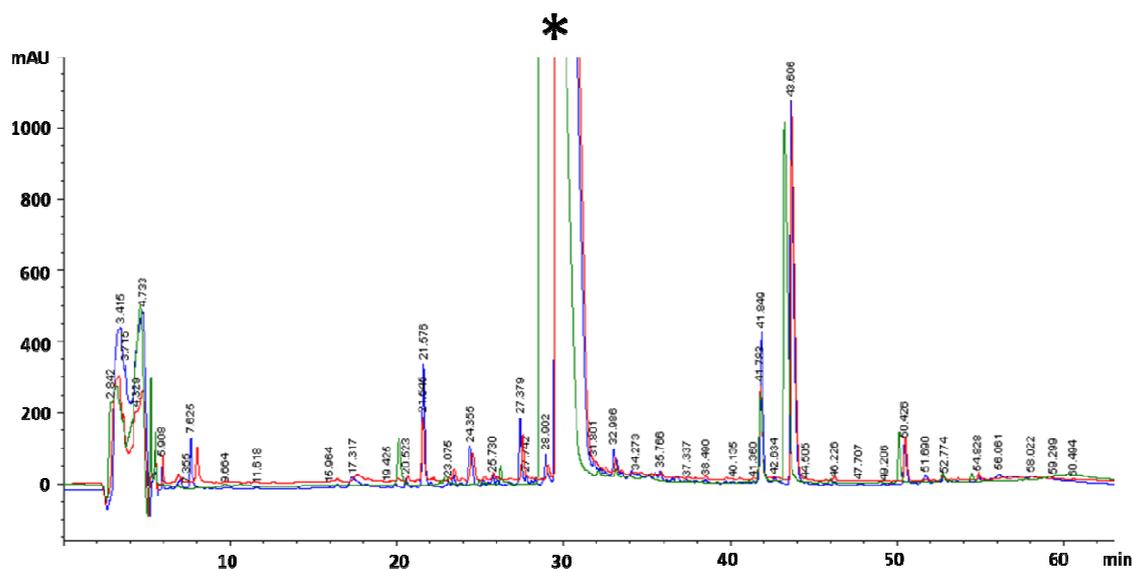
**Figure 42:** Venn diagram showing the numbers of peptides specific or common to native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates (A-s) after the gastric phase (left) or intestinal phase (right) of the simplified digestion protocol.

A total of 532 unique peptides corresponding to OVA P01012 sequence were identified in the 36 runs. In both gastric and intestinal samples, the number of identified peptides was higher for the aggregates than for the native OVA with no large difference observed between the aggregates.

The majority of peptides identified were common to three forms, the aggregates then shared a larger number of peptides than with native form.

### 3.3.2. Comparisons of the digests at the end of the complete digestion

The extent of proteolysis at the end of the complex digestion was evaluated by RP-HPLC (Figure 43). Smaller peptides are observed for the aggregates indicating that the aggregates were more susceptible to digestion. For example, the peaks at 21, 24 or 27 min were found only for the aggregates and the peaks at 20 and 26 min were mainly found for the native form. Other fragments (e.g. 44 and 50 min) were common to the three forms.



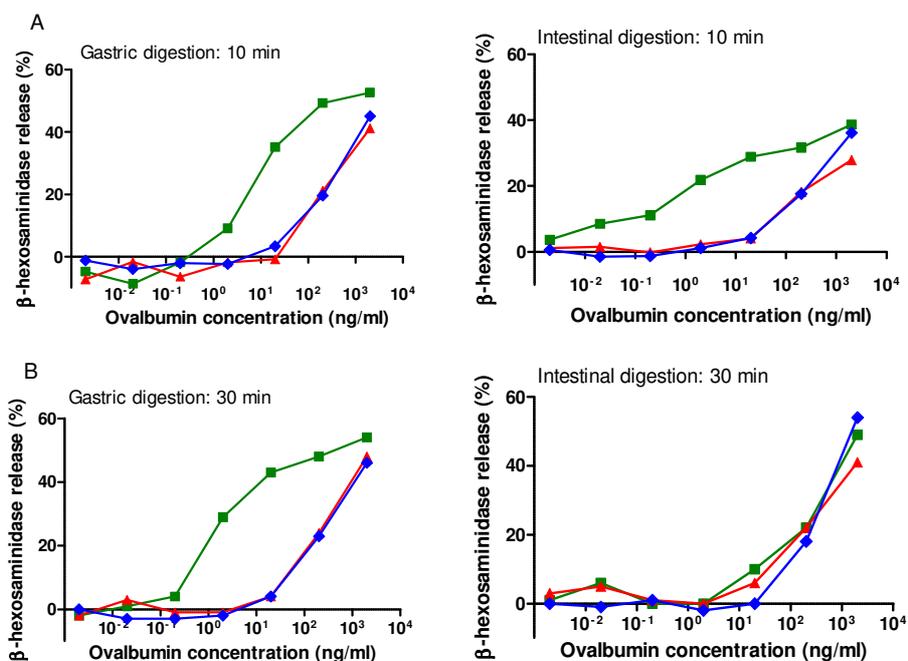
**Figure 43:** RP-HPLC Chromatogram of final digest obtained using the complete *in vitro* model with native ovalbumin (N) in green, large aggregates of ovalbumin (A-L) in red and small aggregates (A-s) in blue. \*enzyme inhibitor

### 3.4. Impact of the digestion on the ability of native and aggregated OVA to induce the RBL-SX38 cell activation

RBL-SX38 activation assay was performed using N, A-L or A-s at the different steps of digestion as the antigen with the pool of 8 sera from egg-allergic children

#### 3.4.1. Comparison of the degranulation ability of native and aggregated OVA after gastric and intestinal digestion in the simplified and complete protocols

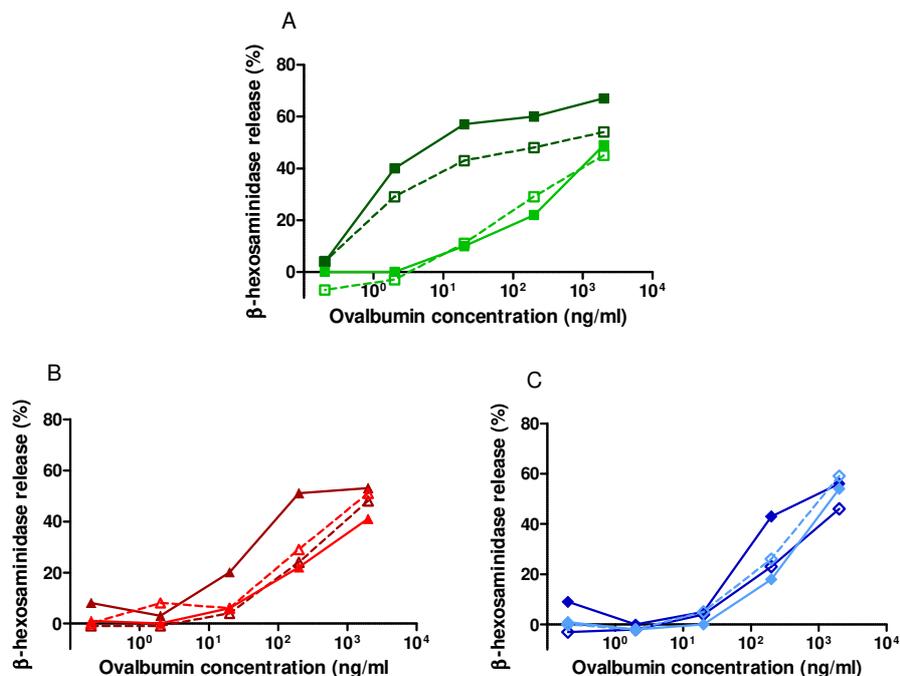
Both after gastric or intestinal digestion with the simplified protocol, N kept a higher capacity than the aggregates as before digestion (Figure 44A). After the intestinal digestion, degranulation curve with N was however flatter than before and after gastric digestion: the maximum of degranulation decreased and lower concentrations appeared to induce the degranulation. N also maintained a higher basophil activation capacity than the aggregates after gastric digestion with the complete protocol but after intestinal digestion, N, A-L and A-s exhibited similar degranulation curves (Figure 44B). As long as compared degranulation abilities of the OVA forms are considered, both digestion protocols gave similar results at the end of the gastric phase but not at the end of the intestinal phase.



**Figure 44:** Comparison of the basophil activation abilities of native ovalbumin (N, green), large aggregates of ovalbumin (A-L, red) and small aggregates of ovalbumin (A-s, blue) after the gastric (left) and intestinal (right) digestion steps using the simplified (A) and complete (B) digestion protocols.

### 3.4.2. Impact of the digestion steps with the complete protocol on the degranulation ability of native and aggregated OVA

Comparing degranulation abilities at different digestion steps in the complete *in vitro* model for each form of OVA clearly showed that the degranulation ability of N was more affected than those of the aggregates (Figure 45).



**Figure 45:** Comparison of the basophil activation abilities of native ovalbumin (A), large aggregates of ovalbumin (B) and small aggregates of ovalbumin (C) before digestion (dark solid line) and after gastric (dark dotted line), intestinal (light solid line) and BBM (light dotted line) digestion steps using the complete digestion model.

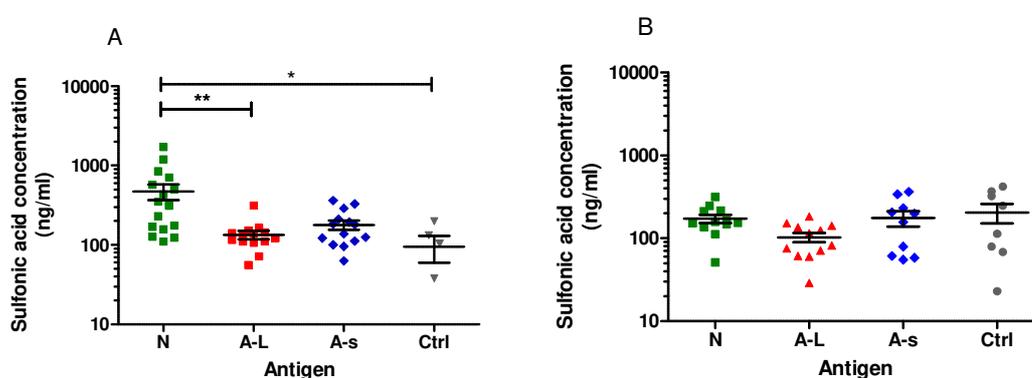
The gastric digestion weakly modified the degranulation curve with N but the intestinal digestion largely decreased the degranulation percentage for a fixed OVA concentration with not further change with BBM digestion (Figure 45A). The degranulation abilities of both aggregates were mainly affected during the gastric phase with no further significant difference after intestinal or BBM digestions (Figure 45B-C).

These results showed that the abilities to activate basophils of native and aggregated OVA were differently affected by the digestion process but in any case, N, A-L and A-S always maintained some ability whatever the digestion protocol and the digestion step.

### 3.5. Transport through the intestinal barrier and degranulation ability after transcytosis

#### 3.5.1. Paracellular permeability

The paracellular permeability of intestinal fragments from mice (Jejunum and Peyer's patches) was evaluated by the final concentration of FITC-sulfonic acid in the basal compartment of Ussing chambers (Figure 46). N, but not the aggregates, increased the paracellular permeability of the jejunal fragments. No significant difference was observed for Peyer's patches whatever the samples.

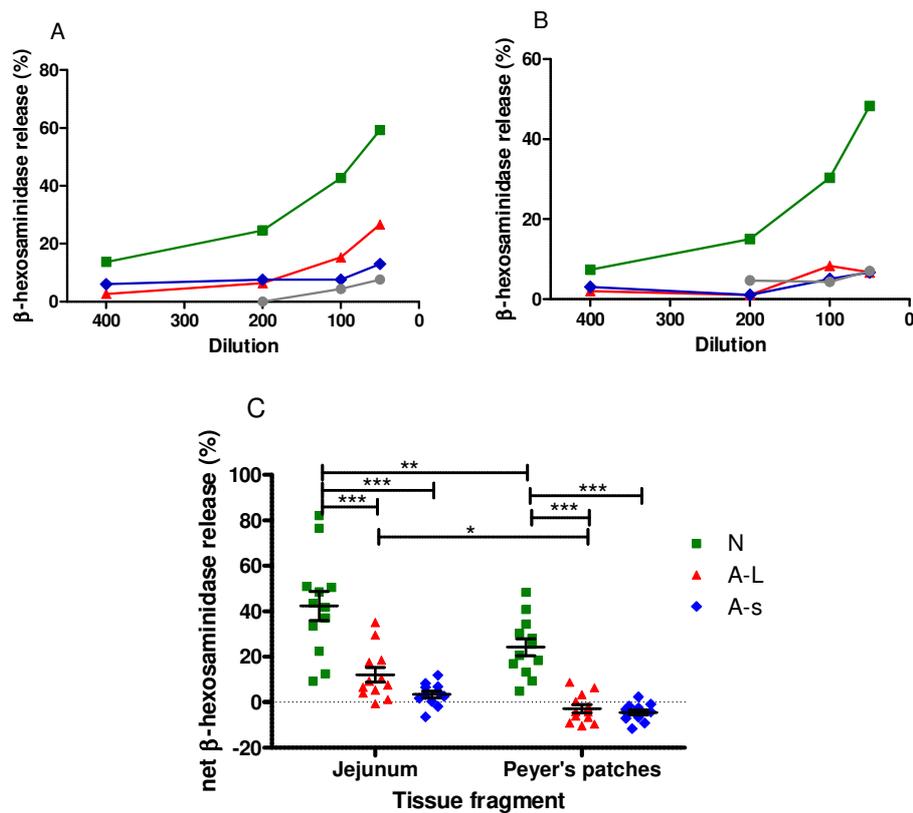


**Figure 46:** Paracellular permeability assessed from the final concentration of FITC-sulfonic acid in the basal compartment of Ussing chambers mounted with jejunum (A) or Peyer's patches (B) in the presence of native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates of ovalbumin (A-s) or no protein (Ctrl) for 2h30. Bars stand for mean  $\pm$  SEM and data were compared using an ANOVA test ( $p < 0.001$  in A,  $p > 0.05$  in B) and Bonferonni post-test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ )

#### 3.5.2. RBL-SX38 cell activation by native and aggregated OVA after transcytosis by jejunum or Peyer's patches in presence of patient IgE

RBL-SX38 activation assay using the 12 basal samples of Ussing chambers after apical incubation with N, A-L or A-s as an antigen was performed with the pool of 8 sera from egg-allergic children sensitized to OVA (Figure 47).

After transcytosis through both jejunum and Peyer's patches, N maintained a significant higher basophil activation capacity than the aggregates. The degranulation with A-L after transcytosis through the jejunum tended to be higher than with A-s (Figure 47A-C). After transcytosis by Peyer's patches both aggregates didn't induce degranulation (Figure 47B-C). For N and A-L, transcytosis by jejunum induced a significant higher degranulation ability compared to transcytosis by Peyer's patches (Figure 47C).



**Figure 47:** Basophil activation abilities of native ovalbumin (N), large aggregates of ovalbumin (A-L) and small aggregates of ovalbumin (A-s) after transcytosis through jejunum or Peyer's patches. Degranulation curve for one set of samples at 4 dilutions with N (green), A-L (red) or A-s (blue) and control without protein (gray) after transcytosis through jejunum (A) and Peyer's patches (B). Net percentages of degranulation at the dilution 1:50 for N, A-s and A-L after transcytosis through jejunum or Peyer's patches (C). Individual data corrected by subtracting mean of controls, means  $\pm$  SEM and results of statistical tests (2-way ANOVA and Bonferroni post-tests, \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ )

#### 4. Discussion

To be allergenic, a protein has to reach the immune system in a form able to activate the immune cells. However, there is still limited information that relates allergenicity of heated protein after digestion or transcytosis. Thus, this work studied whether aggregation induced by heating OVA and how OVA aggregated could modify antigenicity after hydrolysis or transcytosis.

Aggregated samples were obtained as described previously (Nyemb et al., 2014a) by heating OVA under specific conditions to generate large aggregates (pH5 – 0.8M) or small aggregates (pH9 – 0.03M). Two sets of samples were prepared, one for the digestion studies and the other one for transcytosis studies. Aggregates size distribution somehow differed due to a larger size distribution for the small aggregates

of the second set. However, these samples displayed the same order of magnitude in size (a few ten nanometers for small aggregates and a few ten micrometers for large aggregates) and similar macrostructure (translucent solution for small aggregates and opaque solution for large aggregates) than previously described (Nyemb et al., 2014a).

To evaluate whether digestion or transport through the intestinal barrier would affect OVA antigenicity, we selected human sera to constitute a pool to be used in the degranulation test. For this purpose, we first studied IgE-binding of sera from a large population of egg-allergic children and we showed that the small aggregates displayed reduced IgE-binding capacities compared to the native form and the large aggregates: how OVA aggregated influenced more the IgE-binding ability than aggregation itself. Results differed for the degranulation ability: both aggregates had a reduced degranulation ability compared to the native form for each of the 8 selected positive sera (and for the pool made of them) although they had various IgE-binding to native and aggregated OVA.

Even if characterizing the resistance to digestion is not sufficient to predict the allergenic potential (Moreno, 2007), it is known that this resistance changes with thermal aggregation and IgE-binding was generally reported to be more decreased after digestion of heated than raw allergens as for example for OVA heated at 90°C for 15 min (Jiménez-Saiz et al., 2011). We evaluated how digestion changed the antigenic activity using the degranulation test with the pool of human sera. Whatever the digestion protocol and the digestion step, N, A-L and A-s always maintained some ability to induce the basophils degranulation. Martos et al. (2011) found that digested heated OVA (30 min in boiling bath) had a lower ability to activate human basophils than digested native OVA ; however extensively digested samples (1 hour pepsin and 2 hours intestinal digestion) had been there tested. Depending on the step and the digestion duration, the degranulation ability of the three OVA forms was unchanged or decreased. The peptidomic analysis of the digests from the simplified protocol showed that, since the short-time gastric digestion (10 min), beside a set of peptides common to the 3 forms, the other peptides differed mainly between aggregates and the native form as previously reported by Nyemb et al. (2014) at the end of the intestinal phase. Interestingly, ability of native OVA, which was the less susceptible to digestion, was

more affected by 30 min of gastro-intestinal digestion compared to the aggregates that displayed almost the same degranulation ability as before digestion although they were more digested. This confirms the absence of a straightforward link between digestibility and the ability to induce basophils degranulation: digestion susceptibility didn't mean that no antigenic peptides were still present. Our data also suggested that native OVA contained some structural structures involved in its degranulation ability mainly resistant to the gastric digestion but sensible to the duodenal enzymes especially in the complete protocol. Finally, BBM enzymes appeared to have no significant effect on the degranulation ability.

Beyond evaluating the antigenicity after digestion, it's also important to consider transport across epithelial barrier. We chose to study the degranulation ability after transcytosis using non-digested samples because the sensitivity of the RBL test was maximum before digestion and intact OVA was found in blood after ingestion both in mice (Wakabayashi et al., 2006) and in human (Husby et al., 1985). For the first time to our knowledge, we showed that native OVA increased the paracellular jejunal permeability whereas aggregates did not. The native OVA kept a higher ability than the aggregates to activate the basophils after transport across both jejunum and Peyer's patches. This result is in line with the study of Martos et al. (2011) who found a lower degranulation ability for heated OVA than native OVA after transcytosis through Caco-2 cells. Whether the higher degranulation ability of native OVA after transport through the jejunum could be explained by a higher transport due to the increase of paracellular permeability remains to be assessed. Interestingly, we found that the large aggregates were able to induce a higher degranulation after transcytosis by jejunum than the small aggregates. By Peyer's patches, both aggregates lost their degranulation ability. These results conflicted with results obtained on milk allergens by Roth-Walter et al. (2008) who found that the aggregates were taken up by Peyer's patches and native allergens by epithelial cells. However, no transport study was there performed. Indeed our data indicates an ability to activate the basophils without any information about either the quantity of allergen present in the basal compartment or its nature. To go further in the comprehension of the results, this is under investigation. All together, these data showed that aggregation but also how OVA aggregates are

important factors to consider when evaluating transport through the intestinal barrier and are tissue dependent.

Further investigations are needed to complete these preliminary results information about the effect of OVA aggregation on its allergenicity after digestion or after transport across intestinal barrier. Identification of the OVA entities responsible for activation of basophils before and after digestion and transport through epithelial barrier would be important. Comparison of the peptides identified along the digestion to those resistant to human digestion reported by Benedé et al. (2014) will allow to give more information about allergenicity.

To sum up, this study highlights some features between the aggregation of OVA and its antigenicity considering digestion or transport across the intestinal barrier. We showed that all forms of OVA maintained some ability to induce degranulation after short-time digestion. In these conditions, only the gastric digestion had a low effect on the ability of aggregates to induce basophils degranulation whereas complete duodenal digestion had the largest effect on the ability of native OVA. BBM digestion did not show any effect. How OVA aggregated modified its degranulation ability after transcytosis through the jejunum but both aggregates lost their degranulation ability after passage through the Peyer's patches whereas native OVA kept it. An increased jejunal paracellular permeability was exhibited with native OVA. These results might be relevant to the sensitization capacity and required further analyses.

## **5. Bilan de l'étude de la capacité antigénique de l'ovalbumine native et sous forme agrégée après digestion ou passage de la barrière intestinale**

Pour compléter les résultats obtenus chez la souris sur les phases de sensibilisation et déclenchement de la réaction allergique (Chapitres 3 et 4), nous avons étudié, à l'aide d'un test RBL, l'antigénicité de l'OVA native et des deux agrégats après digestion *in vitro* ou passage *ex vivo* en chambres d'Ussing de la barrière intestinale

Dans ce test réalisé avec un pool de 8 sera de patients allergiques à l'œuf, avant digestion et transport, la capacité à induire la dégranulation des basophiles est plus

élevée pour la forme native que pour les deux agrégats qui présentent une capacité similaire.

Sur des temps courts de digestion, le potentiel d'activation des basophiles de la forme native s'est révélé plus sensible à la digestion duodénale que celui des agrégats bien que ces derniers présentent une susceptibilité à la digestion plus importante que la forme native. De plus, les BBM n'ont pas montré d'effet sur la capacité antigénique. Ces premiers résultats nécessitent d'être complétés notamment en caractérisant les niveaux de digestion (degrés d'hydrolyse) ou en analysant la quantité relative des peptides (en cours). Dans les conditions étudiées, toutes les formes d'OVA conservent cependant une capacité à induire la dégranulation des basophiles en fin de digestion.

Après passage de la barrière intestinale par le jéjunum ou les plaques de Peyer, la meilleure capacité antigénique de la forme native par rapport aux agrégats est conservée. Les deux agrégats perdent cette capacité après passage par les plaques de Peyer et seuls les larges agrégats induisent une dégranulation significative après passage par le jéjunum. Ces résultats préliminaires qui montrent un passage différencié selon la forme de l'OVA et le tissu nécessitent d'être complétés notamment par l'étude des milieux apicaux et la caractérisation des formes passées dans les milieux basaux avant de formuler des hypothèses sur les raisons et leur possible implication dans la phase de sensibilisation allergique.

# **Chapitre 6 - Discussion, conclusions et perspectives**



## 1. Discussion

Ce travail de thèse visait à mieux comprendre les liens entre l'agrégation thermique des protéines et l'allergénicité en comparant à l'OVA native, deux types d'agrégats sélectionnés pour leur taille et leur morphologie différentes. L'un des types d'agrégats est formé à pH9 proche du pH naturel du blanc d'œuf et en faible force ionique. Dans ces conditions, l'OVA est fortement chargée, les répulsions électrostatiques élevées limitent l'agrégation protéique ce qui conduit à de petits agrégats de type linéaire (Nyemb et al., 2014b). L'autre type d'agrégats est formé dans des conditions électrostatiques opposées à pH5, proche du point isoélectrique de l'OVA et de celui de nombreux produits alimentaires et plats cuisinés, et en force ionique élevée. Dans ces conditions, les répulsions électrostatiques minimales favorisent une agrégation protéique rapide et désordonnée, ce qui conduit à de gros agrégats. Nous avons évalué l'effet de l'agrégation et de la structure même des agrégats en considérant différents paramètres en lien avec l'allergénicité au cours des étapes de digestion, passage, sensibilisation ou déclenchement de la réaction allergique et en utilisant des approches techniques complémentaires *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo*.

### 1.1. Capacité de sensibilisation

Un modèle murin a été utilisé afin d'évaluer l'effet de l'agrégation sur la phase de sensibilisation caractérisée notamment par la production d'IgE. Ce modèle murin a été utilisé dans deux protocoles successifs et la répétabilité observée dans les concentrations d'Ig pour la forme native et les gros agrégats valide sa robustesse.

Ce modèle de sensibilisation par voie intrapéritonéale nous a permis de montrer un effet de l'agrégation et de la structure des agrégats sur cette phase de l'allergie, les principaux résultats sont synthétisés dans le Tableau 12.

Par rapport à une sensibilisation avec l'OVA native, la sensibilisation avec les larges agrégats ne modifie pas la quantité d'IgE spécifiques produites alors que la sensibilisation avec les petits agrégats la diminue, et la production d'IgG<sub>2a</sub> est augmentée pour les deux types d'agrégats étudiés par rapport à la forme native.

**Tableau 12** : Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats : A-L) par rapport à la forme native (N) sur la phase de sensibilisation

Conditions d'agrégation	Données structurales	Allergénicité	
pH 9/0.03 M	Agrégats 50nm (A-s)	<b>Réponse de type Th1:</b> - Production plus faible d'IgE - Production IgG <sub>2a</sub> plus élevée	Symptômes lors déclenchement avec OVA native : <b>Sensi N &gt; Sensi A-L &gt; Sensi A-s</b>
pH 5/0.8 M	Agrégats 56-65µm (A-L)	<b>Réponse de type Th1 et Th2:</b> - Production d'IgE équivalente - Production IgG <sub>2a</sub> plus élevée	

L'étude des populations cellulaires induites dans les ganglions et les plaques de Peyer ne permet pas d'observer de différences significatives mais les tendances vont dans le sens des résultats de dosage des immunoglobulines sériques spécifiques (Tableau 13). La sensibilisation avec les agrégats diminue l'induction des Th17 et augmente l'induction des Th1 et des Treg par rapport à la forme native. L'induction des Th17 tend à être plus élevée et celle Th1 plus faible lors de la sensibilisation avec les gros qu'avec les petits agrégats.

**Tableau 13** : Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats : A-L) par rapport à la forme native (N) sur les populations cellulaires induites au cours de la phase de sensibilisation

Population	Effet structure OVA
Th1	A-s > A-L > N
Th2	N = A-L = A-s
Th17	N > A-L > A-s
Treg	A-L = A-s > N

Les résultats obtenus sur la fréquence des lymphocytes Treg impliqués dans la tolérance nécessiteraient d'être complétés par le dosage des IgA, qui possèdent un effet immunomodulateurs. La quantité de sérum disponible ne nous a pas permis de réaliser ce dosage en plus de ceux déjà réalisés au niveau sanguin et le matériel biologique n'a pas été prélevé au cours des protocoles pour doser les IgA dans les fèces.

Les résultats obtenus sur l'effet de l'agrégation sur la phase de sensibilisation vont dans le même sens que ceux de la littérature, où il a été montré qu'une sensibilisation intrapéritonéale avec des formes cuites d'OVA induit une réponse de type Th1 par rapport à des formes non cuites (Golias et al., 2012) et que le profil cytokinique est modifié en faveur d'une réponse Th1 dans un modèle *ex vivo* d'activation des lymphocytes T (Rupa et al., 2015). Ils complètent aussi ces résultats en mettant en

évidence que la structure même des agrégats intervient dans la modulation du profil de sensibilisation. Les résultats des populations Th au niveau intestinal et des immunoglobulines sériques indiquent qu’au cours de la phase de sensibilisation des réponses immunitaires adaptatives/spécifiques différentes sont induites en fonction de la structure de l’OVA: une réponse pro-Th2 pour la forme native, une réponse à la fois pro-Th1/pro-Th2 pour des gros agrégats de type sphérique agglomérée et une réponse pro-Th1 pour des petits agrégats de type linéaire. Comprendre comment ces variations de structure de l’ovalbumine modulent ainsi la réponse immunitaire spécifique nécessiterait d’étudier l’activation spécifique des lymphocytes T dans ce modèle et notamment le rôle joué par les cellules présentatrices d’antigène (cellules dendritiques) dans cette modulation.

Ainsi, si toutes les formes d’OVA sont sensibilisantes et induisent une production d’IgE, la concentration en Ig et par conséquent le niveau de la réaction allergique peuvent être diminués en fonction de la morphologie des agrégats.

### 1.2. Capacité de déclenchement

L’effet de l’agrégation sur la phase de déclenchement a été évalué *in vivo* chez la souris et *in vitro* avec des sérums de souris sensibilisées et des sérums de patients allergiques à l’œuf, les principaux résultats sont synthétisés dans le Tableau 14.

**Tableau 14** : Effet de la structure de deux types d’agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats: A-L) par rapport à la forme native (N) sur la phase de déclenchement

Conditions d’agrégation	Données structurales	Allergénicité
<b>Modèle murin</b>		
pH 9/0.03 M	Agrégat 50nm (A-s)	
pH 5/0.8 M	Agrégat 66µm (A-L)	
<b>Test activation basophiles avec sérums souris</b>		
pH 9/0.03 M	Agrégat 50nm (A-s)	Sensi N ou A-L : <b>N &gt; A-s = A-L</b> Sensi A-s : <b>A-s &gt; N &gt; A-L</b>
pH 5/0.8 M	Agrégat 65µm (A-L)	
<b>Test activation basophiles avec sérums humains</b>		
pH 9/0.03 M	Agrégat 50nm (A-s)	<b>N &gt; A-s = A-L</b>
pH 5/0.8 M	Agrégat 65µm (A-L)	

*In vivo*, la capacité de déclenchement a été évaluée par une provocation orale avec 3 mg d’OVA native ou de gros agrégats dans le premier protocole murin.

De faibles symptômes ont été observés sans différences significatives de score entre les souris provoquées avec ces deux formes d'OVA. Ces scores moyens faibles (0.5-2.5) correspondent à des symptômes majoritairement mineurs (démangeaisons, gonflements, poils redressés, ...), un score plus élevé (4) et une baisse de température rectale (signe d'une anaphylaxie) n'ont été enregistrés que pour une souris sensibilisée et ayant subi une provocation orale avec de l'OVA native. C'est la raison pour laquelle, la mesure du gonflement de l'oreille a été choisie comme mesure de symptôme lors du second protocole.

La capacité déclenchante a également été évaluée *in vivo* en dosant un médiateur chimique (mMCP-1) libéré lors de la provocation orale par les mastocytes, cellules effectrices abondantes au niveau intestinal, seules des tendances sans différences significatives ont été observées entre les groupes.

Ces faibles différences sont probablement liées à la quantité d'OVA administrée aux souris lors d'un gavage unique (3mg par souris), limite technique qui découle de la concentration maximale afin d'éviter la gélification lors de la phase d'agrégation. Il serait possible de réaliser des gavages successifs afin d'augmenter la quantité délivrée, sans certitude que cela aurait permis d'obtenir des différences significatives.

Afin d'évaluer la capacité à induire l'activation des cellules effectrices, l'utilisation d'un test *in vitro* utilisant une lignée cellulaire de basophiles a donc été nécessaire.

Ce test *in vitro* a été utilisé avec des sérums de souris sensibilisées (RBL-2H3) ou de patients allergiques à l'œuf et présentant des IgE spécifiques de l'OVA (RBL-SX38). Il est important de souligner que l'évaluation du déclenchement dans le modèle RBL-2H3/sérums de souris ne prend pas en compte l'effet seul des IgE spécifiques mais également d'autres d'immunoglobulines comme les IgG qui peuvent interférer avec l'action des IgE. A l'inverse, pour les RBL-SX38, ces cellules n'étant transfectées qu'avec le récepteur FCεRI humain, seules les IgE humaines participent à la dégranulation et l'action potentiellement activateur ou inhibiteur des autres isotypes d'Ig est ignoré. Le ratio IgE spécifiques/IgE totales est aussi important à prendre en compte et dans le cas des sérums humains connaissant ces deux paramètres nous avons sélectionnés des sérums pour lesquels le ratio IgE spécifiques/IgE totales était compris entre 2 et 10%

afin d'assurer une quantité suffisante d'IgE spécifiques de l'ovalbumine par rapport au contenu total en IgE du sérum.

L'évaluation *in vitro* de la capacité de déclenchement a mis en évidence un effet de l'agrégation pour les souris sensibilisées avec l'OVA native et sous forme de gros agrégats ainsi que pour les sérums humains mais pas de la structure même des agrégats. La forme native présente une meilleure aptitude à la dégranulation que les formes agrégées qui possèdent une capacité identique à activer les basophiles. Cette diminution pour les agrégats, peut s'expliquer par un masquage ou une dénaturation des épitopes présents sur la forme native. Ces résultats sont cohérents avec la littérature sur les traitements thermiques qui ont montré généralement une diminution du déclenchement pour les formes cuites chez la souris (Martos et al., 2011; Watanabe et al., 2014) et chez l'homme par un test d'activation des basophiles (Golias et al., 2012). Ils apportent des éléments de compréhension sur la tolérance à l'œuf cuit observée chez la majorité des patients (Lemon-Mulé et al., 2008). Les données obtenues chez l'homme sont similaires à celles obtenues chez la souris avec la sensibilisation native ou avec la sensibilisation avec les gros agrégats. Cette similitude entre l'homme et la souris apporte des éléments permettant de valider notre modèle de sensibilisation à un allergène alimentaire et notre modèle *in vitro* d'activation des basophiles.

La sensibilisation avec les petits agrégats a donné des résultats différents : la capacité de dégranulation est plus importante pour cette forme sensibilisante. Comme pour les deux autres sensibilisations, la forme native présente une meilleure capacité que les gros agrégats. Ce résultat met en évidence un effet de la structure même des agrégats dans ces conditions de sensibilisation.

L'évaluation du déclenchement au niveau cellulaire a été effectuée dans cette étude *in vivo* par le dosage de mMCP-1, molécule libérée par les mastocytes lors de la provocation orale et *in vitro* en utilisant des basophiles de rats et les sérums de ces souris sensibilisées. Les résultats entre ces deux méthodes ne sont pas toujours concordants. Nous pouvons formuler plusieurs hypothèses pour expliquer ces discordances. Tout d'abord l'environnement différent : les mastocytes présents au niveau des muqueuses sont entourés d'autres types cellulaires avec lesquels ils peuvent interagir, alors que le modèle *in vitro* de dégranulation est composé d'un seul

type cellulaire. Les acteurs moléculaires de l'interaction antigène-anticorps pourraient aussi ne pas être identiques dans les deux modèles. D'une part, les profils d'Ig fixées sur les cellules pourraient être différents : le modèle *in vitro* met en œuvre les Ig sériques c'est-à-dire par rapport aux Ig totales sécrétées dans l'organisme, les Ig non fixées sur les mastocytes et basophiles des souris ; dans quelle mesure ces deux profils sont identiques n'est pas actuellement avéré. D'autre part, *in vivo*, l'allergène doit passer la barrière intestinale avant d'activer les mastocytes contrairement au modèle *in vitro* où l'allergène est directement mis en contact avec les basophiles. Les interactions Ig-antigène au niveau de la barrière intestinale sont multiples avec des conséquences biologiques variées. Alors que les complexes IgA-antigène sont sécrétés dans la lumière intestinale (empêchant l'absorption de l'antigène), le transport facilité des complexes IgE-allergène via le CD23 chez les souris sensibilisées dans la première phase de la réaction allergique (Figure 16 page 54) pourrait favoriser la présentation aux mastocytes des formes se liant plus particulièrement à ces immunoglobulines. Au-delà de ce biais potentiel, notre travail apporte des informations supplémentaires sur la modulation du déclenchement par l'agrégation et montrent qu'en fonction de la forme sensibilisante, la structure des agrégats peut se révéler un paramètre à considérer vis-à-vis de la capacité de déclenchement.

### **1.3. Capacité antigénique et épitopes**

Nous avons étudié la capacité de liaison des différentes formes d'OVA à différentes immunoglobulines chez l'homme et chez la souris. Chez l'homme nous avons tout d'abord montré que l'OVA sous forme de larges agrégats présente une capacité diminuée à se lier avec les IgE et les IgG<sub>4</sub> par rapport à la forme native. Cette observation a été complétée par un test ELISA d'inhibition qui nous a permis de conclure que les épitopes présents dans les larges agrégats étaient présents dans la forme native alors que certains épitopes étaient spécifiques de l'OVA native. La perte d'épitope pour les larges agrégats par rapport à la forme native peut être liée à un masquage d'une partie de la protéine par le phénomène d'agrégation ou à une perte de la structure de l'OVA par la dénaturation.

La morphologie de l'agrégat modifie également la capacité de liaison aux IgE puisque les petits agrégats ont globalement une capacité diminuée par rapport aux larges

agrégats. L'étude par patient a montré que les IgE des enfants allergiques se lient majoritairement aussi bien aux larges agrégats (87/100 sera) qu'à la forme native mais moins aux petits agrégats (67/100 sera). Dans quelle mesure ces différences de réactivité vis-à-vis des formes agrégées pourraient-elles refléter les formes d'œuf contre lesquelles les enfants se sont sensibilisés ou les formes tolérées ? Les données cliniques dont nous disposons ne nous permettent pas de réaliser ces analyses.

Chez la souris, les IgE produites lors des sensibilisations avec l'OVA native et les gros agrégats se lient mieux à l'OVA native qu'aux gros ou petits agrégats en accord avec la diminution de la capacité de liaison des agrégats observée chez l'homme. Cependant, la sensibilisation avec les petits agrégats conduit à des résultats différents puisque dans ce cas, les petits agrégats montrent une capacité équivalente à la forme native et plus élevée que les gros agrégats à lier les IgE. Le test de dégranulation avec les sérums de souris sensibilisées avec les petits agrégats nous a permis de formuler l'hypothèse qu'il existe des épitopes spécifiques de cette morphologie d'agrégats. Nous avons identifiés avec les sérums de souris deux épitopes linéaires (P57-70 et P189-200) reconnus spécifiquement par des IgE après sensibilisation par les deux types d'agrégats et pas après sensibilisation avec l'OVA native. Ces deux épitopes ont déjà été identifiés comme immunodominant, l'un chez la souris (Mine and Yang, 2007) et l'autre chez l'homme (Benedé et al., 2014; Mine and Rupa, 2003). Cependant, ces épitopes linéaires ne permettent donc pas à eux seul d'expliquer les différences de réactivité observée entre agrégats qui pourrait être liées majoritairement à des épitopes conformationnels.

#### **1.4. Capacité antigénique après digestion et passage**

Pour être allergénique, une protéine doit atteindre le système immunitaire sous une forme capable d'induire une réaction allergique après digestion et passage de la barrière intestinale. Nous avons donc étudié l'effet de l'agrégation thermique sur la capacité antigénique après chacune de ces deux étapes en utilisant un test *in vitro* d'activation des basophiles.

Nous avons montré que les agrégats étaient plus susceptibles à la digestion que la forme native et que les peptides présents dans les digestats étaient différents en fonction de la structure de l'OVA. Les peptides communs aux trois formes sont les plus

nombreux puis ceux communs aux deux formes agrégées et ceci dès des temps courts de digestion gastrique. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus avec un protocole simplifié utilisant des temps longs de digestion (1h et 30 min) qui avaient montré 1) que l'OVA native est moins digérée que les agrégats, 2) que les gros agrégats présentent eux-mêmes une digestibilité plus faible que les petits agrégats et 3) que les peptides présents en fin de digestion diffèrent selon la structure de départ (Nyemb et al., 2014a).

Le tableau 15 présente une synthèse des comparaisons de la capacité d'activation aux différentes étapes de digestion testées lors de ce travail.

**Tableau 15** : Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats: A-L) par rapport à la forme native (N) sur la digestibilité et sur la capacité antigénique après digestion

Conditions d'agrégation	Données structurales	Allergénicité : Capacité de dégranulation	Digestibilité
pH 9/0.03 M	Agrégat 50nm (A-s)	- après digestion gastrique (10 ou 30 min): Peu modifiée (N), modification A-L et A-s <b>N &gt; A-L = A-s</b>	Susceptibilité digestion : <b>A-s &gt; A-L &gt; N</b>
pH 5/0.8 M	Agrégat 66µm (A-L)	- après digestion gastro-intestinale (10 min + 10 min) Peu modifiée (N) <b>N &gt; A-L = A-s</b>  - après digestion gastro-intestinale (30 min + 30 min) Diminution pour N <b>N = A-s = A-L</b>  - après digestion gastro-intestinale et BBM (30 min + 30 min + 2h) Pas de modification <b>N = A-s = A-L</b>	

Nous avons montré que la capacité antigénique des agrégats est légèrement modifiée dès la phase de digestion gastrique, alors que la forme native plus résistante à la digestion et qui avant hydrolyse présentait une capacité d'activation des basophiles meilleure que les formes agrégées perd cette caractéristique principalement lors de la phase duodénale dans le modèle complet de digestion. Ce résultat est à rapprocher de ceux de Benedé et al. (2014) qui avaient obtenu une diminution significativement plus importante de l'IgE-réactivité de l'OVA native lorsque la digestion *in vitro* utilisait des extraits pancréatiques humains par rapport à un mélange enzymatique trypsine/chymotrypsine. D'après nos résultats, l'étape de digestion par les BBM quant à elle ne modifie apparemment pas la capacité antigénique de l'OVA.

Il apparaît donc que l'OVA native possède des structures épitopiques particulières impliquées dans sa capacité à induire la dégranulation des basophiles. Celles-ci

seraient principalement sensibles à la digestion duodénale « complète » impliquant d'autres enzymes que la trypsine et la chymotrypsine.

Si la résistance à la digestion est souvent avancée comme une caractéristique des allergènes (Moreno, 2007), le lien entre digestibilité et allergénicité n'est pas direct. Ces résultats préliminaires et notamment la caractérisation peptidique des digestats nécessitent cependant d'être poursuivie. En se replaçant dans un contexte de déclenchement d'une réaction allergique, ces travaux montrent cependant que, malgré un début de digestion mis en évidence par l'apparition de nombreux peptides, la capacité à induire la dégranulation des basophiles est très largement maintenue pendant les premières minutes de la digestion et notamment après la digestion gastrique, en particulier pour l'OVA native.

L'étude du passage de la barrière intestinale réalisée en chambre d'Ussing avec des fragments prélevés sur des souris naïves a mis en évidence que l'OVA native augmente la perméabilité para-cellulaire au niveau du jéjunum contrairement aux agrégats qui n'ont pas cet effet. Cette modification de la barrière intestinale par l'OVA native en dehors de toute sensibilisation est un élément d'information important qui pourrait avoir un impact dans la mise en place d'allergie alimentaire. L'interaction et l'activation des cellules épithéliales (principalement bronchiques) par des allergènes, notamment ceux possédant des activités protéasiques, et aboutissant à une augmentation de la perméabilité paracellulaire a déjà été suggéré comme un facteur favorisant la sensibilisation allergique (Scheurer et al., 2015).

Ne disposant pas de techniques permettant d'évaluer la quantité d'OVA ni la nature des composés passés à travers la barrière intestinale, notre étude s'est limitée à étudier la capacité antigénique après passage de la barrière intestinale des molécules récupérées dans le compartiment basal. La capacité de l'OVA à activer la dégranulation des basophiles après passage de la barrière intestinale est apparue modulée par l'agrégation et la structure même des agrégats ainsi que par le tissu. La capacité supérieure de l'OVA native par rapport aux agrégats est maintenue après passage par le jéjunum ou par les plaques de Peyer (Tableau 16).

**Tableau 16** : Effet de la structure de deux types d'agrégats (petits agrégats: A-s ; gros agrégats: A-L) par rapport à la forme native (N) sur la capacité antigénique après passage par le jéjunum ou les plaques de Peyer (PP)

Conditions d'agrégation	Données structurales	Allergénicité : Capacité de dégranulation	
pH 9/0.03 M	Agrégat 41nm (A-s)	Après passage par jéjunum : <b>Non</b> Après passage par PP : <b>Non</b>	Après passage par jéjunum : <b>N &gt; A-L &gt; A-s = Ctrl</b>  Après passage par PP : <b>N &gt; A-L = A-s = Ctrl</b>
pH 5/0.8 M	Agrégat 43µm (A-L)	Après passage par jéjunum : <b>Oui</b> Après passage par PP : <b>Non</b>	

Au niveau du jéjunum, le passage modifie peu les différences dans la capacité de dégranulation puisque l'écart entre la forme native et les gros agrégats est maintenu, seuls les petits agrégats semblent perdre cette capacité d'activation des basophiles. Il est intéressant de noter que seule l'OVA native paraît capable d'induire la dégranulation des basophiles après passage par les plaques de Peyer. Ce résultat peut sembler contradictoire avec le schéma généralement admis de prise en charge des formes agrégées par les plaques de Peyer (Rahaman et al., 2016) ou les résultats trouvés notamment pour le lait *in vivo* (Roth-Walter et al., 2008). Il faut cependant souligner que cette dernière étude évalue la présence dans le tissu alors notre étude ne montre que l'absence de capacité des milieux basaux à induire la dégranulation sans prendre en compte la quantité d'allergène encore présente dans le tissu. On peut considérer que la capture des antigènes agrégés par les cellules présentatrices abondantes dans les plaques de Peyer, pourrait être responsable de l'absence de capacité de dégranulation observée.

Ces résultats sont donc très préliminaires mais ouvrent des perspectives intéressantes en tant que modèles d'études des interactions entre la barrière intestinale et les allergènes dans le contexte de l'allergie alimentaire et d'étude de l'impact des traitements thermiques.

## 2. Conclusions

Au cours de cette thèse, l'utilisation de plusieurs approches et techniques (modèle de sensibilisation *in vivo* par voie intrapéritonéale, test de dégranulation des basophiles et la combinaison des tests *in vitro* de digestion ou *ex vivo* de passage avec l'évaluation de l'antigénicité par le test de dégranulation des basophiles) et leur adaptation pour leur utilisation avec des agrégats de tailles très différentes, nous ont permis d'analyser finement l'effet de l'agrégation thermique sur l'allergénicité de l'ovalbumine.

Lors de ce travail de thèse, en combinant des résultats obtenus sur la phase de sensibilisation, sur la phase de déclenchement et sur la capacité antigénique avant et après digestion ou passage de la barrière intestinale, nous avons montré pour la première fois l'importance de la structure même des agrégats qui se forment lors d'un traitement thermique sur l'allergénicité.

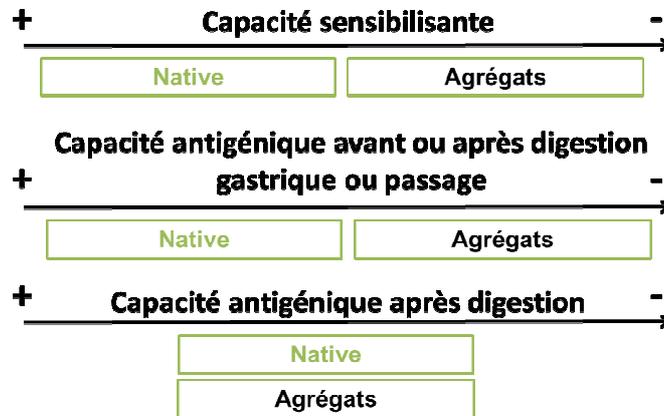
Sur certains paramètres, nous avons ainsi montré un effet de l'agrégation alors que sur d'autres paramètres, un effet plus spécifique de la structure même des agrégats a été observé (Tableau 17).

**Tableau 17** : Bilan des résultats obtenus sur l'effet de l'agrégation et de la structure de l'OVA sur la sensibilisation, le déclenchement et l'antigénicité avant et après digestion ou passage par comparaison de l'OVA native (N), de petits agrégats (A-s), de gros agrégats (A-L) et de contrôles.

Paramètre	Effet agrégation	Effet structure OVA
Capacité de sensibilisation	↘ sensibilisation	N > A-L > A-s > Ctrl
Capacité de déclenchement	↘ déclenchement	N > A-L = A-s > Ctrl
Antigénicité avant digestion ou passage	<b>ELISA</b> Homme: N > A-L > A-s Souris sensibilisées N ou A-L: N > A-L = A-s Souris sensibilisées A-s : As = N > A-L	
	<b>RBL</b> Homme ou souris sensibilisées N ou A-L: N > A-L = A-s Souris sensibilisées A-s : A-s > N > A-L	
Antigénicité après digestion	<b>Digestion gastrique</b>	
	↘ antigénicité	N > A-L = A-s > Ctrl
	<b>Digestion gastro-intestinale</b>	
	Antigénicité =	N = A-L = A-s > Ctrl
Antigénicité après passage	<b>Par jéjunum</b>	
	↘ antigénicité	N > A-L > A-s = Ctrl
	<b>Par Plaques de Peyer</b>	
	↘ antigénicité	N > A-L = A-s = Ctrl

De façon générale, l'agrégation thermique de l'OVA diminue sa capacité de sensibilisation *in vivo*, de déclenchement *in vitro* et l'antigénicité avant ou après

passage de la barrière intestinale et après digestion gastrique (Figure 48). L'effet cumulé sur les différents paramètres évalués montre ainsi une diminution de l'allergénicité suite à l'agrégation thermique.



**Figure 48 :** Bilan de l'effet de l'agrégation sur la capacité sensibilisante et antigénique avant ou après digestion et passage de la barrière intestinale par rapport à la forme native.

L'effet de la structure même des agrégats a été mis en évidence lors de la phase de sensibilisation et sur la capacité antigénique après passage par le jéjunum (Figure 49). La combinaison de la diminution de la capacité de sensibilisation et de la capacité antigénique après passage par le jéjunum des petits comparés aux gros agrégats semble indiquer un effet global de diminution de l'allergénicité pour ces petits agrégats.



**Figure 49 :** Bilan de l'effet de la structure des agrégats sur la capacité sensibilisante et antigénique après digestion passage de la barrière intestinale au niveau du jéjunum.

Ainsi, nous avons pour la première fois montré qu'au-delà du barème thermique, les conditions physicochimiques qui modulent la structure des agrégats sont un élément important à prendre en compte dans l'évaluation de l'allergénicité. Les petits agrégats qui ont été formés au pH naturel du blanc d'œuf présentent une capacité sensibilisante plus faible que l'OVA native et que les gros agrégats obtenus dans d'autres conditions de pH.

### 3. Perspectives

Le travail réalisé est un progrès en avant vers la compréhension de l'effet de l'agrégation sur l'allergénicité de l'OVA et de façon plus large, sur le lien entre traitement thermique et capacité d'une protéine à être allergène. Cependant, plusieurs questions restent posées.

L'étude des populations Th au niveau intestinal et des immunoglobulines sériques ont montré qu'au cours de la phase de sensibilisation des réponses immunitaires adaptatives/spécifiques différentes se mettaient en place selon la structure de l'ovalbumine. Une perspective à court-terme pour comprendre les observations de l'effet de l'agrégation sur la phase de sensibilisation réside dans l'utilisation de modèles cellulaires afin de comprendre quels mécanismes cellulaires précoces conduisent à une sensibilisation différentes des formes d'OVA, notamment le rôle des cellules dendritiques sur l'activation spécifique des lymphocytes T. Il est en effet possible d'étudier la capture de l'antigène par marquage de la protéine et mesure de l'intensité de fluorescence, la présentation de l'antigène en étudiant l'expression du CMH-II ou la présence de molécules de co-stimulation et enfin le profil de sécrétion des cytokines par les DCs (Heilmann et al., 2014; Katayama et al., 2013). Toutes ces techniques permettraient d'évaluer à quel niveau l'agrégation de l'OVA peut modifier la sensibilisation. Au-delà de l'évaluation des capacités sensibilisantes, il serait également intéressant à plus long terme d'évaluer quel est l'effet des agrégats dans la modulation de la tolérance à l'ovalbumine, uniquement étudiée au cours de cette thèse par l'étude de l'induction des Treg ; pour cela, les IgA présents dans le sérum ou dans les fèces de souris sensibilisées peuvent être dosés. Par la modulation de la balance Th1/Th2, l'étude de l'induction de la tolérance pourraient expliquer certaines différences observées dans les réponses induites par les différentes formes d'OVA.

Les résultats obtenus sur l'étude de la capacité antigénique après digestion et passage nous amènent à nous poser de nombreuses questions auxquelles il serait possible de répondre à plus ou moins long terme.

L'étude de la capacité antigénique après digestion peut être complétée par l'analyse des peptides des digestats responsables de l'activation des basophiles. Cela permettrait d'apporter des informations supplémentaires sur les fragments protéiques

de l'OVA impliqués dans la réaction allergique et également évaluer des différences en fonction des formes d'OVA. Cette étude nécessiterait cependant une mise au point importante du fait de la complexité potentielle du milieu à analyser et de la faible quantité de peptides pouvant être retrouvée et représente donc un travail conséquent nécessitant de lever des verrous technologiques.

Pour aller plus loin sur l'évaluation du passage des formes agrégées, la mise en place d'un dosage serait nécessaire. Des anticorps polyclonaux de lapin contre les formes agrégées ont été produits mais il nous manque un anticorps d'une autre espèce pour pouvoir réaliser un ELISA sandwich permettant de doser l'OVA agrégée dans le milieu basal. La mise en place de ce test permettrait d'évaluer une « quantité passée » Mais ne renseignerait pas sur les formes passées ; l'hydrolyse des différentes formes au cours du passage pourrait même limiter leur dosage. Une approche d'identification par spectrométrie de masse est engagée mais elle se heurte aux faibles quantités présentes dans les milieux basaux.

A court terme, l'utilisation d'inhibiteurs des différentes voies de passage permettrait d'évaluer par quelles voies les formes induisant une dégranulation passent à travers la barrière intestinale et notamment si l'augmentation de perméabilité paracellulaire suffit pour que l'OVA native passe par cette voie.

L'évaluation de la capacité antigénique après digestion et passage peut également être complétée en combinant ces deux étapes. En comparant les résultats à ceux déjà obtenus, ceci permettrait de savoir si l'hydrolyse des agrégats entraîne une augmentation de leur passage lié à une diminution de leur taille et ainsi une augmentation de leur capacité à activer les basophiles ou au contraire si cela entraîne une diminution de la dégranulation ou même, une inactivation dans le cas des gros agrégats.

A moyen terme, l'étude de la capacité d'activation des basophiles des formes d'OVA après passage sur intestin de souris sensibilisées aux différentes formes permettrait non seulement d'apporter des informations sur la sensibilisation mais également sur le passage et ainsi prendre en compte toutes les étapes conduisant à une réaction allergique. Cela permettrait de valider l'effet global sur la réaction allergique des différentes formes d'OVA et confirmer ainsi, une diminution de l'allergénicité par les phénomènes d'agrégation, et également un effet plus faible des petits agrégats par

rapport aux larges agrégats. Cette étape permettrait également d'évaluer le rôle des mastocytes qui chez des individus sensibilisés augmentent la perméabilité paracellulaire aux allergènes.

Le choix a été fait dans cette thèse d'utiliser un modèle murin avec sensibilisation par intrapéritonéale dans lequel l'allergène est mis en contact avec le système immunitaire sans avoir subi les étapes de digestion et passage de la barrière intestinale et d'étudier ces deux phases indépendamment. Nous avons montré qu'en général, tous les effets constatés vont dans le même sens (Native > agrégats et gros agrégats > petits agrégats). Il serait intéressant de vérifier dans un modèle murin en sensibilisation par voie orale si les effets se cumulent *in vivo* avec la difficulté liée à la préparation des échantillons. Une solution potentielle serait de travailler avec des gels déstructurés.

Enfin, à plus long terme, il serait intéressant de chercher à complexifier la matrice protéique. Nos modèles d'agrégation ont été obtenus dans deux conditions de pH, l'une correspondant au pH naturel du blanc d'œuf, l'autre au pH de nombreux produits industrialisés. Cependant, notre étude n'est qu'un début pour envisager de créer des aliments pour la prévention ou pour éliminer le risque de déclencher une allergie alimentaire pour les enfants déjà sensibilisés. En effet, nous n'avons travaillé que sur une protéine du blanc d'œuf et il est nécessaire de considérer tout d'abord l'œuf dans sa totalité. Il est également important de noter que des processus de gélification sont souvent observés par la cuisson du blanc d'œuf et l'effet de cette structure serait intéressant à étudier. De plus dans une matrice alimentaire, d'autres composés comme les lipides sont retrouvés et peuvent agir sur l'allergénicité. Les différentes techniques utilisées dans cette thèse pourraient être en partie appliquées à d'autres matrices plus complexes pour justifier d'un effet modulateur sur la phase de sensibilisation ou de déclenchement. Il serait néanmoins nécessaire de vérifier que des aliments solides mis en suspension seraient utilisables avec ces techniques. Pour une application industrielle, les données obtenues par ces différentes méthodes devraient être complétées par une étude clinique réalisée chez des patients allergiques pour justifier d'une non réponse aux allergènes contenus dans l'aliment.



## Références

- Aalberse, R.C. (2000). Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *106*, 228–238.
- Aldemir, H., Bars, R., and Herouet-Guicheney, C. (2009). Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *54*, S52–S57.
- Amo, A., Rodríguez-Pérez, R., Blanco, J., Villota, J., Juste, S., Moneo, I., and Caballero, M.L. (2010). Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 7453–7457.
- Azad, M.B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D.S., Field, C.J., Sears, M.R., Becker, A.B., Scott, J.A., and Kozyrskyj, A.L. (2013). Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* *9*, 15.
- Balimane, P. V., and Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discov. Today* *10*, 335–343.
- Bannon, G.A. (2004). What makes a food protein an allergen? *Curr. Allergy Asthma Rep.* *4*, 43–46.
- Bartnikas, L.M., Sheehan, W.J., Larabee, K.S., Petty, C., Schneider, L.C., and Phipatanakul, W. (2013). Ovomuroid is not superior to egg white testing in predicting tolerance to baked egg. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* *1*, 354–360.
- Benedé, S., López-Expósito, I., López-Fandiño, R., and Molina, E. (2014). Identification of IgE-binding peptides in hen egg ovalbumin digested in vitro with human and simulated gastroduodenal fluids. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 152–158.
- Benedé, S., Blázquez, A.B., Chiang, D., Tordesillas, L., Berin, M.C., Abrahamsson, T.R., Jakobsson, H.E., Andersson, A.F., Bjorksten, B., Engstrand, L., et al. (2016). The rise of food allergy: Environmental factors and emerging treatments. *EBioMedicine* *7*, 27–34.
- Benhamou, A.H., Caubet, J.-C., Eigenmann, P.A., Nowak-Wegrzyn, A., Marcos, C.P., Reche, M., and Urisu, A. (2010). State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy* *65*, 283–289.
- Benhamou Senouf, A.H., Borres, M.P., and Eigenmann, P.A. (2015). Native and denatured egg white protein IgE tests discriminate hen's egg allergic from egg-tolerant children. *Pediatr. Allergy Immunol.* *26*, 12–17.
- Berin, M.C. (2012). Mucosal antibodies in the regulation of tolerance and allergy to foods. *Semin. Immunopathol.* *34*, 633–642.
- Berin, M.C., and Sampson, H.A. (2013). Food allergy: an enigmatic epidemic. *Trends Immunol.* *34*, 390–397.
- Bidat, E. (2006). Allergie alimentaire de l'enfant. *Arch. Pédiatrie Organe Off. La Société Fr. Pédiatrie* *13*, 1349–1353.
- Bihouée, T., Bouchaud, G., Chesné, J., Lair, D., Rolland-Debord, C., Braza, F., Cheminant, M.-A., Aubert, P., Mahay, G., Sagan, C., et al. (2014). Food allergy enhances allergic asthma in mice. *Respir. Res.* *15*.
- Binaghi, R.A., and Demeulemester, C. (1983). Influence of the medium on the heat and acid denaturation of IgE. *J. Immunol. Methods* *65*, 225–233.

- Blanc, F., Adel-Patient, K., Drumare, M.-F., Paty, E., Wal, J.-M., and Bernard, H. (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. *Clin. Exp. Allergy* *39*, 1277–1285.
- Blanc, F., Vissers, Y.M., Adel-Patient, K., Rigby, N.M., Mackie, A.R., Gunning, a. P., Wellner, N.K., Skov, P.S., Przybylski-Nicaise, L., Ballmer-Weber, B., et al. (2011). Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* *55*, 1887–1894.
- Bloom, K. a, Huang, F.R., Bencharitiwong, R., Bardina, L., Ross, A., Sampson, H. a, and Nowak-Węgrzyn, A. (2014). Effect of Heat Treatment on Milk and Egg Proteins Allergenicity. *Pediatr. Allergy Immunol.* *25*, 740–746.
- Bodinier, M., Brossard, C., Triballeau, S., Morisset, M., Guérin-Marchand, C., Pineau, F., de Coppet, P., Moneret-Vautrin, D.A., Blank, U., and Denery-Papini, S. (2008). Evaluation of an in vitro mast cell degranulation test in the context of food allergy to wheat. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *146*, 307–320.
- Bøgh, K.L., van Bilsen, J., Głogowski, R., López-Expósito, I., Bouchaud, G., Blanchard, C., Bodinier, M., Smit, J., Pieters, R., Bastiaan-Net, S., et al. (2016). Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of food allergens in animal models. *Clin. Transl. Allergy* *6*, 21.
- Bouchaud, G., Castan, L., Chesné, J., Braza, F., Aubert, P., Neunlist, M., Magnan, A., and Bodinier, M. (2016). Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy* *71*, 68–76.
- Boyano Martínez, T., García-Ara, C., Díaz-Pena, J.M., Muñoz, F.M., García Sánchez, G., and Esteban, M.M. (2001). Validity of specific IgE antibodies in children with egg allergy. *Clin. Exp. Allergy* *31*, 1464–1469.
- Boyman, O., Kaegi, C., Akdis, M., Bavbek, S., Bossios, A., Chatzipetrou, A., Eiwegger, T., Firinu, D., Harr, T., Knol, E., et al. (2015). EAACI IG Biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* *70*, 727–754.
- Brededorst, R., and David, K. (2001). What establishes a protein as an allergen? *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* *756*, 33–40.
- Bryant, C.M., and McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* *9*, 143–151.
- Burks, A.W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P.A., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Chiang, W., Beyer, K., Wood, R., et al. (2012a). ICON: food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 906–920.
- Burks, A.W., Jones, S.M., Wood, R.A., Fleischer, D.M., Sicherer, S.H., Lindblad, R.W., Stablein, D., Henning, A.K., Vickery, B.P., Liu, A.H., et al. (2012b). Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. *N. Engl. J. Med.* *233–243*.
- Butler, J., Bencharitiwong, R., Martos, G., and Nowak-Węgrzyn, A.H. (2010). Rat Basophil Leukemia (RBL) cell-based Mediator Release Assay to Egg White in Children with Egg Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, AB84.
- Cabanillas, B., Cuadrado, C., Rodriguez, J., Hart, J., Burbano, C., Crespo, J.F., and Novak, N. (2015). Potential changes in the allergenicity of three forms of peanut after thermal processing. *Food Chem.* *183*, 18–25.

- Calvani, M., Arasi, S., Bianchi, A., Caimmi, D., Cuomo, B., Dondi, A., Indirli, G.C., La Grutta, S., Panetta, V., and Verga, M.C. (2015). Is it possible to make a diagnosis of raw, heated, and baked egg allergy in children using cutoffs? A systematic review. *Pediatr. Allergy Immunol.* *26*, 509–521.
- Campana, R., Vrtala, S., Maderegger, B., Dall'Antonia, Y., Zafred, D., Blatt, K., Herrmann, H., Focke-Tejkl, M., Swoboda, I., Scheiblhofer, S., et al. (2011). Altered IgE epitope presentation: A model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. *Mol. Immunol.* *48*, 431–441.
- Campbell, L., Raikos, V., and Euston, S.R. (2003). Modification of functional properties of egg-white proteins. *Nahrung* *47*, 369–376.
- Carrard, A., Rizzuti, D., and Sokollik, C. (2015). Update on food allergy. *Allergy* *70*, 1511–1520.
- Cehade, M., and Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 3–12.
- Chinthrajah, R.S., Hernandez, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., and Nadeau, K.C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 984–997.
- Cianferoni, A., and Spergel, J.M. (2009). Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergol. Int.* *58*, 457–466.
- Claude, M., Lupi, R., Bouchaud, G., Bodinier, M., Brossard, C., and Denery-Papini, S. (2016). The thermal aggregation of ovalbumin as large particles decreases its allergenicity for egg allergic patients and in a murine model. *Food Chem.* *203*, 136–144.
- Comoy, E.E., Capron, a, and Thyphronitis, G. (1997). In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int. Immunol.* *9*, 523–531.
- Coudeyras, S., and Forestier, C. (2010). Microbiota and probiotics: effects on human health. *Can. J. Microbiol.* *56*, 611–650.
- Croguennec, T., Nau, F., and Brule, G. (2002). Influence of pH and Salts on Egg White Gelation. *J. Food Sci.* *67*, 608–614.
- D'Urbano, L.E., Pellegrino, K., Artesani, M.C., Donnanno, S., Luciano, R., Riccardi, C., Tozzi, A.E., Ravà, L., De Benedetti, F., and Cavagni, G. (2010). Performance of a component-based allergen-microarray in the diagnosis of cow's milk and hen's egg allergy. *Clin. Exp. Allergy* *40*, 1561–1570.
- Davis, P.J., and Williams, S.C. (1998). Protein modification by thermal processing. *Allergy* *53*, 102–105.
- Davis, P.J., Smales, C.M., and James, D.C. (2001). How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* *56*, 56–60.
- Denery-Papini, S., Bodinier, M., Pineau, F., Triballeau, S., Tranquet, O., Adel-Patient, K., Moneret-Vautrin, D.A., Bakan, B., Marion, D., Mothes, T., et al. (2011). Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. *Clin. Exp. Allergy* *41*, 1478–1492.
- De Silva, C., Dhanapala, P., Doran, T., Tang, M.L.K., and Suphioglu, C. (2016). Molecular and immunological analysis of hen's egg yolk allergens with a focus on YGP42 (Gal d 6). *Mol. Immunol.* *71*, 152–160.

- De Silva, D., Geromi, M., Panesar, S.S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Cardona, V., Dubois, A.E.J., Halken, S., et al. (2014a). Acute and long-term management of food allergy: systematic review. *Allergy* 69, 159–167.
- De Silva, D., Geromi, M., Halken, S., Host, A., Panesar, S.S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Cardona, V., et al. (2014b). Primary prevention of food allergy in children and adults: Systematic review. *Allergy* 69, 581–589.
- Dhuban, K. Bin, D’Hennezel, E., Ben-Shoshan, M., McCusker, C., Clarke, A., Fiset, P., Mazer, B., and Piccirillo, C.A. (2013). Altered T helper 17 responses in children with food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 162, 318–322.
- Dos Santos, G.G., Reinders, J., Ouwehand, K., Rustemeyer, T., Scheper, R.J., and Gibbs, S. (2009). Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 372–382.
- Dubrac, S., Schmuth, M., and Ebner, S. (2010). Atopic dermatitis: the role of Langerhans cells in disease pathogenesis. *Immunol. Cell Biol.* 88, 400–409.
- Durand, D., Christophe Gimel, J., and Nicolai, T. (2002). Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Phys. A Stat. Mech. Its Appl.* 304, 253–265.
- Du Toit, G., Katz, Y., Sasieni, P., Mesher, D., Maleki, S.J., Fisher, H.R., Fox, A.T., Turcanu, V., Amir, T., Zadik-Mnuhin, G., et al. (2008). Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 984–991.
- Du Toit, G., Roberts, G., Sayre, P.H., Bahnson, H.T., Radulovic, S., Santos, A.F., Brough, H.A., Phippard, D., Basting, M., Feeney, M., et al. (2015). Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* 372, 803–813.
- Frossard, C.P., Hauser, C., and Eigenmann, P.A. (2004). Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 377–382.
- Fu, T.-J., Abbott, U.R., and Hatzos, C. (2002). Digestibility of Food Allergens and Nonallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7154–7160.
- Gieni, R.S., Yang, X., Kelso, A., and Hayglass, K.T. (1996). Limiting dilution analysis of CD4 T-cell cytokine production in mice administered native versus polymerized ovalbumin: directed induction of T-helper type-1-like activation. *Immunology* 87, 119–126.
- Golias, J., Schwarzer, M., Wallner, M., Kverka, M., Kozakova, H., Srutkova, D., Klimesova, K., Sotkovsky, P., Palova-Jelinkova, L., Ferreira, F., et al. (2012). Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One* 7, e37156.
- Gómez, E., Mayorga, C., Gómez, F., Blázquez, A.B., Díaz-Perales, A., Blanca, M., Torres, M.J., Gomez, E., Mayorga, C., Gomez, F., et al. (2013). Food allergy: management, diagnosis and treatment strategies. *Immunotherapy* 5, 755–768.
- Gourbeyre, P., Denery-Papini, S., Larré, C., Gaudin, J.-C., Brossard, C., and Bodinier, M. (2012). Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 336–344.

- Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *124*, 3–20.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., and Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* *30*, 591–600.
- Halstensen, T.S. (1997). Why are we not all allergic: Basic mechanisms for tolerance development. In *Environmental Toxicology and Pharmacology*, pp. 25–31.
- Handa, A., Takahashi, K., Kuroda, N., and Froning, G. (1998). Heat-induced Egg White Gels as Affected by pH. *J. Food Sci.* *63*, 403–407.
- Hegg, P.-O., Martens, H., and Löfqvist, B. (1979). Effects of pH and neutral salts on the formation and quality of thermal aggregates of ovalbumin. A study on thermal aggregation and denaturation. *J. Sci. Food Agric.* *30*, 981–993.
- Heilmann, M., Wellner, A., Gadermaier, G., Ilchmann, A., Briza, P., Krause, M., Nagai, R., Burgdorf, S., Scheurer, S., Vieths, S., et al. (2014). Ovalbumin modified with pyrrolidine, a Maillard reaction product, shows enhanced T-cell immunogenicity. *J. Biol. Chem.* *289*, 7919–7928.
- Hoffmann, H.J., Santos, A.F., Mayorga, C., Nopp, A., Eberlein, B., Ferrer, M., Rouzaire, P., Ebo, D.G., Sabato, V., Sanz, M.L., et al. (2015). The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy* *70*, 1393–1405.
- Hogan, S.P., and Rothenberg, M.E. (2008). Dietary allergenic proteins and intestinal immunity: a shift from oral tolerance to sensitization. *Clin. Exp. Allergy* *38*, 229–232.
- Honma, K., Kohno, Y., Saito, K., Shimojo, N., Horiuchi, T., Hayashi, H., Suzuki, N., Hosoya, T., Tsunoo, H., and Niimi, H. (1996). Allergenic epitopes of ovalbumin (OVA) in patients with hen's egg allergy: inhibition of basophil histamine release by haptenic ovalbumin peptide. *Clin. Exp. Immunol.* *103*, 446–453.
- Husby, S., Jensenius, J.C., and Svehag, S.E. (1985). Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scand. J. Immunol.* *22*, 83–92.
- Jenkins, J.A., Breiteneder, H., and Mills, E.N.C. (2007). Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 1399–1405.
- Jiménez-Saiz, R., Belloque, J., Molina, E., and López-Fandiño, R. (2011). Human immunoglobulin E (IgE) binding to heated and glycosylated ovalbumin and ovomucoid before and after in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 10044–10051.
- Johansen, P., Senti, G., Martínez Gómez, J.M., Wüthrich, B., Bot, A., and Kündig, T.M. (2005). Heat denaturation, a simple method to improve the immunotherapeutic potential of allergens. *Eur. J. Immunol.* *35*, 3591–3598.
- Johansson, S.G., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., et al. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* *56*, 813–824.
- Johansson, S.G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martell, J.A., Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., et al. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* *113*, 832–836.

- Jones, S.M., Burks, A.W., Keet, C., Vickery, B.P., Scurlock, A.M., Wood, R.A., Liu, A.H., Sicherer, S.H., Henning, A.K., Lindblad, R.W., et al. (2016). Long-term treatment with egg oral immunotherapy enhances sustained unresponsiveness that persists after cessation of therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 1117–1127.
- Joo, K., and Kato, Y. (2006). Assessment of allergenic activity of a heat-coagulated ovalbumin after in vivo digestion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 591–597.
- Kanny, G., Morisset, M., Flabbée, J., Beaudouin, E., Parisot, L., and Moneret-Vautrin, D.. (2002). L'accueil des enfants à risque d'allergie alimentaire à l'école. Le projet d'accueil individualisé à l'école. *Rev. Française d'Allergologie d'Immunologie Clin.* *42*, 307–313.
- Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Nakashima, S., Masuda, S., Kanda, T., Akiyama, H., Teshima, R., and Nakamura, S. (2013). Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells. *Food Chem.* *138*, 757–761.
- Katz, Y., Rajuan, N., Goldberg, M.R., Eisenberg, E., Heyman, E., Cohen, A., and Leshno, M. (2010). Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 77–82.
- Kelleher, M.M., Dunn-Galvin, A., Gray, C., Murray, D.M., Kiely, M., Kenny, L., McLean, W.H.I., Irvine, A.D., and Hourihane, J.O.B. (2016). Skin barrier impairment at birth predicts food allergy at 2 years of age. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 1111–1116.
- Kitabatake, N., Hatta, H., and Doi, E. (1987). Heat-induced and Transparent Gel Prepared from Hen Egg Ovalbumin in the Presence of Salt by a Two-step Heating Method. *Agric. Biol. Chem.* *51*, 771–778.
- Koplin, J.J., Osborne, N.J., Wake, M., Martin, P.E., Gurrin, L.C., Robinson, M.N., Tey, D., Slaa, M., Thiele, L., Miles, L., et al. (2010). Can early introduction of egg prevent egg allergy in infants? A population-based study. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 807–813.
- Koplin, J.J., Allen, K.J., Gurrin, L.C., Peters, R.L., Lowe, A.J., Tang, M.L.K., and Dharmage, S.C. (2013). The impact of family history of allergy on risk of food allergy: a population-based study of infants. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *10*, 5364–5377.
- Koseki, T., Kitabatake, N., and Doi, E. (1989). Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin. *Food Hydrocoll.* *3*, 123–134.
- Kosti, R.I., Triga, M., Tsabouri, S., and Priftis, K.N. (2013). Food allergen selective thermal processing regimens may change oral tolerance in infancy. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. *41*, 407–417.
- Kulis, M., Wright, B.L., Jones, S.M., and Burks, A.W. (2015). Diagnosis, management, and investigational therapies for food allergies. *Gastroenterology* *148*, 1132–1142.
- Lack, G. (2012). Update on risk factors for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 1187–1197.
- Lassé, M., Deb-Choudhury, S., Haines, S., Larsen, N., Gerrard, J.A., and Dyer, J.M. (2015). The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. *J. Food Compos. Anal.* *38*, 42–48.
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. *Impact Food Bioact. Heal.* 103–111.
- Lehrer, S.B., Ayuso, R., and Reese, G. (2002). Current Understanding of Food Allergens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *964*, 69–85.

- Lemon-Mulé, H., Sampson, H.A., Sicherer, S.H., Shreffler, W.G., Noone, S., and Nowak-Węgrzyn, A. (2008). Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J. Allergy Clin. Immunol.* *122*, 977–983.
- Leonard, S.A., Sampson, H.A., Sicherer, S.H., Noone, S., Moshier, E.L., Godbold, J., and Nowak-Węgrzyn, A. (2012). Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 473–480.
- Leonard, S.A., Caubet, J.-C., Kim, J.S., Groetch, M., and Nowak-Węgrzyn, A. (2015). Baked milk- and egg-containing diet in the management of milk and egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* *3*, 13–23.
- Lepski, S., and Brockmeyer, J. (2013). Impact of dietary factors and food processing on food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* *57*, 145–152.
- Li, A.-L., Meng, X., Huo, G., Duan, C., Zheng, Q., Li, D., and Wang, Y. (2014). The Th17/Treg imbalance in bovine  $\beta$ -lactoglobulin-sensitized mice. *Int. Dairy J.* *34*, 257–262.
- Li, X., Schofield, B.H., Huang, C.-K., Kleiner, G.I., and Sampson, H.A. (1999). A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *103*, 206–214.
- Lim, H., Kim, Y.U., Yun, K., Drouin, S.M., and Chung, Y. (2013). Distinct regulation of Th2 and Th17 responses to allergens by pulmonary antigen presenting cells in vivo. *Immunol. Lett.* *156*, 140–148.
- Liu, T., Navarro, S., and Lopata, A.L. (2016). Current advances of murine models for food allergy. *Mol. Immunol.* *70*, 104–117.
- Lupi, R., Masci, S., Rogniaux, H., Tranquet, O., Brossard, C., Lafiandra, D., Moneret-Vautrin, D.A., Denery-Papini, S., and Larré, C. (2014). Assessment of the allergenicity of soluble fractions from GM and commercial genotypes of wheats. *J. Cereal Sci.* *60*, 179–186.
- Luyt, D., Ball, H., Kirk, K., and Stiefel, G. (2016). Diagnosis and management of food allergy in children. *Paediatr. Child Health (Oxford)*. *26*, 287–291.
- MacGlashan, D.W. (2013). Basophil activation testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 777–787.
- Maeyama, K., Hohman, R.J., Metzger, H., and Beaven, M.A. (1986). Quantitative relationships between aggregation of IgE receptors, generation of intracellular signals, and histamine secretion in rat basophilic leukemia (2H3) cells. Enhanced responses with heavy water. *J. Biol. Chem.* *261*, 2583–2592.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., and Girardin, S.E. (2007). The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* *19*, 106–115.
- Martin, P.E., Eckert, J.K., Koplin, J.J., Lowe, A.J., Gurrin, L.C., Dharmage, S.C., Vuillermin, P., Tang, M.L.K., Ponsonby, A.-L.L., Matheson, M., et al. (2015). Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort. *Clin. Exp. Allergy* *45*, 255–264.
- Martinez-Maqueda, D., Miralles, B., and Recio, I. (2015). HT29 cell line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, (Springer International Publishing), pp. 113–124.
- Martino, D., Kesper, D.A., Amarasekera, M., Harb, H., Renz, H., and Prescott, S. (2014a). Epigenetics in immune development and in allergic and autoimmune diseases. *J. Reprod. Immunol.* *104-105*, 43–48.

- Martino, D., Joo, J.E., Sexton-Oates, A., Dang, T., Allen, K., Saffery, R., and Prescott, S. (2014b). Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. *Epigenetics* 9, 998–1006.
- Martino, D.J., Saffery, R., Allen, K.J., and Prescott, S.L. (2016). Epigenetic modifications: mechanisms of disease and biomarkers of food allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 42, 9–15.
- Martos, G., Lopez-Exposito, I., Bencharitiwong, R., Berin, M.C., and Nowak-Węgrzyn, A. (2011). Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 990–997.
- Masilamani, M., Commins, S., and Shreffler, W. (2012). Determinants of food allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 32, 11–33.
- Matsubara, T., Aoki, N., Honjoh, T., Mizumachi, K., Kurisaki, J., Okajima, T., Nadano, D., and Matsuda, T. (2008). Absorption, migration and kinetics in peripheral blood of orally administered ovalbumin in a mouse model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2555–2565.
- Matsuo, H., Yokooji, T., and Taogoshi, T. (2015). Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergol. Int.* 64, 332–343.
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* 3, 247–259.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738.
- Mills, E.N.C., and Mackie, A.R. (2008). The impact of processing on allergenicity of food. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8, 249–253.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 225–232.
- Mine, Y., and Rupa, P. (2003). Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein Eng. Des. Sel.* 16, 747–752.
- Mine, Y., and Yang, M. (2007). Epitope characterization of ovalbumin in BALB/c mice using different entry routes. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 200–212.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124.
- Monti, G., Muratore, M.C., Peltran, A., Bonfante, G., Silvestro, L., Oggero, R., and Mussa, G.C. (2002). High incidence of adverse reactions to egg challenge on first known exposure in young atopic dermatitis children: Predictive value of skin prick test and radioallergosorbent test to egg proteins. *Clin. Exp. Allergy* 32, 1515–1519.
- Moreno, F.J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomed. Pharmacother.* 61, 50–60.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 933–944.
- Nicolai, T., and Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18, 249–256.

- Nisbet, a D., Saundry, R.H., Moir, a J., Fothergill, L. a, and Fothergill, J.E. (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* *115*, 335–345.
- Nowak-Wegrzyn, A., and Fiocchi, A. (2009). Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *9*, 234–237.
- Nwaru, B.I., Hickstein, L., Panesar, S.S., Muraro, A., Werfel, T., Cardona, V., Dubois, A.E.J., Halken, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Poulsen, L.K., et al. (2014). The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* *69*, 62–75.
- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Jardin, J., Rutherford, S.M., and Nau, F. (2014a). The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. *Food Chem.* *157*, 429–438.
- Nyemb, K., Jardin, J., Causeur, D., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Rutherford, S.M., and Nau, F. (2014b). Investigating the impact of ovalbumin aggregate morphology on in vitro ovalbumin digestion using label-free quantitative peptidomics and multivariate data analysis. *Food Res. Int.* *63*, 192–202.
- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Pézennec, S., Jardin, J., Briard-Bion, V., Cauty, C., Rutherford, S.M., Dupont, D., and Nau, F. (2016). The structural properties of egg white gels impact the extent of in vitro protein digestion and the nature of peptides generated. *Food Hydrocoll.* *54*, 315–327.
- Oboki, K., Ohno, T., Saito, H., and Nakae, S. (2008). Th17 and allergy. *Allergol. Int.* *57*, 121–134.
- Ohtani, K., Sato, S., Syukuya, A., Asaumi, T., Ogura, K., Koike, Y., Iikura, K., Yanagida, N., Imai, T., and Ebisawa, M. (2016). Natural history of immediate-type hen's egg allergy in Japanese children. *Allergol. Int.* *65*, 153–157.
- Osborne, N.J., Koplin, J.J., Martin, P.E., Gurrin, L.C., Lowe, A.J., Matheson, M.C., Ponsonby, A.L., Wake, M., Tang, M.L.K., Dharmage, S.C., et al. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 668–676.
- Pabst, R. (1987). The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat. Embryol. (Berl.)* *176*, 135–144.
- Pabst, O., and Mowat, A.M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* *5*, 232–239.
- Palmer, D.J., Metcalfe, J., Makrides, M., Gold, M.S., Quinn, P., West, C.E., Loh, R., and Prescott, S.L. (2013). Early regular egg exposure in infants with eczema: A randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 387–392.
- Pearson, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2012). Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends Immunol.* *33*, 289–296.
- Perkin, M.R., Logan, K., Tseng, A., Raji, B., Ayis, S., Peacock, J., Brough, H., Marrs, T., Radulovic, S., Craven, J., et al. (2016). Randomized Trial of Introduction of Allergenic Foods in Breast-Fed Infants. *N. Engl. J. Med.* *374*, 1733–1743.
- Perrier, C., and Corthésy, B. (2011). Gut permeability and food allergies. *Clin. Exp. Allergy* *41*, 20–28.
- Perrier, C., Thierry, A.-C., Mercenier, A., and Corthésy, B. (2010). Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin. Exp. Allergy* *40*, 153–162.

- Perry, T.T., Matsui, E.C., Kay Conover-Walker, M., and Wood, R.A. (2004). The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J. Allergy Clin. Immunol.* *114*, 144–149.
- Peters, R.L., Dharmage, S.C., Gurrin, L.C., Koplin, J.J., Ponsonby, A.L., Lowe, A.J., Tang, M.L.K., Tey, D., Robinson, M., Hill, D., et al. (2014). The natural history and clinical predictors of egg allergy in the first 2 years of life: A prospective, population-based cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 485–491.
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., and Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 948–956.
- Poulsen, O.M., and Hau, J. (1987). Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the “all or none” determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides. *Clin. Exp. Allergy* *17*, 75–83.
- Prescott, S., and Allen, K.J. (2011). Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr. Allergy Immunol.* *22*, 155–160.
- Prescott, S.L., Smith, P., Tang, M., Palmer, D.J., Sinn, J., Huntley, S.J., Cormack, B., Heine, R.G., Gibson, R.A., and Makrides, M. (2008). The importance of early complementary feeding in the development of oral tolerance: concerns and controversies. *Pediatr. Allergy Immunol.* *19*, 375–380.
- Prescott, S.L., Pawankar, R., Allen, K.J., Campbell, D.E., Sinn, J.K., Fiocchi, A., Ebisawa, M., Sampson, H.A., Beyer, K., and Lee, B.-W. (2013). A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ. J.* *6*, 21.
- Pyrhönen, K., Hiltunen, L., Näyhä, S., Läärä, E., and Kaila, M. (2011). Real-life epidemiology of food allergy testing in Finnish children. *Pediatr. Allergy Immunol.* *22*, 361–368.
- Quake, C., and Nadeau, K.C. (2015). The role of epigenetic mediation and the future of food allergy research. *Semin. Cell Dev. Biol.* *43*, 125–130.
- Radauer, C., and Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 518–525.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., and Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends Food Sci. Technol.* *49*, 24–34.
- Reitsma, M., Westerhout, J., Wichers, H.J., Wortelboer, H.M., and Verhoecx, K.C.M. (2014). Protein transport across the small intestine in food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* *58*, 194–205.
- Remes, S.T., Koskela, H.O., Iivanainen, K., and Pekkanen, J. (2005). Allergen-specific sensitization in asthma and allergic diseases in children: The study on farmers’ and non-farmers’ children. *Clin. Exp. Allergy* *35*, 160–166.
- Riedler, J., Braun-Fahrländer, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., von Mutius, E., et al. (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* *358*, 1129–1133.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., et al. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 638–646.
- Rosenblum, M.D., Way, S.S., and Abbas, A.K. (2015). Regulatory T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 90–101.

- Roth-Walter, F., Berin, M.C., Arnaboldi, P., Escalante, C.R., Dahan, S., Rauch, J., Jensen-Jarolim, E., and Mayer, L. (2008). Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy* 63, 882–890.
- Ruiter, B., and Shreffler, W.G. (2012a). Innate immunostimulatory properties of allergens and their relevance to food allergy. *Semin. Immunopathol.* 34, 617–632.
- Ruiter, B., and Shreffler, W.G. (2012b). The role of dendritic cells in food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 921–928.
- Ruiter, B., Knol, E.F., Van Neerven, R.J.J., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Knulst, A.C., and Van Hoffen, E. (2007). Maintenance of tolerance to cow's milk in atopic individuals is characterized by high levels of specific immunoglobulin G4. *Clin. Exp. Allergy* 37, 1103–1110.
- Rupa, P., and Mine, Y. (2006). Engineered recombinant ovomucoid third domain can modulate allergenic response in Balb/c mice model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 710–717.
- Rupa, P., Schnarr, L., and Mine, Y. (2015). Effect of heat denaturation of egg white proteins ovalbumin and ovomucoid on CD4+ T cell cytokine production and human mast cell histamine production. *J. Funct. Foods* 18, 28–34.
- Sakai, S., Sugawara, T., Kishi, T., Yanagimoto, K., and Hirata, T. (2010). Effect of glucosamine and related compounds on the degranulation of mast cells and ear swelling induced by dinitrofluorobenzene in mice. *Life Sci.* 86, 337–343.
- Sampson, H.A. (2004). Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 805–819.
- Sampson, H.A., Aceves, S., Bock, S.A., James, J., Jones, S., Lang, D., Nadeau, K., Nowak-Wegrzyn, A., Oppenheimer, J., Perry, T.T., et al. (2014). Food allergy: a practice parameter update-2014. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1016–1025.
- Savage, J.H., Matsui, E.C., Skripak, J.M., and Wood, R.A. (2007). The natural history of egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1413–1417.
- Scheurer, S., Toda, M., and Vieths, S. (2015). What makes an allergen? *Clin. Exp. Allergy* 45, 1150–1161.
- Shin, M., Han, Y., and Ahn, K. (2013). The influence of the time and temperature of heat treatment on the allergenicity of egg white proteins. *Allergy. Asthma Immunol. Res.* 5, 96–101.
- Sicherer, S.H. (2011). Epidemiology of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 594–602.
- Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2010). Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 116–125.
- Sicherer, S.H., Furlong, T.J., Maes, H.H., Desnick, R.J., Sampson, H.A., and Gelb, B.D. (2000). Genetics of peanut allergy: A twin study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 53–56.
- Sicherer, S.H., Wood, R.A., Vickery, B.P., Jones, S.M., Liu, A.H., Fleischer, D.M., Dawson, P., Mayer, L., Burks, A.W., Grishin, A., et al. (2014). The natural history of egg allergy in an observational cohort. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 492–499.
- Singh, K., Chang, C., and Gershwin, M.E. (2014). IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 13, 163–177.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13, 139–145.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med. J.* 299, 1259–1260.

- Tan, T.H.-T., Ellis, J.A., Saffery, R., and Allen, K.J. (2012). The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. *Clin. Exp. Allergy* *42*, 20–29.
- Taylor, H.R., English, D.R., Field, B.A., Spicer, P.E., and Graham, D.M. (2012). Prevalence of trachoma in a single community, 1975–2007. *Clin. Exp. Ophthalmol.* *40*, 121–126.
- Tsai, H.-J., Kumar, R., Pongracic, J., Liu, X., Story, R., Yu, Y., Caruso, D., Costello, J., Schroeder, A., Fang, Y., et al. (2009). Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clin. Exp. Allergy* *39*, 101–109.
- Turner, P.J., Mehr, S., Joshi, P., Tan, J., Wong, M., Kakakios, A., and Campbell, D.E. (2013). Safety of food challenges to extensively heated egg in egg-allergic children: a prospective cohort study. *Pediatr. Allergy Immunol.* *24*, 450–455.
- Untersmayr, E. (2015). The influence of gastric digestion on the development of food allergy. *Rev. Fr. Allergol.* *55*, 444–447.
- Untersmayr, E., and Jensen-Jarolim, E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J. Allergy Clin. Immunol.* *121*, 1301–1308.
- Urisu, A., Ando, H., Morita, Y., Wada, E., Yasaki, T., Yamada, K., Komada, K., Torii, S., Goto, M., and Wakamatsu, T. (1997). Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* *100*, 171–176.
- Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., and Pahr, S. (2015). Food allergies—the Basics. *Gastroenterology* *148*, 1120–1131.
- Van Ginkel, C.D., Flokstra-de Blok, B.M.J., Kollen, B.J., Kukler, J., Koppelman, G.H., and Dubois, A.E.J. (2015). Loss-of-function variants of the filaggrin gene are associated with clinical reactivity to foods. *Allergy* *70*, 461–464.
- Van Wijk, F., and Knippels, L. (2007). Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.* *61*, 8–20.
- Ventura, M.T., Polimeno, L., Amoruso, A.C., Gatti, F., Annoscia, E., Marinaro, M., Di Leo, E., Martino, M.G., Buquicchio, R., Bonini, S., et al. (2006). Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig. Liver Dis.* *38*, 732–736.
- Verhoeckx, K., Vissers, Y., Baumert, J.L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guichenev, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., et al. (2015). Food processing and allergenicity. *Food Chem. Toxicol.* *80*, 223–240.
- Vissers, Y.M., Blanc, F., Skov, P.S., Johnson, P.E., Rigby, N.M., Przybylski-Nicaise, L., Bernard, H., Wal, J.-M., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., et al. (2011). Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut. *PLoS One* *6*, e23998.
- Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Watari, E., Shimizu, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K., and Takahashi, H. (2006). Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology* *119*, 167–177.
- Wang, J., and Sampson, H.A. (2011). Food allergy. *J. Clin. Invest.* *121*, 827–835.
- Wang, C.-C., Lin, Y.-R., Liao, M.-H., and Jan, T.-R. (2013). Oral supplementation with areca-derived polyphenols attenuates food allergic responses in ovalbumin-sensitized mice. *BMC Complement. Altern. Med.* *13*, 154.

- Watanabe, H., Toda, M., Sekido, H., Wellner, A., Fujii, T., Henle, T., Hachimura, S., and Nakajima-Adachi, H. (2014). Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalbumin in a murine model of food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* *58*, 394–404.
- Weijers, M., Visschers, R.W., and Nicolai, T. (2002). Light Scattering Study of Heat-Induced Aggregation and Gelation of Ovalbumin. *Macromolecules* *35*, 4753–4762.
- Weijers, M., Broersen, K., Barneveld, P.A., Cohen Stuart, M.A., Hamer, R.J., De Jongh, H.H.J., and Visschers, R.W. (2008). Net charge affects morphology and visual properties of ovalbumin aggregates. *Biomacromolecules* *9*, 3165–3172.
- Woodfolk, J.A. (2007). T-cell responses to allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 280–294.
- Xepapadaki, P., Fiocchi, A., Grabenhenrich, L., Roberts, G., Grimshaw, K.E.C., Fiandor, A., Larco, J.I., Sigurdardottir, S., Clausen, M., Papadopoulos, N.G., et al. (2016). Incidence and natural history of hen's egg allergy in the first 2 years of life-the EuroPrevall birth cohort study. *Allergy* *71*, 350–357.
- Zaborsky, N., Brunner, M., Wallner, M., Himly, M., Karl, T., Schwarzenbacher, R., Ferreira, F., and Achatz, G. (2010). Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *J. Immunol.* *184*, 725–735.





# Thèse de Doctorat

Mathilde CLAUDE

## Agrégation thermique de l'ovalbumine et modulation de l'allergénicité

### Thermal aggregation of ovalbumin and modulation of allergenicity

#### Résumé

L'allergie alimentaire est un problème de santé publique. Si de nombreux allergènes ont été identifiés, les formes sous lesquelles ces protéines doivent être consommées pour être mieux tolérées par le système immunitaire restent méconnues. L'œuf, aliment fréquemment responsable d'allergie alimentaire chez l'enfant, entre dans la composition de nombreux produits alimentaires et est susceptible de subir des traitements thermiques variés. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'effet de l'agrégation protéique induite par traitement thermique sur l'allergénicité d'un allergène majeur de l'œuf, l'ovalbumine (OVA). Une étude a permis de mettre en évidence que l'agrégation de l'OVA module l'allergénicité de la protéine en influençant d'une part la sensibilisation en augmentant la production d'IgG dans un modèle murin et d'autre part le déclenchement en diminuant la capacité de liaison aux IgE et la capacité de dégranulation des basophiles dans le modèle murin et pour des IgE de patients allergiques. Au-delà du phénomène d'agrégation, la structure même des agrégats modifie l'allergénicité de l'OVA. Des agrégats linéaires formés sous des conditions électrostatiques de répulsion induisent une production plus faible d'IgE chez la souris et une diminution du déclenchement par rapport à des agrégats sphériques. L'agrégation de l'OVA modifie également sa capacité à activer des basophiles après digestion et après passage de la barrière intestinale. Tous ces résultats apportent des éléments de compréhension sur la tolérance à l'œuf cuit et permettent ainsi de donner des pistes d'amélioration des procédés alimentaires pour la population à risque d'allergie.

#### Mots clés

**Allergie alimentaire, Œuf, Agrégation protéique, Ovalbumine, IgE, Modèle murin d'allergie, Activation des basophiles**

#### Abstract

Food allergies constitute a public health problem. Many allergens were already identified but the way proteins have to be consumed in order to be more tolerated by immune system remains unknown. Egg, one of the most important causes of food allergy among children, is present in a wide range of food products and is susceptible to be exposed to various thermal treatments. The aim of this work was to evaluate the effect of thermal aggregation of protein on allergenicity of one major allergen within egg, ovalbumin. One study using murine model allowed highlighting that aggregation of OVA modulates allergenicity of the protein by influencing both phases of the allergic reaction. During the sensitization, IgG production increased. Aggregation of ovalbumin also decreased its IgE-binding capacity and basophil activation ability in the murine model and for IgE from egg allergic patients. Beyond the aggregation phenomenon, the structure of aggregates itself modifies the allergenicity of ovalbumin. Aggregates formed under repulsive electrostatic conditions (linear aggregates of few ten nanometers) induced in a murine model lower IgE production during sensitization phase and consequently decreases elicitation phase compared to other aggregates (spherical aggregates of few ten micrometers) formed under different conditions. Aggregation of ovalbumin also modified the basophil degranulation ability after digestion and transport across the epithelial barrier. All these results give some comprehensive elements about tolerance to cooked egg and allowed giving some clues to enhance food technologic process for children with a risk to develop allergy.

#### Key Words

**Food allergy, Egg, Protein Aggregation, Ovalbumin, IgE, Murine model of food allergy, Basophil Activation**